



**HAL**  
open science

# UTILISATION INTEGREE DE BIOINDICATEURS POUR LA SURVEILLANCE DES SOLS ET DES ECOSYSTEMES TERRESTRES

Clémentine Fritsch

► **To cite this version:**

Clémentine Fritsch. UTILISATION INTEGREE DE BIOINDICATEURS POUR LA SURVEILLANCE DES SOLS ET DES ECOSYSTEMES TERRESTRES. Ecologie, Environnement. Université de Franche-Comté, 2010. Français. NNT: . tel-00524516

**HAL Id: tel-00524516**

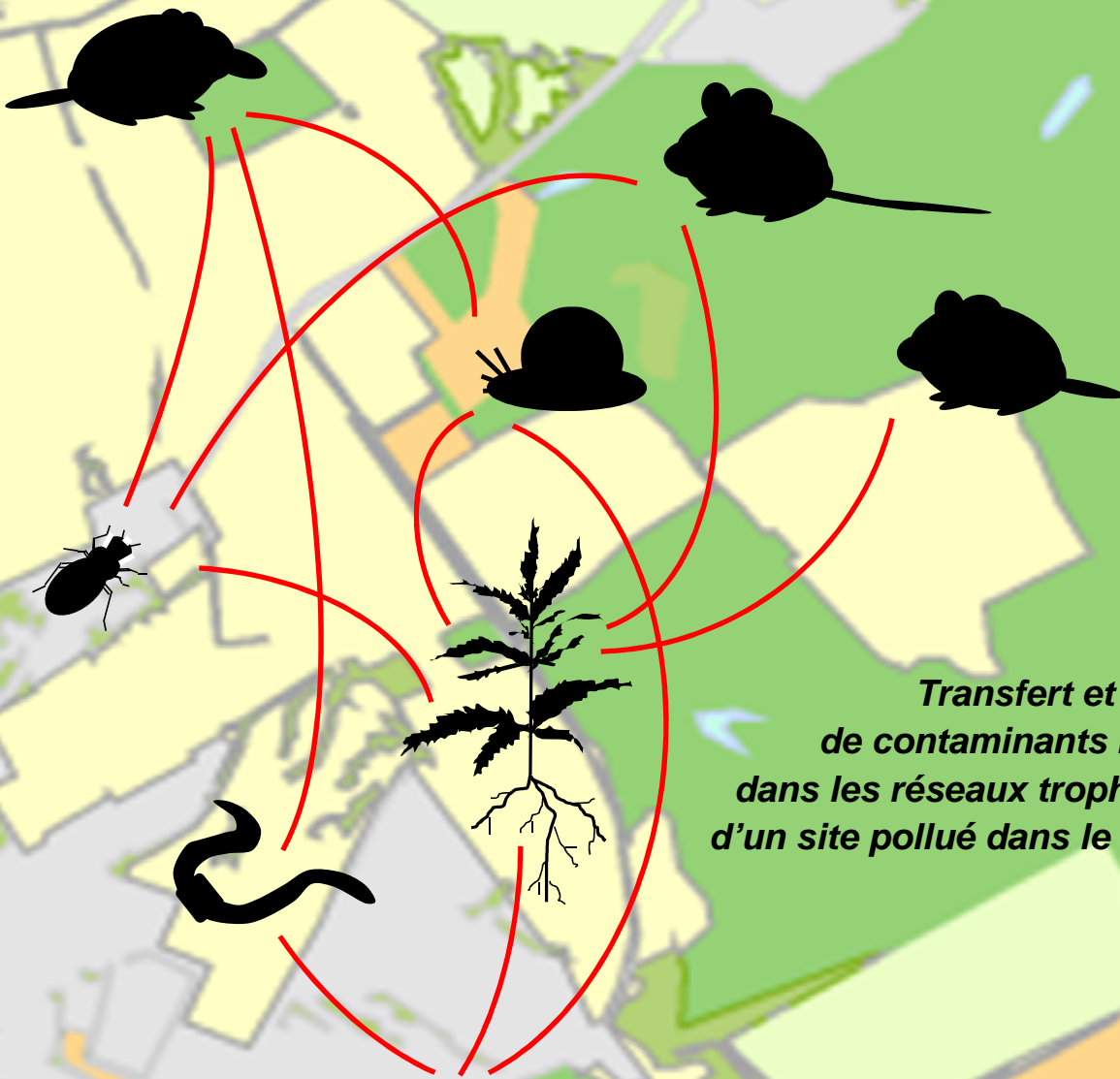
**<https://theses.hal.science/tel-00524516>**

Submitted on 8 Oct 2010

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# UTILISATION INTEGREE DE BIOINDICATEURS POUR LA SURVEILLANCE DES SOLS ET DES ECOSYSTEMES TERRESTRES



*Transfert et effets  
de contaminants métalliques  
dans les réseaux trophiques terrestres  
d'un site pollué dans le Nord de la France*

**Cd Pb Zn**



**Clémentine Fritsch**



UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE  
U.F.R. DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
Laboratoire Chrono-Environnement (UMR CNRC/UFC 6249, Usc INRA)

# THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE  
Spécialité : Sciences de la Vie et de l'Environnement  
Ecole doctorale : Homme, Environnement, Santé

## UTILISATION INTEGREE DE BIOINDICATEURS POUR LA SURVEILLANCE DES SOLS ET DES ECOSYSTEMES TERRESTRES

par

**Clémentine FRITSCH**

Soutenue le 3 mai 2010 devant le jury composé de :

<b>Françoise BUREL</b> (Directrice de Recherche, CNRS, Rennes)	Rapporteur
<b>Thierry CAQUET</b> (Directeur de Recherche, INRA, Rennes)	Rapporteur
<b>Annette DE VAUFLEURY</b> (MCF HDR, Université de Franche-Comté, Besançon)	Directrice
<b>Michaël COEURDASSIER</b> (MCF, Université de Franche-Comté, Besançon)	Co-directeur
<b>Pierre-Marie BADOT</b> (Professeur, Université de Franche-Comté, Besançon)	Examineur
<b>Cornelis A.M. VAN GESTEL</b> (Professeur, Université de Vrije, Amsterdam)	Examineur
<b>Cécile GRAND</b> (Dr, ADEME, Angers)	Examinatrice



## **Remerciements**

J'ai réfléchi à de nombreux moyens de présenter ces remerciements sous une forme un tant soit peu originale et ludique (et courte !). Cependant, je souhaite remercier les nombreuses de personnes qui ont participé à ce travail dans différents plans. La liste des remerciés est longue, mais n'y voyez pas de complaisance. Cette thèse représente un investissement personnel mais aussi un travail d'équipe... Alors je me lance dans une liste à la Prévert, moins poétique et pas très originale certes, mais que j'espère exhaustive et dans laquelle je place mes sentiments les plus sincères.

Je souhaite en premier lieu remercier mes directeurs de thèse et responsables du programme STARTT sans lesquels rien de tout ceci n'aurait été possible : Annette de Vaufleury, Michaël Cœurduassier et Renaud Scheiffler. Je les remercie tout particulièrement pour leur implication, pour le temps qu'ils m'ont consacré, leur enthousiasme, leurs conseils, leur soutien, leur connaissance encyclopédique de la bibliographie, leur questionnement scientifique. Remerciements tous particuliers à Patrick Giraudoux et Francis Raoul qui m'ont aidé au cours de mes travaux à bien des niveaux...J'ai été très heureuse de travailler avec eux lors des sessions de terrain et de profiter de leur expérience naturaliste et scientifique pour la capture de micromammifères et d'oiseaux. Leurs conseils et leur aide pour le traitement statistique des données ont été d'une grande importance pour mener à bien ma thèse. Leur grande culture scientifique et leur passion pour transmettre leurs savoirs sont de réels moteurs pour un doctorant !

J'ai eu l'opportunité de participer à plusieurs collaborations au cours de ma thèse, et je souhaite témoigner ma gratitude à ces collaborateurs. Je remercie l'équipe du Laboratoire Sols et Environnement de l'Institut Supérieur d'Agriculture et plus particulièrement Francis Douay et Christelle Pruvot : bien sûr pour la gestion des prélèvements et de l'analyse des sols, mais aussi pour leurs conseils. Merci 1000 fois aux dijonnais Bruno Faivre et Paul Alibert pour leur participation... Tant pour leur aide, leur savoir-faire, leurs connaissances, que leur bonne humeur ! Merci aussi pour les réponses électroniques détaillées de Bruno aux mails inquiets depuis le Ch'Nord. Richard Cosson s'est impliqué avec enthousiasme dans les manips sur les MTs, m'a chaleureusement accueillie à Nantes au sein du laboratoire ISOMER et a pris le temps d'effectuer plusieurs déplacements en Franche-Comté pour participer aux réunions et à l'analyse des données. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude pour tout cela, mais aussi pour ses conseils pour la rédaction et sa grande connaissance du dosage de MTs et de la physiologie des métaux. Et puis merci beaucoup tout simplement pour la sympathie qu'il m'a témoignée.

La citation d'Albert Einstein « *C'est le rôle essentiel du professeur d'éveiller la joie de travailler et de connaître* » pourrait fort bien être dédiée à mes encadrants et co-auteurs. Je leur suis très reconnaissante d'avoir eu l'occasion de faire ma thèse avec eux, et d'avoir répondu présent à tous les moments, même pour des questions stats au café ou un vendredi tard alors qu'on pourrait croire que c'est déjà le week-end... Je voudrais aussi leur exprimer ma reconnaissance pour m'avoir permis divers déplacements à l'étranger (congrès, short-course) qui m'ont beaucoup apporté sur le plan personnel et professionnel.

Je remercie bien sûr les financeurs de mon allocation de recherche : l'ADEME et le Conseil régional de Franche-Comté. Je remercie tout particulièrement Cécile Grand qui a été l'ingénieur ADEME en charge du suivi de ma thèse. Merci à Cécile pour son implication dans le suivi de mes travaux et les discussions scientifiques (en réunion et en congrès...) que nous avons eues.

Je souhaite également témoigner ma gratitude aux directeur et directeurs adjoints de l'UMR Chrono-environnement, Hervé Richard, Pierre-marie Badot, Patrick Giraudoux, Didier Marquer et Jean-François Viel pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Je tiens à remercier les différentes personnes qui nous ont accueillis et donné l'accès aux terrains d'étude lors de nos travaux dans le Nord Pas-de-Calais. Tout d'abord la famille Desruelles qui nous a chaleureusement accueillis dans leur gîte. Mais aussi Mr Bizard, Mr des Rotours, Mr Dutailis, Mme Dziuba, Mr Meurice, Mr Rémy, Mr Rousseau, Mr et Mme Royaux, Mr Thibault, Mme Vanveuren, Mr et Mme Wlodarczyk, les communes d'Evin-Malmaison et Courcelles-Lès-Lens ainsi que la Communauté de communes du pays de Pévèle (et Mme Uhrès) et l'Office Nationale des Forêts pour nous avoir donné l'accès à leurs terrains. Je souhaite également exprimer ma gratitude à Mr Demarquette, Mr Houfflin, Mr Legay et Mr Zieske pour leur accueil sympathique lors de l'accès aux sites d'étude.

Je remercie chaleureusement Hélène Roussel que j'ai rencontrée lors des sessions d'échantillonnage alors qu'elle travaillait au LSE. Merci beaucoup, Hélène, pour tes conseils scientifiques mais aussi pour les bons moments passés sur le terrain et les distractions du week-end dans le Nord Pas de Calais, entre estaminets, bals folks et ballades à cheval. J'espère bien que nos 2 pies en M pourront se rencontrer à l'occasion d'expéditions bretonnes... Je souhaite également remercier les étudiants que j'ai encadrés de près ou de loin lors de leurs stages de Master 1 ou 2. J'ai appris beaucoup grâce à eux et ils ont participé activement à l'avancée des manips de STARTT, j'espère que moi aussi je leur ai été un peu utile... Pierre-Emmanuel Baurand, Océane Contoz, Elie Dhivert, Séverine Drouhot, Willy Gerbaud, Alice Labourier, Jonathan Paris, Pierre-Yves Peseux, Anne-Sophie Prudent et Nicolas Tête.

Merci au personnel technique du laboratoire et aux contractuels pour leur aide précieuse et leur compagnie agréable : Simon-Pierre Babski, Nadia Crini, Jean-Claude Lambert, Christiane Lovy, Bruno Régent, Dominique Rieffel et Thomas Schneider. Leur sympathie et leur bonne humeur sont restées intactes, même aux aurores après de courtes nuits pour les manips de terrain, lors des longues journées de dissection parfois éprouvantes pour le nez (un organisme décongelé, quoi qu'on en dise et malgré l'habitude, dégage une odeur nauséabonde) et quand le spectro était dans un mauvais jour du genre cuvette graphite qui fait des siennes... Bien sûr, je remercie également Françoise Gualdi et Brigitte Jolibois. Je souhaite également remercier Lucien Gomot.

Toute ma reconnaissance aux MCF ou Pr du labo ... Pour leurs conseils et leur sympathie. La liste serait très longue, je ne la ferai donc pas mais ils se reconnaîtront. Merci tout particulièrement à « l'équipe du RU », les repas du midi ont été autant l'occasion de moments agréables pour décompresser, que le lieu de discussions scientifiques et générales où j'ai appris bien des choses sur la recherche, le métier de chercheur et le fonctionnement d'un laboratoire. Je souhaite également remercier les différents « patrons » qui m'ont embauchée l'année précédant le début de la thèse et permis de cette manière d'attendre une allocation de recherche pour mener à bien ce sujet : Thomas Déforêt, Michaël Cœurassier, Patrick Giraudoux, Mickaël Sage, Nadine Bernard, Daniel Gilbert et Renaud Scheifler. Merci particulier à mes collègues de bureau pour l'ambiance et la convivialité, les discussions diverses et variées et même parfois sérieuses ! Et les pauses réconfortantes. Alors merci Carotte, Hung, Olivier, Caro, François, Benjamin, Manon, Séverine, Micha et merci Sam. Merci aussi aux anciens ou encore thésards du labo et aux contractuels (je pense aux collègues de promo de longue date) pour leur soutien. En particulier pour Fred et Amélie : j'espère d'autres occasions de discuter collaborations devant une mousse ou un ordinateur...

Je souhaite aussi remercier les chercheurs qui m'ont répondu très gentiment lorsque je leur demandais des TAP, qui se sont montrés aimables et accessibles lors des congrès ou encore qui m'ont dit un petit mot sur une com' ou une publi. Je leur dois une bonne part de « re » motivation lors des moments de doute.

Remerciements chaleureux à mes proches qui m'ont donné le goût du travail et de la curiosité. Ils m'ont également permis de poursuivre les études universitaires qui m'ont menée jusqu'ici. Merci aussi pour leur soutien et merci frangine pour ton oreille attentive et tes encouragements. Toute ma sympathie aux zamis pour leur présence chaleureuse (Tom, Thomas, Francis, Catherine, Laurence, Anne-Fatou, Ludo, Isabelle et Xavier, Alain et Claudine...). Merci beaucoup Julie pour avoir pris soin du « gros » pendant mes absences prolongées chez les Ch'tis. Grand merci aux Eguilléens Dom', Anne-Claude, Alaïs et Auriane pour le soutien au quotidien, les soins au « gros » et les bons moments de détente équestres et autres. Toute ma gratitude à Edwige, Jacky et Gautier pour leur soutien et leur gentillesse.

Merci à mon compagnon bien évidemment. Merci énormément pour tout, tout bonnement et très sincèrement. Enfin, les derniers mots sont pour Mystère de l'Ouest qui ne lira jamais ce manuscrit, alors que pourtant cela l'intéresserait sans aucun doute. Grâce à lui, j'ai pu garder (enfin je crois !) *mens sans in corpore sano* et maintenir le cap !

*Le campagnol est un animal qui, tué en quantité suffisante et dans des conditions contrôlées, produit une thèse de doctorat.*

--- Woody Allen (adapté de)

## **Avant-propos : financement de la thèse, collaborations et comité de pilotage**

Le fonctionnement des travaux menés durant la thèse a été assuré par le programme de recherche STARTT « Spatialisation des Transferts dans les Réseaux Trophiques Terrestres ». Ce programme était co-financé par l'ANR (*Agence Nationale de la Recherche*, contrat n°ANR-05-ECCO-004) et l'ADEME (*Agence de l'Environnement et de la maîtrise de l'Energie*, contrat n°0572C0058).

L'allocation de recherche qui m'a permis de réaliser ma thèse était co-financée par l'ADEME et le Conseil Régional de Franche-Comté (01/09/2006 au 31/08/09).

Cette thèse s'est déroulée en collaboration avec différents laboratoires, le laboratoire d'accueil étant le Laboratoire Chrono-Environnement (LCE). Parmi les différents laboratoires impliqués dans la réalisation du programme, nous ne citerons ci-après (Tableau 1) que ceux qui ont réalisé des collaborations sur la partie « études *in situ* sur le site de Metaleurop » du programme STARTT, car la thèse s'est inscrite dans cette partie seulement.

**Tableau 1.** Laboratoires impliqués dans la réalisation du programme STARTT dans le cadre des collaborations sur la partie « études *in situ* sur le site de Metaleurop ».

<b>Intitulé du laboratoire</b>	<b>Sigle</b>	<b>Organisme(s) de tutelle</b>	<b>Adresse</b>	<b>Responsable</b>	<b>Statut du responsable</b>
Biogéosciences UMR 5561	BGS	Université de Bourgogne et CNRS	Dijon	Bruno Faivre	PRU
EA 2160 MMS (Mer, Molécules, Santé) ISOMer	EMI	Université de Nantes	Nantes	Richard Cosson	CR1-CNRS
Laboratoire Sols et Environnement	LSE	Institut supérieur d'agriculture de Lille	Lille	Francis Douay	MCF
Géochimie de l'environnement	GE	Université Joseph Fourier de Grenoble, CNRS	Grenoble	Alain Manceau	DR
Centre d'Etudes Biologiques de Chizé	CEBC	CNRS	Chizé	Olivier Chastel	CR

Un comité de pilotage comportant les membres suivant a été constitué au cours de la thèse :

Michaël Cœurassier (Co-directeur de thèse, LCE)

Francis Douay (LSE, Lille)

Bruno Faivre (BGS, Dijon)

Patrick Giraudoux (LCE)

Cécile Grand (ADEME)

André Pierre (Conseil Régional)

Francis Raoul (LCE)

Renaud Scheiffler (LCE)

Annette de Vaufleury (Directrice de thèse, LCE)





## Sommaire

<b>Remerciements</b>	1
<b>Avant-propos : financement de la thèse, collaborations et comité de pilotage</b>	3
<b>Sommaire</b>	5
<b>Liste des publications relatives à la thèse</b>	9
<b>Liste des abréviations et symboles</b>	11
<b>Liste des figures</b>	12
<b>Liste des tableaux</b>	15

## **PARTIE 1. INTRODUCTION GENERALE** 17

I.1. Introduction	19
I.1.1. Contexte général	19
I.1.2. Pollution des sols par les éléments traces métalliques (ETMs)	22
I.1.3. Transfert des ETMs dans les écosystèmes	32
I.1.4. Réponses des organismes aux ETMs	42
I.1.5. Evaluation du risque environnemental (ERE)	56
I.1.6. Facteurs de variabilité des réponses des organismes exposés aux ETMs	60
I.2. Synthèse et objectifs	77
I.2.1. Synthèse	77
I.2.2. Objectifs	79

## **PARTIE 2. MATERIELS ET METHODES** 81

II.1. Présentation du site d'étude	83
II.1.1. Localisation et historique du site	83
II.1.2. Contamination des sols des alentours de Metaleurop	83
II.2. Détermination de la stratégie d'échantillonnage	86
II.2.1. Démarche générale	86
II.2.2. Définition d'une grille d'échantillonnage	87
II.2.3. Analyse paysagère	87
II.2.4. Niveau de contamination des sols en ETMs	89
II.2.5. Choix des stations d'étude pour les prélèvements des sols et des bioindicateurs	89
II.3. Protocoles d'échantillonnage <i>in situ</i> (Bioindication passive)	98
II.3.1. Echantillonnage des sols	98
II.3.2. Echantillonnage des micromammifères	99
II.3.3. Echantillonnage des mollusques gastéropodes	100
II.4. Protocole d'exposition en microcosmes <i>in situ</i> (Bioindication active)	101
II.4.1. Elevage des escargots	101
II.4.2. Exposition <i>in situ</i>	101

II.5. Protocoles d'analyse en laboratoire	104
II.5.1. Identification à l'espèce	104
II.5.2. Dissections	104
II.5.3. Analyses des sols	106
II.5.4. Dosage des ETMs dans les matrices biologiques	106
II.6. Cartographie des contaminations des sols : prédiction des concentrations en ETMs dans les sols	107
II.6.1. Données disponibles	107
II.6.2. Analyse de la composition paysagère	107
II.6.3. Prédiction des concentrations totales et extractibles dans les sols ligneux : variographie et interpolation par krigeage ordinaire	108
II.6.4. Prédiction des concentrations totales pour tous types de sols : variographie et interpolation par krigeage universel	109
II.6.5. Cartes prédites des concentrations en ETMs dans les sols	110
II.7. Récepteurs capturés	117
II.7.1. Micromammifères	117
II.7.2. Mollusques gastéropodes	117
<b>PARTIE 3. RESULTATS</b>	<b>123</b>
III.1. Chapitre 1. Variabilité spatiale des contaminations des sols ligneux	125
Résumé	125
Abstract	126
III.1.1. Introduction	127
III.1.2. Materials and methods	128
III.1.3. Results	133
III.1.4. Discussion	144
III.1.5. Conclusions	150
III.1.6. References	151
III.1.7. Supplementary Materials	155
III.2. Chapitre 2. Variabilité spatiale des contaminations des organismes	157
Résumé	157
Abstract	158
III.2.1. Introduction	159
III.2.2. Materials and methods	162
III.2.3. Results	169
III.2.4. Discussion	181
III.2.5. Conclusions	187
III.2.6. References	188
III.2.7. Supporting information	192

III.3. Chapitre 3. Variabilité inter-individuelle des réponses des micromammifères à la contamination environnementale _____	197
Résumé _____	197
Abstract _____	198
III.3.1. Introduction _____	199
III.3.2. Materials and methods _____	200
III.3.3. Results _____	207
III.3.4. Discussion _____	215
III.3.5. Conclusions _____	223
III.3.6. References _____	224
 Résultats complémentaires : Rôle des métallothionéines dans la protection contre le stress induit par les métaux _____	 227
 III.4. Chapitre 4. Variabilité temporelle de l'accumulation des ETMs chez le campagnol roussâtre _____	 233
Résumé _____	233
Abstract _____	234
III.4.1. Introduction _____	235
III.4.2. Materials and methods _____	235
III.4.3. Results _____	237
III.4.4. Discussion _____	240
III.4.5. Conclusions _____	242
III.4.6. References _____	243
 III.5. Chapitre 5. Variabilité inter-populationnelle des réponses à la contamination de l'environnement : capacités d'adaptation des escargots _____	 245
Résumé _____	245
Abstract _____	246
III.5.1. Introduction _____	248
III.5.2. Materials and methods _____	251
III.5.3. Results _____	256
III.5.4. Discussion _____	268
III.5.5. Conclusions _____	277
III.5.6. References _____	278

**PARTIE 4. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES \_\_\_\_\_ 283**

IV.1. Synthèse des résultats _____	285
IV.2. Discussion _____	287
IV.2.1. Transfert des ETMs dans les réseaux trophiques _____	287
IV.2.2. Réponses des récepteurs à la contamination de l'environnement : paramètres d'effets _____	296

IV.2.4. Les apports d'une approche intégrée et implications dans le cadre de l'évaluation du risque environnemental _____	305
IV.2.5. Conclusions _____	308
IV.3. Perspectives _____	311
IV.3.1. Exposition des organismes et transfert dans les réseaux trophiques _____	311
IV.3.2. Impacts directs et indirects des ETMs sur les individus, les populations et les communautés _____	312
IV.3.3. Mettre plus d'« éco » dans l'écotoxicologie _____	314
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES _____</b>	<b>315</b>
<b>ANNEXES _____</b>	<b>337</b>
<b><i>Extended abstract</i> _____</b>	<b>343</b>
<b><i>Résumé étendu</i> _____</b>	<b>345</b>

## Liste des publications relatives à la thèse

### Publications

- C. Fritsch, P. Giraudoux, M. Cœurdassier, F. Douay, F. Raoul, C. Pruvot, C. Waterlot, A. de Vaufleury, R. Scheifler. 2010. *Spatial distribution of metals in smelter-impacted soils of woody habitats: influence of landscape and soil properties, and risk for wildlife*. Chemosphere, 81 (2):141-155.
- C. Fritsch, R. P. Cosson, M. Cœurdassier, F. Raoul, P. Giraudoux, N. Crini, A. de Vaufleury, R. Scheifler. 2010. *Responses of wild small mammals to a pollution gradient: host factors influence metal and metallothionein levels*. Environmental Pollution, 158 (3): 827-840.
- F. Douay, C. Pruvot, C. Waterlot, C. Fritsch, H. Fourrier, A. Loriette, G. Bidar, C. Grand, A. de Vaufleury, R. Scheifler. 2009. *Contamination of woody habitat soils around a former lead smelter in the North of France*. Science of the Total Environment, 407 (21): 5564-5577.
- A. de Vaufleury, C. Fritsch, F. Gimbert, B. Pauget, M. Coeurdassier, N. Crini, R. Scheifler. 2009. *Utilisation et intérêts des escargots et des micromammifères pour la bioindication de la qualité des sols*. Etude et Gestion des Sols, 16 (3/4): 203-218.

### Conférences internationales

- C. Fritsch, M. Coeurdassier, F. Raoul, P. Giraudoux, A. de Vaufleury, R. Scheifler. *Trace metal accumulation and effects in bank voles: inter-annual and inter-seasonal variations*. SETAC Europe 20th Annual Meeting, 23-27 May 2010, Sevilla, Spain. Communication orale.
- C. Fritsch, M. Coeurdassier, F. Gimbert, N. Crini, R. Scheifler, A. de Vaufleury. *Lack of evidence of adaptation in metal accumulation of the garden snail exposed in the field*. SETAC Europe 20th Annual Meeting, 23-27 May 2010, Sevilla, Spain. Poster.
- C. Fritsch, R. Cosson, M. Cœurdassier, F. Raoul, P. Giraudoux, F. Douay, A. de Vaufleury, R. Scheifler. *Environmental and biological factors affecting metal and metallothionein levels in small mammals*. SETAC Europe 19th Annual Meeting, 31 May-4 June 2009, Göteborg, Sweden. Communication orale.
- R. Scheifler, C. Fritsch, B. Faivre, M. Cœurdassier, F. Raoul, P. Giraudoux, O. Chastel, F. Douay, A. de Vaufleury A. *Accumulation and effects of Cd, Pb and Zn in blackbirds (Turdus merula) along a heavy metal pollution gradient*. SETAC Europe 19th Annual Meeting, 31 May-4 June 2009, Göteborg, Sweden. Poster.
- R. Scheifler, F. Douay, C. Fritsch, M. Cœurdassier, V. Sappin-Didier, H. Martin, W. Boireau, O. Chastel, B. Faivre, R. Cosson, R. Dallinger, A. Manceau, C. Grand, F. Raoul, P. Giraudoux, A. de Vaufleury. *Bioavailability, transfer and effects of trace metal elements in food webs of a terrestrial ecosystem: changes of spatial scale and of biological level*. Congrès ConSoil, 3-6 juin 2008, Milan, Italie. Poster.
- C. Fritsch, M. Cœurdassier, R. Scheifler, F. Raoul, F. Douay, N. Crini, A. de Vaufleury. *Accumulation and effects of Cd, Pb and Zn in the bank vole: influence of environmental (landscape) and biological factors*. SETAC Europe 18th Annual Meeting, 25-29 May 2008, Warsaw, Poland. Communication orale.

## Conférences nationales

- R. Scheifler, C. Fritsch, M. Cœurassier, F. Raoul, P. Giraudoux, R. Cosson, O. Chastel, B. Faivre, F. Douay, A. de Vaufleury. *Biodisponibilité, transfert et effets d'éléments traces métalliques dans les réseaux trophiques*. 2èmes rencontres nationales de la recherche sur les sites et sols pollués, 20-21 octobre 2009, Paris, France. Communication orale.
- C. Fritsch, M. Cœurassier, R. Scheifler, F. Raoul, F. Douay, A. Labourier, N. Crini, A. de Vaufleury. *Contamination en cadmium et plomb et état de santé du campagnol roussâtre (Clethrionomys glareolus) sur un site industriel pollué*. Forum des Jeunes Chercheurs, 14-15 juin 2007, Dijon, France. Communication orale.

## Vulgarisation

- « *Pollution : les escargots jouent les indics* ». 2008. Rédaction Laurianne Geffroy, réalisation Jean-Pierre Courbatze, Ya+K productions, durée 6 min 24. Reportage diffusé à la Cité des Sciences et de l'Industrie, La Villette, Paris. 2008.
- « *Les animaux sentinelles* ». 2007. Réalisation Kamel Kezadri, Mona Lisa productions, durée 52 min. Documentaire diffusé par ARTE en 2008.
- « *Vous prendrez bien un peu de polluant dans votre chaîne alimentaire ?* ». 18 mai 2008. Journal « La Voix du Nord », rédaction Pierre-Laurent Flamen.
- « *Etude sur la pollution par les métaux lourds : un coin de Pévèle sert de référence zéro* ». 08 juin 2008. Journal « La Voix du Nord ».

## **Liste des abréviations et symboles**

ADN : acide désoxyribonucléique  
AFNOR : association française de normalisation  
ALAD : acide delta-aminolévulinique déhydratase  
ANOVA : analyse de variance  
BCI : body condition index  
BSAF : biota-soil accumulation factor (facteur d'accumulation sol-organisme)  
Ca : calcium  
CaCl<sub>2</sub> : chlorure de calcium  
CaCO<sub>3</sub> : carbonate de calcium  
Cd : cadmium  
CEC : capacité d'échange cationique  
CO : carbone organique  
Cu : cuivre  
DTPA : acide éthylène triamine pentaacétique  
EC50 : concentration pour laquelle 50% de l'effet maximum relevé est observée  
Eco-SSL(s) : ecological soil screening level(s)  
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique  
EEA : European environment agency  
ERE : évaluation du risque environnemental ou évaluation du risque écologique  
ERA : ecological risk assessment  
ETM(s) : élément(s) trace(s) métallique(s)  
HI : hepatic index (indice hépatique)  
IA : indice d'adiposité  
ICC : indice de condition corporelle  
IH : indice hépatique (en anglais : hepatic index HI)  
II : indice immunitaire  
IR : indice rénal (en anglais : renal index RI)  
ISO : organisation internationale de normalisation  
LCE : Laboratoire Chrono-Environnement (UMR 6249 UFR/CNRS usc INRA, Besançon)  
LOAEL(s) : lowest observed adverse effect levels  
LSE : Laboratoire Sols et Environnement (Institut Supérieur d'Agriculture, Lille)  
Mg : magnésium  
MO : matière organique  
MT(s) : métallothionéine(s)  
NaNO<sub>3</sub> : nitrate d'ammonium  
NOAEL(s) : no observed adverse effect levels  
Pb : plomb  
PBT(s) : agents chimiques persistant(s), bioaccumulatif(s) et toxique(s)  
PEC : predicted environmental concentration  
pH : potentiel hydrogène  
PNEC : predicted no-effect-concentration  
POP(s) : polluant(s) organique(s) persistant(s)  
RI : renal index (indice rénal)  
SIG : système d'information géographique  
TRV(s) : toxicity reference value(s)  
US EPA : United State environmental protection agency  
Zn : zinc



## Liste des figures

### PARTIE I

- Figure I.1.1. Modèle général décrivant les pools d'accumulation et les voies de transfert majeurs des éléments dans les écosystèmes terrestres (Adriano, 2001).
- Figure I.1.2. Proportions relatives des différences sources d'apports de métaux dans les sols agricoles au Pays de Galle et en Angleterre (Adriano, 2001).
- Figure I.1.3. Concentrations en Cd dans le sol ( $\text{mg.kg}^{-1}$  masse sèche) dans la plaine inondable de Afferdensche en Deestsche Waarden aux Pays-Bas (Schipper et al., 2008).
- Figure I.1.4. Schéma synoptique des processus d'interactions clés affectant la partition des ETMs entre les phases liquides et solides dans les sols.
- Figure I.1.5. Bilan des contaminants affectant les sols et eaux souterraines en Europe (European Environment Agency, 2006).
- Figure I.1.6. Modèle conceptuel pour l'exposition directe et indirecte des récepteurs écologiques aux contaminants présents dans les sols (McGeer et al., 2004).
- Figure I.1.7. Représentation schématique du concept de biodisponibilité et des concepts associés.
- Figure I.1.8. Méthodes d'évaluation de la biodisponibilité : relations conceptuelles entre tests chimiques et biologiques et bioaccumulation (Harmsen, 2007).
- Figure I.1.9. Principaux types de pyramides concentrations résultant du transfert trophique des polluants dans les réseaux trophiques.
- Figure I.1.10. Modèle général décrivant le devenir des ETMs. Adapté de (Walker et al., 2006).
- Figure I.1.11. Schéma représentant l'hypothèse générale concernant l'importance des différentes fractions de métal dans un organisme pour la description des patrons d'accumulation, de toxicité et de transfert trophique. La taille des fractions visualisées correspond à la distribution habituellement observées dans les organismes invertébrés (Vijver et al., 2004).
- Figure I.1.12. Relations entre performance (P) (croissance, fécondité, survie, autres paramètres de santé...) et concentrations en élément essentiel ( $C_e$ ) ou non-essentiel ( $C_{ne}$ ) dans la nourriture des organismes. Adapté de (Walker et al., 2006).
- Figure I.1.13. Etapes de l'évaluation des risques liés aux agents chimiques recommandée en Europe (European Commission, 2003).
- Figure I.1.14. Schéma synoptique des niveaux d'organisation entre lesquels des différences de réponses aux ETMs (bioaccumulation, effets) peuvent apparaître et processus à l'origine de ces différences.
- Figure I.1.15. a. Schéma synoptique des facteurs du récepteur ou qui affectent l'accumulation et les effets des métaux, ou d'autres contaminants. b. Facteurs liés au récepteur affectant la vulnérabilité des récepteurs écologiques à la contamination en ETMs. (Peakall and Burger, 2003).
- Figure I.1.16. Voie d'exposition contribuant à l'exposition des vertébrés terrestres aux contaminants, leur contribution relative et leur degré de compréhension par les écotoxicologues pour les oiseaux (a), les mammifères (b), les reptiles (c) et les amphibiens (d) (Smith et al., 2007).
- Figure I.1.17. Influence théorique du paysage sur l'accumulation d'un polluant par un récepteur.
- Figure I.1.18. Influence théorique des interactions entre pollution et paysage conduisant à une forme de fragmentation de l'habitat
- Figure I.1.19. Exemple théorique des impacts d'une pollution sur les populations suivant une dynamique métapopulationnelle dans 2 paysages différents (A et B).
- Figure I.1.20. Implication du paysage dans l'exposition des organismes aux ETMs et dans leurs effets.
- Figure I.1.20. Relations entre échelles spatiales, temporelles, niveaux d'organisation et évaluation du risque (EcoRA : ecological risk assessment, évaluation du risque environnemental) (Kapustka, 2008).
- Figure I.2.1. Position des chapitres de la thèse dans le cadre global du transfert et des effets des ETMs dans les milieux terrestres et récepteurs étudiés.

### PARTIE II

- Figure II.2.1. (a). Localisation géographique du secteur d'étude et grille d'échantillonnage. (b). Grille étendue et numérotation des mailles.
- Figure II.2.2. Carte d'occupation des sols sur la zone d'étude.
- Figure II.2.3. Carte d'usage des sols sur la zone d'étude.
- Figure II.2.4. (a) Représentation graphiques de l'AFC. (b) Poids des variables sur les axes 1, 2 et 3 de l'AFC. (c) Dendrogramme issu de la classification ascendante hiérarchique (distance euclidienne, liens complets) permettant d'identifier les groupements.
- Figure II.2.5. Types paysagers des mailles de la zone d'étude.
- Figure II.2.6. Courbes d'iso-concentration en Pb des sols agricoles du secteur de Metaleurop (données du LSE).
- Figure II.2.7. Localisation des 32 et 3 mailles retenues.

- Figure II.2.8. Localisation des 3 mailles dans la zone d'échantillonnage et des 2 témoins externes et photographies aériennes.
- Figure II.3.1. Exemple de mailles possédant une seule tache ligneuse (a : paysage type agricole) et 10 taches ligneuses (b : paysage type bosquets/friches).
- Figure II.3.2. Pièges mis en place dans différents milieux ligneux.
- Figure II.3.3. Exemple de disposition des 10 lignes de pièges pour les micromammifères dans les taches ligneuses où les sols ont été échantillonnés (maille 117).
- Figure II.4.1. Photographie des espèces étudiées. (a). Individu adulte de l'espèce *Cantareus aspersus* (ex-*Helix aspersa*) l'escargot petit-gris. (b). Individu adulte de l'espèce *Cepaea nemoralis* l'escargot des bois..
- Figure II.4.2. (a). Elevage des adultes pour la reproduction. (b). Prélèvements des pontes. (c). Eclosion des pontes. (d). Elevage des juvéniles.
- Figure II.4.3. (a). Introduction des escargots dans un microcosme. (b). Microcosmes mis en place.
- Figure II.4.4. Localisation des microcosmes sur les mailles témoin et contaminée.
- Figure II.6.1. Données disponibles pour les points d'échantillonnage de sol. Exemple d'un point (W-1) ligneux dans un paysage dominé par le milieu urbain dans un périmètre de 300 m.
- Figure II.6.2. Courbes d'iso-concentration des concentrations totales en Cd, Pb et Zn dans les sols ligneux ( $\text{mg.kg}^{-1}$  masse sèche).
- Figure II.6.3. Courbes d'iso-concentration des concentrations extractibles ( $\text{CaCl}_2$ ) en Cd, Pb et Zn dans les sols ligneux ( $\text{mg.kg}^{-1}$  masse sèche).
- Figure II.6.4. Surfaces d'iso-concentration des concentrations totales en Cd, Pb et Zn dans les sols ligneux ( $\text{mg.kg}^{-1}$  masse sèche).
- Figure II.6.5. Surfaces d'iso-concentration des concentrations extractibles ( $\text{CaCl}_2$ ) en Cd, Pb et Zn dans les sols ligneux ( $\text{mg.kg}^{-1}$  masse sèche).
- Figure II.6.6. Courbes d'iso-concentration des concentrations totales en Cd, Pb et Zn dans tous les sols ( $\text{mg.kg}^{-1}$  masse sèche).
- Figure II.6.7. Surfaces d'iso-concentration des concentrations totales en Cd, Pb et Zn dans tous les sols ( $\text{mg.kg}^{-1}$  masse sèche).
- Figure II.7.1. Répartition des micromammifères capturés lors de la session d'échantillonnage d'automne 2006 par niveau croissant de contamination des sols en Cd ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) au sein de chaque paysage.
- Figure II.7.2. Micromammifères capturés sur les mailles retenues le long du gradient de pollution, lors des la session d'échantillonnage d'automne 2006, printemps 2007 et printemps 2008.
- Figure II.7.3. (a). Répartition des escargots appartenant aux espèces *Cepaea sp* et *Oxychilus draparnaudi* récoltés lors de la session d'automne 2006 par niveau croissant de contamination des sols en Cd ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) au sein de chaque paysage. (b). Escargots capturés sur des mailles communes lors des échantillonnages d'automne 2006 et printemps 2007.

### PARTIE III

- Figure III.1.1. Empirical variograms with variographic envelopes and fitted models for total and  $\text{CaCl}_2$ -extracted Cd, Pb and Zn concentrations.
- Figure III.1.2. Maps (iso-lines) of predicted Cd, Pb and Zn concentrations in soils of woody habitats ( $\text{mg.kg}^{-1}$  dw) using ordinary kriging for total (left) and  $\text{CaCl}_2$ -extracted (right). The localization of the former smelter is indicated with slash marks, and the study area limits (8x5 km) with a dash line.
- Figure III.1.3. Empirical variograms with variographic envelopes for total and  $\text{CaCl}_2$ -extracted Cd, Pb and Zn residuals (concentrations normalized upon defined spatial trend).
- Figure III.1.4. Risk maps of Cd, Pb and Zn based on ecological soil screening levels (Eco-SSLs, US EPA. Risk = soil value / Eco-SSL value) for plants, soil invertebrates, small mammals (herbivorous and ground insectivorous) and birds (ground insectivorous). The localization of the former smelter is indicated with slash marks, and the study area limits (8x5 km) with a black line.
- Figure SM1. Site location (a, b) and map of land use and sampling point locations over the study site (study area extended to 9x6 km for land use mapping), with the example of total Cd concentrations in soils ( $\text{mg.kg}^{-1}$  dw) (c). Adapted from Douay et al (2009).
- Figure III.2.1. Iso-concentration lines of predicted total concentrations in topsoils of Cd, Pb and Zn ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  dw).
- Figure III.2.2. Relationships between MTE concentrations in soft body for snails ( $[\text{C}]_B$ ) and in liver for small mammals ( $[\text{C}]_L$ ) and total MTE concentrations measured in soil ( $[\text{C}]_S$ ) at sampling point ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  dw).
- Figure III.2.3. Relationships between MTE concentrations in soft body for snails ( $[\text{C}]_B$ ) and in liver for small mammals ( $[\text{C}]_L$ ) normalized upon age (except for *O. draparnaudi*) and total MTE concentrations measured in soil ( $[\text{C}]_{\text{soil}}$ ) at sampling point ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  dw) by landscape type.
- Figure III.2.4. Values of partial  $R^2$  for soil Cd and Pb concentrations in significant regressions between internal MTE concentrations (normalized upon age) in small mammals and total soil MTE concentrations using measured values at sampling point ( $\square$ ) and predicted values at several buffer sizes ( $\square$ ) in agricultural lands, urban areas and woodlands.

- Figure III.2.5. Values of partial  $R^2$  for soil Cd and Pb concentrations in significant regressions between internal MTE concentrations in snails (normalized upon age for *Cepaea*) and soil MTE concentrations using measured values at sampling point (□) and predicted values at several buffer sizes (□) in urban areas and woodlands.
- Figure III.2.6. Synthesis of data concerning Pb in the bank vole and in the greater white-toothed shrew illustrating an overall interpretation of data.
- Figure III.3.1. Location of the 4 study sites (C: control, L: low, M: medium and H: high contamination) and sampling design for soils and small mammals.
- Figure III.3.2. Soil metal concentrations in relation to liver metal concentrations (decimal logarithm,  $\mu\text{g.g}^{-1}$  dw) for the wood mouse *Apodemus sylvaticus*, the bank vole *Myodes glareolus*, the common shrew *Sorex araneus* and the pygmy shrew *Sorex minutus*.
- Figure III.3.3. Soil metal concentrations in relation to kidney metal concentrations (decimal logarithm,  $\mu\text{g.g}^{-1}$  dw) for the wood mouse *Apodemus sylvaticus*, the bank vole *Myodes glareolus*, the common shrew *Sorex araneus* and the pygmy shrew *Sorex minutus*.
- Figure III.3.4. MT levels in relation to Cd concentrations in soil (decimal logarithm,  $\mu\text{g.g}^{-1}$  dw) for the wood mouse *Apodemus sylvaticus*, the bank vole *Myodes glareolus*, the common shrew *Sorex araneus* and the pygmy shrew *Sorex minutus*.
- Figure III.3.5. MT levels in relation to Cd concentrations in the kidneys and the liver (decimal logarithm,  $\mu\text{g.g}^{-1}$  dw) for the wood mouse *Apodemus sylvaticus*, the bank vole *Myodes glareolus*, the common shrew *Sorex araneus* and the pygmy shrew *Sorex minutus*.
- Figure III.3.6. Schéma synoptique des caractéristiques des espèces étudiées en termes de diversité de régime alimentaire et de mobilité ou d'exploitation de différents habitats (Talmage and Walton, 1991; Canova, 1992; Abt and Bock, 1998; Ouin et al., 2000; Tattersall et al., 2001; Le Louarn et al., 2003; Lugon-Moulin, 2003; Millán de la Peña et al., 2003; Butet et al., 2006; Michel et al., 2006; Wijnhoven et al., 2006; Michel et al., 2007).
- Figure III.4.1. Location of the study sites and sampling design for soils and small mammals.
- Figure III.4.2. Hepatic and renal concentrations of Cd, Pb and Zn normalized upon age and sex in relation to soil metal concentrations ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  dw).
- Figure III.5.1. Photography of shell development abnormality in several wild adults *Cepaea nemoralis* collected in Metaleurop surroundings.
- Figure III.5.2. Concentrations of Cd, Pb and Zn in F1 snail soft tissues ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  dw) before exposure for control origin ("BE") and metal-exposed origin ("ME").
- Figure III.5.3. Accumulation of Cd, Pb and Zn in F1 *Cepaea nemoralis* soft tissues ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  dw) over exposure time (days) for control origin ("BE") and metal-exposed origin ("ME") by exposure site (reference "R" and polluted "P1").
- Figure III.5.4. Accumulation of Cd, Pb and Zn in F1 *Cantareus aspersus* soft tissues ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  dw) over exposure time (days) for control origin ("BE") and metal-exposed origin ("ME") by exposure site (reference "R", polluted "P1", highly polluted "P2" and "P3").
- Figure III.5.5. Body condition of *Cepaea nemoralis*: evolution of snail weight (g), shell size (mm) and shell weight (g) over exposure (time in days) for control origin ("BE") and metal-exposed origin ("ME") by exposure site (reference "R" and polluted "P1").
- Figure III.5.6. Body condition of *Cantareus aspersus*: evolution of snail weight (g), shell size (diameter, mm) and shell weight (g) over exposure (time in days) for control origin ("BE") and metal-exposed origin ("ME") by exposure site (reference "R", polluted "P1", highly polluted "P2" and "P3").

#### PARTIE IV

- Figure IV.1.1. Représentation schématique synthétique des principaux résultats de la thèse.
- Figure IV.2.1. Variabilité spatiale des concentrations en ETMs dans les récepteurs.
- Figure IV.2.2. Exemple hypothétique expliquant les relations entre stratégies d'accumulation et de séquestration dans les proies et transfert d'un métal aux consommateurs, selon les caractéristiques des sites et des réseaux trophiques.
- Figure IV.2.3. Bioaccumulation, production de métallothionéines et effets induits par les ETMs.
- Figure IV.2.4. Abondance de différentes espèces de micromammifères dans des zones humides du Jura (France) sur une durée de 10 ans, d'après (Michelat and Giraudoux, 2006).
- Figure IV.2.5. Variabilité temporelle de l'accumulation : exemple du Campagnol roussâtre.
- Figure IV.2.6. Synthèse des interactions entre paysage et contamination des sols et leur implication dans les transferts et les effets des ETMs dans les écosystèmes terrestres.

## Liste des tableaux

Tableau 1. Laboratoires impliqués dans la réalisation du programme STARTT dans le cadre des collaborations sur la partie « études in situ sur le site de Metaleurop ».

### PARTIE I

Tableau I.1.1. Classification de certains ions métalliques entre les classes A, intermédiaire et B d'après (Nieboer and Richardson, 1980).

Tableau I.1.2. Teneurs naturelles en ETMs dans les sols. Les valeurs données sont exprimées en  $\text{mg.kg}^{-1}$  masse sèche.

Tableau I.1.3. Nombre estimé et surfaces concernées des zones urbaines et industrielles contaminées par les ETMs en Europe (Adriano, 2001).

Tableau I.1.4. ETMs co-précipitant régulièrement avec les minéraux secondaires du sol (Alloway, 1995).

Tableau I.1.5. Séquences de toxicité molaire pour différents taxons (Sigel, 1986).

### PARTIE II

Tableau II.2.1. Composition du paysage (% des différentes classes d'occupation du sol) dans chacun des types de paysages identifiés. Les dominantes paysagères (occupation du sol majoritaire) caractérisent les types paysagers.

Tableau II.2.2. Nombre de mailles retenues par type paysage par niveau de contamination présumé.

Tableau II.2.3. Caractéristiques des 3 mailles retenues sur la zone d'étude et des 2 mailles « témoins externes ».

Tableau II.5.1. Paramètres relevés lors des dissections des micromammifères.

Tableau II.7.1. Caractéristiques majeures des espèces étudiées parmi les micromammifères.

Tableau II.7.2. Caractéristiques majeures des espèces de mollusques gastéropodes étudiées

### PARTIE III

Table III.1.1. Summary (minimum, 1st quartile, median, 3rd quartile and maximum) of sampled soils main characteristics: location, soil properties and trace metal total and  $\text{CaCl}_2$ -extracted concentrations ( $n = 261$ ). The point sampled in a dredged material deposit (DSD), which exhibits extreme contamination values and was not properly a soil sample, is presented separately ( $n = 1$ ). Adapted from Douay et al (2009).

Table III.1.2. Parameters of the retained variogram models (range in meters) for total and extractable Cd, Pb and Zn, results of cross-validation (ME: mean error, MSPE: mean square predicted error, MDR: mean deviation ratio,  $r$  /  $p$ -value: Pearson product-moment correlation coefficient and statistical significance), median kriged values and median variance of kriged values (both expressed in  $\text{mg.kg}^{-1}$  dw).

Table III.1.3. Summary of parameters of the selected models for total and  $\text{CaCl}_2$ -extractable Cd, Pb and Zn concentrations in woody soils (NS: non significant,  $p > 0.05$ ).

Table III.2.1. Minimum (Min.), median (Med.) and maximum (Max.) total and extracted ( $\text{CaCl}_2$ ) concentrations of Cd, Pb and Zn ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  dw) in woody soils ( $n = 261$ ) and dredged sediment deposit (DSD,  $n = 1$ ).

Table III.2.3. Minimum (Min), median (Med) and maximum (Max) internal concentrations of Cd, Pb and Zn measured in soft body for snails and liver for small mammals ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  dw).

Table III.2.4. Multiple ( $R^2$  model) and partial R-squared (Partial  $R^2$ , for significant parameters only:  $p$ -value  $< 0.05$ ) of models linking internal MTE concentrations with all studied variables (age, MTE concentrations in soil, landscape and interaction between MTEs in soils and landscape).

Table III.2.5. Parameters (coefficient:  $b$ , statistical significance:  $p$  value, and partial R-squared:  $R^2$ ) of the regressions between internal MTE concentrations (normalized upon age except for *O. draparnaudi*, body for snails and liver for small mammals) and total or  $\text{CaCl}_2$ -extracted MTE concentrations in soils at sampling location.

Table III.2.6. Partial R-squared ( $R^2$ ), coefficient ( $b$ ), and statistical significance ( $p$  value) of significant regressions between MTE concentrations in animals (normalized upon age) and total MTE concentrations in soil at sampling point by landscape (A: agricultural lands, U: urban areas, S: scrub/shrublands, W: woodlands).

Table SI1. Total concentrations of Cd, Pb and Zn ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  dw) in soils for agricultural ("A",  $n = 294$ ), urban ("U",  $n = 39$ ), woody ("W",  $n = 261$ ) soils and dredged material deposits ("D",  $n = 1$ ).

Table III.3.1. Percentage of land use surfaces on sites (500x500m).

Table III.3.2. Distance from the smelter (median, km) and concentrations of Cd, Pb and Zn in soil by site (minimum, median and maximum,  $\mu\text{g.g}^{-1}$  dw).

Table III.3.3. Distribution of specimens by site (R: rearing, C: control, L: low contamination, M: medium contamination and H: high contamination), species, gender (M: males, F: females) and age (Juv: juveniles, Sub-ad: sub-adults and Ad: adults).

Table III.3.4. Liver concentrations of MT, Cd, Pb, Zn and Cu by species and site (minimum, median and maximum,  $\mu\text{g.g}^{-1}$  dw, UDL: under detection limit).

- Table III.3.5. Kidney concentrations of MT, Cd, Pb, Zn and Cu by species and site (minimum, median and maximum,  $\mu\text{g.g}^{-1}$  dry weight, UDL: under detection limit).
- Tableau III.3.6. Relations significatives ( $p < 0.05$ ) entre les concentrations rénales en ETMs et les indices corporel et somatiques
- Tableau III.3.7. Synthèse des paramètres à considérer pour une évaluation des probabilités de risque lié aux ETMs pour les espèces considérées selon les différents paramètres étudiés.
- Table III.4.1. Characteristics of sampling sites: distance to Metaleurop former smelter (median, km), median and minimum-maximum (min-max) soil total concentrations of Cd, Pb and Zn ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  dw) and percentage of land uses
- Table III.4.2. Minimum (Min), median (Med) and maximum (Max) concentrations of Cd, Pb and Zn ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  dw) by organ and by sampling period (A 06: autumn 2006, S 07: spring 2007 and S 08: spring 2008).
- Table III.4.3. Percentage of captured animals by sampling period exhibiting renal concentrations higher than toxic thresholds for Cd and Pb.
- Table III.5.1. Soil contamination and properties in microcosms of the 4 exposure sites (reference "R", polluted "P", highly polluted "P2" and "P3"). Soil metal concentrations (total and  $\text{CaCl}_2$ -extractable) are given in  $\mu\text{g.g}^{-1}$  dw, soil granulometry (clay, silt, sand and organic carbon OC) in  $\text{g.kg}^{-1}$  dw, cation exchange capacity (CEC) in  $\text{cmol.kg}^{-1}$  dw,  $\text{CaCO}_3$  concentration in  $\text{g.kg}^{-1}$  dw,  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{cmol.kg}^{-1}$  dw and Ca total concentration in  $\text{g.100g}^{-1}$  dw.
- Table III.5.2. Concentrations of Cd, Pb, and Zn ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  dw) at times 0, 14 and 28 days of exposure and mean values in vegetation samples (*Urtica dioica* and *Arabidopsis halleri*) of the 4 exposure sites (reference "R", polluted "P", highly polluted "P2" and "P3").
- Table III.5.3. Measured Cd concentrations at the end of exposure ( $C_{\text{sn}}$  28days) and kinetic parameter estimates of Cd accumulation in snails.
- Table III.5.4. Measured Pb concentrations at the end of exposure ( $C_{\text{sn}}$  28days) and kinetic parameter estimates of Pb accumulation in snails.
- Table III.5.5. Measured Zn concentrations at the end of exposure ( $C_{\text{sn}}$  28days) and kinetic parameter estimates of Zn accumulation in snails.
- Table III.5. 6. Synthesis of toxicological thresholds (EC50 or concentrations of exposure "[C]") for Cd, Pb and Zn effects on growth and food consumption in the studied species. For each experiment, the name of the species of concern is accompanied by indication on age of studied individuals ("juv.": juveniles, "ad.": adults).

# **PARTIE 1**

---

## **INTRODUCTION GENERALE**



---

## I.1. INTRODUCTION

---

### I.1.1. Contexte général

L'écotoxicologie est une discipline relativement récente, qui a pour objet l'étude du comportement et du devenir des polluants dans les écosystèmes, ainsi que leurs effets sur la structure et le fonctionnement des communautés et des écosystèmes (Forbes and Forbes, 1997; Walker et al., 2006; Ramade, 2007). Cette définition récente et la formation même du terme « écotoxicologie », venant de « écologie » et « toxicologie » montre que l'écotoxicologie est par essence inter-disciplinaire, au carrefour entre la chimie environnementale, la toxicologie et l'écologie. L'émergence des problématiques de protection des écosystèmes et de la biodiversité depuis les années 1970, et plus encore actuellement avec la prise de conscience mondiale des effets anthropiques sur le fonctionnement des écosystèmes (Millennium Ecosystem Assessment, 2005), place l'écotoxicologie au centre de questionnements et d'attentes scientifiques, sociales, économiques et politiques (Forbes and Forbes, 1997; Ramade, 2007). Si les principales menaces qui entraînent l'érosion de la biodiversité sont la perte d'habitat, les changements climatiques, les espèces invasives, la sur-exploitation et l'eutrophisation, les pollutions locales et diffuses d'agents chimiques organiques et métalliques constituent par ailleurs un problème majeur pour la santé humaine et de l'environnement en Europe (European Environment Agency, 2007). L'écotoxicologie est mise en face d'un défi majeur, celui de répondre à des questions fondamentales sur l'impact des polluants dans les écosystèmes en les rendant accessibles et exploitables techniquement pour les décideurs politiques et les gestionnaires des milieux naturels.

Les études en écotoxicologie manient donc des concepts et outils de plusieurs disciplines mais les compétences sont trop souvent dissociées, limitant la mise en relation des mécanismes intervenant à différentes échelles spatio-temporelles et niveaux d'organisation biologique. Pour répondre aux questionnements scientifiques émergents, et aux objectifs sociétaux, les enjeux actuels de l'écotoxicologie sont de poursuivre conceptuellement la multi-disciplinarité intrinsèque de la discipline en utilisant conjointement les différentes approches et en intégrant les nouveaux outils développés dans d'autres champs disciplinaires (van Straalen, 2003; Kapustka, 2008).

Les points clés en développement dans la recherche en écotoxicologie concernent les changements d'échelles : spatiales et temporelles et les relations des processus entre niveaux d'organisation biologique (Cairns Jr and Niederlehner, 1996; Akçakaya, 2001; Kapustka et al., 2001; Ares, 2003; van Straalen, 2003; Carlsen et al., 2004; Hope, 2005; Mineau, 2005; Tannenbaum, 2005; Fairbrother et al., 2007; Kapustka, 2008). Ces changements d'échelles, en amenant une approche holistique et fonctionnelle, permettent une compréhension globale des processus gouvernant transfert et effets des polluants dans les écosystèmes. L'utilisation des outils employés en écologie fonctionnelle et évolutive, en écologie du paysage et en géostatistiques dans le cadre d'études en écotoxicologie aideraient à améliorer la compréhension des mécanismes qui régissent le devenir et les effets des polluants dans l'environnement en les



replaçant dans leur contexte écologique (Cairns Jr and Nlederlehner, 1996; Akçakaya, 2001; Kapustka et al., 2001; Ares, 2003; van Straalen, 2003; Carlsen et al., 2004). Ce type de démarche a montré son intérêt dans l'étude des transferts de contaminants biologiques et la prédiction des risques de transmission en éco-épidémiologie (Danson et al., 2003; Giraudoux et al., 2003; Kitron et al., 2006; Danson et al., 2008; Pleydell et al., 2008; Yang et al., 2008; Johnson et al., 2009).

Principalement en raison de son origine historique liée à la toxicologie, l'étude des effets des polluants en écotoxicologie en milieu terrestre a surtout été menée à des niveaux biochimiques, cellulaires, tissulaires, et individuels. Pourtant, parmi les besoins actuels identifiés pour l'évaluation du risque environnemental lié aux polluants, la nécessité de lier les effets à différents niveaux d'organisation biologique et l'extrapolation des résultats obtenus en conditions contrôlées aux situations de terrain sont soulignés (Lagadic et al., 1997; Tannenbaum, 2001; Dobson and Shore, 2002; Mineau, 2005; Tannenbaum, 2005). Depuis les années 1990, de nombreux auteurs ont fait apparaître la nécessité et l'intérêt de considérer les impacts des polluants d'un point de vue écologique et non plus seulement toxicologique : l'écotoxicologie devenant en ce sens une écologie du stress, les polluants étant considérés comme des stressseurs environnementaux au même titre que les autres contraintes écologiques (van Straalen, 2003; Van den Brink, 2008).

Dans ce contexte, cette thèse a pour but d'améliorer la compréhension des transferts et des impacts des polluants métalliques dans les écosystèmes terrestres. L'objectif est d'apporter, dans le cadre d'une étude spatiale et temporelle des réponses de différents modèles biologiques à la pollution, des données concernant l'influence des variables individuelles (espèce, âge, sexe) mais aussi environnementales (contamination et caractéristiques des sols, paysage) sur la bioaccumulation et les effets des éléments traces métalliques (ETMs). Pour atteindre cet objectif, une approche intégrée basée sur des changements d'échelle spatiale et de niveau d'organisation biologique, alliée à l'utilisation d'outils généralement employés en géostatistiques et en écologie spatiale, constitue une démarche scientifique et méthodologique adaptée. Une échelle spatiale se caractérise par son étendue (i.e. surface concernée) et sa résolution (i.e. le niveau de détail de l'information ou le grain et l'étendue de la plus petite unité représenté) (Burel and Baudry, 1999). Une échelle spatiale « large » concerne une vaste étendue spatiale, mais ce terme peut s'appliquer à des surfaces mondiales, continentales ou encore régionales, selon le contexte. Il en est de même pour une échelle spatiale « locale » qui peut aussi bien concerner la surface d'une région que d'un champ. Généralement, une large échelle possède une résolution plus faible (niveau de détail plus limité et plus grande étendue de la plus petite surface représentée) qu'une échelle locale. Les mêmes remarques pour l'application des termes peuvent être appliquées aux échelles temporelles : selon le contexte, une durée courte ne concerne pas le même pas de temps si l'on se place à l'échelle des temps géologiques ou à l'échelle de la durée de vie d'un micromammifère, et la résolution varie en conséquence. Les niveaux d'organisation biologiques ont trait à la structure de l'organisation du vivant. Généralement, on distingue 8 niveaux d'organisation biologiques (ce nombre peut cependant varier selon les sources) (Barbault, 2000;

Auger and Lett, 2003; Lidicker, 2008). Les travaux mis en œuvre dans cette thèse concernent le transfert et les effets du cadmium (Cd), du plomb (Pb) et du zinc (Zn) dans les réseaux trophiques terrestres. Ils portent sur la mesure des réponses des organismes aux ETMs à différents niveaux d'organisation biologique (biochimiques, organiques, individuels et populationnels), durant 3 années et à 2 saisons, dans une vaste zone polluée (40 km<sup>2</sup>) autour d'une ancienne fonderie de Pb et Zn dans le nord de la France. Dans cette thèse, le travail étant placé dans le contexte d'un site pollué par des ETMs, nous utiliserons le terme échelle « large » pour des surfaces de l'ordre d'une dizaine de km<sup>2</sup>, et échelle « locale » pour des étendues de l'ordre d'une dizaine de m<sup>2</sup>. Les variations temporelles abordées ont trait à des variations sur un mois, inter-saisonnières (printemps et automne) et inter-annuelles.

Les modèles biologiques étudiés appartiennent à différents taxons de mollusques gastéropodes terrestres parmi les invertébrés, et de micromammifères parmi les vertébrés. Au sein de chacun des groupes, les espèces présentent des régimes alimentaires contrastés. Ces organismes présentent des caractéristiques physiologiques, biologiques et écologiques variées, permettant ainsi de comparer l'influence de ces différents paramètres sur leurs réponses à la contamination de l'environnement. Les escargots et les micromammifères présentent un intérêt tout particulier pour l'étude des transferts et effets des ETMs dans les écosystèmes terrestres, car ces taxons sont largement répartis à travers le monde et colonisent des milieux diversifiés : ils peuvent donc être présents dans une large variété de sites pollués (Talmage and Walton, 1991; Berger and Dallinger, 1993). De plus, ils présentent des densités de population relativement élevées, permettant ainsi d'obtenir des tailles d'échantillon suffisantes pour étudier transfert et effets des polluants en milieu naturel. Ils sont par ailleurs connus pour accumuler les ETMs dans leurs tissus, donnant ainsi la possibilité de tracer les transferts de ces éléments (Talmage and Walton, 1991; Berger and Dallinger, 1993). Enfin, leur position dans les réseaux trophiques (détritivores/herbivores et carnivores constituant la proie de nombreux vertébrés et invertébrés) favorise leur rôle potentiel de vecteurs de contaminants biologiques et chimiques dans les écosystèmes, tout particulièrement dans le cas des micromammifères (Shore and Rattner, 2001; Giraudoux et al., 2002; Giraudoux et al., 2003; Alvarez et al., 2009). Ils constituent une source d'exposition aux ETMs pour de nombreux invertébrés et vertébrés (mammifères et oiseaux, dont certains sont des espèces protégées), pouvant par conséquent entraîner des risques d'empoisonnement secondaire des prédateurs (Beeby, 1985; Jongbloed et al., 1996; Laskowski and Hopkin, 1996a; Shore and Rattner, 2001; Scheifler et al., 2002; Wijnhoven et al., 2007).

Le plan de ce mémoire est le suivant. La première partie introductive présente l'état actuel des connaissances et les besoins identifiés qui ont orienté la définition des objectifs de ce travail. La seconde partie est constituée de la présentation du matériel et des méthodes utilisés pour mener à bien cette étude. La troisième partie réunit la présentation des résultats obtenus sous forme de 5 chapitres correspondant à des articles publiés, soumis ou en préparation. La discussion générale et les perspectives qui se dégagent de ce travail sont exposées dans une quatrième partie.

## I.1.2. Pollution des sols par les éléments traces métalliques (ETMs)

### I.1.2.a. Présence des ETMs dans les sols

Les « éléments majeurs » (O, Si, Al, Fe, Ca, Na, K, Mg, Ti et P) constituent plus de 99% des éléments de la croûte terrestre. Les autres éléments du tableau périodique sont appelés « éléments traces » et leur concentration individuelle n'excède normalement pas 0,1% (1000 mg/kg masse sèche) et, la plupart d'entre eux montrent des concentrations moyennes inférieures à 100 mg/kg (Alloway, 1995). Les éléments traces métalliques (ETMs) sont donc les métaux appartenant au groupe des éléments traces et parmi eux on peut citer le cadmium (Cd), le cuivre (Cu), le plomb (Pb) et le zinc (Zn). La plupart des ETMs étaient autrefois placés sous la dénomination « métaux lourds » mais cette terminologie, basée sur la masse atomique de référence et bien qu'encore usitée, est soumise à discussion. Les ETMs peuvent être classés en groupes selon leur position dans le tableau périodique, le Cd appartenant au groupe II-B, le Cu au groupe I-B, le Pb au groupe IV-A et le Zn au groupe II-B. D'autres classifications, basées non plus cette fois sur les seules propriétés physico-chimiques des éléments mais sur les implications de ces propriétés sur les interactions entre les ETMs et les systèmes vivants existent (Sigel, 1986). Ce type de classification est particulièrement important pour expliquer les mécanismes de transport, stockage et toxicité des ETMs au niveau cellulaire sur les êtres vivants (Sigel, 1986).

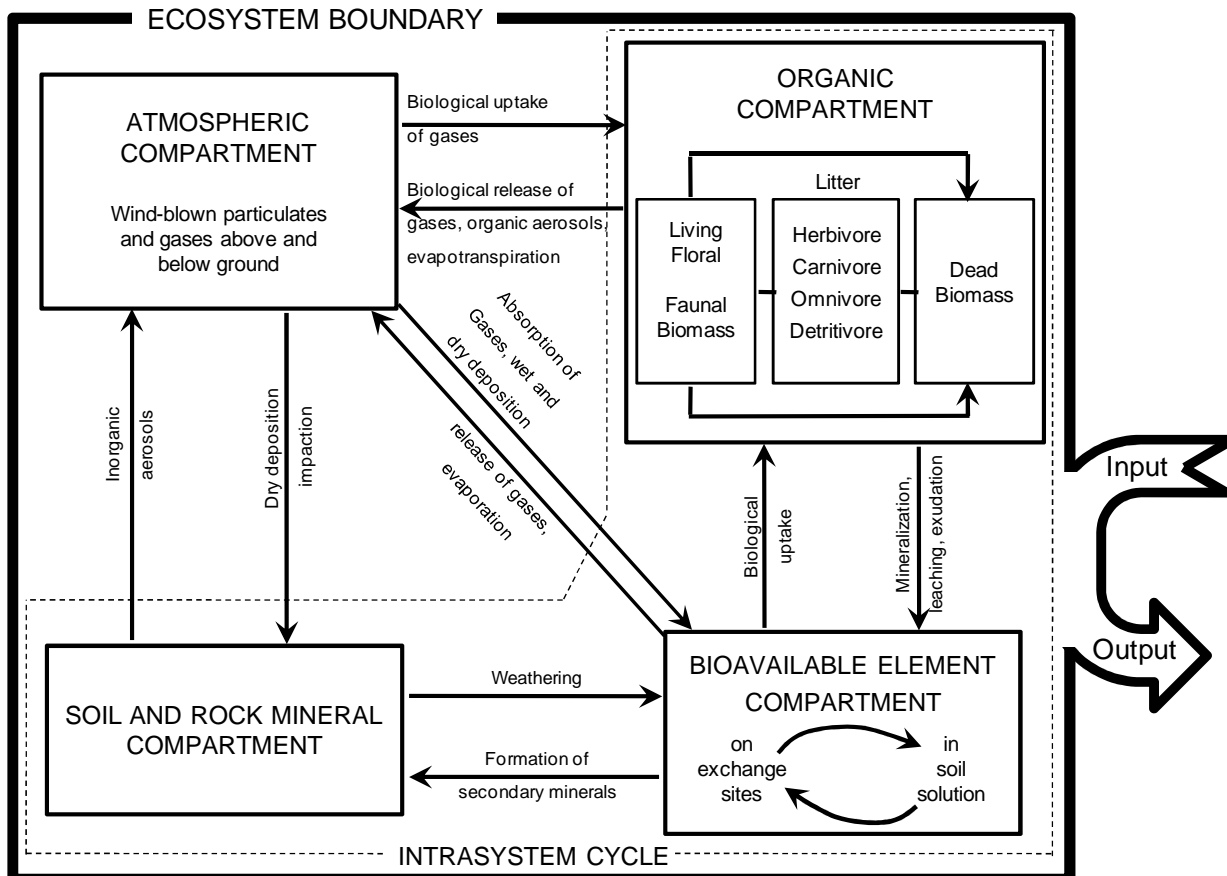
La plus communément utilisée par les biologistes est basée sur l'affinité des ETMs avec certains ligands, plus précisément les ligands oxygénés (classe A), les ligands azotés ou soufrés (classe B) ou pour les 2 types de ligands (classe intermédiaire) (Nieboer and Richardson, 1980)(Tableau I.1.1).

**Tableau I.1.1.** Classification de certains ions métalliques entre les classes A, intermédiaire et B d'après (Nieboer and Richardson, 1980). Le nom des métaux étudiés dans la thèse est écrit en gras.

Classe A	Intermédiaire	Classe B
Calcium	<b>Zinc</b>	<b>Cadmium</b>
Magnésium	<b>Plomb</b>	Cuivre
Manganèse	Fer	Mercure
Potassium	Chrome	Argent
Strontium	Cobalt	
Sodium	Nickel	
	Arsenic	
	Vanadium	

Les ETMs présents de manière endogène dans les sols proviennent de la dégradation du matériau parent et sont distribués dans les sols par les processus pédogénétiques (Alloway, 1995). Le fond pédo-géochimique en ETMs (concentrations naturelles dans les sols) est fortement conditionné par le substrat géologique (Kabata-Pendias and Pendias, 1992; Alloway, 1995; Adriano, 2001). D'autres sources, exogènes, telles que les apports par ruissellement liés à l'érosion, les émissions atmosphériques des feux de forêt ou encore des éruptions volcaniques,

interviennent de manière naturelle. D'autres facteurs naturels influencent les teneurs du fond pédogéochimique en ETMs, par exemple les caractéristiques physico-chimiques du sol, le climat ou encore la végétation et les flux de matière dans les écosystèmes (Alloway, 1995; Baize and Sterckeman, 2001). Les ETMs ne sont en effet pas statiques au sein des écosystèmes, et leurs cycles biogéochimiques des ETMs à l'échelle terrestre sont liés à des interactions entre les compartiments physiques et biologiques (Figure I.1.1).



**Figure I.1.1.** Modèle général décrivant les pools d'accumulation et les voies de transfert majeurs des éléments dans les écosystèmes terrestres (Adriano, 2001).

Les concentrations naturelles en ETMs sont très variables spatialement, puisque les facteurs qui modulent leurs concentrations varient dans l'espace à différentes échelles (Xu and Tao, 2004; Rodriguez et al., 2008). De plus, de fortes concentrations peuvent être observées régionalement ou localement en fonction du substrat géologique mais aussi des mécanismes pédogénétiques aboutissant au relargage des ETMs dans les sols par le matériau parent et des apports exogènes cités précédemment. Les gammes des teneurs naturelles en Cd, Pb et Zn sont donc relativement larges et très variables entre métaux (Tableau I.1.2). Les valeurs régionales pour le Nord-Pas-de-Calais (en considérant des sols comparables à ceux du site de Metaleurop Nord) sont proches des valeurs moyennes observées à travers le monde, ce qui suggère que les ensembles géologiques et pédologiques considérés ne montrent pas de fortes concentrations en ETMs naturelles (Tableau I.2).

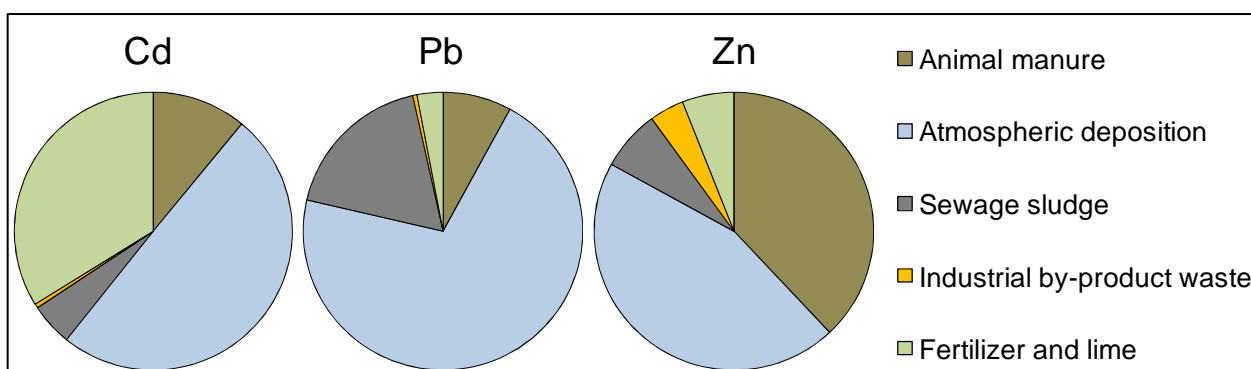
**Tableau I.1.2.** Teneurs naturelles en ETMs dans les sols. Les valeurs données sont exprimées en  $\text{mg.kg}^{-1}$  masse sèche.<sup>a</sup> Valeurs rapportées dans la littérature (Kabata-Pendias and Pendias, 1992; Alloway, 1995; Adriano, 2001).

	A travers le monde <sup>a</sup>		Valeurs régionales Nord-Pas-de-Calais <sup>b</sup>	
	Gamme	Moyenne	Médiane sols agricoles	Médiane sols forestiers
<b>Cadmium</b>	0,006 – 1,10	0,53	0,39	0,20
<b>Plomb</b>	2 - 160	17 à 42 <sup>c</sup>	32,7	53,3
<b>Zinc</b>	10 - 300	40 à 64 <sup>c</sup>	68,1	53,4

<sup>b</sup> Valeurs régionales pour des sols comparables à ceux du site de Metaleuop Nord (sols appartenant au même ensemble pédogénétique : substrat géologique et conditions régionales similaires) (Sterckeman et al., 2002b).<sup>c</sup> Valeurs différentes selon les sources.

Les sols peuvent présenter de fortes teneurs en ETMs dues à des apports d'origine anthropique. Les principales sources de pollution des sols en ETMs délibérées ou accidentelles sont : (1) les activités métallurgiques : activités minières, fonderie et industrie métallurgique, (2) les pratiques agricoles et horticoles (fertilisants, pesticides), (3) les boues d'épuration, (4) l'utilisation de combustibles fossiles, (5) l'industrie manufacturière et chimique, (6) les stockages de déchets, (7) les activités sportives de tir et pêche et (8) les zones d'entraînement militaire et les zones de combats (Van Den Hout et al., 1999; Adriano, 2001). Les sols sont affectés par des sources locales de polluants, le polluant est émis dans l'environnement à proximité (m à km) du sol où il sera retenu, ou depuis des sources éloignées (plusieurs km voire milliers de km). Lorsque des polluants (parmi lesquels les ETMs) sont émis dans l'environnement, ils peuvent être transportés sur de larges distances et transférés entre l'atmosphère, l'hydrosphère la lithosphère et la biosphère. Le transport et le devenir des ETMs à de larges échelles spatiales (échelles régionales et continentales) sont principalement contrôlés par les propriétés physico-chimiques du polluant lui-même mais aussi du média (atmosphère, océan...) et des surfaces de déposition (Van Den Hout et al., 1999). Les sols pollués constituent une source d'ETMs dans l'environnement, ils sont également un puits pour les ETMs émis et constituent une source d'exposition majeure des organismes (Alloway, 1995).

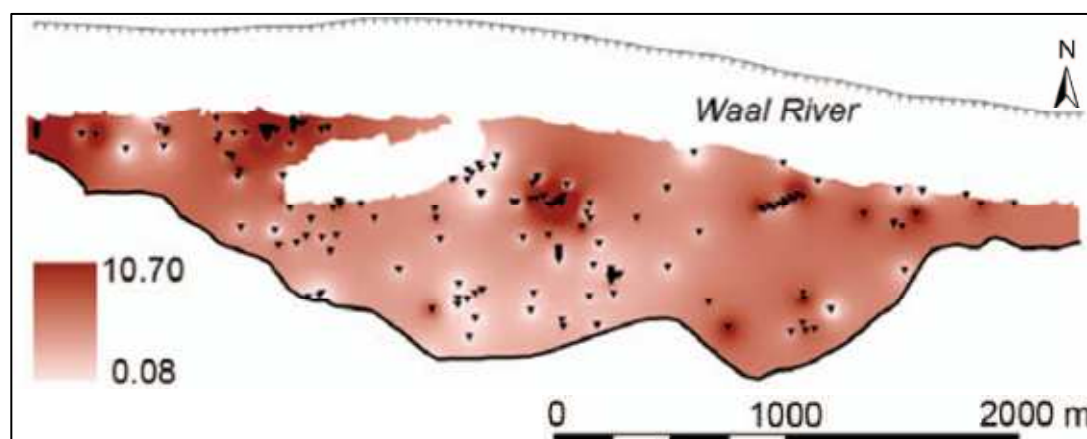
Concernant le Cd, le Pb et le Zn, les sources anthropogéniques majeures sont l'industrie manufacturière et surtout la fonderie, les activités minières, les sites de stockage de déchets (résidus d'incinération de plastiques, batteries...), les épandages de boues d'épuration, les pratiques agricoles (fertilisants, pesticides...), la combustion d'hydrocarbures et autres combustibles fossiles et les gaz d'échappement des véhicules notamment pour le Pb (Alloway, 1995). Comme le montre l'exemple de la contamination en ETMs des sols agricoles du Pays de Galle et de l'Angleterre (Figure I.1.2), la contribution des différentes sources varie selon le métal considéré, mais les sources majeures restent les dépôts atmosphériques (rejets industriels et transports), les intrants agricoles (fertilisants, pesticides) et les épandages de boues d'épuration.



**Figure 1.1.2.** Proportions relatives des différentes sources d'apports de métaux dans les sols agricoles au Pays de Galle et en Angleterre (Adriano, 2001).

**Tableau 1.1.3.** Nombre estimé et surfaces concernées des zones urbaines et industrielles contaminées par les ETMs en Europe (Adriano, 2001).

Source	Number	Amount of waste (tonnes)	Area (km <sup>2</sup> )	Potentially contaminated area (km <sup>2</sup> )
Industrial estates	12 x 10 <sup>6</sup>		10 000	16-40 thousand
Landfills/impoundments	60-120 thousand	3-6 thousand	600-1200	900-7200
Fuel storage tanks	3-6 x 10 <sup>6</sup>			250-4000
Mining waste dump	A few thousand	17 000 x 10 <sup>6</sup>	250-500	350-5000
Line sources			10-25 thousand	1500-7500
Dredged sediment dumpsites	Hundreds			Hundreds
Hazardous waste sites	Hundreds			Hundreds
Estimated total contaminated area				20-60 thousand



**Figure 1.1.3.** Concentrations en Cd dans le sol (mg.kg<sup>-1</sup> masse sèche) dans la plaine inondable de Afferdensche en Deestse Waarden aux Pays-Bas (Schipper et al., 2008).

Selon l'origine de la contamination, les contaminations peuvent être locales ou diffuses, les surfaces concernées variant de quelques ares à plusieurs dizaines de km<sup>2</sup> (Tableau I.1.3). Dans le cas de rejets atmosphériques d'activités minières et de fonderie par exemple, les dépôts peuvent affecter plusieurs dizaines de km<sup>2</sup> autour de la mine/de l'usine concernée (Rieuwerts and Farago, 1996; Martley et al., 2004; Hasselbach et al., 2005).

A une échelle spatiale large (continentale ou régionale), ou à celle plus locale d'un site, les contaminations des sols peuvent présenter une forte hétérogénéité spatiale (Cf figure I.1.3) du fait de la variabilité spatiale des facteurs à l'origine des ETMs dans les sols (fond pédo-géochimique, mécanismes d'émissions et de dépôt des polluants, caractéristiques du milieu : climat, végétation...). Dans le cas d'émissions de poussières contaminées depuis des sources ponctuelles, il a été montré que la distance à la source, la direction et la vitesse des vents, la fréquence et la quantité de précipitations, la rugosité et l'interception par l'environnement influençait les taux de déposition et en conséquence, les niveaux de pollution des sols (Antonic and Legovic, 1999; Branford et al., 2004; De Ridder et al., 2004; Ali-Khodja et al., 2005; Floret et al., 2006; Rawlins et al., 2006). De plus, les quantités et la spéciation des ETMs varient avec l'occupation du sol, les milieux boisés montrant des concentrations en ETMs dans les sols généralement plus fortes que les milieux ouverts (prairies, champs cultivés, landes...) (Rieuwerts and Farago, 1996; Fowler et al., 2004; Ettler et al., 2005; Magiera and Zawadzki, 2007).

#### *1.1.2.b. Devenir des ETMs dans les sols*

Les paramètres chimiques qui affectent le comportement et la mobilité des métaux dans les sols sont ceux qui sont liés à l'adsorption des ETMs à la phase solide du sol (Kabata-Pendias and Pendias, 1992; Alloway, 1995; Adriano, 2001; Carrillo-Gonzalez et al., 2006). Le terme adsorption peut être défini comme l'ensemble des processus de sorption des éléments chimiques vers les particules du sol. Les phénomènes d'adsorption conditionnent en conséquence la partition des ETMs entre les phases liquides et solides du sol, donc la mobilité des ETMs dans cette matrice. L'adsorption est donc une réaction cinétique qui repose sur les lois des équilibres thermodynamiques et qui met en jeu divers types d'interactions intermoléculaires (e.g. forces de van der Waal, interactions ion-dipôle, liaisons hydrogène et hydrophobiques, transferts de charges, échanges d'ions et de ligands, sorption chimique ou encore liaisons magnétiques). Tous les constituants biotiques et abiotiques du sol peuvent influencer la concentration des ETMs dans la solution du sol à travers différents mécanismes (Figure I.1.4) (Alloway, 1995; Adriano, 2001; Carrillo-Gonzalez et al., 2006). La majorité des ETMs existe sous forme de cations dans la solution du sol et leur adsorption dépend de la densité de charges négatives à la surface des colloïdes. Ce type de fixation est réversible, les forces de liaison sont relativement faibles et les ions restent sous des formes échangeables. L'adsorption spécifique implique la formation de liaisons covalentes relativement fortes entre les ETMs et la surface des minéraux (voire leur intégration dans les structures), elle est, dans certains cas, irréversible sans destruction de la matrice. La co-

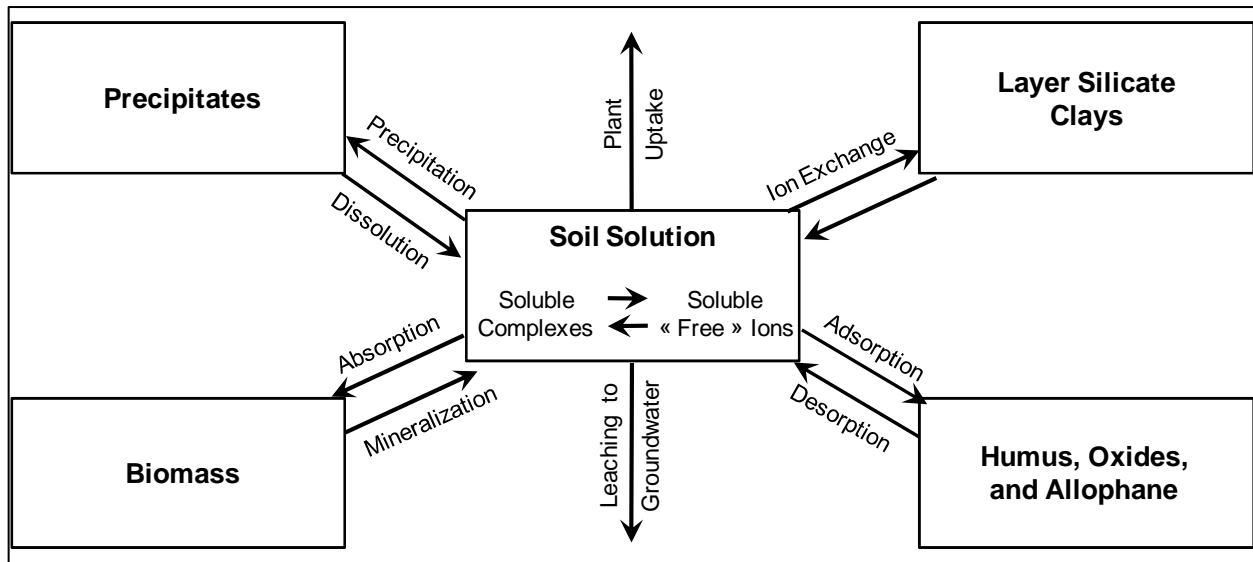
précipitation est définie comme la précipitation simultanée d'un agent chimique en conjonction avec un autre élément (argiles, oxydes de Fe, de Mg, d'Al, phosphates et carbonates dans le cas des ETMs). Les espèces formées varient selon les métaux, en fonction des affinités entre éléments (Tableau I.1.4). En plus d'être impliquée dans les réactions d'échanges de cation, la matière organique (acides humiques par exemple) peut adsorber les ETMs en formant des complexes par chélation. Ainsi, sous certaines conditions chimiques (pH et conditions redox) et lorsque les concentrations mises en jeu sont suffisamment élevées, de nombreux métaux peuvent former des précipités insolubles et des complexes organo-métalliques de fort poids moléculaires, ces deux formes étant extrêmement peu mobiles (Alloway, 1995; Adriano, 2001; Carrillo-Gonzalez et al., 2006). Par exemple, dans les sols fortement pollués en Cd, des précipités Cd-phosphates, Cd-carbonates (octavite) ou encore Cd-sulphites peuvent se former. Concernant le Pb, on peut observer des formes comme la pyromorphite ou la chloropyromorphite dans les sols pollués riches en phosphates, des complexes organo-métalliques, ou encore des précipités Pb-carbonates et Pb-oxydes. De plus, le Pb peut être présent dans les sols sous des formes minérales, quasiment immobiles, comme l'hydrocérussite, la cérussite ou l'anglesite selon l'origine des contaminations (émission de fonderie, combustion d'hydrocarbures, plombs de chasse). La transformation complète de ces grains de Pb (et donc la libération d'ions) peut prendre quelques dizaines à quelques centaines d'années. Dans le cas du Zn, la formation de complexes organo-métalliques augmente sa mobilité contrairement à ce qui est observé pour le Pb, car sa chélation avec les acides fulviques ou des acides organiques de faible poids moléculaire produisent des complexes solubles. L'évolution des formes minérales du Zn comme la franklinite (Zn et Fe) peuvent représenter un facteur important pour la solubilité du Zn.

**Tableau I.1.4.** ETMs co-précipitant régulièrement avec les minéraux secondaires du sol (Alloway, 1995). Les métaux étudiés ici sont notés en caractères gras.

Mineral	Co-precipitated trace metals
Fe oxydes	V, Mn, Ni, Cu, <b>Zn</b> , Mo
Mn oxydes	Fe, Co, Ni, <b>Zn</b> , <b>Pb</b>
Ca carbonates	V, Mn, Fe, Co, <b>Cd</b>
Clay minerals	V, Ni, Co, Cr, <b>Zn</b> , Cu, <b>Pb</b> , Ti, Mn, Fe

Ainsi, les métaux peuvent être présents sous différentes espèces chimiques dans les sols : dans la solution du sol, échangeables, liés à la matière organique, liés fortement à des oxydes de Fe ou de Mn, co-précipité avec des carbonates ou phosphates et enfin inclus dans la structure des silicates (Figure I.1.4). Il faut noter que des échanges entre les pools existent, la spéciation des ETMs dans les sols évoluant au cours du temps (Figure I.1.4).





**Figure I.1.4.** Schéma synoptique des processus d'interactions clés affectant la partition des ETMs entre les phases liquides et solides dans les sols (D'après Adriano 2001).

Les fractions solubles et échangeables caractérisent la fraction mobile des ETMs dans le sol. Les mécanismes qui régissent l'adsorption, en contrôlant les concentrations des ions métalliques et des complexes dans la solution du sol, ont une implication capitale dans leur absorption par les organismes et tout particulièrement les plantes et les invertébrés du sol. Différentes équations (notamment les isothermes de Langmuir et Freundlich) permettent de prévoir quantitativement les concentrations adsorbées, donc de calculer la partition à l'équilibre (sur l'hypothèse de l'« *Equilibrium Partitioning Theory* ») d'un élément entre les phases liquides et solides d'un sol (Alloway, 1995; Sauvé et al., 2000). Ainsi, le coefficient de partition  $K_d$  (constante correspondant à la pente de l'isotherme) est un paramètre utile pour évaluer la fraction mobile d'ETMs dans un sol et comparer les capacités de sorption de différents sols (Alloway, 1995; Sauvé et al., 2000; Sauvé et al., 2003). Cependant, il ne permet pas de quantifier les mécanismes mis en jeu ni d'identifier les phases solides sur lesquelles les métaux sont fixés. Les extractions chimiques aident à mesurer les concentrations en ETMs dans la solution du sol et à les lier à certaines phases solides du sol. Dans cet objectif, deux types principaux d'extraction chimique sont fréquemment utilisées : l'extraction séquentielle et l'extraction sélective. La procédure d'extraction séquentielle est divisée en 4 étapes qui permettent d'extraire 4 fractions : (1) fraction échangeable (soluble dans l'eau et liée aux carbonates) extraite à l'acide acétique, (2) fraction réductible (liée aux oxydes de fer et de manganèse notamment) extraite au chlorhydrate d'hydroxyle amine, (3) fraction oxydable (liée à la matière organique) extraite au peroxyde d'hydrogène et à l'acétate d'ammonium et enfin (4) la fraction résiduelle extraite par un mélange d'acides hydrofluorique et perchlorique (Alloway, 1995; Rauret et al., 2000). Les agents chimiques, les concentrations utilisés et/ou les temps de contact peuvent varier mais la procédure séquentielle et les fractions que l'on cherche à atteindre restent les mêmes. L'extraction chimique sélective est employée en utilisant un seul agent chimique et sert en général à évaluer les concentrations d'ETMs mobiles (solubles et échangeables). Dans ce

cas, les sels neutres (chlorure de calcium, acétate d'ammonium par exemple), les acides faibles (acide acétique ou citrique par exemple) ou encore des complexes (EDTA, DGT ou DTPA) sont fréquemment employés (Alloway, 1995; McLaughlin et al., 2000). Un autre type d'extraction existe, basée sur des extractions à l'eau, sans agent chimique additionnel (McLaughlin et al., 2000; Peijnenburg and Jager, 2003). Cette technique permet de mesurer les concentrations qui peuvent se trouver dans la solution du sol, et peut être couplée à la mesure des ETMs liés au carbone organique dissous (Peijnenburg and Jager, 2003). Ainsi, différents types d'extraction permettant d'accéder aux différentes fractions peuvent être utilisés, le choix de l'agent chimique repose sur le métal étudié, les propriétés du sol considéré, et la fraction visée (Alloway, 1995; Das et al., 1995; Adriano, 2001; Harmsen, 2007).

La notion de mobilité des ETMs dans les sols inclut implicitement un facteur temps. On peut distinguer en effet une fraction mobile (à court terme) et une fraction mobilisable (à long terme) (Lebourg et al., 1996). La fraction mobilisable, généralement mesurée à court terme, peut être définie comme le facteur d'intensité ( $I$ ), alors que, la plupart du temps, il n'y a pas d'information concernant le facteur de quantité ( $Q$ ), qui peut être défini comme la capacité tampon de la concentration en métal dans le sol (Tiller, 1972; McLaughlin et al., 2000). De nombreux facteurs affectent  $Q$  et la relation entre  $Q$  et  $I$  (ce ratio étant appelé le pouvoir tampon  $C$ ), comme la quantité totale de métal dans le sol, sa spéciation, les processus de vieillissement (« *ageing* ») et les facteurs environnementaux (McLaughlin et al., 2000). Les processus de vieillissement concernent le vieillissement des pollutions (évolution de la partition des ETMs au cours du temps) et le vieillissement des sols eux-mêmes. La spéciation des ETMs dans les sols est dépendante du temps, la réalisation des mécanismes chimiques qui régissent la spéciation ne sont pas synchroniques, certains se déroulent rapidement, d'autres plus lentement, et un certain temps est nécessaire avant d'arriver à l'équilibre. Certains processus n'ont lieu qu'après une première phase de liaison. Les processus de vieillissement des contaminations, bien connu sous le terme anglo-saxon de « *ageing* », conduisent en général à une réduction de la mobilité des ETMs (McLaughlin et al., 2000). Le vieillissement des sols, évolution naturelle de pédogénèse, module la mobilité des ETMs car les phases organiques (auxquelles les métaux peuvent être associés) sont à long terme dégradées (McLaughlin et al., 2000).

Considérant le site de Metaleurop, les sols ont été pollués pendant plusieurs décennies : les différents phénomènes de vieillissement (vieillissement des contaminations, vieillissement des sols, dégradation des formes minérales insolubles en composés solubles) ont pu avoir lieu. Il paraît difficile de prévoir si la mobilité des ETMs dans les sols pollués autour de l'usine a évolué vers une réduction ou une augmentation, donc une diminution ou un accroissement du risque pour l'environnement. Il est en effet possible que les sols les plus pollués présentent des fractions d'ETMs mobiles, pouvant être transférés dans les compartiments biotiques, très faibles. Le risque représenté par ces zones fortement contaminées pourrait donc être limité par le fait que la spéciation des ETMs ait évolué dans le sens d'une très faible mobilité.

La fraction mobile des métaux dans les sols peut donc montrer une forte variabilité spatiale et temporelle. Ce, puisque la mobilité des métaux est principalement régie par les propriétés des sols, lesquelles varient dans le temps et l'espace, mais aussi par les concentrations totales et l'évolution de la spéciation, qui varient également spatialement et temporellement.

### *1.1.2.c. Enjeux de la pollution des sols par les ETMs*

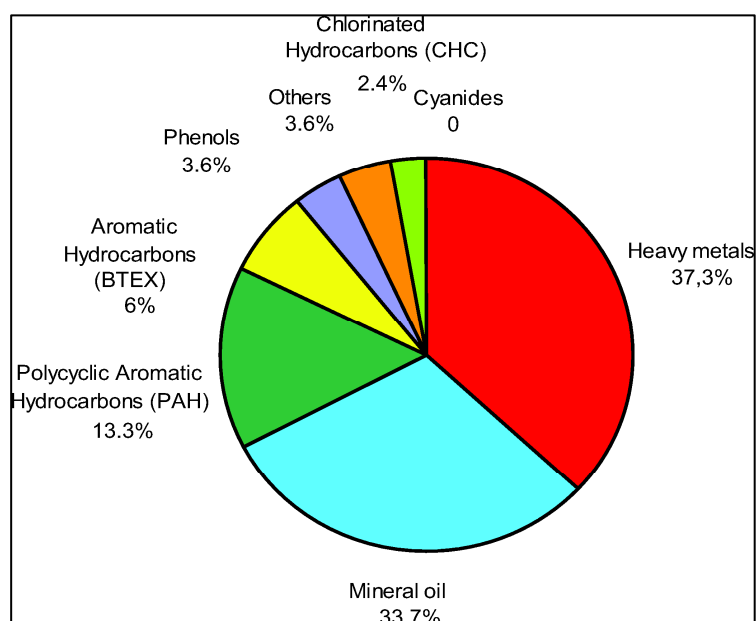
#### « Santé » des sols

Si les émissions atmosphériques d'ETMs en Europe ont diminué de manière continue depuis les 40 dernières années (Pacyna et al., 2007; CITEPA, 2009) et tout particulièrement depuis les années 1990, les contaminations des sols restent élevées (Scheifler et al., 2006a). Les polluants métalliques, contrairement à de nombreux polluants organiques qui peuvent être dégradés, sont en effet persistants dans l'environnement (Walker et al., 2006).

Or la contamination en ETMs des sols peut altérer la structure et le fonctionnement des communautés d'organismes du sol et mettre ainsi en péril la qualité et le fonctionnement des sols. La contamination des sols en ETMs peut en conséquence poser un problème majeur pour la santé des sols et des écosystèmes associés (Adriano, 2001; Fairbrother et al., 2007). Cependant, la santé des systèmes pédologiques est essentielle pour le fonctionnement des écosystèmes terrestres (Doran and Zeiss, 2000; Edwards, 2002). Les sols ont en effet un rôle clé dans les flux d'énergie et de matière, tenant une large part dans les cycles des éléments (Gobat et al., 2003). La présence de contaminants dans les sols des agrosystèmes peut entraîner la mise en péril des quantités et de la qualité des produits de consommation humaine et animale et exposer les populations humaines aux polluants via la chaîne alimentaire. Le sol est par ailleurs une ressource essentielle, non renouvelable, qui est soumise à des pressions croissantes. L'importance de la protection des sols est désormais reconnue au niveau international. La pollution locale et diffuse des sols est l'une de ces pressions croissantes, elle est par ailleurs considérée comme étant la 3<sup>ème</sup> menace pesant sur la qualité des sols parmi les 10 identifiées, après l'érosion et la diminution des teneurs en matière organique (Adriano, 2001; Commission of the European Communities, 2002; 2006).

Divers polluants affectent la qualité des sols et les ETMs représentent une forte proportion d'entre eux si l'on considère les sols contaminés en Europe ou en France (Figure I.1.5). Sur plus de 4000 sites pollués répertoriés dans la base de données nationale du Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement Durable et de l'Aménagement du Territoire français répertoriant les sites pollués (BASOL, 2009), plusieurs ETMs figurent parmi les 10 principaux polluants constatés (en termes d'occurrence) dans les sites contaminés en France.

Ainsi, le Cd est présent dans 6,4% de sites, le Pb dans 18,1% et le Zn dans 10,4%.



**Figure I.1.5.** Bilan des contaminants affectant les sols et eaux souterraines en Europe (European Environment Agency, 2006).

Les impacts des ETMs dans les écosystèmes représentent un enjeu pour la protection de l'environnement mais aussi pour la santé humaine et pour l'économie (European Environment Agency, 2007; Fairbrother et al., 2007). Dans ce contexte, une évaluation du risque environnemental (ERE, appelée également évaluation du risque écologique) lié à la pollution des sols par les ETMs est nécessaire. La démarche d'ERE, dont la procédure est détaillée au praragraphe I.1.5, vise en effet à estimer les impacts sur les écosystèmes de la présence de polluants dans l'environnement, afin d'envisager la mise en place de programme de remédiation, orienter la gestion des sites contaminés ou encore guider les limites de l'utilisation de matrices (sols, sédiments) contenant des polluants en milieu naturel (USEPA, 1998; Jensen et al., 2006; Smith et al., 2006; Hayet et al., 2009).

### En résumé...

L'importance sanitaire et économique de la « santé » des sols rend nécessaire leur protection vis-à-vis des pollutions locales et diffuses en ETMs, et exige l'application d'études d'ERE. Pour atteindre cet objectif de protection, il convient de développer la connaissance des caractéristiques des contaminations des sites pollués et du devenir des ETMs dans les sols pollués.

Un grand nombre de facteurs physiques, chimiques et biologiques conditionnent le transport, le devenir et la mobilité des contaminants. Si la plupart sont bien identifiés et quantifiés, un manque de connaissance existe en ce qui concerne les facteurs agissant à des échelles intermédiaires (telles que celles des sites pollués, quelques km<sup>2</sup>) situées entre des échelles régionales voire continentales (plusieurs dizaines de km<sup>2</sup>) et micro-locales (µm<sup>2</sup> à m<sup>2</sup>) (van Oort et al., 2009). En effet, le transport et le devenir des ETMs à de larges échelles spatiales (régionales

voire continentales) ou la spéciation à des échelles micro-locales ont été fréquemment étudiés, mais très peu d'études combinent les différentes échelles (van Oort et al., 2009). Il semble pourtant nécessaire d'étudier les facteurs qui conditionnent la distribution et la mobilité des polluants dans les sols sur des étendues pertinentes par rapport à celles où des effets préjudiciables des polluants sur la faune peuvent exister.

Dans l'ensemble, les différents facteurs qui peuvent moduler les concentrations totales et extractibles des ETMs dans les sols sont étudiés séparément, ce qui ne permet pas de quantifier leur importance relative et leurs interactions. Les études sont soit focalisées sur l'apport ou la déposition de polluants, sur la quantification et la description des niveaux des ETMs dans les sols de sites pollués, sur les paramètres pédologiques et géologiques qui influencent les niveaux de fond ou encore sur la spéciation à échelle micro-locale des polluants dans les sols. Par ailleurs, de nombreux travaux concernent plus le développement de méthodes aboutissant à la prédiction des concentrations dans les sols par interpolation spatiale que la compréhension des mécanismes qui expliquent la distribution spatiale.

Pourtant, l'étude intégrée des facteurs liés à l'apport, au dépôt, à la rétention et à la mobilité des ETMs dans les sols, qui agissent à différentes échelles spatiales, pourrait permettre d'évaluer l'importance relative de chacun d'eux et ainsi améliorer la compréhension de l'hétérogénéité spatiale des contaminations et de son implication dans le transfert des polluants dans les écosystèmes.

Notre étude s'intéressera à la variabilité spatiale et non temporelle des contaminations des sols, mais pourra néanmoins servir de base à l'étude de la variabilité à des échelles de temps pertinentes vis-à-vis des processus de vieillissement (décennies à plusieurs décennies).

### **I.1.3. Transfert des ETMs dans les écosystèmes**

#### *I.1.3.a. Exposition*

L'exposition d'un organisme est définie au sens strict comme le contact d'un organisme avec un agent chimique ou physique. L'exposition est donc le processus par lequel l'organisme acquiert une dose (USEPA, 1992; Suter II, 1993). Ainsi, l'exposition peut être définie comme la quantité d'un agent particulier qui atteint un organisme, système ou (sub-population cible à une fréquence spécifique pendant une durée définie (IPCS, 2004). L'exposition permet donc de décrire et quantifier le contact entre une cible (organisme) et un agent (polluant) et ainsi la possibilité et l'intensité du transfert du polluant du média (biotique ou abiotique) vers l'organisme, que ce soit par transfert non trophique ou trophique. Ce concept est essentiel en écotoxicologie puisqu'il est le déterminant du transfert des polluants des compartiments abiotiques : l'environnement aux compartiments biotiques : organismes et entre compartiments biotiques (transfert trophique).

Les organismes sont exposés aux polluants lorsque le récepteur (organisme) et l'agent (polluant) co-existent dans le temps et l'espace et interagissent (Smith et al., 2007). Cependant la

co-occurrence est une condition nécessaire mais pas suffisante pour assurer l'exposition, et les interactions entre polluant et récepteur sont essentielles. Pour évaluer l'exposition passée, présente ou future d'un récepteur, il convient de caractériser l'intensité de l'exposition (souvent exprimée par la concentration de l'agent dans la ou les sources d'exposition pertinentes), la définir temporellement (fréquence et durée du contact...) et spatialement (usage de la zone, proximité de la source, surface exploitée...) (Fairbrother et al., 2007; Smith et al., 2007).

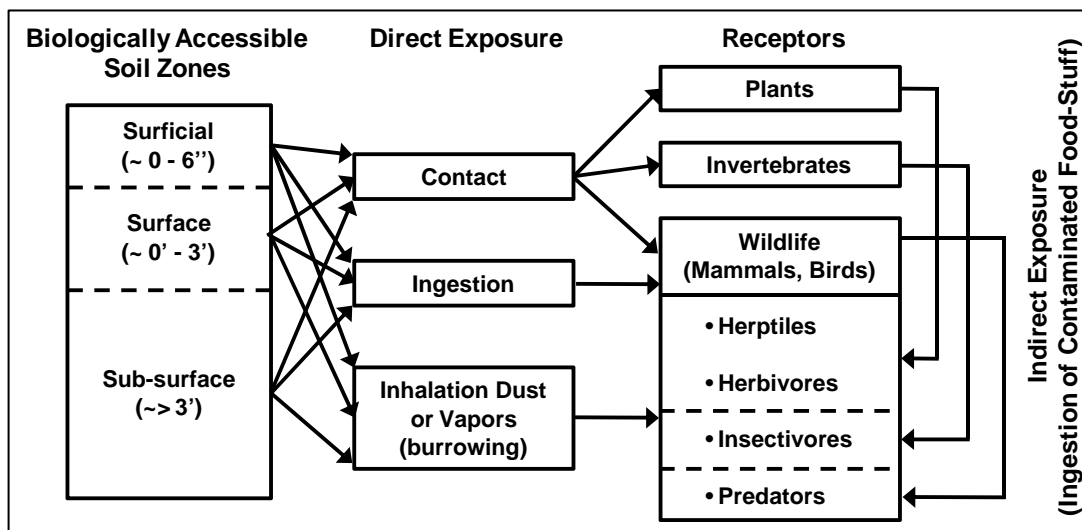
Les sources d'exposition sont les médias (compartiments biotiques et abiotiques) dans lesquels se trouve le polluant : l'eau, l'air, le sol ou les sédiments et la biomasse. Les voies d'absorption sont les voies par lesquelles le polluant pénètre dans le milieu intérieur (Figure I.7). Le point d'exposition caractérise le lieu du contact entre polluant et cible. Enfin, la voie d'exposition peut être définie comme la voie de passage d'un polluant de la source vers une cible. Elle intègre donc la source d'exposition, le point d'exposition et la voie d'absorption, il s'agit de la description de la voie empruntée par le polluant depuis la source jusqu'à la cible (IPCS, 2004; Fairbrother et al., 2007). Ainsi, lorsque l'on cherche à quantifier l'intensité de l'exposition d'un organisme, il convient de caractériser la voie d'exposition de l'organisme au polluant, en identifiant les quantités de polluant concernées dans la ou les sources pour chacune des voies d'exposition, à l'endroit où l'organisme et le polluant co-existent.

Par ailleurs, il convient de différencier la dose potentielle (quantité de polluant dans l'environnement aux lieux et temps d'exposition), la dose appliquée (quantité de polluant réellement en contact avec l'organisme), la dose interne (quantité de polluant qui traverse les barrières physiologiques et pénètre dans l'organisme) et enfin la dose biologique effective (quantité de polluant qui peut exercer un effet toxicologique) (USEPA, 1992).

Sur le terrain, il est en général possible de mesurer la dose potentielle (concentrations en polluant dans l'environnement) et la dose interne (quantité de polluant accumulé dans un organisme), des polluants persistants ou des polluants dont les mécanismes et les produits de dégradation sont connus. L'évaluation de la dose appliquée et de la dose effective est plus compliquée, en raison des nombreuses variables environnementales et biologiques qui les influencent. En effet, de nombreux facteurs biologiques et écologiques modulent l'exposition des organismes en modifiant l'intensité, la durée et/ou la fréquence du contact avec le polluant (Peakall and Burger, 2003; Smith et al., 2007). Ils sont notamment liés au mode de vie (milieu de vie, exploitation de l'habitat, taille du domaine vital...), au nourrissage (régime alimentaire, et comportement de nourrissage) et à différents traits d'histoire de vie (développement, reproduction) (Peakall and Burger, 2003; Smith et al., 2007).

D'autre part, la contribution relative des voies d'exposition varie entre organismes et selon les sources de contamination et les polluants concernés. L'implication des différentes sources et voies et en conséquence les voies d'exposition peuvent varier drastiquement d'une situation à l'autre. Concernant plus précisément les polluants présents dans les sols, leur répartition verticale et horizontale conditionne les voies d'exposition mises en jeu. Par ailleurs, les contaminants présents

dans les sols peuvent entraîner une exposition directe (contact, inhalation, consommation) ou indirecte par transfert dans les chaînes alimentaires (Figure I.1.6).



**Figure I.1.6.** Modèle conceptuel pour l'exposition directe et indirecte des récepteurs écologiques aux contaminants présents dans les sols (McGeer et al., 2004).

Plus particulièrement, parmi les modèles biologiques étudiés dans cette thèse, les mollusques gastéropodes terrestres peuvent être exposés via l'air, l'eau et le sol et la biomasse (Figure I.8). Par exemple il a été montré que l'escargot petit gris *Cantareus (ex-Helix) aspersus* était exposé aux ETMs par voie digestive, pulmonaire et tégumentaire (Gomot-de Vaufleury and Bispo, 2000; Coeurdassier et al., 2002; Gomot-de Vaufleury and Pihan, 2002; Regoli et al., 2006; Scheifler et al., 2006b; Fritsch et al., 2008). La contribution relative des différentes voies varie selon le polluant considéré et les conditions d'exposition. Les micromammifères sont soumis aux mêmes sources d'exposition que les escargots, mais leur principale source d'exposition aux polluants présents dans les sols est indirecte par l'ingestion de nourriture contaminée (Figures I.1.7 et I.1.16) (Shore and Rattner, 2001; Smith et al., 2007). L'ingestion accidentelle et l'inhalation de particules de sol peut aussi représenter une voie non négligeable, soit par ingestion de particules à la surface des aliments, ou encore lors du creusage d'un terrier ou de la toilette (Beyer et al., 1994; Chesser et al., 2001; McGeer et al., 2004).

### I.1.3.b. Biodisponibilité

Un concept essentiel dans l'évaluation de la dose appliquée et interne, et par conséquent dans l'étude du transfert des polluants dans les écosystèmes, est celui de la biodisponibilité. Si la dose appliquée dépend du contact, elle dépend aussi de la disponibilité environnementale du contaminant : la quantité totale du contaminant présent dans le milieu n'est pas nécessairement accessible aux organismes. Ceci est particulièrement prégnant dans le cas des matrices telles que le sol ou les sédiments. La partition du polluant dans le sol affecte sa potentialité d'être transféré dans/vers un organisme. Dans le cas des ETMs par exemple, nous avons vu que la quantité totale

était partitionnée entre des fractions mobiles ou échangeables et d'autres fractions fortement fixées voire immobiles.

Si le concept de biodisponibilité est essentiel et fréquemment usité dans la littérature, sa définition reste discutée et l'emploi de ce terme recouvre parfois des définitions variables et inadéquates qui peuvent conduire à des malentendus sur l'interprétation des résultats de travaux en écotoxicologie (Peijnenburg and Jager, 2003) Il convient donc de développer des éclaircissements sur le concept et la définition de la biodisponibilité.

La biodisponibilité peut être définie comme la fraction de la quantité totale de polluant présent dans un compartiment (sol, sédiment, item alimentaire...) qui, au cours d'une durée donnée (durée d'exposition), est disponible ou peut être rendue disponible pour l'absorption par les organismes et causer des effets dans l'organisme (Peijnenburg and Jager, 2003; IPCS, 2004; Fairbrother et al., 2007; Kaufman et al., 2007; ISO, 2008; Denys et al., 2009)(Figure I.1.7). Cette définition reflète un processus dynamique qui implique 4 conditions majeures conditionnant le transfert et les effets dans les organismes : la disponibilité environnementale, la biodisponibilité environnementale, la bioaccessibilité et la biodisponibilité toxicologique (Figure I.1.7). La disponibilité environnementale traduit la libération du polluant par le média, donc sa partition physico-chimique dans le média. La biodisponibilité environnementale concerne la proportion de polluant pouvant être absorbée et fait intervenir les caractéristiques biologiques et physiologiques de l'organisme qui peuvent moduler l'absorption (Figure I.1.7). Dans le cadre de la biodisponibilité environnementale, lorsque l'absorption a lieu par voie digestive, la bioaccessibilité exprime la fraction absorbable du polluant présent dans le média pouvant pénétrer dans le milieu intérieur de l'organisme et atteindre la circulation systémique en traversant les membranes biologiques du tube digestif (Peijnenburg and Jager, 2003; Denys et al., 2009). Enfin, la biodisponibilité toxicologique traduit la fraction du polluant présent dans l'organisme pouvant exercer des effets toxiques, donc la redistribution du polluant dans l'individu au niveau tissulaire et cellulaire (Figure I.1.7).

Dans le cas des sols et sédiments, la disponibilité environnementale dépend des caractéristiques physico-chimiques du polluant et du média, qui contrôlent sa partition dans le média sous des formes solubles, échangeables et non-échangeables (Peijnenburg and Jager, 2003; McGeer et al., 2004; Fairbrother et al., 2007; Harmsen, 2007). Il est généralement considéré que les fractions solubles et échangeables des métaux sont biodisponibles tandis que les fractions plus fortement liées à la matrice ne le sont pas, même si cela a pu être remis en cause par certaines études (Scheifler et al., 2003b).

La pénétration des polluants à travers les membranes biologiques peut s'opérer par diffusion passive ou facilitée ou encore via des mécanismes de transport actifs (Peijnenburg and Jager, 2003; McGeer et al., 2004) (Figure I.1.7). La bioaccessibilité dépend des capacités physico-chimiques du polluant à traverser les membranes biologiques et des caractéristiques physiologiques de l'organisme.

Le concept de bioaccessibilité est principalement employé dans le cas des transferts par



ingestion et concerne donc la fraction qui après ingestion, peut être mobilisée par les fluides digestifs puis pénétrer dans le milieu intérieur. Les caractéristiques digestives des organismes (comme par exemple, la durée du transit et le pH des différents compartiments du tractus gastro-intestinal), ainsi que les caractéristiques physico-chimiques de la matrice ingérée et la spéciation dans la matrice du polluant induisent des variations drastiques de la bioaccessibilité entre différentes situations (Peijnenburg and Jager, 2003; McGeer et al., 2004; Denys et al., 2007; Fairbrother et al., 2007; Kaufman et al., 2007). L'efficacité de l'assimilation digestive varie selon la forme chimique du polluant dans la matrice ingérée : à quantité de polluant égale, la fraction assimilée peut fortement varier entre deux matrices différentes et entre 2 espèces métalliques différentes au sein de la même matrice.

Enfin, la biodisponibilité toxicologique est inhérente aux processus physiologiques qui gouvernent l'absorption, la compartimentation à l'échelle des tissus et des cellules ainsi que la détoxification (Peijnenburg and Jager, 2003; Fairbrother et al., 2007) (Figure I.1.7). Les polluants peuvent en effet être excrétés mais aussi stockés sous des formes non-toxiques. Les capacités physiologiques des organismes à séquestrer les métaux par exemple, sous de formes non-toxiques, peuvent donc influencer la biodisponibilité toxicologique : une forte quantité accumulée n'implique pas nécessairement une grande quantité toxique si une partie du polluant est stockée sans interaction possible avec les cibles cellulaires (Vijver et al., 2004; Fairbrother et al., 2007).

Les mécanismes qui contrôlent la biodisponibilité sont donc liés au média, au polluant et à l'organisme considéré. Pour un même organisme, la biodisponibilité d'un métal considéré en concentration totale égale peut donc varier considérablement entre 2 sols dont les caractéristiques physico-chimiques diffèrent. De la même manière, la biodisponibilité d'un métal considéré en concentration totale égale dans un même sol peut varier drastiquement entre organismes vivants selon leurs caractéristiques écologiques, biologiques et physiologiques.

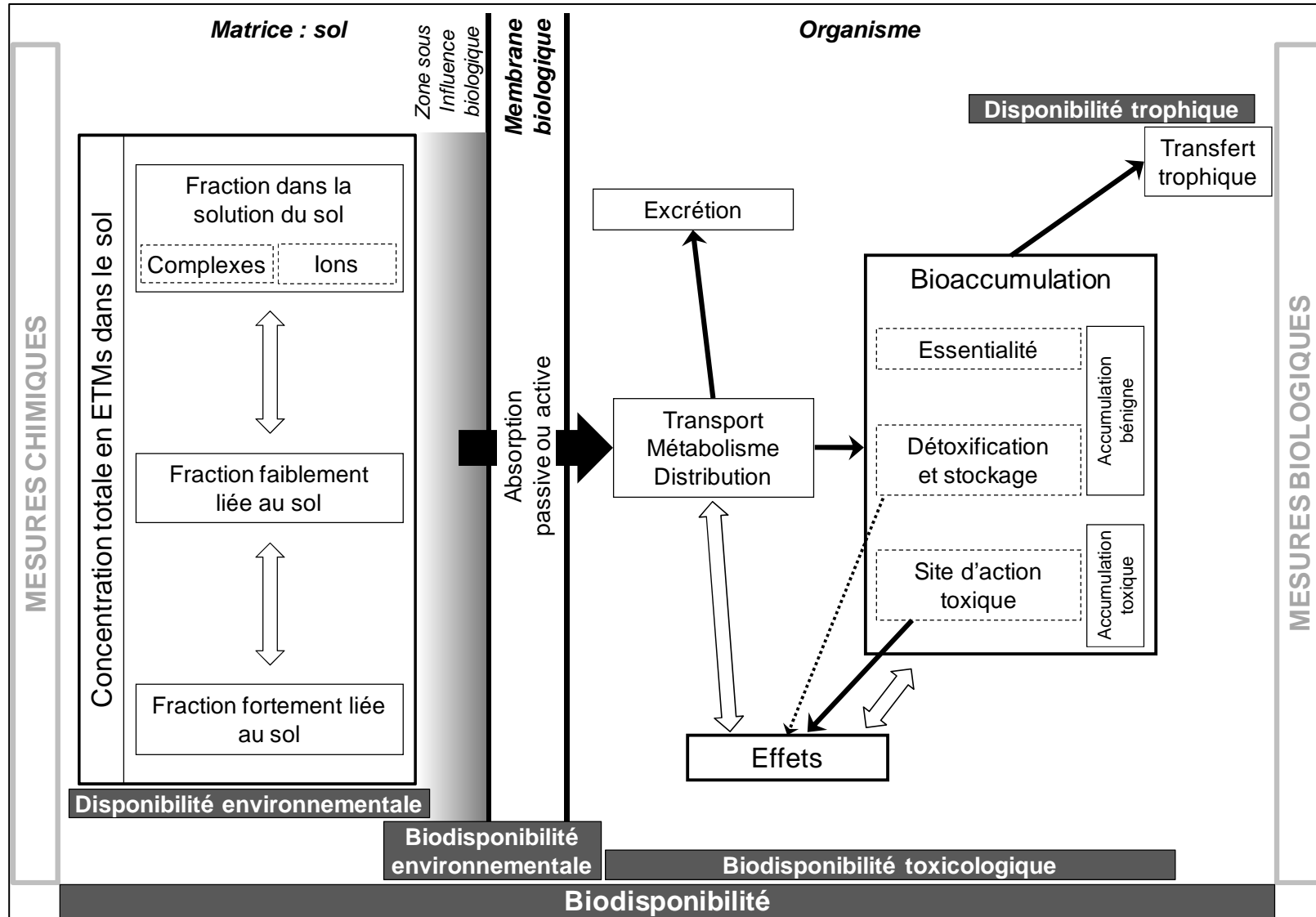
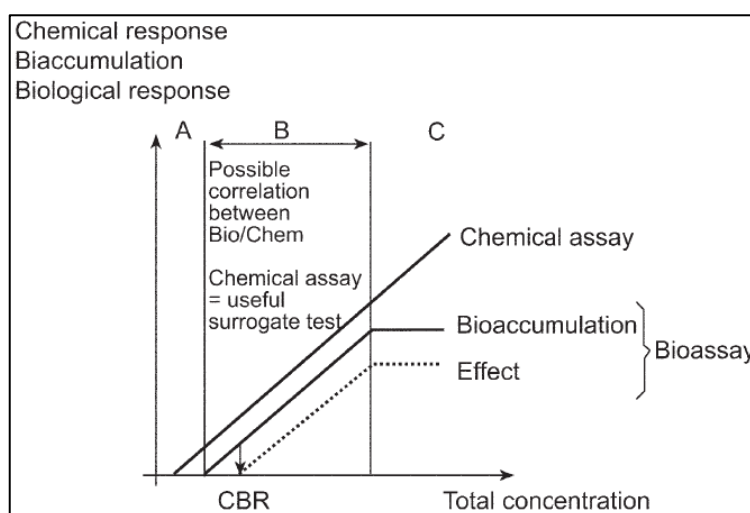


Figure I.1.7. Représentation schématique du concept de biodisponibilité et des concepts associés.

La biodisponibilité peut être évaluée par des mesures chimiques ou biologiques (Peijnenburg and Jager, 2003; Harmsen, 2007; ISO, 2008) (Figure I.1.7). Il est généralement admis que la disponibilité environnementale des ETMs dans les sols et les sédiments peut être évaluée en utilisant des extractants chimiques, tels que ceux décrits précédemment (partie I.1.2.b) pour l'extraction des différentes fractions de métaux dans les sols, ou à l'eau (Harmsen, 2007; Meers et al., 2007; ISO, 2008). La biodisponibilité étant dépendante de la disponibilité environnementale et de l'organisme considéré, les extractants sont plus ou moins pertinents selon l'espèce et les caractéristiques du sol ou des sédiments analysés, pour estimer la biodisponibilité. La performance de l'extractant dépend en outre du polluant considéré. Si de nombreuses recherches tentent de relier extraction chimique et biodisponibilité, les extractants identifiés comme reflétant la biodisponibilité pour un organisme sont rarement généralisables. Un même extractant ne permet pas systématiquement d'avoir accès à la même fraction échangeable selon les caractéristiques physico-chimiques du sol. De plus, pour un même sol, un extractant peut apporter une bonne estimation de la biodisponibilité d'un métal pour une espèce donnée, tandis qu'un autre agent chimique apporte une meilleure estimation pour une autre espèce (Peijnenburg and Jager, 2003). La biodisponibilité des ETMs dans un sol peut également être évaluée par l'utilisation d'organismes vivants, par mesure des concentrations accumulées ou des effets (réponses biochimiques, performances individuelle, morbidité, létalité...) dans des conditions d'exposition données (Hund-Rinke and Kordel, 2003; ISO, 2006; Harmsen, 2007; ISO, 2008).

Les données d'accumulation des métaux mesurées dans les organismes que ce soit dans des études de laboratoire ou de terrain peuvent être utilisées comme des mesures de la biodisponibilité (Peakall and Burger, 2003). Ces données de bioaccumulation peuvent concerner soit des mesures à un temps donné, soit des études cinétiques qui permettent d'évaluer les flux d'assimilation et d'élimination des métaux. La bioaccumulation représente un indicateur de la biodisponibilité environnementale uniquement si l'organisme considéré présente des capacités d'accumulation forte et d'excrétion faible, sans quoi les concentrations internes ne reflètent pas la capacité du polluant à pénétrer dans l'organisme. Une autre mesure biologique de la biodisponibilité est la mesure de réponses biologiques dans les organismes. Dans ce cas, le paramètre biologique considéré reflète la biodisponibilité au sens large, y compris la disponibilité toxicologique. Ces mesures de réponse biologique peuvent concerner des mesures d'effets délétères (croissance, reproduction, pathologie...) ou d'expressions de biomarqueurs (activités enzymatiques, protéomique, génétique...).

Les mesures chimiques ou biologiques de la biodisponibilité apportent des informations similaires ou différentes selon les différents cas de figure existants. Les 3 paramètres présentent des relations mais celles-ci n'étant pas linéaires, les 3 mesures n'apportent pas nécessairement le même résultat (Figure I.1.8).



**Figure 1.1.8.** Méthodes d'évaluation de la biodisponibilité : relations conceptuelles entre tests chimiques et biologiques et bioaccumulation (Harmsen, 2007). Réponses des tests chimiques et biologiques en fonction de la concentration totale. Zone A : le contaminant est détecté, mais il n'y a pas d'effet détectable. Zone B : les courbes dose-réponse sont parallèles pour les tests chimiques et biologiques, alors le test chimique constitue un substitut utile aux essais biologiques, il est représentatif des réponses biologiques (accumulation ou effets). Zone C : les relations entre les tests deviennent non linéaires, la corrélation entre les paramètres d'évaluation de la biodisponibilité est perdue. CBR : critical body residues (concentration interne à partir de laquelle un effet est observé).

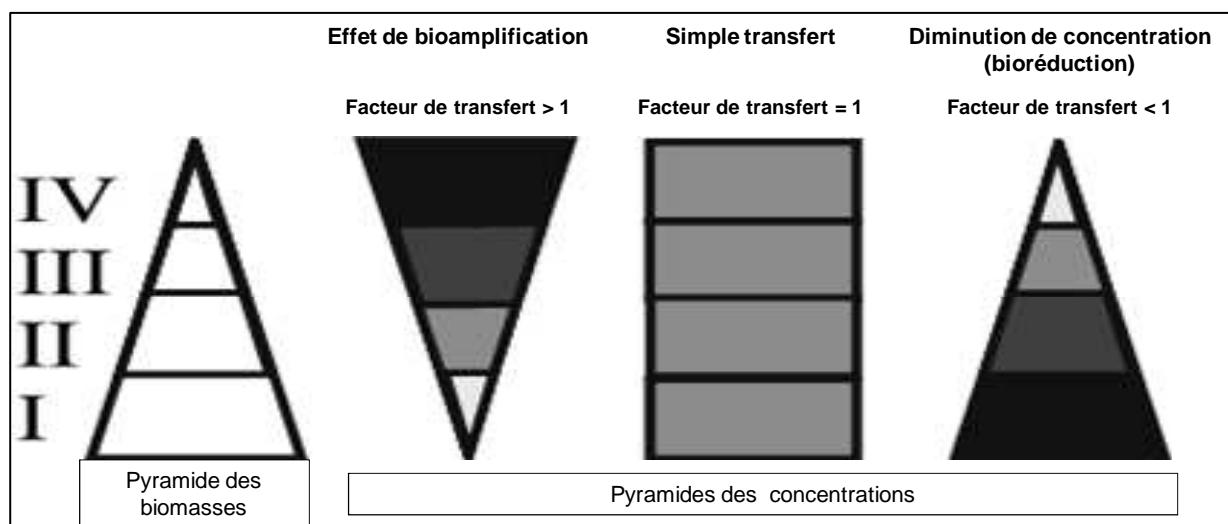
Il a été souligné depuis quelques années que l'évaluation du risque environnemental devrait être basée sur les fractions disponibles et non totales des ETMs dans les sols, puisque de nombreux tests en laboratoire ont montré que les réponses des organismes étaient plus corrélées aux concentrations biodisponibles que totales (ISO, 2008). Les extractions avec des sels neutres comme le  $\text{CaCl}_2$  semblent de bons indicateurs de la biodisponibilité des ETMs dans les sols pour certaines plantes et invertébrés du sol, ces méthodes sont donc conseillées pour l'évaluation du risque lié aux ETMs (Harmsen, 2007; Meers et al., 2007; ISO, 2008). Pourtant, lorsque ce type de démarche a été récemment testé *in situ*, en étudiant les corrélations entre concentrations en ETMs des micromammifères et les concentrations considérées comme disponibles dans les sols (extractibles avec des sels neutres ou dans l'eau interstitielle du sol), les auteurs ont mis en évidence de faibles relations voire l'absence de corrélation (Rogival et al., 2007b; Wijnhoven et al., 2007; Van Gestel, 2008). Les conclusions de ces travaux montrent que des plus amples recherches sont nécessaires pour déterminer dans quelle mesure les fractions disponibles mesurées par extraction sont pertinentes pour l'évaluation des risques pour les vertébrés.

### 1.1.3.c. Transfert des ETMs dans les réseaux trophiques

Considérant les polluants présents dans les sols ou les sédiments, les organismes qui ne dépendent pas directement de ces matrices en tant que ressource (nourriture, habitat...) peuvent être contaminés par transfert trophique. Le transfert trophique est par conséquent déterminant pour la contamination des organismes, et le transfert et les effets des ETMs dans les écosystèmes. En effet, l'exposition par ingestion de nourriture contaminée est la voie principale

pour une grande majorité de vertébrés mais aussi les invertébrés carnivores et herbivores (Smith et al., 2007) (Figure I.1.6). Les métaux accumulés dans les différents organismes constituant les réseaux trophiques peuvent entraîner l’empoisonnement secondaire des prédateurs, les transferts trophiques ont par conséquent une forte implication dans les effets des ETMs dans les écosystèmes (Gorree et al., 1995; Jongbloed et al., 1996; Scheifler et al., 2002; Hamers et al., 2006; Walker et al., 2006; Hispard et al., 2008a; Veltman et al., 2008). Le transfert trophique peut conduire au phénomène de biomagnification (i.e. augmentation des concentrations accumulées avec le niveau trophique), qui est cependant un phénomène plutôt rare et non généralisable bien qu’ayant eu de larges conséquences environnementale et sanitaires dans certains cas (Ramade, 2007)(Figure I.1.9). Mais si ce phénomène a été observés à plusieurs reprises pour certains contaminants, comme les polluants organiques persistants ou encore le Hg (AMAP, 2004; Ramade, 2007), il est extrêmement rare et anecdotique dans le cas des ETMs. Cependant, dans certaines chaînes alimentaires, des cas de biomagnification du Cd ont parfois été rapportés (Gorree et al., 1995; Veltman et al., 2007). Le transfert des ETMs entre les compartiments peut aboutir à 3 patrons principaux de transfert dans les réseaux trophiques: un effet de biomagnification (ou bioamplification), un simple transfert ou une diminution des concentrations (parfois appelée bioréduction ou biodilution) (Figure I.1.9).

Ces patrons sont déterminés par les caractéristiques du polluant, mais aussi par la structure et la composition des communautés concernées : le transfert varie selon les caractéristiques biologiques et physiologiques des espèces constituant les réseaux trophiques (combinaisons de l’exposition et de la régulation des concentrations internes aux différents niveaux trophiques).



**Figure I.1.9.** Principaux types de pyramides concentrations résultant du transfert trophique des polluants dans les réseaux trophiques.

L'étude du transfert des ETMs dans les chaînes alimentaires est souvent réalisée en mesurant les concentrations en métaux dans différents organismes présents sur un site et en se basant sur des données bibliographiques pour estimer le régime alimentaire des espèces étudiées (Roberts

and Johnson, 1978; Hunter and Johnson, 1982; Andrews et al., 1984; Scanlon, 1987; Pascoe et al., 1996; Mertens et al., 2001; Notten et al., 2005; Hamers et al., 2006; Veltman et al., 2008). Les résultats obtenus dans de nombreux travaux montrent que le régime alimentaire des espèces étudiées influence leur contamination. Les organismes carnivores présentent généralement de plus fortes concentrations que les herbivores par exemple pour les polluants organiques persistants (POPs) et les agents chimiques persistants, bioaccumulables et toxiques (PBTs) dont font partie certains ETMs non essentiels (Shore and Rattner, 2001; AMAP, 2004; Debruyn and Gobas, 2006; Gobas et al., 2009). Certains travaux se sont attachés à la prédiction du transfert des ETMs dans les chaînes alimentaires en utilisant des modèles de bioaccumulation, notamment pour le Cd (Gorree et al., 1995; Jongbloed et al., 1996; Sample et al., 1998; Veltman et al., 2008; Loos et al., *In press*). L'un des problèmes majeurs pour évaluer les transferts trophiques est le manque de connaissances du régime alimentaire de nombreuses espèces et le fait qu'il est extrêmement variable temporellement, spatialement, et entre individus pour de nombreuses espèces (Hopkin, 1989; Shore and Rattner, 2001). Par exemple, chez les escargots et les micromammifères, il a été montré que le régime alimentaire diffère entre sites, saisons, périodes de vie et individus (Mason, 1970; Williamson and Cameron, 1976; Abt and Bock, 1998; Lugon-Moulin, 2003; Smith et al., 2007). Lors de l'évaluation de l'exposition aux polluants, la prise en compte précise du régime alimentaire sur un site contaminé peut ainsi aboutir à des résultats différents de ceux basés sur les données de régime alimentaire de la bibliographie (Millsap et al., 2004). En l'absence de données empiriques sur la composition du régime alimentaire et les coefficients de transfert entre les niveaux trophiques, des coefficients généraux sont utilisés (facteurs de transfert ou de bioaccumulation) mais ils peuvent conduire à imprécision dans l'estimation du transfert qui pourtant est rarement mentionnée dans les études (Shore and Rattner, 2001). La prédiction des transferts est donc parfois réalisée à partir des concentrations en ETMs dans le sol, en se basant sur des régressions empiriques (Shore, 1995; Sample et al., 1998).

Certains animaux présentent de fortes capacités de bioaccumulation des ETMs, et parcequ'ils constituent une importante ressource alimentaire pour les prédateurs de par leur position dans les réseaux trophiques, jouent un rôle majeur dans le transfert des ETMs dans les chaînes alimentaires. C'est le cas notamment des annélides oligochètes, des mollusques gastéropodes terrestres et des micromammifères (Beeby, 1985; Jongbloed et al., 1996; Laskowski and Hopkin, 1996a; Reinecke et al., 2000; Shore and Rattner, 2001; Vandecasteele et al., 2004). Ainsi, les recommandations proposées pour l'identification des substances bioaccumulables et du suivi des transferts et de la biomagnification dans les écosystèmes terrestres, incluent la considération du réseau trophique sol-vers de terre–musaraigne–rapace (Gobas et al., 2009).

Pour conclure, lorsqu'un organisme est **exposé** à une fraction **biodisponible** de polluant, résulte après **absorption** une **accumulation** du polluant dans les tissus, l'ensemble de ce phénomène caractérisant le **transfert** des polluants des compartiments abiotiques aux compartiments biotiques puis entre compartiments biotiques.

## En résumé...

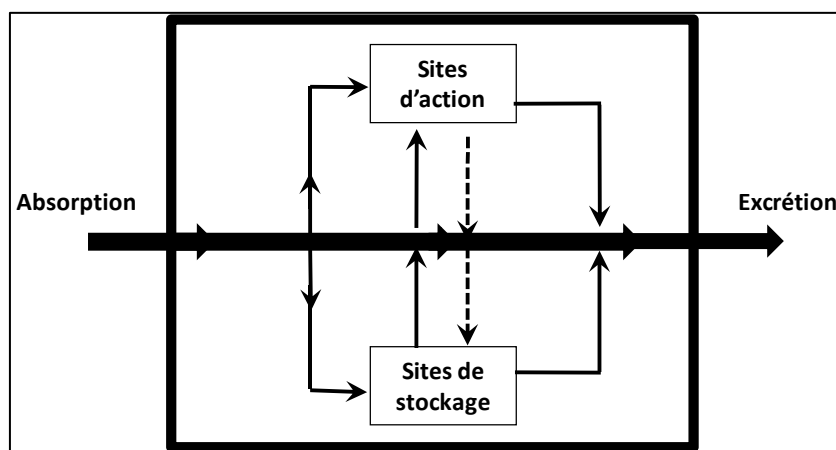
L'évaluation de la biodisponibilité et de l'exposition sont des questions clés en écotoxicologie et en évaluation du risque puisque ces paramètres constituent la base des transferts et des effets des ETMs dans les écosystèmes. Si de nombreux travaux ont permis de d'identifier les facteurs déterminants qui gouvernent exposition et biodisponibilité, il s'avère que les processus écologiques et dynamiques des écosystèmes contaminés empêchent souvent de prédire le transfert et les effets des ETMs *in situ*. Notamment, de plus amples recherches sont nécessaires pour identifier les relations entre disponibilité environnementale et accumulation dans les espèces de niveau trophique supérieur à ceux fréquemment étudiés pour l'étude de biodisponibilité des ETMs dans les sols (végétaux, invertébrés du sol). D'autre part, des manques existent dans la compréhension de l'exposition dans le cadre du transfert trophique : les prédictions ne recouvrent pas toujours la réalité, montrent des différences entre études et ne sont pas toujours confrontées avec des données de terrain. L'acquisition de données sur des sites contaminés en ETMs paraît nécessaire pour permettre la validation de modèles prédictifs. Elle pourrait par exemple incrémenter les bases de données et permettre d'améliorer l'évaluation du risque environnemental.

### I.1.4. Réponses des organismes aux ETMs

#### I.1.4.a. Accumulation des ETMs

Lorsque les métaux ont pénétré dans le milieu intérieur, par voie respiratoire, digestive ou cutanée, ils sont transportés via les fluides corporels (sang, lymphe, hémolymphe) ou diffusion active ou passive à travers les membranes biologiques (Walker et al., 2006; Fairbrother et al., 2007). Concernant la voie d'exposition digestive, les métaux peuvent être éliminés sans passage dans le milieu intérieur, par évacuation directe via le transit intestinal. Après absorption, les métaux sont ensuite distribués dans les différents tissus de l'organisme. La distribution au sein de l'organisme dans le temps qui suit l'absorption dépend de la voie d'exposition, et varie ensuite au cours du temps selon les caractéristiques du métal et la physiologie de l'organisme (Dallinger and Wieser, 1984; Walker et al., 2006). Les métaux peuvent alors être stockés dans des organes d'accumulation (souvent : os, foie, reins, hépato-pancréas) et atteindre des organes cibles. Les organes d'accumulation sont parfois des organes cibles, mais pas nécessairement : par exemple, le Pb chez les mammifères a des effets neuro-, hépato- et néphro-toxiques alors que près de 90% est accumulé dans les os.

Le modèle général décrivant le devenir des polluants dans les organismes montre 4 sites d'interaction avec le métabolisme : les sites de stockage, les sites de métabolisation, les sites d'action et enfin l'excrétion (Figure I.1.10). Le devenir des xénobiotiques métalliques diffère de celui d'autres xénobiotiques comme les composés organiques lipophiles dans la mesure où ils ne peuvent pas être métabolisés. Les métaux peuvent donc interagir avec le métabolisme par stockage, action ou excrétion (Figure I.1.10).



**Figure I.1.10.** Modèle général décrivant le devenir des ETMs. Adapté de (Walker et al., 2006).

Les métaux peuvent être excrétés via les fèces ou l'urine après éventuellement passage dans le foie ou l'hépatopancréas en début de digestion (excrétion biliaire). L'excrétion peut aussi être réalisée par voie salivaire et par la sueur pour certains métaux chez les mammifères. Les ETMs peuvent par ailleurs être éliminés par translocation et dépôt dans les éléments kératinisés (poils, griffes, plumes, exosquelette) qui seront remplacés au cours de la vie de l'organisme. Une élimination peut aussi exister par transfert dans le lait chez les mammifères, les œufs (oiseaux, reptiles, amphibiens, invertébrés) et le mucus chez les mollusques gastéropodes. Les ETMs essentiels sont régulés par des mécanismes homéostatiques. Des mécanismes d'absorption, de stockage et d'excrétion leur sont donc dédiés, mais ces derniers peuvent également être « empruntés » par d'autres métaux dont les caractéristiques physico-chimiques sont suffisamment proches. Différents mécanismes d'antagonisme ou de synergie entre métaux peuvent intervenir durant l'absorption, le stockage ou l'excrétion des métaux (Walker et al., 2006; Fairbrother et al., 2007; Reeves and Chaney, 2008).

L'hypothèse générale concernant la toxicité des métaux est que les formes atteignant les sites d'action sont principalement des formes libres (formes ioniques), la détoxification des métaux étant majoritairement possible par séquestration sous des formes non toxicologiquement actives et non par métabolisation comme pour les polluants organiques (Paquin et al., 2002; Vijver et al., 2004). La toxicité, la compartimentation et les formes de stockage des métaux dépendent non seulement de la physiologie des organismes mais également des caractéristiques physico-chimiques des métaux.

L'accumulation des métaux au sein de l'organisme est donc un processus dynamique, les concentrations internes représentant la balance entre l'absorption et l'élimination (Burger et al., 2003; Luoma and Rainbow, 2005; Fairbrother et al., 2007). Elle varie au cours du temps et peut être modélisée grâce à des approches toxicocinétiques (Gimbert, 2006; Fairbrother et al., 2007; Loos et al., 2009). L'accumulation des ETMs représente donc la première réponse des organismes



à l'exposition aux ETMs, et les concentrations accumulées représentent la dose interne appliquée à l'organisme et conditionnent les effets des ETMs.

Toutes les combinaisons liant de fortes/faibles capacités d'assimilation à de fortes/faibles capacités d'excrétion peuvent exister dans le vivant, certains organismes montrant des stratégies de régulation des concentrations internes avec de fortes capacités d'excrétion le plus souvent, d'autres des stratégies de macro-concentration avec des capacités de séquestration sous des formes non toxiques (Moriarty, 1999; Walker et al., 2006). Certains organismes peuvent montrer de très fortes capacités d'accumulation et sont qualifiés en ce cas de « macro-concentrateurs » ou « hyper-accumulateurs » (Dallinger and Rainbow, 1993). Par exemple, certains oligochètes et isopodes présentent des facteurs de bioconcentration (concentration interne/concentration dans le sol) supérieurs à 30 pour le cadmium.

Les mollusques gastéropodes terrestres sont connus pour accumuler de fortes concentrations en ETMs et peuvent être considérés comme des organismes hyper-accumulateurs bien que les facteurs de bioconcentration n'atteignent pas des niveaux aussi élevés que celui cité précédemment pour Cd (Williamson, 1980; Berger and Dallinger, 1993; Coeurdassier et al., 2000; Gomot-de Vaufleury and Pihan, 2000; Pihan and de Vaufleury, 2000; Notten et al., 2005; de Vaufleury et al., 2006; Scheifler et al., 2006b; Gimbert et al., 2008a). Cependant, leurs capacités d'accumulation dépendent de l'ETM considéré : par exemple, ils montrent des capacités d'excrétion du Pb relativement importantes, mais une quasi-absence d'excrétion du Cd. Parmi les micromammifères, on distingue des espèces qui accumulent peu les ETMs, les rongeurs en général, tandis que les insectivores sont en grande majorité considérés comme des hyper-accumulateurs (Talmage and Walton, 1991; Shore and Rattner, 2001; Veltman et al., 2007; Wijnhoven et al., 2007).

#### *1.1.4.b. Mécanismes de défense au niveau individuel*

##### Elimination et séquestration

Les réponses précoces des individus à la présence des ETMs dans leurs tissus mettent en jeu des mécanismes biochimiques et physiologiques permettant l'élimination et/ou la séquestration des éléments.

Certains organismes présentent des capacités de régulation de leurs concentrations internes en ETMs, en éliminant les ETMs absorbés notamment par excrétion. Cette stratégie de régulation des concentrations internes permet de maintenir de faibles concentrations en ETMs dans les tissus, limitant ainsi les possibilités d'interactions des ETMs avec des sites de toxicité.

D'autres organismes stockent les ETMs dans leurs tissus sous des formes toxicologiquement inertes. Ce stockage constitue un mécanisme de tolérance qui peut permettre aux organismes de survivre dans des environnements contaminés en ETMs. Les principales structures de séquestration sont des granules et des protéines, notamment des métalloprotéines dont les métallothionéines (MTs). Le stockage par séquestration dans des granules ou liaison à des

protéines dépend principalement du métal concerné mais aussi des capacités physiologiques des organismes (Hopkin, 1989; Peakall and Burger, 2003; Vijver et al., 2004; Walker et al., 2006). Ainsi, le Cd et le Zn sont principalement stockés par liaison à des MTs bien que l'on puisse les trouver également dans des granules, tandis que l'inverse est observé pour le Pb.

La mise en place de mécanismes de défense contre les ETMs, notamment l'induction de MTs, est considérée comme un marqueur d'exposition puisqu'elle constitue une réponse biochimique précoce des organismes à la présence d'ETMs dans leurs tissus (Amiard et al., 2006).

### **Granules**

Il existe plusieurs types de granules impliqués dans le stockage, le transport et l'excrétion des éléments (Brown, 1982; Hopkin, 1989; Dallinger and Rainbow, 1993; Vijver et al., 2004; Walker et al., 2006). On distingue 2 principaux types de granules impliqués dans la détoxification des métaux non-essentiels, les types A et B, qui sont des corpuscules d'inclusion intra-cellulaires. Les granules de type A sont constitués de couches concentriques de pyrophosphates et peuvent contenir des métaux de classe A et intermédiaire (Mn, Pb, Zn...). Leur rôle concerne la détoxification de certains métaux et l'excrétion, le stockage et la mobilisation d'éléments essentiels, et plus particulièrement du Ca. Les granules de type B proviennent du système lysosomal et contiennent de grandes quantités de soufre. Ils referment principalement des métaux des classes B et intermédiaire comme Cd, Cu, Hg, As et Zn mais aussi Pb. Ces granules proviendraient de la dégradation des MTs et semblent dédiés à la détoxification des métaux (Hopkin, 1989; Walker et al., 2006). Chez des micromammifères, l'apparition de corps d'inclusion dans les reins est considérée comme une première manifestation toxique de l'exposition aux métaux (Shore and Douben, 1994b; Shore and Rattner, 2001).

### **Protéines de liaison**

Les métaux peuvent être liés à des protéines dans 2 cas principaux : les protéines qui requièrent un ion métallique comme part de leur structure (hémoglobine, hémocyanine...) et les protéines de transport/stockage. Les protéines de transport et/ou de séquestration jouant un rôle majeur dans les processus de régulation homéostatique ou de détoxification des ETMs sont des métalloprotéines, liant plus ou moins spécifiquement certains métaux (par exemple protéines de liaison du Pb chez certaines espèces) et surtout des MTs.

### **Métallothionéines**

Les MTs sont des protéines cytosoliques de faible poids moléculaire non-enzymatiques, riches en cystéine (donc en soufre), résistantes à la chaleur et observées dans tous les règnes du monde vivant (Dallinger et al., 2000; Miles et al., 2000; Vijver et al., 2004; Amiard et al., 2006; Klaassen et al., 2009). Elles sont principalement impliquées dans les processus métaboliques d'absorption/excrétion et homéostatiques des métaux essentiels, la détoxification des métaux non-essentiels et la protection contre les radicaux libres (mécanismes anti-oxydants). Leur production est induite par de nombreux facteurs comme l'exposition aux ETMs (Cd et Zn notamment, mais

aussi Pb, Ni, Hg et Ag), des hormones, des cytokines, différents stress environnementaux et d'autres agents chimiques (xénobiotiques organiques par exemple) (Miles et al., 2000; Savva et al., 2002; Amiard et al., 2006; Swiergosz-Kowalewska et al., 2007). Les inducteurs les plus puissants sont les métaux et les glucocorticoides. La synthèse des MTs est par ailleurs modulée par des facteurs liés au récepteur et à l'environnement comme la condition corporelle, le stade de développement, la température, les rayonnements ultra-violets, la photopériode ou encore la saison (Włostowski, 1992b; a; Davis and Cousins, 2000; Miles et al., 2000; Włostowski et al., 2004; Swiergosz-Kowalewska et al., 2007; Marques et al., 2008). Les relations entre teneurs internes en ETMs et MTs ont fait l'objet de nombreuses études et le rôle protecteur des MTs contre les effets délétères des ETMs chez de nombreuses espèces est avéré. Ces études ont été menées tant en laboratoire qu'en milieu naturel chez les invertébrés, tandis que, pour les vertébrés, elles ont surtout été menées en laboratoire et sur la souris, le rat et un rongeur sauvage, le Campagnol roussâtre (Włostowski, 1992a; Włostowski and Krasowska, 1999; Dallinger et al., 2000; Miles et al., 2000; Park et al., 2001; Amiard et al., 2006; Klaassen et al., 2009). En comparaison, peu de recherches ont été menées sur l'exploration des relations entre concentrations internes en ETMs et en MTs ou sur l'induction des MTs chez les vertébrés sauvages en milieu naturel, exposés de manière chronique à des pollutions métalliques. La plupart d'entre elles sont récentes et focalisées sur l'utilisation de MTs comme marqueurs d'exposition aux métaux (Elliott and Scheuhammer, 1997; Barjaktarovic et al., 2002; Damek-Poprawa, 2002; Kojadinovic et al., 2007; Rogival et al., 2007a; Swiergosz-Kowalewska et al., 2007; Marques et al., 2008; Vanparrys et al., 2008).

Il est proposé dans de nombreux travaux que certains micromammifères insectivores présentent une forte bioaccumulation du Cd par rapport aux rongeurs mais une plus faible sensibilité au stress métallique grâce à une forte capacité de production de MTs (Shore and Douben, 1994a; Veltman et al., 2007). Pourtant, cette hypothèse n'a à notre connaissance jamais été vérifiée.

### **Glutathion**

Le glutathion (GSH) est le second composé hydrosulfure de faible poids moléculaire cytosolique majeur impliqué en tant que réactif cellulaire réducteur et ayant un rôle protecteur contre de nombreuses substances toxiques dont les ETMs à travers son groupe de liaison SH (Swiergosz-Kowalewska, 2001). Le GSH semble agir de manière similaire aux MTs et joue un rôle dans la défense contre le stress oxydatif mais aussi d'autres fonctions cellulaires de détoxification des composés endogènes et exogènes (Swiergosz-Kowalewska, 2001).

### Implication des formes de stockage pour les transferts dans les réseaux trophiques

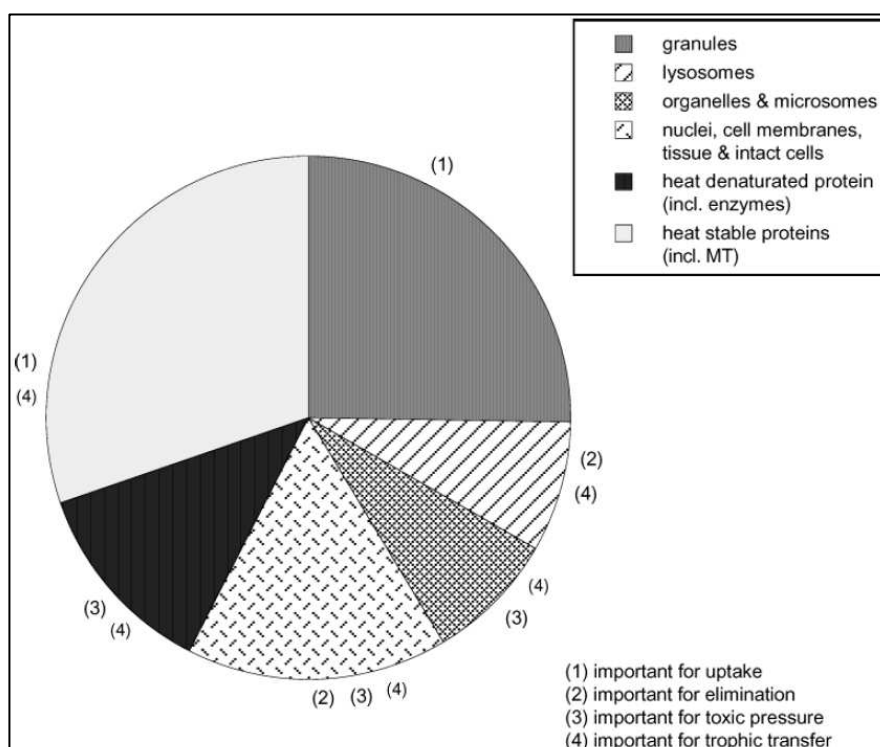
Si la séquestration des métaux revêt une importance toute particulière pour les mécanismes toxicocinétiques et toxicodynamiques en permettant aux organismes de gérer la présence de xénobiotiques internes en limitant leur potentiel toxique, elle est aussi capitale vis-à-vis du transfert dans les chaînes alimentaires (Figure I.1.11). Les formes de séquestration des métaux dans les

organismes peuvent influencer la biodisponibilité des ETMs dans les chaînes alimentaires (Figure I.1.11), une partie seulement de la quantité de métal accumulée dans un organisme pouvant être biodisponible pour un prédateur, donc être transférée au niveau trophique supérieur (Hopkin, 1989; Vijver et al., 2004). Cet aspect de la biodisponibilité des ETMs dans les chaînes alimentaires en lien avec la séquestration chez les récepteurs a amené la définition de « *trophically available metal* ». Ce concept a surtout été étudié en milieu marin (Wallace and Lopez, 1996; 1997; Wallace et al., 1998; Wallace et al., 2003; Wallace and Luoma, 2003; Seebaugh et al., 2005; Seebaugh et al., 2006; Rainbow et al., 2007), plus rarement en milieu terrestre (Hopkin, 1989; Vijver et al., 2004; Monteiro et al., 2008).

Dans le transfert entre producteurs et consommateurs, Monteiro et al. (2008) ont montré que les formes de stockage subcellulaires dans les végétaux influencent directement l'assimilation du Cd par le cloporte *Porcellio dilatatus* (Monteiro et al., 2008). A des niveaux trophiques supérieurs, le Cd accumulé dans les escargots, majoritairement lié à des MTs, est biodisponible pour le rat (Hispard et al., 2008a), alors qu'il a été montré que les métaux stockés dans les granules ne sont que peu bioaccessibles pour les prédateurs (Wallace et al., 1998).

### **En résumé...**

Les mécanismes de défense des organismes contre les ETMs ont une forte implication dans le transfert et les effets des ETMs dans les écosystèmes, en permettant aux organismes de survivre dans les milieux contaminés et en influençant le transfert dans les réseaux trophiques. Les formes de stockage ont été intensivement étudiées chez les invertébrés, mais chez les vertébrés ce type de travaux a surtout été mené en laboratoire, sur des espèces modèles (rat, souris...). La capacité des micromammifères sauvages à stocker les ETMs sous des formes non toxiques est peu connue, notamment chez les insectivores qui cependant montrent une hyper-accumulation des ETMs.



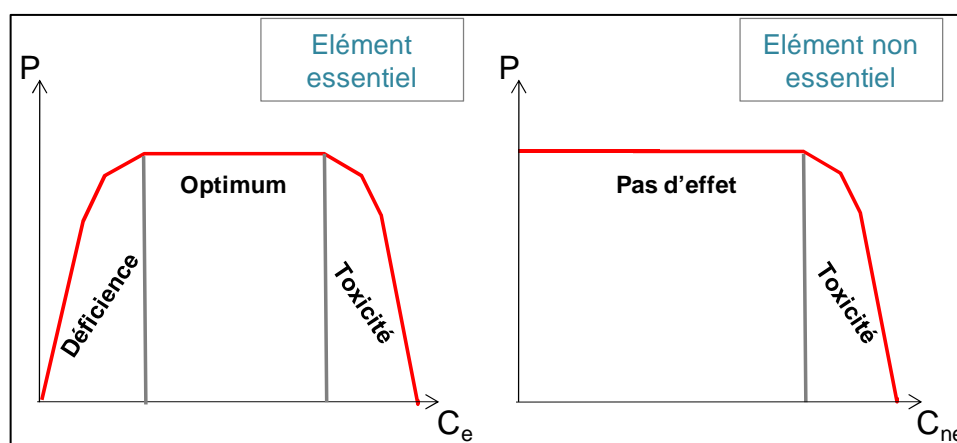
**Figure 1.1.11.** Schéma représentant l'hypothèse générale concernant l'importance des différentes fractions de métal dans un organisme pour la description des patrons d'accumulation, de toxicité et de transfert trophique. La taille des fractions visualisées correspond à la distribution habituellement observées dans les organismes invertébrés (Vijver et al., 2004).

#### 1.1.4.c. Effets directs et indirects

##### Effets toxiques

Les ETMs induisent des effets toxiques chez les organismes vivants, c'est pourquoi ils sont reconnus au niveau international comme dangereux pour la santé des organismes et des écosystèmes (Baker et al., 2003; Fairbrother et al., 2007). Les effets de l'exposition aux ETMs peuvent être très variables selon le métal et l'organisme considéré ainsi que les doses mises en jeu, nous ne détaillerons pas ici toutes les conséquences sur la mortalité et la morbidité induites par l'exposition aux ETMs. Il est cependant important de noter que des effets délétères peuvent intervenir à différents niveaux d'organisation biologique : effets sub-cellulaires, cellulaires, tissulaires, individuels populationnels et communautaires (Sigel, 1986; Laskowski and Hopkin, 1996b; Albers et al., 2000; Gomot-de Vaufleury, 2000; Gomot-de Vaufleury and Kerhoas, 2000; Kammenga and Laskowski, 2000; Shore and Rattner, 2001; AMAP, 2002; Peplow and Edmonds, 2005; Bertin and Averbek, 2006; Walker et al., 2006; Fairbrother et al., 2007). En effet, les effets individuels peuvent se traduire par la mortalité des individus d'une part, mais aussi par un impact négatif sur les fonctions de reproduction ou encore génotoxiques, entraînant ainsi des modifications des dynamiques de populations. En conséquence, certaines espèces disparaissent des sites contaminés, d'autres sont sujettes à une réduction de l'abondance des individus, et ceci peut conduire à des modifications dans la structure et le fonctionnement des communautés.

Les réponses des organismes à l'exposition aux ETMs sont fortement conditionnées par l'essentialité ou non des éléments, les éléments essentiels étant par définition nécessaires à la réalisation du métabolisme des êtres vivants. Ces derniers, s'ils ne sont pas présents en quantité insuffisante dans le milieu, la nourriture et/ou dans l'organisme peuvent induire des carences tandis que passé un certain seuil, ils peuvent devenir toxiques (Figure I.1.12). Les éléments non-essentiels, en l'état actuel des connaissances, ne sont pas nécessaires aux organismes et peuvent être tolérés à des seuils traces puis devenir toxiques (Figure I.1.12). Cette différence est capitale dans la mesure où elle implique que des mécanismes de régulation homéostatique existent pour gérer l'absorption, la distribution, la séquestration et l'élimination des métaux essentiels et maintenir de cette manière les concentrations internes à des niveaux optimaux.



**Figure I.1.12.** Relations entre performance ( $P$ ) (croissance, fécondité, survie, autres paramètres de santé...) et concentrations en élément essentiel ( $C_e$ ) ou non-essentiel ( $C_{ne}$ ) dans la nourriture des organismes. Adapté de (Walker et al., 2006).

Le Cd et le Pb sont des éléments non-essentiels pour les organismes, tandis que le Zn est un élément essentiel (Kabata-Pendias and Pendias, 1992; Walker et al., 2006; Fairbrother et al., 2007). Cependant, ces trois métaux peuvent être toxiques pour les organismes vivants selon les doses internes atteintes (Walker et al., 2006; Fairbrother et al., 2007). La sensibilité des organismes aux ETMs varie selon leurs caractéristiques physiologiques et génétiques, des différences de sensibilité peuvent donc être observées entre taxons, entre espèces et entre individus (Burger et al., 2003; Peakall and Burger, 2003). Cependant, le Cd et le Pb figurent parmi les éléments les plus toxiques pour de nombreux taxons (Tableau I.1.5).

**Tableau I.1.5.** Séquences de toxicité molaire pour différents taxons (Sigel, 1986).

Organisms	Toxicity sequence
Algae	Hg > Cu > <b>Cd</b> > Fe > Cr > <b>Zn</b> > Co > Mn
Fungi	Ag > Hg > Cu > <b>Cd</b> > Cr > Ni > <b>Pb</b> > Co > <b>Zn</b> > Fe
Flowering plants	Hg > <b>Pb</b> > Cu > <b>Cd</b> > Cr > Ni > <b>Zn</b>
Annelids	Hg > Cu > <b>Zn</b> > <b>Pb</b> > <b>Cd</b>
Fish	Ag > Hg > Cu > <b>Pb</b> > <b>Cd</b> > Al > <b>Zn</b> , Ni > Cr > Co > Mn >> Sr
Mammals	Ag, Hg, <b>Cd</b> > Cu, <b>Pb</b> , Co, Sn, Be >> Mn, <b>Zn</b> , Ni, Fe, Cr >> Sr > Cs, Li, Al

### Effets indirects

Les effets délétères des ETMs peuvent être indirects, et dûs au coût métabolique induit par les mécanismes de régulation et de séquestration sous des formes non toxiques, et/ou par modification des ressources alimentaires notamment, en impactant l'abondance et la diversité des proies et/ou des compétiteurs. De la même manière que les effets toxiques directs, les effets indirects se traduisent à différents niveaux d'organisation biologique.

Les effets des ETMs sur le métabolisme peuvent être indirects lorsque la détoxification par excrétion ou stockage induit des coûts métaboliques perturbant les compromis énergétiques nécessaires pour assurer les fonctions métaboliques des organismes. Ainsi, le coût énergétique de l'excrétion et de la séquestration pourrait avoir une implication dans les allocations d'énergie des organismes et par conséquent sur la réalisation de leur métabolisme, leur santé et/ou leurs traits d'histoire de vie. Si conceptuellement il est admis que les mécanismes de défense représentent un coût métabolique et énergétique, peu de travaux ont démontré son impact et le coût de la tolérance à l'exposition aux ETMs reste un sujet débattu (Kammenga and Laskowski, 2000). Si les causes ne peuvent pas être imputées de manière certaine aux coûts induits par la régulation, il apparaît que certaines espèces présentent une forte sensibilité à l'exposition aux polluants en ayant cependant de faibles concentrations internes (e.g. (Scheifler et al., 2002).

Concernant les effets indirects par modification de la qualité ou de la quantité des ressources, Eeva et al. (2003) ont testé l'hypothèse d'un stress nutritionnel liés aux ETMs sur les populations de Mésanges charbonnières *Parus major* en analysant des effets directs (succès d'envol, croissance, taux métabolique, asymétrie fluctuante, taux d'hormones du stress, concentrations en ETMs dans les fécès...) et indirects (effets de l'apport de nourriture sur le succès de reproduction et la survie) (Eeva et al., 2003). Ils ont relevé à la fois des effets directs et indirects des ETMs : les oiseaux étaient sujets, en plus d'un stress toxique direct, à un stress nutritionnel lié à la réduction des proies comme des insectes forestiers et des chenilles (Eeva et al., 2003). Le statut nutritionnel des individus, dépendant de la qualité et de la quantité des ressources, peut moduler leur sensibilité aux stress métallique en limitant les capacités de défense (par exemple : séquestration, défenses anti-oxydantes). Un stress nutritionnel lié à la perte de qualité des habitats pollués pourrait donc augmenter la sensibilité des organismes. La disparition de certaines espèces ou la diminution de leur abondance peut induire de manière indirecte, par une réduction de la quantité et de la qualité des ressources pour les consommateurs, la mise en péril du maintien des populations de ces consommateurs et par conséquent des modifications dans la structure et le fonctionnement des communautés. Pour certains vertébrés (mammifères, micromammifères, amphibiens), la diminution de la qualité de l'habitat et de sa capacité d'accueil liées à la présence d'ETMs a également été suggérée comme étant une cause potentielle indirecte de la diminution de l'abondance des animaux (Storm et al., 1993; Galbraith et al., 1995). Dans certains cas, les effets toxiques directs des ETMs sur certaines espèces peuvent également modifier indirectement la communauté en modulant des interactions non-trophiques entre les espèces comme le

parasitisme (Lefcort et al., 2002) et la compétition inter-spécifique (Clements and Newman, 2002; Rohr et al., 2006).

Enfin, pour les métapopulations, une population puits peut souffrir de l'impact des polluants non pas parce qu'elle y est exposée, mais parce que sa population source est affectée (Barnthouse et al., 2008).

### Mesure des effets

Chez les vertébrés, la majorité des travaux concernant les effets des ETMs s'est attachée à mesurer des effets individuels (croissance, reproduction), mais aussi biochimiques ou physiologiques aux niveaux sub-cellulaires, cellulaires et tissulaires. De nombreuses données ont été acquises lors d'expérimentations en laboratoire, en exposant des organismes modèles (souris, rat...) à des doses importantes ou sur des animaux sauvages vivant dans des sites naturels fortement contaminés. Les données acquises en laboratoire sur des effets individuels ne sont cependant pas toujours représentatives de l'occurrence d'effets *in natura* et sont difficiles à extrapoler (Smith et al., 2006; Allard et al., 2009). De plus, elles permettent rarement d'évaluer des impacts sur les dynamiques de population à long terme (Tannenbaum, 2001; Smith et al., 2006). En développant un modèle permettant de prédire les effets du Cd et d'autres stress (prédation, inondation...) sur les populations de vertébrés, Loos et al. (*in press*) ont montré que les prédictions semblaient correctes pour le Mulot sylvestre ou le Campagnol des champs mais pas pertinentes pour la Taupe, probablement en raison des mauvaises estimations des doses limites toxicologiques pour cette espèce. Ils démontrent par ailleurs que la mesure des effets toxiques des polluants doit être placée dans le contexte écologique des récepteurs, en tenant compte des autres stress environnementaux et écologique. Ce point a par ailleurs été souligné comme étant une nécessité pour évaluer les risques liés aux ETMs (Kapustka, 2008).

Peu d'études ont été conduites sur les effets populationnels et communautaires des ETMs *in situ*. Ce type d'effets est particulièrement difficile à mesurer, à cause de la variété d'autres facteurs écologiques qui peuvent intervenir et de la nécessité de mener des suivis à long terme (Barnthouse et al., 2008; Kapustka, 2008; Loos et al., *In press*). Pourtant, certains travaux ont pu mettre en évidence des effets sur les populations ou communautés d'oiseaux et de micromammifères vivant dans des milieux pollués par les métaux (Dmowski et al., 1998; Dmowski et al., 2000; Eeva et al., 2000b; Kataev, 2005; Eeva et al., 2008; Eeva et al., 2009).

Les données d'abondance et de présence/absence de certaines espèces sont fréquemment utilisées en bioindication, comme indicateur de l'impact présent ou passé d'une contamination (Peakall and Burger, 2003; Markert, 2007). Cependant, l'interprétation de ce type de données reste compliquée et sujette à caution. En effet, la rareté d'une espèce est liée à des paramètres écologiques intrinsèques et environnementaux. De plus les dynamiques spatiales et temporelles des populations et des communautés affectent la rareté (Gaston, 1994). En conséquence, il peut s'avérer difficile d'imputer la faible abondance ou l'absence d'une espèce à la pollution du milieu si sa dynamique de population dans le milieu considéré n'est pas bien définie et les fluctuations



normales des populations connues. Cet aspect montre également la nécessité de développer des suivis à long terme et à des échelles pertinentes sur des sites pollués et témoins pour disposer de références pertinentes et comprendre les patrons d'effet des ETMs sur les populations et les communautés (Peakall and Burger, 2003; Tannenbaum, 2005).

Les différents champs disciplinaires de l'écotoxicologie apportent des informations complémentaires, mais parfois trop parcellaires, pour mener une évaluation du risque écologiquement représentative (Burger et al., 2003). Le besoin de lier les mesures effectuées à différents niveaux d'organisation biologique pour estimer les effets délétères des ETMs dans les écosystèmes a été identifié (Burger et al., 2003; Hope, 2006; Kapustka, 2008). Dans le cas des études *in situ*, il a été mentionné qu'il conviendrait d'améliorer la compréhension des relations entre l'accumulation et les effets biologiques, donc les relations dose/réponse en liant les réponses

~~à l'échelle de l'individu, de la population, de la communauté et de l'écosystème (Burger et al., 2003; Kapustka, 2008). Cette approche intégrée d'évaluation des effets des ETMs dans les écosystèmes a été développée par les Kapustka *in situ* pour estimer l'impact de la contamination/adhésion/vie communautaire sur les populations d'invertébrés terrestres (Burger et al., 2003; Kapustka, 2008). Cette approche a été intégrée d'évaluation des effets des ETMs dans les écosystèmes par exemple (Mittlebach, 2005; Galy et al., 2005; Tannenbaum, 2005) et sera utilisée dans ce document.~~  
<EndNote><Cite><Author>Kapustka</Author><Year>2008</Year><RecNum>1712</RecNum><RecNum>1712</rec-number><foreign-keys><key app="EN" db-id="11599429"></foreign-keys></Cite></EndNote>  
Article ETMs d'effets écologiques, de l'échelle de l'individu à l'échelle de l'écosystème, pour estimer l'impact de la contamination/adhésion/vie communautaire sur les populations d'invertébrés terrestres (Burger et al., 2003; Kapustka, 2008). Cette approche a été intégrée d'évaluation des effets des ETMs dans les écosystèmes par exemple (Mittlebach, 2005; Galy et al., 2005; Tannenbaum, 2005) et sera utilisée dans ce document.  
Intégrer des mesures plus globales de l'état de santé des animaux (par exemple, par exemple, capacité de reproduction, etc.) et des impacts populationnels (Tannenbaum, 2005; 2008).  
U:\Documents and Settings\Chapman\My Documents\Bibli\Aide\ETMRA\texte appq, concept, ressource des articles\<Cite\>EndNote\</Cite> (Kapustka, 2008).

Considérant les polluants comme un stress additionnel aux stress écologiques existants, les réponses retenues pour évaluer les effets pourraient s'attacher à la mesure d'un stress écologique, en lien avec les compromis énergétiques des organismes et les dynamiques des populations, et non plus seulement toxicologique (van Straalen, 2003). Ce type de réponse, tout particulièrement l'évaluation de la condition corporelle, est parfois utilisé en écologie fonctionnelle et évolutive pour évaluer les performances ou la « qualité » des individus et leurs liens avec les dynamiques de populations chez les micromammifères par exemple (Schulte-Hostedde et al., 2001; Norrdahl and Korpimaki, 2002; Norrdahl et al., 2004; Schulte-Hostedde et al., 2005). La compréhension de l'influence de certaines variables biologiques et environnementales et des données acquises *in situ* sur les effets des ETMs dans les écosystèmes sont nécessaires pour améliorer l'évaluation

des risques environnementaux. Plus précisément, des recherches complémentaires doivent être menées pour améliorer l'interprétation des relations dose/réponse, notamment afin d'évaluer la pertinence des valeurs toxicologiques de références en les confrontant aux observations *in situ*.

#### *1.1.4.d. Mécanismes de défense au niveau populationnel*

Les mécanismes permettant aux organismes de tolérer l'exposition aux ETMs peuvent être en lien avec des comportements d'évitement (évitement des « points chauds » de contamination, sélection alimentaire), la détoxification des métaux et la séquestration sous des formes non-toxiques, la compartimentation (translocation dans des tissus non-cibles, parties kératinisées qui seront éliminées...) et l'excrétion (Posthuma and Van Straalen, 1993; Kammenga and Laskowski, 2000).

Les effets délétères des ETMs peuvent intervenir sur des traits individuels mais aussi populationnels. A ce titre, la présence des ETMs dans l'environnement peut être considérée comme un stress additionnel responsable de processus de micro-évolution en exerçant une pression de sélection (Bengtsson et al., 1992; Posthuma and Van Straalen, 1993; Kammenga and Laskowski, 2000; Morgan et al., 2007). En effet, dans une population, les individus sont capables de développer des mécanismes de tolérance pour éviter les effets négatifs des ETMs, cette tolérance présentant une variabilité inter-individuelle plus ou moins importante. Lorsque le stress métallique survient, les individus tolérants peuvent devenir plus compétitifs que les individus non-tolérants notamment en termes de valeur sélective. Par conséquent, certaines populations peuvent devenir résistantes si les génotypes tolérants ont été sélectionnés. Les phénotypes tolérants sont donc déterminés par le polymorphisme génétique d'une part, aboutissant à une certaine plasticité phénotypique qui permet aux organismes de développer des réponses face au stress métallique, et/ou par les phénomènes adaptatifs conduisant à l'établissement d'écotypes adaptés à la vie en milieu pollué (Posthuma and Van Straalen, 1993; Morgan et al., 2007). En effet, la tolérance n'est pas systématiquement liée à des phénomènes adaptatifs mais peut aussi résulter de mécanismes d'acclimatation, ou des deux (Posthuma and Van Straalen, 1993; Morgan et al., 2007). Les organismes sont capables de s'acclimater physiologiquement, ce qui implique une exposition à des concentrations sub-létales durant une période de la vie de l'individu pour aboutir à une tolérance au stress induit par les métaux (Posthuma and Van Straalen, 1993; Morgan et al., 2007).

Dans le cas de l'acclimatation, l'expression des mécanismes de tolérance est provoquée par l'exposition au stress, alors que dans le cas de l'adaptation, l'expression des traits de tolérance est constitutive. L'acclimatation traduit une tolérance au stress: dans ce cas le stress est appliqué durant une partie de la vie de l'individu, les réponses sont induites plutôt que fixes et dues à la plasticité phénotypique, et les traits de tolérance peuvent être perdus si le stress disparaît. L'adaptation caractérise la résistance: la réponse au stress évolue durant une exposition multi-générationnelle au stress, est génétiquement constitutive et héritée par la progéniture et la population peut revenir à un état non-adapté si le stress est supprimé et si le trait d'adaptation a

un coût en termes de valeur sélective (Posthuma and Van Straalen, 1993; Morgan et al., 2007). La résistance peut être le résultat d'une sélection directionnelle si les divergences génétiques entre individus sont significatives, ce qui implique la sélection des individus (génotypes) les plus tolérants à travers les mécanismes de sélection naturelle, les individus les plus sensibles de la population d'origine ayant été éliminés (Bengtsson et al., 1992; Posthuma and Van Straalen, 1993; Kammenga and Laskowski, 2000). Si une contamination de l'environnement élevée en ETMs constitue une contrainte pour une population locale et de cette manière peut conduire à la sélection de génotypes tolérants, l'adaptation peut être entravée par différentes forces en opposition (flux de gènes, dérive génétique, sélection naturelle due à d'autres contraintes écologiques, faible polymorphisme et architecture génétique des traits sous-jacents) (Posthuma and Van Straalen, 1993; Kammenga and Laskowski, 2000; Kawecki and Ebert, 2004). Par ailleurs, les populations de nombreuses espèces semblent incapables de s'adapter à des contaminations locales, comme le suggèrent la réduction de l'abondance ou la disparition locale de certains taxons sur des sites pollués (Posthuma and Van Straalen, 1993; Kammenga and Laskowski, 2000).

Les phénomènes d'acclimatation et d'adaptation peuvent par conséquent induire des réponses différentes entre populations. Ces réponses différentes peuvent concerner l'accumulation, la séquestration et/ou la sensibilité. Par exemple, l'efficacité d'excrétion du Cd et du Pb chez différentes populations d'*Orchesella cincta* originaires de sites miniers très contaminés est plus forte que chez des populations venant de sites moins ou pas pollués (Vanstraalen et al., 1987). Chez cette espèce, la résistance au Cd (forte capacité d'excrétion, sur-expression de gènes des MTs) chez certaines populations a des bases génétiques, résultant de mécanismes adaptatifs (Roelofs et al., 2009). Chez l'escargot *Cantareus aspersus* (ex-*Helix aspersa*) des différences inter-populations d'accumulation du Pb ont été mises en évidence, dans sa distribution (concentrations relatives tissus mous/coquilles) ou encore dans les interactions métaboliques avec le Ca (Beeby and Richmond, 1987; Richmond and Beeby, 1992; Mulvey et al., 1996; Beeby and Richmond, 1998; 2001). Concernant les effets, la résistance au Cd chez la mouche *Drosophila melanogaster* dans des lignées ayant évolué vers un phénotype résistant (meilleure survie des juvéniles, période de développement plus courte et fécondité accrue chez les lignées résistantes par rapport aux lignées non-résistantes lors d'une exposition au Cd) présente une base génétique (Shirley and Sibly, 1999). Cependant, cette résistance présente un « coût » dans la mesure où certains traits d'histoire de vie sont modifiés chez les génotypes résistants et les rendent moins performants dans un environnement sain que les lignées non-résistantes (Shirley and Sibly, 1999). Chez *Cantareus aspersus*, des différences inter-populationnelles dans les effets de réduction de la croissance due à une exposition au Pb ont été mises en lumière et pourraient être liées à des variations physiologiques de régulation des éléments essentiels comme le Ca et le Mg (Beeby et al., 2002). Des différences de sensibilité ont également pu être montrées chez les vers de terre. Ainsi, Spurgeon et Hopkin (2000) ont démontré que certaines populations du ver *Eisenia fetida* présentent une résistance à l'exposition au Zn, les populations non-tolérantes ayant une plus forte

sensibilité à l'exposition (apparition d'effets pour des concentrations d'exposition plus faibles que les adaptés) mais ne montrent cependant pas de différences de toxicocinétiques (Spurgeon and Hopkin, 2000).

### **En résumé...**

Dans le cadre de l'ERE, l'utilisation de la bioaccumulation ou de mesures d'effets lors de mesures en bioindication passive peut être compliquée par les adaptations potentielles des populations autochtones. En effet, la résistance à l'exposition aux métaux peut empêcher la détection des réponses des individus ou populations dans les écotypes résistants aux ETMs (Kammenga and Laskowski, 2000; Spurgeon and Hopkin, 2000; Tannenbaum, 2005; Morgan et al., 2007). Les différences des réponses à la pollution métallique entre populations sont compliquées à prévoir et à prendre en compte dans le cadre de l'ERE. Pourtant, la compréhension des processus qui permettent aux populations animales de se maintenir dans des environnements contaminés est essentielle d'un point de vue fondamental pour son implication dans l'étude des mécanismes d'évolution, mais aussi pour améliorer les procédures d'ERE (Morgan et al., 2007). Concernant la tolérance ou la résistance aux ETMs, la majeure partie des travaux menés concernent des micro-organismes, des invertébrés et des insectes. Certains groupes, comme les escargots, qui sont pourtant connus pour vivre sur les sites pollués en ETMs, ont peu été étudiés.

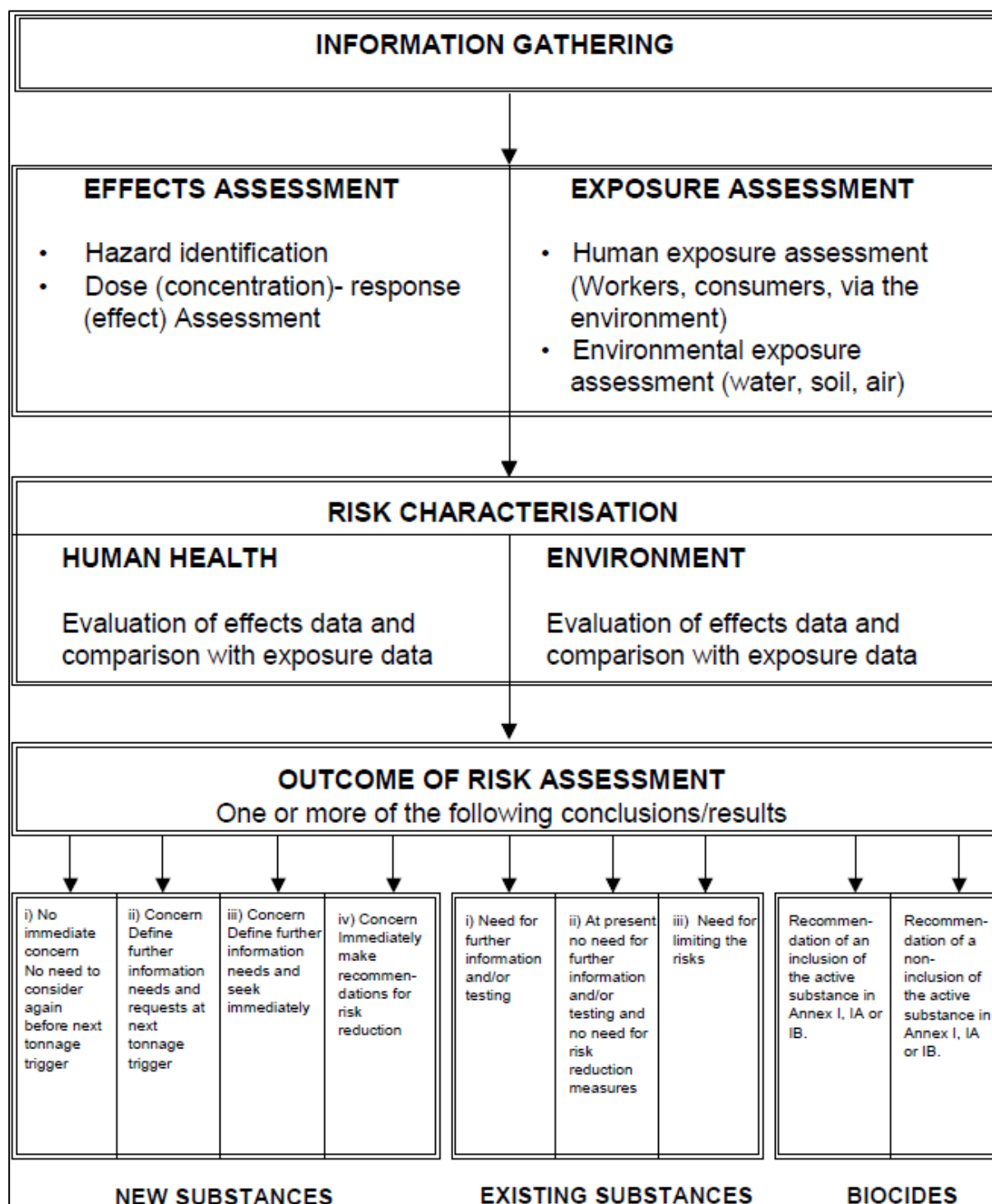
### **I.1.5. Evaluation du risque environnemental (ERE)**

La contamination des sols en ETMs entraîne des effets néfastes sur la qualité du sol et sur les fonctions qu'il assure dans le fonctionnement de l'écosystème et représente un risque pour les organismes et les écosystèmes (European Environment Agency, 2007; Fairbrother et al., 2007). Au vu de l'implication des ETMs dans la pollution des sols et des risques pour l'environnement qui peuvent en résulter, il semble nécessaire de développer une évaluation de ces risques et des outils de gestion des sites contaminés en ETMs. L'évaluation des risques sanitaires et environnementaux des contaminations des sols en ETMs représente donc un enjeu majeur d'un point de vue sanitaire, écologique mais aussi politique et économique.

L'évaluation du risque environnemental, ou évaluation du risque écologique est une procédure qui a pour objectif d'estimer la probabilité d'occurrence d'effets indésirables d'un agent chimique présent dans l'environnement. Cette procédure s'adresse généralement à des agents dangereux pour la faune et la flore et montrant des concentrations anormalement élevées dans l'environnement. Pour donner une définition plus précise et communément employée par les parties concernées, l'évaluation du risque est une procédure qui tente de calculer ou d'estimer le risque pour une cible (organisme, un système ou une (sub-population) dû à l'exposition a un agent donné, et en incluant l'identification des incertitudes associées (USEPA, 1998; European Commission, 2003; IPCS, 2004; Hayet et al., 2009).

Les procédures d'évaluation du risque varient d'un pays à l'autre, mais la démarche générale reste la même (Jensen and Pedersen, 2006; Smith et al., 2006; Hayet et al., 2009). Après formulation du problème (identification des besoins et définition des objectifs basée sur les informations disponibles), l'ERE inclus 4 étapes majeures : l'identification du potentiel dangereux, la caractérisation du danger par l'évaluation des relations dose/réponse, l'évaluation de l'exposition et la caractérisation du risque (USEPA, 1998; European Commission, 2003; IPCS, 2004; Fairbrother et al., 2007) (Figure I.1.13). L'étape de caractérisation du risque consiste à synthétiser les informations des étapes précédentes et fournir une estimation du risque. Elle est basée en partie sur le calcul du rapport PEC/ PNEC, c'est-à-dire le rapport entre les concentrations de l'agent attendues dans les compartiments (PEC : Predicted Environmental Concentration) et les concentrations en-dessous desquelles aucun effet inacceptable de l'agent sur les organismes n'est attendu (PNEC : Predicted No Effect Concentration). Concernant les milieux terrestres, les PECs et PNECs sont calculées pour différents compartiments, à savoir le sol et les items alimentaires, selon l'organisme considéré.

L'ERE peut être prospective : avant la mise sur le marché d'une substance par exemple, ou rétrospective : gestion d'un site pollué (Hayet et al., 2009).



**Figure I.1.13.** Etapes de l'évaluation des risques liés aux agents chimiques recommandée en Europe (European Commission, 2003).

L'ERE peut être menée par modélisation, en prédisant l'exposition des organismes et les effets (USEPA, 1998; European Commission, 2003; Smith et al., 2006; Fairbrother et al., 2007). Mais des procédures de biosurveillance, visant à suivre temporellement et/ou spatialement le transfert et les effets des polluants dans les écosystèmes, peuvent également être développées (USEPA, 1998; European Commission, 2003; Smith et al., 2006; Fairbrother et al., 2007). Elles mettent en jeu l'utilisation de bioindicateurs, c'est-à-dire des organismes (ou une part de

l'organisme ou une communauté d'organismes) chez lesquels la réponse mesurée (biochimique, génétique, enzymatique, physiologique, morphologique, comportementale, et pour les communautés structurelle et/ou fonctionnelle) renseigne sur la présence et/ou l'impact des polluants (IPCS, 2004; Markert, 2007). Les réponses mesurées au niveau individuel sont, outre les concentrations en xénobiotiques accumulées (qui renseignent sur la présence des substances dans le milieu et leur transfert à l'organisme), des biomarqueurs. Les biomarqueurs, dans le cadre de l'écotoxicologie, sont définis comme des structures ou processus biologiques dont les variations, induites par les xénobiotiques, sont observables et/ou mesurables au niveau de l'individu (Lagadic et al., 1997). Ils sont principalement d'ordre biochimiques et physiologiques et l'on peut distinguer 3 catégories principales : biomarqueurs d'exposition, d'effets et de sensibilité aux effets. Les réponses mesurées aux niveaux supérieurs d'organisation (dynamiques de populations, structure et fonctionnements des communautés...) sont basées sur l'étude des bioindicateurs en tant qu'espèce et non plus en tant qu'individu. Deux types de bioindication peuvent être développés : bioindication passive et bioindication active. La bioindication passive est basée sur le prélèvement d'organismes sauvages autochtones exposés de manière chronique sur les sites pollués, tandis que la bioindication active consiste en l'exposition d'organismes naïfs par l'expérimentateur sur le site contaminé. Dans le premier cas, les mesures concernent une exposition chronique et à long terme donc une intégration temporelle des phénomènes d'exposition et d'effets, et permettent d'étudier les réponses des organismes dans des conditions écologiquement représentatives. Par contre, il n'est pas possible de connaître précisément le moment et/ou l'endroit de l'exposition au polluant. Dans le second cas, l'intérêt est de connaître le passé des individus, leur âge et autres caractéristiques individuelles pouvant influencer le niveau d'expression du paramètre mesuré, mais aussi de connaître le lieu et la durée d'exposition ce qui facilite l'interprétation des réponses observées et l'évaluation de relation dose/réponse.

Le choix des espèces à étudier, parfois appelées « espèces sentinelles » dépend du polluant concerné, du milieu considéré et de l'étendue spatiale de la contamination. Une espèce sentinelle peut représenter un indicateur pour suivre l'exposition aux ETMs au cours du temps ou servir d'alarme précoce. La qualité de l'espèce choisie dépend en partie de la manière dont elle accumule les métaux, et d'autre part des quantités de polluants causant des effets. Un organisme sentinelle utilisable doit soit être suffisamment sensible pour montrer des effets et représenter une indication précoce du risque lié aux ETMs, sans être trop sensible à d'autres modifications environnementales, soit présenter de fortes capacités d'accumulation des ETMs sans effets toxiques afin que la mesure des concentrations internes représente une estimation de l'exposition et du transfert des ETMs dans les chaînes alimentaires (Beeby, 2001; Peakall and Burger, 2003).

Les niveaux d'ETMs accumulés dans les organismes sont parfois considérés comme un indicateur d'exposition dans les environnements pollués (Peakall and Burger, 2003; Luoma and Rainbow, 2005). Les niveaux accumulés constituent en effet une mesure intégrative de la biodisponibilité pour l'organisme concerné, parce qu'ils intègrent tous les voies d'exposition dans le

temps et l'espace, et représentent la balance entre assimilation et élimination (Burger et al., 2003; Fairbrother et al., 2007; Smith et al., 2007). Cependant, pour que la bioaccumulation soit un marqueur pertinent de l'exposition, il convient que le polluant considéré soit persistant et ne soit pas métabolisé, et que l'organisme considéré présente des capacités d'accumulation et une excrétion limitée (Beeby, 2001). La mesure de la bioaccumulation présente également l'avantage de permettre l'estimation de l'apparition d'effets délétères en comparant les concentrations internes mesurées avec des valeurs de référence, comme par exemple les « *Critical Body Residues* » (van Straalen, 1996; Luoma and Rainbow, 2005), les valeurs toxicologiques de référence (TRVs) (USEPA, 2005d), ou des données de LOAELs (Lowest Observed Adverse Effect Levels), NOAELs (No Observed Adverse Effect Levels), EC50 (concentration pour laquelle 50% de l'effet maximum relevé est observée) (European Commission, 2003).

La confrontation de données obtenues à différents niveaux d'organisation biologique, basées sur des indicateurs à la fois d'ordre chimiques, toxicologiques et écologiques, et considérant plusieurs récepteurs intégrant des voies d'exposition et des sensibilités variées permet d'affiner l'ERE (Jensen et al., 2006; Semenzin et al., 2008; Dagnino et al., 2009; Hayet, 2010). En effet, une telle approche intégrée permet de synthétiser différentes preuves d'occurrence ou d'absence d'occurrence d'effets des polluants dans les écosystèmes pour tenter de déterminer dans quelle mesure la présence des contaminants peut être considérée comme une cause de dysfonctionnement à différents niveaux d'organisation (sur la base du « poids de l'évidence » dessinée par des faisceaux de présomption) (Jensen et al., 2006; Semenzin et al., 2008; Dagnino et al., 2009; Hayet, 2010).

Les escargots et les micromammifères ont été étudiés pour développer leur utilisation en tant que biomoniteurs de la pollution de l'environnement, à cause de leur capacités d'accumulation (Talmage and Walton, 1991; Berger and Dallinger, 1993; Pihan and de Vaufleury, 2000; Shore and Rattner, 2001). Les escargots peuvent être employés tant en bioindication active (Gomot-de Vaufleury and Pihan, 2000; Scheifler et al., 2003a; Regoli et al., 2006; Gimbert et al., 2008b) que passive (Martin and Coughtrey, 1982; Hopkin, 1989; Gomot-de Vaufleury and Pihan, 2000; Notten, 2005). Les micromammifères sont surtout considérés pour des études de bioindication passive, même si quelques études en mésocosmes ont été menées (Talmage and Walton, 1991; Propst et al., 1999; Shore and Rattner, 2001). Au cours de ces travaux antérieurs, il a été montré que ces organismes constituaient de bon biomoniteurs de la pollution de l'environnement, et notamment des pollutions métalliques, puisque leurs concentrations internes varient entre des sites diversement pollués et reflètent le niveau de contamination des sites (de Vaufleury and Gomot, 2006). Cependant, la majorité des études ont été menées en comparant des sites pollués à des références ou des gradients de quelques niveaux de pollution : l'évolution des réponses en fonction des concentrations dans les sols mais aussi d'autres paramètres environnementaux reste un champ à explorer.



## En résumé...

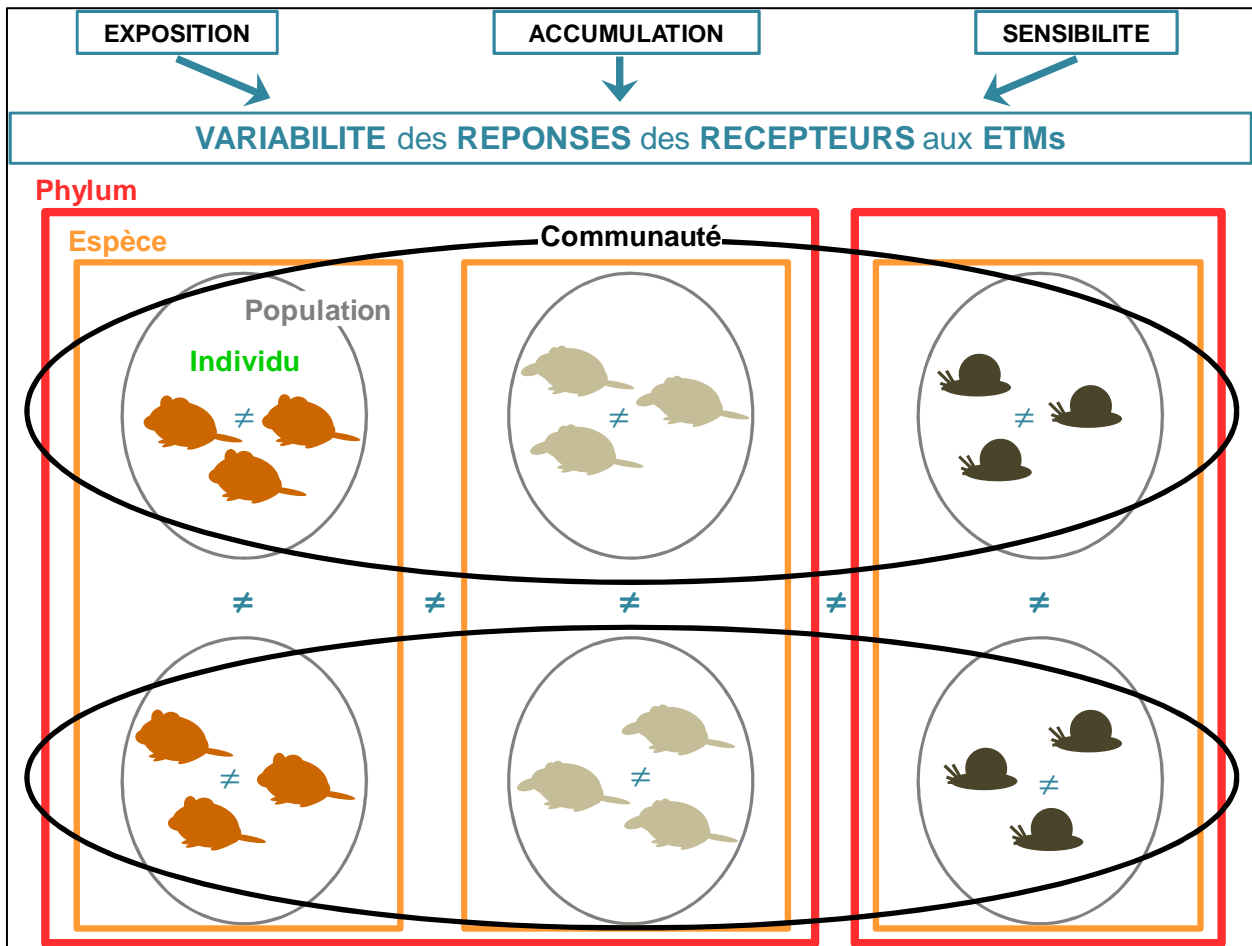
La protection des écosystèmes est devenue une demande économique et sociétale et plus seulement scientifique ou morale. Le développement actuel de la prise en compte de la protection de l'environnement dans les sociétés occidentales fait émerger une attente croissante vis-à-vis de la gestion des sites contaminés. Le questionnement n'est donc plus seulement scientifique, mais politique : les décideurs doivent baser leurs choix sur des informations pertinentes, et sont par ailleurs demandeurs de résultats scientifiques représentatifs et d'outils d'évaluation efficaces.

Le développement de procédures d'évaluation des risques et de gestion des sites contaminés nécessite donc une bonne connaissance des mécanismes qui modulent le transfert et les effets des ETMs dans les écosystèmes terrestres et des données représentatives acquises *in situ*. Ainsi, l'étude des transferts et des effets des ETMs dans les écosystèmes terrestres est essentielle d'un point de vue fondamental, pour améliorer la compréhension des mécanismes biologiques et écologiques contrôlant l'exposition, l'accumulation et les effets des polluants chez les organismes, et d'un point de vue appliqué, pour apporter les connaissances et les outils nécessaires à l'évaluation des risques environnementaux liés aux ETMs et développer des procédures de gestion des sites contaminés. Les escargots et les micromammifères, grâce aux données précédemment acquises en toxicologie, écologie et écotoxicologie sur ces animaux, constituent des bioindicateurs intéressants pour affiner la compréhension des mécanismes physiologiques et écologiques, nécessaires pour mener à bien et améliorer les procédures d'ERE. La confrontation de réponses à la pollution en ETMs observées pour différents récepteurs dont les caractéristiques d'exposition, d'accumulation et de sensibilité varient pourrait permettre d'affiner l'estimation de l'occurrence d'effets, de même que l'étude d'indicateurs à différents niveaux d'organisation biologique.

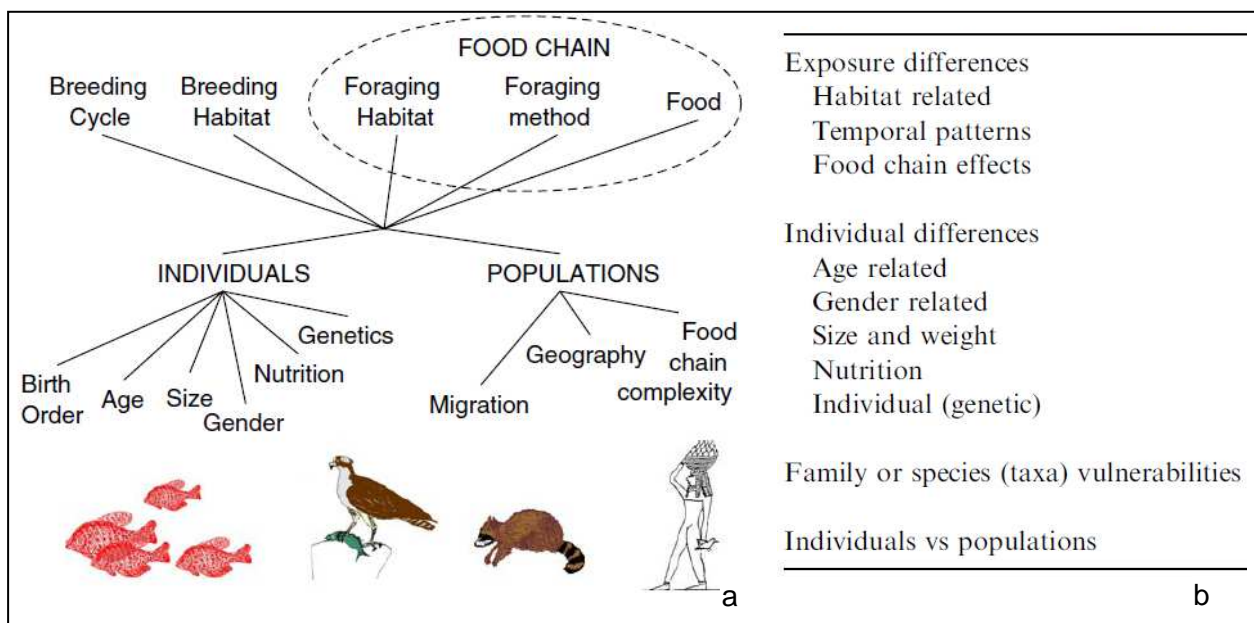
### I.1.6. Facteurs de variabilité des réponses des organismes exposés aux ETMs

#### I.1.6.a. Variabilité entre récepteurs

Des différences entre récepteurs dans les réponses des organismes aux polluants existent et s'expriment à différentes niveaux d'organisation biologique : différences inter-individuelles, inter-populationnelles, inter-spécifiques, entre taxons et entre communautés (Figures I.1.14). Ces différences entre récepteurs sont dues à des caractéristiques intrinsèques du récepteur qui interviennent en modulant l'exposition, l'accumulation et/ou la sensibilité (Figures I.1.14 et I.1.15).



**Figure 1.1.14.** Schéma synoptique des niveaux d'organisation entre lesquels des différences de réponses aux ETMs (bioaccumulation, effets) peuvent apparaître et processus à l'origine de ces différences.



**Figure 1.1.15. a.** Schéma synoptique des facteurs du récepteur ou qui affectent l'accumulation et les effets des métaux, ou d'autres contaminants. **b.** Facteurs liés au récepteur affectant la vulnérabilité des récepteurs écologiques à la contamination en ETMs. (Peakall and Burger, 2003).

Les caractéristiques intrinsèques du récepteur qui peuvent moduler ses réponses aux ETMs sont réunies sous le terme « facteurs du récepteur ». Un facteur du récepteur peut être défini comme tout attribut d'un individu, d'un groupe d'individus ou d'une espèce pouvant influencer l'intensité de l'exposition, l'absorption, l'accumulation, la toxicocinétique, la sensibilité et la toxicité des ETMs (Burger et al., 2003). Certains individus, ou populations ou taxons peuvent donc présenter une vulnérabilité accrue à la pollution (Figure I.1.15). Les facteurs à l'origine de ces différences sont d'ordre génétique, physiologique, biologiques et écologiques (Figure I.1.15).

### Variabilité inter-individuelle

Les différences de comportement individuel peuvent fortement influencer l'exposition des individus et entraîner des différences d'accumulation des ETMs. Notamment, les préférences individuelles lors du choix du territoire et de la recherche de nourriture, modulent l'exposition (Burger et al., 2003; Peakall and Burger, 2003; Smith et al., 2007). Par ailleurs, la contribution des différentes voies d'absorption peut varier au cours de la vie des organismes, par exemple lorsque les stades de vie présentent de fortes disparités morphologiques, physiologiques et écologiques (Figure I.15). L'exposition peut varier également entre sexes et avec l'âge, ces deux paramètres induisant des différences de comportement alimentaire et d'exploitation spatiale du milieu (Smith et al., 2007). Par exemple, chez le Mulot à collier *Apodemus flavicollis*, les mâles ont de plus vastes domaines vitaux que les femelles, et les femelles montrent moins d'exclusivité spatiale (déplacement du territoire lors d'une réduction de nourriture disponible) (Stradiotto et al., 2009). L'âge est un paramètre important en lien avec la durée d'exposition aux ETMs, mais aussi avec les comportements alimentaires (les jeunes individus ont des régimes différents de ceux des adultes chez certaines espèces), et l'exploitation spatiale de l'environnement (territorialité des adultes, dispersion des juvéniles...). En conséquence, pour le Cd dont l'accumulation est cumulative (quasi-absence d'excrétion), on observe une augmentation des concentrations internes avec l'âge (Williamson, 1980; Shore and Rattner, 2001).

L'accumulation des ETMs peut varier entre individus à cause du polymorphisme génétique et de la plasticité phénotypique qui induisent des variations dans les capacités d'assimilation, d'excrétion et de stockage. L'âge est à nouveau un paramètre important, puisqu'il détermine certains besoins en éléments essentiels au cours du développement des individus et de la reproduction. Par ailleurs, l'assimilation des ETMs peut varier selon l'âge : par exemple, chez les rongeurs adultes, 2 à 16% du Pb présent dans la nourriture est assimilé, tandis que les juvéniles peuvent en assimiler 45-50% (Shore and Rattner, 2001). Des carences en éléments essentiels (Fe, Ca, Mg) peuvent modifier l'assimilation du Cd et du Pb (Beeby and Richmond, 1988; Merian, 1991; Reeves and Chaney, 2008; Włostowski et al., 2009). Le statut nutritionnel et les besoins physiologiques des individus conduisent donc à des différences intra-populationnelles dans l'accumulation des ETMs.

La sensibilité des individus diffère, pour les mêmes raisons que celles citées concernant l'accumulation, à savoir le polymorphisme génétique, la plasticité phénotypique, l'âge et le sexe.

Les variations physiologiques qui en découlent augmentent ou réduisent la vulnérabilité des individus. Par exemple, les femelles gestantes montrent une sensibilité très forte à la toxicité du Cd (Shimada et al., 1998). Les expériences passées d'exposition aux ETMs au cours de la vie de l'individu à des doses sub-létales peuvent aussi induire des différences de sensibilité, en favorisant la mise en place de mécanismes de défense. Une acclimatation physiologique dépendant des capacités génétiques et phénotypiques propres à l'individu peut également exister.

La compréhension du rôle des facteurs du récepteur dans les réponses des individus à la contamination de l'environnement est donc un enjeu clé en écotoxicologie. Les facteurs du récepteur sont essentiels pour interpréter la grande variabilité inter-individuelle des réponses des organismes à la pollution et évaluer sa signification écotoxicologique et son implication dans les impacts des ETMs sur les populations, les communautés et les écosystèmes. En effet, une grande variabilité inter-individuelle peut avoir une forte implication dans la précision de l'évaluation des relations dose/effet. Dans de nombreuses études sur l'évaluation de l'accumulation et des relations dose/effet, les auteurs s'attachent à minimiser (par les procédures expérimentales employées notamment) l'importance de la variabilité inter-individuelle. Pourtant, la variabilité inter-individuelle peut d'une part constituer un signe d'effet des ETMs dans les populations exposées et peut d'autre part avoir des implications dans les dynamiques de population et dans les phénomènes d'acclimatation ou d'adaptation (Depledge, 1990; Forbes et al., 1995).

### Variabilité entre espèces

Les différences d'exposition entre les récepteurs résultent des variations complexes dans les traits d'histoire de vie des différents taxons. Chaque taxon présente en effet des caractéristiques écologiques intrinsèques qui affectent leurs voies d'exposition potentielles. Smith et al. (2007) a présenté de façon semi-quantitative la contribution de chaque voie d'absorption potentielle dans l'exposition de différents taxons de vertébrés terrestres aux contaminants (Figure I.1.16). On constate par exemple que l'ingestion est une voie d'absorption importante pour tous les taxons considérés tandis que le contact tégumentaire qui contribue fortement chez les amphibiens, est une voie modérée pour les oiseaux, les mammifères et les reptiles. Cependant, d'autres différences liées à la biologie des organismes influencent les voies d'exposition à l'intérieur de chaque taxon. Notamment, l'habitat, le régime alimentaire, le mode de nourrissage modulent l'exposition et induisent des différences inter-spécifiques (Burger et al., 2003; Peakall and Burger, 2003; Smith et al., 2007).

a. Oiseaux				b. Mammifères			
Exposure pathways contributing to contaminant exposure in birds and their estimated relative contribution to exposure and degree of understanding				Exposure pathways contributing to contaminant exposure in mammals and their estimated relative contribution to exposure and degree of understanding			
Exposure pathway	Age class/life stages	Contribution to exposure	Understanding of pathway	Exposure pathway	Age class/life stages	Contribution to exposure	Understanding of pathway
Ingestion	All	High	High	Ingestion	All	High	High
Dermal contact	All	Moderate	Moderate	Dermal contact	All	Moderate	Moderate
Inhalation	All	Low	Low	Inhalation	All	Low in general; moderate to high in some fossorial mammals	Moderate
Maternal transfer	Embryos	Moderate	Moderate	Transplacental transfer	Fetuses	Moderate to high	Low to moderate in wildlife
				Lactational transfer	Nursing offspring	High	Low to moderate in wildlife
c. Reptiles				d. Amphibiens			
Exposure pathways contributing to contaminant exposure in reptiles and their estimated relative contribution to exposure and degree of understanding				Exposure pathways contributing to contaminant exposure in amphibians and their estimated relative contribution to exposure and degree of understanding			
Exposure pathway	Age class/life stages	Contribution to exposure	Understanding of pathway	Exposure pathway	Age class/life stages	Contribution to exposure	Understanding of pathway
Ingestion	All	High	Moderate	Ingestion	All	High	Low/medium
Dermal	All	Moderate	Low	Dermal	All	High	Low
Inhalation	All	Low	Low	Pulmonary	Larvae	High	Low/medium
Maternal transfer	Embryos	Moderate	Low	Pulmonary	Juvenile/Adult	Low	Low
Contaminated nesting media	Embryos	Low	Low				

**Figure I.1.16.** Voie d'exposition contribuant à l'exposition des vertébrés terrestres aux contaminants, leur contribution relative et leur degré de compréhension par les écotoxicologues pour les oiseaux (a), les mammifères (b), les reptiles (c) et les amphibiens (d) (Smith et al., 2007).

Les plus fortes concentrations internes chez les insectivores par rapport aux rongeurs, seraient dues à leurs différences de régime alimentaire, la nourriture des insectivores étant plus contaminée que celle des rongeurs (Shore and Rattner, 2001). Cependant, ces différences sont aussi probablement liées à leur physiologie, l'efficacité d'assimilation digestive de la nourriture étant plus forte chez les carnivores que chez les herbivores (Veltman et al., 2007). De plus, parmi les rongeurs, le Mulot sylvestre *Apodemus sylvaticus* et le Campagnol roussâtre *Myodes glareolus* (ex-*Clethrionomys glareolus*), qui ont le même niveau trophique (Abt and Bock, 1998), montrent des différences d'accumulation lorsqu'ils sont présents sur un même site contaminé (Shore and Rattner, 2001). Considérant une exposition égale, l'accumulation des ETMs peut varier : à cause des différences générales d'assimilation liées à des capacités physiologiques d'absorption et à la bioaccessibilité. Pour des voies d'exposition par ingestion, la physiologie digestive des organismes (temps de résidence, pH des fluides digestifs...) affecte la quantité de métaux pénétrant dans la circulation systémique (Peijnenburg and Jager, 2003; Fairbrother et al., 2007). La physiologie des animaux va également influencer les capacités d'excrétion des ETMs, mais aussi leur translocation et leur distribution dans les différents organes. La toxicocinétique des ETMs dans les organismes est donc variable entre taxons. Par exemple, Janssen et al. (1991) ont montré 4 patrons d'accumulation et d'excrétion différents chez 4 espèces d'arthropodes du sol (*Neobisium muscorum* : pseudoscorpion, *Notiophilus biguttatus* : carabidé, *Orchesella cincta* : collembole et *Platynothrus peltifer* : oribate) lors de l'étude des toxicocinétiques du Cd en conditions contrôlées. En effet, l'efficacité d'assimilation du Cd est plus forte chez les prédateurs *N. biguttatus* et *N.*

*muscorum*, et plus faible chez les saprophytes *O. cincta* et *P. peltifer* (Janssen et al., 1991). Par ailleurs, les constantes d'excrétion sont élevées chez les insectes *N. biguttatus* et *O. cincta* et faibles chez les arachnides *N. muscorum* et *P. peltifer* (Janssen et al., 1991). Les auteurs en ont donc conclu que l'efficacité d'assimilation du Cd est liée au niveau trophique et probablement aux différences de demandes en nutriments, et que l'influence des capacités d'excrétion est plus importante pour déterminer les concentrations accumulées à l'équilibre que l'efficacité d'assimilation.

Des différences inter-spécifiques au stress métallique peuvent faire intervenir des mécanismes physiologiques liés à la sensibilité des cibles mais aussi à la régulation et au stockage des ETMs. La détoxification par stockage sous des formes toxicologiquement inactives ou par excrétion induit une grande diversité de mécanismes de tolérance aux ETMs. Ainsi, les séquences de toxicité molaire des ETMs sont variables entre taxons (Tableau I.5) (Sigel, 1986; Vijver et al., 2004). Chez les micromammifères, les Murinés et les Arvicolinés, 2 sous-familles de rongeurs présentant une accumulation faible du Cd, diffèrent en sensibilité entre eux mais aussi par rapport aux Soricinés et aux Crocidurinés (insectivores) ces derniers montrant une forte accumulation du Cd mais une plus faible sensibilité aux stress métalliques (Shore and Douben, 1994a; Damek-Poprawa and Sawicka-Kapusta, 2004). Des conclusions similaires émergent pour le Pb (Shore and Douben, 1994b; Shore and Rattner, 2001). L'interprétation des données existantes *in situ* et en laboratoire reste difficile et la détermination de doses limites d'effets pour les espèces sauvages est très approximative. De plus, les données peuvent être contradictoires selon que l'on considère des limites toxicologiques basées sur les concentrations en ETMs accumulées dans les organes ou sur les concentrations journalières dans la nourriture, et selon l'effet considéré (toxicité rénale, hépatique, reproduction...). Les valeurs obtenues par des tests en laboratoire sont remises en question par certains auteurs (représentativité écologique, différences entre rat et souris utilisés en laboratoire et micromammifères sauvages) mais restent utilisées par exemple pour la détermination des *Ecological Soil Screening levels* (Eco-SSLs : valeurs seuils de concentrations en ETMs dans les sols au-delà desquels un risque existe pour les organismes considérés) (Shore and Rattner, 2001; USEPA, 2005d) ou des *Predicted No Effect Concentrations* (PNEC) (European Commission, 2003). L'utilisation de données acquises *in situ* est également difficile à cause de la diversité des effets mesurés (de plus de nombreuses études mesurent l'accumulation, pas les effets), du fait qu'elles sont très rarement basées sur des paramètres liés à la reproduction (ne permettent donc pas d'envisager des effets populationnels) et de la difficulté d'interpréter la présence/l'absence d'une espèce comme signe d'effet de la pollution par les ETMs (Shore and Rattner, 2001).

### Variabilité entre populations

La variabilité des impacts des ETMs entre populations peut être liée aux différences de dynamiques de populations et/ou de structure et fonctionnement des communautés (Figure I.1.15). La structure des réseaux trophiques et les caractéristiques des espèces qui les constituent peuvent moduler le transfert des ETMs dans les chaînes alimentaires, par exemple si les consommateurs primaires diffèrent en accumulation (stratégies de régulation ou stratégies d'hyper-accumulation) ou selon le nombre de niveaux trophiques mis en jeu (« longueur » de la chaîne alimentaire). Par exemple, en étudiant l'accumulation de certains ETMs (Cd, Cu et Zn) chez plusieurs invertébrés (araignées et amphipodes), Hendrickx et al. (2004) ont montré que les patrons d'accumulation pour une même espèce varient en fonction du site mais que ces différences entre sites sont espèce-spécifiques. Les auteurs concluent que des variations dans la structure des réseaux trophiques expliqueraient les variations intra-spécifiques des réponses à la contamination (Hendrickx et al., 2004).

Comme développé au paragraphe I.1.4.d, des différences entre populations peuvent intervenir suite à des phénomènes d'acclimatation et/ou d'adaptation (Posthuma and Van Straalen, 1993; Kammenga and Laskowski, 2000).

### **En résumé...**

La variabilité des réponses des organismes à cause des facteurs du récepteur implique la nécessité de considérer ces différents niveaux d'organisation biologique dans les études sur le transfert et les effets des ETMs dans les écosystèmes. Pourtant, il est difficile de mesurer l'importance de chacun d'eux dans une mesure ponctuelle *in situ*. Mesurer l'influence relative de chacun des facteurs impliquerait de pouvoir contrôler certains d'entre eux pour mesurer l'influence de la variabilité des autres, ce qui est difficilement envisageable dans des études de terrain. Des expérimentations peuvent donc être menées en laboratoire mais la simplification alors du système ne permet pas de tenir compte des interactions entre facteurs et n'est pas toujours représentative des phénomènes réels. Un moyen de palier à ces difficultés peut consister dans la comparaison des réponses de différents récepteurs sympatriques sauvages exposés dans des environnements pollués de manière chronique, différant par certains traits mais similaires pour d'autres.

Il est reconnu qu'il est nécessaire d'améliorer la connaissance sur l'influence des facteurs du récepteur sur l'accumulation et les effets des ETMs. Parmi les recommandations pour une meilleure considération de ces facteurs, certains auteurs conseillent notamment de développer des études dans des conditions environnementalement réalistes (interactions entre facteurs, exposition à des mélanges de métaux, études *in situ* dans des sites contaminés) (Tableau I.1.6). Mais aussi de considérer les facteurs du récepteur dans tous les aspects de la biodisponibilité, de la disponibilité environnementale à la disponibilité toxicologique (Tableau I.1.6).

**Tableau I.1.6.** *Recommandations pour l'intégration des facteurs du récepteur dans les études concernant la biodisponibilité des métaux (Burger et al., 2003).*

---

Include age, gender, reproductive state, gestational stage, size, and genetic factors
Develop improved analytical characterization under controlled host conditions
Include interactions between host factors
Develop methods for examining how host factors interact with mixtures of metals
Develop improved analytical characterization of metal bioavailability in experimental animal models
Use field situations, such as hazardous waste sites, to examine the effect of host factors on bioavailability of metals
Develop better analytical tools that provide rapid determination of metal content (and metal species) in the field
Develop better biokinetic models to examine the effect of host factors on metals
Conduct studies that are more representative of the human population
Consider host factors in all aspects of bioavailability, from environmental to target organ
Include host factors in biomonitoring schemes, for both ecological and human receptors
Include host factors in risk assessments
Incorporate host factors in human genomic studies

---

### En résumé...

De plus, les facteurs écologiques des récepteurs, hors régime alimentaire, sont souvent peu considérés et des travaux sont nécessaires pour évaluer leur implication dans les différences d'exposition et de réponses entre espèces. A l'heure actuelle, l'évaluation du risque est surtout basée sur le niveau trophique des animaux (European Commission, 2003; USEPA, 2005d), sans tenir compte des différences qui existent entre espèces dans les réponses aux ETMs en termes d'exposition, d'accumulation et/ou de sensibilité. De nouvelles approches tentent de développer une évaluation de la vulnérabilité des populations et des écosystèmes, basées sur les traits écologiques qui influencent la vulnérabilité des espèces aux polluants (De Lange et al., 2009; Lahr et al., *In press*). Cependant, ces travaux nécessitent de vérifier la validité des prédictions *in natura*, et de plus amples investigations pour identifier et prendre en compte les facteurs des récepteurs favorisant la vulnérabilité.



### *I.1.6.b. Variabilité spatio-temporelle et écotoxicologie du paysage*

#### Variabilité spatiale et temporelle de l'exposition, des transferts et des effets

Il est reconnu que l'exposition des organismes mobiles aux contaminants varie dans l'espace, notamment du fait de l'hétérogénéité spatiale de la contamination des sols, de la disponibilité environnementale et des caractéristiques de l'habitat et du paysage (Clifford et al., 1995; Marinussen and van der Zee, 1996; Smith et al., 2007). Le paysage est défini comme une mosaïque caractérisée par la composition, la structure et la fonction des taches d'occupation du sol dont elle est constituée (Urban et al., 1987; Burel and Baudry, 1999). Dans les paysages hétérogènes, la durée, la fréquence et l'intensité de l'exposition peut varier spatialement car, en premier lieu, le temps passé par les animaux (mouvements, comportement de nourrissage et d'alimentation...) dans les différentes taches changent avec l'occupation du sol. Certains habitats représentent, selon l'espèce considérée, un milieu de vie plus favorable de par sa structure (par exemple milieu boisé *versus* milieu ouvert) ou par la disponibilité et la quantité en ressources alimentaires présentes. Selon les ressources nécessaires (alimentation, protection, reproduction) pour l'organisme, le caractère favorable varie au cours du temps, à court (journée...) ou long terme (année...). Les différences d'exploitation en termes de temps passé et de fréquentation des différentes taches peuvent donc moduler l'exposition des animaux, et présenter de fortes différences entre espèces selon leurs caractéristiques écologiques (préférences d'habitat, taille du domaine vital, stratégie de nourrissage, régime alimentaire...). L'agencement spatial des différentes taches peut de plus affecter les déplacements des organismes et la manière dont ils exploitent leur environnement (migration, colonisation...). En second lieu, les niveaux d'ETMs dans les sols peuvent varier entre habitats (caractéristiques d'interception et de rétention des milieux), et enfin, la disponibilité environnementale des ETMs peut être différente entre types d'occupation du sol (caractéristiques du sol, faune du sol, spéciation des ETMs).

Pour résumer, les différentes sources de variabilité spatiale sont les distributions spatiales des contaminants et des caractéristiques physico-chimiques du sol, la structure et la qualité des habitats, la composition et la structure du paysage et les caractéristiques écologiques des animaux.

Grâce à des approches de modélisation, Van den Brink et al. ont par exemple montré que les doses journalières en Cd sont dépendantes de la répartition spatiale des habitats, du domaine vital des organismes et de leur stratégies de nourrissage, mais aussi que plus le paysage est « structuré » (paysage avec de très nombreuses taches peu étendues réparties « aléatoirement » *versus* paysage caractérisé par une matrice homogène et des taches délimitées et étendues, parfois connectées), moins les concentrations en Cd dans les sols expliquent les concentrations en Cd dans les animaux (Van den Brink et al., 2008).

Concernant la variabilité temporelle de l'exposition, elle peut être mise en lien avec les processus cités précédemment de variabilité de l'exploitation de l'environnement et de régime alimentaire, mais également avec l'évolution dans le temps des concentrations totales et

disponibles des ETMs dans l'environnement. L'exposition aux polluants peut varier au cours de la vie des organismes, selon les caractéristiques biologiques et écologiques des stades de vie (Smith et al., 2007). Pour certains polluants, comme le Pb et le Cd par exemple, qui peuvent traverser la barrière placentaire, les mammifères peuvent être exposés avant même la naissance (Shore and Rattner, 2001). Des variations physiologiques et métaboliques des organismes interviennent au cours du temps, différant par exemple selon, le statut de condition corporelle, les périodes de reproduction, la photopériode, qui modulent l'accumulation des ETMs et la sensibilité des organismes au stress induit par les métaux (Burger et al., 2003; Peakall and Burger, 2003; Włostowski et al., 2004). Par exemple, chez les micromammifères, les taux de stéroïdes circulant varient au cours de l'année notamment lors des périodes de reproduction et affectent l'accumulation du Cd et la sensibilité des individus (Shimada et al., 1998). Les variations inter-saisonnnières de régime alimentaire, liées à la disponibilité des ressources et aux besoins physiologiques des animaux, peuvent affecter leur exposition aux polluants (Peakall and Burger, 2003; Smith et al., 2007; Van den Brink et al., 2008). Par ailleurs, l'évolution temporelle de l'environnement dans lequel les récepteurs peuvent être exposés peut induire des différences dans le temps dans les réponses. Ainsi, des modifications du milieu, qu'elles soient naturelles (successions écologiques, perturbations climatiques...) ou anthropiques (agriculture, urbanisation) peuvent moduler la localisation des habitats favorables ou défavorables au sein de la zone contaminée et faire varier la probabilité de contact entre récepteur et polluant (Barntouse et al., 2008).

Parmi les travaux menés *in situ* sur les micromammifères, l'influence de l'hétérogénéité des contaminations des sols a rarement été considérée dans la mesure où la grande majorité des études sont conduites en comparant des sites contaminés à des sites témoins, plus rarement des gradients et dans ce cas des gradients constitués de quelques sites. L'échelle à laquelle les contaminations des sols influencent les réponses des organismes, et l'échelle à laquelle la bioaccumulation reflète les contaminations environnementales sont par conséquent des questions qui ont rarement été abordées. Pourtant cela constitue un enjeu majeur dans les processus de transfert et d'effets des ETMs dans les écosystèmes et présente une question de fond pour le choix des organismes étudiés dans le cadre de l'évaluation des risques (Tannenbaum, 2005). Les méta-analyses, notamment concernant le Cd, montrent des relations entre concentrations en ETMs dans les sols et dans les micromammifères (Shore, 1995; Sample et al., 1998; Veltman et al., 2007). Pourtant, les études récentes qui se sont intéressées aux corrélations entre concentrations en ETMs des micromammifères et les concentrations totales dans les sols au point de capture, ont mis en évidence de très faibles relations voire l'absence de corrélation (Wijnhoven et al., 2007). De plus, certains travaux ont suggéré que les différences de niveaux accumulés dépendaient plus des caractéristiques des récepteurs que de la variabilité spatiale de la contamination et de la qualité de l'habitat (Schipper et al., 2008). Ces travaux récents démontrent que les concentrations totales et la disponibilité environnementale ne sont pas toujours les facteurs

déterminant les niveaux accumulés chez les micromammifères. Les paramètres environnementaux (paysage, inondations...), les caractéristiques écologiques des animaux (déplacements, migration, colonisation...) et les processus dynamiques de l'accumulation et des dynamiques de populations peuvent par ailleurs expliquer l'accumulation des ETMs.

Des différences temporelles, et notamment inter-saisonniers dans l'accumulation de différents polluants métalliques ou radioactifs semblent liées dans certains cas à des variations de composition et/ou de contamination du régime alimentaire, mais aussi à des variations physiologiques dans l'assimilation, la régulation et le stockage des métaux (Włostowski, 1987; 1992b; Rudge et al., 1993; Erry et al., 1999; Toal et al., 2002; Włostowski et al., 2009). Il convient de souligner que lors de suivis temporels et plus particulièrement saisonniers, la structure en âge des populations varie au cours du temps et influence donc le niveau de contamination des récepteurs au niveau populationnel. Les suivis de l'accumulation étant rarement effectués sur de longues périodes, l'identification des phénomènes à l'origine des variations temporelles de l'accumulation entre saisons et entre années reste incomplète.

Le besoin de développer une estimation spatialement et temporellement explicite de l'exposition aux polluants a été soulignée durant la dernière décennie, et l'on peut noter une augmentation des études s'intéressant à ces questions (Clifford et al., 1995; Ares, 2003; Hope, 2006). Certains auteurs ont mis en évidence, par modélisation, l'influence de la contamination du sol, de l'hétérogénéité de l'occupation du sol et de la taille du domaine vital (Marinussen and van der Zee, 1996; Hope, 2000; 2001; Purucker et al., 2007; Schipper et al., 2008; Loos et al., *In press*). D'autres travaux ont montré l'importance d'incorporer des données temporelles dans l'estimation de l'exposition (Linkov et al., 2002; Hope, 2005). Dans la grande majorité des cas, ces études développent des modèles individus-centrés et calculent sur cette base l'exposition cumulée. Un effort a également été fait pour introduire des données spatialement explicites comme la taille du domaine vital, l'hétérogénéité de la contamination ou du comportement de nourrissage dans l'évaluation du risque liés à différents polluants dont les ETMs (Kooistra et al., 2001; Gaines et al., 2005; Kooistra et al., 2005; Topping et al., 2005; Van den Brink, 2010; Loos et al., *In press*; Sala et al., *In press*). Mais rares sont les travaux mesurant la variabilité spatio-temporelle de l'exposition dans les situations de terrain.

### Vers une écotoxicologie du paysage

Dans le début de la décennie 1990, certains auteurs, en référence aux concepts et méthodes développés en écologie du paysage, ont proposé le développement de nouveaux concepts en écotoxicologie qui prendraient en compte le paysage, les mécanismes écologiques qui y sont liés et des niveaux d'organisation biologique pertinents par rapport à cette échelle, et ont proposé une « écotoxicologie du paysage » (Cairns Jr, 1993; Cairns Jr and Niederlehner, 1996).

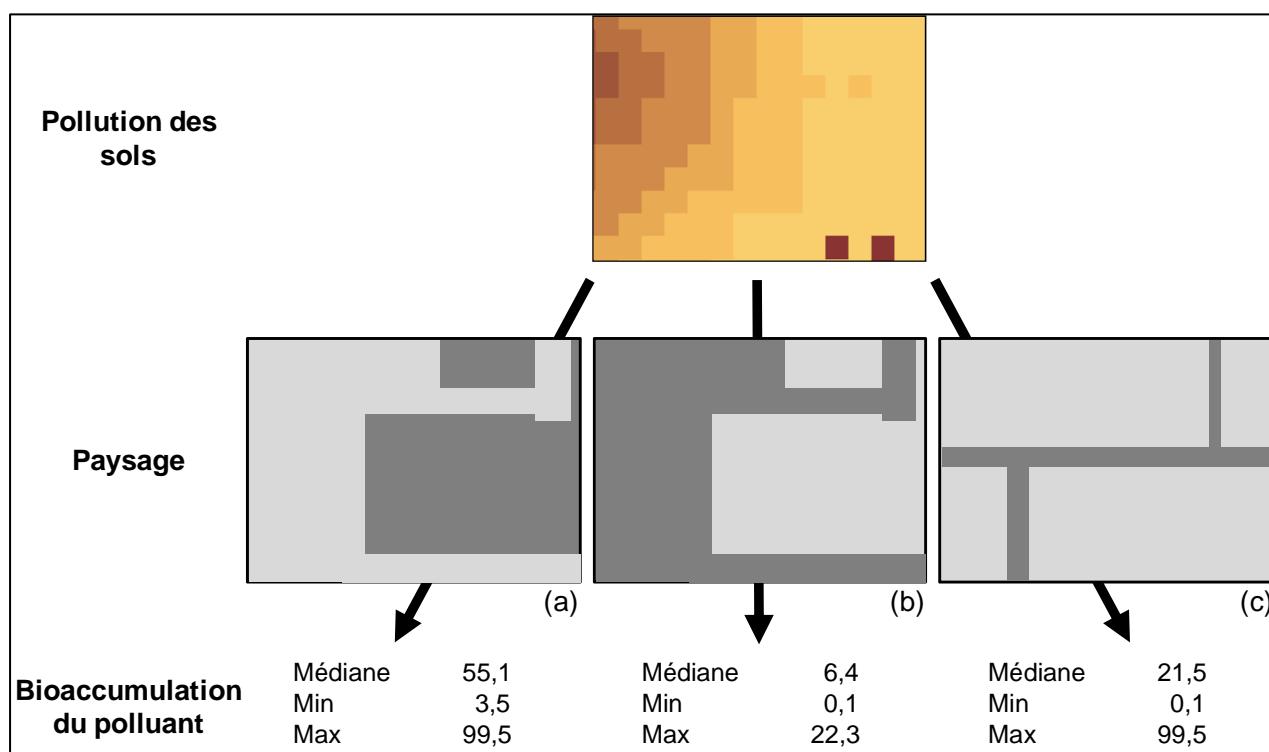
La qualité de l'habitat est une caractéristique multi-factorielle, conditionnée par des variables abiotiques et biotiques (climat, altitude, géologie, structure de la végétation, disponibilité des ressources, compétition, prédation...), qui détermine la présence des organismes en permettant

ou non le maintien des populations locales selon les caractéristiques de l'espèce concernée (Ricklefs and Miller, 2000). La qualité de l'habitat peut s'échelonner d'un habitat inadapté (où les populations ne pourront pas se maintenir) à un habitat optimal (qui pourra éventuellement être une source). Les taches d'habitat représentées dans le milieu sont donc plus ou moins favorables en fonction de leur qualité pour une espèce donnée, et leur distribution spatiale conditionne la distribution spatiale des organismes.

Le paysage exerce un rôle dans l'hétérogénéité spatiale de l'exposition des organismes en conditionnant la répartition spatiale des récepteurs : la localisation des taches favorables/défavorables détermine la présence/l'absence du récepteur et leur agencement module ses déplacements. Ceci peut donc faire varier le contact entre le récepteur et le contaminant et la bioaccumulation et les effets qui en résulte (Figure I.1.17 ) (Hope, 2000; 2001; Ares, 2003; Purucker et al., 2007; Barnthouse et al., 2008; Schipper et al., 2008; Loos et al., *In press*).

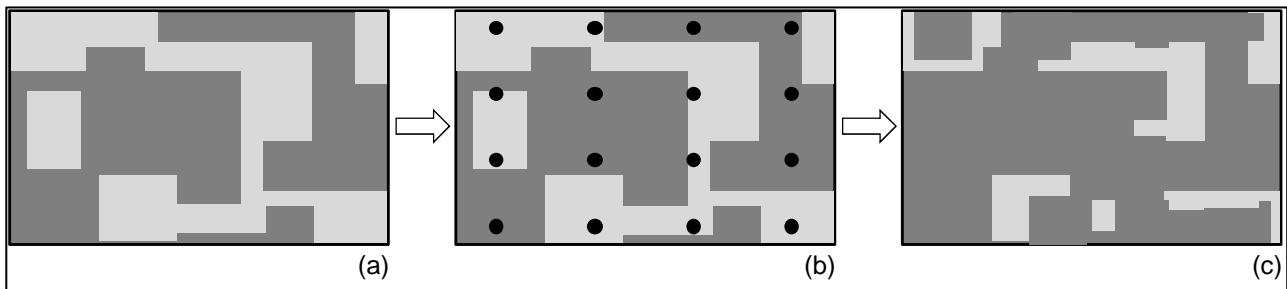
Le paysage, par son influence sur la structure et le fonctionnement des populations et des communautés (Burel and Baudry, 1999; Lidicker, 2008) peut représenter un facteur majeur gouvernant l'exposition des organismes : en affectant la structure des réseaux trophiques et la manière dont les organismes exploitent leur environnement, il pourrait influencer le transfert trophique (présence/absence de certaines espèces, interactions trophiques et non trophiques entre organismes) et les effets des ETMs (interactions avec d'autres stress écologiques augmentant la sensibilité au stress induit par les métaux) (Ares, 2003). En effet, ces variables peuvent induire des différences de réponses des récepteurs aux ETMs (voir I.1.6.a). De plus, le paysage ayant une implication dans les flux de matière et d'énergie au sein des écosystèmes (Lidicker, 2008), il est probable qu'il modifie le transfert des ETMs dans les écosystèmes au même titre que celui d'autres éléments.

La présence des polluants dans l'environnement peut participer à la qualité de l'habitat et modifier les caractéristiques des taches de la mosaïque paysagère, participant ainsi à la répartition spatiale des taches favorables/défavorables dans la matrice paysagère (Akçakaya, 2001; Ares, 2003; Carlsen et al., 2004). Par exemple, en modifiant la disponibilité des ressources alimentaires ou encore en limitant les capacités de survie et/ou de reproduction des organismes par effet toxique, la présence de polluants peut altérer la qualité de l'habitat (Ares, 2003; Carlsen et al., 2004). Ainsi, le fait qu'une tache favorable soit polluée peut la rendre défavorable : le nombre et la répartition spatiale des taches favorables sont donc modifiés, ce qui peut affecter les populations vivant dans le paysage concerné.



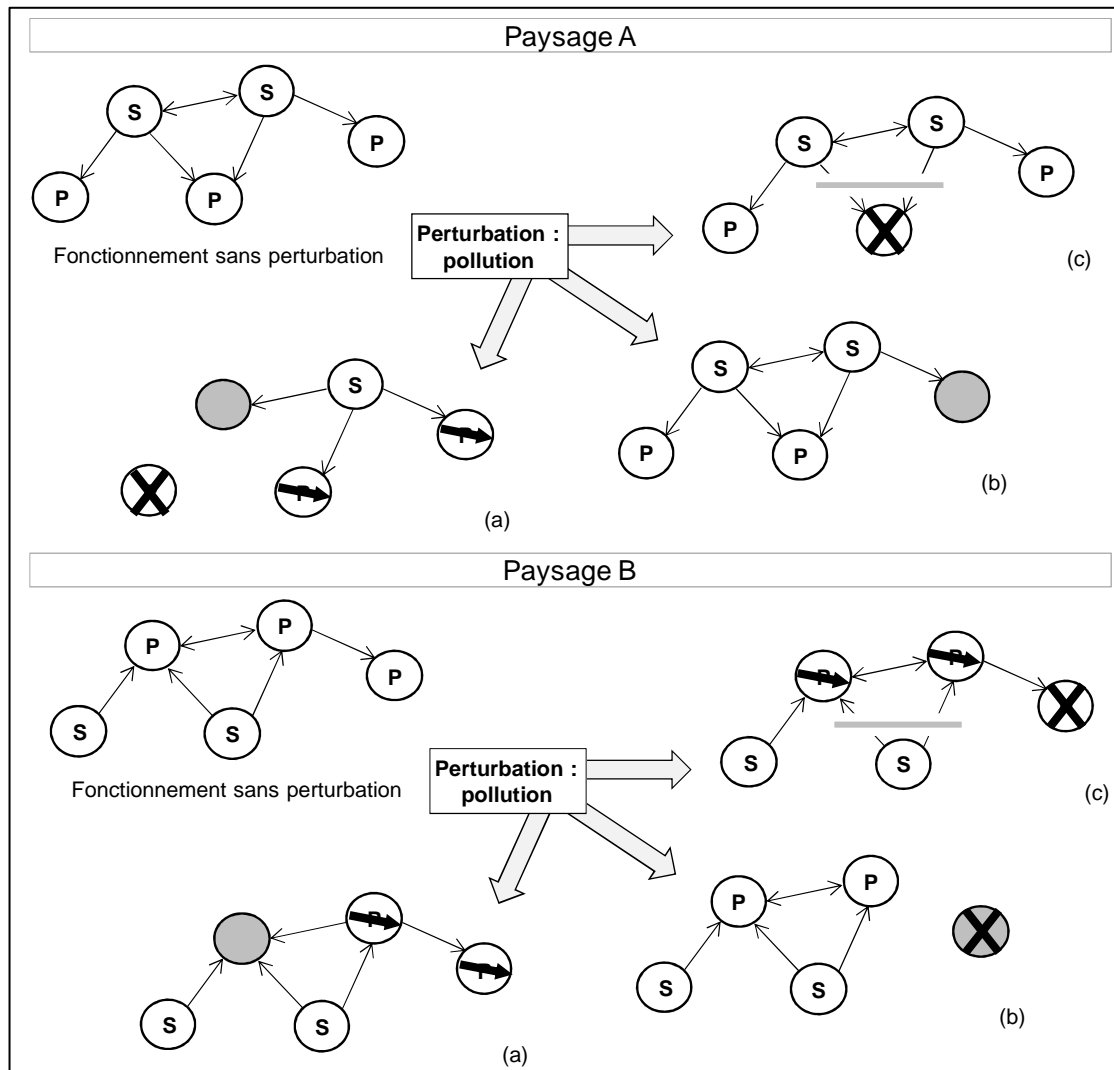
**Figure I.1.17.** Influence théorique du paysage sur l'accumulation d'un polluant par un récepteur. Pour une distribution spatiale donnée de la pollution des sols, 3 types de paysages sont proposés : les taches favorables sont représentées en gris clair, les taches défavorables en gris foncé. Dans le paysage (a), les taches favorables recouvrent des sols fortement contaminés : l'exposition des récepteurs est forte et les concentrations internes sont élevées. Dans le paysage (b), les taches favorables sont majoritairement présentes sur des sols peu contaminés : les récepteurs sont exposés à de faibles contaminations, ils montrent une accumulation relativement faible. Dans le paysage (c), la matrice paysagère est favorable, seules quelques taches sont défavorables, les récepteurs peuvent donc se déplacer et être exposés sur la quasi-totalité de la zone : les concentrations accumulées montrent une très forte variabilité entre individus, et un niveau médian intermédiaire entre les 2 situations précédentes. Ce type de simulation peut être obtenu avec des modèles d'exposition individu-centrés, adapté de (Van den Brink et al., 2008).

Dans des cas extrêmes, si la pollution provoque une dégradation intense de la qualité de l'habitat mettant en péril la survie et la reproduction des organismes, ce type d'interaction entre paysage et pollution peut être considéré comme une forme de fragmentation (Figure I.1.18) (Ares, 2003; Carlsen et al., 2004). La fragmentation de l'habitat étant vue comme la perte de vastes zones d'habitat favorable au sein d'un paysage, laissant de petites isolées d'habitat intact au sein d'une matrice hostile (Burel and Baudry, 1999; Ares, 2003; Carlsen et al., 2004) (Figure I.1.18). Or la fragmentation a une importance majeure sur les populations et les communautés, conduisant fréquemment à la disparition des espèces inféodées à l'habitat impacté (Burel and Baudry, 1999; Ares, 2003; Carlsen et al., 2004).



**Figure I.1.18.** Influence théorique des interactions entre pollution et paysage conduisant à une forme de fragmentation de l'habitat. Les zones en gris clair symbolisent l'habitat favorable, en gris foncé l'habitat défavorable. Les points noirs représentent l'apport d'un polluant. Le paysage (a) est structuré par la répartition équilibrée de taches favorables et défavorables, les taches favorables sont connectées. L'apport d'un polluant (b) entraîne (c) une modification de la distribution de l'habitat favorable : les zones d'habitat favorables impactées deviennent défavorables (toxicité, réduction des ressources...). Ainsi, on observe en (c) une matrice hostile avec des taches d'habitat favorable d'étendue réduite et une forte perte de connectivité.

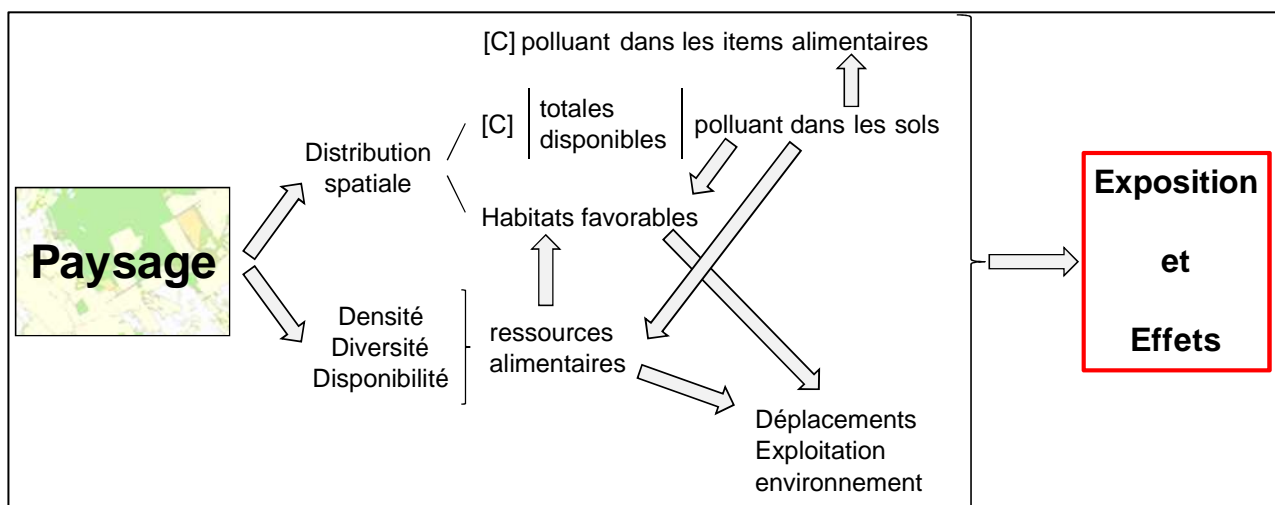
Le paysage, puisqu'il participe à l'isolement des populations, peut influencer les possibilités de résilience des populations ou communautés impactées par une pollution en limitant ou en favorisant les possibilités de recolonisation de l'habitat concerné (Ares, 2003; Carlsen et al., 2004; Caquet et al., 2007; Barnthouse et al., 2008). Dans le cas de métapopulations, la modification des caractéristiques favorables d'une ou de plusieurs taches à cause d'une pollution en ETMs peut affecter les flux d'individus entre populations source et puits et donc la dynamique de population globale (Cairns Jr and Niederlehner, 1996; McLaughlin and Landis, 2000; Akçakaya, 2001; Carlsen et al., 2004; Amini et al., 2005). D'autres cas de figures liés à l'influence du paysage sur les dynamiques de populations et de communautés peuvent être envisagés, et dans différents cas, l'addition d'un stresser perturbant les ressources et/ou la survie des adultes et la production de jeunes (comme les ETMs) peut impacter différemment les populations selon le fonctionnement initial déterminé par le paysage (Cairns Jr and Niederlehner, 1996; McLaughlin and Landis, 2000; Akçakaya, 2001; Ares, 2003; Carlsen et al., 2004) (Figure I.1.19).



**Figure 1.1.19.** Exemple théorique des impacts d'une pollution sur les populations suivant une dynamique métapopulationnelle dans 2 paysages différents (A et B). Les cercles représentent des taches où sont présentes les populations, les lettres S et P caractérisent la population : source (S) ou puits (P). Les 2 paysages diffèrent par la répartition des taches permettant l'établissement d'une population puits ou source dans la tache concernée. Pour le paysage A, dans le cas de figure (a), une population source est affectée : la population puits alimentée seulement par cette source disparaît, l'ancienne population source devient un puits, la population puits alimentée auparavant par les 2 sources n'est plus alimentée que par une seule : l'abondance diminue. Dans le cas de figure A (b), la population impactée est un puits : il n'y a pas de modification de la dynamique de population, les sources alimentent la population affectée. Dans le cas A (c), ce ne sont pas les taches où vivent les populations qui sont polluées mais la perturbation affecte la liaison entre les populations. La population puits qui dépendait des 2 sources est isolée et s'éteint. Dans le cas de figure B (a), la pollution impactée un puits, alimenté par 2 sources : la population affectée est maintenue. Cependant, les 2 autres puits peuvent voir leurs effectifs diminuer, les migrants de populations sources atteignant les zones en moins grand nombre. Dans le cas B (b), un puits est pollué et il n'était alimenté que par les migrants passant par un autre puits, la population va probablement s'éteindre faute d'immigration suffisante. Dans le cas B (c), une des sources n'est plus connectée aux puits, une seule source peut alimenter les populations puits, provoquant une diminution des effectifs des 2 puits les plus proches et entraînant la disparition du puits le plus éloigné qui va probablement souffrir d'une immigration insuffisante, les migrants étant préférentiellement retenus dans les taches précédentes. Adapté de (Barnthouse et al., 2008).

## En résumé...

Le paysage peut moduler l'exposition et les effets des polluants pour les récepteurs, à travers plusieurs mécanismes susceptibles d'interagir (Figure I.1.20). Pourtant l'écotoxicologie du paysage reste une discipline très peu développée (Barnthouse et al., 2008; Kapustka, 2008; Clements and Rohr, 2009). Des développements théoriques récents font du paysage un niveau d'organisation biologique à part entière auquel sont attachés des processus propres (Lidicker, 2008). La prise en compte du paysage en écotoxicologie nécessite donc de considérer des variables paysagères d'une part, mais aussi les concepts et méthodes de l'écologie du paysage (Cairns Jr and Nlederlehner, 1996).



**Figure I.1.20.** Implication du paysage dans l'exposition des organismes aux ETMs et dans leurs effets.

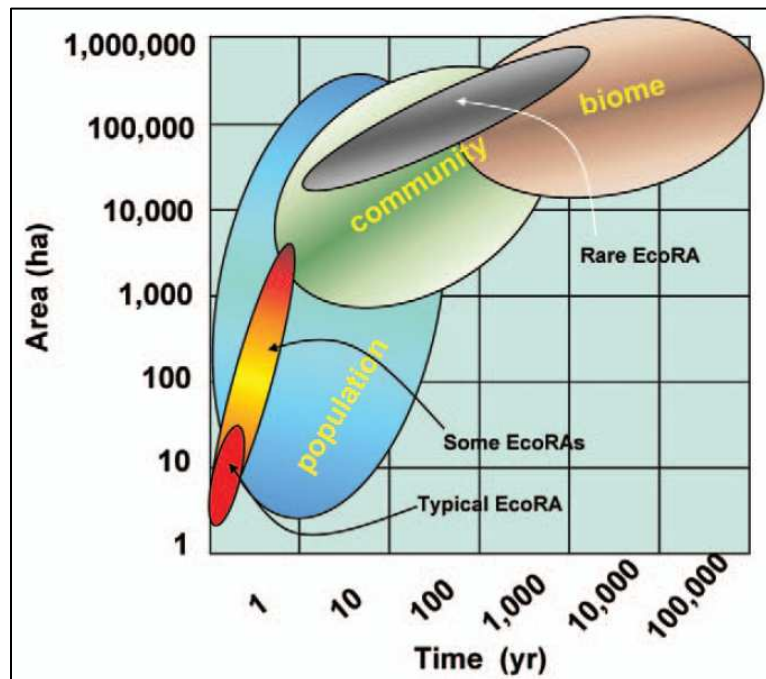
Si l'influence des variables paysagères sur l'exposition a été considérée par modélisation, les différences effectives entre organismes, occupations du sol ou paysages sur un site contaminé ont très rarement été mesurées sur le terrain (Vermeulen et al., 2009a). Par ailleurs, l'influence de l'hétérogénéité spatiale de l'occupation du sol a surtout été regardée à l'échelle de l'habitat mais pas à l'échelle de la mosaïque d'habitat, i.e. du paysage. Pourtant, la nécessité d'étudier les facteurs affectant le transfert des polluants à l'échelle du paysage, i.e. échelle à laquelle des effets directs et indirects des polluants peuvent intervenir sur les récepteurs, a été soulignée par différents auteurs (Ares, 2003; Carlsen et al., 2004; Gaines et al., 2005; Barnthouse et al., 2008).

Les publications récentes examinant les limites actuelles des procédures d'évaluation du risque mettent en évidence la nécessité de mener des études à de plus larges échelles de temps et d'espace que cela n'est fait en général, et de considérer des mesures d'effets qui puissent être mises en perspective avec les méthodes de biologie de la conversation (Hope, 2006; Kapustka, 2008) (Figure I.1.20).

Cela implique d'étudier en quoi le paysage et les mécanismes qui s'y rattachent peuvent constituer des éléments complémentaires de compréhension (voire de prédiction) et d'évaluer l'exposition de manière spatialement et temporellement explicite. Enfin, cette démarche doit



considérer le fait que des stressseurs autres que les polluants représentent des contraintes pour les organismes exposés *in situ*, et que ceci peut moduler leurs réponses à la contamination environnementale.



**Figure 1.1.20.** Relations entre échelles spatiales, temporelles, niveaux d'organisation et évaluation du risque (EcoRA : ecological risk assessment, évaluation du risque environnemental) (Kapustka, 2008).

---

## I.2. SYNTHÈSE ET OBJECTIFS

---

### I.2.1. Synthèse

Les risques pour l'environnement que représentent les pollutions métalliques des sols rendent nécessaire le développement de procédures d'évaluation du risque environnemental des sites contaminés. L'apport de connaissances sur la compréhension des mécanismes qui régissent le transfert et les effets des ETMs dans les écosystèmes terrestres est donc essentiel d'un point de vue fondamental et appliqué pour le développement d'évaluations du risque écologiquement plus représentatives et l'amélioration des interprétations de l'ERE.

Les concentrations en ETMs sont connues pour être hétérogènes dans l'espace, et de nombreux travaux ont décrit les contaminations des sols de sites pollués ou encore développé des méthodes d'interpolation spatiale pour prédire les concentrations. Cependant, peu de travaux ont considéré l'influence de différents paramètres environnementaux agissant à des échelles spatiales variées sur les concentrations totales et extractibles des ETMs dans les sols.

La variabilité spatiale de l'exposition des organismes mobiles aux ETMs est fortement dépendante de la contamination des sols par les ETMs et de leur disponibilité environnementale. Pourtant, la majorité des études sur la biodisponibilité, les transferts ou les effets des ETMs conduites *in situ* ne prennent pas en compte l'hétérogénéité spatiale des concentrations totales et de la disponibilité environnementale des ETMs. Elles concernent pour la plupart la comparaison de sites de référence et contaminés, ou plus rarement, un gradient de quelques sites. Des travaux récents sur ces thèmes ont mis en évidence l'absence de relation généralisable entre les niveaux de métaux accumulés et les concentrations totales ou disponibles des ETMs dans les sols.

Il est admis que le paysage peut influencer l'exposition et les effets des organismes aux polluants, mais ce niveau d'organisation, dont l'importance a été abordée dans des travaux de modélisation, est rarement considéré dans les études d'écotoxicologie *in natura*.

Les facteurs biologiques du récepteur modulent la bioaccumulation et les effets des ETMs. L'interprétation des données d'accumulation et d'effets nécessite donc une meilleure connaissance de l'influence de ces facteurs et de leurs interactions.

S'il est reconnu que l'accumulation et les effets des ETMs dans les organismes peuvent varier au cours du temps, la variabilité inter-annuelle et inter-saisonnière a été peu étudiée chez les organismes terrestres. Certains auteurs ont mis en évidence des différences temporelles de bioaccumulation des ETMs sans pouvoir de manière certaine mettre en évidence les mécanismes sous-jacents.

Les organismes peuvent présenter des mécanismes de tolérance ou de résistance qui leur permettent de limiter le stress induit par les métaux et de vivre dans des milieux contaminés. Pourtant, les capacités de séquestration des ETMs sous des formes non-toxiques ne sont pas toujours prises en compte lors de l'utilisation des données de relations dose/réponse. Pour l'évaluation du risque, ces données de relation dose/réponse sont souvent obtenues grâce à des

études en laboratoire, qui ne reflètent donc pas la réalité des situations in *natura* où d'autres stress environnementaux s'ajoutent à ceux de l'exposition aux ETMs et concernent des espèces qui ne sont pas toujours comparables d'un point de vue physiologique aux espèces sauvages. Les capacités d'adaptation doivent également être considérées pour l'utilisation en bioindication passive d'organismes autochtones, mais les données sur les capacités d'adaptation de nombreux taxons restent parcellaires.

Les escargots et les micromammifères sont considérés comme des bioindicateurs pertinents pour l'évaluation des risques liés aux ETMs et représentent des taxons importants pour l'étude des transferts des ETMs dans les réseaux trophiques. Cependant, la validation de leur utilisation dans les études de bioindication nécessite d'affiner l'interprétation de leurs réponses à la contamination environnementale. Notamment, sur l'échelle à laquelle ils intègrent la contamination des sols, sur l'implication de la variabilité inter-individuelle des réponses et sur la signification de mesures ponctuelles d'accumulation.

## I.2.2. Objectifs

Dans le cadre des nouvelles approches développées en écotoxicologie et des besoins identifiés pour améliorer l'évaluation des risques environnementaux liés aux ETMs, les objectifs de la thèse sont les suivants (Figure I.2.1) :

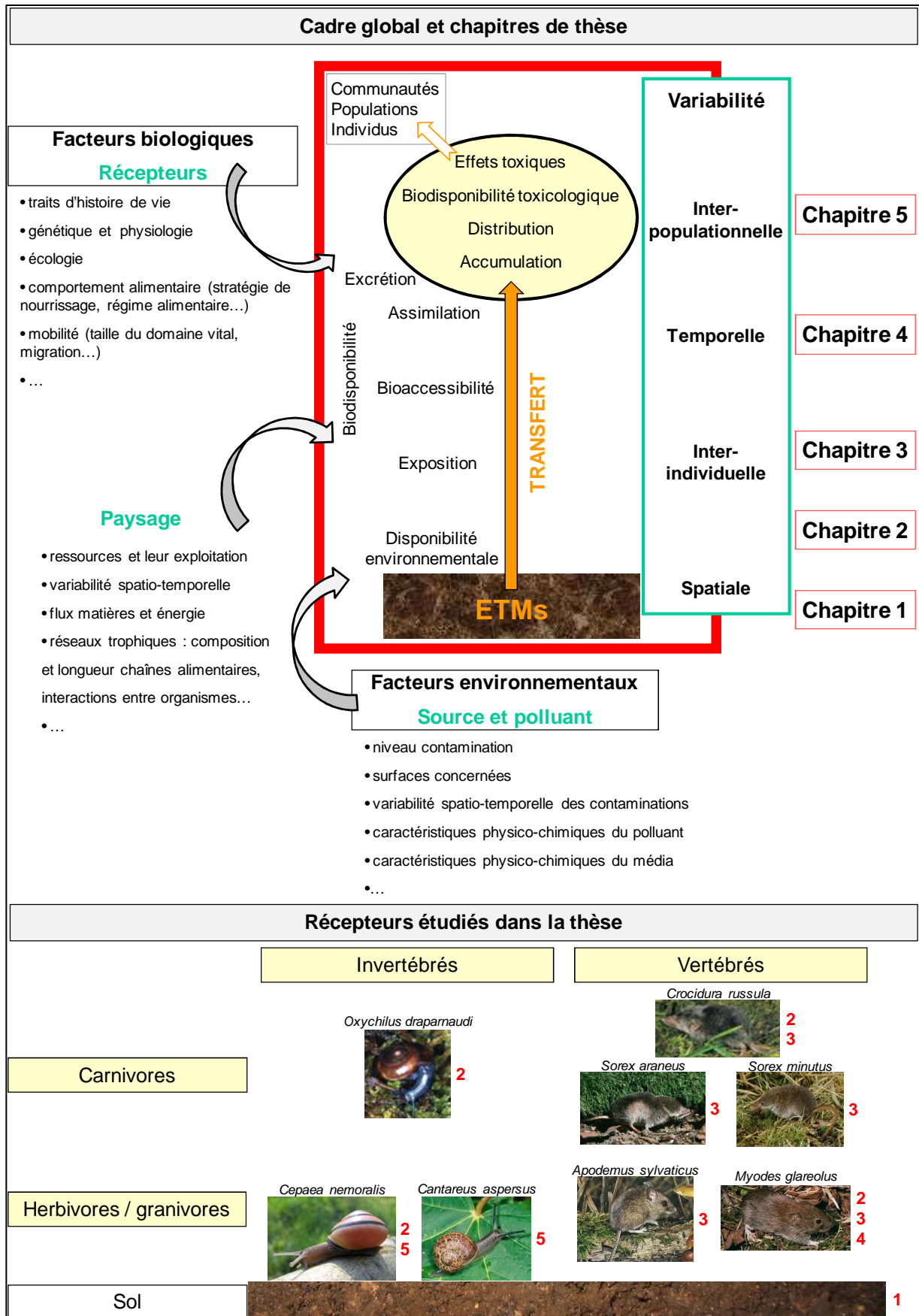
Etudier la variabilité spatiale de la contamination des sols en recherchant quelles variables, agissant à différentes échelles spatiales, affectent la distribution spatiale des concentrations totales et extractibles dans les sols. Cette étude fait l'objet du chapitre 1.

Dans le chapitre 2, le but est d'aborder la variabilité spatiale des contaminations des organismes. Ce, en explorant si les contaminations totales et extractibles des sols en ETMs expliquent les niveaux d'ETMs accumulés chez les escargots et les micromammifères, en recherchant à quelle échelle spatiale les contaminations des organismes reflètent les contaminations environnementales, et quel est le rôle du paysage dans la bioaccumulation des ETMs.

Le chapitre 3 concerne la variabilité inter-individuelle des réponses des micromammifères à la contamination environnementale en ETMs. Dans cette partie, la question centrale est de comprendre quelle est l'influence des facteurs du récepteur sur l'accumulation et le stockage des ETMs par la mesure de concentrations en ETMs dans les organes et des niveaux de métallothionéines. Des résultats complémentaires précisent l'étude du rôle protecteur des MTs dans le stress induit par les métaux.

La variabilité temporelle de l'accumulation des ETMs est abordée dans le chapitre 4, en étudiant les différences inter-saisonnières et inter-annuelles des niveaux en Cd, Pb et Zn chez le Campagnol roussâtre.

Le dernier chapitre concerne la variabilité inter-populationnelle des réponses des organismes à la contamination de l'environnement, en s'attachant à l'étude des capacités potentielles d'adaptation de 2 espèces d'escargots (*Cantareus aspersus* et *Cepaea nemoralis*) par la comparaison des réponses, lors d'une expérience de bioindication active, d'individus dont les parents étaient ou non exposés aux ETMs.



**Figure I.2.1.** Position des chapitres de la thèse dans le cadre global du transfert et des effets des ETMs dans les milieux terrestres et récepteurs étudiés. Les numéros en rouge à côté des images des récepteurs indiquent les numéros des chapitres dans lesquels ils sont étudiés (Source photographies : ARKive [www.arkive.org/](http://www.arkive.org/) et Thomas Schneider).

# **PARTIE 2**

---

## **MATERIELS ET METHODES**



---

## II.1. PRESENTATION DU SITE D'ETUDE

---

### II.1.1. Localisation et historique du site

Le site d'étude se situe autour de l'ancienne fonderie Metaleurop Nord S.A. localisée à Noyelles-Godault (Nord—Pas-de-Calais, 50°25'42 N 3° 00'55 E, Figure II.2.1). Différents types d'occupation du sol sont présents sur le site : les surfaces les plus importantes sont occupées par des milieux urbanisés (32%), des milieux agricoles (principalement champs labourés, 43%) et des milieux forestiers (plantations ou forêt naturelle, 12%) (données personnelles). La Deûle (rivière partiellement canalisée) traverse la zone d'étude du nord-ouest au sud-est et longe l'ancien site de Metaleurop Nord S.A..

L'usine de Metaleurop Nord a été, durant son activité de 1894-2003, l'une des plus grosses fonderies de Pb et Zn en Europe. Le procédé pyrométallurgique employé (procédé thermique de première fusion) a généré des quantités considérables de poussières contaminées en ETMs entre autres. Ces rejets atmosphériques ont été drastiquement réduits dans les années 1970 (de 350 t de Pb canalisées en 1970 à 15 t environ en 2002) suite à la mise en place de la réglementation sur les installations classées pour l'environnement et à l'intervention des organismes de régulation. Cependant, en 2002, les émissions annuelles de poussières restaient de 1 t de Cd, 17 t de Pb et 31 t de Zn (DRIRE, 2003). Par ailleurs, les « stériles » liés aux activités de l'usine étaient stockés à ciel ouvert sous forme d'un terril et étaient donc sujets à dispersion par le vent, entraînant des émissions de poussières contaminées supplémentaires. Une autre usine (Umicore, fonderie de Zn, localisée à Auby, à moins de 4 km de Metaleurop Nord), a également participé à la contamination des sols de la zone, bien que les procédés de production pyrométallurgiques aient été remplacés en 1975 par un procédé électrolytique, diminuant drastiquement les émissions en ETMs (DRIRE, 2003).

Différentes mesures concrètes avaient été imposées à Metaleurop Nord une trentaine d'années avant sa fermeture et concernaient notamment la maîtrise des rejets en ETMs, des campagnes de suivi sanitaire de la population (dépistage de plombémie), surveillance et retrait de la chaîne alimentaire des produits non conformes, opération « Ceinture Verte » (acquisition des terrains agricoles dans les zones polluées au-delà de 250 mg/kg de Pb), projet d'intérêt général visant à limiter l'usage des sols, actions de recherche en matière de réhabilitation des sols (DRIRE, 2003)...

### II.1.2. Contamination des sols des alentours de Metaleurop

Les sols de la zone présentent une contamination en ETMs, notamment en Cd, Pb et Zn considérable à la fois pour les niveaux atteints et les surfaces concernées : près de 120 km<sup>2</sup> où vivent 55 000 personnes. D'après BASOL, les sols de surface agricoles montrent une contamination atteignant des valeurs supérieures à 20 mg/kg de Cd sur 0,85 km<sup>2</sup>, 500 mg/kg sur 5 km<sup>2</sup> en Pb (BASOL, 2009). L'utilisation de la signature isotopique du Pb a permis de mettre en



évidence le panache de déposition des poussières contaminées émises par Metaleurop, montrant l'implication majeure de l'usine dans la contamination des sols du secteur (Franssens et al., 2004) bien que n'étant probablement pas la seule source de rejets d'ETMs dans l'environnement (autres usines, transports, agriculture intrants agricoles...). La contamination des sols arables et urbains aux alentours de Metaleurop Nord a été bien documentée (Frangi and Richard, 1997; Sterckeman et al., 2000; Sterckeman et al., 2002a; Douay et al., 2008b). Le laboratoire LSE a créé une base de données groupant toutes les mesures de concentrations en ETMs effectuées dans le secteur, permettant la compilation de plus de 700 échantillonnages de sols agricoles et urbains et contribuant à caractériser les niveaux et la distribution spatiale des contaminations des sols entourant Metaleurop Nord. Cependant, la contamination des autres types de sols du secteur, et notamment les sols de milieux ligneux (forêts, plantations d'arbres, haies, bosquets...) n'a été que peu considérée. Pourtant ces zones peuvent constituer des milieux favorisant l'exposition humaine (fréquentation pour activités récréatives, chasse, cueillette de fruits sauvages...) et celle de la faune sauvage (sites privilégiés de reproduction et nourrissage...).

Les études épidémiologiques conduites sur la zone ont montré qu'une proportion non négligeable de la population (30% et 12% des hommes et femmes adultes, respectivement) vivant dans le voisinage de Metaleurop Nord (jusqu'à 1km environ) montraient des concentrations sanguines supérieures à 100 µg/l de Pb (limite admise comme indiquant une surexposition)(Leroyer et al., 2001b). Concernant tant les adultes que les enfants, les niveaux de plombémie sanguine diminuaient avec l'augmentation de la distance entre la fonderie et leur logement (Leroyer et al., 2000; Leroyer et al., 2001a; Leroyer et al., 2001b; De Burbure et al., 2006). La diminution de l'exposition aux poussières contaminées depuis la fermeture de la fonderie semble avoir conduit à une diminution des teneurs sanguines en ETMs au sein de la population (Declercq and Ladrière, 2004). Cependant, la population et la faune sauvage restent exposées aux contaminations en métaux des sols via les chaînes alimentaires (notamment les légumes cultivés dans les jardins des particuliers), l'ingestion accidentelle de sol (qui est une voie d'exposition majeure chez les enfants) et l'inhalation de poussières contaminées dues à la dispersion éolienne (De Burbure et al., 2006; Deram et al., 2006; Douay et al., 2008a; Roussel et al., 2008; Bidar et al., 2009). Ainsi, l'accumulation des ETMs dans les végétaux cultivés et naturels du secteur a été mise en évidence par plusieurs études (Deram et al., 2006; Pruvot et al., 2006; Douay et al., 2008a; Douay et al., 2008c).

Après la fermeture du site, (liquidation judiciaire 10/03/03, tribunal de Béthune), l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) a pris le relais des mesures de prévention du risque sanitaire que l'entreprise avait mises en place à la demande de l'Etat (DRIRE, 2003). Ainsi, l'ADEME intervient dans la gestion de la réhabilitation du site et le programme STARTT et la présente thèse ont pour but de contribuer à établir un état des lieux de la contamination des sols et des organismes de milieux ligneux. Cet état complétera celui réalisé sur les sols agricoles et urbains, par des données d'autres habitats et dans d'autres compartiments biologiques, animaux

principalement, pour permettre un suivi à moyen et long termes de l'efficacité des actions entreprises sur le secteur d'étude. Certaines parcelles gérées par l'ADEME seront donc être intégrées dans les stations d'étude.

Si les facteurs intervenant dans la contamination des sols agricoles et urbains du secteur ont été précédemment étudiés, les sols développés dans des milieux ligneux ont été moins considérés. Pourtant, d'un point de vue fondamental (processus intervenant dans la contamination des sols et dans la mobilité des métaux) et d'un point de vue appliqué (évaluation du risque lié aux polluants métalliques), la connaissance des niveaux de contamination des sols totaux et disponibles et de leur distribution spatiale semble essentielle. Les milieux ligneux représentent en effet des surfaces relativement importantes, et sont des lieux privilégiés pour la reproduction et le nourrissage de la faune. De plus, ce sont des milieux très fréquentés par les populations humaines pour des activités récréatives, où les populations peuvent être également être exposées à travers les activités de chasse et de cueillette (baies, noisettes...). Il apparaît donc important d'étudier les distributions spatiales des concentrations totales et disponibles en métaux dans les sols ligneux, et de mettre en lumière les facteurs qui les expliquent.

---

## II.2. DETERMINATION DE LA STRATEGIE D'ÉCHANTILLONNAGE

---

### II.2.1. Démarche générale

Un échantillonnage systématique sur 40 km<sup>2</sup> autour de l'ancienne fonderie, basé sur une grille régulière (maillage avec des stations de 500 x 500m), a été retenu. Ce type d'échantillonnage est conseillé pour la caractérisation de nombreuses variables environnementales et permet d'appliquer par la suite des analyses statistiques spatiales en limitant un biais éventuel lié à une pression d'échantillonnage irrégulière dans l'espace (Theocharopoulos et al., 2001; Webster and Oliver, 2001; USEPA, 2002). Il a été décidé de travailler uniquement dans les milieux ligneux pour les raisons détaillées ci-après. Nous appellerons ci-après « habitat ligneux » les différents types d'habitat ligneux, c'est-à-dire de milieux boisés (végétation arbustive ou arborescente) tels que les forêts (naturelles ou plantations), les bosquets ou encore les haies (en milieu agricole mais aussi en parcs urbains et autres...). En effet, ce type d'habitat est favorable au nourrissage et à la reproduction des modèles biologiques considérés dans le programme STARTT et la présente thèse (escargots, micromammifères, oiseaux). De plus, un échantillonnage « à habitat constant » sur l'ensemble de la zone devait permettre de contacter les mêmes espèces sur toute l'emprise du site, en limitant l'influence des variations de paysage et de contamination sur la zone. Ce choix permet par ailleurs de considérer des zones de prélèvement homogènes, ce qui est fréquemment conseillé par différentes normes et protocoles standardisés (Theocharopoulos et al., 2001), et permet de limiter les sources de variations liées à l'habitat. Enfin, les sols agricoles et urbains du secteur ayant déjà été étudiés du point de vue des caractéristiques pédologiques et de la contamination, de nombreux points de prélèvements avaient déjà été réalisés sur la zone d'étude mais rarement dans les milieux ligneux. Le présent travail, en investiguant d'autres milieux que ceux déjà considérés, pourrait donc améliorer la connaissance de la contamination du site. Ci-après, le terme « habitat ligneux » caractérisera le type d'habitat ligneux considéré (haie, bosquet, forêt, plantation...) tandis que le terme « tache ligneuse » concernera l'entité, la zone en elle-même, quel que soit le type d'habitat ligneux concerné.

Le premier objectif étant de caractériser la contamination des sols sur l'emprise de la zone d'étude, des mesures systématiques dans chacune des mailles de la grille ont été prévues. Concernant le second axe de la thèse, l'échantillonnage des récepteurs (escargots, micromammifères) à large échelle n'étant pas envisageable sur l'ensemble du site pour des raisons logistiques, il a été décidé de choisir un sous-échantillon de 32 stations. Enfin, pour l'étude à une échelle spatiale plus fine des transferts et effets des ETMs dans les chaînes alimentaires, 3 stations ont été retenues parmi le sous-échantillon.

La démarche de définition de la stratégie d'échantillonnage a donc été définie en 3 étapes majeures :

- (1) préparation d'une grille d'échantillonnage couvrant 40 km<sup>2</sup> autour de l'ancienne fonderie.
- (2) caractérisation du site et des mailles de la grille d'échantillonnage en termes d'occupation du

sol de manière à choisir la localisation des points de prélèvement des sols et les sous-échantillons de stations de prélèvement (32 puis 3 stations).

(3) caractérisation des mailles de la grille d'échantillonnage en termes de contamination des sols en ETMs.

(4) sélection des 32 et 3 stations de prélèvements de récepteurs.

Les objectifs de la thèse concernant pour partie l'étude de l'influence de la variabilité spatiale des contaminations et du paysage sur le transfert et les effets des ETMs dans les chaînes alimentaires, ces 2 paramètres ont été considérés dans le choix des stations de prélèvements. Le choix des 32 stations de prélèvements des bioindicateurs a donc été raisonné de manière à obtenir un échantillon représentatif de la zone en termes de contamination et de paysage, en essayant dans la mesure du possible d'étudier plusieurs réplicats pour différents niveaux de contamination en ETMs dans les différents types de paysages présents sur la zone. Les mêmes paramètres ont été pris en compte pour le choix des 3 stations d'étude à échelle plus fine : nous avons choisi d'étudier 3 stations présentant des caractéristiques paysagères comparables et sur un gradient de contamination des sols.

## II.2.2. Définition d'une grille d'échantillonnage

Un quadrillage, sous forme d'une grille de 5 x 8 km composée de mailles de 500 x 500 m (soit 160 mailles), a été positionné sur le secteur d'étude (Figure II.2.1). Deux mailles hors de la zone ont été ajoutées comme stations « témoins externes » (Figure II.2.1). Afin de limiter les « effets de bord » pour les analyses paysagères notamment, la grille a été étendue à 9 x 6 km. Les mailles ont été numérotées de manière croissante, cette numérotation a par la suite été utilisée pour les dénommer (Figure II.2.1).

## II.2.3. Analyse paysagère

### II.2.3.a. Cartographie de l'occupation des sols

Afin de sélectionner les 32 stations présentant des compositions paysagères semblables et des niveaux de contamination contrastés, il a été nécessaire de réaliser une cartographie de l'occupation des sols. Cette cartographie a été réalisée (sur la zone étendue de 6 x 9 km) en croisant 2 sources d'information :

(1) base de données CORINE LANDCOVER (cartographie de l'occupation du sol au niveau européen, disponible auprès de l'Institut Français de l'Environnement (IFEN), utilisable sous SIG, d'une résolution de 0,25km<sup>2</sup> et basée sur une typologie comprenant plus d'une vingtaine de classes d'occupation du sol ; <http://www.eea.eu.int> ; <http://www.ifen.fr>).

(2) photographies aériennes (BD ORTHO®, document informatisé géoréférencé développé par l'Institut Géographique National (IGN), utilisable avec différents logiciels de Système d'Information Géographique (SIG), réunissant des dalles de 1 km<sup>2</sup> réalisées à partir de photographies aériennes modifiées de manière à s'affranchir de certaines déformations liées à la prise de vue, avec une

résolution de 80 cm).

La réunion de ces 2 informations, ainsi que les visites des sites sur le terrain, ont permis de montrer des imperfections dans la base de donnée CORINE (en raison de sa résolution : éléments de 0,25 km<sup>2</sup> d'un seul tenant), notamment en ce qui concerne les limites des unités et l'absence d'unités inférieures à 0,25km<sup>2</sup>.

Afin d'affiner la cartographie de l'occupation du sol (améliorer la résolution, mettre à jour les changements d'occupation et corriger les erreurs de typologie relevées sur CORINE), une numérisation manuelle (utilisation de ArcGIS 8.0, 9.0 et QuantumGIS Kore 1.0) a été réalisée, partant de la couche vectorielle de CORINE, en précisant les limites inexacts des différentes unités, en ajoutant les éléments ligneux absents (bosquets de moins de 0,25 km<sup>2</sup>, haies...) et en corrigeant les imperfections en terme de typologie. Ce sur la base des photographies aériennes et des visites de terrain.

La résolution finale de la carte obtenue était de 4 m. La carte est représentée dans son intégralité dans la Figure II.2.2. Cette carte d'occupation des sols a été utilisée pour l'analyse la composition paysagère et pour la création d'une carte de l'usage des sols (Figure II.2.3).

#### *II.2.3.b. Analyse statistique et classification des dominantes paysagères*

Sur la base de cette carte d'occupation des sols, une classification ascendante hiérarchique a permis de déterminer une typologie de dominante paysagère caractéristique de chaque maille. L'ensemble des analyses a été réalisée grâce au logiciel R 2.7.0, avec les bibliothèques additionnelles ade4, pvclust, vegan et cluster (R Development Core Team, 2006).

Brièvement, la carte vectorielle a été convertie en raster (1 pixel = 4 m) et sur cette base, le nombre de pixels de chaque catégorie d'occupation du sol par maille a été calculé. Une analyse factorielle des correspondances (AFC) a été développée afin d'identifier les variables structurantes, discriminantes ou redondantes caractérisant l'occupation des sols dans les mailles de la grille d'échantillonnage (Legendre and Legendre, 1998). Ces variables étant identifiées, les types d'occupation du sol (classes CLC) ont été sélectionnées et certains regroupement réalisés, afin de chercher à caractériser les dominantes paysagères de chacune des mailles de la grille. Le terme de « dominante paysagère » réfère ici à la composition et à l'organisation du paysage de la maille concernée, l'occupation du sol caractérisant la matrice étant considérée comme la dominante paysagère donc le déterminant principal du type de paysage : par exemple, agricole, urbaine ou forestière. L'axe 1 de l'AFC montre 1 gradient de fermeture du milieu (de labours à forêt) et l'axe 2 la présence singulière de zones industrielles particulières (usines, terrils, chantiers, décharges) et l'axe 3 représente un gradient d'urbanisation (Figure II.2.4).

Les variables structurantes de la composition paysagère sur notre grille semblent donc être la présence de milieux urbains, de labours et forestiers. Les bosquets/haies sont placés au centre du graphique, indiquant qu'ils ne constituent pas une variable structurant les différences/ressemblances entre mailles et qu'ils sont donc présents partout sur le site, quelle que

soit l'occupation du sol majoritairement représentée dans la maille.

Une classification ascendante hiérarchique (sur la base d'une matrice de distance, coefficient de distance/similarité : distance euclidienne (Legendre and Legendre, 1998) a été utilisée, permettant de déterminer des types de paysages, basés sur les dominantes paysagères, présents sur la zone (Figure II.2.4). La typologie obtenue compte 7 classes de types de paysages : urbain, mixte urbain/agricole, dominé par des bosquets et friches, agricole, forestier, site de Metaleurop, mixte forestier/prairial (Tableau II.2.1). Les noms de typologie ont été basés sur le type d'occupation du sol de la matrice paysagère (élément dominant du paysage) de la maille, qui représente donc sa dominante paysagère, mais d'autres classes d'occupation du sol peuvent être présentes dans la maille. Ainsi, même une maille dont la dominante paysagère est « Agricole » peut posséder des habitats ligneux ou encore des milieux urbains. Cette typologie a permis d'attribuer à chacune des 160 mailles un type paysager (Figure II.2.5).

**Tableau II.2.1.** Composition du paysage (% des différentes classes d'occupation du sol) dans chacun des types de paysages identifiés. Les dominantes paysagères (occupation du sol majoritaire) caractérisent les types paysagers.

Type de paysage	Numéro de classe	% occupation du sol						
		Urbain	Industriel	Labours	Prairies	Forêt	Friches, haies et bosquets	Rivière, étang
Urbain	1	73,01	0,01	8,02	5,57	2,13	10,84	0,41
Bosquets / Friches	2	6,90	7,21	2,7	4,84	10,33	62,89	5,14
Mixte urbain + agricole	3	41,04	1,13	30,35	5,95	1,53	19,58	0,42
Agricole	4	10,26	0,31	78,09	1,94	2,64	6,31	0,46
Forestier	5	6,58	0,00	11,78	4,80	63,35	11,42	2,08
Site Metaleurop	6	2,00	94,01	0	0,00	0,00	2,24	1,75
Mixte forestier + prairie	7	6,57	0,00	4,94	45,53	34,77	7,44	0,75

## II.2.4. Niveau de contamination des sols en ETMs

Le but de cette étape était l'attribution d'un degré de contamination en ETMs supposé, d'après les données disponibles pour les sols arables, aux 160 mailles de la grille d'échantillonnage. Les courbes d'iso-concentration en Cd et en Pb des sols agricoles (données du LSE, Figure II.2.6) ont donc été utilisées pour déterminer le niveau présumé de contamination de chacune des mailles (faible, moyen, fort).

## II.2.5. Choix des stations d'étude pour les prélèvements des sols et des bioindicateurs

Les 32 mailles ont été sélectionnées en privilégiant les mailles les plus représentées sur le secteur en termes de dominante paysagère (à savoir les mailles de type urbain, agricole et

forestier) afin d'obtenir un nombre de réplicats suffisant pour chaque niveau de pollution.

Pour chacun de ces types paysagers, 3 mailles ont été choisies (3 réplicats dans la mesure du possible) pour chacun des 3 niveaux de contamination présumée définis. Nous avons donc obtenu un échantillonnage de 3 types paysagers x 3 degrés de contamination x 3 réplicats, soit 27 mailles. La sélection a été complétée par 2 mailles dans un autre type paysager (type mixte bosquets / friches). Pour ce paysage, il n'a pas été possible ni d'obtenir plus de réplicats, ni plusieurs niveaux de contamination car il est peu représenté sur la zone. Il était cependant nécessaire de le prendre en compte car les mailles les plus contaminées situées aux abords de l'ancienne fonderie présentent cette dominante paysagère. Un quatrième réplicat a été ajouté pour certaines classes lorsque plus de 3 mailles présentant le type de dominante paysagère et le niveau de contamination souhaités étaient candidates. Le nombre de mailles retenues par type de paysage par niveau de contamination est présenté dans le Tableau II.2.2, leur localisation géographique sur la Figure II.2.7.

**Tableau II.2.2.** Nombre de mailles retenues par type paysage par niveau de contamination présumé.

Paysage	Urbain			Forestier			Agricole			Bosquets / Fiches	Total
	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++		
Niveau présumé de contamination	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+++	
Nombre de mailles	3	3	3	3	4	3	3	4	4	2	32

Parmi ces 32 mailles, 3 ont été retenues au sein de la zone d'étude, présentant des caractéristiques paysagères le plus semblable possible et suivant un gradient de contamination des sols (tableau II.2.3, Figure II.8). Les mailles, dans leur ordre d'éloignement à l'usine, portent les numéros 097, 117 et 103 (ces numéros réfèrent aux numéros des mailles sur la grille d'échantillonnage). Deux mailles « témoin externe » ont été ajoutées par la suite (Figure II.8).

Il paraissait essentiel d'ajouter une station « contrôle » à l'échantillonnage, les premiers dosages d'ETMs dans les sols (hiver 2006) ayant montré que la maille 103 (la moins contaminée parmi les 3 mailles constituant le gradient de contamination), présentait des concentrations élevées par rapport au fond pédo-géochimique (le double environ) et représentait donc une station contaminée. Une première maille témoin externe a donc été choisie sur la commune de Mérignies, à une dizaine de kilomètres au Nord de Metaleurop (Printemps 2007). L'accès au site n'étant pas possible l'année suivante, une seconde maille témoin externe a été choisie à proximité de la première sur la commune de Tourmignies (Printemps 2008). Dans les 2 cas, nous nous sommes attachés à rechercher des stations présentant des caractéristiques paysagères proches des 3 mailles de la zone d'étude, avec des sols développés sur les mêmes ensembles géomorphologiques et dont les caractéristiques étaient comparables à celles des 3 mailles et enfin ne présentant pas de risque particulier de contamination des sols en ETMs. Les mailles « témoins externes » retenues portent les noms de TE1 et TE2 (ordre de sélection).

**Tableau II.2.3.** Caractéristiques des 3 mailles retenues sur la zone d'étude et des 2 mailles « témoins externes ».

	TE1	TE2	103	117	097	Zone d'étude
<b>Paysage</b>						
<i>(% occupation du sol)</i>						
Urbain	1,0	0,3	1,7	5,3	12,6	25,3
Industriel	0,0	0,0	0,0	0,0	21,6	1,2
Labours	41,3	24,3	39,0	24,8	0,0	42,4
Prairies	11,0	17,3	2,2	0,0	1,2	4,6
Forêt	28,8	37,3	40,7	53,0	16,0	12,3
Friches	10,5	11,3	10,5	10,3	24,9	7,1
Haies et bosquets	6,8	8,0	6,1	7,0	17,0	6,2
Rivière, étang	0,8	1,8	0,0	0,0	7,0	1,0
<b>Contamination des sols</b>						
<i>(médiane, mg.kg<sup>-1</sup> ms)</i>						
<i>n</i>	5	10	6	5	10	277,0
Cd	1,6	1,4	4,3	9,1	48,3	4,8
Pb	110,4	107,4	267,2	512,0	1295,3	280,0
Zn	183,2	168,8	352,7	555,8	1874,7	439,0
<b>Distance à Metaleurop</b>						
<i>(km)</i>						
	11,2	10,0	3,0	1,4	0,5	2,5



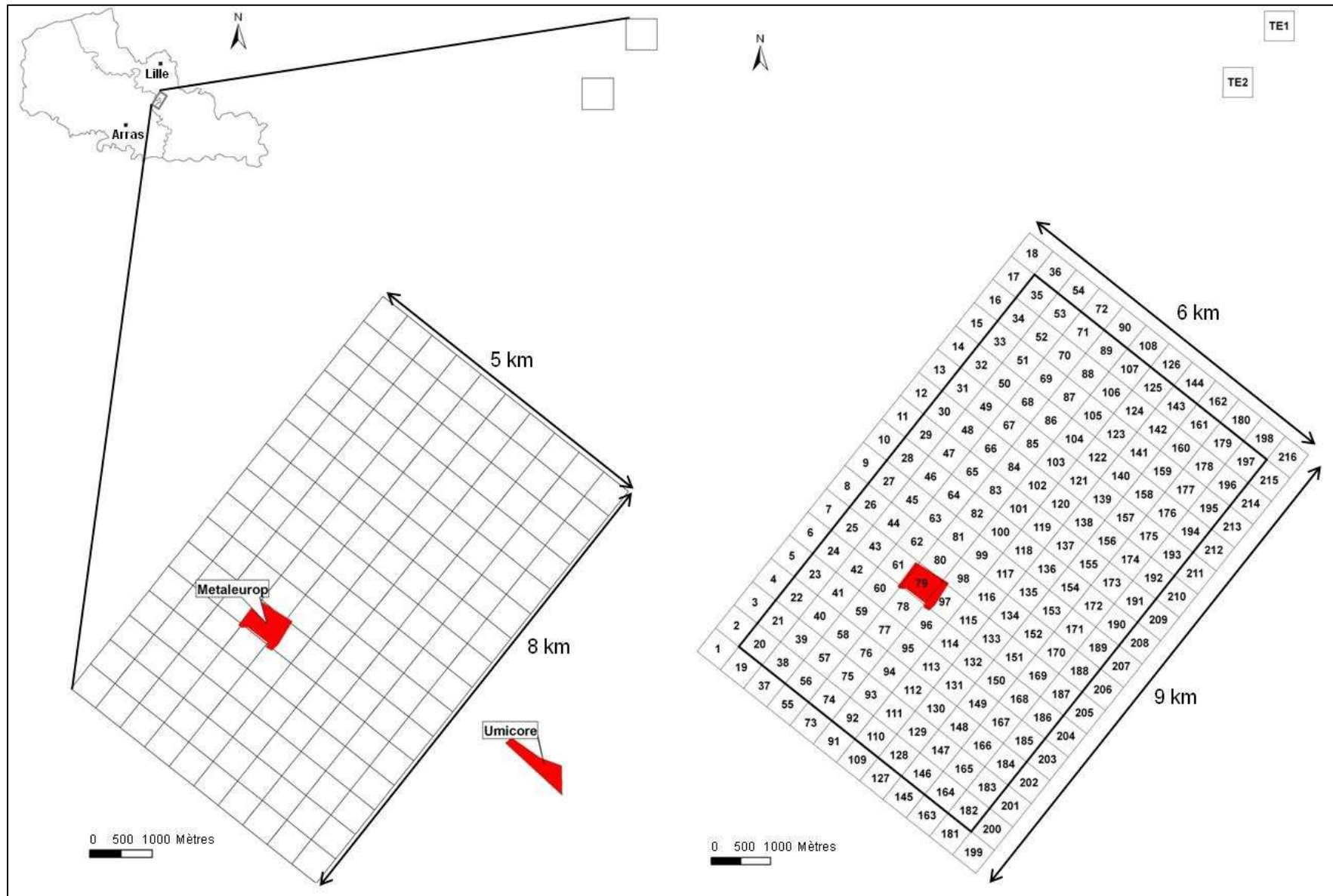


Figure II.2.1. (a). Localisation géographique du secteur d'étude et grille d'échantillonnage. (b). Grille étendue et numérotation des mailles.

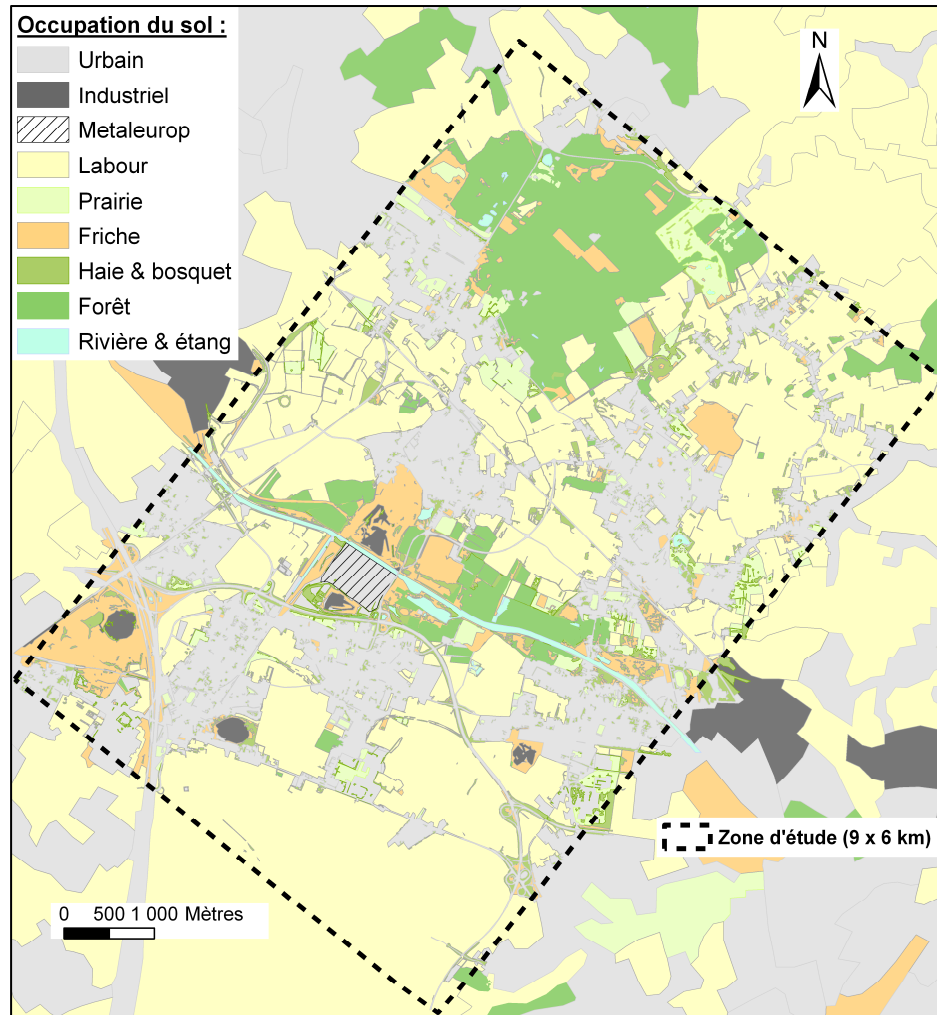


Figure II.2.2. Carte d'occupation des sols sur la zone d'étude.

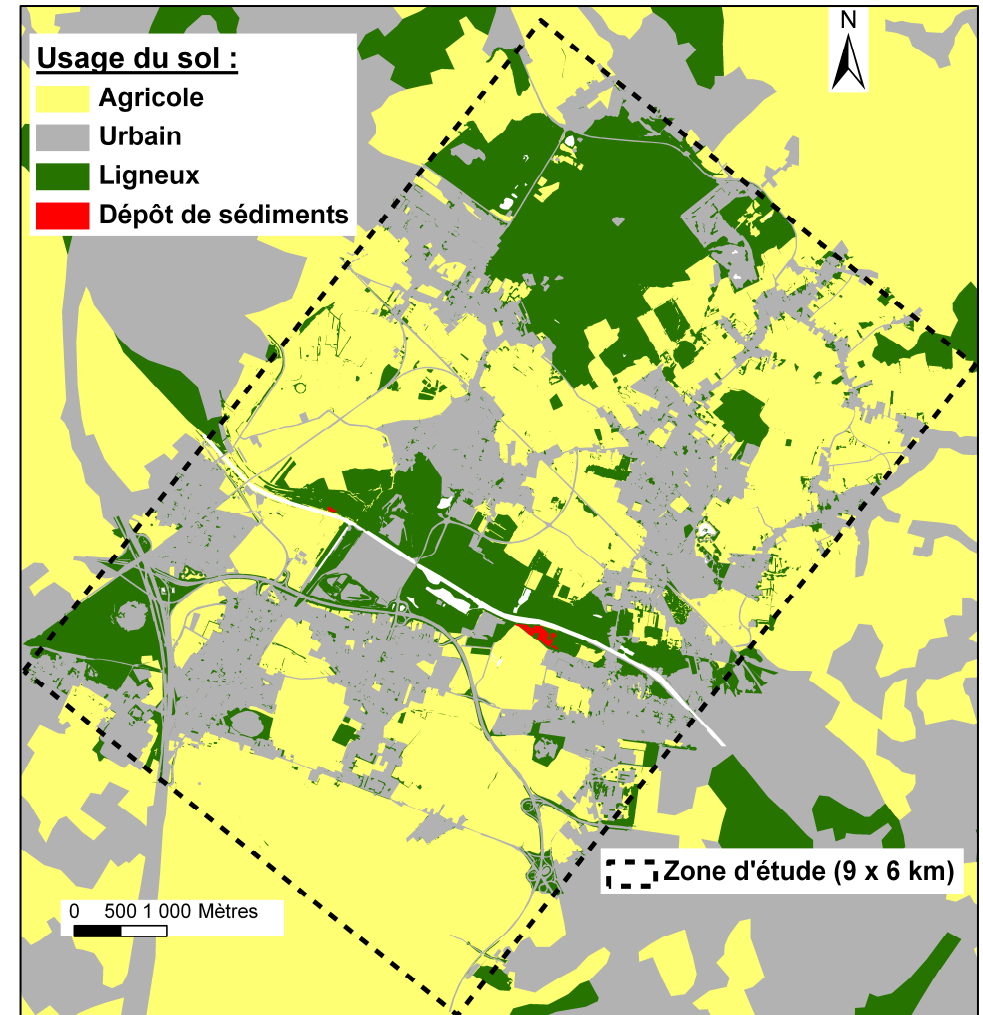


Figure II.2.3. Carte d'usage des sols sur la zone d'étude.

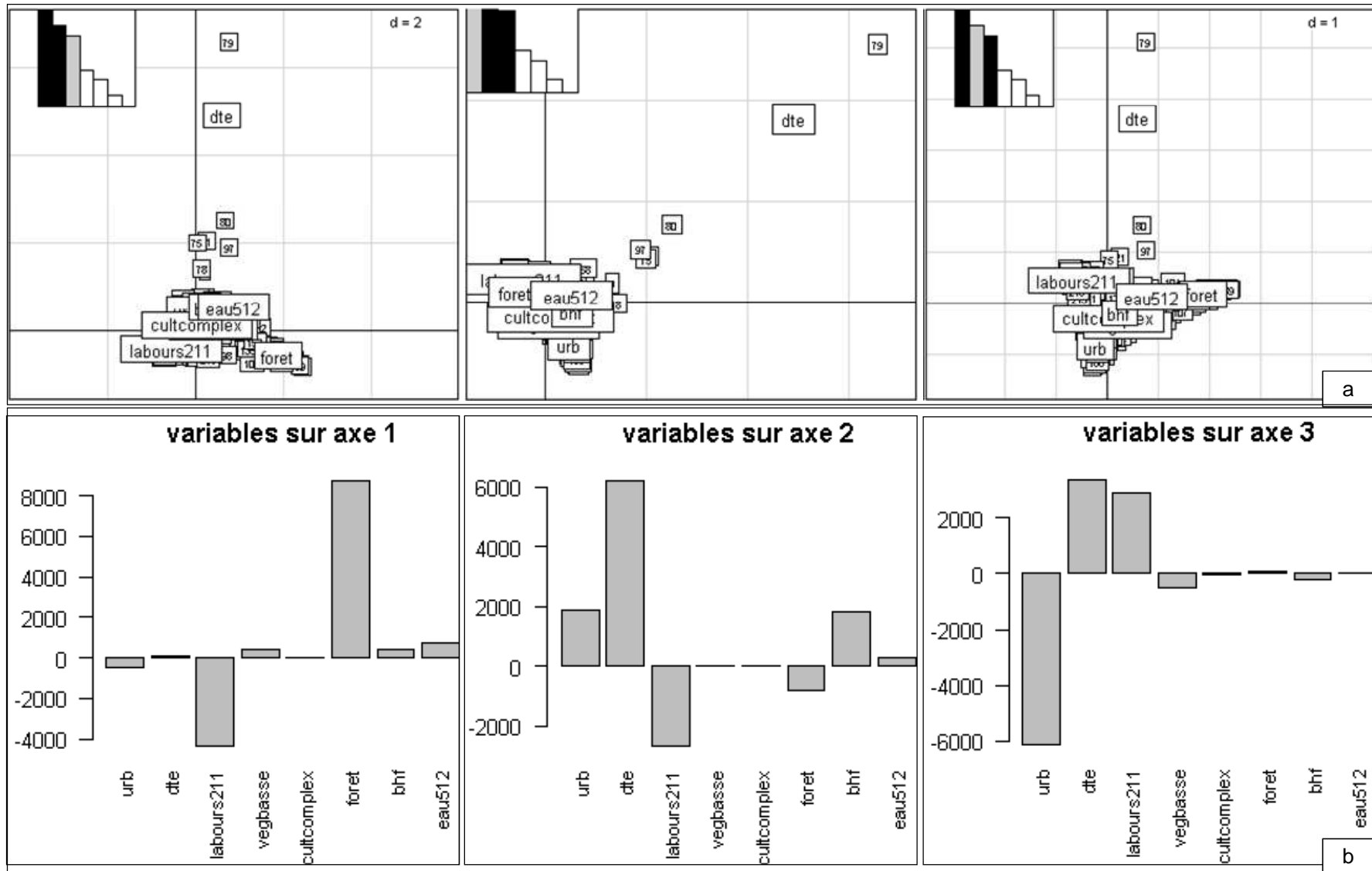
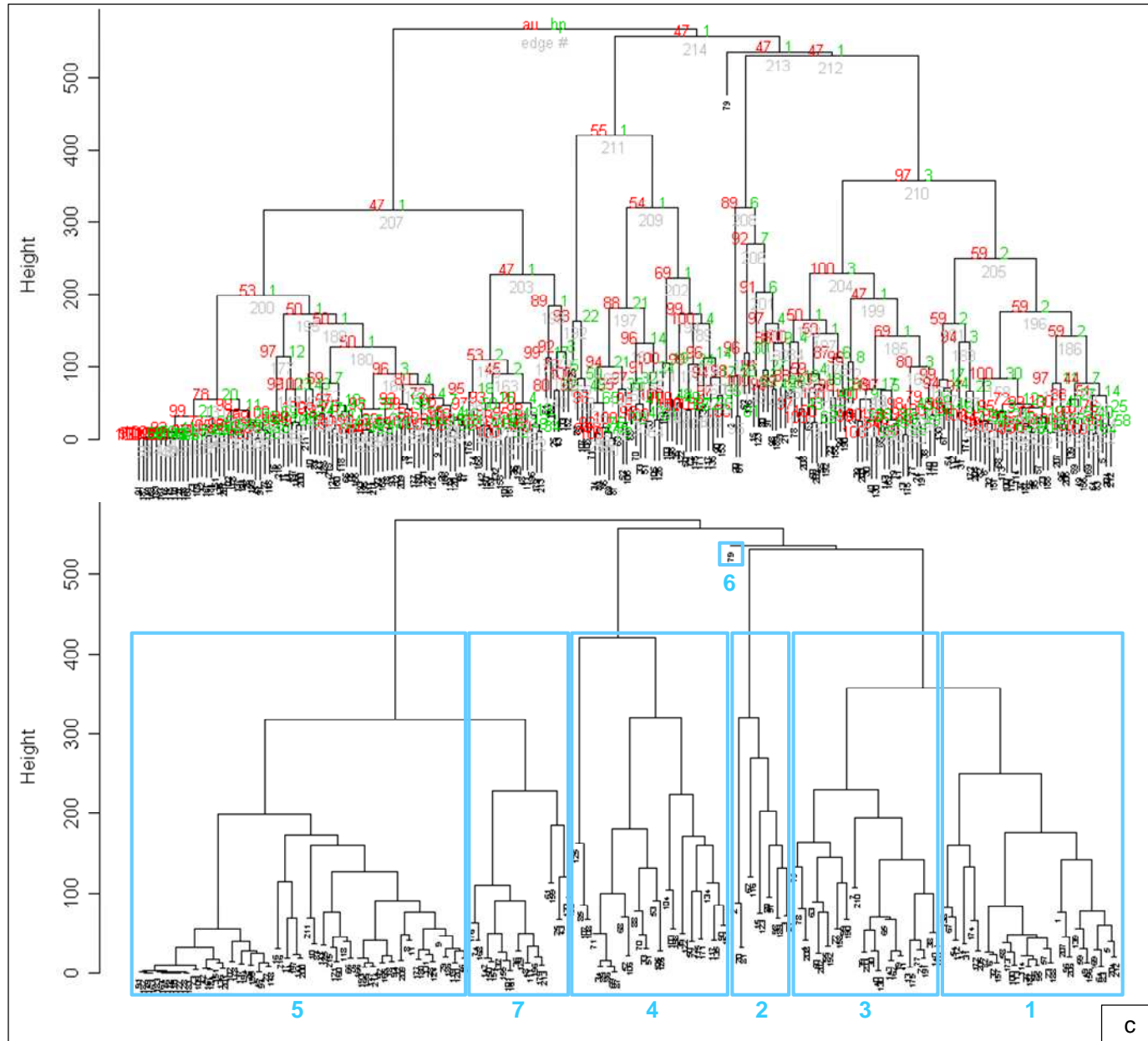


Figure II.2.4. (a) Représentation graphique de l'AFC. (b) Poids des variables sur les axes 1, 2 et 3 de l'AFC.



**Figure II.2.4. (c)** Dendrogramme issu de la classification ascendante hiérarchique (distance euclidienne, liens complets) permettant d'identifier les groupements.

En haut les probabilités d'apparition des nœuds (En rouge : valeur de probabilité « approximativement non-biaisée » obtenue par « multiscale bootstrap resampling », en %. En vert : valeur de probabilité d'un groupement, c'est-à-dire sa fréquence d'apparition lors de réplifications par « bootstrap », en %. En gris : numéro du groupement).

En bas le découpage en 7 classes de types paysagers (les numéros correspondent à ceux indiqués pour la figure II.2.5).

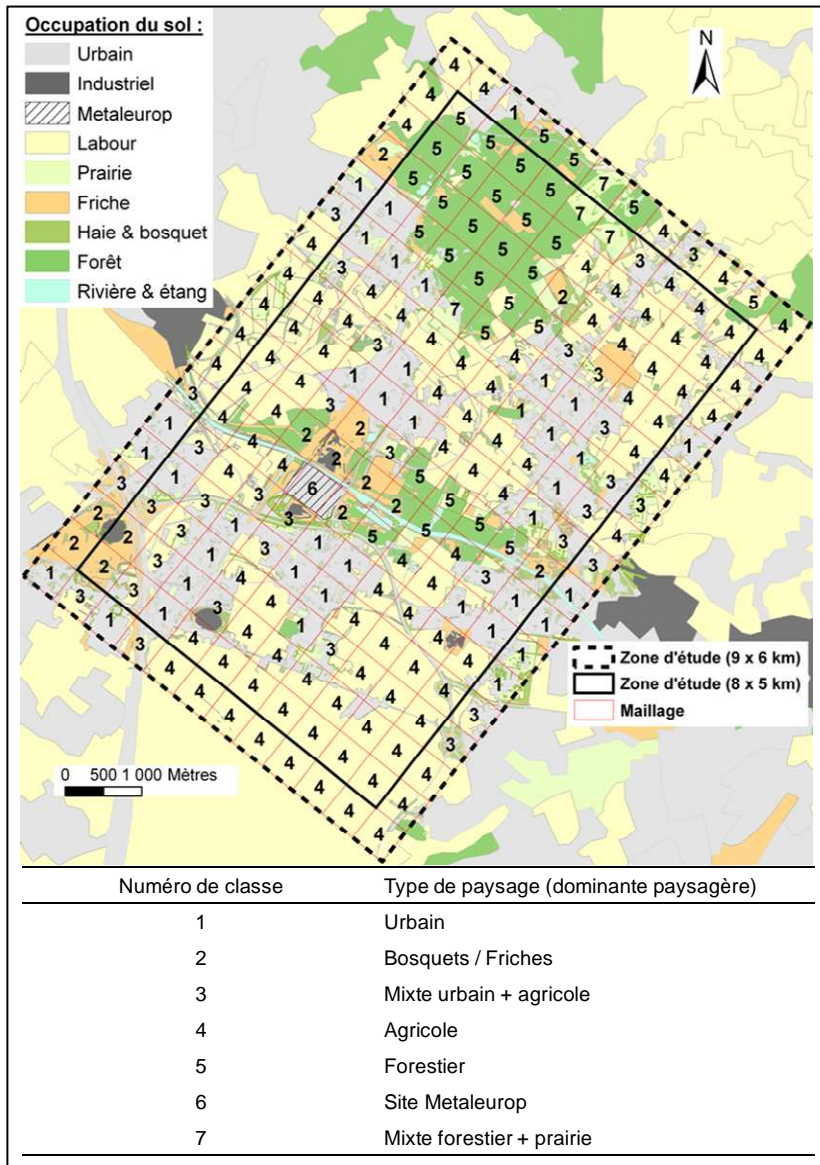


Figure II.2.5. Types paysagers des mailles de la zone d'étude.

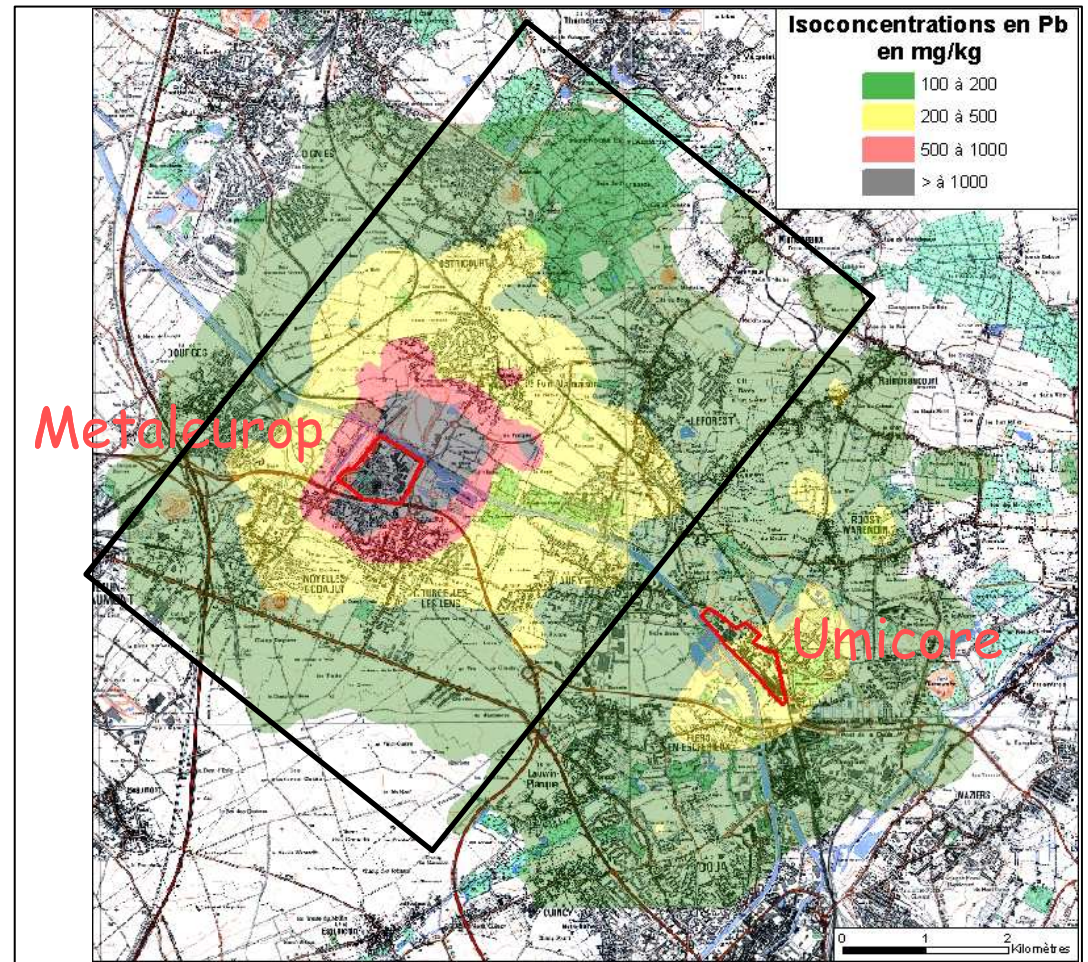


Figure II.2.6. Courbes d'iso-concentration en Pb des sols agricoles du secteur de Metaleurop (données du LSE). La zone d'étude (8 x 5 km) est indiquée par un rectangle de bordure noire.

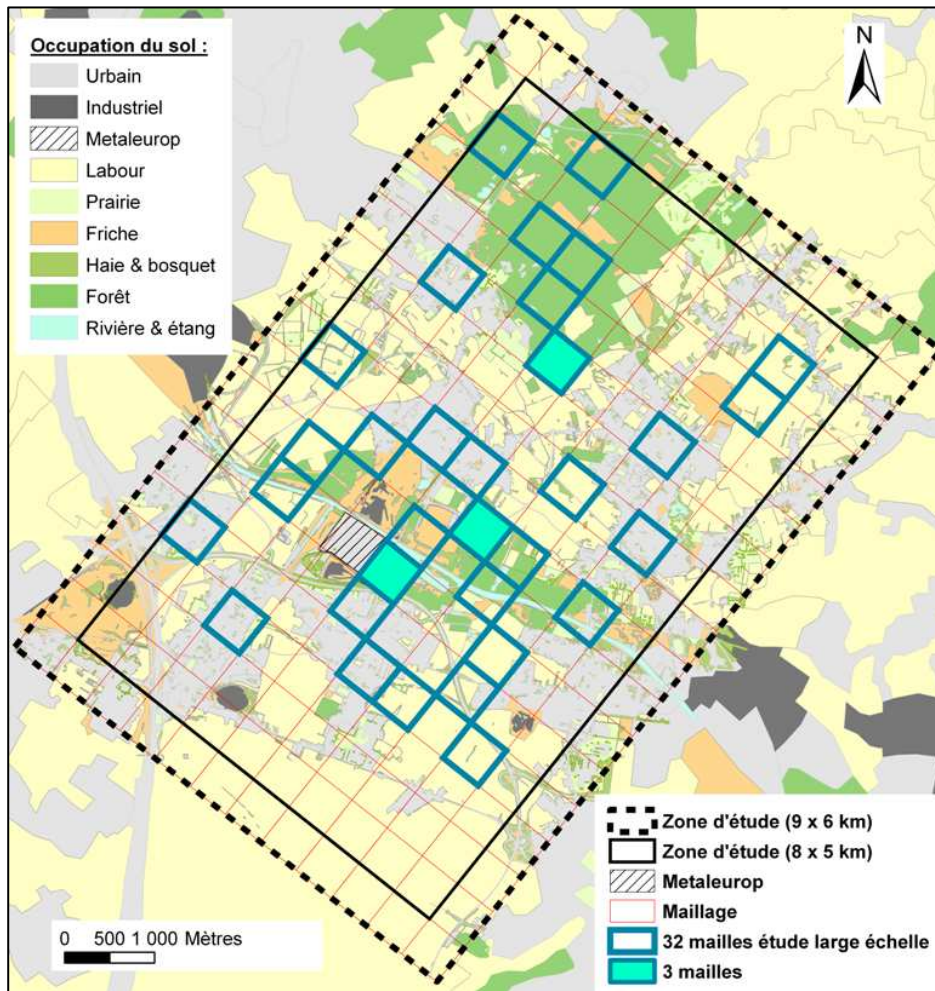


Figure II.2.7. Localisation des 32 et 3 mailles retenues.

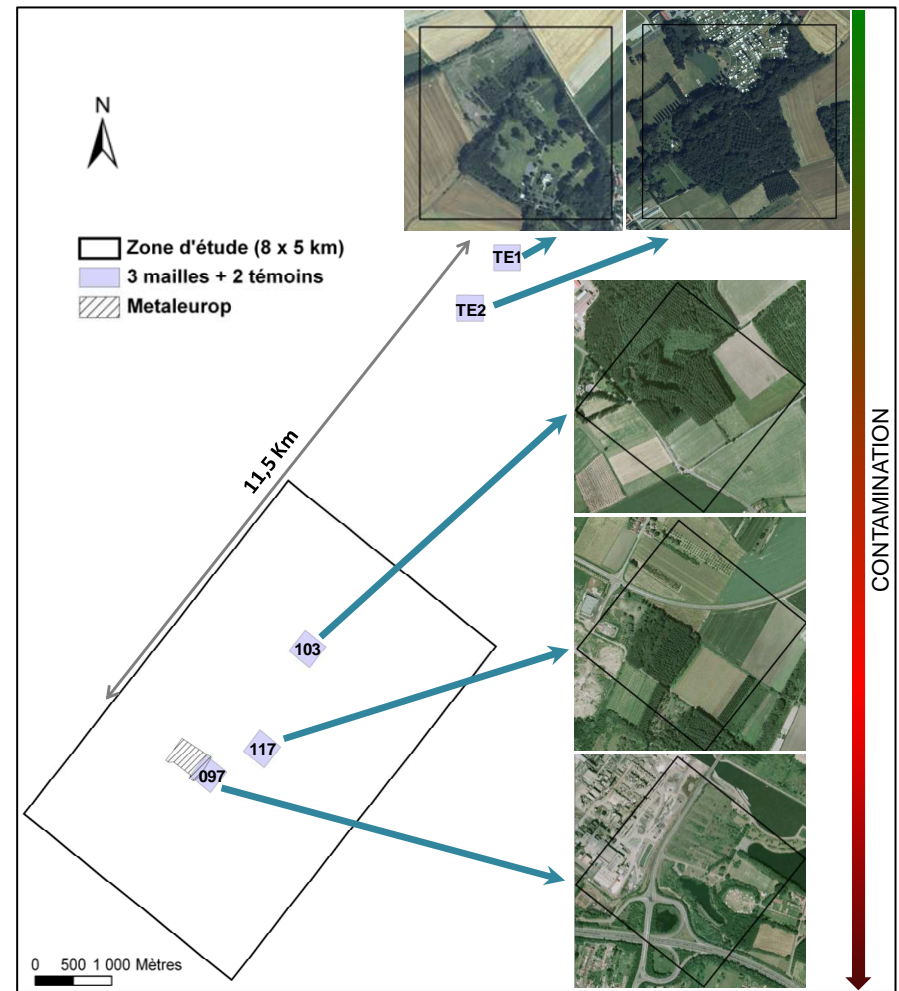


Figure II.2.8. Localisation des 3 mailles dans la zone d'échantillonnage et des 2 témoins externes et photographies aériennes.

## II.3. PROTOCOLES D'ÉCHANTILLONNAGE *IN SITU* (BIOINDICATION PASSIVE)

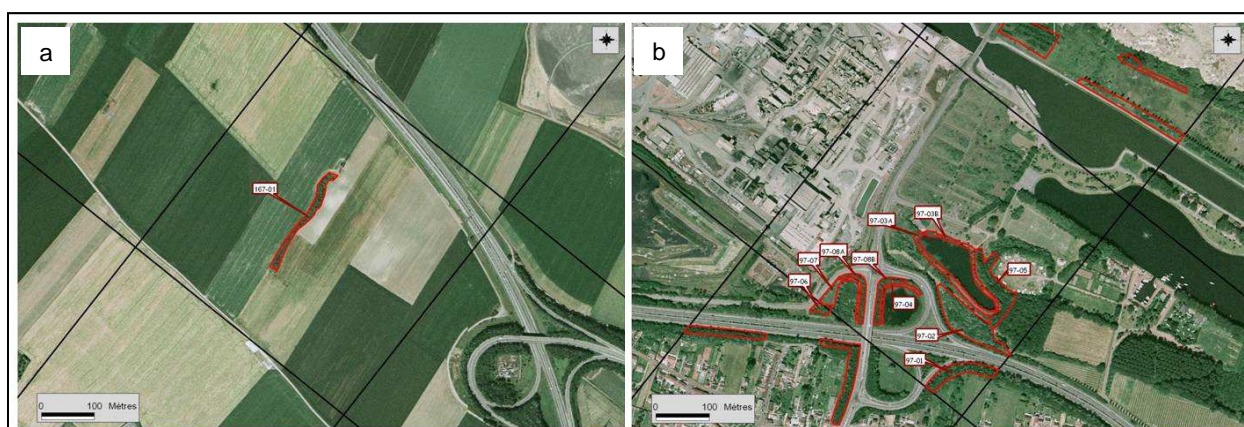
### II.3.1. Échantillonnage des sols

Deux procédures différentes ont été appliquées en termes de pression d'échantillonnage, l'une pour les 32 mailles choisies pour les prélèvements des récepteurs, l'autre pour les 128 mailles restantes.

Dans les 32 mailles retenues, il a été décidé de prendre en compte l'hétérogénéité de la contamination à l'échelle de la maille (soit 0,25 km<sup>2</sup>). Le terme « habitat ligneux » caractérise le type d'habitat ligneux considéré (haie, bosquet, forêt, plantation...) tandis que le terme « tache ligneuse » concerne la zone en elle-même, quel que soit le type d'habitat ligneux concerné. Entre 1 et 10 taches ligneuses (exemples Figure II.3.1) par maille ont fait l'objet de prélèvements de sols, leur nombre variant selon le nombre de taches ligneuses présentes et leur accessibilité. Lorsque plusieurs taches ont été considérées au sein d'une même maille, elles pouvaient appartenir à différents types d'habitat (par exemple, 3 taches, parmi lesquelles 2 haies et un bosquet) ou à un seul (par exemple, 4 taches, toutes des bosquets).

Dans les 128 mailles restantes, il a été prévu d'échantillonner une seule tache ligneuse. Cependant, 7 mailles ne possédant pas d'habitat ligneux, aucun prélèvement n'a pu être réalisé (mailles de paysage agricole, caractérisées par une agriculture céréalière intensive, situées au sud-est de la zone d'étude – n°092, 110, 128, 146, 164, 182 et 183).

Les prélèvements ont été réalisés dans des taches ligneuses homogènes, un échantillon composite (15 points sous-échantillons) a été réalisé dans chaque zone. Les sols ont été prélevés sur 20 cm de profondeur, en prélevant également l'humus et en étudiant le profil pédologique. Les zones de prélèvements ont été repérées sur photographie aérienne pour chacune des mailles et ont été cartographiés grâce à un logiciel du type « Système d'Information Géographique » (SIG, ArcGIS). Les coordonnées géographiques de chaque prélèvement composite (centre de la zone échantillonnée) ont été relevées. L'échantillonnage et la gestion des analyses des paramètres physico-chimiques et des concentrations en ETMs dans les sols ont été réalisés par le LSE.



**Figure II.3.1.** Exemple de mailles possédant une seule tache ligneuse (a : paysage type agricole) et 10 taches ligneuses (b : paysage type bosquets/friches).

## II.3.2. Echantillonnage des micromammifères

### II.3.2.a. Large échelle : 32 stations

L'échantillonnage à large échelle a été réalisé en automne (16 septembre au 21 octobre 2006). Dans les 32 mailles retenues, les micromammifères ont été échantillonnés par piégeage légal (piège tapette, Figure II.3.2) en maintenant un effort d'échantillonnage constant sur chacune des mailles. Pour ce faire, 10 transects de 10 pièges espacés de 3 m ont été posés dans les différentes taches dont les sols ont été précédemment échantillonnés (Figure II.3.3). Chaque ligne de piège a été géoréférencée en début et en fin de ligne (GPS, Etrex Garmin®). Ces pièges ont été laissés sur site 3 nuits consécutives et relevés chaque matin. Les pièges ont été appâtés avec une pâte constituée de beurre de cacahuète, de farine et d'eau. Les micromammifères capturés ont été placés dans des sacs étanches et congelés à -20°C le soir même de leur prélèvement. A chaque relevé, les pièges ont été retendus, munis d'appât frais et remplacés en cas de casse ou de disparition. Le nombre total de nuit/piège a été de 8700.

Quelques aménagements du protocole général ont dû être faits durant la réalisation de la session de capture. Ainsi, sur les 32 mailles retenues, 2 n'ont pas pu être échantillonnées : les mailles 082 (paysage urbain) et 063 n'ont pas pu faire l'objet de prélèvements, la première parce que les élus locaux ne nous ont pas permis de poser les pièges en raison de la proximité d'une école maternelle et d'un jardin d'enfants, la seconde a été écartée par manque de temps et elle représentait un 4<sup>ème</sup> réplicat du type de maille « agricole / moyennement contaminée ». Par ailleurs, les mailles 151, 157 et 167, possédant des taches ligneuses d'étendue trop restreinte, n'ont pu recevoir que 6, 7 et 6 lignes de 10 pièges, respectivement.

### II.3.2.b. Echelle fine : 3 stations et témoin externe

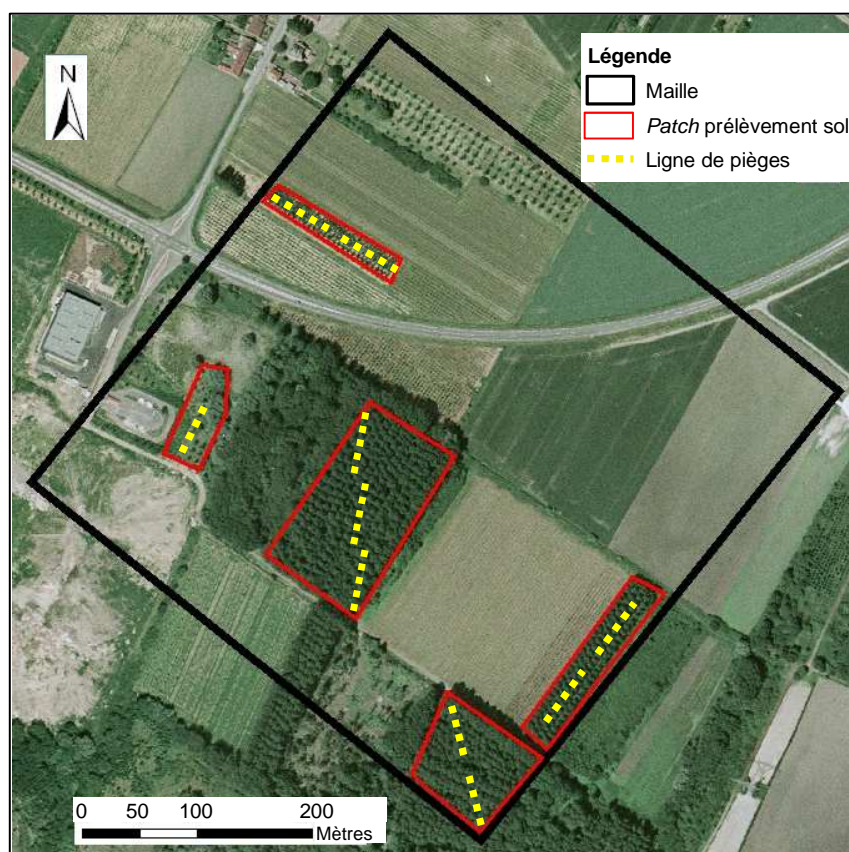
L'échantillonnage sur les 3 mailles et les témoins externes a été réalisé au printemps durant 2 années consécutives (03/04/07 au 31/05/07 et 03/04/08 au 15/05/08). La pression d'échantillonnage, la disposition des lignes et le reste du protocole ont été identiques pour toutes les sessions. Ainsi, pour les mailles échantillonnées à plusieurs reprises, à l'automne et aux 2 printemps (mailles n°097, 117 et 103), les lignes ont été placées aux mêmes endroits. Le nombre total de nuit/piège a été de 1200 chaque printemps.

De plus, des pièges de type Barber ont été ajoutés, aux mêmes emplacements que les lignes de pièges type tapette mais à raison de 3 pièges espacés de 10 m par ligne. Ils ont été laissés en place 3 nuits consécutives et relevés chaque matin. Les pièges type tapette permettent surtout la capture de rongeurs tandis que les pièges Barber, destinés à l'origine à l'échantillonnage des invertébrés marcheurs du sol, permettent de capturer des micromammifères insectivores. Pour les pièges Barber, le nombre de nuit/piège a été de 360 à chaque printemps.





**Figure II.3.2.** Pièges mis en place dans différents milieux ligneux.



**Figure II.3.3.** Exemple de disposition des 10 lignes 10 de pièges pour les micromammifères dans les taches ligneuses où les sols ont été échantillonnés (maille 117).

### II.3.3. Echantillonnage des mollusques gastéropodes

A l'automne et au printemps, les escargots ont été échantillonnés par ramassage manuel le long des transects de piégeage de micromammifères. Ainsi, lors des suivis des lignes de pièges, nous avons recherché activement les escargots présents dans la tache ligneuse concernée. Les escargots ont été placés dans des sacs étanches (groupés par tache ligneuse) et congelés à -20°C le soir même de leur prélèvement.

## II.4. PROTOCOLE D'EXPOSITION EN MICROCOSMES *IN SITU* (BIOINDICATION ACTIVE)

### II.4.1. Elevage des escargots

L'adaptation potentielle à la pollution métallique de leur environnement a été étudiée chez 2 espèces autochtones d'escargots vivant sur le site de Metaleurop Nord. Les réponses mesurées ont été l'accumulation des métaux et la condition corporelle (masse fraîche totale, taille de la coquille, masse sèche de la coquille). De plus amples détails sur cette expérimentation sont présentés dans la partie VI du présent manuscrit. Ces mesures d'accumulation des ETMs et de masse et taille (masse corporelle, taille de la coquille, masse de la coquille) chez 2 espèces d'escargots de différentes origines exposés à un gradient de contamination métallique des sols, permettent en outre d'apporter des données pour affiner l'utilisation des escargots dans le cadre d'études de bioindication active.

Des escargots adultes appartenant à l'espèce *Cantareus aspersus* (ex-*Helix aspersa*, escargot petit gris, Figure II.4.1.a) et *Cepaea nemoralis* (escargot des bois, Figure II.1.4.b) ont été prélevés aux alentours de Metaleurop (communes de Noyelles-Godault et Evin-Malmaison) et de Besançon.

L'objectif était d'obtenir des individus de première génération F1 issus de parents provenant de populations exposées (alentours Metaleurop) ou non exposées (alentours Besançon) à des contaminations environnementales en ETMs. Ces individus adultes ont ensuite été élevés dans notre laboratoire jusqu'à ce qu'ils se reproduisent (température :  $20 \pm 2$  °C, photopériode : 18h j/6h n, humidité relative : 80-90%) (Gomot-de Vaufleury and Bispo, 2000; de Vaufleury et al., 2006). Les œufs ont été prélevés et les juvéniles F1 issus ont été élevés jusqu'à ce qu'ils atteignent une masse de 6 g ( $5,986 \pm 0,326$  g) environ pour *C. aspersus* et 2 g ( $1,873 \pm 0,174$  g) pour *C. nemoralis* (Figure II.4.2 a à d). Les animaux ont été nourris avec de l'aliment pour escargot non contaminé en ETMs (Helixal®, Chays frères, Valdahon, France, contenant  $0,29 \pm 0,01$   $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  masse sèche (ms) de Cd,  $0,19 \pm 0,10$   $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  ms de Pb et  $98,99 \pm 12,82$   $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  ms de Zn,  $n = 5$ , mesures effectuées par nos soins). Ces individus de F1, naïfs en termes d'exposition à des ETMs puisqu'élevés en laboratoire, mais issus de parents exposés ou non ont été utilisés pour une expérimentation de bioindication active (encagement *in situ*).

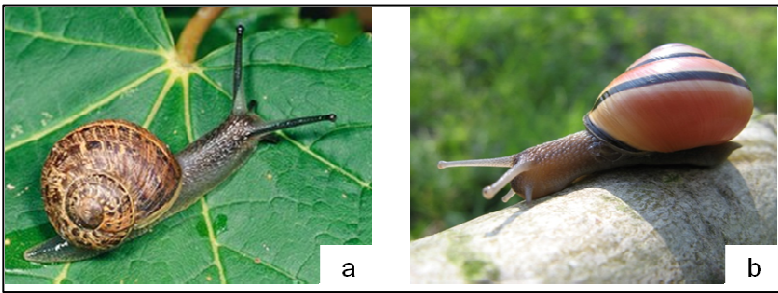
### II.4.2. Exposition *in situ*

Les escargots ont été exposés en microcosmes (cylindres en acier inoxydable, 25 cm de diamètre, 25 cm de hauteur). Les microcosmes ont été placés sur le sol de manière à ce que les escargots puissent avoir accès à de la nourriture présente sur le site (sol, litière, végétation naturelle poussant dans le microcosme). Des morceaux de tuile ont été ajoutés afin de maintenir des abris frais et humides dans l'enceinte du microcosme et un grillage a été ajusté au dessus du microcosme afin d'empêcher la fuite des escargots d'une part et leur prédation d'autre part (Figure II.4.3). Ce dispositif d'exposition a été développé par les membres de l'équipe du LCE et a montré

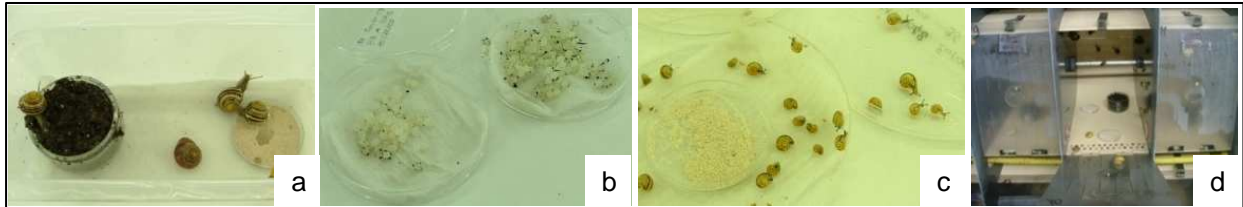
son efficacité dans les expérimentations en bioindication active avec des escargots, tant en laboratoire que sur le terrain (Scheifler et al., 2003a; Scheifler et al., 2006b; Fritsch et al., 2008; Gimbert et al., 2008b). Il permet en effet d'exposer ces animaux dans un dispositif convenant à la survie et à la croissance des escargots durant des périodes relativement longues (plusieurs semaines) et constitue un dispositif écologiquement représentatif puisque les animaux sont exposés comme lors de leur vie sauvage (voies pulmonaire, tégumentaire et digestive) et se nourrissent des végétaux et du sol présents sur le site.

Les escargots ont été exposés *in situ* sur site témoin et contaminé. Nous avons retenu, parmi les mailles choisies pour les études à petite échelle, la maille témoin externe (TE2) et la maille la plus contaminée (097). Sur la maille témoin, tous les microcosmes ont été placés à un seul endroit tandis qu'ils ont été utilisés dans 3 stations (DZ, E1 et E2) sur la maille 097 (Figure II.4.4). Pour des raisons de facilité de compréhension de la nomenclature des sites hors contexte de la thèse, les stations ont été renommées dans le chapitre VI : TE2=R, DZ=P1, E1=P3 et E2=P2. Les 3 stations de la maille 097 montrent des contaminations des sols croissantes, permettant ainsi d'étudier 4 stations avec des sols présentant un gradient de contamination des sols mais des caractéristiques physico-chimiques comparables.

L'encagement a eu lieu au mois de mai 2008. Les animaux introduits dans les microcosmes ont été prélevés à 0, 3, 7, 14 et 28 jours (en fin d'expérimentation à 28 jours tous les individus restants ont été prélevés) de manière à étudier la cinétique d'accumulation des ETMs au cours de l'exposition.



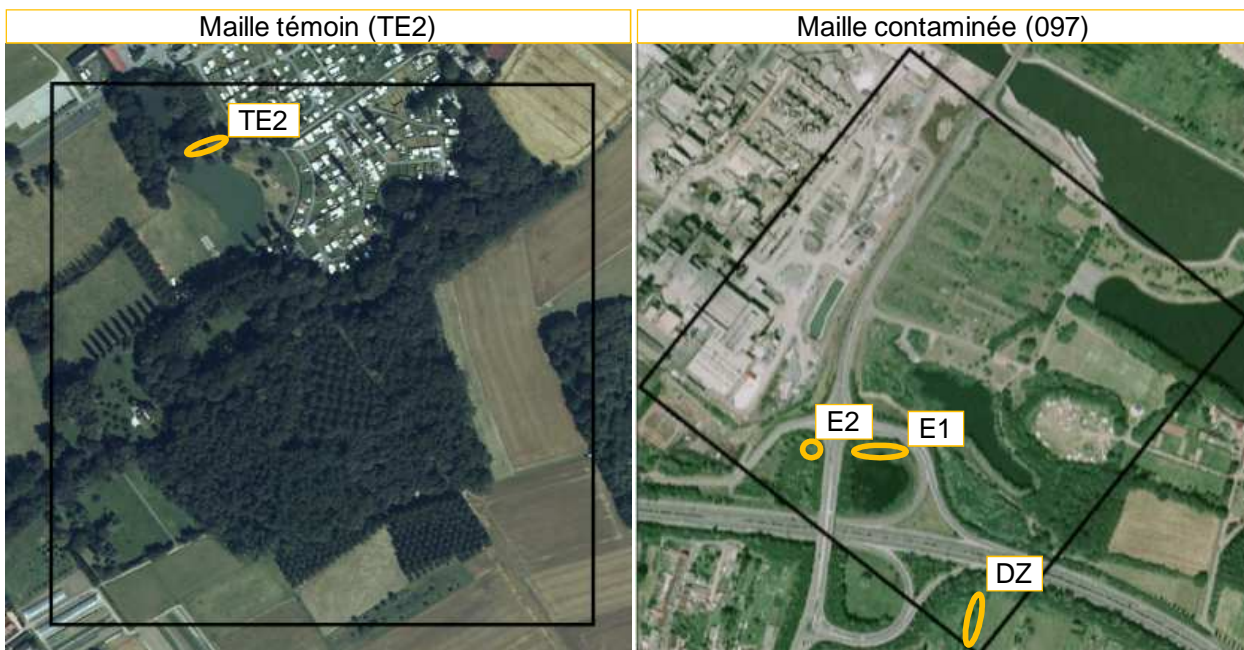
**Figure II.4.1.** Photographie des espèces étudiées. (a). Adulte de l'espèce *Cantareus aspersus* (ex-*Helix aspersa*) l'escargot petit-gris. (b). Adulte de l'espèce *Cepaea nemoralis* l'escargot des bois. (Source : ARKive [www.arkive.org/](http://www.arkive.org/) pour *C. aspersus* et Thomas Schneider pour *C. nemoralis*).



**Figure II.4.2.** (a). Elevage des adultes pour la reproduction. (b). Prélèvements des pontes. (c). Eclosion des pontes. (d). Elevage des juvéniles.



**Figure II.4.3.** (a). Introduction des escargots dans un microcosme. (b). Microcosmes mis en place.



**Figure II.4.4.** Localisation des microcosmes sur les mailles témoin et contaminée. Les ellipses de couleur orange montrent l'emplacement des microcosmes.

---

## II.5. PROTOCOLES D'ANALYSE EN LABORATOIRE

---

### II.5.1. Identification à l'espèce

Les animaux ont été identifiés à l'espèce principalement sur des critères morphométriques. Concernant les micromammifères, différents paramètres généraux (structure du corps, taille des yeux et oreilles, couleur...) et morphométriques (taille, poids) et surtout les caractéristiques dentaires ont permis l'identification spécifique des individus (Chaline et al., 1974; Charissou, 1999; Le Louarn et al., 2003; Lugon-Moulin, 2003). Concernant le genre *Apodemus* (mulots forestiers) le protocole d'identification sur critères morphométriques et morphologiques dentaires n'est pas fiable pour une précision spécifique. Bien que la limite Nord de l'aire de distribution connue d'*A. flavicollis* semble plus au sud de la zone d'étude, la présence de cette espèce ne peut pas être complètement exclue en l'état actuel des connaissances (J-P Quéré, com.pers.). Pour les quatre individus les plus lourds (plus de 30 grammes, à l'exclusion des femelles gestantes), des analyses génétiques ont été réalisées, permettant l'identification à l'espèce pour confirmation (la limite supérieure du poids d'*A. sylvaticus* voisine les 30 grammes, celle d'*A. flavicollis* voisine les 45 grammes). L'extraction de l'ADN a été réalisée au Centre de Biologie et de Gestion des Populations (Montferrier-sur-Lez, France), et l'amplification et l'analyse des marqueurs au laboratoire MacroGen (Séoul, Corée). Les 4 individus identifiés par analyse génétique sont 4 *A. sylvaticus*, ce qui exclu donc très probablement la présence d'*A. flavicollis* dans notre échantillon.

Les escargots ont été identifiés à l'espèce sur la base de critères morphologiques de la coquille et du corps et, pour les espèces du genre *Cepaea*, sur les caractéristiques des organes sexuels (Pfleger, 1989; Kerney and Cameron, 2006). La détermination spécifique des escargots a été réalisée avec l'aide d'Elie Dhivert, au cours de son stage de Master 1 et par la suite en tant que technicien contractuel.

### II.5.2. Dissections

Concernant les escargots, les tissus mous ont été séparés des coquilles puis ont été séchés jusqu'à masse constante (étuve, 70°C) et conservés au sec jusqu'à l'analyse des métaux.

Concernant les micromammifères, les animaux ont été disséqués, sexés, plusieurs paramètres de masse et de taille ont été mesurés et certains organes prélevés pour différentes analyses (Tableau II.5.1). Plusieurs organes ont été prélevés afin de mesurer les concentrations internes en ETMs dans des organes d'accumulation (foie, reins) ou pour d'autres analyses (régime alimentaire et concentrations en ETMs dans les contenus stomacaux). Les foies et reins ont été séchés jusqu'à masse constante (étuve, 70°C) et conservés au sec jusqu'à l'analyse des métaux dans les tissus. Le protocole a été modifié pour les échantillons de printemps 2007 afin de doser les teneurs en métallothionéines des organes, qui ont été lyophilisés puis broyés au lieu d'être séchés à l'étuve et conservés en dessiccateur jusqu'à analyse des MTs et ETMs (les détails des analyses des teneurs en MTs sont précisés dans la section « Matériels et Méthodes » du chapitre

3 qui présente cette partie de l'étude).

**Tableau II.5.1.** Paramètres relevés lors des dissections des micromammifères.

Paramètres externes	Paramètres internes	Organes prélevés et mesures
Présence/absence de parasites externes	Sexe et : Femelles : présence/absence d'embryons, de cicatrices placentaires et diamètre de l'utérus	Tube digestif : masse fraîche (+ régime alimentaire : sous – échantillonnage des individus dans le cadre de stages de Master)
Présence/absence de mamelles	Mâles : taille et masse des testicules, masse des vésicules séminales	Foie : masse fraîche et dosage des ETMs
Longueur de la patte arrière gauche	Présence/absence de parasites internes	Reins : masse fraîche et dosage des ETMs
Longueur du corps	Présence/absence d'anomalie de l'aspect de la rate et masse fraîche	
Poids corporel (masses fraîche)	Masse fraîche des tissus adipeux sous-cutanés des cuisses	
Masse sèche du cristallin (rongeurs uniquement)		

L'âge des animaux a été estimé par pesée des cristallins et évaluation de l'âge relatif en 3 classes d'âge. Chez les rongeurs, les cristallins ont été prélevés, fixés dans du formaldéhyde, séchés puis pesés (au 0,0001 g près). Cette mesure permet en effet d'estimer l'âge chez les rongeurs, et a été développée concernant le Mulot sylvestre et le Campagnol roussâtre (Kozakiewicz, 1976; Vandorpe and Verhagen, 1980; Delattre et al., 1988; Klevezal, 1996). Pour les musaraignes (et ceci a également été fait en parallèle chez les rongeurs, certaines analyses requérant des données estimées de la même manière chez les 2 groupes) l'âge relatif a été évalué en se basant sur la taille, le poids corporel et le statut reproducteur (3 classes : juvéniles, adultes non-reproducteurs et adultes reproducteurs).

Différents indices de condition corporelle et somatiques ont été mesurés sur les animaux capturés. Lors de la dissection des animaux, les paramètres suivants ont été mesurés : longueur de la patte arrière gauche (au 0,1 mm près, indice de taille), et masse totale du corps, de l'appareil digestif, du foie, des reins, de la rate, des embryons et des tissus adipeux sous-cutanés des cuisses (au 0,001 g près) (Tableau II.5.1). Les indices suivants ont été calculés : indice de condition corporelle (ICC, basé sur la masse corporelle), indice hépatique (IH, basé sur la masse du foie), indice rénal (IR, basé sur la masse des reins), indice immunitaire (II, basé sur la masse de la rate) et indice d'adiposité (IA, basé sur la masse des tissus adipeux) (Ma, 1989; Møller et al., 1998; Green, 2001; Schulte-Hostedde et al., 2001; Norrdahl et al., 2004; Schulte-Hostedde et al., 2005). Le calcul des indices a été réalisé sur la base de modèles linéaires généralisés, chacun des indices est la masse du corps ou d'un organe normalisée sur l'indice de taille (pour la masse du corps) ou sur la masse du corps (après soustraction de la masse du tractus digestif et des embryons, pour la masse des organes), de l'âge et du sexe. Ce calcul permet de considérer si un individu est plutôt lourd/léger par rapport à sa taille, son âge et son sexe, et si un organe est plutôt

lourd/léger au regard de la masse de l'individu, de son âge et de son sexe.

### II.5.3. Analyses des sols

La gestion des analyses a été assurée par les membres du LSE concernant les sols de l'échantillonnage à large échelle. Les analyses des teneurs en ETMs dans les sols ainsi que les paramètres pédologiques ont été réalisées au Laboratoire d'Analyse des Sols d'Arras (INRA). Les extractions d'ETMs au  $\text{CaCl}_2$  et les mesures des concentrations en métaux extractibles ont été réalisées par le LSE pour les sols du secteur à large échelle et par le Laboratoire d'Analyse des Sols d'Arras pour les sols des microcosmes *in situ*. Le détail des analyses est donné dans les sections « Matériels et Méthodes » des chapitres de la thèse.

### II.5.4. Dosage des ETMs dans les matrices biologiques

Les analyses des teneurs en ETMs dans les matrices biologiques ont été réalisées au LCE. Les échantillons secs de matrices animales ont été minéralisés par minéralisation acide à l'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ). Les échantillons de matrices végétales ont été minéralisés par minéralisation acide en utilisant de l'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) et du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Nous avons procédé à des essais de techniques de minéralisation en comparant les minéralisations au micro-onde et à l'étuve. Les pourcentages de recouvrement des matériaux de référence par rapport aux valeurs certifiées étaient légèrement meilleurs pour les minéralisations à l'étuve qu'au micro-onde, notamment pour les matrices animales, et les valeurs dans les échantillons de terrain extrêmement proches entre les 2 méthodes. Nous avons donc choisi de minéraliser à l'étuve (70°C, 72h), ce qui permet la digestion d'un plus grand nombre d'échantillons. Les teneurs en ETMs ont été mesurées par spectrométrie d'absorption atomique (AAS) four (Cd, Pb) et flamme (Zn) (VARIAN, four : 220Z et 240Z, flamme : 220FS et 240FS). Des vérifications métrologiques ont été réalisées tout au long des dosages (blancs, matériaux de référence certifiés, répétitions de mesures...). Les informations principales (limites de détection, valeurs de recouvrement des matériaux de référence...) sur le déroulement des dosages d'ETMs sont données dans les sections « Matériels et Méthodes » des chapitres du présent manuscrit.

---

## II.6. CARTOGRAPHIE DES CONTAMINATIONS DES SOLS : PREDICTION DES CONCENTRATIONS EN ETMs DANS LES SOLS

---

La présente partie a pour objectif de présenter succinctement les démarches de prédiction des concentrations en ETMs dans les sols et les cartes associées. En effet, ces deux parties ont été séparées lors du déroulement de la thèse afin de répondre aux objectifs scientifiques des chapitres. Ces cartes représentent donc à la fois des résultats, mais aussi le matériel à la base d'analyses plus poussées. Dans chacun des cas, les analyses développées sur les données de contamination des sols se sont appuyées sur le traitement géostatistique des données. Dans le premier cas, pour déterminer quelles variables environnementales et pédologiques expliquent la distribution spatiale des concentrations totales et extractibles dans les sols ligneux, dans le second cas pour rechercher à quelle échelle les concentrations internes en ETMs dans les organismes sont le mieux corrélées aux concentrations totales en ETMs dans les sols.

Nous avons donc choisi de présenter les cartes de prédiction de manière conjointe ici, afin d'éviter d'éventuelles ambiguïtés sur l'utilisation des données de contamination des sols dans les chapitres des résultats, et afin de présenter de manière homogène et comparable les deux parties concernant les cartographies des teneurs en ETMs dans les sols.

Des précisions sur les méthodes d'interpolation spatiale employées sont donc données dans les parties dédiées des chapitres 1 (sols ligneux) et 2 (tous types d'usage du sol).

### II.6.1. Données disponibles

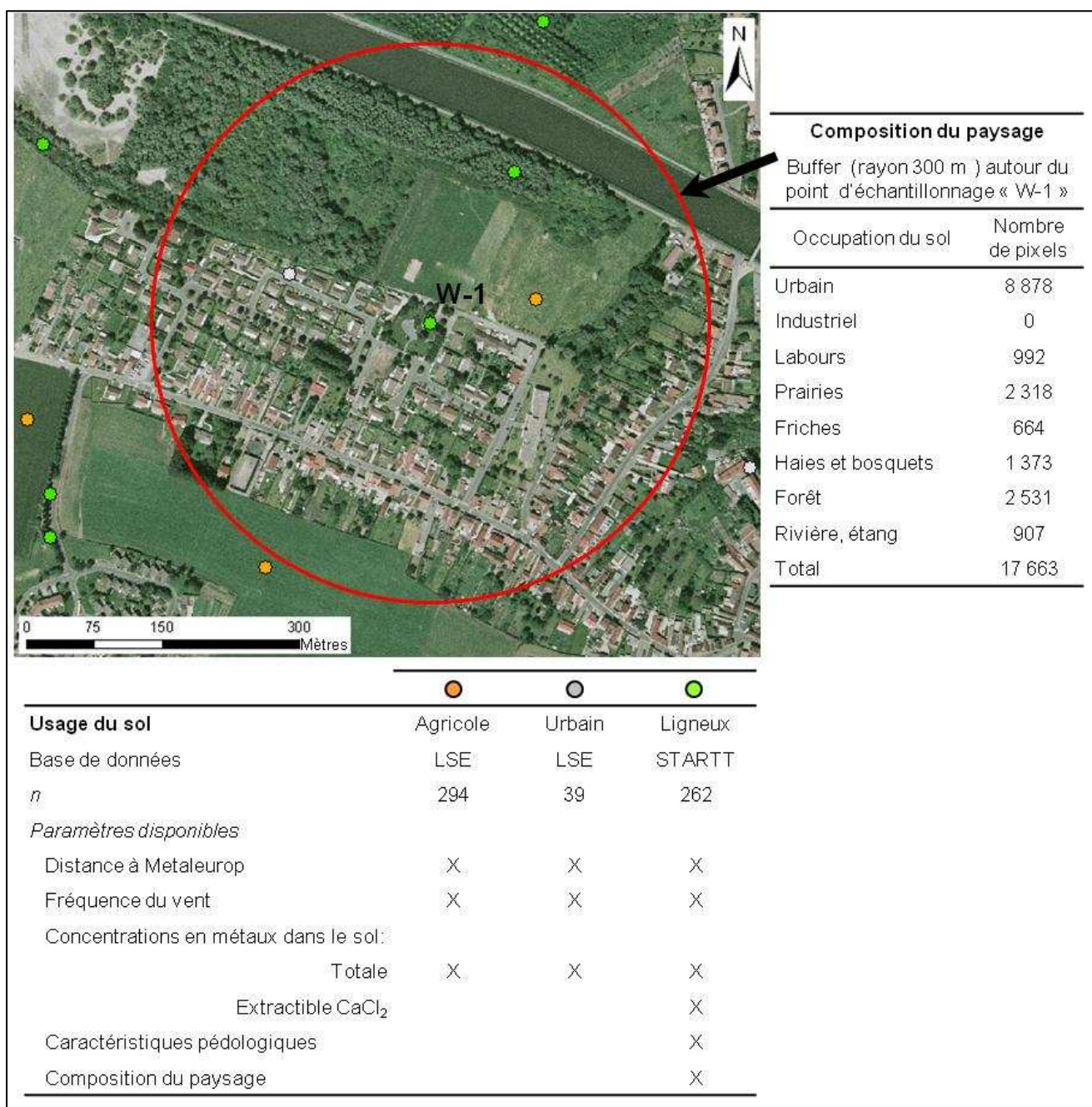
Les concentrations dans les sols disponibles pour étudier et prédire les distributions spatiales des contaminations des sols proviennent du programme STARTT (sols ligneux) et de la base de données développées par le LSE (sols agricoles et urbains). Concernant les données du LSE, seules les concentrations totales étaient disponibles, alors que pour les données obtenues dans le cadre de STARTT, nous disposons des concentrations totales, extractibles ( $\text{CaCl}_2$ ), des caractéristiques pédologiques et de la composition paysagère (Figure II.6.1). Pour chacun des points, nous avons calculé la distance à Metaleurop (distance euclidienne) et la fréquence du vent affectant le point (d'après les données de Météo-France) (Figure II.6.1).

### II.6.2. Analyse de la composition paysagère

La composition paysagère a été déterminée pour les sols ligneux puisque cette variable a été utilisée dans le premier chapitre, afin d'étudier l'influence du paysage sur les concentrations en ETMs totales et extractibles dans les sols. La composition du paysage a été déterminée en utilisant des *buffers* (cercle « tampon » au sein duquel l'information recherchée est extraite) de taille croissante autour de chaque point de prélèvement : le nombre de pixel pour chacune des classes d'occupation du sol a été calculé à chaque taille de *buffer* (Figure II.6.1). Ce calcul a été réalisé au moyen du logiciel GRASS GIS 6.0 (GRASS Development Team, 2008). Chaque point était donc caractérisé par plusieurs variables liées au paysage : le type d'usage du sol (type



d'occupation du sol du point lui-même : agricole, urbain ou ligneux) et la composition du paysage (nombre de pixels des différentes classes d'occupation du sol à plusieurs surfaces autour du point).



**Figure II.6.1.** Données disponibles pour les points d'échantillonnage de sol. Exemple d'un point (W-1) ligneux dans un paysage dominé par le milieu urbain dans un périmètre de 300 m.

### II.6.3. Prédiction des concentrations totales et extractibles dans les sols ligneux : variographie et interpolation par krigeage ordinaire

L'auto-corrélation spatiale des concentrations totales et extractibles a été étudiée au moyen de variogrammes omnidirectionnels empiriques et d'enveloppes variographiques (Webster and Oliver, 2001; Bivand et al., 2008). Des modèles ont été ajustés sur les variogrammes afin de prendre en compte de l'auto-corrélation spatiale lors des interpolations (Webster and Oliver, 2001;

Bivand et al., 2008). Ces modèles ont été choisis sur la base de leur ajustement aux données (méthode des moindres carrés pondérés) et des critères de validation croisée (Webster and Oliver, 2001; Bivand et al., 2008). Un krigeage ordinaire a été employé pour prédire les concentrations en ETMs dans les sols (Matheron, 1970; Cressie, 1988; Webster and Oliver, 2001; Bivand et al., 2008). Il faut noter que dans cette partie, un point particulier, échantillonné non pas dans un sol mais dans un dépôt de boues de curage de la Deûle et présentant des valeurs extrêmement élevées au regard de la distribution des données de contamination a été retiré de l'analyse. Ce point est représenté sur les cartes pour montrer sa localisation et sa contamination mais il n'a pas fait l'objet de prédiction.

La distance moyenne entre les couples de points voisins étant de 205 m, la distance entre les points de la grille régulière de prédiction a été fixé à 200 m. Les analyses ont été réalisées grâce au logiciel R 2.7.1 (R Development Core Team, 2006), en ajoutant les bibliothèques suivantes : `pgirmess`, `maptools`, `geoR` et `gstat`.

#### **II.6.4. Prédiction des concentrations totales pour tous types de sols : variographie et interpolation par krigeage universel**

Nous avons en premier lieu étudié si les concentrations totales différaient selon la distance à Metaleurop, la fréquence du vent et le type de sol. Ces 3 variables expliquant les teneurs en ETMs dans les sols, nous les avons intégrées dans un modèle linéaire général. Ce modèle a été utilisé pour l'interpolation par krigeage universel afin de tenir compte des différences dues aux variables identifiées. En effet, le krigeage universel permet de prédire des données non stationnaires par la définition d'une dérive externe. Le modèle a alors 2 composantes : la première étant le terme de la dérive externe, la seconde étant la variable spatiale aléatoire (Matheron, 1969; Webster and Oliver, 2001; Bivand et al., 2008). L'auto-corrélation spatiale des concentrations totales a été étudiée au moyen de variogrammes omnidirectionnels empiriques et d'enveloppes variographiques en tenant compte de la dérive externe (variogrammes sur les résidus des modèles définis avant). Des modèles ont été ajustés sur les variogrammes de la même manière que décrite dans le paragraphe précédent pour les sols ligneux. Un krigeage universel a été appliqué pour prédire les concentrations totales en ETMs dans les sols. Dans cette analyse, il a été possible de conserver le point particulier très contaminé du dépôt de boues de curage puisque le modèle de dérive externe permettait de tenir compte du type de sol (agricole, urbain, ligneux, sédiment). Il est donc pris en compte dans les prédictions et n'est pas représenté à part.

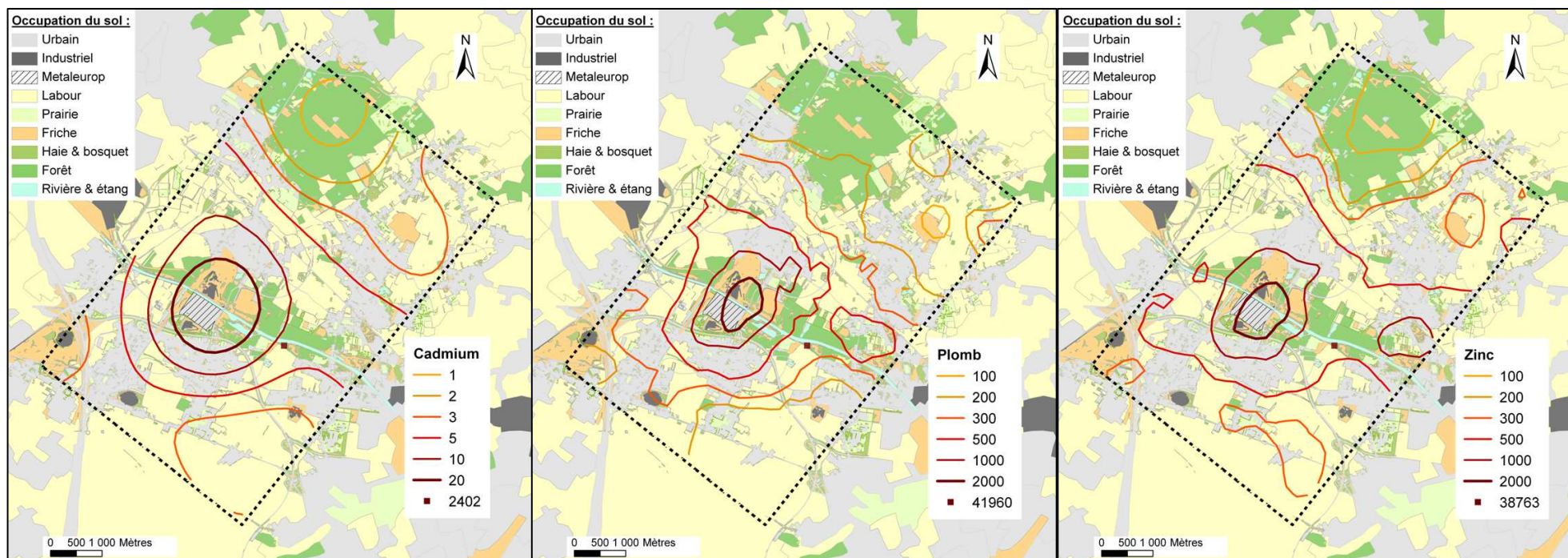
La distance moyenne entre les couples de points voisins étant de 112 m, la distance entre les points de la grille régulière de prédiction a été fixée à 100 m. Les analyses ont été réalisées grâce au logiciel R 2.7.1 (R Development Core Team, 2006), en ajoutant les bibliothèques suivantes : `pgirmess`, `maptools`, `geoR` et `gstat`.

### **II.6.5. Cartes prédites des concentrations en ETMs dans les sols**

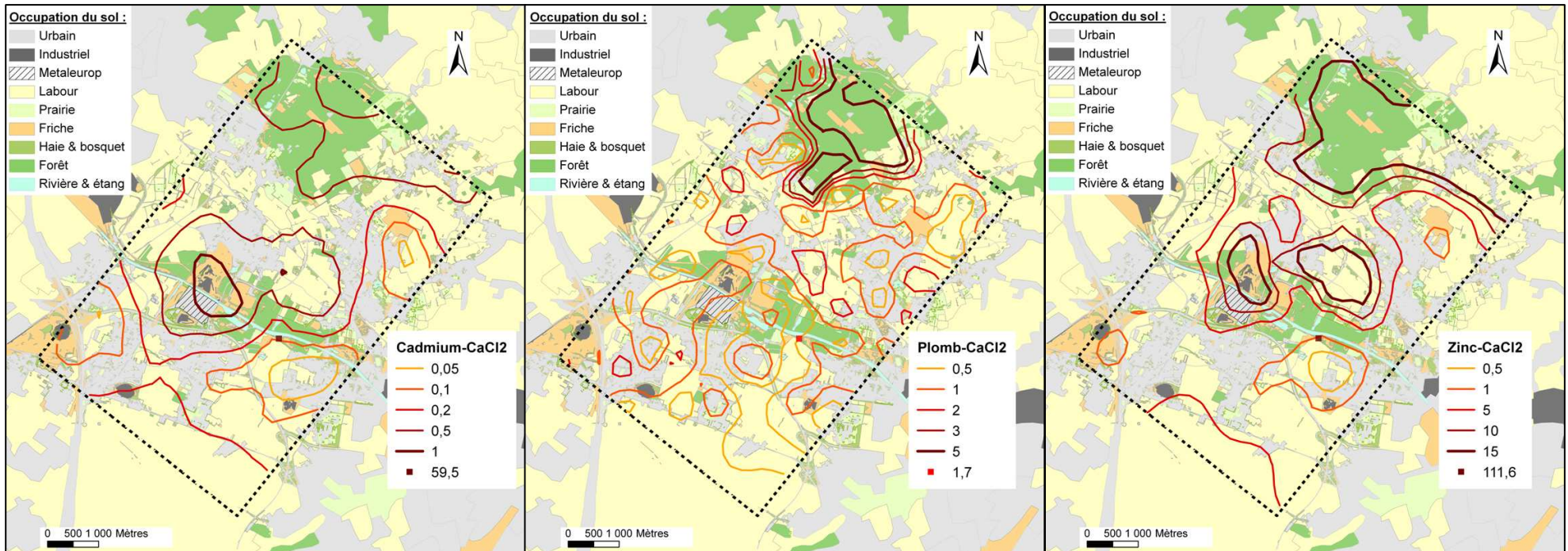
Les cartes de prédiction ont été produites sur la bases des données prédites dans R (exportées sous-formes de courbes d'iso-concentration et de surfaces d'iso-concentration) et mises en formes grâce aux logiciels ArcGIS 9.0 et QuantumGIS 1.0.

Deux types de représentations graphiques, apportant des visualisations complémentaires des informations sont présentées ci-après : représentation des contaminations par des courbes d'iso-concentration ou par des surfaces d'iso-concentration.

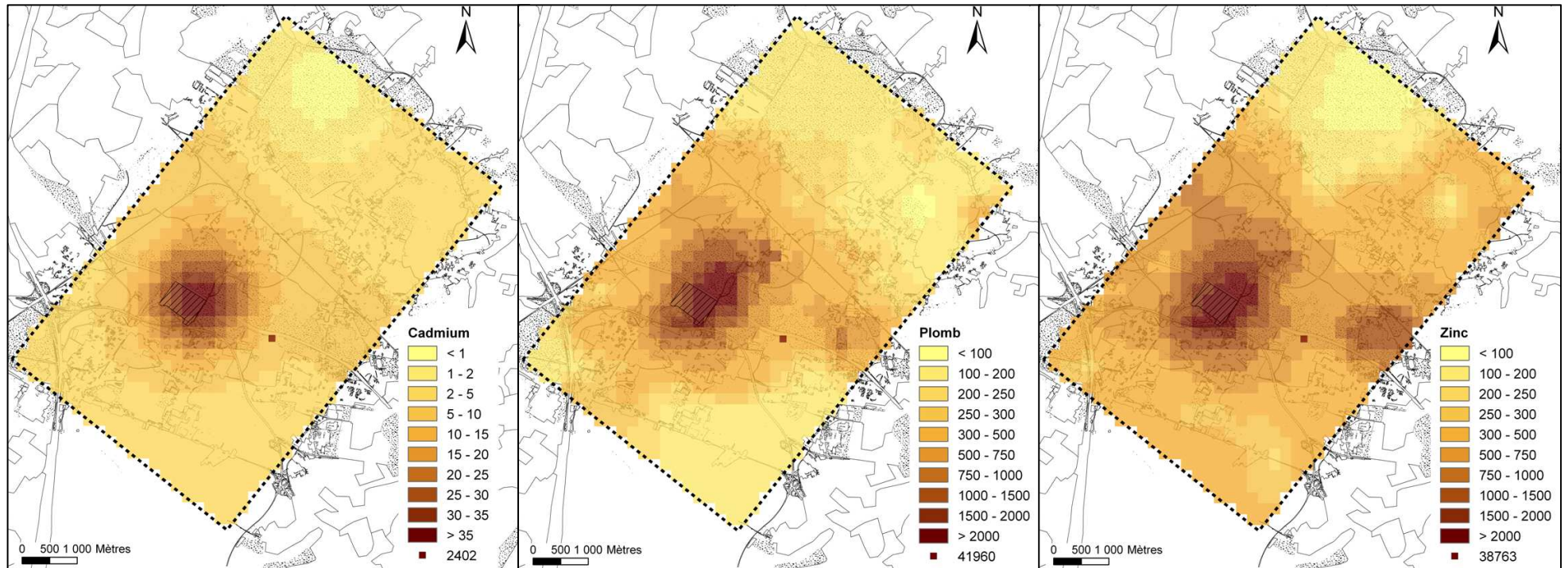
Les cartes II.6.2 à II.6.5 y présentent les concentrations totales et extractibles en Cd, Pb et Zn dans les sols ligneux. Les cartes II.6.6 et II.6.7 présentent les concentrations totales en Cd, Pb et Zn pour tous les types d'usage de sols.



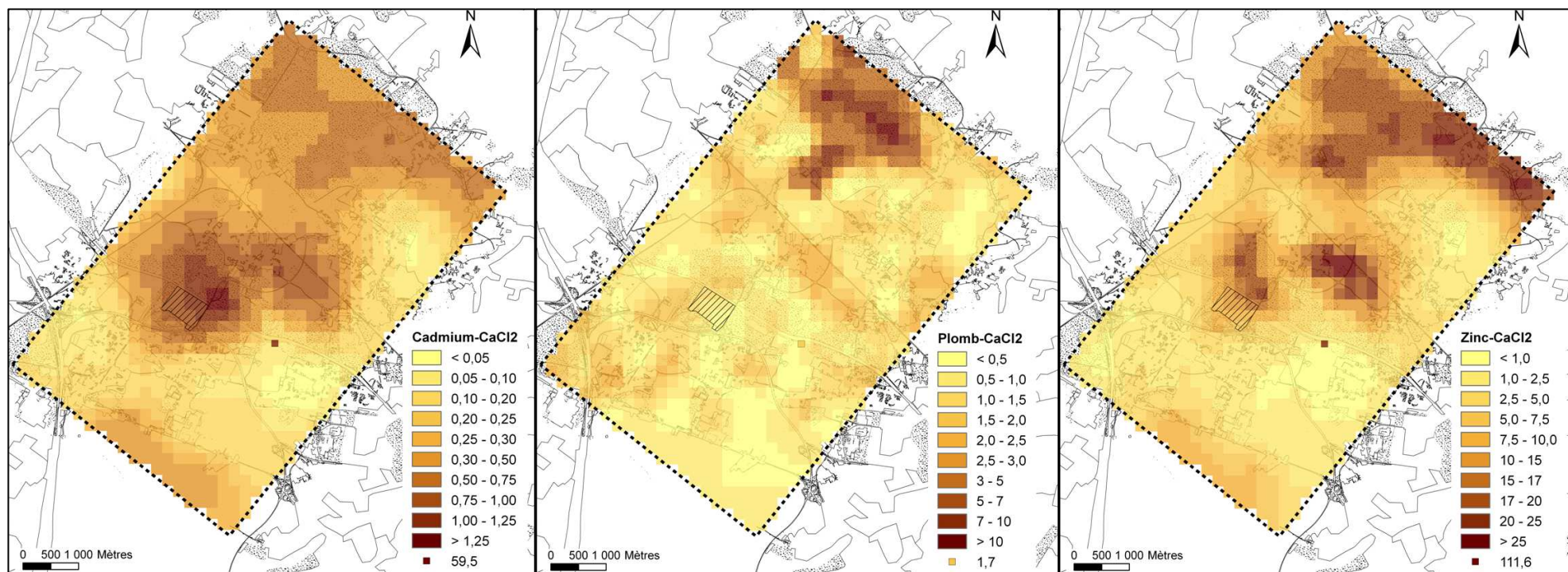
**Figure II.6.2.** Courbes d'iso-concentration des concentrations totales en Cd, Pb et Zn dans les sols ligneux (mg.kg<sup>-1</sup> masse sèche). Le point représenté par un rectangle visualise la localisation et la contamination du point particulier des dépôts de boues de curage. La zone d'étude étendue (8 x 5 km) est figurée par des tirets.



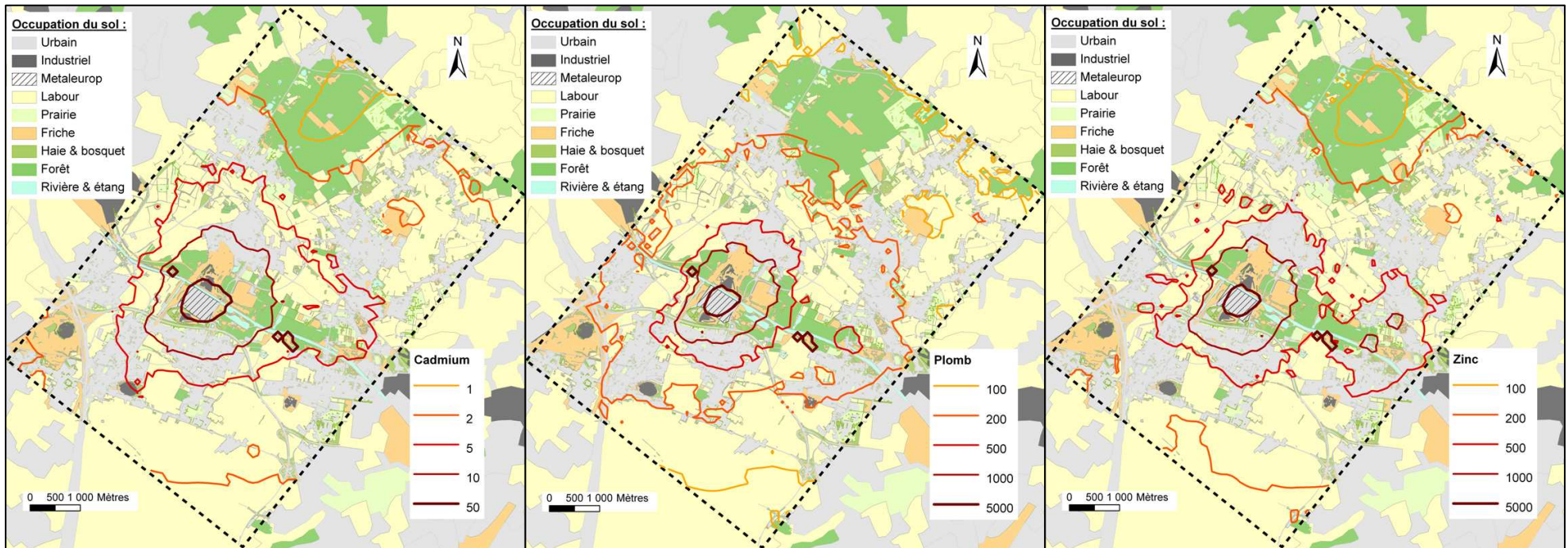
**Figure II.6.3.** Courbes d'iso-concentration des concentrations extractibles (CaCl<sub>2</sub>) en Cd, Pb et Zn dans les sols ligneux (mg.kg<sup>-1</sup>masse sèche). Le point représenté par un rectangle visualise la localisation et la contamination du point particulier des dépôts de boues de curage lorsqu'il montre une concentration extrême. La zone d'étude étendue (8 x 5 km) est figurée par des tirets.



**Figure II.6.4.** Surfaces d'iso-concentration des concentrations totales en Cd, Pb et Zn dans les sols ligneux (mg.kg<sup>-1</sup> masse sèche). Le point représenté par un rectangle visualise la localisation et la contamination du point particulier des dépôts de boues de curage. L'ancienne usine de Metaleurop est figurée par la zone hachurée, la zone d'étude étendue (8 x 5 km) est figurée par des tirets et les milieux boisés par des zones en pointillés.

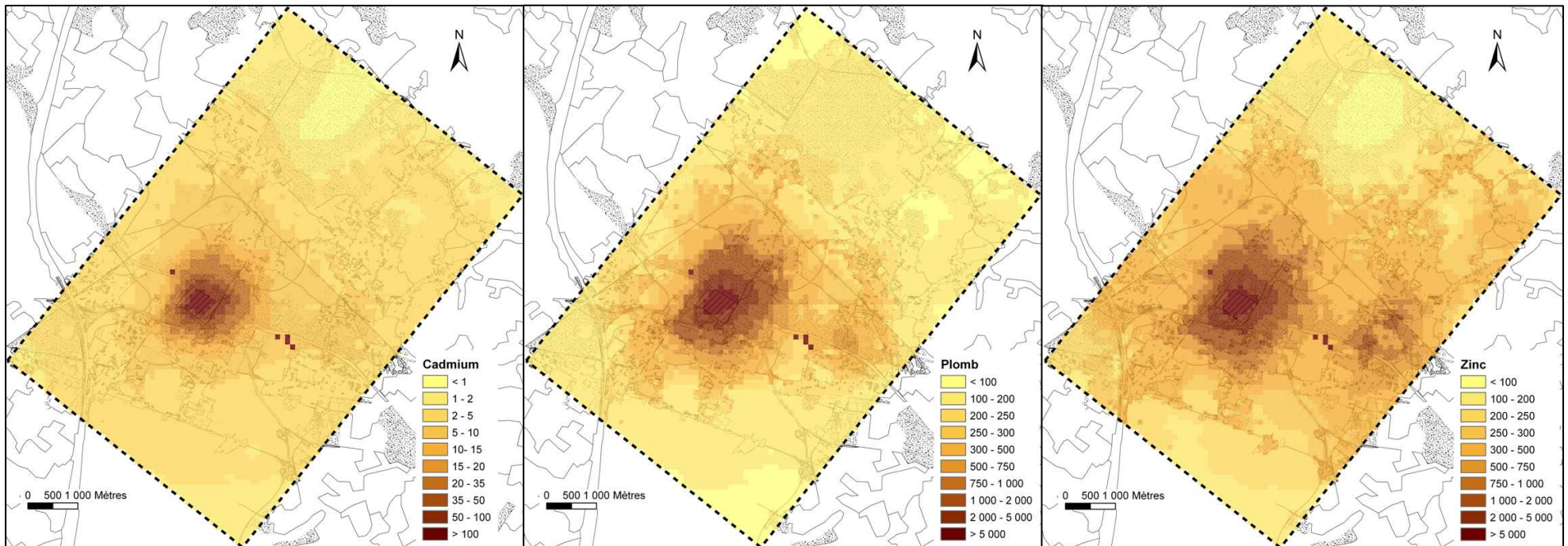


**Figure II.6.5.** Surfaces d'iso-concentration des concentrations extractibles (CaCl<sub>2</sub>) en Cd, Pb et Zn dans les sols ligneux (mg.kg<sup>-1</sup> masse sèche). Le point représenté par un rectangle visualise la localisation et la contamination du point particulier des dépôts de boues de curage lorsqu'il montre une concentration extrême. L'ancienne usine de Metaleurop est figurée par la zone hachurée, la zone d'étude étendue (8 x 5 km) est figurée par des tirets et les milieux boisés par des zones en pointillés.



**Figure II.6.6.** Courbes d'iso-concentration des concentrations totales en Cd, Pb et Zn dans tous les sols ( $\text{mg.kg}^{-1}$  masse sèche). La zone d'étude étendue (9 x 6 km) est figurée par des tirets.





**Figure II.6.7.** Surfaces d'iso-concentration des concentrations totales en Cd, Pb et Zn dans tous les sols ( $\text{mg.kg}^{-1}$  masse sèche). L'ancienne usine de Metaleurop est figurée par la zone hachurée, la zone d'étude étendue (9 x 6 km) est figurée par des tirets et les milieux boisés par des zones en pointillés.

---

## II.7. RECEPTEURS CAPTURES

---

### II.7.1. Micromammifères

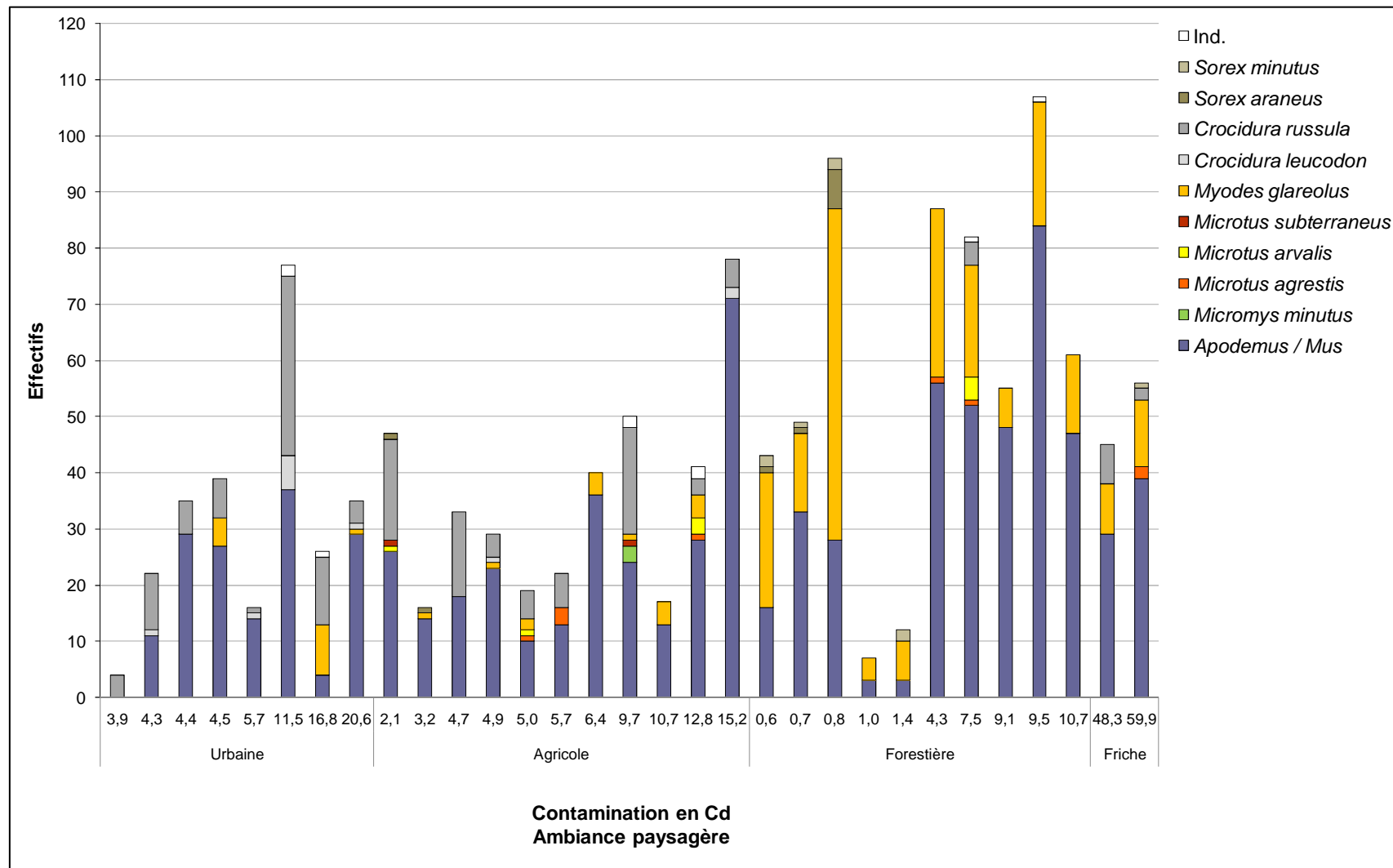
Au cours des 3 sessions d'échantillonnage, 1719 individus ont été piégés (automne 2006 : 1346, printemps 2007 : 225, printemps 2008 : 148). La grande majorité des individus capturés ont été des rongeurs appartenant aux espèces suivantes : le mulot sylvestre *A.sylvaticus* (60%) et campagnol roussâtre *M. glareolus* (22%). D'autres espèces de rongeurs ont été capturées mais en faible nombre (Figures II.7.1 et II.7.2). Les espèces d'insectivores échantillonnées ont varié entre les sessions d'automne et de printemps (Figures II.7.1 et II.7.2). En effet, en automne, les insectivores ont principalement été des musaraignes à dents blanches du genre *Crocidura* et au printemps, des musaraignes à dents rouges du genre *Sorex*. Les espèces les plus représentées ont été respectivement la crocidure musette *Crocidura russula* (10%) et la musaraigne carrelet/couronnée *Sorex araneus/coronatus* (2,5%).

Les espèces principalement étudiées dans la thèse sont *Apodemus sylvaticus*, *Myodes glareolus*, *Crocidura russula*, *Sorex araneus* et *Sorex minutus*. Les caractéristiques biologiques majeures de ces espèces sont présentées dans le tableau II.7.1 (Abt and Bock, 1998; Le Louarn et al., 2003; Ligon-Moulin, 2003; Wijnhoven et al., 2005).

### II.7.2. Mollusques gastéropodes

Des escargots ont été échantillonnés au cours de l'automne 2006 et du printemps 2007. Plus de 2186 individus, appartenant à 21 espèces ont été récoltés (2101 individus en automne, 85 au printemps). Les espèces les plus représentées dans l'échantillon, et les mieux réparties par rapport à la dominante paysagère et la contamination des sols ont été *Cepaea sp* (*nemoralis*, *hortensis* et juvéniles) et *Oxychilus draparnaudi* (Figure II.7.3). De plus, ces espèces ont été contactées à la fois au printemps et à l'automne (Figure II.7.3). Les identifications spécifiques de tous les taxons n'ayant pas encore été toutes validées à ce jour, nous ne présenterons pas ici la globalité des données.

Les espèces étudiées dans la thèse sont *Cepaea nemoralis* et *Oxychilus draparnaudi*. L'espèce *Cantareus aspersus* a également été considérée lors de l'exposition en microcosmes. Les caractéristiques biologiques majeures de ces espèces sont présentées dans le tableau II.7.2 (Wolda et al., 1971; Williamson and Cameron, 1976; Vonproschwitz, 1994; Kerney and Cameron, 2006).



**Figure II.7.1.** Répartition des micromammifères capturés lors de la session d'échantillonnage d'automne 2006 par niveau croissant de contamination des sols en Cd ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) au sein de chaque paysage. La catégorie « Ind. » correspond à des individus qui n'ont pas encore, ou pas pu être déterminés. La catégorie « Apodemus/Mus » regroupe *Apodemus sylvaticus* et *Mus musculus*, mais la très grande majorité des individus sont des mulots (toutes les identifications n'étant pas réalisées à ce jour, les 2 espèces ont été groupées ici).

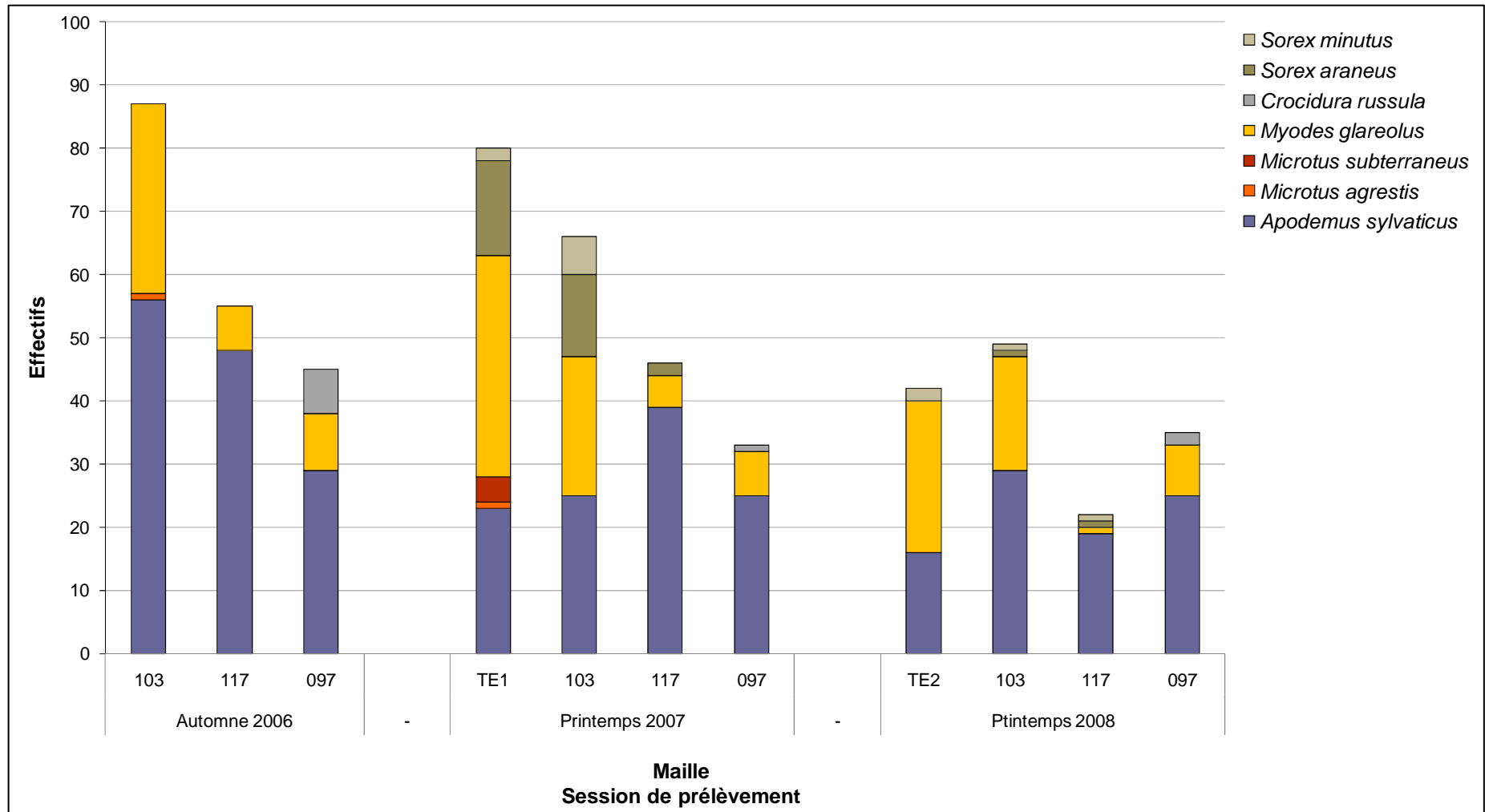





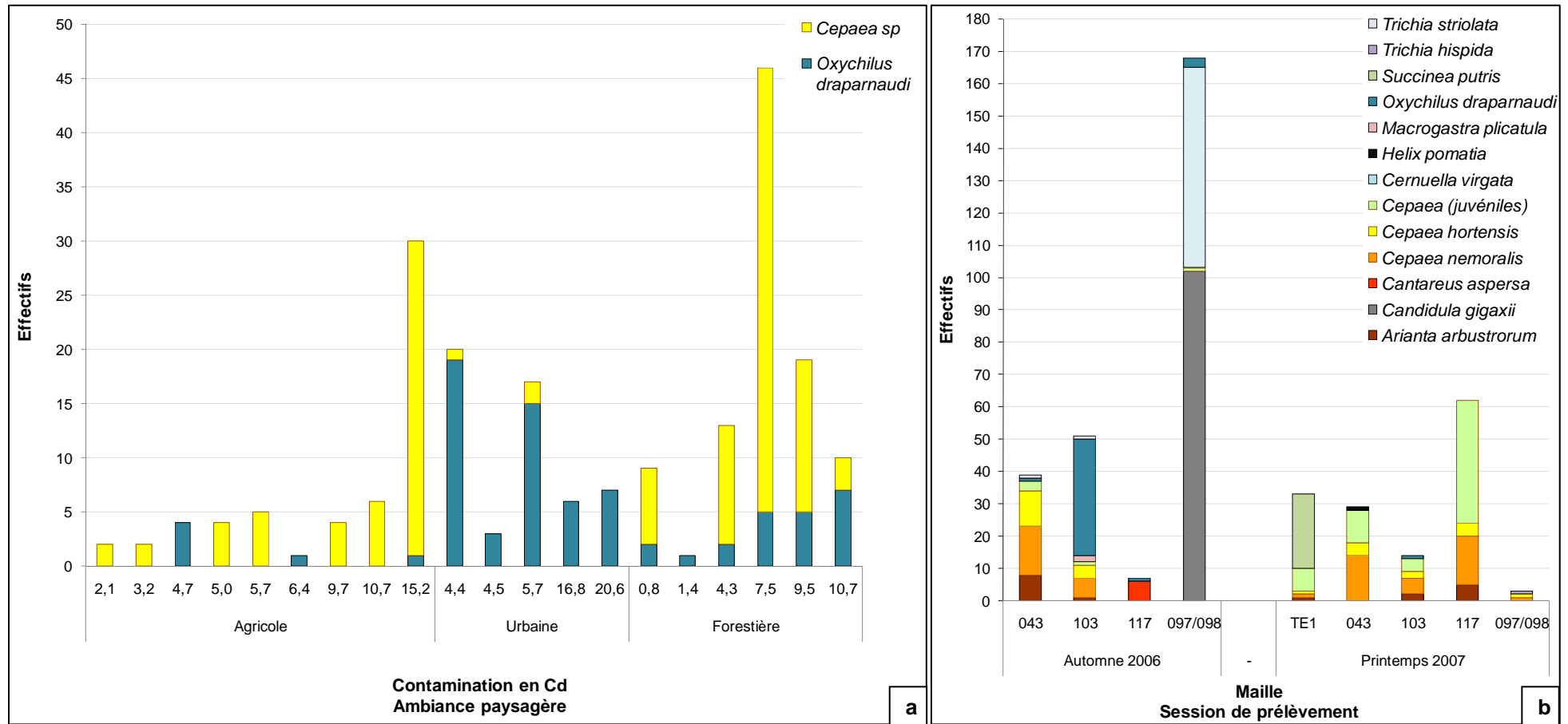


Figure II.7.2. Micromammifères capturés sur les mailles retenues le long du gradient de pollution, lors de la session d'échantillonnage d'automne 2006, printemps 2007 et printemps 2008.

**Tableau II.7.1.** Caractéristiques majeures des espèces étudiées parmi les micromammifères (Source des photographies : ARKive [www.arkive.org/](http://www.arkive.org/)).




	Famille Sous-famille	Espèce	Distribution géographique	Taille (mm) Poids (g) <sup>a</sup>	Habitat <sup>b</sup>	Domaine vital (m <sup>2</sup> )	Régime alimentaire	Photographie
Rongeurs	Muridae Murinae	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Apodemus sylvaticus</i></li> <li>• Mulot sylvestre</li> <li>• Wood mouse</li> </ul>	Europe	71 – 104 18 – 30	Ubiquiste : tout biotope pas totalement dépourvu de végétation herbacée et buissons	230 – 12200 (moyenne 1000 – 2000)	Omnivore, dominante granivore/herbivore La nourriture animale peut dépasser 20% poids total régime (escargots, vers de terre, insectes...)	
	Cricetidae Arvicolinae	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Myodes glareolus</i> (ex-<i>Clethrionomys glareolus</i>)</li> <li>• Campagnol roussâtre</li> <li>• Bank vole</li> </ul>	Paléarctique	94 - 109 23 - 40	Forêts, milieux boisés, broussailles	260 – 2000	Dominante herbivore/granivore Faible apport origine animale (escargots, insectes, vers de terre)	
Musaraignes	Soricidae Crociturinae	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Crocidura russula</i></li> <li>• Crocitude musette</li> <li>• Greater white-toothed shrew</li> </ul>	Paléarctique (sauf Corse)	61 – 86 10 – 14	Zones urbaines et agricoles (jardins, vergers, broussailles, milieux boisés...)	50 – 395	Carnivore, dominante insectivore Large spectre (insectes, arachnides, escargots, vers de terre...)	
	Soricidae Soricinae	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Sorex araneus</i></li> <li>• Musaraigne carrelet</li> <li>• Common shrew</li> </ul>	Paléarctique	60 – 88 7 – 13	Forêts, lisières, zones de cultures (agriculture peu intensive), milieux boisés, broussailles	360 – 1400	Carnivore, dominante insectivore (insectes, arachnides, escargots, limaces, et surtout vers de terre...)	
	Soricidae Soricinae	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Sorex minutus</i></li> <li>• Musaraigne pygmée</li> <li>• Pygmy shrew</li> </ul>	Paléarctique (Absente plupart côtes méditerranéennes)	42 – 69 3 – 6	Forêts, zones humides, zones de cultures (agriculture peu intensive), milieux boisés	530 – 1860	Carnivore, dominante insectivore (petites proies surface : insectes et arachnides taille < 6 mm, escargots, cloportes...)	

<sup>a</sup> Taille : longueur tête + corps, poids corporel.<sup>b</sup> Habitat principal, des milieux particuliers non présentés ici peuvent parfois être signalés.



**Figure II.7.3. (a).** Répartition des escargots appartenant aux espèces *Cepaea* sp et *Oxychilus draparnaudi* récoltés lors de la session d'automne 2006 par niveau croissant de contamination des sols en Cd ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) au sein de chaque paysage. **(b).** Escargots capturés sur des mailles communes lors des échantillonnages d'automne 2006 et printemps 2007.

**Tableau II.7.2.** Caractéristiques majeures des espèces de mollusques gastéropodes étudiées (Source photographique : ARKive [www.arkive.org/](http://www.arkive.org/) et Thomas Schneider)

	Famille Sous-famille	Espèce	Distribution géographique	Taille (∅ mm) Poids (g) <sup>a</sup>	Habitat <sup>b</sup>	Régime alimentaire	Photographie
Mollusques gastéropodes	Helicidae Helicinae	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Cantareus aspersus</i> (ex-<i>Helix aspersa</i>)</li> <li>• Escargot petit gris</li> <li>• Common / brown garden snail</li> </ul>	Europe (Mondiale : introduit)	25 - 45 7 - 15	Assez ubiquiste. zones urbaines et agricoles (parcs, jardins, haies, friches, vignes, bordure des champs...)	Herbivore et détritivore (végétation, litière, sol)	
	Helicidae Helicinae	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Cepaea nemoralis</i></li> <li>• Escargot des bois</li> <li>• Brown-lipped / grove snail</li> </ul>	Europe	18 – 30 3 - 6	Ubiquiste : zones urbaines, agricoles et forestières (parcs, jardins, haies, friches, bordure des champs, prairies, bois...)	Herbivore et détritivore (végétation, litière, sol)	
	Zonitidae Oxychilinae	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Oxychilus draparnaudi</i></li> <li>• <i>Oxychilus</i></li> <li>• Draparnaudi's glass snail</li> </ul>	Europe (Espèce invasive : continent américain, Pacifique)	11 – 16 < 1	Plutôt ubiquiste si micro-habitat frais et humide : zones urbaines et agricoles (parcs, jardins, haies, friches...), forêts	Carnivore (nérophage, pontes de gastéropodes, insectes...)	

<sup>a</sup> Taille de la coquille, poids corporel.

<sup>b</sup> Habitat principal, des milieux particuliers non présentés ici peuvent parfois être signalés.

# **PARTIE 3**

---

## **RESULTATS**





---

## III.1. CHAPITRE 1

---

### VARIABILITE SPATIALE DES CONTAMINATIONS DES SOLS LIGNEUX

---

*Quelles variables affectent la distribution spatiale des concentrations totales et extractibles dans les sols ?*

#### Résumé

La distribution spatiale des concentrations totales et extractibles ( $\text{CaCl}_2$ ) dans des sols impactés par une fonderie a été étudiée à l'échelle d'un vaste site pollué, situé dans le Nord de la France. Cette étude a été menée sur 262 sols échantillonnés dans des habitats ligneux. Les concentrations totales et extractibles en ETMs mesurées atteignent respectivement 2402 et 59,5  $\mu\text{g.g}^{-1}$  pour le Cd, 41960 et 13,7  $\mu\text{g.g}^{-1}$  pour le Pb et enfin 38760 et 143,0  $\mu\text{g.g}^{-1}$  pour le Zn (masse sèche : ms). La structure spatiale des concentrations totales et extractibles montre une forte auto-corrélation spatiale des contaminations, et un krigeage ordinaire a été utilisé pour prédire les concentrations dans les sols. Nous avons recherché quelles variables influencent les concentrations en ETMs et leur distribution spatiale : les concentrations totales dépendent surtout de la distance à la fonderie, du vent et des teneurs en carbone organique dans les sols, tandis que les concentrations extractibles sont principalement modulées par le pH. Ces variables étant égales par ailleurs, les propriétés du sol et les caractéristiques du paysage influencent également les concentrations totales et extractibles. En conclusion, nous avons montré que les concentrations en ETMs totales et extractibles sont gouvernées par des processus agissant à différentes échelles spatiales : les concentrations totales sont surtout liées à l'apport et à la rétention des métaux (large échelle) tandis que les concentrations extractibles sont expliquées par les facteurs qui contrôlent la solubilité des métaux dans les sols (faible échelle). Les distributions spatiales des concentrations totales et extractibles en ETMs diffèrent au sein de la zone d'étude, ce qui devrait être considéré dans le cadre de l'évaluation des risques. Des cartes de risque basées sur les valeurs d'ECO-SSLs de l'US EPA (pour les plantes, les invertébrés du sol et les vertébrés) ont été réalisées, et montrent qu'un risque est probable pour la faune sur ce site mais que la pertinence des Eco-SSLs est discutable.

**Mots-clés** : pollution des sols, sol superficiel, disponibilité, occupation du sol, structure spatiale

## Abstract

The spatial distribution of total and CaCl<sub>2</sub>-extracted Cd, Pb and Zn concentrations in smelter-impacted soils was investigated over a polluted site (40 km<sup>2</sup>) in northern France. The study was conducted on 262 soils sampled in woody habitats. Total and extracted concentrations of trace metals (TMs) rose up to 2402 and 59.5 mg.kg<sup>-1</sup> for Cd, 41 960 and 13.7 mg.kg<sup>-1</sup> for Pb, 38 760 and 143.0 mg.kg<sup>-1</sup> for Zn, respectively. The spatial dependence of both total and extracted concentrations showed a high spatial auto-correlation and ordinary kriging was used to predict soil concentrations. Investigating which variables influenced metal concentrations and their spatial distribution, we found that total concentrations mostly depended on the distance from the smelter, the wind and the organic carbon, while extracted concentrations were mainly modulated by the pH. Conditionally to those variables, other soil properties and landscape characteristics influenced both total and extracted concentrations. We conclude that total and extracted TM concentrations are governed by different processes which act at various spatial ranges: total concentrations are mainly related to input and retention of metals (large scale) whereas extracted concentrations were mainly explained by factors controlling metal solubility in soils (local scale). Spatial distributions of total and extracted TMs differed over the area, which should be considered for risk assessment. Maps of risk based on the US EPA's Eco-SSLs (for plants, invertebrates and vertebrates) were realized, showing that wildlife may be at risk but that relevance of Eco-SSL values is questionable.

**Keywords:** soil pollution, woody topsoil, availability, land use, spatial structure.

## Publication relative :

*Spatial distribution of metals in smelter-impacted soils of woody habitats: influence of landscape and soil properties, and risk for wildlife.*

C. Fritsch<sup>1</sup>, P. Giraudoux<sup>1</sup>, M. Cœurdassier<sup>1</sup>, F. Douay<sup>2</sup>, F. Raoul<sup>1</sup>, A. de Vaufleury<sup>1</sup>, R. Scheifler<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Chrono-Environment, UMR UFC/CNRS 6249 USC INRA, University of Franche-Comte, Place Leclerc, F-25030 Besançon Cedex, France

<sup>2</sup> Laboratoire Sols et Environnement, Institut Supérieur d'Agriculture, 48 boulevard Vauban, F-59046 LILLE Cedex, France

Publié en 2010 dans *Chemosphere*, 81 (2):141-155.

### III.1.1. Introduction

Following their release in the environment, pollutants can be carried over large distances and transferred within and between atmosphere, hydrosphere, lithosphere and biosphere. Assessing the environmental factors like soil or landscape features that may influence transport, fate and bioavailability of TMs in ecosystems, and therefore their spatial distribution, is a key issue to predict and limit their effects on both human and environmental health (Baker et al., 2003; Fairbrother et al., 2007). If metals and metalloids are naturally present in the environment at trace levels, soils may exhibit high concentrations because of anthropogenic contamination (mainly related with agriculture, transports and industrial activities). The transport and the fate of metals at large spatial scales (regional to continental scales) are principally controlled by physico-chemical characteristics of the pollutant itself, of the media (atmosphere, seawater...) and of the deposition surface (Van Den Hout et al., 1999). In the case of atmospheric deposition of contaminated dusts from point source emissions, it has been shown that the distance from the source, the direction and the speed of winds, the frequency and the quantity of precipitations, the roughness and the interception by the environment may influence deposition rates and hence soil pollution (Antonic and Legovic, 1999; Branford et al., 2004; De Ridder et al., 2004; Ali-Khodja et al., 2005; Floret et al., 2006; Rawlins et al., 2006). Moreover, differences in metal concentration and speciation have been noticed between land uses, woodlands showing higher metal concentrations in soils than open lands (Rieuwerts and Farago, 1996; Fowler et al., 2004; Ettler et al., 2005; Magiera and Zawadzki, 2007). However, the influence of landscape, defined as a mosaic characterized by composition, structure and function of land use features (Urban et al., 1987), has scarcely been considered although the variability in roughness and interception occurring because of heterogeneity of landscapes may influence pollutant deposition and thus, local environmental contamination (De Ridder, 2003). Apart from the spatial variation of total metal concentrations, available concentrations, which are a key parameter of wildlife exposure, may also be heterogeneous over space due to the variability of soil properties, which are usually considered as the main parameters modulating metal mobility in soils (Peijnenburg and Jager, 2003).

The spatial variability of soil total and available TM concentrations, as demonstrated in different studies, is due to a combination of the heterogeneity of background levels, emission and deposition mechanisms and retention, mobility and cycling processes (Adriano, 2001). These factors act at various spatial scales (Xu and Tao, 2004; Queiroz et al., 2008; Rodriguez et al., 2008). Studies have rarely combined the different variables involved in those different processes while it might contribute to a better understanding of the mechanisms explaining the spatial distribution of total and available metal concentrations in soils and of the relative importance of each factor. This study takes place in the framework of a research programme named STARTT, which aims at studying, at different spatial scales and various biological levels, the processes involved in the bioavailability, the transfer and the effects of Cd, Pb and Zn in terrestrial food webs

(Scheifler et al., 2007). These studies are carried out in the surroundings of the former Metaleurop Nord smelter (Northern France), and focus on woody habitats which are favourable for feeding and reproduction of several animal groups such as snails, birds and small mammals, which constitute the biological models studied within the framework of the STARTT programme. The contamination of agricultural and urban topsoils of the former smelter surroundings has already been documented (Frangi and Richard, 1997; Sterckeman et al., 2000; Sterckeman et al., 2002b; Douay et al., 2008), while woodlands have been less considered. Recent studies showed that the patterns and levels of trace metal (TM) contamination differed between agricultural, urban and woody habitat topsoils (Douay et al., 2009). Moreover, a study on TM transfer to small mammals in woody habitats of this area showed that accumulated metal levels and associated individual responses greatly depended on the spatial distribution of soil contamination (Fritsch et al., 2010). Further investigations are therefore needed to elucidate which parameters are involved in the spatial distribution and variability of Cd, Pb and Zn soil concentrations over this polluted area.

The present study aims at analyzing factors explaining the spatial distribution of total and  $\text{CaCl}_2$ -extracted Cd, Pb and Zn concentrations in soils of woody habitats over a large (over 40 km<sup>2</sup>) polluted area surrounding the former Metaleurop Nord smelter. Two kinds of factors were considered: factors related to metal input (distance from the smelter, wind, and landscape) and factors related to metal mobility (soil physico-chemical characteristics). Finally, TM spatial distributions were used to derive risk maps for several terrestrial organisms.

### III.1.2. Materials and methods

#### III.1.2.a. Study site and sampling strategy

This study was carried out in the surroundings of the former Metaleurop Nord smelter in Northern France (Noyelles-Godault, Nord-Pas-de-Calais, 50°25'42 N 3°00'55 E). This Pb- and Zn-smelter, in activity from 1894 to 2003, used a pyrometallurgic process that generated considerable quantities of contaminated dust. Atmospheric releases were drastically reduced in the seventies but in 2002, annual dust emissions still were 1 t of Cd, 17 t of Pb and 31 t of Zn (DRIRE, 2003). Furthermore, particulates from Metaleurop slag heap located close to the plant were subject to dispersal by the wind. A Zn-smelter named “Umicore” is located 5 km to the east of Metaleurop (Auby, Nord-Pas-de-Calais, 50°24'26 N 3°04'36 E). The generated atmospheric fallout of former Metaleurop smelter and Umicore smelter led to the contamination of the surrounding soils on an area that extends over 120 km<sup>2</sup> and where 55,000 inhabitants live (Frangi and Richard, 1997; Sterckeman et al., 2000; Sterckeman et al., 2002b; Douay et al., 2008; Douay et al., 2009).

We defined a 40 km<sup>2</sup> (8 x 5 km) study area approximately centred on former Metaleurop Nord smelter and excluding Umicore smelter. This area was split into 160 squares 0.5 km-sided, which constituted the sampling units, referred to as “squares” hereafter. Because of the absence of woody habitats, 7 squares located in the south-eastern part of the area were not sampled. In each sampled squares, 1 to 10 (for logistical reasons) composite 0-25 cm (litter removed) soil samples

(constituted each by 15 randomly placed sub-samples in a homogeneous patch) were taken in woody patches. Patches considered as “woody” were natural forests, tree plantations (poplar groves for instance) or copses and hedgerows in natural or cultivated lands and urban parks. Soils sampled in woody habitats will be called hereafter “woody soils”.

The Euclidean distance (expressed in meters) between each soil sampling point (center of the area concerned by the composite sampling) and the main source of contamination (center of the former Metaleurop plant) was calculated.

Wind data were obtained from Météo-France (Paris, France). The dataset consisted in 18 238 daily measurements of instantaneous wind at 10 m height from January 1958 to December 2007 in Lille-Lesquin meteorological station (about 20 km distant from Metaleurop). The resulting compass rose integrates wind direction and frequency (%). For each class of angle of the compass rose circle (from 0 to 360°, step of 20°), the frequency of the wind blowing up this angle was reported, the sum of the frequencies of all angles being 100%. The compass rose was centred on Metaleurop Nord smelter: for each soil sampling point, the angle between the vector “Metaleurop smelter to the North” and the vector “Metaleurop smelter to the soil sampling point” was calculated and thus, for each point, the value of wind attributed corresponded to the frequency (%) of wind blowing on the point.

A total of 262 soils were sampled in woody patches, along a range of distances from Metaleurop Nord varying from 472 to 5726 m and oriented in all directions (Table III.1.1, Supplementary Materials). The prevailing wind came from southwest.

### *III.1.2.b. Soil analyses*

More details on protocols used for the determination of soil properties and total and extracted ( $\text{CaCl}_2$ ) metal analyses are given in Douay et al (2009). Briefly, for each soil sampled, the soil profile was described, taking down soil parameters like depth (cm), hydromorphia, anthropization degree and coarse element content. The assessment of soil anthropization degree (from 1: null to 5: intense) referred to the presence of signs, at various depths, suggesting anthropogenic deposit or embankments. These signs were mainly coarse elements such as bricks, tiles, concrete or waste rocks from coal mining. In addition, the following soil characteristics were measured: granulometry, pH (water suspension), organic carbon content (OC), total carbonate content ( $\text{CaCO}_3$ ) and cation exchange capacity (CEC). Chemical total extraction of metals in soils was performed by ashing (450°C) and acid digestion using mixture of hydrofluoric and perchloric acids (AFNOR, 1996). Soil total TM concentrations were measured by inductively-coupled argon plasma mass spectrophotometry (ICP-MS) for Cd and Pb and by inductively-coupled argon plasma atomic emission spectrophotometry (ICP-AES) for Zn.

In order to assess availability of metals in soil, a selective extraction using calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ , 0.01 M) was performed. This chemical extractant was chosen because it is considered as relevant for the assessment of the bioavailable (to plants and soil invertebrates) fraction of Cd, Pb

and Zn in soils (Harmsen, 2007; ISO, 2007; Meers et al., 2007). Extracted metal concentrations (names hereafter “CaCl<sub>2</sub>-extracted”) were quantified using flame atomic absorption spectrometry (AAS, AA-6800, Shimadzu). Both extracted and total TM concentrations were expressed as mg.kg<sup>-1</sup> dry weight (dw).

The extracted fraction, expressed as a percentage, was calculated dividing CaCl<sub>2</sub>-extracted concentration by total concentrations in the sample (both in mg.kg<sup>-1</sup> dw) and multiplying this value by 100.

#### *III.1.2.d. Landscape composition analysis*

A land use analysis was performed to determine the landscape composition around each soil sampling point. For this purpose, the study area was extended to 9 x 6 km by adding a line of squares around the initial 8 x 5 km grid with the aim of avoiding edge effect in further statistical analyses. A land use mapping was realized using ArcGIS 8 on the basis of CORINE Land Cover (CLC) database (European Commission, 2000). The surface area of the smallest unit mapped in CLC is 25 ha. Based on aerial photographs (BD ORTHO® database from the Institut Géographique National, resolution of 0.5 m) and, when necessary, on field reconnaissance, the limits of the different units and the units smaller than 25 ha (like hedgerows or copses) were manually digitalized in order to obtain a resolution of 4 m. The resulting vector map was converted into a raster map (1 pixel = 4 x 4 m), constituted of 8 categories of land uses: urban, industrial, ploughed fields, grassland, copses and hedgerows, woodland, scrub/shrubland, water (canal, river and ponds). A circular buffer technique was performed using the opensource GRASS GIS 6.0 software (GRASS Development Team, 2008), in order to calculate the number of pixels of each land use category in the area surrounding the point. Several buffer radiuses were used: 50, 100, 200, 300, 400 and 500 m around the sampling point. The landscape composition for each soil sampling point was expressed as a number of pixels for the different categories of land uses at each buffer radius.

#### *III.1.2.e. Statistical analyses*

The statistical analyses were separated in three distinct steps. Firstly, we investigated the spatial dependence of total and extracted metal concentrations in topsoils and modelled the spatial auto-correlation to predict soil metal concentrations. Secondly, we determined which variables can explain the levels of contamination using a sequential multi-factorial regression (non spatial analysis using spatially explicit variables). Finally, we studied the spatial dependence of contaminations controlling for the explaining variables identified in the second step (i.e. using built explanatory models as a spatial trend), in order to check for residual spatial auto-correlation. The metal concentrations (total and extracted) being skewed, data were log-transformed using log<sub>10</sub>(x + 1). All statistical analyses were performed using R 2.7.1 software (R Development Core Team, 2006), adding the following packages: *pgirmess*, *maptools*, *geoR* and *gstat*.

The spatial dependence of soil contamination was studied computing directional empirical variograms (directions: 0°, 45°, 90°, and 135°) (Webster and Oliver, 2001; Bivand et al., 2008). However, we found that modelling anisotropy was not indicated here. Therefore, omnidirectional empirical variograms with variographic envelopes were computed for all TMs. The variographic envelopes were obtained by permutation (99 simulations, Monte-Carlo method). Then, models were fitted on the variograms with 4 correlation functions which were considered as relevant in the light of the spatial auto-correlation pattern (exponential, gaussian, spherical and circular), and models were cross-validated (leave-one-out cross validation). The best model was chosen on the basis of the sum of squares of the fitted models and cross-validation criteria (Webster and Oliver, 2001; Bivand et al., 2008). Predictions were realized applying ordinary kriging (Matheron, 1970; Cressie, 1988; Bivand et al., 2008). The median distance between couples of nearest points was calculated for choosing a relevant distance between nodes of a regular grid where kriging would be applied. Finally, we kriged soil metal concentrations at the nodes of the grid and back-transformed (power 10) obtained values.

In the second step, a multi-factorial sequential regression was developed. The dependent variables were the total and extracted metal concentrations in woody soils. Explanatory variables were the distance from the smelter, the frequency of wind, the soil properties and the landscape composition variables. When it was relevant (distribution of the data or link function), explanatory variables were log-transformed. Then, relationships between dependent and explanatory variables were analyzed using general linear models with a Gaussian error (Venables and Ripley, 2001; Grafen and Hails, 2002). Models were built on the basis of ecological and statistical considerations using a sequential approach. Concerning total concentrations, 3 different groups of explanatory variables were used: (i) the distance from the smelter and the frequency of wind, (ii) the soil properties and (iii) the landscape composition variables. Preliminary univariate analyses (Spearman's rank correlations, used to determine whether certain variables were correlated and the importance of each variable in univariate relationships) showed that most of the soil characteristics co-varied with the distance from the smelter, wind and landscape composition. The largest correlation coefficients for Cd, Pb and Zn total concentrations were always found with the distance. Moreover, according to the literature, the distance from the source and the frequency of wind are the variables primarily involved in the input of the pollutants in smelter-impacted soils (Rieuwerts et al., 1999; Sterckeman et al., 2002b; Suchara and Sucharova, 2002; Martley et al., 2004; Suchara and Sucharova, 2004; Ettler et al., 2005; Rawlins et al., 2006; Douay et al., 2008). Distance and wind were therefore placed first in the models in order to explore the influence of soil properties and landscape composition on contamination conditionally to them. To explore the landscape influence on the contamination, soil properties were introduced next in the model in order to control for them when examining landscape effect. Within the different soil properties and landscape composition variables, variables that were highly correlated to soil metal concentrations (univariate exploratory analyses) were placed first. Concerning extracted concentrations, 3



groups of explanatory variables were used: (i) total concentrations of the metals were placed first in the models in order to explore extractability (i.e. the extracted concentration of a metal conditionally to its total concentration), (ii) soil properties and (iii) landscape composition variables. For both total and extracted concentrations, the selection of each variable in the models was made as follows. The first variables in the model (distance and wind or total concentration) being fixed, all soil properties were added and the non significant ones were excluded, step by step. Then, all landscape composition variables were added within one model for each buffer size. The buffer size conferring the highest adjusted R-squared to the model was retained and then, only the significant landscape composition variables were retained in the final model. The coefficient of determination of each variable in the models (partial R-squared) was determined using an analysis of variance (ANOVA) and the significance of each variable was tested performing permutation test (Monte-Carlo, 1000 permutations). The final models were checked graphically for homogeneity of variance, normality of error and linearity/additivity. The leverage was regarded looking at plots of the standardized residuals versus leverage.

In the third step, we studied the spatial dependence of soil contamination controlling for explaining variables identified in the second step, in order to check for residual spatial autocorrelation. For this purpose, we performed omnidirectional empirical variograms with variographic envelopes based on the residuals of soil concentrations after adding a spatial trend, also called external drift, which was created using the general linear models obtained in the second step.

### *III.1.2.f. Risk maps using Eco-SSLs*

In order to assess whether TM levels in soils of the study area could pose risk for wildlife, we calculated a risk index using the Eco-SSLs (USEPA, 2005a, b, c). The index of risk was calculated as the ratio of the predicted total concentration in topsoil divided by the Eco-SSL value. In the guidance for developing Eco-SSLs, US EPA indicated that Eco-SSLs should be used to characterize risk, comparing screening levels with measured soil concentrations: if soil concentrations exceeded Eco-SSL values (e.g. ratio defining risk index described above higher than 1), the receptor of concern should be considered to be at risk for deleterious effects of pollutants (USEPA, 2005d). We chose to examine the Eco-SSLs for Cd, Pb and Zn considering plants, soil invertebrates, insectivorous birds and herbivorous and insectivorous small mammals, because they constitute the dietary items of numerous predators and are studied in the framework of the STARTT research programme. Values of Eco-SSLs for Cd are 32, 140, 73, 0.36 and 0.77 mg.kg<sup>-1</sup> dw for plants, soil invertebrates, herbivorous small mammals, insectivorous small mammals and insectivorous birds, respectively (USEPA, 2005a). For Pb they are 120, 1700, 1200, 56 and 11 mg.kg<sup>-1</sup> dw for plants, soil invertebrates, herbivorous small mammals, insectivorous small mammals and insectivorous birds, respectively (USEPA, 2005b). Finally, values for Zn are 160, 120, 6800, 79 and 46 mg.kg<sup>-1</sup> dw for plants, soil invertebrates, herbivorous small mammals, insectivorous small mammals and insectivorous birds, respectively (USEPA, 2005c).

### III.1.3. Results

#### III.1.3.a. Environmental, soil and contamination characteristics of the study area

The texture of sampled soils varied from sandy-loam to silty-clay and silty-loam with a majority of loam/silty-loam textures (according to USDA classification, USDA, 2009). The values of pH ranged from 3.8 to up to 8.3 with 62% of the soils exhibiting pH from 6 to 8 (Table III.1.1). The other soil properties (OC, CEC and total  $\text{CaCO}_3$ ) showed a relatively high variability (Table III.1.1), highlighting the wide heterogeneity of soils of the sampled woody patches, which differed by both type (forest, hedgerows, copses, groves...) and origin (natural, planted).

Woody soils were heavily polluted by Cd, Pb and Zn (Table III.1.1) with median total concentrations (5.0, 302.9 and 460.4  $\text{mg.kg}^{-1}$ , respectively) largely exceeding background values in woody topsoils of comparable texture, which are 0.2, 53.3 and 53.4  $\text{mg.kg}^{-1}$ , respectively (Sterckeman et al., 2002a). Over the 262 woody soils sampled in this study, only 7 soils exhibited metal concentrations lower or equal to those reference pedo-geochemical values. The highest total TM values were observed on a singular point corresponding to a deposit of dredged sediments from the Deûle canal (Table III.1.1, Supplementary Materials). This substrate cannot be strictly considered as a soil impacted by the smelter emissions as the major source of contamination was not dust deposition and this matrix was not a soil but a sediment. This point was therefore considered as an outlier and was removed from the dataset for statistical analyses on metal levels and their spatial distributions (Table III.1.1). Except this outlier, the highest concentrations (upper than 3rd quartile values) were located in the vicinity of the former smelter (less than 1 km), principally at the north-east of the plant along the prevailing wind direction (Supplementary Materials).

The  $\text{CaCl}_2$ -extracted concentrations in soils (dredged sediment deposit not considered) varied from 0.02 to 5.80  $\text{mg.kg}^{-1}$  for Cd, from 0.27 to 13.68  $\text{mg.kg}^{-1}$  for Pb and from 0.02 to 143.00  $\text{mg.kg}^{-1}$  for Zn (Table III.1.1). Contrarily to total concentrations, the highest values of extracted concentrations were not always observed in the dredged sediment deposit. A part of the highest extracted concentrations (upper than the 3rd quartile values) were located close to the smelter (less than 1 km) but an appreciable amount (64%, 96% and 54% for Cd, Pb and Zn, respectively) of those highest concentrations were located more than 3 km far from Metaleurop. Extracted fractions were classified in the order  $\text{Cd} \gg \text{Zn} > \text{Pb}$  (median Cd: 3.0%, Zn: 0.6%, Pb: 0.2%, respectively). The 3 metals exhibited different relationships between  $\text{CaCl}_2$ -extracted and total concentrations. For Cd, a slight but significant positive relationship was found (log-log,  $p < 0.01$ ,  $\text{adj-R}^2 = 0.17$ , slope = 0.15). Contrarily to Cd, Pb exhibited a weak negative correlation between total and extracted concentrations (log-log,  $p < 0.01$ ,  $\text{adj-R}^2 = 0.05$ , slope = -0.14) while the relationship was not significant for Zn (log-log,  $p = 0.47$ ).

**Table III.1.1.** Summary (minimum, 1st quartile, median, 3rd quartile and maximum) of sampled soils main characteristics: location, soil properties and trace metal total and CaCl<sub>2</sub>-extracted concentrations (n = 261). The point sampled in a dredged material deposit (DSD), which exhibits extreme contamination values and was not properly a soil sample, is presented separately (n = 1). Adapted from Douay et al (2009).

	Min	1 <sup>st</sup> qu.	Med.	3 <sup>rd</sup> qu.	Max.	Outlier
<i>Location</i>						
Distance from Metaleurop Nord (km)	0.47	1.54	2.32	3.40	5.73	1.79
Wind (%)	1.4	4.9	6.8	8.5	11.1	5.2
<i>Soil properties</i>						
Sand (g.kg <sup>-1</sup> )	52.0	193.0	327.0	462.0	881.0	377.0
Silt (g.kg <sup>-1</sup> )	90.0	350.0	466.0	562.0	745.0	507.0
Clay (g.kg <sup>-1</sup> )	29.0	153.0	194.0	238.0	685.0	116.0
OC (g.kg <sup>-1</sup> )	5.3	25.9	35.3	58.5	259.0	100.9
CaCO <sub>3</sub> (g.kg <sup>-1</sup> )	0.5	0.5	3.5	28.6	208.0	115.5
CEC (cmol <sup>+</sup> .kg <sup>-1</sup> )	7.0	12.0	14.4	17.8	33.3	14.9
pH	3.8	6.0	7.2	7.9	8.3	7.5
Depth (cm)	5.0	60.0	120.0	120.0	120.0	120.0
Coarse elements (%)	0	0	0	10	90	0
Hydromorphia (index from 0 to 6)	0	1	3	4	6	4
Anthropization (index from 1 to 5)	1	1	3	5	5	5
<i>Metal concentrations (mg.kg<sup>-1</sup> dw)</i>						
Cd	0.1	2.9	5.0	10.3	236.5	2402.0
Pb	16.0	193.2	302.9	613.8	7 331.0	41 960.0
Zn	44.0	290.1	460.4	838.1	7 264.0	38 760.0
CaCl <sub>2</sub> -Cd	0.02	0.07	0.20	0.52	5.80	59.46
CaCl <sub>2</sub> -Pb	0.27	0.29	0.66	1.75	13.68	1.74
CaCl <sub>2</sub> -Zn	0.02	0.79	4.11	16.82	143.00	111.57

### III.1.3.b. Spatial dependence and prediction of TM concentrations in soils of woody habitats

The variograms showed clear spatial structures for all total and extracted TM concentrations (Figure III.1.1). Although total Zn semi-variance did not clearly show a plateau, indicating that the average concentration of this metal was not stationary over the area, the patterns of spatial auto-correlation were quite similar for the 3 total TMs. Otherwise, these patterns were rather different between total and CaCl<sub>2</sub>-extracted concentrations, and within CaCl<sub>2</sub>-extracted metals (Figure III.1.1, Table III.1.2). Notably, CaCl<sub>2</sub>-extracted concentrations spatially covaried at smaller scales than total concentrations, and among extracted, CaCl<sub>2</sub>-Pb showed the smaller range of spatial auto-correlation.

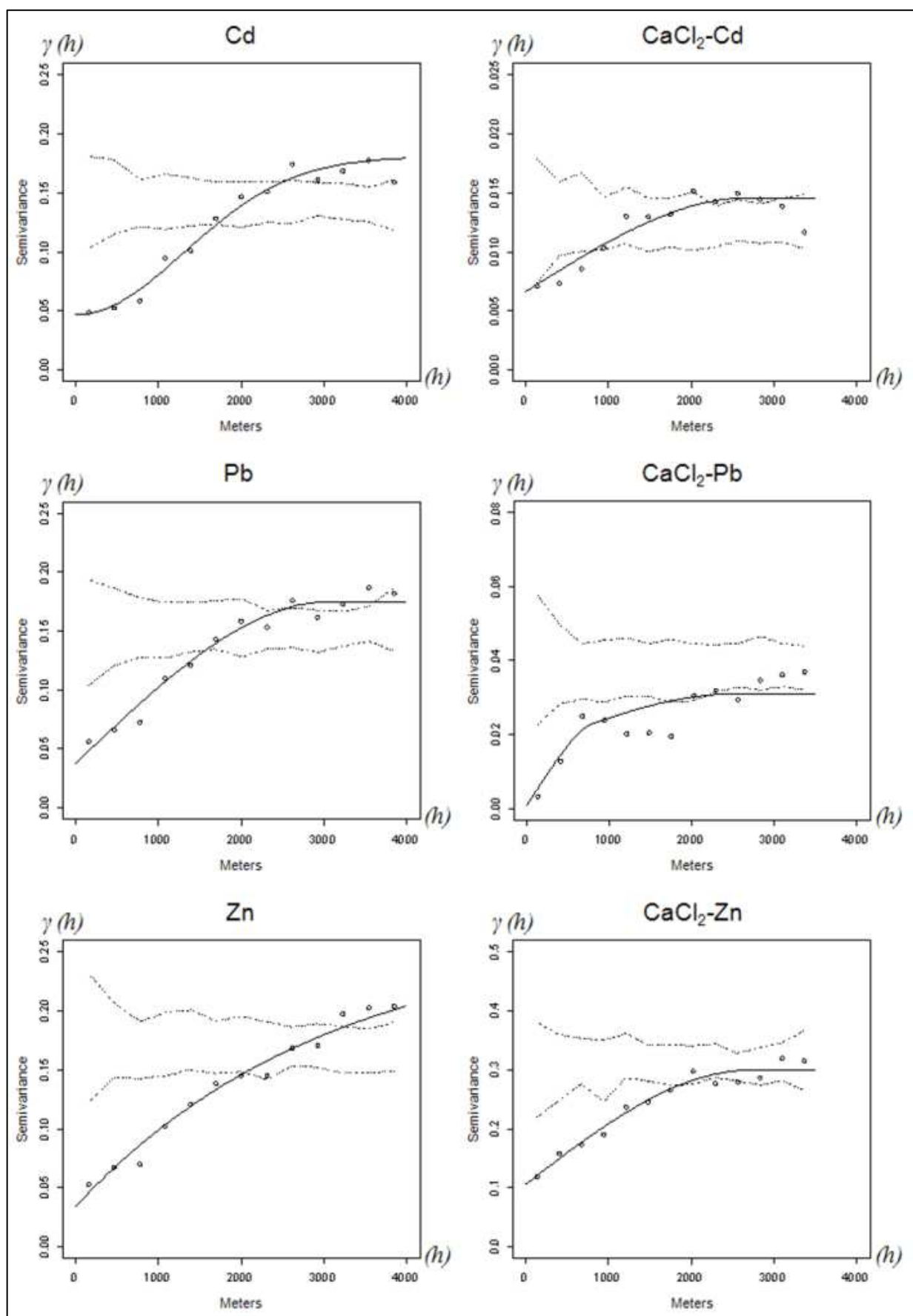
The median distance between couples of nearest points was calculated at 204.8 m. Therefore, the distance between nodes of the regular grid for kriging was fixed at 200 m. The goodness-of-fit was checked by cross-validation and showed that models accurately predicted soil values (Table III.1.2). Moreover, the median variance of kriged values was relatively low (Table III.1.2). The

median kriged values were close to median observed concentrations, but obviously lower for total concentrations and higher for  $\text{CaCl}_2$ -extracted ones because of the regularity of the grid (more values computed for points distant to Metaleurop than actually sampled, Tables III.1.1 and III.1.2).

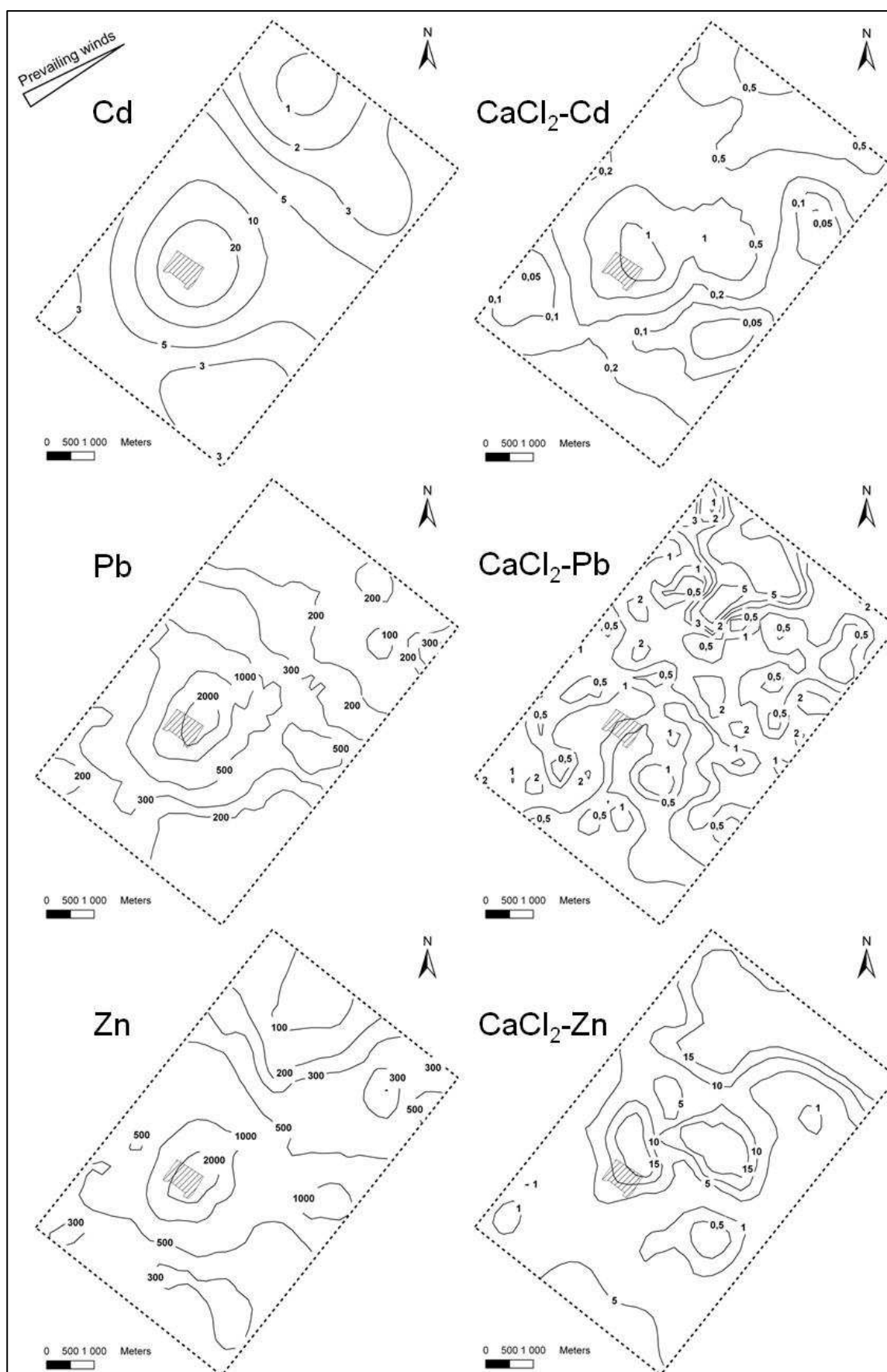
Since the matrix of dredged sediment deposit cannot be considered as a soil *sensu stricto*, this point was removed to predict TM concentrations in soils of woody habitats. The general spatial distribution pattern was similar for the 3 total TM concentrations: concentric ellipses around the former smelter with highest values close to the smelter and oriented north-east of the smelter along prevailing wind direction (Figure III.1.2). However, the Zn contamination is more extensive in the eastern part of the site than for the other metals. Concerning extracted concentrations, we noticed that the highest values were observed close to the smelter for Cd and Zn, not for Pb, for which the highest values were mostly located far from the smelter. For the three metals, the northern part of the area showed higher levels than the southern part (Figure III.1.2). Extracted TMs, and notably Pb, exhibited a strongly variable distribution over space with localized spots, contrarily to total concentrations. This is reflected by the pattern of spatial auto-correlation shown on variograms.

**Table III.1.2.** Parameters of the retained variogram models (range in meters) for total and CaCl<sub>2</sub>-extracted Cd, Pb and Zn, results of cross-validation (ME: mean error, MSPE: mean square predicted error, MDR: mean deviation ratio, *r* / *p*-value: Pearson product-moment correlation coefficient and statistical significance), median kriged values and median variance of kriged values (both expressed in mg.kg<sup>-1</sup> dw).

Metal	Variogram model				Cross-validation					Kriging	
	Correlation function	Nugget	Partial sill	Range	ME	MSPE	MDR	Correlation observed and predicted <i>r</i> / <i>p</i> -value	Correlation predicted and residuals <i>r</i> / <i>p</i> -value	Median kriged values	Median variance of kriged values
Cd	Gaussian	0.047	0.134	1850	<0.001	0.049	-0.001	0.82 / <0.001	-0.02 / 0.752	3.8	0.13
Pb	Spherical	0.038	0.137	3000	-0.002	0.076	-0.006	0.74 / <0.001	-0.09 / 0.158	234.3	0.16
Zn	Exponential	0.034	0.233	4000	< 0.001	0.066	-0.002	0.79 / <0.001	-0.05 / 0.446	380.3	0.14
CaCl <sub>2</sub> -Cd	Spherical	0.006	0.008	2750	-0.002	0.013	0.009	0.57 / <0.001	-0.07/ 0.250	0.31	0.021
CaCl <sub>2</sub> -Pb	Nested: Circular	0.001	0.015	750	0.009	0.032	0.049	0.69 / <0.001	-0.14/ 0.025	1.08	0.003
	Spherical		0.015	2500							
CaCl <sub>2</sub> -Zn	Spherical	0.106	0.192	2700	-0.004	0.179	-0.044	0.64 / <0.001	-0.04/ 0.540	5.12	0.404



**Figure III.1.1.** Empirical variograms with variographic envelopes and fitted models for total and  $\text{CaCl}_2$ -extracted Cd, Pb and Zn concentrations.



**Figure III.1.2.** Maps (iso-lines) of predicted Cd, Pb and Zn concentrations in soils of woody habitats ( $\text{mg.kg}^{-1}$  dw) using ordinary kriging for total (left) and  $\text{CaCl}_2$ -extracted (right). The localization of the former smelter is indicated with slash marks, and the study area limits (8x5 km) with a dash line.

### *III.1.3.c. Influence of distance, wind, soil properties and landscape composition on TM levels in soils*

The retained models for total and CaCl<sub>2</sub>-extracted Cd, Pb and Zn concentrations (Table III.1.3) explained a large part of variance, ranging from 62 to 85%. The lowest explanation was found for extracted Pb.

Soil total concentrations of Cd, Pb and Zn were mainly influenced by the distance from Metaleurop Nord (Table III.1.3). This variable explained 57.5, 47.7 and 43.5% of the variation for Cd, Pb and Zn, respectively. For those 3 elements, total concentrations logarithmically decreased with the distance, indicating a rapid fall of contamination from the source. The wind frequency represented the second most explanatory variable for Cd and the third one for both Pb and Zn. The principal variable explaining the extracted concentrations was the pH, the second being the total concentrations for Cd and Pb while the total concentration was not significant for Zn.

Soil characteristics affected both total and extracted soil metal concentrations but this influence was much higher for extracted than for total ones (Table III.1.3). The pH was the main variable that influenced Cd, Pb and especially Zn extracted concentrations. Extracted concentrations decreased with increasing pH but the patterns were different between Cd and Zn versus Pb. The relationship with the pH for Cd and Zn was linear while it was logarithmic for Pb: extracted Pb dramatically increased below a threshold of 5.5 pH value.

Landscape variables significantly influenced both total and extracted Cd, Pb and Zn concentrations conditionally to other variables (from 0.7 to 4.2% of explained variance, Table III.1.3). The most significant buffer sizes (radiuses) explaining soil metal concentrations were 300 and 500 m. The total concentrations of the 3 metals were positively related to the presence of copses and hedgerows within a 300m radius around the sampling point. The total concentrations of Cd and Pb were negatively correlated to the presence of urban areas. The Zn concentration (total and extracted) was positively correlated to the presence of ploughed fields. The extracted concentrations and the woodland presence were negatively correlated. The extracted concentrations of the 3 studied metals were positively correlated to the presence of scrub/shrublands around the sampling point.

We did not detect any significant influence of certain soil and landscape variables such as anthropization and hydromorphia indices, silt content and soil depth, and the presence of industrial areas, grasslands and water (canal and ponds).



**Table III.1.3.** Summary of parameters of the selected models for total and CaCl<sub>2</sub>-extracted Cd, Pb and Zn concentrations in woody soils (NS: non significant,  $p > 0.05$ ).

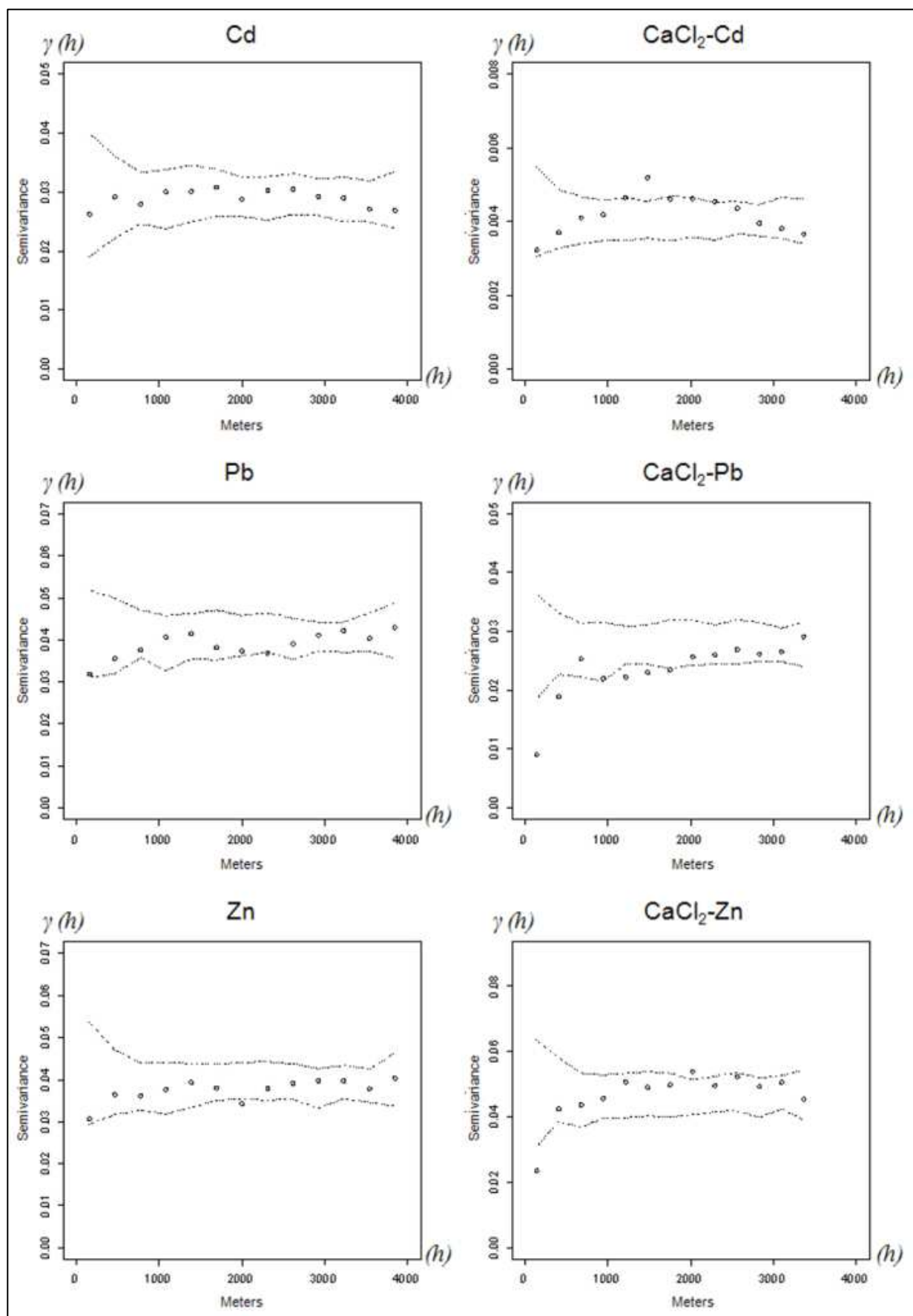
Model Adjusted R-squared	Explanatory variables in the best model	Coefficient estimates	Partial R <sup>2</sup>	p-value
<b>Cd</b>				
Log(Cd+1) ~ log(distance) + wind + log(OC) + log(CEC) + sand + copse/hedgerow300 + urban300				
Adj-R <sup>2</sup> = 0.78	Distance	-1.03	0.575	<0.01
	Wind	$3.05 \times 10^{-2}$	0.081	<0.01
	OC	$1.41 \times 10^{-1}$	0.038	<0.01
	CEC	$8.09 \times 10^{-1}$	0.058	<0.01
	Sand	$1.93 \times 10^{-4}$	0.006	0.01
	Copse/hedgerow 300 m	$7.54 \times 10^{-5}$	0.022	<0.01
	Urban 300 m	$-5.43 \times 10^{-6}$	0.004	0.03
<b>Pb</b>				
Log(Pb+1) ~ log(distance) + wind + log(OC) + log(CEC) + pH + copse/hedgerow300 + urban300				
Adj-R <sup>2</sup> = 0.71	Distance	-1.08	0.477	<0.01
	Wind	$3.04 \times 10^{-2}$	0.080	<0.01
	OC	$4.97 \times 10^{-1}$	0.109	<0.01
	CEC	$4.53 \times 10^{-1}$	0.017	<0.01
	pH	$-5.04 \times 10^{-2}$	0.015	<0.01
	Copse/hedgerow 300 m	$7.12 \times 10^{-5}$	0.017	<0.01
	Urban 300 m	$-6.99 \times 10^{-6}$	0.006	0.03
<b>Zn</b>				
Log(Zn+1) ~ log(distance) + wind + log(OC) + log(CEC) + pH + sand + copse/hedgerow300 + ploughed field300				
Adj-R <sup>2</sup> = 0.77	Distance	$-7.01 \times 10^{-1}$	0.435	<0.01
	Wind	$2.47 \times 10^{-2}$	0.062	<0.01
	OC	$3.88 \times 10^{-1}$	0.122	<0.01
	CEC	$6.45 \times 10^{-1}$	0.051	<0.01
	pH	$7.29 \times 10^{-2}$	0.056	<0.01
	Sand	$2.32 \times 10^{-4}$	0.006	<0.01
	Copse/hedgerow 300 m	$1.02 \times 10^{-4}$	0.032	<0.01
Ploughed field 300 m	$8.22 \times 10^{-6}$	0.010	<0.01	
<b>CaCl<sub>2</sub>-Cd</b>				
Log(CaCl <sub>2</sub> -Cd +1) ~ log (Cd+1) + pH + log(CEC) + clay + Coarse elements + woodland300 + scrub/shrubland300				
Adj-R <sup>2</sup> = 0.77	Cd	$2.99 \times 10^{-1}$	0.169	<0.01
	pH	$-1.04 \times 10^{-1}$	0.500	<0.01
	CEC	$-3.39 \times 10^{-1}$	0.032	<0.01
	Clay	$5.15 \times 10^{-4}$	0.026	<0.01
	Coarse elements	$9.69 \times 10^{-4}$	0.015	<0.01
	Woodland 300 m	$-5.55 \times 10^{-6}$	0.018	<0.01
	Scrub/shrubland 300 m	$9.48 \times 10^{-6}$	0.014	<0.01
<b>CaCl<sub>2</sub>-Pb</b>				
Log(CaCl <sub>2</sub> -Pb +1) ~ log(Pb+1) + log(pH) + CaCO <sub>3</sub> + log(CEC) + log(OC) + sand + scrub/shrubland500				
Adj-R <sup>2</sup> = 0.62	Pb	$-1.70 \times 10^{-2}$	0.052	<0.01
	pH	-2.25	0.489	<0.01
	CaCO <sub>3</sub>	$1.13 \times 10^{-3}$	0.041	<0.01
	CEC	$-3.59 \times 10^{-1}$	0.009	0.01
	OC	$2.02 \times 10^{-1}$	0.011	0.01
	Sand	$-2.83 \times 10^{-4}$	0.021	<0.01
	Scrub/shrubland 500 m	$4.44 \times 10^{-6}$	0.007	0.04
<b>CaCl<sub>2</sub>-Zn</b>				
Log(CaCl <sub>2</sub> -Zn +1) ~ log(Zn+1) + pH + Scrub/schrubland500 + ploughed field500 + woodland500				
Adj-R <sup>2</sup> = 0.85	Zn	$8.11 \times 10^{-1}$	0.002	NS
	pH	$-5.32 \times 10^{-1}$	0.829	<0.01
	Scrub/shrubland 500 m	$1.64 \times 10^{-5}$	0.008	<0.01
	Ploughed field 500 m	$2.34 \times 10^{-6}$	0.009	<0.01
	Woodland 500 m	$-4.81 \times 10^{-6}$	0.005	<0.01

### *III.1.3.d. Spatial structure and distribution of TMs in soils taking into account explanatory variables*

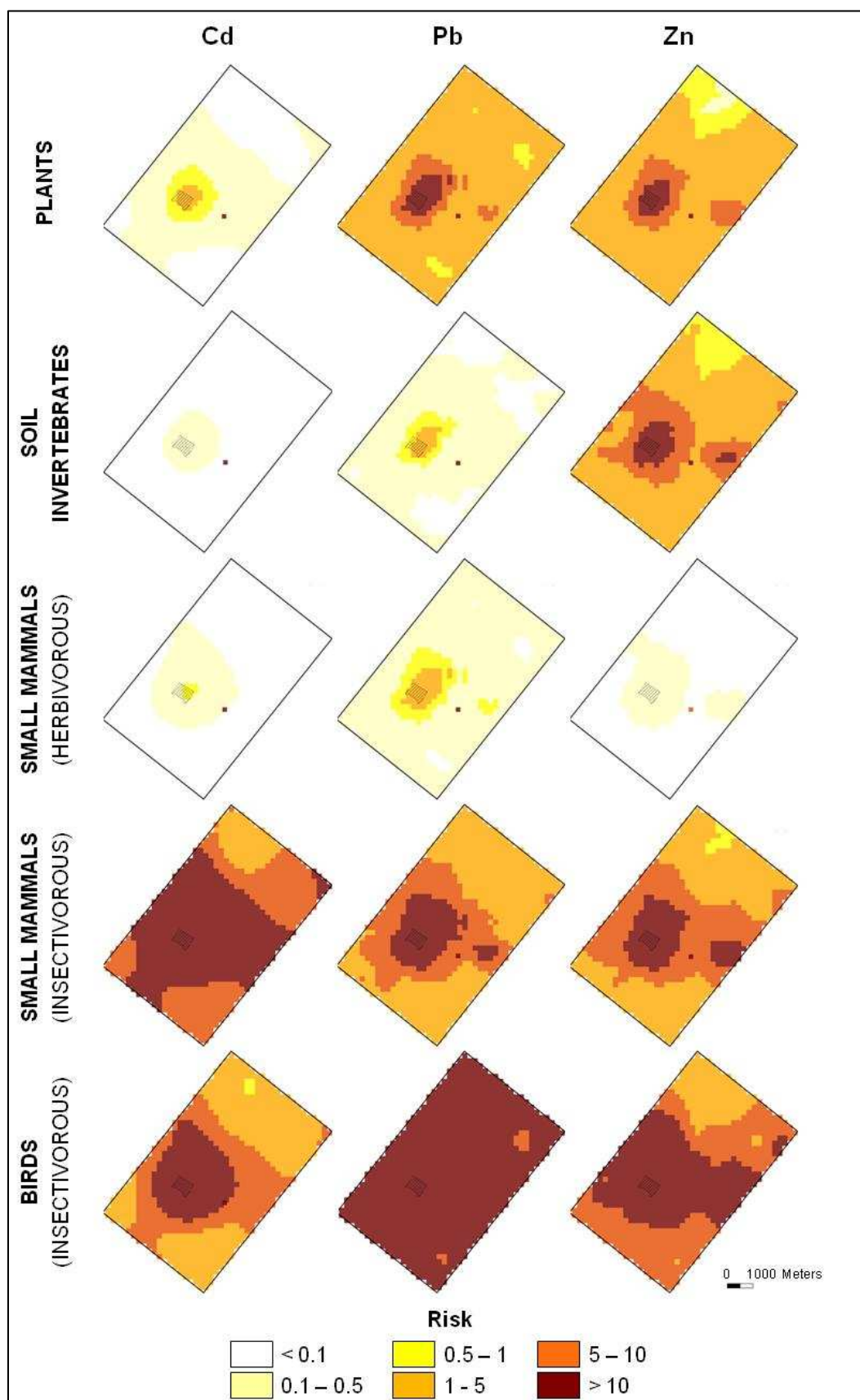
The values of semivariance calculated on the variograms of concentration residuals (i.e. metal concentrations normalized upon explanatory variables identified in the previous step, the models being used to define a spatial trend) were much lower than the values observed without the spatial trend, indicating that a large part of the TM concentration variability was explained by the spatial trends (Figures III.1.1 and III.1.3). Concerning total TM concentrations and  $\text{CaCl}_2\text{-Cd}$ , we did not detect spatial auto-correlation as residual variograms did not exhibit a spatial structure (Figure III.1.3). Therefore, the spatial structure of total TM and  $\text{CaCl}_2\text{-Cd}$  concentrations in soils is carried by the spatial trend, suggesting that the variables which defined TM spatial distribution were accurately identified. For extracted Pb and Zn, however, a slight spatial auto-correlation still was observed for low separation distances (Figure III.1.3). This suggests that the spatial distribution of extracted Pb and Zn concentrations was also marginally influenced by variables acting at local spatial scale, which had not been identified in the spatial trend.

### *III.1.3.e. Risk maps using Eco-SSLs*

Risk indices indicated that adverse effects might occur for all considered groups of organisms, depending on the metal of concern (Figure III.1.4). Although matrix of dredged sediment deposit cannot be considered a soil, organisms living in this area might be exposed to TMs and we consequently considered this sampling point for risk calculations. The calculated risk index reached extremely high values, up to 324 for woody habitat and 6672 on the dredged sediment deposit. Generally, species might be at risk for adverse effects in areas surrounding the former smelter and on the dredged sediment deposit area. The lower risk values were observed mainly in the forest of Phalempin (north of the study site). Plants could be at risk notably for Pb and Zn: soil TM concentrations exceed the Eco-SSL over 0.8, 39 and 36  $\text{km}^2$  for Cd, Pb and Zn, respectively. Soil invertebrates were supposed to be at risk for Zn notably and to a lower extent for Pb and Cd. TM soil concentrations higher than Eco-SSLs were found over 37 and 1  $\text{km}^2$  for Zn and Pb, respectively. Concerning Cd, the dredged sediment deposit area was the only place found to pose risk to soil invertebrates. Insectivorous birds and small mammals should be at risk for all TMs over nearly the whole studied area (except 0.2  $\text{km}^2$  considering Cd for birds and 0.7  $\text{km}^2$  considering Zn for insectivorous small mammals). Moreover, the risk index for these groups reached extremely high values over large surfaces: predicted concentrations in soils exceeded the Eco-SSLs by a factor equal or higher than 10 over surfaces of 6.2 to 39.5  $\text{km}^2$ . Contrarily, the risk for herbivorous small mammals was supposed to be limited, notably concerning Cd and Zn, for which Eco-SSLs were exceeded only at the dredged sediment deposit location. Herbivorous small mammals might be more at risk for Pb: Eco-SSL was exceeded over 1.8  $\text{km}^2$ .



**Figure III.1.3.** Empirical variograms with variographic envelopes for total and  $\text{CaCl}_2$ -extracted Cd, Pb and Zn residuals (concentrations normalized upon defined spatial trend).



**Figure III.1.4.** Risk maps of Cd, Pb and Zn based on ecological soil screening levels (Eco-SSLs, US EPA. Risk = soil value / Eco-SSL value) for plants, soil invertebrates, small mammals (herbivorous and ground insectivorous) and birds (ground insectivorous). The localization of the former smelter is indicated with slash marks, and the study area limits (8x5 km) with a black line.

### III.1.4. Discussion

Generally, the numerous processes that influence metal concentrations in soils are studied separately. The present integrated study allowed determining, in smelter-impacted topsoils of woody habitats over a large area, which variables explain the spatial variability of soil total and available concentrations and their relative importance. Our findings evidence that different processes govern total and available TMs in studied soils: variables primarily involved in explaining total soil TM concentrations were related to input (emission and deposition) and retention of metals while variables primarily involved in conditioning CaCl<sub>2</sub>-extracted TM concentrations were related to the solubility of metals in soils. These processes act at different spatial scales and factors affecting extracted concentrations varied at smaller spatial ranges than those modulating total concentrations. Such differences in processes affecting TM concentrations in soils resulted in a different spatial distribution pattern of total or extracted TMs over the polluted area, which has a strong implication in terms of risk assessment, as discussed hereafter.

Considering the coefficients of determination obtained when modelling the influence of environmental variables and soil properties on total and CaCl<sub>2</sub>-extracted TMs in soils and the remaining spatial auto-correlation taking into these explanatory variables, our results strongly suggest that the main variables governing metal levels in soils have been identified. Nevertheless, a non negligible part of variance remained unexplained. This suggests that other variables which have not been taken into account here influence soil contamination. Particularly, other landscape characteristics, additional metal inputs and soil management related to anthropogenic activities and/or metal speciation in soils might influence TM total or CaCl<sub>2</sub>-extractable levels in soils surrounding the former smelter.

#### *III.1.4.a. Influence of distance from the smelter, wind and soil properties on the spatial distribution of TM concentrations in soils*

Total TM concentrations exhibited a high spatial auto-correlation, over a range of several kilometres. Their spatial distributions corresponded to concentric ellipses of iso-concentrations around the smelter and oriented toward north-east. The variables mainly involved in explaining total TM concentrations in soils and their spatial distributions were the distance from the former Pb- and Zn-smelter “Metaleurop Nord” and, to a lesser extent, the wind and the organic carbon. Therefore, it appears consistent that the plume with the highest levels was found close the smelter, and downwind.

Such variables (distance from point source, wind, OC in soil) are related to transport, deposition and retention processes of heavy metals, which act at large spatial scale (at a range of kilometres for distance from source and wind). This is in agreement with previous studies on the contamination of the environment by smelter emissions, showing that polluted surfaces generally extended from one to several tens of km around the source (Rieuwerts and Farago, 1996; Chopin

and Alloway, 2007a). The relation to distance and particularly the expanse of contaminated surfaces could vary because of the type and quantity of emissions, smelter size, chimney height, winds (frequency, speed and direction) and topography (Goodarzi et al., 2001; Chopin and Alloway, 2007a). In this study, we observed a logarithmic decrease of metal concentrations in woody topsoils with the distance from the source, consistently with studies concerning point sources and notably non-ferrous smelters (Rieuwerts et al., 1999; Martley et al., 2004; Suchara and Sucharova, 2004; Ettler et al., 2005; Hasselbach et al., 2005). On the site of Metaleurop Nord, other sources of contamination could have occurred, notably traffic emissions, agricultural chemicals and solid fuel combustion (Pacyna et al., 2007). Some authors have suggested that an absence of clear correlation between soil contamination and distance from a smelter and/or the presence of hot spots distant to the point source could indicate additional sources of contamination (Verner et al., 1996; Douay et al., 2007). In our study, only one point was considered as a hot-spot distant from the smelter. This sample corresponds to a dredged sediment deposit, exhibiting extremely high metal concentrations, comparable to concentrations found in other sediment samples from the Deûle canal (Vdovic et al., 2006; Boughriet et al., 2007). The presence of this deposit points out the possible influence of embankments and deposits on soil contamination and their importance for wildlife exposure to contaminants. However, the influence of these deposits, which are random and localized, may result in either an increase or a decrease of expected concentrations, depending on the supply of polluted or non-polluted material and cannot be predicted without a detailed knowledge on the history of each land parcel (van Oort et al., 2009). As a consequence, our findings suggest that the former Metaleurop Nord smelter was the principal source of metal contamination over the study area. This corroborates the studies of Franssens et al (2004) and Bourennane et al (2010), who evidenced the prevailing role of Metaleurop in Cd, Pb and Zn enrichment in soils of this area.

Our study showed an enhancement of soil contamination for downwind points that was also reported in some studies (Suchara and Sucharova, 2002; Ettler et al., 2005; Rawlins et al., 2006). However, the effect of wind on soil contamination, has not systematically been observed (Rieuwerts and Farago, 1996; Chopin and Alloway, 2007a). Indeed, it has been shown that wind effect can be modulated by regional climatic particularities and could be modulated by elevation and topography (for instance, channelling or restricting effect on particle movement due to local barrier) (Antonic and Legovic, 1999; Goodarzi et al., 2001; Hasselbach et al., 2005). The location of Metaleurop Nord smelter in a flat region could have therefore favoured the influence of the wind on the dispersal of polluted dusts.

The 2nd or 3rd most explanatory variable (depending on the metal considered) was the OC. Soil organic matter, which is closely related to OC, has been found to be a key factor controlling adsorption and retention of TMs by providing a large quantity of adsorption sites (Alloway, 1995; Sauvé et al., 2000; Cancès et al., 2003; Carrillo-Gonzalez et al., 2006; Lair et al., 2007). Therefore, this could explain the positive relationship between OC and TM levels in soils. Soil properties

(other than OC) and landscape composition also influenced soil TM total concentrations but, owing their respective weights in the models, they might be considered as secondary variables. Notably, pH, sand content and CEC were significant variables, which is in accordance with several studies showing the role of these variables on metal solubility and immobilization in soils (Alloway, 1995; Carrillo-Gonzalez et al., 2006; Zhang et al., 2006; Covelo et al., 2008).

Extracted concentrations showed a high spatial auto-correlation but over a smaller spatial scale than total concentrations. Their spatial distributions differed from those of total concentrations (showing more localized spots than total TMs), and among metals. For Cd and Zn, the highest levels were found close to the smelter and northern of the area. For Pb, high levels were only located northern of the area. The pH was the most important variable in explaining levels and spatial distributions of extracted metal concentrations and accounted for presence of high levels northern of the area (where the pH is relatively low: 5.4 on average northern of the area and 7.3 on average southern) and more localized spots than for total concentrations.

It is known that pH dramatically affects the mobility of metals in soil because of its influence on solubility and could vary at relatively local spatial range within a given site (range of meters to few hundreds of meters) (Gambrell, 1994; Alloway, 1995; Sauvé et al., 2000; Carrillo-Gonzalez et al., 2006; Zhang et al., 2006). The present work, which concerned soils of woody habitats over a large smelter-impacted area, confirmed the crucial role of pH on TM mobility in heavily polluted soils under field conditions. Moreover, in our dataset, the principal limiting factor for TM extractability was the pH whereas total concentrations poorly determined the extracted values. Such a result appears to be reliable owing to the influence of soil pH on  $\text{CaCl}_2$ -extractability and the large range of pH values measured over the study area (Ciesielski et al., 2007). Moreover, as previously reported in soils from Metaleurop and others, extracted fractions were classified in the order  $\text{Cd} \gg \text{Zn} > \text{Pb}$  (Cancès et al., 2003; Sauvé et al., 2003; François et al., 2004; Zhang et al., 2006). The extractability of Zn was extremely pH-dependent. Conversely, for Cd, the total concentration was more important in explaining extractability than for Pb and Zn, reflecting the high environmental mobility of this metal (Alloway, 1995; Adriano, 2001). Lead was the least mobile metal and the relationship between extracted and total concentrations suggested that Pb was immobilized in highly polluted soils, probably because of precipitation processes and formation of high-molecular-weight organo-Pb complexes (Alloway, 1995; Adriano, 2001; Singh and Oste, 2001). Several authors emphasized the fact that models predicting partitioning or sorption based on soil characteristics (notably pH, CEC, OC...) and total metal contents failed in accurately modelling Pb speciation (Sauvé et al., 2000; MacDonald and Hendershot, 2006; Bonten et al., 2008). They suggested that this could be due to the formation of Pb-precipitates in heavily polluted soils, immobilizing Pb and then hampering accurate modelling. Within the framework of the STARTT programme, the molecular speciation of heavy metals in soils sampled close to Metaleurop has been studied by Manceau et al. (Manceau et al., in prep.). This study identified pyromorphite ( $\text{Pb}_5(\text{PO}_4, \text{AsO}_4)_3\text{Cl}$ ) by micro X-ray diffraction, which is an immobile mineral, highly stable,

occurring in presence of phosphate in heavily polluted soils (Sauvé et al., 1997; Carrillo-Gonzalez et al., 2006). The presence of Pb in particular immobile chemical forms in the most contaminated soils probably explains the negative relationship between total and extracted Pb concentrations, and why a spatial auto-correlation remained at local scale even controlling for total concentration and pH. Similar hypothesis on speciation and extractability could be proposed for Zn, since this metal did not show any relationship between extracted and total concentrations. Moreover, spatial auto-correlation still existed at low separation distance, even after adding a spatial trend. These findings suggest that, for Pb and Zn, different chemical forms were present in soils of highly polluted areas and influenced the spatial distribution of extracted concentrations. Differences in Pb speciation between highly polluted soils impacted by mining and/or smelting activities and less polluted soils located further from the sources have been frequently evidenced (Rieuwerts et al., 2000; Ettler et al., 2005; Chopin and Alloway, 2007b; van Oort et al., 2007; van Oort et al., 2009). In several cases, poorly mobile metallic forms of Pb derived from the smelter emissions have been shown in polluted soils (Sobanska et al., 2000; Ettler et al., 2005; Chopin and Alloway, 2007b). For instance, Pb associated with sulfur has been found in polluted soils and dusts from smelters (Alloway, 1995; Sobanska et al., 1999; Adriano, 2001; Ettler et al., 2005). However, Pb availability has not systematically been found to increase with distance to the plants, highlighting site-specific patterns of emissions, deposition and speciation, related to both smelter particularities and soil properties.

#### *III.1.4.b. Influence of landscape on TM concentrations in soils*

When quantifying the influence of landscape conditionally to soil properties, we observed that the landscape composition surrounding the sampling point influenced both total and  $\text{CaCl}_2$ -extracted concentrations. Generally, only the land use of the point itself is considered to have such an influence (Skrivan et al., 1996; Fowler et al., 1998; Branford et al., 2004; Fowler et al., 2004; Ettler et al., 2005; Magiera and Zawadzki, 2007). Our study evidenced a significant effect of the landscape, most relevant buffer sizes being 300 and 500 m, rather than smaller ranges like 50 or 100 m. The landscape played therefore a role at a spatial scale describing the mosaic of land use around the sampling point. The influence of landscape may be related to 3 major processes: interception (and the resulting deposition), retention and cycling of metals through food webs. In a study concerning roughness variations of terrain in highly heterogeneous natural landscapes in northern Belgium, De Ridder (2003) concluded that the length scale of the horizontal roughness variations ranged from 200 to 1500 m. Our findings concerning the range of land use influence on total and extracted concentrations reinforce these results. Among the landscape variables that influenced metal concentrations, the presence of copses and hedgerows appeared as the most important, showing positive relationships with total concentrations in woody soils. This may be due to a higher roughness because of larger surfaces of interception and edge effect. Indeed, the influence of land use on metal deposition and contamination for different chemicals has been



studied, and an enhancement has been proved in woodlands compared to grasslands, openlands, moorlands and heathlands (Skrivan et al., 1996; Fowler et al., 1998; Branford et al., 2004; Fowler et al., 2004; Ettler et al., 2005; Magiera and Zawadzki, 2007). An increase of the deposition due to edge effect has also been emphasized (Draaijers et al., 1994; De Jong and Klaassen, 1997; Ould-Dada et al., 2002; Branford et al., 2004; De Ridder et al., 2004). We found a significant effect of copse/hedgerow presence but we did not detect any effect of woodland presence on soil total contamination, which could be related with the processes involved in edge effect. The two main processes involved are advection (i.e. changes in air turbulence behind the edge and reduced boundary layer resistance) and inflow (i.e. input of pollutants by wind in the edge, allowing direct contact with vegetation) (De Jong and Klaassen, 1997; Branford et al., 2004; De Ridder et al., 2004). However, advection occurs over large distances while inflow mostly acts on the first 100 m of woodlands. The deposition at forest edges can exceed many times the deposition at the forest interior, with upwind edges being more exposed to dry deposition (De Ridder et al., 2004). The enhancement of the edge effect on deposition is increased with the length of open land preceding the woodland and areas constituted of sparsely and very small forests were especially exposed to edge deposition effect (De Jong and Klaassen, 1997; De Ridder et al., 2004). Our results therefore suggest that inflow was the predominant process leading to the enhancement of soil contamination and that the edge effect had a stronger influence in areas with copses/hedgerows than in large woodland patches.

The influence of other landscape variables (presence of urban areas or ploughed fields) on total metal concentrations could be related to the input of pollutants (additional sources of metals, polluted or unpolluted soil deposits in the context of urban planning) and the cycling of metals in the landscapes of concerns.

As for total concentrations, soil properties (other than pH) and landscape composition secondarily explained extracted concentrations. Notably, the presence of scrub/shrublands, woodlands and/or ploughed fields in the surroundings of sampling points influenced levels of  $\text{CaCl}_2$ -extracted concentrations of Cd, Pb and Zn. Such an influence of landscape on extractability could be related to the fact that landscape composition may affect cycling and retention of metals and their chemical forms in soils of the ecosystem. Certain landscape variables, which are almost never considered in studies focusing on pollutant availability, have as much influence as certain soil properties, generally considered to exert a crucial influence on metal mobility in soils. Further investigations are needed to interpret reliably the cause-effect relationships explaining how landscape composition may affect total or available metal concentrations.

#### *III.1.4.c. Levels of contamination of the study site in a risk assessment perspective*

The study area is heavily polluted regarding both level and expanse of soil contamination. High concentrations of TMs in soils closedown Pb- and/or Zn-smelters have been found worldwide. Soils surrounding Metaleurop Nord exhibited levels of Cd, Pb or Zn consistent with other studies

(Rieuwerts and Farago, 1996; Verner et al., 1996; Ullrich et al., 1999; Li and Thornton, 2001; Rogival et al., 2006; Chopin and Alloway, 2007a; Douay et al., 2007; Yan et al., 2007; Du et al., 2008). However, the particularity of this site lies in the fact that the values rarely reached so elevated contaminations for the 3 metals together.

On the basis of ecological soil screening levels proposed by the US EPA (USEPA, 2005a, b, c), adverse effects of TMs in wildlife are likely to occur over Metaleurop Nord surroundings. Surfaces where animals might be at risk were extremely large notably for insectivorous vertebrates. However Eco-SSLs for insectivorous animals are lower than or close to regional background TM levels in soils (for instance,  $0.36 \text{ mg.kg}^{-1}$  Cd for small mammals while the background value is  $0.2 \text{ mg.kg}^{-1}$ , and  $11.0 \text{ mg.kg}^{-1}$  Pb for birds whereas the background value is  $53.3 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), suggesting that Eco-SSLs for these trophic groups are overestimated. In the guidance for using Eco-SSLs, US EPA explained that soil factors affecting bioavailability were considered for Eco-SSL value calculations, and that screening levels are appropriate only for soils exhibiting certain ranges of pH values and organic matter contents ( $4.0 < \text{pH} < 8.5$ , OM content  $\leq 10\%$ ) (USEPA, 2005d). A great majority of studied soils fell within the ranges of soil parameters, but approximately 20% of samples (mostly located around the former smelter) exhibit levels of OM content higher than 10%, resulting in a potentially low bioavailability. Therefore, risk may be overestimated in the vicinity of the former smelter. Even if risk assessment procedures currently consider total concentrations, many studies have emphasized that biological effects often are more related to the biologically available fraction of a contaminant in a soil rather than to its total concentration (ISO, 2008). In the case of Metaleurop Nord, contrarily to total TM concentrations, highest available TM concentrations have not only been found around the smelter. Indeed, within a 1-km radius around the former smelter, average concentrations were of 40, 1987, 2140  $\text{mg.kg}^{-1}$  for total Cd, Pb and Zn, respectively, and 1.1, 0.6, 16.0 for  $\text{CaCl}_2$ -extracted Cd, Pb and Zn, respectively. Considering samples located 4-km and more away from the smelter, average concentrations were of 2, 186, 262  $\text{mg.kg}^{-1}$  for total Cd, Pb and Zn, respectively, and 0.5, 3.4, 18.5 for  $\text{CaCl}_2$ -extracted Cd, Pb and Zn, respectively. The spatial location of high available concentrations strongly suggests that risk may be high not only close to the ancient factory but also several kilometres far away from it, for instance in the forest of Phalempin located north of the study area. This may be of particular importance for environmental as well as for human risk assessment since forests are usually favourable habitats for fauna reproduction and feeding. Moreover, they constitute recreational areas, which are intensively frequented by people and where hunting and picking (fruits, nuts...) are likely to occur. According to Eco-SSLs, risk may be strong for insectivorous small mammals but limited for herbivorous ones considering both the levels reached by the risk index and the spatial extent of areas where animals should be at risk. However, studying levels of TM and metal-binding proteins, i.e. metallothioneins in small mammals of Metaleurop Nord site, we found that shrews exhibited high levels of MTs in relation to metal accumulation, suggesting a capability to protect themselves against metal injury, while the increase

of MTs with metal accumulation in rodents was slight or absent (Fritsch et al., 2010). Moreover, shrews have been found to be less sensitive to metal-induced stress in polluted natural environments than rodents (Shore and Rattner, 2001). Therefore these findings on rodents and shrews susceptibility to metal-induced stress are not in accordance with the risk assessment based on Eco-SSLs. However, the US EPA emphasized some limitations of the use of Eco-SSLs and the relevance of these values has been questioned, notably concerning toxicity reference values for certain groups (Regan et al., 2002; USEPA, 2005d; Allard et al., 2009; Buekers et al., 2009). We also end up in such conclusions using Eco-SSLs for risk assessment. Otherwise, these results found on small mammals showed that internal TM concentrations in animals decreased with distance from the former smelter, suggesting that accumulated levels, and therefore associated toxic effects, might be more related to total than to extracted TM concentrations in soils. As a conclusion, it seems that neither environmental availability evaluated by chemical extracts, nor Eco-SSL values allow accurately identifying areas within a polluted site where soil TMs may pose risk for wildlife.

### III.1.5. Conclusions

Our study shows that the understanding of spatial distribution and variability of both total and extracted Cd, Pb and Zn concentrations in soils may be improved by changing our scale of perception from local soil properties to landscape composition, wind and distance from the source. In this study, we combined the analysis of factors related to several mechanisms (emission and deposition, retention and mobility). While total concentrations in soils mainly depended on input and retention of metals, CaCl<sub>2</sub>-extracted ones were principally modulated by the mobility of metals. The landscape, which is less considered in ecotoxicological studies than soil properties, influenced both total and CaCl<sub>2</sub>-extracted concentrations of TM in soils, and might therefore be a significant factor modulating exposure of wildlife to pollutants. This work also provided a spatially detailed but temporally specific (i.e. 7 years after the closure of the smelter) picture on the variables explaining the spatial distribution of extracted and total concentrations of metal in woody topsoils impacted by a smelter during more than one century. Soil total and extracted contaminations and the associated risks might change over time because of the intrinsic dynamic of metal speciation, mobility and cycling and also the extrinsic dynamic of the polluted area (vegetation, climate change, land use, urban planning...). This argues for a long-term monitoring of the site and the need to consider land use and landscape for both risk assessment and polluted soil management. Since soils of Metaleurop Nord surroundings are heavily polluted, and neither chemical soil TM extracts nor Eco-SSLs seemed relevant methods to identify areas where TMs may pose risk for wildlife, the present results highlight the need to conduct thorough ecological risk assessment within this site.

**Acknowledgements** - The authors gratefully thank Cécile Grand from ADEME (*Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie*) and Brice Mourier for many fruitful scientific discussions. This work was financially supported by the STARTT programme, which is cofunded by ANR (*Agence Nationale de la Recherche*, contract n°ANR-05-ECCO-004) and ADEME (contract n°0572C0058). Clémentine Fritsch was financially supported by a grant from ADEME and the *Conseil Régional de Franche-Comté*. The authors are indebted to the two anonymous reviewers for improving the manuscript.

### III.1.6. References

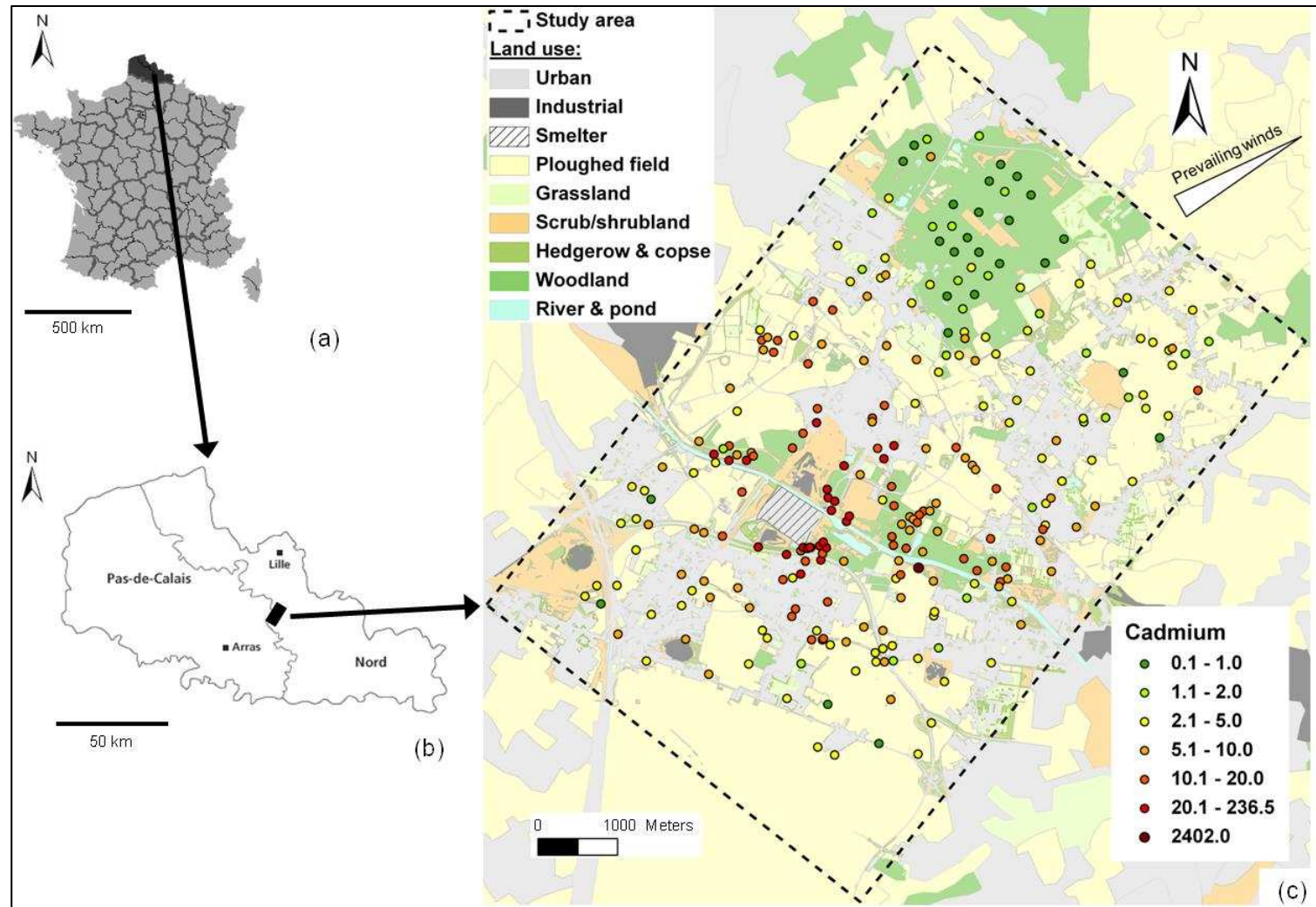
- Adriano, D., 2001. Trace elements in terrestrial environment: Biogeochemistry, bioavailability and risks of metals, 2nd ed. Springer-Verlag, New-York, NY, USA.
- AFNOR, 1996. Qualité des sols - Méthodes chimiques - sols sédiments, mise en solution totale par attaque acide - NF X31-147. Association Française de Normalisation, Paris, France.
- Ali-Khodja, H., Boumegoura, N., Habbas, B., 2005. Spatio-temporal deposition fluxes of dust and trace elements around a cement plant in the vicinity of Hamma Bouziane, Algeria. *Fresenius Environ. Bull.* 14, 237-247.
- Allard, P., Fairbrother, A., Hope, B.K., Hull, R.N., Johnson, M.S., Kapustka, L.A., Mann, G., MacDonald, B., Sample, B.E., 2009. Recommendations for the development and application of wildlife toxicity reference values. *Integr. Environ. Assess. Manage.* 6, 28-37.
- Alloway, B.J., 1995. Heavy metals in soils. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK.
- Antonic, O., Legovic, T., 1999. Estimating the direction of an unknown air pollution source using a digital elevation model and a sample of deposition. *Ecol. Model.* 124, 85-95.
- Baker, S., Herrchen, M., Hund-Rinke, K., Klein, W., Kordel, W., Peijnenburg, W., Rensing, C., 2003. Underlying issues including approaches and information needs in risk assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 6-19.
- Bivand, R.S., Pebesma, E.J., Gómez-Rubio, V. (Eds.), 2008. Applied spatial data analysis with R. Springer+Business Media, LLC, New York, USA.
- Bonten, L.T.C., Groenenberg, J.E., Weng, L., Van Riemsdijk, W.H., 2008. Use of speciation and complexation models to estimate heavy metal sorption in soils. *Geoderma* 146, 303-310.
- Boughriet, A., Proix, N., Billon, G., Recourt, P., Ouddane, B., 2007. Environmental impacts of heavy metal discharges from a smelter in Deûle-canal sediments (northern France): Concentration levels and chemical fractionation. *Water Air Soil Pollut.* 180, 83-95.
- Bourennane, H., Douay, F., Sterckeman, T., Villanneau, E., Ciesielski, H., King, D., Baize, D., 2010. Mapping of anthropogenic trace elements inputs in agricultural topsoil from Northern France using enrichment factors. *Geoderma* 157, 165-174.
- Branford, D., Fowler, D., Moghaddam, M.V., 2004. Study of aerosol deposition at a wind exposed forest edge using <sup>210</sup>Pb and <sup>137</sup>Cs soil inventories. *Water Air Soil Pollut.* 157, 107-116.
- Buekers, J., Steen Redeker, E., Smolders, E., 2009. Lead toxicity to wildlife: Derivation of a critical blood concentration for wildlife monitoring based on literature data. *Sci. Total Environ.* 407, 3431-3438.
- Cancès, B., Ponthieu, M., Castrec-Rouelle, M., Aubry, E., Benedetti, M.F., 2003. Metal ions speciation in a soil and its solution: experimental data and model results. *Geoderma* 113, 341-355.
- Carrillo-Gonzalez, R., Simunek, J., Sauve, S., Adriano, D., 2006. Mechanisms and pathways of trace element mobility in soils. *Adv. Agron.* 91, 111-178.
- Chopin, E., Alloway, B., 2007a. Distribution and mobility of trace elements in soils and vegetation around the mining and smelting areas of Tharsis, Riotinto and Huelva, Iberian Pyrite Belt, SW Spain. *Water Air Soil Pollut.* 182, 245-261.
- Chopin, E.I.B., Alloway, B.J., 2007b. Trace element partitioning and soil particle characterisation around mining and smelting areas at Tharsis, Riotinto and Huelva, SW Spain. *Sci. Total Environ.* 373, 488-500.
- Ciesielski, H., Guérin-Lebourg, A., Proix, N., 2007. Effet du pH sur l'extraction des éléments traces métalliques dans les sols. *Etude et Gestion des Sols* 14.
- Covelo, E.F., Matías, J.M., Vega, F.A., Reigosa, M.J., Andrade, M.L., 2008. A tree regression analysis of factors determining the sorption and retention of heavy metals by soil. *Geoderma* 147, 75-85.
- Cressie, N., 1988. Spatial prediction and ordinary kriging. *Math. Geol.* 20, 405-421.
- De Jong, J.J.M., Klaassen, W., 1997. Simulated dry deposition of nitric acid near forest edges. *Atmos. Environ.* 31, 3681-3691.
- De Ridder, K., 2003. Horizontal scale of roughness variations for realistic landscapes. *Bound.-Layer Meteor.* 109, 49-57.
- De Ridder, K., Neiryck, J., Mensink, C., 2004. Parametising forest edge deposition effective roughness length. *Agric. For. Meteorol.* 123, 1-11.

- Douay, F., Pruvot, C., Roussel, H., Ciesielski, H., Fourier, H., Proix, N., Waterlot, C., 2008. Contamination of urban soils in an area of Northern France polluted by dust emissions of two smelters. *Water Air Soil Pollut.* 188, 247-260.
- Douay, F., Pruvot, C., Waterlot, C., Fritsch, C., Fourier, H., Lorette, A., Bidar, G., Grand, C., de Vaufleury, A., Scheifler, R., 2009. Contamination of woody habitat soils around a former lead smelter in the North of France. *Sci. Total Environ.* 407, 5564-5577.
- Douay, F., Roussel, H., Fourier, H., Heyman, C., Chateau, G., 2007. Investigation of heavy metal concentrations on urban soils, dust and vegetables nearby a former smelter site in Mortagne du Nord, Northern France. *J. Soils Sed.* 7, 143-146.
- Draaijers, G.P.J., Van Ek, R., Bleuten, W., 1994. Atmospheric deposition in complex forest landscapes. *Bound.-Layer Meteor.* 69, 343-366.
- DRIRE, 2003. L'industrie au regard de l'environnement. Direction Régionale de l'Industrie de la Recherche et de l'Environnement, p. 308.
- Du, P., Xue, N., Liu, L., Li, F., 2008. Distribution of Cd, Pb, Zn and Cu and their chemical speciations in soils from a peris-melter area in northeast China. *Environ. Geol.* 55, 205-213.
- Ettler, V., Vanek, A., Mihaljevic, M., Bezdicka, P., 2005. Contrasting lead speciation in forest and tilled soils heavily polluted by lead metallurgy. *Chemosphere* 58, 1449-1459.
- European Commission, 2000. COoRdinate INformation on the Environment - CORINE Land Cover database. European Environment Agency, <http://dataservice.eea.europa.eu/dataservice/>. Copenhagen, Denmark.
- Fairbrother, A., Wenstel, R., Sappington, K., Wood, W., 2007. Framework for metals risk assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 68, 145-227.
- Floret, N., Viel, J.F., Lucot, E., Dudermel, P.M., Cahn, J.Y., Badot, P.M., Mauny, F., 2006. Dispersion modeling as a dioxin exposure indicator in the vicinity of a municipal solid waste incinerator: A validation study. *Environ. Sci. Technol.* 40, 2149-2155.
- Fowler, D., Skiba, U., Nemitz, E., Choubedar, F., Branford, D., Donovan, R., Rowland, P., 2004. Measuring aerosol and heavy metal deposition on urban woodland and grass using inventories of <sup>210</sup>Pb and metal concentrations in soil. *Water Air Soil Pollut.* 4, 483-499.
- Fowler, D., Smith, R.I., Leith, I.D., Crossley, A., Mourné, R.W., Branford, D.W., Moghaddam, M., 1998. Quantifying fine-scale variability in pollutant deposition in complex terrain using <sup>210</sup>Pb inventories in soil. *Water Air Soil Pollut.* 105, 459-470.
- François, M., Dubourguier, H.C., Li, D.Y., Douay, F., 2004. Prediction of heavy metal solubility in agricultural topsoils around two smelters by the physico-chemical parameters of the soils. *Aquat. Sci.* 66, 78-85.
- Frangi, J.-P., Richard, D., 1997. Heavy metal soil pollution cartography in northern France. *Sci. Total Environ.* 205, 71-79.
- Franssens, M., Flament, P., Deboudt, K., Weis, D., Perdrix, E., 2004. Evidencing lead deposition at the urban scale using "short-lived" isotopic signatures of the source term (Pb-Zn refinery). *Atmos. Environ.* 38, 5157-5168.
- Fritsch, C., Cosson, R.P., Coeurdassier, M., Raoul, F., Giraudoux, P., Crini, N., de Vaufleury, A., Scheifler, R., 2010. Responses of wild small mammals to a pollution gradient: host factors influence metal and metallothionein levels. *Environ. Pollut.* 158, 827-840.
- Gambrell, R.P., 1994. Trace and toxic metals in wetlands - A review. *J. Environ. Qual.* 23, 883-891.
- Goodarzi, F., Sanei, H., Duncan, W.F., 2001. Monitoring the distribution and deposition of trace elements associated with a zinc-lead smelter in the Trail area, British Columbia, Canada. *J. Environ. Monit.* 3, 515-525.
- Grafen, A., Hails, R., 2002. *Modern Statistics for the Life Sciences*. Oxford University Press.
- GRASS Development Team, 2008. Geographic Resources Analysis Support System (GRASS) Software. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://grass.osgeo.org>.
- Harmsen, J., 2007. Measuring bioavailability: from a scientific approach to standard methods. *J. Environ. Qual.* 36, 1420-1428.
- Hasselbach, L., Ver Hoef, J.M., Ford, J., Neitlich, P., Crecelius, E., Berryman, S., Wolk, B., Bohle, T., 2005. Spatial patterns of cadmium and lead deposition on and adjacent to National Park Service lands in the vicinity of Red Dog Mine, Alaska. *Sci. Total Environ.* 348, 211-230.
- ISO, 2007. Soil quality - Requirements and guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 2008. Soil quality - Requirements and guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials. ISO 17402:2008. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Lair, G.J., Gerzabek, M.H., Haberhauer, G., 2007. Sorption of heavy metals on organic and inorganic soil constituents. *Environ. Chem. Lett.* 5, 23-27.
- Li, X., Thornton, I., 2001. Chemical partitioning of trace and major elements in soils contaminated by mining and smelting activities. *Appl. Geochem.* 16, 1693-1706.
- MacDonald, J.D., Hendershot, W.H., 2006. Modelling trace metal partitioning in forest floors of northern soils near metal smelters. *Environ. Pollut.* 143, 228-240.

- Magiera, T., Zawadzki, J., 2007. Using of high-resolution topsoil magnetic screening for assessment of dust deposition: Comparison of forest and arable soil datasets. *Environ. Monit. Assess.* 125, 19-28.
- Martley, E., Gulson, B., Pfeifer, H., 2004. Metal concentrations in soils around the copper smelter and surrounding industrial complex of Port Kembla, NSW, Australia. *Sci. Total Environ.* 325, 113-127.
- Matheron, G., 1970. La théorie des variables régionalisées, et ses applications. Les cahiers du Centre de morphologie mathématique de Fontainebleau, Fascicule 5. Ecole des Mines de Paris, Fontainebleau, France.
- Meers, E., Samson, R., Tack, F.M.G., Ruttens, A., Vandegehuchte, M., Vangronsveld, J., Verloo, M.G., 2007. Phytoavailability assessment of heavy metals in soils by single extractions and accumulation by *Phaseolus vulgaris*. *Environ. Exp. Bot.* 60, 385-396.
- Ould-Dada, Z., Copplestone, D., Toal, M., Shaw, G., 2002. Effect of forest edges on deposition of radioactive aerosols. *Atmos. Environ.* 36, 5595-5606.
- Pacyna, E.G., Pacyna, J.M., Fudala, J., Strzelecka-Jastrzab, E., Hlawiczka, S., Panasiuk, D., Nitter, S., Pregger, T., Pfeiffer, H., Friedrich, R., 2007. Current and future emissions of selected heavy metals to the atmosphere from anthropogenic sources in Europe. *Atmos. Environ.* 41, 8557-8566.
- Peijnenburg, W.J.G.M., Jager, T., 2003. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 63-77.
- Queiroz, J.C.B., Sturaro, J.R., Saraiva, A.C.F., Barbosa Landim, P.M., 2008. Geochemical characterization of heavy metal contaminated area using multivariate factorial kriging. *Environ. Geol.* 55, 95-105.
- R Development Core Team, 2006. R: A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org>, Vienna, Austria.
- Rawlins, B.G., Lark, R.M., Webster, R., O'Donnell, K.E., 2006. The use of soil survey data to determine the magnitude and extent of historic metal deposition related to atmospheric smelter emissions across Humberside, UK. *Environ. Pollut.* 143, 416-426.
- Regan, H.M., Sample, B.E., Ferson, S., 2002. Comparison of deterministic and probabilistic calculation of ecological soil screening levels. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 882-890.
- Rieuwerts, J., Farago, M., 1996. Heavy metal pollution in the vicinity of a secondary lead smelter in the Czech Republic. *Appl. Geochem.* 11, 17-23.
- Rieuwerts, J., Farago, M., Cikrt, M., Bencko, V., 1999. Heavy metal concentrations in and around households near a secondary lead smelter. *Environ. Monit. Assess.* 58, 317-335.
- Rieuwerts, J.S., Farago, M.E., Cikrt, M., Bencko, V., 2000. Differences in lead bioavailability between a smelting and a mining area. *Water Air Soil Pollut.* 122, 203-229.
- Rodriguez, J.A., Nanos, N., Grau, J.M., Gil, L., Lopez-Arias, M., 2008. Multiscale analysis of heavy metal contents in Spanish agricultural topsoils. *Chemosphere* 70, 1085-1096.
- Rogival, D., Scheirs, J., De Coen, W., Verhagen, R., Blust, R., 2006. Metal blood levels and hematological characteristics in wood mice (*Apodemus sylvaticus* L.) along a metal pollution gradient. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 149-157.
- Sauvé, S., Hendershot, W., Allen, H., 2000. Solid-solution partitioning of metals in contaminated soils: dependence on pH, total metal burden, and organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 34, 1125-1132.
- Sauvé, S., Manna, S., Turmel, M.C., Roy, A.G., Courchesne, F., 2003. Solid-solution partitioning of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn in the organic horizons of a forest soil. *Environ. Sci. Technol.* 37, 5191-5196.
- Sauvé, S., McBride, M.B., Hendershot, W.H., 1997. Speciation of lead in contaminated soils. *Environ. Pollut.* 98, 149-155.
- Scheifler, R., Douay, F., Boireau, W., Chastel, O., Cosson, R., Dallinger, R., Faivre, B., Manceau, A., Martin, H., Sappin-Didier, V., de Vaufleury, A., 2007. The STARTT programme: a study of bioavailability, transfer and effects of metals in terrestrial food webs at various spatial scales and biological levels. 17th SETAC Europe Annual Meeting, Porto, Portugal, pp. 90-91.
- Shore, R.F., Rattner, B.A. (Eds.), 2001. *Ecotoxicology of Wild Mammals*. John Wiley & Sons, London, UK.
- Singh, B.R., Oste, L., 2001. In situ immobilization of metals in contaminated or naturally metal-rich soils. *Environ. Rev.* 9, 81-97.
- Skivan, P., Rusek, J., Fottova, D., Burian, M., Minaiik, L., 1996. Factors affecting the content of heavy metals in bulk atmospheric precipitation, throughfall and stemflow in central Bohemia, Czech Republic. *Water Air Soil Pollut.* 85, 841-846.
- Sobanska, S., Ledésert, B., Deneele, D., Laboudigue, A., 2000. Alteration in soils of slag particles resulting from lead smelting. *Comptes Rendus de l'Académie de Sciences - Serie IIa: Earth and Planetary Science* 331, 271-278.
- Sobanska, S., Ricq, N., Laboudigue, A., Guillermo, R., Bremard, C., Laureyns, J., Merlin, J.C., Wignacourt, J.P., 1999. Microchemical investigations of dust emitted by a lead smelter. *Environ. Sci. Technol.* 33, 1334-1339.
- Sterckeman, T., Douay, F., Fourrier, H., Proix, N., 2002a. Référentiel pédo-géochimique du Nord-Pas de Calais. Conseil Régional du Nord-Pas de Calais,
- Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, Lille, France, p. 130.
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourrier, H., 2000. Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environ. Pollut.* 107, 377-389.

- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourier, H., Perdrix, E., 2002b. Assessment of the contamination of cultivated soils by eighteen trace elements around smelters in the North of France. *Water Air Soil Pollut.* 135, 173-194.
- Suchara, I., Sucharova, J., 2002. Distribution of sulphur and heavy metals in forest floor humus of the Czech Republic. *Water Air Soil Pollut.* 136, 289-316.
- Suchara, I., Sucharova, J., 2004. Distribution of 36 elements deposition rates in a historic mining and smelting area as determined through fine-scale biomonitoring techniques. Part II: relative long-term accumulated atmospheric deposition levels. *Water Air Soil Pollut.* 153, 229-252.
- Ullrich, S., Ramsey, M., Helios-Rybicka, E., 1999. Total and exchangeable concentrations of heavy metals in soils near Bytom, an area of Pb/Zn mining and smelting in upper Silesia, Poland. *Appl. Geochem.* 14, 187-196.
- Urban, D.L., O'Neill, R.V., Shugart, H.H.J., 1987. *Landscape Ecology*. Bioscience 37, 119-127.
- USDA, 2009. Soil classification. Technical references. Natural Resources Conservation Service - United States Department of Agriculture. <http://soils.usda.gov/technical/classification/>.
- USEPA, 2005a. Ecological soil screening levels for cadmium. US Environmental Protection Agency, Washington DC, USA, p. 236.
- USEPA, 2005b. Ecological soil screening levels for lead. US Environmental Protection Agency, Washington DC, USA, p. 242.
- USEPA, 2005c. Ecological soil screening levels for zinc. US Environmental Protection Agency, Washington DC, USA, p. 242.
- USEPA, 2005d. Guidance for developing ecological soil screening levels. US Environmental Protection Agency, Washington DC, USA, p. 85.
- Van Den Hout, K.D., Bakker, D.J., Berdowski, J.J.M., Van Jaarsveld, J.A., Reinds, G.J., Bril, J., Breeuwsma, A., Groenenberg, J.E., De Vries, W., Van Pagee, J.A., Villars, M., Sliggers, C.J., 1999. The impact of atmospheric deposition of non-acidifying substances on the quality of European forest soils and the North Sea. *Water Air Soil Pollut.* 109, 357-396.
- van Oort, F., Labanowski, J., Jongmans, T., Thiry, M., 2007. Devenir des polluants métalliques dans les sols : révélateur de l'activité humaine sur la pédogenèse ? *Etude et Gestion des Sols* 14, 287-303.
- van Oort, F., Thiry, M., Jongmans, T., Bourennane, H., Cambier, P., Lamy, I., Citeau, L., Nahmani, J., 2009. Pollutions métalliques : distributions hétérogènes du Zn, Pb, Cd, et Cu et relations avec l'usage des sols. in: Cambier, P., Schwartz, C., van Oort, F. (Eds.). *Contaminations métalliques des agrosystèmes et écosystèmes péri-industriels*. Editions Quae, Versailles, France, pp. 15-45.
- Vdovic, N., Billon, G., Gabelle, C., Potdevin, J.L., 2006. Remobilization of metals from slag and polluted sediments (Case Study: The canal of the Deule River, northern France). *Environ. Pollut.* 141, 359-369.
- Venables, W.N., Ripley, B.D., 2001. *Modern applied statistics with S-PLUS*, Third ed. Springer-Verlag, New-York.
- Verner, J.F., Ramsey, M.H., Helios-Rybicka, E., Jedrzejczyk, B., 1996. Heavy metal contamination of soils around a Pb-Zn smelter in Bukowno, Poland. *Appl. Geochem.* 11, 11-16.
- Webster, R., Oliver, M.A. (Eds.), 2001. *Geostatistics for environmental scientists*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Xu, S., Tao, S., 2004. Coregionalization analysis of heavy metals in the surface soil of Inner Mongolia. *Sci. Total Environ.* 320, 73-87.
- Yan, S., Ling, Q., Bao, Z., 2007. Metals Contamination in Soils and Vegetables in Metal Smelter Contaminated Sites in Huangshi, China. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 79, 361-366.
- Zhang, M.K., Fang, L.P., Huang, C.Y., 2006. Competitive adsorption and mobility sequence of heavy metals in urban soils of southeastern China. *J. Environ. Sci. (China)* 18, 329-333.

## III.1.7. Supplementary Materials



**Figure SM1.** Site location (a, b) and map of land use and sampling point locations over the study site (study area extended to 9x6 km for land use mapping), with the example of total Cd concentrations in soils ( $\text{mg.kg}^{-1} \text{ dw}$ ) (c). Adapted from Douay et al (2009).





---

## III.2. CHAPITRE 2

---

### VARIABILITE SPATIALE DES CONTAMINATIONS DES ORGANISMES

---

*Les contaminations totales et disponibles des sols et le paysage expliquent-ils l'accumulation des ETMs chez les escargots et les micromammifères ?*

#### Résumé

Sur un vaste site pollué (40 km<sup>2</sup>) par une fonderie dans le nord de la France, nous avons étudié les relations entre les concentrations en éléments traces métalliques (ETMs) totales et extraites au CaCl<sub>2</sub> dans les sols et l'accumulation chez des invertébrés (les escargots *Cepaea sp* et *Oxychilus draparnaudi*) et des vertébrés (le Campagnol roussâtre *Myodes (ex-Clethrionomys) glareolus* et la Crocidure musette *Crocidura russula*) sympatriques. Les concentrations totales et extraites au CaCl<sub>2</sub> en ETMs ont été mesurées dans 262 sols de milieux ligneux (où les animaux ont été capturés). Les concentrations totales en Cd, Pb et Zn varient de 0,1 à 236,5, de 16 à 7331 et de 44 à 7264 µg.g<sup>-1</sup> ms, respectivement. Les concentrations internes (jusqu'à 741, 200 et 271 µg.g<sup>-1</sup> ms pour le Cd, le Pb et le Zn, respectivement, dans le foie des micromammifères ; jusqu'à 258, 443 et 6 619 µg.g<sup>-1</sup> ms pour le Cd, le Pb et le Zn, respectivement, dans les tissus mous des escargots) augmentent généralement avec la pollution du sol et sont mieux expliquées par les concentrations totales plutôt qu'extraites au CaCl<sub>2</sub>, excepté pour *Cepaea sp*. De plus, l'influence du paysage a été évaluée, montrant que les niveaux d'ETMs des animaux, et leur variation le long du gradient de pollution sont modulés par le paysage. Finalement, l'échelle à laquelle la corrélation entre concentrations en ETMs internes et dans les sols est la meilleure a été étudiée. Pour ce faire, les concentrations totales en ETMs dans les sols de surface ont été prédites sur l'ensemble de la zone par krigeage universel, en utilisant les données des sols ligneux (présente étude), et de sols agricoles et urbains (travaux précédents). Ensuite, la concentration médiane dans les sols a été calculée dans des « buffers » de taille croissante et reliée à l'accumulation dans les organismes. L'échelle spatiale de la meilleure corrélation entre ETMs dans les animaux et les sols varie entre métaux, espèces et paysages, rendant difficile toute généralisation. En conclusion, les variables comme le paysage, et d'une manière générale, les approches multi-échelle, qui sont rarement considérées en écotoxicologie jusqu'à présent, devraient être mieux prises en compte dans les prochaines recherches fondamentales et pour l'évaluation du risque écologique appliquée.

**Mots-clés** : exposition, biodisponibilité, métaux lourds, hétérogénéité spatiale

## Abstract

Over a large smelter-impacted area (40 km<sup>2</sup>) in northern France, we studied the relationships between total or CaCl<sub>2</sub>-extracted soil concentrations of metal trace elements (MTEs) and accumulation in sympatric invertebrates (the grove snail *Cepaea sp* and the glass snail *Oxychilus draparnaudi*) and vertebrates (the bank vole *Myodes glareolus* and the greater white-toothed shrew *Crocidura russula*). Total and CaCl<sub>2</sub>-extracted concentrations of MTEs were measured in 262 soils of woody patches (where animals were captured). Total Cd, Pb and Zn concentrations ranged from 0.1 to 236.5, from 16 to 7331 and from 44 to 7264 µg.g<sup>-1</sup> dw, respectively. Internal MTE concentrations (up to 741, 200 and 271 µg.g<sup>-1</sup> dw for Cd, Pb and Zn, respectively, in small mammal liver; up to 258, 443 and 6 619 µg.g<sup>-1</sup> dw for Cd, Pb and Zn, respectively, in snail body) generally increased with soil pollution and were always better explained by total than CaCl<sub>2</sub>-extracted MTE concentrations, except in *Cepaea sp*. Furthermore, the influence of landscape was assessed, showing that MTE levels in animals and their variations along the pollution gradient were modulated by landscape. Finally, the spatial scale at which the correlation between internal and soil MTE concentrations was the best was studied. To do so, total topsoil MTE concentrations were predicted over the whole area by universal kriging, using data of MTE concentrations in woody (present data) and agricultural and urban (previous works) soils. Then, median soil concentrations were calculated in buffers of increasing size and related to accumulation in organisms. The spatial scale of the best correlation between animal and soil MTE concentrations varied between metals, species and landscapes, rendering difficult any generalization. We conclude that variables like landscape and, more generally, multi-scale approaches, which have been poorly considered in ecotoxicology until now, should be more taken into account in further fundamental researches as well as in applied risk assessment.

**Keywords:** exposure, bioavailability, heavy metals, spatial heterogeneity.

## Publication relative :

*Spatially explicit analysis of metal bioaccumulation in terrestrial invertebrates and vertebrates: influence of landscape and soil contamination*

C. Fritsch<sup>1</sup>, M. Cœurassier<sup>1</sup>, P. Giraudoux<sup>1</sup>, F. Raoul<sup>1</sup>, F. Douay<sup>2</sup>, D. Rieffel<sup>1</sup>, A. de Vaufleury<sup>1</sup>, R. Scheifler<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Chrono-Environment, UMR UFC/CNRS 6249 USC INRA, University of Franche-Comte, Place Leclerc, F-25030 Besançon Cedex, France

<sup>2</sup> Laboratoire Sols et Environnement, Institut Supérieur d'Agriculture, 48 boulevard Vauban, F-59046 Lille Cedex, France

En préparation.

### III.2.1. Introduction

Environmental pollution by metal trace elements (MTEs) is recognized as a subject of concern for organism and ecosystem health (Smith et al., 2006; Fairbrother et al., 2007). Metals are naturally present in the environment but soils can exhibit high levels of these persistent pollutants due to anthropogenic activities, and such a contamination may lead to harmful effects to wildlife (Smith et al., 2006; Fairbrother et al., 2007). Metal transfer from soil to biota is controlled in a large part by metal bioavailability, which may be defined as the fraction of the total concentration of a metal that is available or can be made available for uptake and, as a consequence, for causing effects in organisms (Baker et al., 2003; Peakall and Burger, 2003; Peijnenburg and Jager, 2003; Van Gestel, 2008). MTE availability is often estimated using chemical extractants and among them, the calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ) is considered to be relevant for the assessment of the bioavailable fraction of cadmium (Cd), lead (Pb) and zinc (Zn) to some plants and invertebrates (Baker et al., 2003; Peijnenburg and Jager, 2003; Harmsen, 2007; Meers et al., 2007; ISO, 2008). As plants and soil invertebrates can constitute the dietary items of a large variety of invertebrate and vertebrate consumers, it could be hypothesised that  $\text{CaCl}_2$ -extracts of MTEs reflect their potential to be transferred in food webs. It is commonly admitted that organisms respond (accumulation, effects) to bioavailable instead of total metal concentrations in soils, and in a risk assessment perspective, it has been recommended to develop studies based on bioavailable rather than total concentrations for risk estimates (ISO, 2008). However, in the few studies that have tried to relate MTE transfer in terrestrial food webs and available MTE concentrations in soils under field conditions, chemical ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ ) or pore water extractions of metals failed to satisfactorily explain MTE accumulation in target organisms (Rogival et al., 2007; Wijnhoven et al., 2007; Van Gestel, 2008).

Assessing the environmental and ecological factors that may influence the bioavailability of pollutants in ecosystems is therefore a key issue in ecotoxicology. The understanding of those phenomena, however, is hampered by the frequent high spatial and temporal variability of soil and landscape variables, which dramatically affects exposure pathways of receptors (Ares, 2003; Woodbury, 2003; Carlsen et al., 2004; Smith et al., 2007). Wildlife is exposed to contaminants when receptors and contaminants co-exist and interact in space and time (Smith et al., 2007). The exposure of organisms to contaminants depends on a large variety of “host factors”, which affect external and/or internal dose, such as habitat preferences, home range size, feeding and foraging behaviour, migratory behaviour, species, age, size, or genetics (Peakall and Burger, 2003; Fairbrother et al., 2007; Smith et al., 2007; Fritsch et al., 2010). It is recognized that the exposure of organisms to contaminants varies in space due to heterogeneity in the level of soil contamination, in the environmental availability of the contaminant and in the habitat and landscape characteristics (Clifford et al., 1995; Smith et al., 2007; Schipper et al., 2008). In heterogeneous landscapes, duration and intensity of exposure may spatially vary because the time

spent by the animal (movements, foraging behaviour...) in the different patches constituting the landscape is likely to change according to land use. Moreover, levels of MTEs in soil can also vary between habitats (interception and retention characteristics of certain habitats enhanced MTE levels in soil) and differences in environmental MTE availability between land uses may occur (soil characteristics, soil biodiversity and speciation of metals in soil) (Rieuwerts and Farago, 1996; Fowler et al., 1998; Kapusta et al., 2003; Fowler et al., 2004; Ettler et al., 2005; Hope, 2006; Magiera and Zawadzki, 2007; Smith et al., 2007; Vermeulen et al., 2009). Finally, the landscape pattern modulates the structure and the functioning of populations and communities (Burel and Baudry, 2003; Lidicker, 2008) and could therefore be an important factor governing the spatial heterogeneity in organism exposure.

Several authors have emphasized that it would be necessary to study factors affecting pollutant bioavailability at the same spatial scales that harmful effects on receptors occur (i.e. habitat or landscape level) (Ares, 2003; Carlsen et al., 2004; Gaines et al., 2005; Barnthouse et al., 2008; Kapustka, 2008). The need to develop spatially explicit exposure and risk assessment has been highlighted during the last decade and an increase of studies addressing such issues has been noticed in recent years (Hope, 2006; Purucker et al., 2007). Some authors evidenced the influence of soil contamination, land use heterogeneity and home range size on organism exposure using modelling methods (Marinussen and van der Zee, 1996; Hope, 2000; 2001; Purucker et al., 2007; Schipper et al., 2008). In most of cases, these studies developed individual-based walk models and calculated the cumulative exposure of animals. An effort has also been made to introduce spatially explicit data such as home range size, contamination heterogeneity and foraging behaviour in risk assessment (Kooistra et al., 2001; Gaines et al., 2005; Kooistra et al., 2005; Topping et al., 2005). If the influence of those variables on exposure has been explored by modelling, the effective differences in the exposure of organisms between land uses or landscapes of a specific site have rarely been measured in the field (Vermeulen et al., 2009). Bioaccumulated levels of MTEs are generally recognized to reflect the exposure of organisms in polluted environments, and could therefore be used to investigate in the field the influence of land use or landscape on MTE transfer in food webs (Van Straalen, 1996; Luoma and Rainbow, 2005). To our knowledge, only a recent study has investigated the influence of habitat type on MTE bioaccumulation, and has highlighted that the transfer of pollutants from soil to biota varied among habitats (Vermeulen et al., 2009).

Land snails and small mammals have been extensively studied as biomonitors of MTE environmental contamination due to their bioaccumulation abilities, showing that internal levels reflected the contamination level of sites (Talmage and Walton, 1991; Berger and Dallinger, 1993; de Vaufleury and Pihan, 2000; Shore and Rattner, 2001). The relationships between internal MTE levels in animals and in soils have mainly been studied by comparing polluted sites to reference areas, which did not allow exploring the influence of the spatial heterogeneity of total or available soil MTEs on bioaccumulated metals. Studying the accumulation of heavy metals in small

mammals from diffusely polluted flood plains, Wijnhoven et al (2007) investigated the relationship between MTE concentrations in animals and in soils sampled at the same locations. These authors found weak correlations between body and soil MTE concentrations (Wijnhoven et al., 2007). Their results suggested that dispersal of animals and changes in foraging and feeding behaviour due to periodic flooding influenced their exposure to contaminants. Conversely, in a recent study on MTE accumulation in small mammals along a pollution gradient in a smelter-impacted area, we observed that internal MTE levels greatly depended on local soil contamination (Fritsch et al., 2010). Studying MTE accumulation in the wood mouse, van den Brink et al (2010) showed inter-site differences in soil-kidney Cd ratios, and attributed these variations to soil parameters that drive MTE availability from soil to plants and invertebrates (van den Brink et al., 2010). Such discrepancies highlight the potential influence of site-specific characteristics (landscape, environmental particularities such as flooding or barriers, soil characteristics...) on MTE transfer in food webs, and point out the need of data on the influence of environmental characteristics on pollutant transfer in ecosystems, considering both the intensity and the spatial pattern of transfer. In biomonitoring studies, the question of the spatial dependence of biomonitor and soil pollutant concentrations is rarely addressed.

Accumulated levels of MTEs in animals depend on the environmental availability of MTE in soils, the exposure of animals and the animal storage abilities of MTE (balance between uptake and elimination). The assessment of the independent influence of each one of these parameters is extremely complex in free-living animals because they cannot be controlled and studied independently. Studying several species exposed simultaneously over a polluted area could help in such an issue, by comparison of the species responses in respect to their physiological and ecological characteristics. This approach constitutes a way to control for some parameters (species differing in phylogeny but having the same feeding behaviour for instance) and would allow identifying pattern of response to environmental contamination and main parameters controlling for accumulation (Fritsch et al., 2010). In the present work, we studied four sympatric species in a large polluted site surrounding a former Pb and Zn-smelter. The species differed by their phylogeny (invertebrates *versus* vertebrates), physiology (MTE storage abilities), diet (herbivorous, omnivorous, and carnivorous), spatial mobility and habitat preferences. Small mammals have a larger spatial range of mobility than snails (Cameron and Williamson, 1977; Baur and Baur, 1993; Kozakiewicz et al., 2000; Le Louarn et al., 2003; Lugon-Moulin, 2003; Schipper et al., 2008). The grove snail *Cepaea sp* is an herbivorous species (Wolda et al., 1971; Williamson and Cameron, 1976) while the glass snail *Oxychilus draparnaudi* is carnivorous (Vonproschwitz, 1994; Mahtfeld, 2000; Kerney and Cameron, 2006). The bank vole *Myodes (ex-Clethrionomys) glareolus* is herbivorous/granivorous, intermediary between strictly herbivorous voles and omnivorous mice (Abt and Bock, 1998; Le Louarn et al., 2003; Sadowska et al., 2008) while the greater white-toothed shrew *Crocidura russula* is typically carnivorous (Lugon-Moulin, 2003).

In this article, we addressed three questions: (i) Were MTE concentrations in animals related

to soil total or extractable MTE concentrations? (ii) Did landscape influence the relationship between MTE concentrations in animals and in soils? (iii) At which spatial scale MTE concentrations in animals correlate at best with soil MTE concentrations? This last question relies upon the hypothesis that the correlation will be the best when the spatial range considered for soil contamination will approximate the surfaces prospected by the organism of concern

### III.2.2. Materials and methods

#### III.2.2.a. Study site and sampling strategy

This study was carried out in the surroundings of the former “Metaleurop-Nord” smelter in Northern France (Noyelles-Godault, Nord – Pas-de-Calais, 50°25'42 N 3°00'55 E). The contamination of agricultural and urban soils of Metaleurop surroundings has been well documented (Frangi and Richard, 1997; Sterckeman et al., 2000; Sterckeman et al., 2002; Douay et al., 2008) and woody soils were recently studied (Douay et al., 2009; Fritsch et al., *submitted*), showing that this area is considered as highly polluted by Cd, Pb and Zn for both levels of contamination and surfaces of concern.

We defined a 40 km<sup>2</sup> (8 x 5 km) study area. This area was split into 160 squares (500 m-sided), which constituted our sampling units. In each square, soils and animals were sampled in woody habitats, which are favourable for small mammals and snails. Habitats considered as “woody” were natural forests, tree plantations (poplar groves for instance), woodlots or copses and hedgerows in natural or cultivated lands and urban parks. Nine of the 160 squares were excluded from the sampling: one because it corresponds to the location of the former smelter, which is under rehabilitation process, the others because they were occupied by ploughed fields without any woody habitat. The number of squares actually sampled was therefore 151.

#### III.2.2.b. Landscape analysis

A land use analysis was performed to determine the landscape composition of each square. For this purpose, the study area was extended to 9 x 6 km by adding a line of squares around the initial 8 x 5 km grid with the aim of avoiding edge effect in further statistical analyses. A land use mapping was realized using ArcGIS 8 (ESRI Co., USA) on the basis of the CORINE Land Cover (CLC) database (European Commission, 2000). The resolution of CLC is 25 ha. Based on aerial photographs (BD ORTHO® database from the *Institut Géographique National*, resolution of 0.5 m) and, when necessary, on field reconnaissance, the limits of the different units and the units smaller than 25 ha (like hedgerows or copses) were manually digitalized in order to obtain a resolution of 4 meters. The resulting vector map was converted into a raster map (1 pixel = 4 x 4 m), constituted of 8 categories of land uses: urban and industrial, ploughed field, grassland, hedgerow and copse, woodland, scrub/shrubland, river and pond, and former Metaleurop Nord smelter. For each square, the number of pixels of each category of land use was computed. Seven groups of squares were identified using correspondence analysis and clustering, corresponding to

seven landscape types. These types (hereafter named “landscape”) were named according to their dominant land uses: agricultural lands, urban areas, woodlands, scrub/shrublands, mixed urban areas and ploughed fields and finally mixed woodlands and grasslands. The last type was constituted of the former Metaleurop smelter itself. The 4 prevailing landscape types were agricultural lands, urban areas, woodlands and scrub/shrublands. These 4 landscape types were used to answer the second question of this work (i.e. the influence of landscape on the relationship between soil and internal MTE concentrations in the different studied species).

### *III.2.2.c. Soil use analysis*

To answer the third question of this study (i.e. the scale at which MTE concentrations in soils and animals correlate at best), we needed to obtain soil contamination data in buffers of increasing radius size. To reach this aim with the best accuracy, our data on “woody” soils were gathered with data on agricultural and urban soils coming from the soil database of the Laboratory of Soils and Environment (LSE, ISA, Lille, France).

The land use map was used to build a soil use map with 4 classes of soil use: woody soils (soils of woody patches), agricultural soils (soils of ploughed fields and grasslands) and urban soils (soils of urban areas: gardens, parks...). Dredged sediment deposits, which are extremely contaminated and do not constitute soils *sensu stricto*, were considered as a separate fourth soil use.

### *III.2.2.d. Soil, small mammal and snail sampling*

In each of the 151 squares, 1 to 10 composite 0-25 cm (humus removed) soil samples (constituted each by 15 randomly placed sub-samples in a woody patch) were taken in woody patches during autumn 2006. A total of 262 soil samples was analysed over the 40 km<sup>2</sup> study area. Detailed data about soil sampling, analyses and results are given elsewhere (Douay et al., 2009; Fritsch et al., *submitted*).

The sampling of animals, which could have not been performed on the 160 squares for logistic reasons, was realized on 30 squares. Those 30 squares were chosen according to the following sampling strategy: 3 replicates for 3 levels of pollution (low, medium, high) in the 4 prevailing landscape types defined above (agricultural lands, urban areas, woodlands and scrub/shrublands). The landscape type “scrub/shrublands” being present only in the vicinity of the former smelter, we obtained only one level of pollution (high) for this type of landscape. Small mammals were captured during the autumn 2006 using break-back traps baited with a mix of water, floor and peanut butter. Sampling authorization was given by the Direction Régionale de l'ENvironnement (DIREN) of Nord – Pas-de-Calais. In each square, 10 lines of 10 traps (each 3 m-spaced) were placed through the woody patches where the soils were sampled. In 3 squares, the available surfaces of woody patches were insufficient to place 10 trap-lines, the number of lines was therefore reduced to 6 to 7. The 289 trap lines were checked every morning for 3 consecutive days



and were re-set/rebaited as necessary. The sampling effort was 2820, 600, 2310 and 2940 trap-nights in agricultural lands, scrub/shrublands, urban areas and woodlands, respectively (one trap set for one night corresponds to a “trap-night”). The percentage of captures was calculated as the number of individuals trapped per 100 trap-nights. Snails were collected by hand searching in the same woody patches and at the same time than small mammals. Snails and small mammals were stored at -20°C until dissection. Each capture location (trap line for small mammals, woody patch for snails) was geo-referenced using a GPS (Garmin eTrex®).

#### III.2.2.e. Animal preparation

Animals were identified at species level using morphometric criteria (Chaline et al., 1974; Charissou, 1999; Le Louarn et al., 2003; Kerney and Cameron, 2006) and then dissected. Crystalline lens weighing is a standard method for estimating relative age of small mammals and is relevant for the bank vole (Kozakiewicz, 1976). However, it was not used here because a non negligible number (10%) of bank vole crystalline lens were not exploitable. Moreover, to our knowledge, no validation of this method to determine age has been published for the greater white-toothed shrew. Therefore, we preferred classifying small mammals (shrews as well as voles) according to 3 classes of relative age (juveniles, non-reproductive adults and reproductive adults) on the basis of body size and weight and reproductive status (Fritsch et al., 2010). We found significant differences of crystalline weight between those three classes, suggesting that our aging method was pertinent. We are however aware that non reproductive adults actually include a large proportion of sub-adults but may also include some few senescent adults. However, we assumed that proportion of senescent adults in class 2 was negligible as tests on bank vole data allowed to estimate it at around 2%.

Small mammals were dissected to sample the liver, which was dried in an oven (60°C) to constant dry weight before acid digestion and MTE analyses (see § III.2.2.f). Snails of *Cepaea* genus (*C. hortensis* and *C. nemoralis*) were grouped and will be called hereafter *Cepaea sp* because the specific determination is not possible for non reproductive individuals. Furthermore, preliminary analyses of our data showed that MTE accumulation did not differ between adult *C. hortensis* and *C. nemoralis*. *Cepaea sp* snails were classified according to 2 classes of relative age (juveniles and adults), regarding the presence of a clear lip at the mouth of their shell. The presence of this lip indicates that the snail has attained adulthood (Williamson, 1979). The age determination was not realized for *Oxychilus draparnaudi* because we did not find any published method. The soft body of the snails was separated from the shell and dried in an oven (60°C) to constant dry weight before MTE analysis. Three to 5 individuals of *Oxychilus draparnaudi* were pooled to allow a sufficient sample weight for MTE analysis.

#### III.2.2.f. Analyses of MTE concentration in soils and animals

The woody soils were analyzed for total and extractable metal concentrations. Samples were

dried, disaggregated and homogenized before being sieved to 250 µm. Cd and Pb concentrations were measured by inductively-coupled argon plasma mass spectrophotometry (ICP-MS) and Zn concentrations by inductively-coupled argon plasma atomic emission spectrophotometry (ICP-AES) after acid digestion according to NF X31-147 (AFNOR, 1996). Measurements were performed by the *Laboratoire d'Analyse des Sols* of the *Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA) of Arras (France), which benefits from the COFRAC (French accreditation committee) accreditation n°1-1380 for its analytical quality for MTE measurements in soils. Selective extractions using CaCl<sub>2</sub> (0.01 M) were carried out in three replicates on 3 g sub-samples of soil. Extracted metal concentrations were quantified using atomic absorption spectrometry (AAS, AA-6800, Shimadzu) by the LSE.

Metal concentrations in snail soft bodies and small mammal livers were measured by furnace (Cd, Pb) or flame (Zn) atomic absorption spectrometry (VARIAN 220Z and 220FS, respectively) at the Chrono-Environment department. Digestion of samples was performed using dissolution in nitric acid (HNO<sub>3</sub>, 65%, Carlo-Erba analytical quality) in a dry oven (65°C) during 72h. After digestion, samples were diluted adding ultra-pure water (18.2 MΩ/cm<sup>2</sup>). Blanks (acid + ultra-pure water) and Certified Reference Materials (CRM, TORT-2 and DOLT-3, National Research Council, Canada) were prepared and analyzed using the same methods than the samples. Average recoveries of the CRM were calculated at 95% ± 10% (*n* = 38) for Cd, 101% ± 17% (*n* = 42) for Pb, 80% ± 2% (*n* = 22) for Zn. Detection limits of the spectrometers (median ± 3SD of blanks) were 0.17, 1.20 and 2.79 µg.l<sup>-1</sup> in the acid digests for Cd, Pb and Zn. Detection limits in snail soft bodies were 0.02, 0.12 and 0.29 µg.g<sup>-1</sup> in the grove snail and 0.09, 0.65 and 1.51 µg.g<sup>-1</sup> in the glass snail for Cd, Pb and Zn, respectively. Detection limits in small mammal livers were 0.02, 0.13 and 0.30 µg.g<sup>-1</sup> in the bank vole, and 0.03, 0.24 and 0.56 µg.g<sup>-1</sup> in the greater white toothed shrew for Cd, Pb and Zn, respectively. When measured values were under the detection limits, half of the detection limit value was used for statistical analyses. For both soil and animal samples, metal concentrations were expressed as micrograms per grams dry weight (µg.g<sup>-1</sup> dw). Hereafter, body and hepatic MTE concentrations of snails and small mammals will be named “internal MTE concentrations”.

### III.2.2.g. Prediction of MTE concentrations in soils

To determine at which spatial scale the correlation between MTE concentrations in animals and in soils was the best, a circular buffer technique was used in order to calculate soil metal concentration in the area surrounding the capture location of animals. Several buffer radiuses were used: 50, 75, 100, 175, 250, 350, 500, 750 and 1000 meters around the sampling point. For each snail or small mammal, at each buffer size, median predicted Cd, Pb and Zn concentration in soil was computed. For this purpose, metal concentrations in soils were predicted on the whole 54 km<sup>2</sup> study area, at each node of a regular (100m) grid. Detailed information about this procedure is given in Supporting Information.

### III.2.2.h. Statistical analyses on MTE concentrations in animals

For each sampled individual, the following data were available: internal metal concentration, measured metal concentrations (total and CaCl<sub>2</sub>-extracted) in the soil of the patch where the individual was caught (called hereafter MTE concentration “at sampling point”), species, age (except for *Oxychilus draparnaudi*), landscape where animals were found (landscape type of the square, as defined in the § III.2.2.b) and median predicted total Cd, Pb and Zn concentrations in soils at several buffer sizes (as defined in the § III.2.2.g).

The normality of data distribution was checked with the test of Shapiro. Because metal concentration in soils and animals were skewed, variables were log-transformed for statistical analyses using  $\log_{10}(x + 1)$ . The analysis of the data was divided in 3 steps answering the 3 aims of this paper.

In a first step, the purpose was to test whether animal and soil MTE concentrations at sampling point were related, and whether total or CaCl<sub>2</sub>-extracted soil MTE concentrations best explained MTE concentrations in animals. As age can influence MTE accumulation in small mammals and snails (Williamson, 1980; Shore and Rattner, 2001; Sánchez-Chardi et al., 2009; Fritsch et al., 2010), we studied the relationship between internal and soil MTE concentrations controlling for this factor (i.e. using internal concentrations normalized upon age). We performed general linear models (GLMs) using internal MTE concentrations (normalized upon age) as dependant variable and total or CaCl<sub>2</sub>-extracted MTE concentrations in soils at sampling point as explanatory variable. On the basis of the R<sup>2</sup> of the models, we determined which soil MTE concentration (total or CaCl<sub>2</sub>-extracted) better explained internal MTE concentrations. Afterwards, the best variable was kept for further analyses. We analyzed the differences in accumulation between species using GLMs with internal metal as dependent variable and total MTE soil concentrations and species with interactions as explanatory variables.

In a second step, we considered the influence of landscape on internal MTE concentrations adding landscape in the models.

Finally, we determined at which spatial scale animal and soil MTE concentrations best correlated, under the hypothesis that this correlation will be the best when the buffer size will approximate the surfaces prospected by the organism of concern. For this purpose, GLMs were used with internal MTE concentrations normalized upon age as dependent variable and median predicted total soil MTE concentrations in buffers around sampled animals as independent variables. For each species, the R<sup>2</sup> of the models and the values of coefficients (slopes) were computed for each buffer size on the whole dataset and by landscape. The sample size being low for the shrew in woodlands ( $n = 4$ ), the grove snail in urban areas ( $n = 3$ ) and null in scrub/shrublands for snails (no specimen), those landscape types were not analyzed individually for these species. We recorded, for each buffer radius size, the highest and lowest values of calculated partial R<sup>2</sup> for soil concentrations and computed the differences between the values that will be called hereafter “ $\Delta R^2$ ”. If the value of  $\Delta R^2$  was lower than 0.05, we assumed that the R<sup>2</sup> did

not show straightforward variations with buffer size increase.

In all cases, the significance of the variables was checked by permutation test (Monte-Carlo, 1000 permutations), the partial R-squared ( $R^2$ ) were calculated using an analysis of variance (ANOVA). The post-hoc multiple comparison test of Tukey was applied to determine pairwise differences.

All statistical analyses were performed using the software R 2.7.1 (R Development Core Team, 2006) with the following additional packages: ade4, geoR, gstat, maptools, pgirmess, pvclust, spdep, splancs, and vegan.

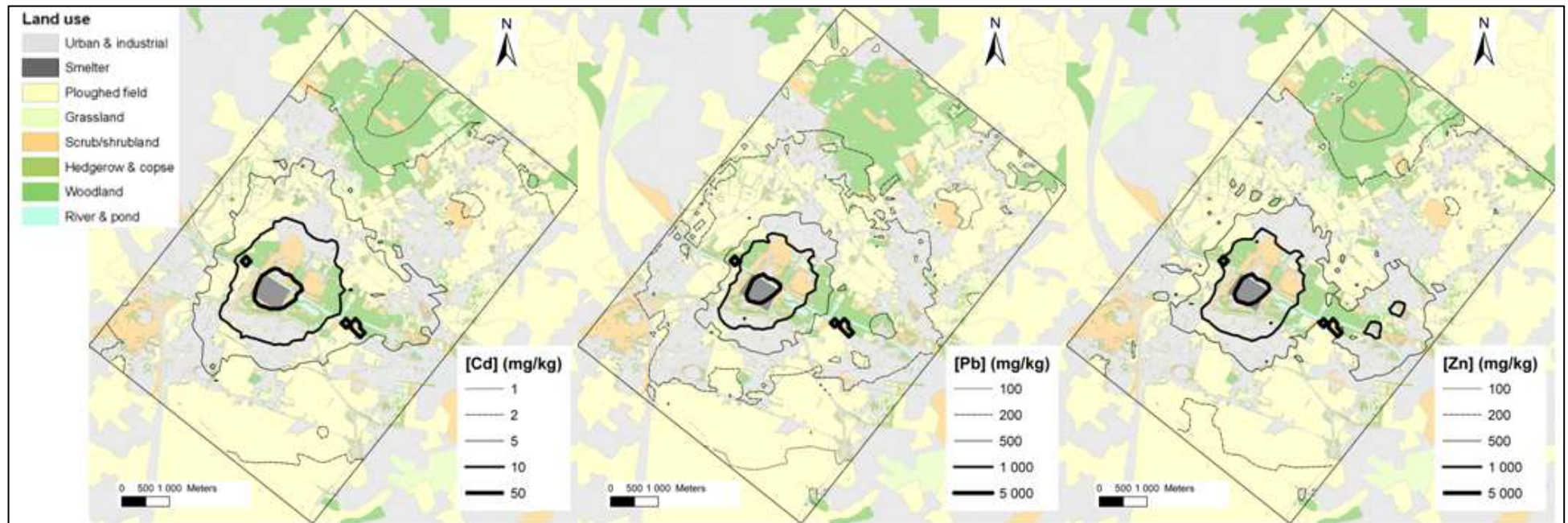


Figure III.2.1. Iso-concentration lines of predicted total concentrations in topsoils of Cd, Pb and Zn ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  dw).

### III.2.3. Results

Soil total MTE concentrations varied from background levels to very high values, particularly in the dredged material deposit (Table III.2.1).  $\text{CaCl}_2$ -extracted MTE concentrations also showed a large range of variations within woody soils (Table III.2.1). Predictions of MTEs concentrations in soils (see Supporting Information) showed a similar spatial pattern for the 3 MTEs. Concentric circles were found around the former smelter with an enhancement of the contamination on downwind areas (Figure III.2.1). Hot spots corresponding to dredged sediment deposits were also found within the study area (Figure III.2.1).

**Table III.2.1.** Minimum (Min.), median (Med.) and maximum (Max.) total and extracted ( $\text{CaCl}_2$ ) concentrations of Cd, Pb and Zn ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  dw) in woody soils ( $n = 261$ ) and dredged sediment deposit (DSD,  $n = 1$ ).

Metal	Min.	Med.	Max.	DSD
Cd	0.1	5.0	236.5	2 402.0
Pb	16	303	7 331	41 960
Zn	44	460	7 264	38 760
Cd- $\text{CaCl}_2$	0.02	0.20	5.80	59.46
Pb- $\text{CaCl}_2$	0.27	0.66	13.68	1.74
Zn- $\text{CaCl}_2$	0.02	4.11	143.00	111.57

Twenty species of snails and 11 species of small mammals were determined. Among them, we retained 4 species (2 snails and 2 mammals) for the present study, because of their wide distribution over the study area. A total of 131 grove snails (*Cepaea sp.*), 78 glass snails (*Oxychilus draparnaudi*), 248 bank voles (*Myodes ex-Clethrionomys glareolus*) and 163 greater white-toothed shrews (*Crocidura russula*) were captured (Table III.2.2). Even if these four species were present over the whole area, species were not fairly distributed among landscapes and pollution levels (Table III.2.2). None of the two snail species studied in this work were found in the scrub/shrubland landscape. Grove snails were abundant in both agricultural and woodland landscapes but rare in urban areas. The glass snail was often present in urban areas, then in woodlands, and was rare in agricultural areas. The bank vole was clearly more abundant in woodlands than in the 3 other landscapes, where it was roughly similarly frequent. Greater white-toothed shrews were equally abundant in agricultural and urban areas and were rare in both scrub/shrubland and woodland landscapes.

**Table III.2.2.** Distribution of specimens by species, age (Juv: juveniles, NR ad: non-reproductive adults and Ad: reproductive adults) and landscape and percentage of capture for small mammals (PC: number of individuals trapped per 100 trap-nights).

Species	Age	Landscape				Total
		Agricultural lands	Scrub/shrublands	Urban areas	Woodlands	
<i>Cepaea sp</i>	Juv	9	0	2	19	30
	Ad	43	0	1	57	101
	Total	52	0	3	76	131
<i>Oxychilus draparnaudi</i>	Total	6	0	50	22	78
<i>Myodes glareolus</i>	Juv	7	10	1	54	72
	NR ad	2	7	9	44	62
	Ad	8	4	4	98	114
	Total	17	21	14	196	248
	PC	0.6	3.5	0.6	6.7	2.9
<i>Crocidura russula</i>	Juv	10	0	13	0	23
	NR ad	50	9	56	4	119
	Ad	15	0	6	0	21
	Total	75	9	75	4	163
	PC	2.7	1.5	3.2	0.1	1.9

### III.2.3.a. Influence of species, age and MTEs in soils at sampling point on internal MTE concentrations

Considering all species together, internal concentrations ranked in the following order: Pb < Cd < Zn and ranged from under detection limits for Cd and Pb and 0.9  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw for Zn to 740.6, 442.6 and 6619.4 for Cd in the greater white-toothed shrew, Pb in the grove snail and Zn in the glass snail, respectively (Table III.2.3).

Cd internal concentrations, conditionally to soil total concentrations, ranked in the following order: shrew ~ glass snail > bank vole > grove snail ( $p < 0.001$ , Figure III.2.2). For Pb, internal concentrations normalized upon soil total Pb were higher in small mammals than in snails with shrew > bank vole ~ glass snail > grove snail ( $p < 0.001$ ). It was quite the contrary for Zn with the order glass snail > grove snail > shrew ~ bank vole ( $p < 0.001$ ).

**Table III.2.3.** Minimum (Min), median (Med) and maximum (Max) internal concentrations of Cd, Pb and Zn measured in soft body for snails and liver for small mammals ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw).

UDL: under detection limits.

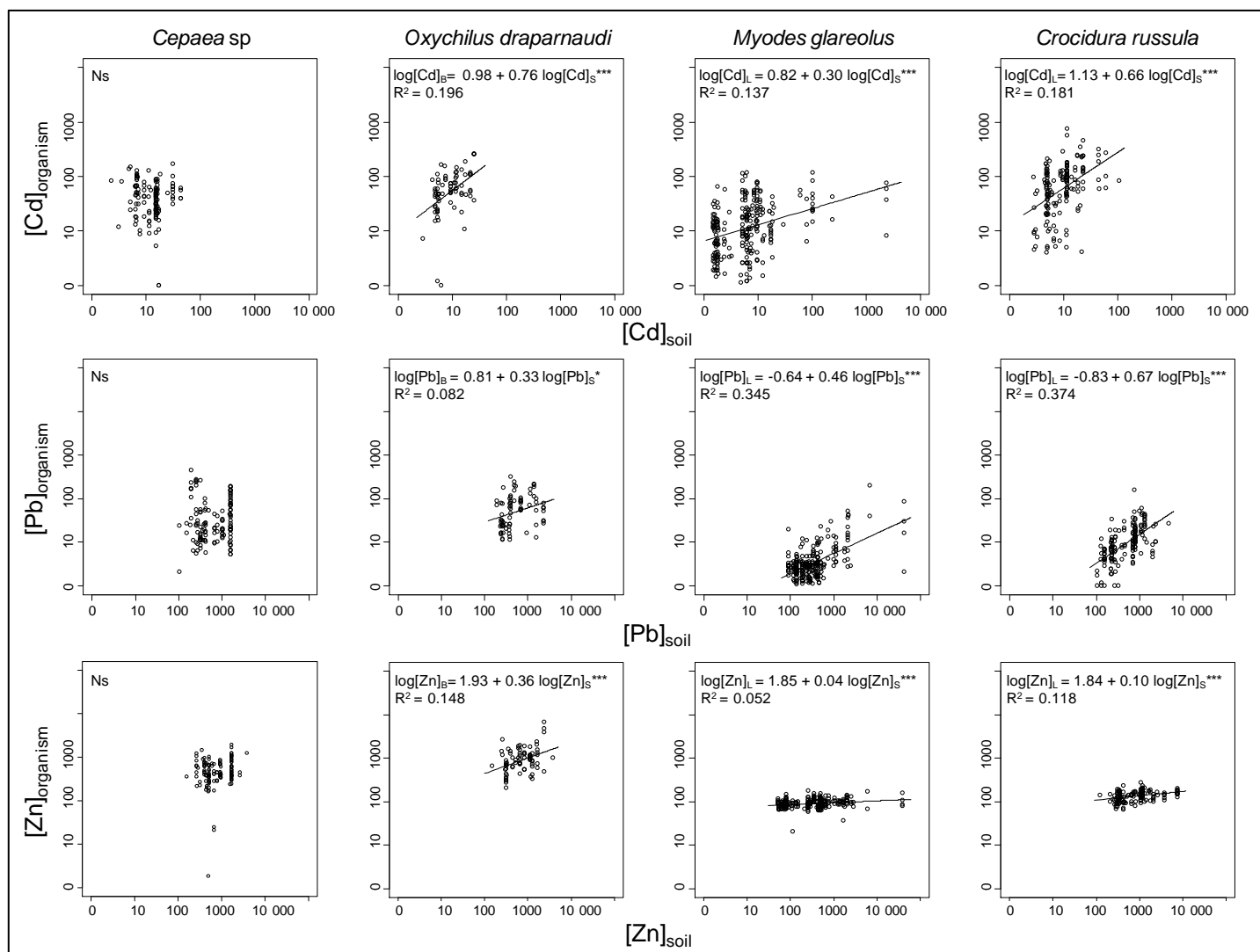
Species	n	Cd			Pb			Zn		
		Min	Med	Max	Min	Med	Max	Min	Med	Max
<i>Cepaea sp</i>	131	UDL	41.8	170.5	1.0	22.6	442.6	0.9	446.8	1 927.4
<i>Oxychilus draparnaudi</i>	78	UDL	55.1	258.4	10.2	55.2	312.6	206.3	918.2	6 619.4
<i>Myodes glareolus</i>	243	0.1	10.8	116.3	0.1	1.8	199.9	18.9	89.4	173.4
<i>Crocidura russula</i>	163	3.0	72.3	740.6	UDL	8.8	158.8	64.7	138.6	271.0

**Table III.2.4.** Multiple ( $R^2$  model) and partial R-squared (Partial  $R^2$ , for significant parameters only:  $p$ -value < 0.05) of models linking internal MTE concentrations with all studied variables (age, MTE concentrations in soil, landscape and interaction between MTEs in soils and landscape).

Species	[MTE] <sub>internal</sub>	Partial $R^2$				$R^2$ model
		Age	log[MTE] <sub>soil</sub>	Landscape	[MTE] <sub>soil</sub> *Landscape	
<i>Cepaea sp</i>	log[Cd]	0.22			0.08	0.30
	log[Pb]	0.03		0.16		0.21
	log[Zn]					ns*
<i>Oxychilus draparnaudi</i>	log[Cd]		0.20		0.09	0.29
	log[Pb]		0.08	0.12	0.12	0.33
	log[Zn]		0.15	0.06	0.17	0.38
<i>Myodes glareolus</i>	log[Cd]	0.07	0.19	0.11	0.02	0.39
	log[Pb]		0.35	0.08	0.02	0.46
	log[Zn]	0.03	0.08	0.07		0.18
<i>Crocidura russula</i>	log[Cd]	0.06	0.17	0.07		0.31
	log[Pb]		0.37	0.09	0.03	0.50
	log[Zn]		0.12	0.05		0.19

\* ns: non significant  $p$ -value > 0.05.





**Figure III.2.2.** Relationships between MTE concentrations in soft body for snails ( $[C]_B$ ) and in liver for small mammals ( $[C]_L$ ) and total MTE concentrations measured in soil ( $[C]_S$ ) at sampling point ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw). Statistical significance: general linear model, Ns for  $p > 0.05$ , \* for  $p < 0.05$ , \*\* for  $p < 0.01$ , \*\*\* for  $p < 0.001$ ,  $R^2$ : R-squared of the model.

Hepatic Cd concentrations increased with age in small mammals ( $p < 0.001$ ,  $R^2 = 0.07$  for the vole;  $p = 0.002$ ,  $R^2 = 0.06$  for the shrew) (Table III.2.4). Similarly, adult grove snails exhibited higher levels than juveniles ( $p < 0.001$ ,  $R^2 = 0.22$ ). Lead concentrations, however, did not increase with age in small mammals although they differed with age in the grove snail, juveniles exhibiting slightly higher concentrations than adults ( $p = 0.045$ ,  $R^2 = 0.03$ ). Zn concentrations increased with age in the bank vole ( $p < 0.001$ ,  $R^2 = 0.03$ ) but did not vary neither for the shrew nor for the grove snail.

**Table III.2.5.** Parameters (coefficient:  $b$ , statistical significance:  $p$  value, and partial R-squared:  $R^2$ ) of the regressions between internal MTE concentrations (normalized upon age except for *O. draparnaudi*, body for snails and liver for small mammals) and total or  $\text{CaCl}_2$ -extracted MTE concentrations in soils at sampling location.

Species	$\log[\text{MTE}]_{\text{internal}} \sim \log[\text{MTE}]_{\text{soil}}$		$b$	$p$	$R^2$
<i>Cepaea sp</i>	Cd	Total	-0.06	0.571	0.07
		$\text{CaCl}_2$	0.65	0.002	
	Pb	Total	0.06	0.590	
		$\text{CaCl}_2$	0.13	0.866	
	Zn	Total	0.19	0.070	
		$\text{CaCl}_2$	0.12	0.059	
<i>Oxychilus draparnaudi</i>	Cd	Total	0.76	<0.001	0.20
		$\text{CaCl}_2$	0.73	0.090	
	Pb	Total	0.33	0.011	0.08
		$\text{CaCl}_2$	0.48	0.275	
	Zn	Total	0.36	<0.001	0.15
		$\text{CaCl}_2$	0.05	0.430	
<i>Myodes glareolus</i>	Cd	Total	0.34	<0.001	0.19
		$\text{CaCl}_2$	0.37	<0.001	0.05
	Pb	Total	0.45	<0.001	0.33
		$\text{CaCl}_2$	-0.19	0.016	0.02
	Zn	Total	0.05	<0.001	0.07
		$\text{CaCl}_2$	-0.02	0.121	
<i>Crocidura russula</i>	Cd	Total	0.64	<0.001	0.18
		$\text{CaCl}_2$	0.85	0.015	0.04
	Pb	Total	0.67	<0.001	0.37
		$\text{CaCl}_2$	0.08	0.886	
	Zn	Total	0.10	<0.001	0.12
		$\text{CaCl}_2$	0.05	0.037	0.03

Internal MTE concentrations increased with total soil concentrations at sampling point in the glass snail and the small mammals although the grove snail did not show any increase of its internal concentrations along the pollution gradient, whatever the metal considered (Figure III.2.2). Total MTE concentrations explained from 7 to 37 % of the variations of internal concentrations (Table III.2.5) and were always better correlated than  $\text{CaCl}_2$ -extracted MTEs (Table III.2.5), except for the grove snail, for which neither total nor extractable concentrations were related to internal

concentrations (except for Cd-CaCl<sub>2</sub>). Extractable MTEs were not correlated to internal concentrations in the glass snail. Similarly, Zn-CaCl<sub>2</sub> and Pb-CaCl<sub>2</sub> were not significantly correlated to Zn in the bank vole and to Pb in the shrew, respectively.

### III.2.3.b. Influence of landscape on internal MTE concentrations

Accumulation of metals differed between landscapes for both the levels of internal MTE (internal concentrations conditionally to age and soil MTE total concentrations at sampling point) and the evolution of internal MTE concentrations along the soil pollution gradient (slopes of the regressions between internal MTE concentrations (normalized upon age) and soil MTE total concentrations at sampling point) (Table III.2.6, Figure III.2.3). The variable “landscape” accounted for 5 to 16% in the explanation of the variations of internal MTE concentrations and the interaction between soil contamination and landscape was sometimes significant, particularly for the glass snail (Table III.2.4).

For *Cepaea* snails in urban areas, sample size was insufficient and did not provide reliable analysis. Internal Pb levels were higher in woodlands than in agricultural lands ( $p < 0.001$ ), while internal Cd and Zn levels did not differ among landscapes (Figure III.2.3). Internal MTE concentrations did not vary with soil MTE concentrations except in the case of Cd in woodlands where a negative correlation was revealed (Table III.2.6, Figure III.2.3).

For sample size reasons, the influence of landscape on MTE accumulation in *O. draparnaudi* was studied only comparing urban areas and woodlands. Internal Cd and Zn levels did not differ between landscapes, while internal Pb levels were higher in woodlands than in urban areas ( $p = 0.003$ , Figure III.2.3). Internal Cd concentrations increased with soil MTE concentrations in both urban areas and woodlands (without significant differences in slopes between landscapes), whereas internal Pb and Zn concentrations significantly increased along the pollution gradient only in urban areas (Table III.2.6, Figure III.2.3).

For the greater white-toothed shrew, too few animals were collected on woodland and scrub/shrubland landscapes and no interpretation could have been made. However, data on agricultural lands and urban areas showed that the level of internal Cd was higher in urban than in agricultural landscapes ( $p = 0.014$ , Figure III.2.3), while slopes of accumulation along the pollution gradient did not significantly differ (Table III.2.6). There were no differences for Pb and Zn, neither in the level of accumulation, nor in the increase of internal concentrations along the gradient (Figure III.2.3).

Concerning the bank vole, we found higher levels of internal MTE in scrub/shrublands and woodlands than in agricultural lands and urban areas for Cd ( $p < 0.004$ ) and than in urban areas for Zn ( $p < 0.003$ , Figure III.2.3). Internal Pb levels were higher in scrub/shrublands than in other landscape types ( $p < 0.01$ ). We did not detect correlation between internal and soil Cd concentrations in scrub/shrublands while regressions were significant in other landscapes (Table III.2.6, Figure III.2.3). Although the increase of internal Cd concentrations with soil contamination

was highest in urban areas and lowest in agricultural lands, coefficients did not differ significantly between landscapes (Table III.2.6). Contrarily, we found a higher increase of internal Pb along the soil pollution gradient in scrub/shrublands than in woodlands and agricultural areas ( $p < 0.04$ , Table III.2.6, Figure III.2.3). Relationships between internal and soil Zn concentrations were rarely significant and did not exhibit differences in slopes between landscapes (Figure III.2.3).

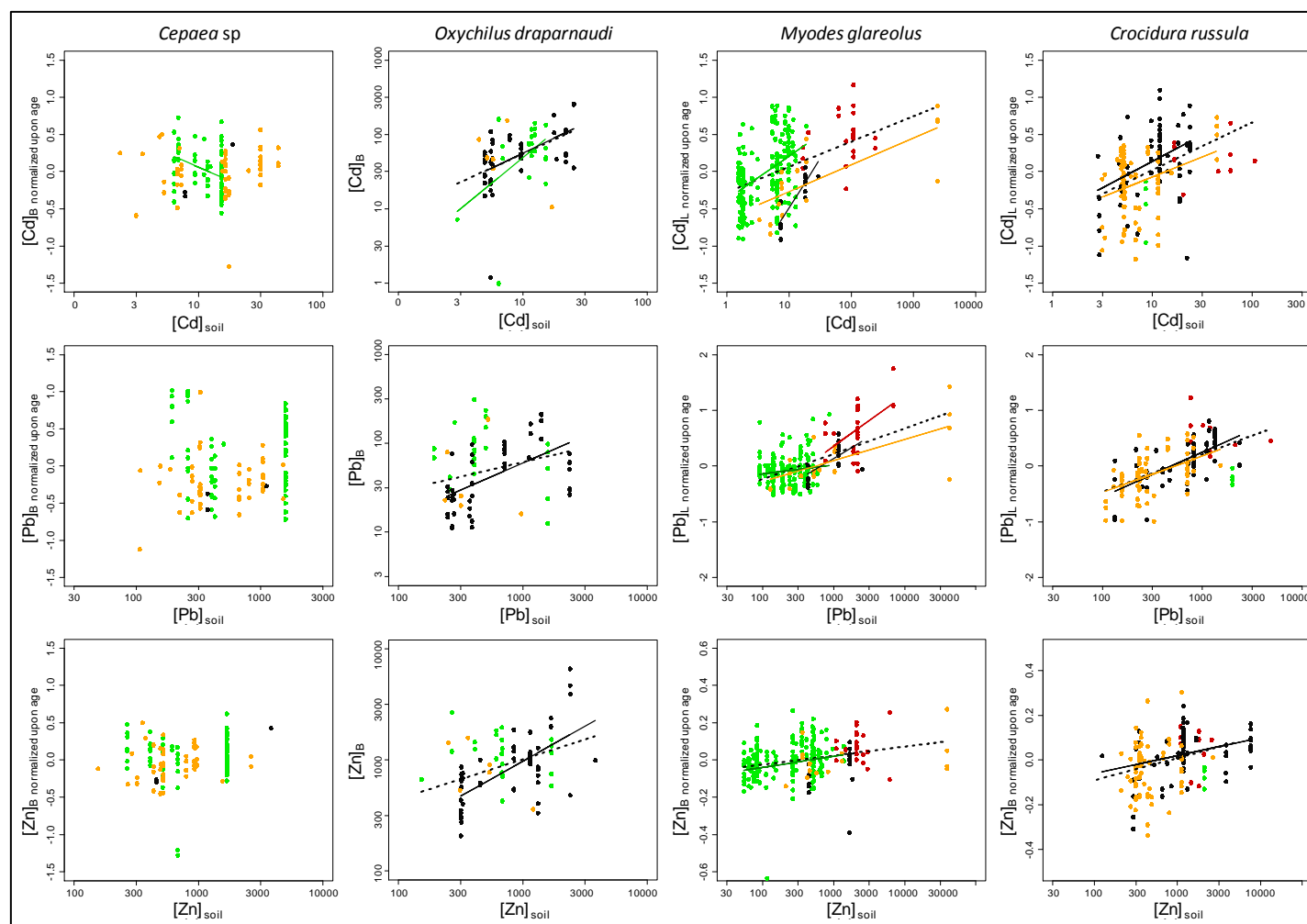
Different patterns could be noticed between non-essential (Cd, Pb) and essential (Zn) metals in small mammals. Most of the regressions were significant for non-essential metals contrarily to Zn and the increase of internal concentrations along pollution gradient was higher for non-essentials (lowest regression coefficient was 0.22 for Cd and Pb whereas the highest for Zn was 0.10), and inter-individual variability was lower for Zn.

Several patterns linking internal and soil MTEs existed, showing various combinations of relatively high / low internal MTE levels with sharp / slight increase of internal MTEs along the pollution gradient. The relationships between internal and soil MTE concentrations varied among landscapes, but these differences were metal-specific and species-specific and thus rendered difficult any generalization (Figure III.2.3, Tables III.2.4, III.2.6 and III.2.7).

The partial  $R^2$  for landscape variable was found rather less important than soil contamination but as important as age in explaining internal MTE concentrations (Table III.2.4). The models gathering all the variables (MTE soil concentration (total), age (except for glass snail) and landscape) explained up to 39% of the variance of the dataset for Cd, 50% for the Pb and 38% for the Zn (Table III.2.4). Therefore, if studied variables significantly accounted for internal MTEs in snails and small mammals, a part of inter-individual variability remained unexplained.

**Table III.2.6.** Partial R-squared ( $R^2$ ), coefficient ( $b$ ), and statistical significance ( $p$  value) of significant regressions between MTE concentrations in animals (normalized upon age) and total MTE concentrations in soil at sampling point by landscape (A: agricultural lands, U: urban areas, S: scrub/shrublands, W: woodlands).

Species	Landscape	n	Cd			Pb			Zn		
			b	p	R <sup>2</sup>	b	p	R <sup>2</sup>	b	p	R <sup>2</sup>
<i>Cepaea sp</i>	All	131									
	A	52									
	S	0									
	U	3									
	W	76	-0.72	0.002	0.15						
<i>Oxychilus draparnaudi</i>	All	78	0.76	<0.001	0.20	0.33	0.010	0.08	0.36	<0.001	0.15
	A	6									
	S	0									
	U	50	0.81	<0.001	0.31	0.61	<0.001	0.34	0.63	<0.001	0.40
	W	22	1.37	0.047	0.23						
<i>Myodes glareolus</i>	All	243	0.34	<0.001	0.19	0.45	<0.001	0.33	0.05	<0.001	0.08
	A	16	0.36	<0.001	0.58	0.38	0.007	0.47			
	S	21				0.91	0.028	0.24			
	U	14	1.31	<0.001	0.78	0.76	0.015	0.40			
	W	192	0.58	<0.001	0.19	0.22	0.018	0.04	0.07	<0.001	0.08
<i>Crocidura russula</i>	All	163	0.64	<0.001	0.18	0.67	<0.001	0.37	0.10	<0.001	0.12
	A	75	0.54	0.012	0.10	0.65	<0.001	0.24			
	S	9									
	U	75	0.71	<0.001	0.17	0.79	<0.001	0.42	0.08	0.001	0.11
	W	4									



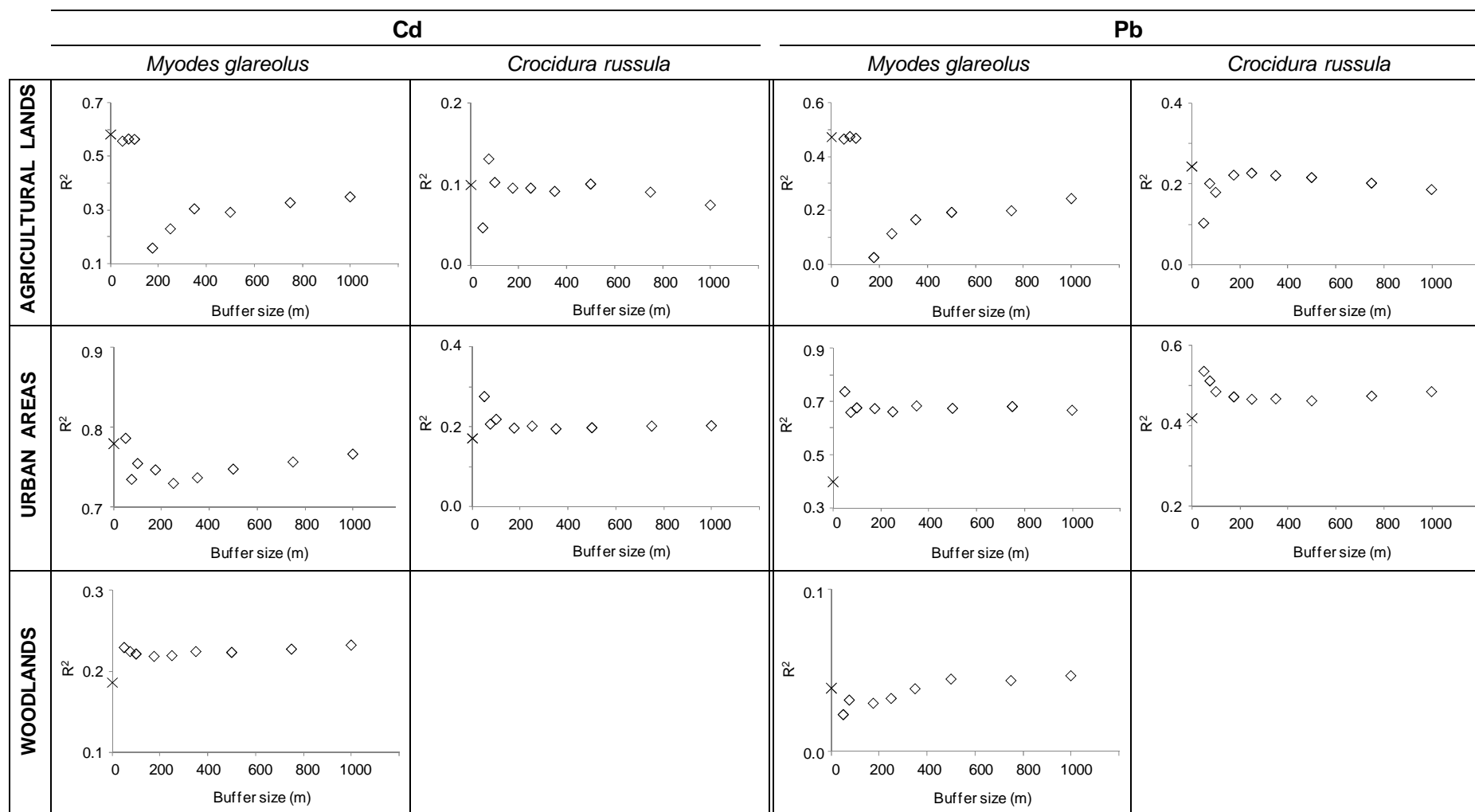
**Figure III.2.3.** Relationships between MTE concentrations in soft body for snails ( $[C]_B$ ) and in liver for small mammals ( $[C]_L$ ) normalized upon age (except for *O. draparnaudi*) and total MTE concentrations measured in soil ( $[C]_{soil}$ ) at sampling point ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw) by landscape type. Points are coloured according to the type of landscape where animals were captured (agricultural lands: orange, urban areas: black, scrub/shrublands: red, woodlands: green). Significant regressions ( $p < 0.05$ ) are plotted with lines which colours correspond to the landscape of concern, and black dashed lines symbolize the regression for the whole dataset including all landscape types.

### III.2.3.c. Spatial range of correlation between animal and soil MTE concentrations

Globally, MTE concentrations in animals were related to soil MTE concentrations in buffers, except for the grove snail (for which few relations were significant) and for Zn, which also showed few significant regressions. The number of significant relationships slightly increased from 27 when considering concentrations in soil at sampling point (Table III.2.6) to 31 (data not shown) when considering concentrations in soil at different buffer sizes. Figures III.2.4 and III.2.5 show  $R^2$  values of the regressions between internal concentrations (normalized upon age) and concentration in soils at sampling point and the evolution of  $R^2$  values of models taking into account the concentration in soils at different buffer sizes.

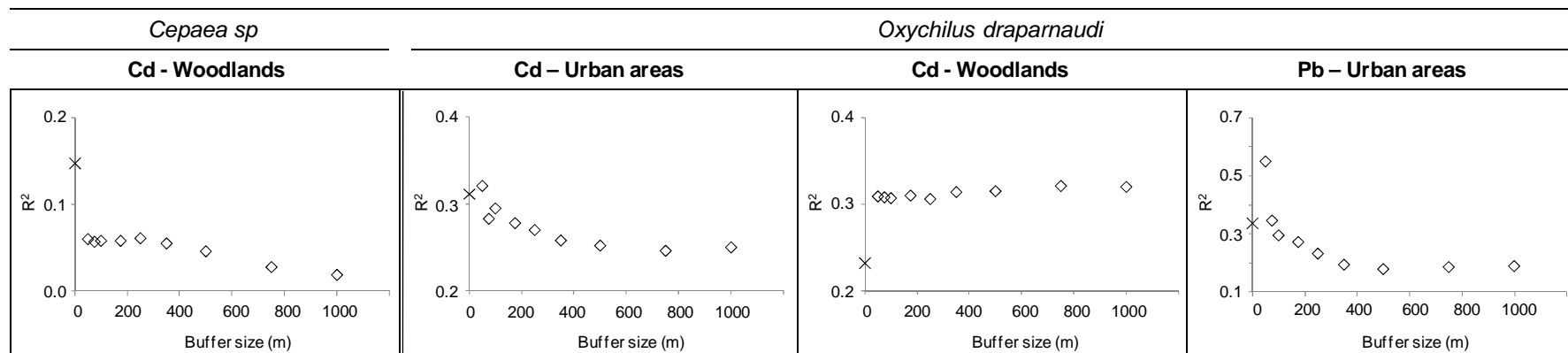
We found 4 major patterns in the relationships between internal concentrations and MTEs in buffers (Figures III.2.4 and III.2.5). The first pattern is represented by better correlations between internal and soil MTEs at sampling point or in buffers of small sizes (< 100 m) than in buffers of increasing sizes. This pattern is shown for instance in the case of Cd and Pb in bank voles from agricultural lands. A second pattern showed better correlations at the lowest buffer size (50 m) than at sampling point, followed by a decrease of  $R^2$  with increasing buffers sizes. This pattern can be seen in urban areas notably, for Cd and Pb in the bank vole, the shrew and the glass snail. A third pattern exhibited a better correlation using MTE concentrations in buffers than at sampling point, with  $R^2$  remaining stable whatever the buffer size. This is the case for Cd in the bank vole and in the glass snail from woodlands. Finally, a fourth pattern showed lowest  $R^2$  at 50 m-buffer size, but roughly similar  $R^2$  for MTEs at sampling point and in buffer from 75 to 1000 m. This pattern can be seen for Cd and Pb in shrews from agricultural lands. For the grove snail, the calculations could be performed for Cd in woodlands only and showed that internal concentrations were better correlated using Cd concentration in soils at sampling point rather than in buffers, but with a negative correlation.

As for the landscape effect, spatial patterns and correlations between animal and soil MTE concentrations were found to be metal-dependent, species-dependent and landscape-dependent.



**Figure III.2.4.** Values of partial  $R^2$  for soil Cd and Pb concentrations in significant regressions between internal MTE concentrations (normalized upon age) in small mammals and total soil MTE concentrations using measured values at sampling point ( $\times$ ) and predicted values at several buffer sizes ( $\diamond$ ) in agricultural lands, urban areas and woodlands.





**Figure III.2.5.** Values of partial  $R^2$  for soil Cd and Pb concentrations in significant regressions between internal MTE concentrations in snails (normalized upon age for *Cepaea*) and soil MTE concentrations using measured values at sampling point ( $\times$ ) and predicted values at several buffer sizes ( $\diamond$ ) in urban areas and woodlands.

### III.2.4. Discussion

#### III.2.4.a. Relationships between internal and soil MTE concentrations

The global high MTE contamination in soils surrounding the former Metaleurop smelter was reflected by high internal metal levels measured in sampled organisms, which appeared among the highest reported in the literature for the studied species (Williamson, 1980; Berger and Dallinger, 1993; Shore and Rattner, 2001; Damek-Poprawa and Sawicka-Kapusta, 2004; Notten et al., 2005; Sánchez-Chardi et al., 2007; Sánchez-Chardi and Nadal, 2007; Wijnhoven et al., 2007; Sánchez-Chardi et al., 2009).

Contrarily to the study of Notten et al. (2005) on *Cepaea* snails in the Biesbosch floodplain, we did not observe an increase of accumulated MTE in soft bodies with soil total MTE contamination (Notten et al., 2005), which could be due to a seasonal effect (Williamson, 1980). Our study was indeed carried out in autumn while the study of Notten et al. was performed during summer; and *Cepaea* snails sampled during springtime in the surroundings of Metaleurop exhibited an increase of internal MTE concentrations along the pollution gradient (unpublished data). Previous field and laboratory studies have also shown that internal MTE concentrations in *Cepaea* snails were better related to diet than to soil MTE concentrations (Dallinger et al., 2004; Notten et al., 2005). The only significant relationship between MTE concentrations in *Cepaea* snails and in soils was obtained for  $\text{CaCl}_2$ -extracted Cd. This could be due to the fact that  $\text{CaCl}_2$ , which is usually considered as a good extractant to estimate phytoavailable Cd concentrations (Harmsen, 2007; Meers et al., 2007), may have relatively well estimated the concentration of their vegetal diet. This was not the case for the glass snail, which has a carnivorous diet, and whose internal concentrations were only related to total soil MTEs. Concerning Pb and Zn, *Cepaea* snails have been shown to excrete these elements (Williamson, 1980). Thus, such a regulation of internal levels may explain the lack of relationship between internal and soil Pb or Zn concentrations.

Recent works have been devoted to the study of the accumulation of MTEs in small mammals along pollution gradients, considering both total or extractable MTE concentrations in soils, notably in the diffusely polluted floodplains in the Netherlands (Wijnhoven et al., 2007; Van Gestel, 2008) and in smelter-impacted soils in Belgium (Rogival et al., 2007). In Dutch floodplains, contrarily to our study, no correlation between total concentrations in soils and internal Cd, Pb or Zn in both the bank vole and the greater white-toothed shrew were found (Wijnhoven et al., 2007; Van Gestel, 2008). Those authors observed that soil Cd and Zn  $\text{CaCl}_2$ -extracted concentrations and internal Cd and Zn were correlated, in the bank vole and the greater white-toothed shrew, respectively. If a very low but significant relationship was found between soil Cd- $\text{CaCl}_2$  and Cd in the greater white-toothed shrew, we did not observe any correlation between soil Zn- $\text{CaCl}_2$  and internal Zn in the bank vole.

In this same environmental context of the Dutch floodplains, van Gestel (2008) found that soil invertebrates and small mammals showed increases of levels of Cd (and sometimes Cu and Pb)

while soil pore water and CaCl<sub>2</sub> extracts of metals were low, highlighting that metal concentrations were not suitable indicators of metal accumulation in the food chain. In a smelter-impacted site, more closely related to Metaleurop than the Dutch floodplains, Rogival et al (2007) used ammonium nitrate as chemical extractant and showed significant relationships between Cd and Pb concentrations in the diet (acorn, earthworm) and organs (liver, kidneys) of the wood mouse. They found stronger relationships between soil and diet MTEs using total rather than extractable concentrations for several metals including Cd, Pb and Zn. This could explain the better correlations found between total rather than extractable soil concentrations and accumulation in tissues in the present study. Indeed, total concentrations in soils may be better estimates of the contamination of the diet than extractable ones.

The slight increase of hepatic Zn concentrations of small mammals along the pollution gradient is consistent with some studies on Zn accumulation, which have evidenced slight differences between polluted and control field sites, and small mammal abilities to regulate internal levels of this essential element (Shore and Rattner, 2001; Milton et al., 2003; Loos et al., 2009; Sánchez-Chardi et al., 2009; Fritsch et al., 2010). Snails of *Oxychilus* species exhibited a stronger increase of internal Zn along the pollution gradient than small mammals and *Cepaea* sp, suggesting different Zn regulation strategies among these taxa.

Globally speaking, it clearly appears that the use of chemical extractants to estimate bioavailability of metals is strongly dependent on the site, the metal, and the species under consideration, rendering any generalization risky. In the light of our results and the discrepancies observed in the literature, it seems, as it was demonstrated for invertebrates and vegetation (Hobbelen et al., 2006; Bleeker and van Gestel, 2007; Harmsen, 2007; Migeon et al., 2009), that the relevance of chemical extractants for assessing the bioavailability of metals in field situation is also a great matter of concern for vertebrate wildlife. Availability of MTEs in soils may not be a limiting factor for MTE transfer in food webs, as bioavailability to herbivorous, omnivorous and carnivorous cannot be resumed by a single chemical extract in polluted soils. This phenomenon is probably due to the variety of exposure routes in both snails (Coourdassier et al., 2002; Scheifler et al., 2006; Smith et al., 2007) and to the fact that factors affecting transfer to secondary consumers are not only related to the partition of metals in soils, but also to parameters that modulate bioavailability along food chains, notably the levels and the chemical storage forms of accumulated MTE in dietary items and the availability of these items (Hendrickx et al., 2004; Vijver et al., 2004).

#### *III.2.4.b. Influence of landscape on animal MTE concentrations*

Our results show that the landscape represents a significant variable contributing, together with the soil concentration and the age of the animals, to explain internal MTE concentrations in 2 snail and 2 small mammal species.

The density, availability and diversity of dietary items are likely to vary among landscape types and it has been proved, for both snails and small mammals, that their diet varies according to the

availability of dietary items (Mason, 1970; Williamson and Cameron, 1976; Abt and Bock, 1998; Lugon-Moulin, 2003). The feeding and foraging behaviour of animals can therefore change according to the landscape type. Resulting variations in diet composition could affect the amount and the bioavailability of metals transferred along food chains, leading to variable accumulated levels in the organism of concern. Indeed, it has been shown that MTE bioavailability for an organism depends not only on its own digestive characteristics but also on the amount and the sequestration of metals in the dietary item (Wallace et al., 1998; Wallace and Luoma, 2003; Vijver et al., 2004; Hispard et al., 2007; Monteiro et al., 2008). It has been emphasized that metal bioavailability can be affected by foraging and feeding behaviour of the organisms (Burger et al., 2003; Peakall and Burger, 2003; Smith et al., 2007). The different patterns of Cd and Pb accumulation between landscapes found in the present work could thus be related to food chain effects. This was also suggested by Hendrickx et al (2004), who evidenced site-specific MTE accumulation in invertebrates (spiders and amphipods) and hypothesized that biological characteristics of sites, *via* alterations of trophic webs, modify MTE transfer (Hendrickx et al., 2004).

Using individual-based models, Schipper et al (2008) modelled the influence of environmental heterogeneity in Dutch floodplains (soil contamination, habitat availability and suitability...) on metal exposure in 4 species of small mammals, including the bank vole (Schipper et al., 2008). Comparing predicted and measured Cd concentrations, those authors concluded that environmental heterogeneity governed only a minor part of the variation in metal exposure and that intraspecies differences in exposure should mainly be due to inter-individuals variations in species traits (daily food intake, diet preferences, prey age...). In our study, soil contamination and landscape explained a rather large part (around 30%) of the variations of Cd internal concentrations. This could be due to the fact that we studied a larger pollution range for both MTE levels and surfaces of concern and that we considered the influence of the landscape (a complex mosaic of land uses) surrounding the sampling point, and not only the land use of the sampling point. Combining these two scales of perception, i.e. exposure heterogeneity within and between landscapes, could improve the understanding of ecological factors affecting transfer of MTEs in ecosystems. Multi-scale approaches has been shown to be relevant within the context of biological contaminant (e.g. parasites) transfer in eco-epidemiology (Giraudoux et al., 2002; Danson et al., 2003; Kitron et al., 2006), and thus appear also promising for studies on chemical transfer within landscape ecotoxicology framework.

Otherwise, our data revealed a high inter-individual variability in MTE concentrations, and although considering age, soil MTEs and landscape, more than half of variance remained unexplained. Therefore, our results are also partly in accordance with those of Schipper et al. (2008) concerning the strong influence of intraspecies variability on exposure and accumulation. This phenomenon suggest that internal MTE prediction using general regression models (a global model relating internal to soil MTE concentrations, as proposed in the literature (Shore, 1995;

Sample et al., 1998; Veltman et al., 2007)) should be used carefully, and that individual characteristics and behaviour seem to govern a large part of bioaccumulation.

#### *III.2.4.c. Spatial scale of correlation between animal and soil MTE concentrations*

As internal and soil MTE concentrations at sampling point were correlated, we argue that the present study evidences a spatially explicit relationship between MTE concentrations in animals and in soils. Our results stress that this spatial correlation is due to both the levels of metals in soils and the landscape composition around the habitats where animals were sampled. The improvement of the correlation between internal and external concentrations using an increasing buffer size was not straightforward, contrarily to what was expected. Marinussen and van der Zee (1996) modelled exposure to and accumulation of Cd in fictitious organisms having various sizes of home-range (10, 50, 100, 200 and 400 m<sup>2</sup>) and showed that the home-range size greatly affected both exposure and internal levels in organisms (Marinussen and van der Zee, 1996). We assume that the scale of the best association between internal and soil metal concentrations depends on numerous biological and ecological parameters. In fact, accumulation abilities, inter-individual variability, spatio-temporal variations in exposure, and the heterogeneity in levels of soil contamination may condition the strength of the relationship between accumulated and soil MTE concentrations.

#### *III.2.4.d. Overall interpretation of the results with the example of Pb*

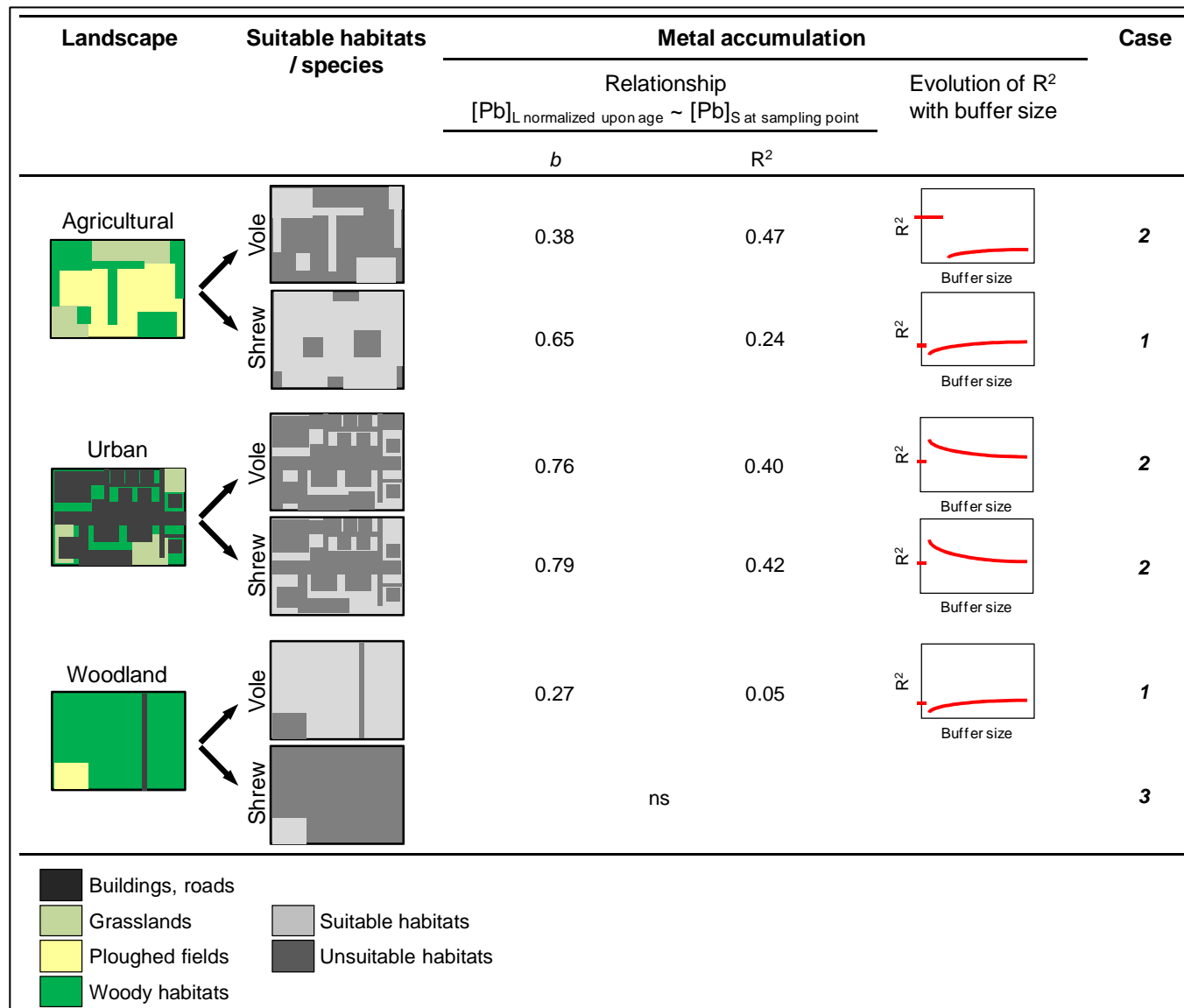
The movements of small mammals are known to be variable among landscapes because of the spatial heterogeneity of suitable habitats, their connectivity and the characteristics of the ecological barriers (Kozakiewicz et al., 2000; Vuilleumier and Fontanillas, 2007). Presence and survival of animals in heterogeneous landscapes are related to both site related characteristics, which define habitat quality at local scale, and to factors acting at landscape and/or meta-population scale (connectivity and habitat availability) (Burel et al., 2004). Both landscape features, animal habitat preferences and resource requirements govern the spatial repartition of suitable/unsuitable patches over an area (Burel and Baudry, 2003). This can result in different exposure patterns among landscapes for a given species, and to different inter-species exposure within a same landscape (Ares, 2003; Barnhouse et al., 2008). Within this context, we propose a synthetic interpretation of our results on small mammals, using Pb as an example (Figure 6), hypothesizing that relationships between internal and soil MTEs are modulated by interactions between landscape and ecological characteristics of the species.

We built hypothetical maps of suitable and unsuitable habitats for each species on the basis of data on habitat preferences found in the literature. The bank vole is a forest specialist species. It can live in other woody habitats (woodlots, hedgerows...) in heterogeneous landscapes (agricultural, urban...) where it is confined in woody patches and rarely moves in surrounding habitats or only cross them to reach other suitable woody habitats (Pollard et al., 1970; Paillat and

Butet, 1996; Kozakiewicz et al., 2000; Wijnhoven et al., 2006). The greater white-toothed shrew is more eurytopic. This species is mostly present in inhabited areas and open landscapes such as agricultural fields (Lugon-Moulin, 2003; Millán de la Peña et al., 2003; Wijnhoven et al., 2006; Vuilleumier and Fontanillas, 2007). Therefore, within each landscape, habitat suitability differs between vole and shrew.

We propose 3 different cases (Figure III.2.6). When almost the whole area is suitable (case 1, Figure III.2.6), home-ranges can overlap several habitats differing in metal contamination and individuals can easily move between more or less contaminated patches. Therefore, internal concentrations show high inter-individual variability and are poorly related to soil contamination (see  $R^2$  and slopes of the relationship, Figure III.2.6). Moreover, strength of the relationship between internal and soil MTEs does not substantially vary whatever considered scale for soil MTE concentration ( $R^2$  roughly similar between sampling point and buffers and among buffers). This is the case for shrews in agricultural lands and voles in woodlands. Conversely, when animals are confined in suitable patches isolated in a hostile matrix (case 2, Figure III.2.6), the absence or presence of local high contaminations in occupied patches would greatly condition animal exposure, since individuals cannot easily move or forage in surrounding habitats. Internal concentrations may strongly depend on soil MTE concentration in occupied patches, which can result in better correlation between internal and soil contamination than in case 1. In this case, represented by voles in agricultural lands and voles and shrews in urban areas, we globally found strong relationships between MTEs in animals and in soils (high values of  $R^2$  and/or slopes, Figure III.2.6). Moreover, we observed better correlations for local scales (sampling point or buffers size lower than 100 m, Figure III.2.6). Finally, in landscapes characterized by a major part of unsuitable habitats (case 3), animals can be found during migration and dispersal or in margins, and it could be supposed that the main duration of exposure has occurred in another place. In such cases (represented by shrews in woodlands and scrub/shrublands, Figure III.2.6), we captured few individuals, which were non-reproductive adults, and failed to detect relationships between MTEs in soils and in animals.

The spatial heterogeneity of soil contamination could more or less affect exposure, depending on species and landscape of concern. Therefore, we conclude that landscape feature modulates animal exposure to pollutants, and resulting accumulation, and that such an effect differ accordingly to species ecological characteristics.



**Figure III.2.6.** Synthesis of data concerning Pb in the bank vole and in the greater white-toothed shrew illustrating an overall interpretation of data. Data concerning metal accumulation are R<sup>2</sup> and slope of the regressions between Pb concentrations in the liver (normalized upon age) and total Pb concentrations in soil measured at sampling point and patterns of evolution of the R<sup>2</sup> with buffer size. Maps of landscapes are based upon observed situations within the study area, maps of suitable habitats by species are hypothesized from habitat preferences described in the literature. 3 patterns linking internal to soil MTE concentrations have been found, named “Case 1, 2 and 3”.

### III.2.5. Conclusions

In this study, we highlight that, apart from age and metal concentration at sampling point, the landscape around the habitats of capture influences the internal MTE concentrations. Certain landscapes should therefore be more at risk than others, depending on considered organisms and metals. In some cases, transfer is high even at low soil contamination resulting in elevated accumulated levels of MTEs in animals (elevated biota-soil accumulation factor). In other cases, low internal MTE levels were found at low soil MTE concentrations but internal concentrations sharply increased along the pollution gradient, or finally, both phenomenon co-occur. We could propose that a landscape gathering the two phenomenon, which would enhance internal MTE levels (high levels at low contamination and sharp increase with pollution increase), would be the most at risk for exposed wildlife.

The lack of relationship between CaCl<sub>2</sub>-extracted MTE concentrations in soil and internal levels in animals, as well as the differences in relationships between soil and animal MTE concentrations between studies, show 2 major insights within a risk assessment framework. Firstly, the use of chemical extracts may not be relevant when assessing MTE bioavailability to herbivorous/granivorous and carnivorous species. Secondly, predictions of internal MTE using general accumulation models (global regression whatever site environmental characteristics such as landscape) might be used cautiously. They indeed should be considered only indicative, field measurements being required to reliably estimate accumulation in target organisms.

Exposure of wildlife to contaminants and subsequent MTE accumulation are affected by several parameters acting at different biological organization levels and are integrative variables of several processes. From our study, we suggest that MTE accumulation in snails and small mammals are governed by ecological (diet, habitat preferences, mobility...) and physiological (assimilation and excretion of MTE...) characteristics of animals. Our results strongly suggest that availability in soil does not fully determine transfer in food webs. Species ecology and landscape are key factors determining organism exposure and modulating internal MTE levels. Our findings lead to hypothesize that ecological characteristics, such as food web structure and the way that organisms exploit their environment (home-range size, migration, foraging and feeding behaviours, exploitation of several habitats...), both dependent on landscape features, mainly explain MTE transfer in food webs. The present study points out a need for further investigations to elucidate underlying mechanisms behind the landscape effect and shows the interest of a multi-scale approach in ecotoxicology.



**Acknowledgments** - The authors gratefully thank Cécile Grand from ADEME (*Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie*) for many fruitful scientific discussions. We warmly thank Elie Dhivert, Alice Labourier, Jean-Claude Lambert, Christiane Lovy, Jonathan Paris and Pierre-Yves Peseux for their technical assistance. The STARTT programme is financially supported by ANR (*Agence Nationale de la Recherche*, contract n°ANR-05-ECCO-004) and ADEME (contract n°0572C0058). CF is financially supported by a grant from ADEME and the *Conseil Régional de Franche-Comté*.

### III.2.6. References

- Abt, K.F., Bock, W.F., 1998. Seasonal variations of diet composition in farmland field mice *Apodemus* spp. and bank voles *Clethrionomys glareolus*. *Acta Theriologica* 43, 379-389.
- AFNOR, 1996. Qualité des sols - Méthodes chimiques - sols sédiments, mise en solution totale par attaque acide - NF X31-147. Association Française de Normalisation, Paris, France.
- Ares, J., 2003. Time and space issues in ecotoxicology: Population models, landscape pattern analysis, and long-range environmental chemistry. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 945-957.
- Baker, S., Herrchen, M., Hund-Rinke, K., Klein, W., Kordel, W., Peijnenburg, W., Rensing, C., 2003. Underlying issues including approaches and information needs in risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 6-19.
- Barnhouse, L.W., Munns, W.R.J., Sorensen, M.T. (Eds.), 2008. Population-level ecological risk-assessment. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA.
- Baur, A., Baur, B., 1993. Daily movement patterns and dispersal in the land snail *Arianta arbustorum*. *Malacologia* 35, 89-98.
- Berger, B., Dallinger, R., 1993. Terrestrial snails as quantitative indicators of environmental metal pollution. *Environmental Monitoring and Assessment* 25, 65-84.
- Bleeker, E.A.J., van Gestel, C.A.M., 2007. Effects of spatial and temporal variation in metal availability on earthworms in floodplain soils of the river Dommel, The Netherlands. *Environmental Pollution* 148, 824-832.
- Burel, F., Baudry, J., 2003. Landscape ecology - Concepts, methods and applications. Sciences Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire, USA.
- Burel, F., Butet, A., Delettre, Y.R., de la Pena, N.M., 2004. Differential response of selected taxa to landscape context and agricultural intensification. *Landscape and Urban Planning* 67, 195-204.
- Burger, J., Diaz-Barriga, F., Marafante, E., Pounds, J., Robson, M., 2003. Methodologies to examine the importance of host factors in bioavailability of metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 20-31.
- Cameron, R.A.D., Williamson, P., 1977. Estimating migration and effects of disturbance in mark-recapture studies on snail *Cepaea nemoralis* L. *Journal of Animal Ecology* 46, 173-179.
- Carlsen, T.M., Coty, J.D., Kercher, J.R., 2004. The spatial extent of contaminants and the landscape scale: An analysis of the wildlife, conservation biology, and population modeling literature. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 798-811.
- Chaline, J., Baudvin, H., Jammot, D., Saint Giron, M.-C., 1974. Les proies des rapaces. Petits mammifères et leur environnement, Doin ed, Paris.
- Charissou, I., 1999. Identification des restes trouvés dans les pelotes de réjection de rapaces. *Supplément scientifique de la revue Etops* 44, 1-31.
- Clifford, P.A., Barchers, D.E., Ludwig, D.F., Sielken, R.L., Klingensmith, J.S., Graham, R.V., Banton, M.I., 1995. An approach to quantifying spatial components of exposure for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 895-906.
- Coeurdassier, M., Gomot-de Vaufléury, A., Lovy, C., Badot, P.-M., 2002. Is the cadmium uptake from soil important in bioaccumulation and toxic effects for snails. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53, 425-431.
- Dallinger, R., Lagg, B., Egg, M., Schipflinger, R., Chabicoovsky, M., 2004. Cd accumulation and Cd-metallothionein as a biomarker in *Cepaea hortensis* (Helicidae, Pulmonata) from laboratory exposure and metal-polluted habitats. *Ecotoxicology* 13, 757-772.
- Damek-Poprawa, M., Sawicka-Kapusta, K., 2004. Histopathological changes in the liver, kidneys, and testes of bank voles environmentally exposed to heavy metal emissions from the steelworks and zinc smelter in Poland. *Environmental Research* 96, 72-78.
- Danson, F.M., Graham, A.J., Pleydell, D.R.J., Campos-Ponce, M., Giraudoux, P., Craig, P.S., 2003. Multi-scale spatial analysis of human alveolar echinococcosis risk in China. *Parasitology* 127, S133-S141.
- de Vaufléury, A.G., Pihan, F., 2000. Growing snails used as sentinels to evaluate terrestrial environment contamination by trace elements. *Chemosphere* 40, 275-284.

- Douay, F., Pruvot, C., Roussel, H., Ciesielski, H., Fourier, H., Proix, N., Waterlot, C., 2008. Contamination of urban soils in an area of Northern France polluted by dust emissions of two smelters. *Water, Air, and Soil Pollution* 188, 247-260.
- Douay, F., Pruvot, C., Waterlot, C., Fritsch, C., Fourier, H., Lorette, A., Bidar, G., Grand, C., de Vaufléury, A., Scheifler, R., 2009. Contamination of woody habitat soils around a former lead smelter in the North of France. *Science of the Total Environment* 407, 5564-5577.
- Ettler, V., Vanek, A., Mihaljevic, M., Bezdicka, P., 2005. Contrasting lead speciation in forest and tilled soils heavily polluted by lead metallurgy. *Chemosphere* 58, 1449-1459.
- Fairbrother, A., Wenstel, R., Sappington, K., Wood, W., 2007. Framework for metals risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68, 145-227.
- Fowler, D., Smith, R.I., Leith, I.D., Crossley, A., Mourné, R.W., Branford, D.W., Moghaddam, M., 1998. Quantifying fine-scale variability in pollutant deposition in complex terrain using  $^{210}\text{Pb}$  inventories in soil. *Water, Air, and Soil Pollution* 105, 459-470.
- Fowler, D., Skiba, U., Nemitz, E., Choubedar, F., Branford, D., Donovan, R., Rowland, P., 2004. Measuring aerosol and heavy metal deposition on urban woodland and grass using inventories of  $^{210}\text{Pb}$  and metal concentrations in soil. *Water, Air, & Soil Pollution: Focus* 4, 483-499.
- Frangi, J.-P., Richard, D., 1997. Heavy metal soil pollution cartography in northern France. *Science of the Total Environment* 205, 71-79.
- Fritsch, C., Cosson, R.P., Coeurdassier, M., Raoul, F., Giraudoux, P., Crini, N., de Vaufléury, A., Scheifler, R., 2010. Responses of wild small mammals to a pollution gradient: host factors influence metal and metallothionein levels. *Environmental Pollution* 158, 827-840.
- Fritsch, C., Giraudoux, P., Coeurdassier, M., Douay, F., Raoul, F., Pruvot, C., Waterlot, C., de Vaufléury, A., Scheifler, R., *submitted*. Scales and variables affecting the spatial distribution of metals in smelter-impacted woody soils differ between total and extractable concentrations. *Chemosphere*.
- Gaines, K., Boring, C., Porter, D., 2005. The development of a spatial explicit model to estimate radiocaesium body burdens in raccoons (*Procyon lotor*) for ecological risk assessment. *Science of the Total Environment* 341, 15-31.
- Giraudoux, P., Delattre, P., Takahashi, K., Raoul, F., Quééré, J.P., Craig, P., Vuitton, D., 2002. Transmission ecology of *Echinococcus multilocularis* in wildlife: what can be learned from comparative studies and multi-scale approaches ?, in: Craig, P., Pawlowski, Z. (Eds.), *Cestode zoonoses: Echinococcosis and Cystercosis. An emergent and global problem*. NATO Sciences Series, IOS press, Amsterdam, The Netherlands, pp. 251-262.
- Harmsen, J., 2007. Measuring bioavailability: From a scientific approach to standard methods. *Journal of Environmental Quality* 36, 1420-1428.
- Hendrickx, F., Maelfait, J.-P., Bogaert, N., Tojal, C., Du Laing, G., Tack, F.M.G., Verloo, M.G., 2004. The importance of biological factors affecting trace metal concentration as revealed from accumulation patterns in co-occurring terrestrial invertebrates. *Environmental Pollution* 127, 335-341.
- Hispard, F., De Vaufléury, A., Cosson, R.P., Devaux, S., Scheifler, R., Coeurdassier, M., Gimbert, F., Martin, H., Richert, L., Berthelot, A., Badot, P.-M., 2007. Comparison of transfer and effects of Cd on rats exposed in a short experimental snail-rat food chain or to CdCl<sub>2</sub> dosed food. *Environment International* 34, 381-389.
- Hobbelen, P.H.F., Koolhaas, J.E., van Gestel, C.A.M., 2006. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* in relation to total and available metal concentrations in field soils. *Environmental Pollution* 144, 639-646.
- Hope, B.K., 2000. Generating probabilistic spatially-explicit individual and population exposure estimates for ecological risk assessments. *Risk Analysis* 20, 573-589.
- Hope, B.K., 2001. A case study comparing static and spatially explicit ecological exposure analysis methods. *Risk Analysis* 21, 1001-1010.
- Hope, B.K., 2006. An examination of ecological risk assessment and management practices. *Environment International* 32, 983-995.
- ISO, 2008. Soil quality - Requirements and guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials. ISO 17402:2008. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Kapusta, P., Sobczyk, L., Rozen, A., Weiner, J., 2003. Species diversity and spatial distribution of enchytraeid communities in forest soils: effects of habitat characteristics and heavy metal contamination. *Applied Soil Ecology* 23, 187-198.
- Kapustka, L.A., 2008. Limitations of the current practices used to perform ecological risk assessment. *Integrated Environmental Assessment and Management* 4, 290-298.
- Kerney, M.P., Cameron, R.A.D., 2006. Guide des escargots et limaces d'Europe. Delachaux et Niestlé, Paris, France.
- Kitron, U., Clennon, J.A., Cecere, M.C., Gurtler, R.E., King, C.H., Vazquez-Prokopec, G., 2006. Upscale or downscale: applications of fine scale remotely sensed data to Chagas disease in Argentina and schistosomiasis in Kenya. *Geospatial Health* 1, 49-58.
- Kooistra, L., Leuven, R.S.E.W., Nienhuis, P.H., Wehrens, R., Buydens, L.M.C., 2001. A Procedure for Incorporating Spatial Variability in Ecological Risk Assessment of Dutch River Floodplains. *Environmental Management* 28, 359-373.
- Kooistra, L., Huijbregts, M.A.J., Ragas, A.M.J., Wehrens, R., Leuven, R., 2005. Spatial variability and uncertainty in ecological risk assessment: A case study on the potential risk of cadmium for the little owl in a Dutch river flood plain. *Environmental Science and Technology* 39, 2177-2187.

- Kozakiewicz, M., 1976. The weight of eye lens as the proposed age indicator of the bank vole. *Acta Theriologica* 21, 314-316.
- Kozakiewicz, M., Van Apeldoorn, R., Bergers, P., Gortat, T., Kozakiewicz, A., 2000. Landscape approach to bank vole ecology. *Polish Journal of Ecology* 48, 149-161.
- Le Louarn, H., Quéré, J., Butet, A., 2003. *Les Rongeurs de France - Faunistique et biologie*, 2e édition revue et augmentée ed, Paris, France.
- Lidicker, W.Z.J., 2008. Levels of organization in biology: on the nature and nomenclature of ecology's fourth level. *Biological Reviews* 83, 71-78.
- Loos, M., Ragas, A.M.J., Tramper, J.J., Hendriks, A.J., 2009. Modeling zinc regulation in small mammals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 2378-2385.
- Lugon-Moulin, N., 2003. *Les Musaraignes - Biologie, Ecologie, Répartition en Suisse*, Ayer, Switzerland.
- Luoma, S.N., Rainbow, P.S., 2005. Why is metal bioaccumulation so variable? *Biodynamics as a unifying concept*. *Environmental Science and Technology* 39, 1921-1931.
- Magiera, T., Zawadzki, J., 2007. Using of high-resolution topsoil magnetic screening for assessment of dust deposition: Comparison of forest and arable soil datasets. *Environmental Monitoring and Assessment* 125, 19-28.
- Mahtfeld, K., 2000. Impact of introduced gastropods on molluscan communities, northern North Island, Conservation Advisory Science Notes No. 277. Department of Conservation, Wellington, New Zealand.
- Marinussen, M.P.J.C., van der Zee, S.E.A.T.M., 1996. Conceptual approach to estimating the effect of home-range size on the exposure of organisms to spatially variable soil contamination. *Ecological Modelling* 87, 83-89.
- Mason, C.F., 1970. Food, feeding rates and assimilation in woodland snails. *Oecologia* 4, 358-373.
- Meers, E., Samson, R., Tack, F.M.G., Ruttens, A., Vandegehuchte, M., Vangronsveld, J., Verloo, M.G., 2007. Phytoavailability assessment of heavy metals in soils by single extractions and accumulation by *Phaseolus vulgaris*. *Environmental and Experimental Botany* 60, 385-396.
- Migeon, A., Richaud, P., Guinet, F., Chalot, M., Blaudez, D., 2009. Metal accumulation by woody species on contaminated sites in the north of France. *Water Air and Soil Pollution* 204, 89-101.
- Millán de la Peña, N., Butet, A., Delettre, Y., Paillat, G., Morant, P., Le Du, L., Burel, F., 2003. Response of the small mammal community to changes in western French agricultural landscapes. *Landscape Ecology* V18, 265-278.
- Milton, A., Cooke, J.A., Johnson, M.S., 2003. Accumulation of Lead, Zinc, and Cadmium in a Wild Population of (*Clethrionomys glareolus*) from an Abandoned Lead Mine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44, 405-411.
- Monteiro, M.S., Santos, C., Soares, A., Mann, R.M., 2008. Does subcellular distribution in plants dictate the trophic bioavailability of cadmium to *Porcellio dilatatus* (Crustacea, Isopoda)? *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 2548-2556.
- Notten, M.J.M., Oosthoek, A.J.P., Rozema, J., Aerts, R., 2005. Heavy metal concentrations in a soil-plant-snail food chain along a terrestrial soil pollution gradient. *Environmental Pollution* 138, 178-190.
- Paillat, G., Butet, A., 1996. Spatial dynamics of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) in a fragmented landscape. *Acta Oecologica – International Journal of Ecology* 17, 553-559.
- Peakall, D., Burger, J., 2003. Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 110-121.
- Peijnenburg, W.J.G.M., Jager, T., 2003. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 63-77.
- Pollard, E., Relton, J., Hedges, V., 1970. A study of small mammals in hedges and cultivated fields. *Journal of Applied Ecology* 7, 549-557.
- Purucker, S.T., Welsh, C.J.E., Stewart, R.N., Starzec, P., 2007. Use of habitat-contamination spatial correlation to determine when to perform a spatially explicit ecological risk assessment. *Ecological Modelling* 204, 180-192.
- R Development Core Team, 2006. R: A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org>, Vienna, Austria.
- Rieuwerts, J., Farago, M., 1996. Heavy metal pollution in the vicinity of a secondary lead smelter in the Czech Republic. *Applied Geochemistry* 11, 17-23.
- Rogival, D., Scheirs, J., Blust, R., 2007. Transfer and accumulation of metals in a soil-diet-wood mouse food chain along a metal pollution gradient. *Environmental Pollution* 145, 516-528.
- Sadowska, E.T., Baliga-Klimczyk, K., Chrzascik, K., Koteja, P., 2008. Laboratory model of adaptive radiation: a selection experiment in the bank vole. *Physiological and Biochemical Zoology* 81, 627-640.
- Sample, B.E., Beauchamp, J.J., Efroymson, R.A., Suter II, G.W., 1998. Development and validation of bioaccumulation models for small mammals. Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, USA, p. 89.
- Sánchez-Chardi, A., Lopez-Fuster, M.J., Nadal, J., 2007. Bioaccumulation of lead, mercury, and cadmium in the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*, from the Ebro Delta (NE Spain): Sex- and age-dependent variation. *Environmental Pollution* 145, 7-14.
- Sánchez-Chardi, A., Nadal, J., 2007. Bioaccumulation of metals and effects of landfill pollution in small mammals. Part I. The greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*. *Chemosphere* 68, 703-711.

- Sánchez-Chardi, A., Ribeiro, C.A.O., Nadal, J., 2009. Metals in liver and kidneys and the effects of chronic exposure to pyrite mine pollution in the shrew *Crocidura russula* inhabiting the protected wetland of Doñana. *Chemosphere* 76, 387-394.
- Scheifler, R., de Vauflleury, A., Coeurdassier, M., Crini, N., Badot, P.M., 2006. Transfer of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn in a soil-plant-invertebrate food chain: A microcosm study. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 815-822.
- Schipper, A.M., Loos, M., Ragas, A.M.J., Lopes, J.P.C., Nolte, B.T., Wijnhoven, S., Leuven, R.S.E.W., 2008. Modeling the influence of environmental heterogeneity on heavy metal exposure concentrations for terrestrial vertebrates in river floodplains. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 919-932.
- Shore, R., 1995. Predicting cadmium, lead and fluoride levels in small mammals from soil residues and by species-species extrapolation. *Environmental Pollution* 88, 333-340.
- Shore, R.F., Rattner, B.A. (Eds.), 2001. *Ecotoxicology of Wild Mammals*. John Wiley & Sons, London, UK.
- Smith, P.N., Cobb, G.P., Godard-Codding, C., Hoff, D., McMurry, S.T., Rainwater, T.R., Reynolds, K.D., 2007. Contaminant exposure in terrestrial vertebrates. *Environmental Pollution* 150, 41-64.
- Smith, R., Pollard, S.J.T., Weeks, J.M., Nathanail, C.P., 2006. Assessing harm to terrestrial ecosystems from contaminated land. *Soil Use and Management* 21, 527-540.
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourrier, H., 2000. Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environmental Pollution* 107, 377-389.
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourrier, H., Perdrix, E., 2002. Assessment of the contamination of cultivated soils by eighteen trace elements around smelters in the North of France. *Water, Air, and Soil Pollution* 135, 173-194.
- Talmage, S., Walton, B., 1991. Small mammals as monitors of environmental contaminants. *Review of Environmental Contaminants and Toxicology* 119, 47-145.
- Topping, C.J., Sibly, R.M., Akçakaya, H.R., Smith, G.C., Crocker, D.R., 2005. Risk Assessment of UK Skylark Populations Using Life-History and Individual-Based Landscape Models. *Ecotoxicology* 14, 925-936.
- van den Brink, N., Lammertsma, D., Dimmers, W., Boerwinkel, M.-C., van der Hout, A., 2010. Effects of soil properties on food web accumulation of heavy metals to the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*). *Environmental Pollution* 158, 245-251.
- Van Gestel, C.A.M., 2008. Physico-chemical and biological parameters determine metal bioavailability in soils. *Science of the Total Environment* 406, 385-395.
- Van Straalen, N.M., 1996. Critical body concentrations : their use in bioindication, in: Van Straalen, N.M., Krivolustky, D.A. (Eds.), *Bioindicator systems for soil pollution*. Kluwer Academic, Amsterdam, pp. 5-16.
- Veltman, K., Huijbregts, M.A.J., Hamers, T., Wijnhoven, S., Hendriks, A.J., 2007. Cadmium accumulation in herbivorous and carnivorous small mammals: Meta-analysis of field data and validation of the bioaccumulation model optimal modeling for ecotoxicological applications. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 1488-1496.
- Vermeulen, F., Van den Brink, N.W., D'Havé, H., Mubiana, V.K., Blust, R., Bervoets, L., De Coen, W., 2009. Habitat type-based bioaccumulation and risk assessment of metal and As contamination in earthworms, beetles and woodlice. *Environmental Pollution* 157, 3098-3105.
- Vijver, M.G., Van Gestel, C.A.M., Lanno, R.P., Van Straalen, N.M., Peijnenburg, W.J.G.M., 2004. Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: A review. *Environmental Science and Technology* 38, 4705-4712.
- Vonproschwitz, T., 1994. *Oxychilus cellarius* (Müller) and *Oxychilus draparnaudi* (Beck) as predators on egg clutches of *Arion lusitanicus mabille*. *Journal of Conchology* 35, 183-184.
- Vuilleumier, S., Fontanillas, P., 2007. Landscape structure affects dispersal in the greater white-toothed shrew: Inference between genetic and simulated ecological distances. *Ecological Modelling* 201, 369-376.
- Wallace, W.G., Lopez, G.R., Levinton, J.S., 1998. Cadmium resistance in an oligochaete and its effect on cadmium trophic transfer to an omnivorous shrimp. *Marine Ecology Progress Series* 172, 225-237.
- Wallace, W.G., Luoma, S.N., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). *Marine Ecology Progress Series* 257, 125-137.
- Wijnhoven, S., van der Velde, G., Leuven, R., Smits, A., 2006. Modelling recolonisation of heterogeneous river floodplains by small mammals. *Hydrobiologia* 565, 135-152.
- Wijnhoven, S., Leuven, R., van der Velde, G., Jungheim, G., Koelemij, E., de Vries, F., Eijsackers, H., Smits, A., 2007. Heavy-metal concentrations in small mammals from a diffusely polluted floodplain: importance of species- and location-specific characteristics. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52, 603-613.
- Williamson, P., Cameron, R.A.D., 1976. Natural diet of landsnail *Cepaea nemoralis*. *Oikos* 27, 493-500.
- Williamson, P., 1979. Age determination of juvenile and adult *Cepaea*. *Journal of Molluscan Studies* 45, 52-60.
- Williamson, P., 1980. Variables affecting body burdens of lead, zinc and cadmium in a roadside population of the snail *Cepaea hortensis* Müller. *Oecologia* 44, 213-220.
- Wolda, H., Zweep, A., Schuitema, K.A., 1971. The role of food in the dynamics of populations of the landsnail *Cepaea nemoralis*. *Oecologia* 7, 361-381.
- Woodbury, P.B., 2003. Dos and don'ts of spatially explicit ecological risk assessments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 977-982.

### III.2.7. Supporting information

#### Prediction of MTE concentrations in soils

Data available from the present study and the LSE database for the prediction of total MTE concentrations in soils were 294, 39 and 262 for agricultural, urban and woody soils, respectively (Table SI1). Among these last 262 data, the substrate of one sampled point corresponded to a dredged sediment deposit and thus was not a soil *sensu stricto*. This sediment came from the Deûle River, which has received effluents and wastes from the Metaleurop plants for decades, and was extremely polluted. This point was therefore considered separately from the other woody soils to avoid overestimating MTE concentrations in woody habitats surrounding this particular site. Moreover, it was used to interpolate MTE concentrations in a similar site, which also received dredged sediments from the Deûle but was not sampled in this work.

**Table SI1.** Total concentrations of Cd, Pb and Zn ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  dw) in soils for agricultural (“A”,  $n = 294$ ), urban (“U”,  $n = 39$ ), woody (“W”,  $n = 261$ ) soils and dredged material deposits (“D”,  $n = 1$ ).

Metal	Soil use	Minimum	Median	Maximum
Cd	A	1.6	5.0	44.0
	U	2.5	12.0	31.0
	W	0.1	5.0	236.5
	D		2 402.0	
Pb	A	80	265	3 005
	U	124	794	3 711
	W	16	303	7 331
	D		41 960	
Zn	A	124	376	2 515
	U	203	858	5 830
	W	44	460	7 264
	D		38 760	

Previous studies conducted in the surroundings of the former Metaleurop Nord smelter have reported that Cd, Pb and Zn concentrations in soils decrease with the distance to the smelter (Sterckeman et al., 2002; Douay et al., 2008; Fritsch et al., *submitted*). Furthermore, in the case of atmospheric deposition of contaminated dusts, it has been shown that winds might influence deposition rates and hence soil pollution, with an enhancement of contamination at downwind locations (Antonic and Legovic, 1999; Goodarzi et al., 2001; De Ridder et al., 2004; Ali-Khodja et al., 2005; Hasselbach et al., 2005). Metal levels can also depend on land use as evidenced by several studies: woodlands are generally more contaminated than open lands (grasslands, arable lands, moorlands or heathlands) due to higher deposition and retention (Rieuwerts and Farago,

1996; Skrivan et al., 1996; Fowler et al., 1998; Fowler et al., 2004; Ettler et al., 2005; Magiera and Zawadzki, 2007). Moreover, in urban areas, a part of variability in metal levels is related to land use because of differences in source of contamination and in deposits (Kelly et al., 1996; Linde et al., 2001; Bretzel and Calderisi, 2006). Consequently, we studied the relationships between metal concentrations in soils and the distance to Metaleurop, the frequency of wind and the soil use (agricultural, urban, sediment deposits, and woody).

The Euclidean distance (expressed in meters) between each soil sampling point (centre of the patch concerned by the composite sampling) and the source (centre of the former Metaleurop plant) was calculated. The distance between sampling points to Metaleurop varied from 472 to 5795 m. Wind data were obtained from *Météo-France* (Paris, France). The dataset consisted in 18 238 daily measurements of instantaneous wind at 10 m height from January 1958 to December 2007 in Lille-Lesquin meteorological station (about 20 km away from Metaleurop). The resulting compass rose integrates wind direction and frequency (%). For each class of angle of the compass rose circle (from 0 to 360°, step of 20°), the frequency of the wind blowing up this angle was reported, the sum of the frequencies of all angles being 100%. The compass rose was centred on Metaleurop Nord smelter: for each soil sampling point, the angle between the vector “Metaleurop smelter to the North” and the vector “Metaleurop smelter to the soil sampling point” was calculated and thus, for each point, the value of wind attributed corresponded to the frequency (%) of wind blowing on the point. The frequency of wind ranged from 1 to 11 % (median = 7 %). The prevailing wind came from southwest and west: the higher frequencies were reported for winds coming from 260°, 240° and 200°, with frequencies of 11.1, 8.8 and 8.5%, respectively, and the lower frequencies were measured for winds coming from east (100°, 120° and 140°) with values of 2.1, 1.4 and 2.7% respectively (data not shown).

Relationships between total MTE concentrations in soils and distance to Metaleurop, frequency of wind and soil use were studied using general linear models (GLMs). The statistical distribution of data was checked using the test of Shapiro. Total MTE concentrations being skewed, data were log-transformed using  $\log_{10}(x + 1)$ . Since the relationship between soil concentrations and distance was not linear but logarithmic, we introduced a decimal logarithmic function in the model. The significance of the variables in the model was assessed by permutation test (Monte-Carlo, 1000 permutations), the partial R-squared ( $R^2$ ) were calculated using an analysis of variance (ANOVA) and the pairwise comparisons were realized by Tukey's honest significant difference test. Total MTE concentrations decreased with the distance from Metaleurop ( $p < 0.001$ ; partial  $R^2 = 0.51, 0.48$  and  $0.40$  for Cd, Pb and Zn, respectively) and were positively related to the frequency of wind ( $p < 0.001$ ; partial  $R^2 = 0.08, 0.08$  and  $0.06$  for Cd, Pb and Zn, respectively). Conditionally to distance and wind, MTE concentrations differed among soil use (partial  $R^2 = 0.11, 0.11$  and  $0.09$  for Cd, Pb and Zn, respectively). All MTE concentrations were higher in woody than in agricultural soils ( $p < 0.001$ ) while they did not vary significantly between woody and urban soils ( $0.72 < p < 1$ ). Lead and Zn concentrations were higher in urban than in

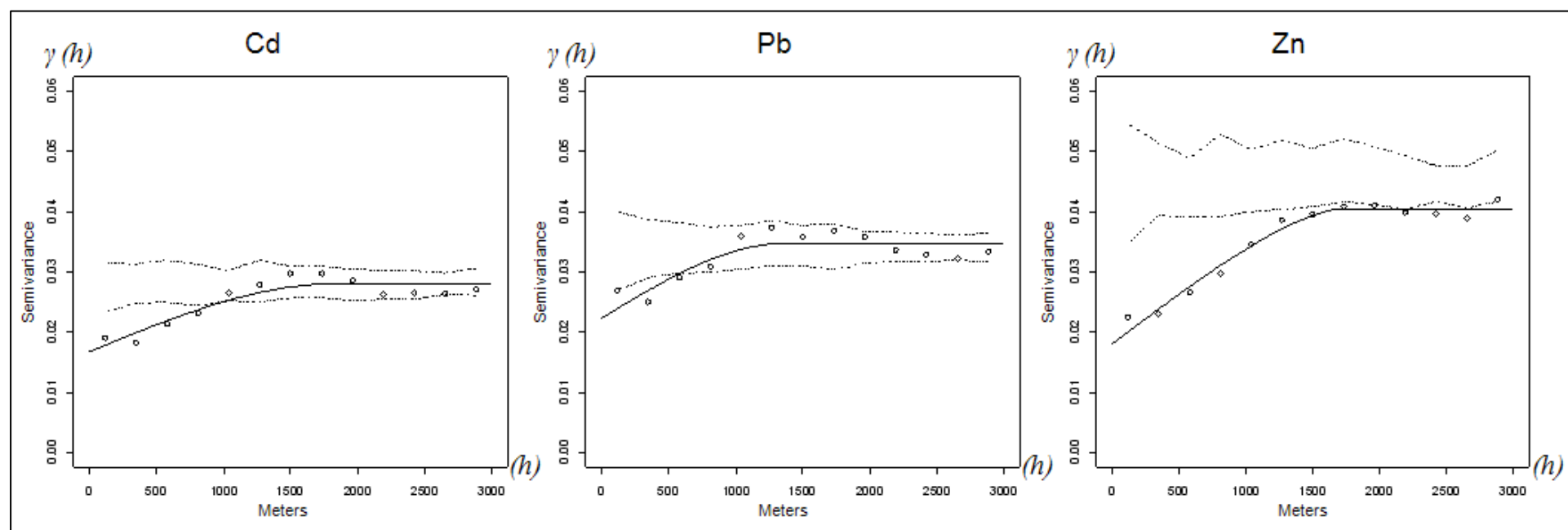
agricultural soils ( $p < 0.001$  for Pb and Zn) but this was not the case for Cd ( $p = 0.12$ ). Globally speaking, the contamination of soils ranked in the order dredged sediment deposit > woody ~ urban > agricultural. The values of  $R^2$  of the models including all variables (distance, wind and soil use) reached 0.70, 0.67 and 0.54 for Cd, Pb and Zn, respectively.

Then, we developed a predictive model using the universal kriging method described by Matheron (Matheron, 1969). This technique allows kriging non stationary data by the definition of a spatial trend. The kriging model has two components, the first one being the trend term and the second one being the spatially random variable (Matheron, 1969; Webster and Oliver, 2001). The spatial trend was defined for each metal by the respective GLM built above. Computation of directional variograms failed to detect a directional component. Subsequently, the spatial dependence was studied performing omnidirectional empirical variograms with variographic envelopes (Figure SI1) (Webster and Oliver, 2001; Bivand et al., 2008). The envelopes were obtained by permutation (99 simulations, Monte-Carlo method).

The models were fitted on the variograms with 4 correlation functions, which seemed relevant in the light of the spatial variance pattern (exponential, gaussian, spherical and circular). Models were cross-validated (leave-one-out). The best model was chosen on the basis of the sum of squares of the fitted models and of the following cross-validation criteria: mean error, mean square prediction error, mean square deviation ratio or mean square normalized error, Pearson correlation coefficient for observed *versus* predicted, Pearson correlation coefficient for predicted *versus* residuals (Webster and Oliver, 2001; Bivand et al., 2008). For both Cd and Pb, the best models were spherical while it was circular for Zn (Table SI2). The parameters of the spatial functions (nugget, partial sill and range) were similar for the 3 metals (Table SI2).

The average distance between couples of nearest points was calculated in order to choose a relevant distance between the nodes of a regular grid on which kriging would be applied. This distance was 112 m and thus, a distance of 100 m between nodes was chosen. At each node of the regular grid, the distance to Metaleurop and the frequency of wind were computed and a soil use (according to the soil use map, see § III.2.2.c) was allocated.

Finally, we kriged soil MTE concentrations at the nodes of the grid, and back-transformed obtained values (Figure 1). The goodness of fit revealed by the results of cross-validation, and the small variance of kriged values indicated that models reliably predicted total soil MTE concentrations.



**Figure S11.** Empirical omnidirectional variograms with variographic envelop and retained fitted models for Cd, Pb and Zn.

**Table S12.** Parameters of the fitted variogram models (range in meters), results of cross-validation (ME: mean error, MSPE: mean square predicted error, MSDR: mean squared deviation ratio,  $r$ : Pearson product-moment correlation coefficient) and median variance of kriged values for Cd, Pb and Zn.

Metal	Variogram model				Cross-validation					Kriging
	Correlation function	Nugget	Partial sill	Range	ME	MSPE	MSDR	$r$ observed and predicted	$r$ predicted and residuals	Median variance kriged values
Cd	Spherical	0.017	0.011	1846	<0.001	0.03	1.40	0.84	-0.02	0.05
Pb	Spherical	0.022	0.012	1385	<0.001	0.04	1.48	0.82	-0.02	0.07
Zn	Circular	0.018	0.022	1706	<0.001	0.04	1.65	0.81	-0.02	0.06





---

### III.3. CHAPITRE 3

#### VARIABILITE INTER-INDIVIDUELLE DES REPONSES DES MICROMAMMIFERES A LA CONTAMINATION ENVIRONNEMENTALE

---

*Quelle est l'influence des facteurs liés au récepteur (espèce, âge, sexe) sur l'accumulation des ETMs et sur les niveaux de métallothionéines ?*

#### Résumé

Nous avons étudié ici comment les facteurs liés aux récepteurs (espèce, âge, sexe) modulaient les concentrations internes en Cd, Pb, Zn et Cu, les niveaux en métallothionéines (MTs) et leur relations chez 7 espèces sympatriques de micromammifères le long d'un gradient de pollution. Les concentrations hépatiques et rénales en Cd augmentent avec l'âge chez toutes les espèces. L'influence de l'âge sur les autres métaux et les teneurs en MTs diffère entre les espèces. Le sexe n'influence pas les niveaux en ETMs et MTs excepté pour le campagnol roussâtre. Trois patrons liant les concentrations internes en ETMs et les niveaux de MTs sont observés le long du gradient : une faible accumulation des ETMs avec un (i) niveau élevé (mulot sylvestre) ou (ii) faible (campagnol roussâtre) accompagnée par une légère ou pas d'augmentation des MTs avec l'accumulation du Cd ; (iii) une forte accumulation des ETMs accompagnée d'une intense augmentation des MTs (musaraignes carrelet et pygmée). Dans des perspectives d'évaluation du risque et de suivi biologique, nous concluons que les mesures des niveaux d'ETMs et de MTs doivent être associées car elles ne peuvent être interprétées convenablement lorsqu'elles sont considérées séparément.

**Mots-clés** : biodisponibilité, bioaccumulation, élément trace métallique, sequestration, fonderie.

## Abstract

We investigated how host factors (species, age, gender) modulated Cd, Pb, Zn, and Cu concentrations, metallothionein levels (MTs) and their relationships in 7 sympatric small mammal species along a pollution gradient. Cd concentrations in liver and kidneys increased with age in all species. Age effect on other metals and MTs differs among species. Gender did not influence metal and MT levels except in the bank vole. Three patterns linking internal metal concentrations and MTs were observed along the gradient: a low metal accumulation with a (i) high (wood mouse) or (ii) low (bank vole) level of MTs accompanied by a slight or no increase of MTs with Cd accumulation; (iii) an elevated metal accumulation with a sharp increase of MTs (common and pygmy shrews). In risk assessment and biomonitoring perspectives, we conclude that measurements of MTs and metals might be associated because they cannot be interpreted properly when considered separately.

**Capsule:** « age more than gender and species more than trophic group influence metallic trace element and metallothionein levels and their relationships in wild small mammals exposed to metals ».

**Keywords:** bioavailability, bioaccumulation, metallic trace elements, sequestration, smelter.

## Publication relative :

*Responses of wild small mammals to a pollution gradient: host factors influence metal and metallothionein levels*

C. Fritsch<sup>a</sup>, R. P. Cosson<sup>b</sup>, M. Cœurdassier<sup>a</sup>, F. Raoul<sup>a</sup>, P. Giraudoux<sup>a</sup>, N. Crini<sup>a</sup>, A. de Vaufleury<sup>a</sup>, R. Scheifler<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Chrono-Environment, UMR 6249 University of Franche-Comté/CNRS Usc INRA, Place Leclerc, F-25030 Besançon Cedex, France

<sup>b</sup> EA 2160 - MMS (Mer, Molécules, Santé), University of Nantes, ISOMer, BP 92208, F-44322 Nantes cedex 3, France

Publié en 2010 dans *Environmental Pollution*, 158 (3): 827-840.

### III.3.1. Introduction

Wildlife is exposed when hosts and contaminants co-exist and interact in space and time (Baker et al., 2003; Smith et al., 2007). The transfer of pollutants from the environment to biota is influenced by numerous environmental (physico-chemical) and biological (host, ecosystems) parameters (Baker et al., 2003; Burger et al., 2003; Peakall and Burger, 2003; Van Gestel, 2008). According to Burger et al. (2003), the biological factors related to the hosts (“host factors”) are defined as any attribute of an individual, group of individuals, or species that influences the amount and degree of pollutant exposure, uptake, absorption, biokinetics, susceptibility and toxicity. These factors depend on biology, physiology and ecology of the hosts and result in differences in exposure (habitat, food chain...), often large inter-individual variability (age, gender, nutritional status, genetics...) and variable vulnerabilities of the different taxa (Peakall and Burger, 2003). In recent years, the need of understanding the influence of host factors on bioavailability, transfer and effects (i.e. from uptake to toxicological susceptibility) has been emphasized (Baker et al., 2003; Burger et al., 2003; Peakall and Burger, 2003; Gonzalez et al., 2008). Indeed, the inter- and intra-specific variations in responses (accumulation, effects) of hosts need to be better characterized in order to improve exposure and dose-response assessment.

When a pollutant enters an organism, the interactions with the metabolism can be identified on 4 types of sites: sites of action (toxicity), sites of metabolism (transformation), sites of excretion and sites of storage (Baker et al., 2003; Vijver et al., 2004; Walker et al., 2006). For most metallic trace elements (MTEs), transformation is not possible but accumulation in animals is observed with capability of storage under non or less toxic forms by sequestering MTEs in intracellular structures like inclusion bodies (granules) and metalloproteins, depending on the metal characteristics (Hopkin et al., 1989; Peakall and Burger, 2003; Vijver et al., 2004). Among metalloproteins, metallothioneins (MTs) are cystein-rich, heat stable, cytosolic, nonenzymatic, low-molecular-weight and ubiquitous metal binding proteins (Miles et al., 2000). Within the 4 classes of mammalian MTs, the MT-I and MT-II are considered to be principally involved in several metabolic processes such as absorption/excretion and homeostasis of essential metals, detoxification of non-essential ones and free radical scavenging (Miles et al., 2000; Savva et al., 2002; Amiard et al., 2006). The MT-I and MT-II synthesis could be induced by numerous factors such as heavy metals (Cd and Zn notably but also Pb, Ni, Hg and Ag), hormones, cytokines, stress and other chemicals (Miles et al., 2000; Savva et al., 2002; Amiard et al., 2006; Swiergosz-Kowalewska et al., 2007). The most efficient inducers are metals and glucocorticoids (Miles et al., 2000). The synthesis of MTs is modulated by numerous host and environmental factors like individual condition, developmental stage, temperature, ultraviolet radiation, photoperiod or season (Włostowski, 1992a; b; Davis and Cousins, 2000; Miles et al., 2000; Włostowski et al., 2004; Swiergosz-Kowalewska et al., 2007; Marques et al., 2008).

The relationships between exposure to metals and MT levels have been well studied in the

laboratory for certain mammal species, mainly rodents used as animal models (mouse and rat) and also for a wild small mammal, the bank vole *Myodes (ex-Clethrionomys) glareolus* (Włostowski, 1992b; Włostowski and Krasowska, 1999; Klaassen et al., 2009). However, few field studies investigated the relationships between metal accumulation and MT levels in wild terrestrial vertebrates except in recent biomonitoring studies using MTs as exposure biomarkers (Rogival et al., 2007a; Marques et al., 2008; Vanparys et al., 2008). For small mammals, some studies showed that MT levels were more elevated in individuals coming from contaminated areas (Damek-Poprawa, 2002; Rogival et al., 2007a; Swiergosz-Kowalewska et al., 2007; Marques et al., 2008). In most of cases, these last studies considered only one or two rodent species and compared polluted to references sites, which did not allow characterizing the patterns linking metal and MT levels in animals and identifying the host (notably inter-species differences) and environmental factors which may modulate those patterns. Moreover, data concerning insectivorous small mammals are very scarce. It has been suggested that elevated metal concentrations in shrew species could be reached because of their high capability of MT synthesis (Shore and Douben, 1994a; Veltman et al., 2007) but this assumption still needs to be verified.

Therefore, the aims of this study were to investigate which and how host factors (species, age and gender) modulated the responses of small mammals to environmental contamination exposure, regarding MTE and MT levels in liver and kidneys and their relationships. The results and the significance of MTs are discussed in risk assessment and biomonitoring perspectives.

### III.3.2. Materials and methods

#### III.3.2.a. Study sites

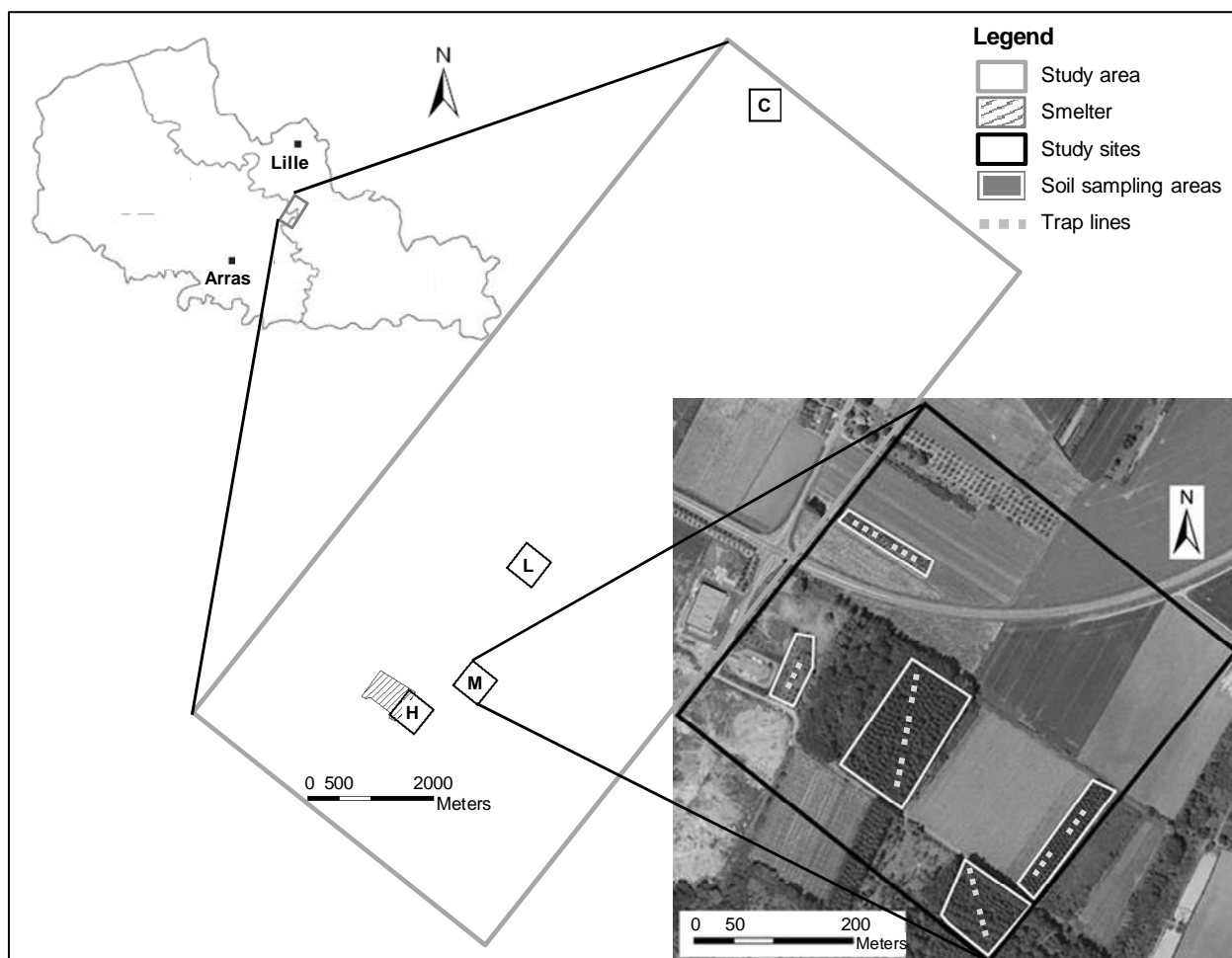
This study was carried out in the surroundings of the former “Metaleurop-Nord” smelter in Northern France (Noyelles-Godault, Nord – Pas-de-Calais, 50°25'42 N 3°00'55 E). This area is considered as highly polluted with Cd, Pb and Zn for both levels of contamination and surfaces of concern (Sterckeman et al., 2002; Douay et al., 2008; Douay et al., 2009). The study area in the present work was situated around the former smelter and stretched on 40 km<sup>2</sup> (Figure III.3.1). Sampling was performed in woody habitats (hedgerows, copses, groves and forests), which are favourable for small mammals.

Five to 7 woody habitats were sampled in four sites chosen along a pollution gradient (i.e. at increasing distance from Metaleurop in the north-eastern direction, III.3. 1). We tried to keep the landscape composition as similar as possible among the 4 sites. However, due to a higher urbanization in the vicinity of the smelter, there were more urban / industrial areas and scrublands and less agricultural lands (ploughed fields, grassland) and woodlands at the highest polluted site (Table III.3.1) than at the other 3 sites. The particular landscape found in the close proximity of the ancient smelter is not found elsewhere in the area.

Soils were sampled during the autumn of 2006. In each site, a composite 0-25 cm soil sample (15 sub-samples within a homogeneous woody habitat) was taken in 5-7 woody habitats in each of

the 4 sites described above. Thus, a total of 25 habitats constituting a continuous pollution gradient were characterized. Soil concentrations indeed were highly variable, even within each of the 4 study sites, and ranged from 1.3 to 236.5  $\mu\text{g.g}^{-1}$  dry weight for Cd, 73.0-6 809.0  $\mu\text{g.g}^{-1}$  for Pb and 150.0-6 035.0  $\mu\text{g.g}^{-1}$  for Zn (Table III.3.2).

The 4 sites will be called “C” (control), “L” (low contamination), “M” (medium contamination) and “H” (high contamination) hereafter in the paper.



**Figure III.3.1.** Location of the 4 study sites (C: control, L: low, M: medium and H: high contamination) and sampling design for soils and small mammals.

**Table III.3.1.** Percentage of land use surfaces on sites (500x500m).

	Urban	Industrial	Ploughed fields	Grassland	Woodland	Scrubland	Copses / hedgerows	River / ponds
C	1.0	0.0	41.3	11.0	28.8	10.5	6.8	0.8
L	1.7	0.0	39.0	2.2	40.7	10.5	6.1	0.0
M	5.3	0.0	24.8	0.0	53.0	10.3	7.0	0.0
H	12.6	21.6	0.0	1.2	16.0	24.9	17.0	7.0
Whole area	25.3	1.2	42.4	4.6	12.3	7.1	6.2	1.0

**Table III.3.2.** Distance from the smelter (median, km) and concentrations of Cd, Pb and Zn in soil by site (minimum, median and maximum,  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw).

Site	n	Distance Metaleurop	Cd			Pb			Zn		
			Min	Med	Max	Min	Med	Max	Min	Med	Max
C	5	11.2	1.3	1.6	2.0	73.0	110.0	182.0	150.0	183.0	267.0
L	6	3.0	1.5	4.0	6.0	149.0	261.5	333.0	114.0	322.5	407.0
M	7	1.4	3.6	9.7	19.5	245.0	526.0	1 260.0	303.0	586.0	1 044.0
H	7	0.6	15.3	59.3	236.5	755.0	1 357.0	6 809.0	1 069.0	1 802.0	6 035.0

### III.3.2.b. Small mammal sampling

Trapping authorization was given by the Direction Régionale de l'ENvironnement (DIREN) of the Nord – Pas-de-Calais. Small mammals were trapped in springtime 2007 using baited snap traps and pitfall traps. On each site, 10 lines of 10 snap traps (3 m-spaced) and 3 pitfall traps (10 m-spaced) were placed through the woody habitats, where the soils were sampled (Figure III.3.1). The trap lines were checked once a day in a 72 h period. Therefore, bodies stayed in traps less than 24 hours before being frozen. The individuals were frozen as soon as possible after their capture and stored (-20°C) until dissection at the laboratory. Animals were identified to the specific level using morphometric criteria (body, skull, and teeth), dissected, sexed and aged. The relative age of the rodents was assessed using their crystalline dry weight (Kozakiewicz, 1976; Vandorpe and Verhagen, 1980). Shrews were classified according to 3 classes of relative age (juveniles, sub-adults and adults) on the basis of body size and weight and reproductive status. For a given species, the individuals whose body size and weight were smaller than the lowest limit of the range of reference values described in the literature (rodents: Le Louarn et al., 2003; shrews: Lugon-Moulin, 2003) were considered as juveniles, others as adults and sub-adults. The individuals classified as sub-adults were animals without characteristics of sexual maturity while individuals considered as adults exhibited characteristics of reproducing animals (size and weight of testis and seminar vesicles for males, and indices of lactation, size of uterus, presence of embryos or presence of placenta scars for females). We also classified rodents in 3 classes of age only for presenting the captured specimens and comparing the age structure between shrews and rodents but we used the crystalline dry weight as an indicator of age for the other statistical analyses. The liver and kidneys were sampled during the dissection and then lyophilized and manually ground to a powder. They were conserved at ambient temperature in a dessicator until acid digestion.

In addition, twelve bank voles (6 sub-adults:  $1.6 \pm 0.0$  month, 3 individuals of each sex, and 6 adults:  $8.0 \pm 0.7$  months, 3 individuals of each sex) originating from a reared laboratory colony were kindly provided by Dr Renata Swiergosz-Kowalewska and Dr Pawel Koteja (Jagiellonian University, Poland) and considered as unexposed “reference” animals for MTE and MT levels (Sadowska et al., 2008). This group of animals will be named “R” (reared laboratory colony) in this article.

### III.3.2.c. Chemical analyses

#### Metallothionein concentration in liver and kidneys

The levels of MTs were determined in liver and kidneys using the polarographic method based on the measurement of heat-stable protein-thiol groups (Cosson, 2000). In order to separate insoluble and soluble forms of metal, 100 mg of ground lyophilized tissues were homogenized in 6 ml of a buffer (Tris 0.1 mol/L: Trizma HCl + Trizma base, pH 8.1 at 4°C and 7.5 at 25°C and 75 µl of β-mercaptoethanol for 100 ml). Insoluble (P1) and soluble (S1) fractions corresponded to the



pellet and the supernatant, respectively, after centrifugation (30,000 g, 4°C, 30 min). Then, 1 ml of S1 was denatured at 95°C (15 min) and then cooled at 4°C for 15 min before centrifugation (13,000 g, 4°C, 15 min). The level of MTs was measured in the resulting supernatant (S2), S2 being stored at -80°C before MT determination. The insoluble fraction (P1) and the remaining soluble fraction (S1) were frozen and conserved for MTEs analysis. The MT concentration was evaluated by differential pulse polarography (DPP). Analyses were conducted using an EG&G PAR Model 394 analyzer and an EG&G PARC Model 303A static mercury drop electrode (Cosson, 2000; Hispard et al., 2007). The calibration curve for MT measurement was obtained with rabbit liver MT (Sigma FLUKA 63995, molecular weight=6600 Da) by the standard addition method (Hispard et al., 2007). The values of MT levels were expressed as micrograms per grams dry weight ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw).

#### MTE concentration in soil and tissues

Soil samples were dried at room temperature, disaggregated and homogenized before being sieved to 250  $\mu\text{m}$  for the determination of Cd, Pb and Zn concentrations. Measurements were performed by the *Laboratoire d'Analyse des Sols* of the *Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA) of Arras (France), which benefits from the COFRAC (French accreditation committee) accreditation n°1-1380 for its analytical quality for MTE measurements in soils. The digestion of samples was realized by ashing at 450°C and dissolution in acid mixture (hydrofluoric and perchloric acids) according to NF X31-147 (AFNOR, 1996). The concentrations of Cd and Pb were measured by inductively coupled argon plasma mass spectrophotometry (ICP-MS) and Zn concentrations by inductively coupled argon plasma atomic emission spectrophotometry (ICP-AES). Calibration and protocol application were provided. Certified samples were used for quality control as well as samples from inter-laboratory comparisons, internal control samples and duplicates of the analysis.

Metal concentrations were measured in liver and kidneys of each individual by furnace (Cd, Pb) or flame (Zn, Cu) atomic absorption spectrometry (VARIAN 220Z and 220FS, respectively) and expressed as micrograms per grams dry weight ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw) of the total sample. Digestion of samples was performed using dissolution in nitric acid ( $\text{HNO}_3$ , 65%, Carlo-Erba analytical quality) in a dry oven (65°C) during 72h. After digestion, samples were diluted adding ultra-pure water (18.2  $\text{M}\Omega/\text{cm}^2$ ). Blanks (acid + ultra-pure water) and Certified Reference Materials (CRM, TORT-2 and DOLT-3, National Research Council, Canada) were prepared and analyzed using the same methods than the samples. Average recoveries of the CRM were calculated at 99%  $\pm$  16% ( $n = 25$ ) for Cd, 108%  $\pm$  22% ( $n = 25$ ) for Pb, 96%  $\pm$  16% ( $n = 15$ ) for Zn, 95%  $\pm$  8% ( $n = 8$ ) for Cu. Detection limits of the spectrometers (median  $\pm$  3SD of blanks) were 0.73, 0.75, 16.36 and 4.98  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  in the acid digests for Cd, Pb, Zn and Cu, respectively. Detection limits in organs were 0.06, 0.06, 1.32 and 0.40  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  in the liver and 0.09, 0.09, 2.04 and 0.62  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  in the kidneys for Cd, Pb, Zn and Cu, respectively. When measured values of metal concentrations were under the detection limits, half of the detection limit value was used for statistical analyses.

### Statistical analyses

Because metal concentration and MT level distributions were skewed, variables were log-transformed for statistical analyses using  $\log_{10}(x + 1)$ . General linear models (glm) were performed, using metal concentrations in soft tissues or MT levels as dependent variables and metal concentrations (soils or tissues), species, age and gender as explanatory variables (Venables and Ripley, 2001; Grafen and Hails, 2002). The interactions between concentrations (soil, organs) and species, age and gender were added when relevant. The relationship between Cu internal concentrations in small mammals and the environmental contamination was tested using Zn soil concentrations as an indicator of soil contamination. Indeed, Cu concentrations in soil have not been measured in the present work, but previous studies conducted around Metaleurop Nord showed that the soil concentrations of Zn and Cu were strongly correlated (Sterckeman et al., 2002). The significance of the variables in the models was tested using a permutation test (Monte-Carlo, 1000 permutations). The coefficient of determination of each variable in the models (partial  $R^2$ ) was determined using an analysis of variance. The post-hoc test of Tukey (Tukey's honest significant difference) was applied to determine the statistical differences for pairwise comparisons. We checked for potential differences of sex-ratio and age structure between sites using  $\chi^2$  test.

Statistical analyses were conducted on the 4 species for which sufficient sample was obtained, e.g. *Apodemus sylvaticus*, *Myodes glareolus*, *Sorex araneus* and *minutus*. Only one exception was made: the relationships between MT and metal levels were regarded for *Microtus subterraneus* in a monovariate analysis using glm (metal by metal, not with all metals in the model because of insufficient sample size).

All statistical analyses were performed using R 2.7.1 software (R Development Core Team, 2006).

**Table III.3.3.** Distribution of specimens by site (R: rearing, C: control, L: low contamination, M: medium contamination and H: high contamination), species, gender (M: males, F: females) and age (Juv: juveniles, Sub-ad: sub-adults and Ad: adults).

Species	Age	Site			R			C			L			M			H			Total field captures
		Gender	M	F	Total	M	F	Total	M	F	Total	M	F	Total	M	F	Total			
<i>Apodemus sylvaticus</i>	Juv				2	1	3					1	1		1	1				
	Sub-ad				13		13	9	10	19	22	10	32	10	8	18				
	Ad					7	7		6	6		6	6		6	6				
	Total						23			25			39			25			87	
<i>Myodes glareolus</i>	Juv				4	2	6													
	Sub-ad	3	3	6	16	2	18	16	1	17	3		3	4	1	5				
	Ad	3	3	6		11	11		5	5		2	2		2	2				
	Total			12			35			22			5			7			62	
<i>Sorex araneus</i>	Juv				3	3	6													
	Sub-ad				2	5	7	4	5	9		1	1							
	Ad				1	1	2	4		4		1	1							
	Total						15			13			2						30	
<i>Sorex minutus</i>	Juv				1		1													
	Sub-ad							2	1	3										
	Ad				1		1	2	1	3										
	Total						2			6									8	
<i>Microtus subterraneus</i>	Juv					1	1													
	Sub-ad				1		1													
	Ad					2	2													
	Total						4												4	
<i>Crocidura russula</i>	Ad														1	1				
	Total															1			1	
<i>Microstus agrestis</i>	Ad					1	1													
	Total						1												1	
Total				12			80			66			46			33			225	

### III.3.3. Results

#### III.3.3.a. Sample size and population structure

A total of 225 individuals were caught, 7 species being represented. The distribution of captures by site, species, age and gender is shown in the Table III.3.3. The most important sample sizes were found for rodents: the wood mouse *Apodemus sylvaticus* and the bank vole *Myodes glareolus* were present at all sites and showed 112 and 69 individuals, respectively. The second group, in respect to sample size and occurrence along the gradient, was insectivorous small mammals, notably the common shrew *Sorex araneus/coronatus* ( $n = 30$ ) and the pygmy shrew *Sorex minutus* ( $n = 8$ ). Both common and pygmy shrews were caught at C and L sites and were absent at the H site. The common shrew was also present at the M site. The common pine vole *Microtus subterraneus* was observed with few individuals at the control site only ( $n = 4$ ) and, for 2 species, only one individual was caught: the field vole *Microtus agrestis* (C site) and the greater white-toothed shrew *Crocidura russula* (H site). The sex ratio and age structure of the wood mouse, the bank vole, and the common and pygmy shrews did not differ significantly either between the sampling sites (sex ratio:  $0 < X^2 < 5.7$ ,  $0.12 < p < 1$ ; age structure:  $4 < X^2 < 8.2$ ,  $0.08 < p < 0.25$ ) or between species (sex ratio:  $X^2 = 5.11$ ,  $p = 0.16$ , age structure: considering 3 age classes for all species, allowing comparing rodents and shrews,  $X^2 = 12.04$ ,  $p = 0.06$ ). For the most represented species, individuals were well distributed for age and gender (Table III.3.3), which allowed investigating the influence of those parameters on metal accumulation and levels of MTs.

#### III.3.3.b. Influence of soil contamination and host factors on the accumulation of MTEs in small mammals

The measured concentrations of Cd, Pb and Zn in the liver (Table III.3.4) and in the kidneys (Table III.3.5) of wild small mammals showed a high variability, with values ranging from 0.1 to 751.2  $\mu\text{g.g}^{-1}$  for Cd, under detection limit (UDL) to 976.0  $\mu\text{g.g}^{-1}$  for Pb, UDL to 278.5  $\mu\text{g.g}^{-1}$  for Zn and UDL to 83.3  $\mu\text{g.g}^{-1}$  for Cu.

Wild small mammals accumulated MTEs in both the liver and the kidneys, the internal concentrations of non-essential metals increasing with soil concentrations for the wood mouse, the bank vole and the common shrew (glm,  $p < 0.01$ , Figures III.3.2 and III.3.3). The relationships between Cd and Pb in organs and in soils were not significant for the pygmy shrew considered alone, probably because of the small sample size (glm,  $p > 0.05$ ).

Differences in internal concentrations were observed between species, particularly for the non-essential metals (glm,  $p < 0.05$ ). Notably, two kinds of responses could be highlighted between rodents and shrews, rodents being low accumulators compared to shrews. For Cd and Pb, in both the liver and the kidneys, accumulation followed the order wood mouse < bank vole < common and pygmy shrews (Figures III.3.2 and III.3.3) with significant differences between the rodents and between rodents and shrews (glm,  $p < 0.05$ ). In shrews, renal and soil Zn concentrations were not

correlated while a slight increase was observed for hepatic concentrations (glm,  $p > 0.05$  in kidneys and  $p < 0.05$  in liver, Figures III.3.2 and III.3.3). Opposite relationships were observed in rodents. The renal Zn concentrations of the pygmy shrew showed lower values than other species and the bank vole had higher values than the wood mouse (glm,  $p < 0.05$ ). The hepatic Zn concentrations differed between species with the following order: wood mouse < bank vole < common and pygmy shrews (glm,  $p < 0.05$ ). Internal Cu concentrations and soil Zn concentrations were correlated for the wood mouse only, showing an increase of hepatic Cu and a decrease of renal Cu along the pollution gradient (glm,  $p < 0.05$ , Figures III.3.2 and III.3.3). For Cu, differences between species were marginal: only hepatic Cu concentrations of the pygmy shrew were higher than those of the other species (glm,  $p < 0.05$ ). The variability of internal Cd, Zn and Cu concentrations depended more on the species than on the soil MTE concentrations (species:  $0.20 < \text{partial } R^2 < 0.65$ , soil MTE concentration:  $0.01 < \text{partial } R^2 < 0.14$ ) whereas the inverse was observed for Pb (species:  $\text{partial } R^2 = 0.17$  and  $0.21$ ; soil MTE concentration:  $\text{partial } R^2 = 0.27$  and  $0.33$ , in liver and kidneys, respectively).

Pb concentrations in both liver and kidneys did not differ between reared bank voles and field bank voles from C site (glm,  $p = 0.78$  and  $0.16$  for liver and kidneys, respectively). Conversely, the concentrations of Cd and Zn were different: Cd (renal and hepatic) and renal Zn were lower in reared bank voles than in control field bank voles, while hepatic Zn was higher (glm,  $p < 0.02$ ). The Cu concentrations differed also but in the kidneys only (glm, liver:  $p = 0.54$ , kidneys:  $p = 0.01$ ) with higher concentrations in bank voles from the field.

Whatever was the species, we did not detect any significant influence of the gender on the internal concentrations of Cd, Pb, Zn and Cu (glm,  $p > 0.05$ , data not shown).

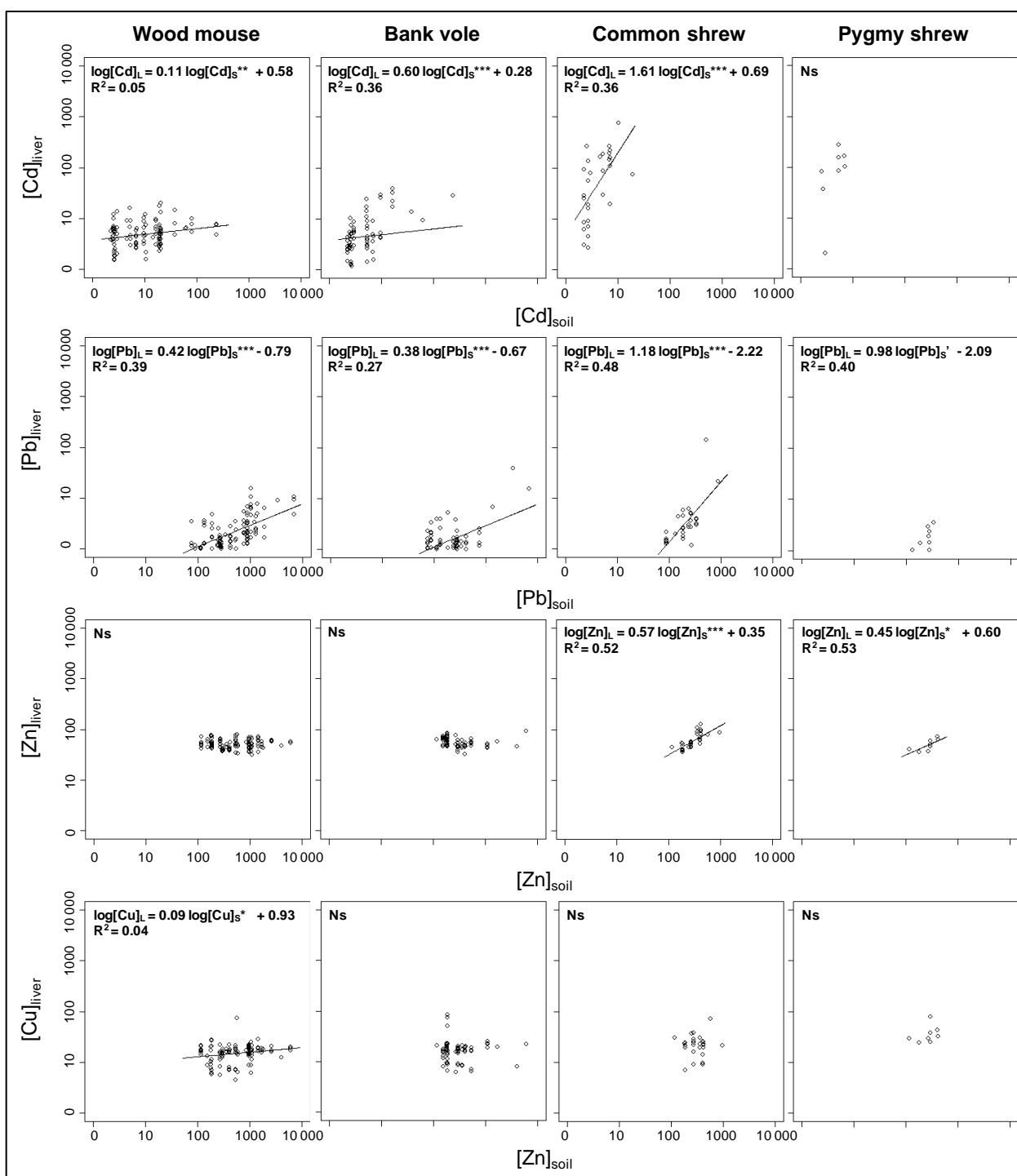
The accumulation of Cd was found to increase with age for all species in the field (glm,  $p < 0.05$ ,  $0.02 < \text{partial } R^2 < 0.58$  in the liver and  $0.08 < \text{partial } R^2 < 0.24$  in the kidneys), except for the wood mouse in the liver ( $p = 0.19$ ) and for the pygmy shrew in the kidneys ( $p = 0.31$ ). The influence of age on Cd concentrations was stronger in the kidneys than in the liver for rodents and inversely, higher in the liver than in the kidneys for the shrews. The Cd concentration increased with age also for reared bank voles but not significantly (glm,  $p = 0.10$  in liver and  $0.57$  in the kidneys). The concentrations of Pb increased with age in both organs of the common shrew (glm,  $p < 0.05$ ,  $\text{partial } R^2 = 0.15$  and  $0.06$  in liver and kidneys, respectively) while no influence of age was found on Pb concentrations for the rodents and the pygmy shrew (glm,  $p > 0.05$ ). Zn concentrations increased significantly with age in the kidneys only for the wood mouse, the bank vole from the field and the common shrew (glm,  $p < 0.05$ ,  $\text{partial } R^2 = 0.07$ ,  $0.28$ , and  $0.15$ , respectively). The Cu concentrations did not vary with age except for the bank voles from the field whose hepatic Cu concentrations decreased with age and renal Cu concentrations increased with age (glm,  $p < 0.05$ ,  $\text{partial } R^2 = 0.17$  and  $0.20$ , respectively).

**Table III.3.4.** Liver concentrations of MT, Cd, Pb, Zn and Cu by species and site (minimum, median and maximum,  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw, UDL: under detection limit).

Species	Site	n	MT			Cd			Pb			Zn			Cu		
			Min	Med	Max	Min	Med	Max	Min	Med	Max	Min	Med	Max	Min	Med	Max
<i>A. sylvaticus</i>	C	23	1 177	1 890	3 672	0.5	2.8	12.6	UDL	0.2	3.8	40.3	55.8	76.0	4.5	10.3	26.7
	L	25	1 324	1 886	3 551	1.6	3.6	15.0	UDL	0.2	0.9	36.1	43.5	71.1	6.0	15.3	21.4
	M	38	1 107	2 179	4 114	0.6	3.4	16.9	UDL	1.0	5.7	32.0	48.8	77.9	3.5	16.0	72.4
	H	25	1 204	2 620	4 500	1.5	5.2	18.8	0.3	3.9	14.4	30.5	53.5	70.6	10.3	17.0	27.5
<i>M. glareolus</i>	R	12	700	965	1 272	0.2	0.5	1.0	UDL	0.2	2.0	63.8	74.3	86.8	10.4	15.9	19.1
	C	34	1 134	1 539	2 634	0.2	2.0	7.8	UDL	0.3	4.3	44.4	64.3	82.9	5.1	14.8	83.3
	L	22	1 052	1 511	2 383	0.4	3.5	23.1	UDL	0.3	2.8	31.7	45.6	61.5	7.3	16.2	19.7
	M	5	800	1 393	2 875	3.2	4.3	28.6	UDL	0.3	0.8	46.6	52.3	64.5	5.4	14.8	17.7
	H	7	1 385	2 449	3 191	8.3	21.1	38.1	0.2	1.6	38.7	42.2	47.7	93.0	7.0	20.9	24.3
<i>S. araneus</i>	C	15	1 491	2 092	4 217	1.7	15.2	133.9	0.3	0.8	4.8	34.5	45.6	56.8	5.9	21.1	36.8
	L	13	2 320	6 352	11 711	18.6	163.2	267.0	0.2	2.6	5.1	43.5	79.3	125.3	8.0	21.7	35.5
	M	2	3 709		9 655	72.8		751.2	20.3		141.2	77.7		86.1	20.3		71.2
<i>S. minutus</i>	C	2	2 146		2 355	1.0		36.3	UDL		0.4	35.1		35.4	23.0		28.2
	L	6	3 742	4 600	6 240	80.3	126.6	274.4	UDL	1.1	2.5	39.6	54.0	71.5	24.0	33.8	79.1
<i>M. subterraneus</i>	C	4	1 006	1 250	1 457	0.4	1.3	2.0	UDL	0.2	0.8	46.1	64.2	74.6	6.7	10.9	18.4
<i>C. russula</i>	H	1		3 904										52.4			25.5
<i>M. agrestis</i>	C	1		1 410										46.4			6.0

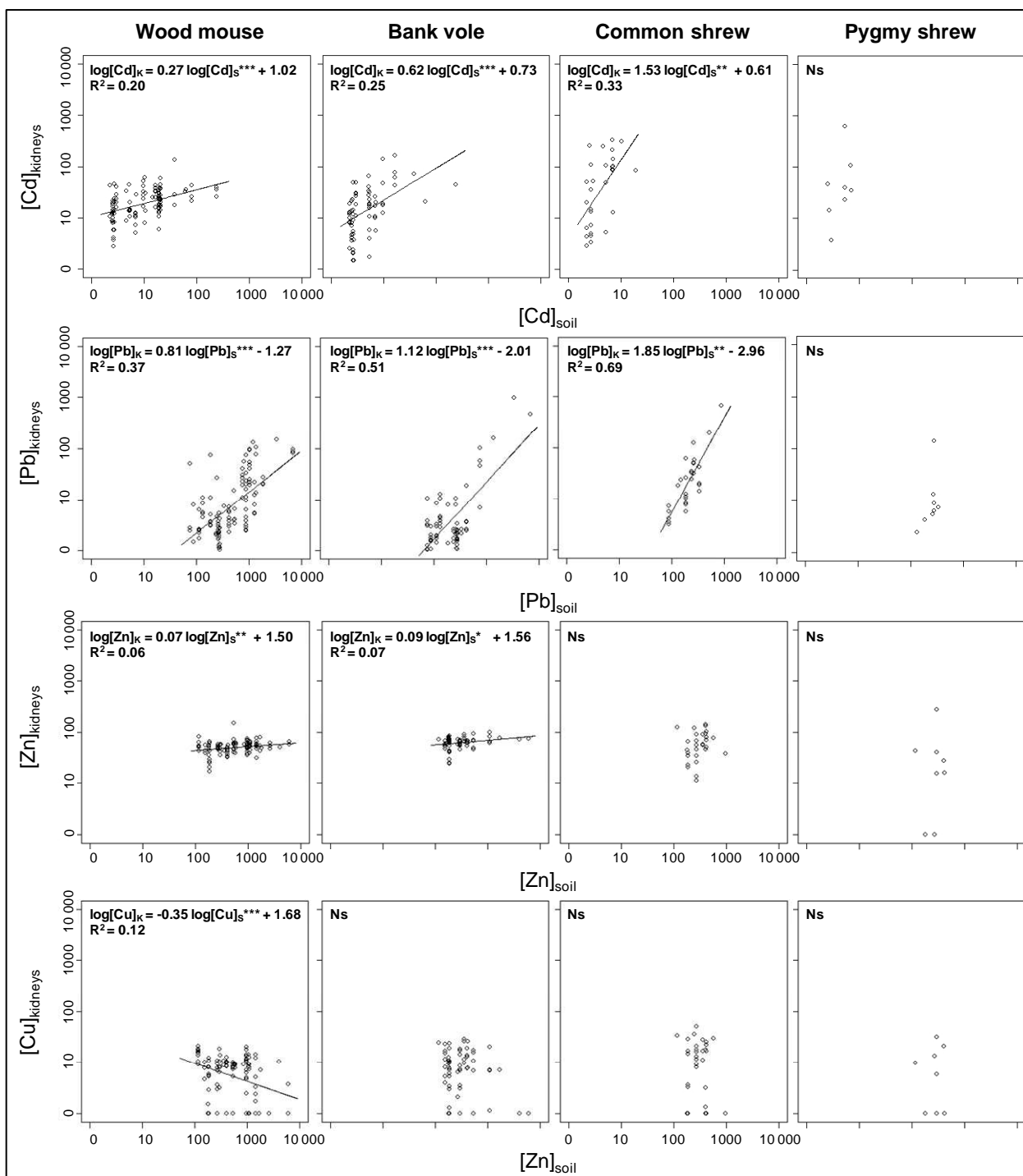
**Table III.3.5.** Kidney concentrations of MT, Cd, Pb, Zn and Cu by species and site (minimum, median and maximum,  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dry weight, UDL: under detection limit).

Species	Site	n	MT			Cd			Pb			Zn			Cu		
			Min	Med	Max	Min	Med	Max	Min	Med	Max	Min	Med	Max	Min	Med	Max
<i>A. sylvaticus</i>	C	23	2 156	3 517	8 562	1.8	12.4	44.2	0.5	2.7	72.3	16.4	46.1	63.9	UDL	4.4	10.9
	L	25	1 820	3 511	7 461	4.1	11.9	43.7	UDL	1.2	6.5	31.3	46.4	80.6	UDL	9.1	19.9
	M	39	2 026	4 262	11 106	4.9	22.5	113.8	1.3	4.4	73.5	34.9	54.1	146.1	UDL	7.1	19.1
	H	25	1 554	2 514	6 106	13.3	30.9	136.7	9.9	39.7	149.5	30.7	53.6	77.7	UDL	0.7	13.2
<i>M. glareolus</i>	R	12	1 225	1 637	2 077	0.1	0.7	1.5	0.2	0.7	3.0	25.4	47.3	99.0	UDL	UDL	15.2
	C	34	1 714	2 824	5 853	0.5	8.5	48.7	UDL	1.0	11.8	23.0	62.4	83.5	UDL	6.3	22.8
	L	22	1 550	2 683	4 456	0.7	16.8	65.0	0.1	1.1	9.5	45.5	64.1	87.8	UDL	9.4	27.2
	M	5	2 650	4 217	8 543	11.5	18.1	139.1	1.5	2.6	17.8	45.3	66.5	92.8	UDL	9.5	16.2
	H	7	2 105	3 203	5 943	19.5	61.1	165.6	6.0	100.0	976.0	59.5	72.3	96.7	UDL	5.8	19.0
<i>S. araneus</i>	C	15	1 809	2 482	6 613	1.9	12.3	106.0	2.2	6.7	60.4	10.3	33.9	87.3	UDL	12.1	49.4
	L	13	2 636	7 073	17 713	4.2	99.6	325.7	12.9	31.6	122.0	45.3	88.9	140.8	UDL	15.7	35.0
	M	2	5 463		15 069	82.3		309.0	191.7		674.0	37.3		75.8	UDL		28.8
<i>S. minutus</i>	C	2	2 899		2 996	2.7		13.6	1.5		3.3	UDL		UDL	UDL		12.3
	L	6	2 775	4 674	35 547	22.6	42.1	626.5	4.4	7.2	139.6	14.6	32.9	278.5	UDL	6.7	30.8
<i>M. subterraneus</i>	C	4	1 385	2 293	3 004	0.2	5.2	18.6	0.2	1.0	2.2	22.0	39.2	60.3	UDL	1.4	6.9
<i>C. russula</i>	H	1		5 618			151.3			244.8			48.4			UDL	
<i>M. agrestis</i>	C	1		2 518			3.1			0.5			41.4			5.6	



**Figure III.3.2.** Soil metal concentrations in relation to liver metal concentrations (decimal logarithm,  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw) for the wood mouse *Apodemus sylvaticus*, the bank vole *Myodes glareolus*, the common shrew *Sorex araneus* and the pygmy shrew *Sorex minutus*. Statistical significance: general linear model, ns for  $p > 0.05$ , \* for  $p < 0.05$ , \*\* for  $p < 0.01$ , \*\*\* for  $p < 0.001$ ,  $R^2$ : R-squared of the model.





**Figure III.3.3.** Soil metal concentrations in relation to kidney metal concentrations (decimal logarithm,  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw) for the wood mouse *Apodemus sylvaticus*, the bank vole *Myodes glareolus*, the common shrew *Sorex araneus* and the pygmy shrew *Sorex minutus*. Statistical significance: general linear model, ns for  $p > 0.05$ , \* for  $p < 0.05$ , \*\* for  $p < 0.01$ , \*\*\* for  $p < 0.001$ ,  $R^2$ : R-squared of the model.

### III.3.3.c. Influence of host factors on the relationships between soil or internal MTE and MT levels

As internal MTE concentrations, the MT levels exhibited a high variability. The concentrations varied from 700 to 11 711  $\mu\text{g.g}^{-1}$  in the liver (Table III.3.4) and from 1 225 to 35 547  $\mu\text{g.g}^{-1}$  in the kidneys (Table III.3.5).

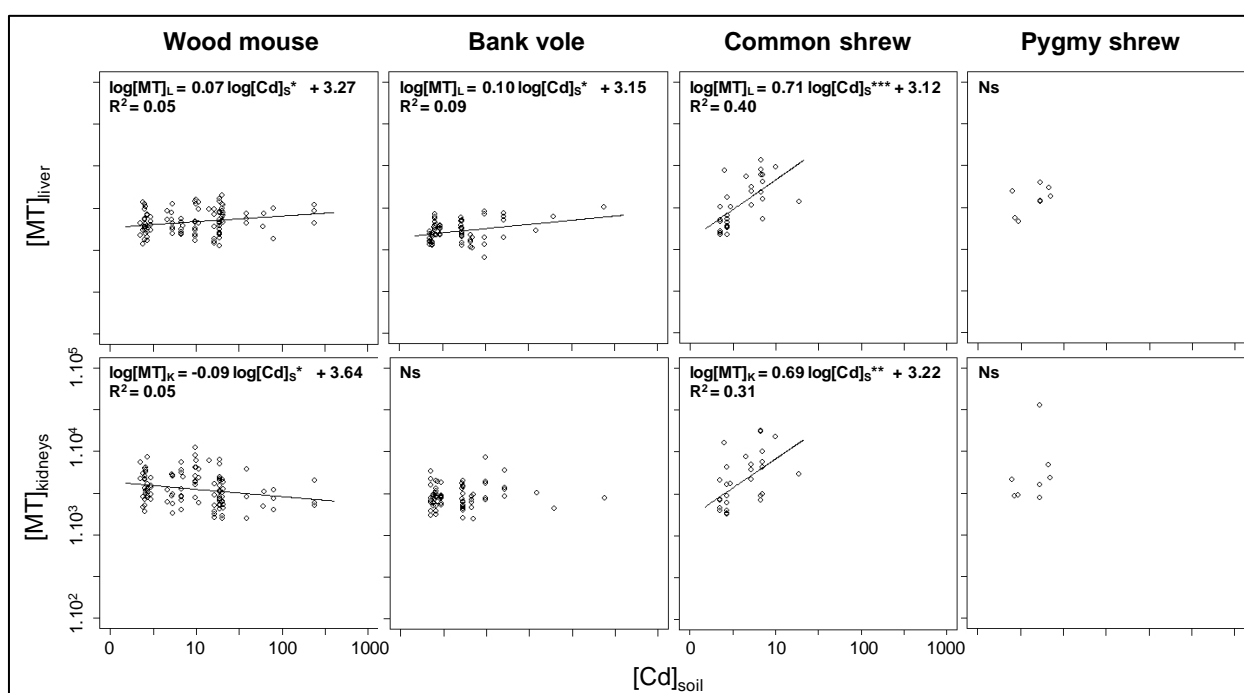
The relationships between environmental contamination (Cd soil concentration) and internal levels of MTs in liver and kidneys showed different responses between species. The wood mouse exhibited significant relationships between soil contamination and levels of MTs but the MT levels increased in the liver and decreased in the kidneys (Figure III.3.4). MT levels in the bank vole increased with soil contamination only in the kidneys (Figure III.3.4). Globally, the slopes of the regressions were low for the rodents. For the common shrew, MT levels increased with the soil contamination in both liver and kidneys with elevated slopes (0.71 and 0.69 in liver and kidneys, respectively, Figure III.3.4) while the relationship was not significant for the pygmy shrew.

The different species exhibited different relationships between the concentrations of metals in organs and levels of MTs (Table III.3.6). Those relationships differed according to the considered organ (glm,  $p < 0.05$ , Table III.3.6). For the bank vole (field) and the common and pygmy shrews, MT levels were positively correlated with the Cd concentrations in both organs (Table III.3.6) while residues of Zn, Pb and Cu marginally and only sometimes influenced MT levels (Table III.3.6). MT levels in shrews were thoroughly related to the residues of metals while for rodents the levels of MTs were only partly explained by the metal levels (see  $R^2$  in the Table III.3.6). The wood mouse exhibited a particular response: hepatic levels of MTs increased significantly with Cd and Zn while renal levels were negatively related to Pb concentrations (Table III.3.6). For the reared bank voles, the levels of MTs were not influenced by the internal metal concentrations (glm,  $p > 0.05$ , Table III.3.6). For the common pine vole, a strong relationship was found only between Cd concentrations and MT concentrations in the liver ( $p = 0.001$ ,  $R^2 = 0.99$ , data not shown).

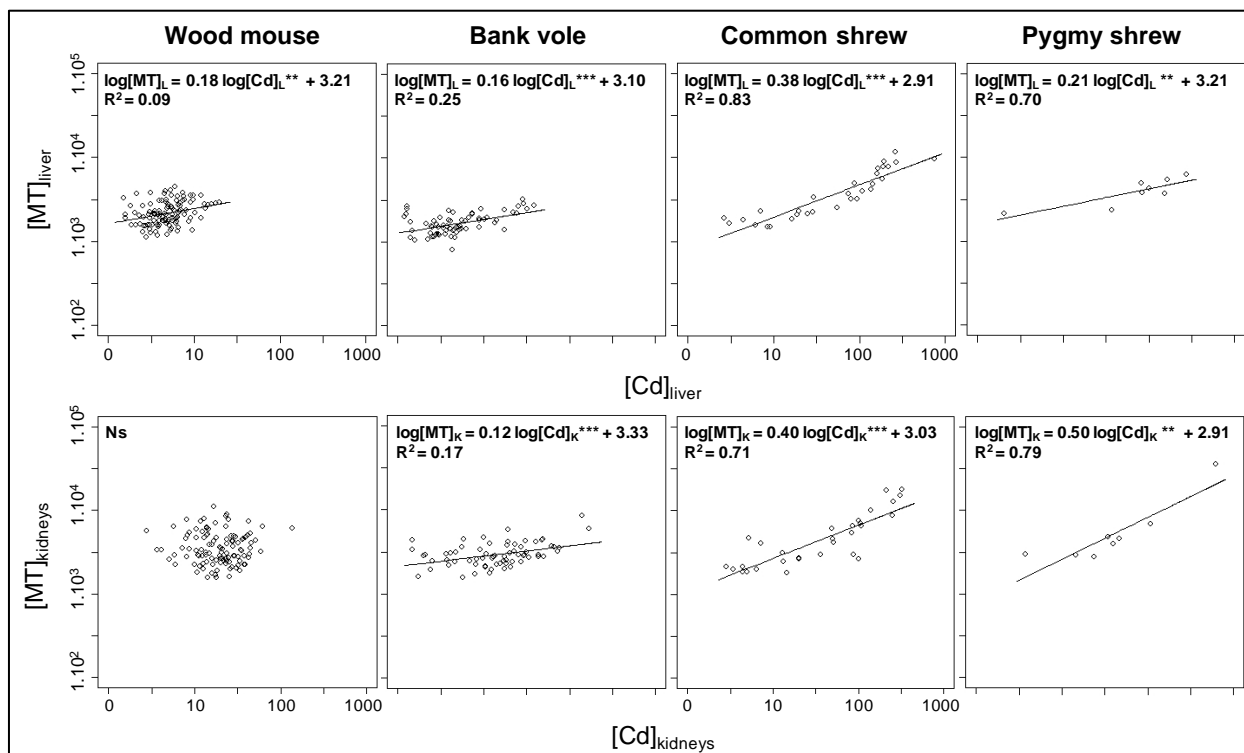
The concentration of Cd most explained the levels of MTs in both organs (Table III.3.6). Thus, differences between species in MT levels were checked conditionally to Cd concentrations (Figure III.3.5) and this variable was significant (glm,  $p < 0.04$ , partial  $R^2 = 0.11$  and  $0.14$  in the liver and kidneys). The bank vole (field) had lower levels of MTs than the other species (except the pygmy shrew for which the difference was not significant), and the wood mouse had higher levels of MTs in the kidneys than the other species (except the pygmy shrew)(Figure III.3.5). The increase of MT levels with Cd concentrations was higher for the common shrew than for the other species in the liver and higher for shrews than for rodents in the kidneys (Figure III.3.5). According to the taxa considered, 3 different patterns linking Cd and MT levels in organs were noticed: a high basis level of MTs accompanied by no or a slight increase of MTs with Cd accumulation (wood mouse), a low basis level of MTs with a slight increase of MT levels with Cd accumulation (bank vole), a dramatic increase of MT levels with Cd concentrations (both species of shrews). The MT levels

(conditionally to internal Cd) of the reared bank voles were lower than those of the bank voles from the field control site (glm,  $p < 0.05$ , Tables 4 and 5).

Since MT levels have been found to significantly depend on metal concentrations, the potential influences of age and gender on the levels of MTs were explored conditionally to internal concentrations of metals. The analysis was not conducted for the pygmy shrew (insufficient sample size). Age and gender influenced MT levels only for the bank voles from the field: the levels of MTs decreased with age in liver only (glm, liver:  $p < 0.001$ ,  $R^2=0.16$ ; kidneys:  $p = 0.09$ ,  $R^2=0.04$ ) and females had higher levels than males (glm, liver:  $p < 0.05$ ,  $R^2 = 0.16$ ; kidneys:  $p < 0.05$ ,  $R^2=0.11$ ) (data not shown).



**Figure III.3.4.** MT levels in relation to Cd concentrations in soil (decimal logarithm,  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw) for the wood mouse *Apodemus sylvaticus*, the bank vole *Myodes glareolus*, the common shrew *Sorex araneus* and the pygmy shrew *Sorex minutus*. Statistical significance: general linear model, ns for  $p > 0.05$ , \* for  $p < 0.05$ , \*\* for  $p < 0.01$ , \*\*\* for  $p < 0.001$ ,  $R^2$ : R-squared of the model.



**Figure III.3.5.** MT levels in relation to Cd concentrations in the kidneys and the liver (decimal logarithm,  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw) for the wood mouse *Apodemus sylvaticus*, the bank vole *Myodes glareolus*, the common shrew *Sorex araneus* and the pygmy shrew *Sorex minutus*. Statistical significance: general linear model, ns for  $p > 0.05$ , \* for  $p < 0.05$ , \*\* for  $p < 0.01$ , \*\*\* for  $p < 0.001$ ,  $R^2$ : R-squared of the model.

### III.3.4. Discussion

#### III.3.4.a. Influence of age and gender on MTE and MT levels

We showed that the accumulation of Cd is age-dependent for rodents as well as for insectivorous small mammals in both the liver and the kidneys. Such an increase of Cd concentrations with age has been reported in studies concerning small mammals in the field and the laboratory (Shore and Rattner, 2001; Milton et al., 2003; Topolska et al., 2004; Rogival et al., 2007b; Sánchez-Chardi et al., 2007a). Our results revealed that the age influenced the concentrations of Pb in the liver and the kidneys but for the common shrew only. If the increase of Pb concentrations with age is well established in bones, the main site of storage (90%) of Pb in mammals, an increase with age in the soft tissues has not been proved for rodents and only suggested for shrews (Shore and Rattner, 2001; Milton et al., 2003; Sánchez-Chardi and Nadal, 2007; Sánchez-Chardi et al., 2007b). Therefore, the influence of age on metal accumulation in soft tissues not only depends on the metal of concern but also on the species.

Although differences in accumulation between males and females have been observed in the literature (Erry et al., 2000; Komarnicki, 2000; Milton et al., 2003; Beernaert et al., 2007; Sánchez-Chardi et al., 2007a; Sánchez-Chardi et al., 2009), some of these studies showed contradictory

results with variations among species, populations, organs or metals. Moreover, several works, as here, did not detect any effect of the gender (Milton and Johnson, 1999; Mertens et al., 2001; Topolska et al., 2004; Rogival et al., 2007b; Sánchez-Chardi and Nadal, 2007; Sánchez-Chardi et al., 2007b; Gonzalez et al., 2008). Based on the review of those works, we found that neither the exposure conditions, nor the species, the geographical area, the metal of concern, the season or the sample size seem to explain those discrepancies. This suggests that interactions between these different parameters occur and that further studies are necessary to conclude on the influence of gender on metal accumulation.

We showed that internal Cd concentrations increased with age and that MT levels were strongly related to those Cd concentrations. Therefore, in this work, we studied the effect of age on MT levels conditionally to internal MTEs and found a decrease of MT levels with age, for the bank vole in the liver only. This has never been reported before but the influence of age on MT levels in small mammals has mainly been studied for pre- and post-natal stages and rarely for adults. Moreover, the confounding effect of the age-dependent increase of internal metal concentrations has not been taken into account in the previous works (Włostowski, 1992a; Miles et al., 2000; Rogival et al., 2007a).

We found a difference of MT levels between males and females for the bank vole, but not for the wood mouse or for the shrews. As for age, the effect of the gender on MTs was rarely considered but our results are in line with the findings of two studies on wild mice (the wood mouse and the Algerian mouse *Mus spretus*), which did not observe any variation of MT levels according to the gender (Rogival et al., 2007a; Marques et al., 2008).

As we underlined in the Results section, the inter-individual variability in both MTE and MT levels was high. The significance and implication of this variability is rarely regarded when studying transfer and effects of pollutants. However, it could have a great importance in conditioning both exposure of organisms and effects on populations (Depledge, 1990; Forbes et al., 1995). In the purpose of assessing harmful effects of metals in ecosystems and predicting small mammal responses to environmental contamination, it would be necessary to investigate the sources of intra-population variability and taking these parameters into account. The relevance of predicting a single (mean or median) value of accumulation to be related to a threshold value for effects for a population exposed to metals therefore appears questionable. It would maybe be preferable to consider values of accumulation and effects by class of age and by sex within the exposed populations.

### *III.3.4.b. Influence of species on MTE accumulation along the pollution gradient*

This study evidenced that internal levels of Cd and Pb dramatically increased with soil contamination. Those results are in accordance with patterns previously established in the literature but the extremely high Cd and Pb concentrations measured here were rarely observed in field studies (Talmage and Walton, 1991; Shore, 1995; Shore and Rattner, 2001; Veltman et al., 2007). Conversely, our results showed that internal concentrations of essential metals remained in a physiological range along the pollution gradient, even on the most polluted site. This suggests an efficient regulation of those essential elements by small mammals and/or that concentrations of essential metals were regulated by their diet items (vegetation, preys), resulting in a slightly metal-loaded diet and thus a low exposure to metals. (Talmage and Walton, 1991; Shore, 1995; Shore and Rattner, 2001). Metal concentrations in small mammals from our control site were in the same order of magnitude for Cd and Pb and slightly lower for Zn than data reported for unpolluted sites in previous studies (Talmage and Walton, 1991; Read and Martin, 1993; Shore and Rattner, 2001).

If all studied species accumulated Cd and Pb along the pollution gradient, we found differences in accumulation of MTEs between species. Inter-species variability in MTE accumulation has been reported, rodents being qualified as “poor-accumulators” and shrews as “hyper-accumulators”, the bank vole being intermediate between the wood mouse and the common shrew (Ma, 1989; Talmage and Walton, 1991; Shore and Douben, 1994a; Shore, 1995; Shore and Rattner, 2001; Veltman et al., 2007; Wijnhoven et al., 2007). But in numerous cases in the literature, animals were compared considering their trophic group (rodents versus insectivorous), more rarely considering the species, while we found here differences among species of a trophic group.

Most of studies concerning metal accumulation in small mammals compared one or some polluted areas to control areas, rarely a continuous gradient of pollution as it was done here. The present approach allowed studying 4 sympatric species along a large gradient of pollution. The used correlative approach therefore allowed characterizing the patterns of accumulation of those 4 sympatric species. We found that not only the internal MTE concentrations but also the patterns of accumulation varied between species.

Some authors developed empirical regressions between internal and soil total concentrations of Cd and Pb using meta-analysis of field studies. The quantitative relationships found in the present work are consistent with those determined by Shore (1995), Sample et al. (1998) and Veltman et al. (2007) for the shrews, even if our values are generally higher. However, regarding the wood mouse and the bank vole, our results are rather different: our values of slopes for both wood mouse and bank vole are lower than those found by Veltman et al. (2007) and Sample et al. (1998) for Cd, but consistent with results of Shore (1995) for renal Cd and hepatic Pb only (lower for hepatic Cd, higher for renal Pb).

If the response of the pygmy shrew to environmental contamination here was globally close to the response of the common shrew, the common shrew had however higher, but not significantly,

Cd and Pb concentrations than pygmy shrew. Similarly, Read and Martin (1993) showed that *Sorex* shrews accumulated great amount of metals. They also found that pygmy shrews had lower tissue concentrations of Cd than common shrews on 2 of their 6 study sites. Different diets have been suggested to be the main cause of the difference in accumulation (Read and Martin, 1993; Shore and Rattner, 2001). Indeed, the pygmy shrew focuses on the consumption of small-surface active preys while the common shrew actively feeds on burrowing animals such as earthworms (Pernetta, 1976; Lugon-Moulin, 2003), a strong accumulator of heavy metals (Nahmani et al., 2007).

Comparing the present data on accumulation and the results of meta-analysis cited above, it appears that the bioavailability of Cd along food chains is more site-specific than those of Pb. The site specificity in food chain composition (quantity and availability of food resources, bioavailability along food chains) may affect the transfer to small mammals having a diversified diet such as the wood mouse and the bank vole (herbivorous/omnivorous). Differences in accumulation pattern appeared between species having a similar diet, showing that the modelling of bioaccumulation based only on the trophic group of the studied organisms could lead to over- or under-estimate for certain small mammal species. As a consequence, the inter-species interpolations of accumulation should be made with great care and the prediction of metal bioaccumulation in small mammals should be conducted using regressions between animal and soil metal concentrations rather than using inter-species ratios.

Those inter-species differences in accumulation patterns for animals having a similar diet could be related to differences in physiology (for instance metabolic rate, consumption rate, digestive characteristics influencing bioaccessibility, excretion rate...) and behaviour (for example feeding behaviour, home-range size, habitat preference, dispersal and colonization...) (Shore and Rattner, 2001).

#### *III.3.4.c. Influence of species on the relationships between MTE and MT levels*

From the present results, 3 different patterns of responses to environmental contamination in wild small mammals were highlighted according to the species. To our knowledge, such differences among small mammal species in the field have never been showed insofar as MT levels in shrews have never been reported. The evolution of MT levels in response to internal levels of pollutants also should not only depend on the studied metal and its concentration but also on the specificity of small mammal physiology (inducibility of MTs, gene expression, MT production...).

The levels of MTs were higher (conditionally to internal Cd) in the bank voles from the control site than in the laboratory reared individuals, suggesting that other stresses, inherent to field conditions, in addition to background metal exposure induced the synthesis of MTs. It is known that a wide variety of exogenous factors (photoperiod, UV radiation, temperature...) and host factors (animal condition, hormone levels, glucocorticoid levels, physical trauma, microbial infection,

development stage...) influence the induction of MTs in animals (Włostowski, 1992a; Davis and Cousins, 2000; Miles et al., 2000; Włostowski et al., 2004; Chwelatiuk et al., 2005). This may explain why higher levels of MTs and higher inter-individual variability were found in wild voles compared to laboratory animals. The use of MT levels in laboratory animals as a reference value of MT basis level therefore should be considered carefully: animals from the laboratory may have lower levels of MT not only because of the absence of exposure to metals but also because of the absence of certain inducers of MTs inherent to field conditions, and therefore under-estimate the reference level of MT in respect to free living animals.

It appears hard to compare our MT levels with values found in small mammals of other studies because the methods used for MT level determination varied, providing results which were thus rarely comparable. However, in a field study using the polarographic method as here, Algerian mouse from a reference site and wood mouse from our control (which are two wild mice of Murinae sub-family) have similar levels of MT in both liver and kidneys (Marques et al, 2008). In a laboratory experiment studying the effects of MTEs on *Wistar* rats (also a rodent of Murinae sub-family), unexposed animals showed levels of MTs in organs slightly lower than those observed here in the wood mouse from control site (Hispard et al., 2007). Thus, similarly to the bank voles in the present work, we notice that Murinae from the laboratory have lower MT levels than Murinae from field reference sites.

In both the liver and kidneys of wild small and large mammals and birds (Gamberg and Scheuhammer, 1994; Elliott and Scheuhammer, 1997; Barjaktarovic et al., 2002; Damek-Poprawa, 2002; Kojadinovic et al., 2007; Rogival et al., 2007a; Vanparys et al., 2008), MTs have been shown to increase with internal metal concentrations, particularly Cd, the concentration of Zn and Cu being marginally significant. Our results reinforce those findings, showing the importance of Cd internal concentrations in levels of MTs for 4 wild small mammal species differing by their physiology and diet. The poor and inconsistent relationships found between MTs and Zn or Cu concentrations could seem surprising owing to the one of the main functions of MTs, i.e. the homeostasis of these essential elements. However, Swiergosz-Kowalewska et al. (2007) reported that Zn was poorly related to MT gene expression in bank vole chronically exposed to metals in the field, while Cd was greatly correlated to MT gene expression. This suggests that in the case of a chronic exposure to metals in the field, essential metals are not the main inducers of MTs. Moreover, Włostowski (1992b) showed that within a physiological range of concentration, neither Zn nor Cu induced the synthesis of hepatic MT in the bank vole. It has also been observed that rats fed with different but normal levels of Zn and Cu in their diet showed only minor variations in the MT synthesis in the liver (Włostowski, 1992b). We could thus hypothesize that the basis level of MT is sufficient to manage with essential metals and that an increase of MT levels becomes necessary only for the detoxification of non-essential ones.

A positive relationship between MT and Pb levels was observed in our results, which was rarely reported. Studying MT gene expression in bank voles chronically exposed to MTEs *in situ*,



Swiergosv-Kowalewska et al. (2007) found a positive correlation between MT-I gene expression and Pb concentrations in kidneys. Moreover, it has been shown that Pb injection could increase the level of MTs in rats, even if this was less efficient than the injection of Cd or Zn (Eaton et al., 1980). Pb effect on MT induction was supposed to be indirect, related to stress and not to the metal ion *per se* (Eaton et al., 1980).

On the other hand, in the wood mouse, we observed a significant decrease of renal MTs with renal Pb concentrations increase and no correlation with Cd concentrations. Those results and the decrease of renal Cu along the pollution gradient for the wood mouse suggest that this species could be subject to metal-induced stress, notably to Pb toxicosis in kidneys. Indeed, a chronic exposure to Pb can lead to nephropathy with renal insufficiency, dysfunctions of the proximal tubule re-absorption and urinary leak of low-molecular-weight proteins (Garnier, 2005). In several aquatic animals, the toxicity of metals in organs has been shown to affect MT induction (Amiard et al., 2006). Notably, results such as an absence or a depletion of MT levels with internal metals, a reduced inducibility or deviation from linearity of the relationship between MT and Cd levels have been reported concomitantly to lethal or sub-lethal effects in exposed animals (Amiard et al., 2006). Our results suggest that such phenomena could also be observed in terrestrial vertebrates. Indeed, to investigate deeply the relevance of such a hypothesis on detrimental effect of Pb in the wood mouse, we compared our data with toxic thresholds reported in the literature. We found that the number of individuals which exhibited renal Pb concentrations exceeding  $25 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dry weight (a toxic threshold in kidneys proposed for small mammals by Shore and Douben (1994b)) was 22 for the wood mouse, 6 for the bank vole, 12 for the common shrew and 1 for the pygmy shrew. The toxic threshold of renal Cd concentrations,  $105 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dry weight (Shore and Douben, 1994a), was exceeded by a lower number of individuals by both rodents and shrews: we measured higher renal levels in only 2 wood mice, 2 bank voles, 7 common shrews and 2 pygmy shrews. Those results reinforce the hypothesis of Pb injury for the wood mouse: according to the number of individuals exceeding the threshold values, the rodents, and notably the wood mouse, should be more at risk for Pb than for Cd-induced stress. The shrews should be at risk for Cd toxicity regarding the number of individuals concerned, but they are known to be more tolerant to metal-induced stresses, and particularly to Cd injury, than rodents (Shore and Rattner, 2001). Moreover, our study proved that they were able to produce large quantities of MTs in response to Cd accumulation. So, despite elevated residues in some individuals, the shrews seem to be able to protect themselves against Cd toxicosis, at least at the levels of pollution studied here. Indeed, the *Sorex* spp were not trapped in the most polluted areas, which did not allow concluding on the responses of these species to extremely high levels of environmental contamination and resulting risk.

We evidenced that MT levels were strongly related to internal Cd concentrations, but, moreover, that the field exposure to a mixture of pollutants influenced the responses of small mammals and modulated the renal and hepatic MT levels. The accumulation of Cd does not

necessarily induce an increase of MT levels because of interactions with other factors, for instance Pb-induced stress. If differences between species in relationships between MTE and MT levels could be partly due to metal-induced stress, it is also possible that differences in isoform induction could participate in explaining the various responses (Miles et al., 2000).

#### *III.3.4.d. Presence of small mammals along the pollution gradient*

We noticed, at the most contaminated sites, the absence of the common shrew, the common pine vole and the field vole in our samples, and the decrease of the abundance of the bank vole. This could be considered as a sign of adverse effects of pollutants via direct (influence on health) or indirect (available resources) influence of environmental contamination on small mammal populations. However, this could also be due to the influence of landscape, which differs, as we underlined in the description of the study sites along the pollution gradient, and especially between the H site and the others. Adverse effect of metallic pollution cannot be totally ignored but an effect of landscape appears more relevant. Indeed, the H site is characterized by more scrublands, urban and industrial areas and less agricultural lands and woodlands. The gradient of landscape composition along the pollution gradient seems to be reflected by the small mammal species in the community with the disappearance of microtine voles (field vole and common pine vole) and of *Sorex* shrews, the decrease of bank vole abundance and the appearance of the greater white-toothed shrew. The microtine voles are known to be well represented in grassy linear habitats. The field vole predominantly feeds on grass and occurs principally in open habitats (grasslands...) and the common pine vole is rather a seed- and insect-eater occurring in diversified habitats with several vegetation layers (Le Louarn et al., 2003; Butet et al., 2006). The greater white-toothed shrew is known to live preferentially in scrublands, open landscapes (cultivated fields, grasslands) and urban areas (gardens, hedgerows...) (Lugon-Moulin, 2003; Butet et al., 2006). Conversely, the wood mouse and the bank vole are known to prefer woody habitats (Le Louarn et al., 2003; Butet et al., 2006). However, the wood mouse is known to be more eurytopic than the bank vole and the common shrew, these two last species being more strictly confined to woody patches (hedgerows for instance) in heterogeneous landscapes (Canova and Fasola, 1991; Butet et al., 2006). Moreover, *Sorex* shrews are more selective in their habitat choice than Cricetidae and Muridae and dependent on resources occurring in permanent habitats (Talmage and Walton, 1991; Butet et al., 2006). Regarding the ecology of the sampled species, it is likely that the absence of certain species and notably *Sorex* spp in the most polluted areas is more related to the landscape than to a detrimental effect on *Sorex* populations.

#### *III.3.4.e. Significance of MTs as exposure biomarker and for risk assessment*

Considering the evolution of MT levels along the pollution gradient, an increase of MT levels was only revealed in certain cases (notably in the liver and kidneys in the common shrew, and in the liver only in the wood mouse and the bank vole). Therefore, our results are only partly in

accordance with the few studies on terrestrial wild vertebrates from contaminated sites. These studies on small mammals (*A. sylvaticus*, *A. flavicollis*, *M. glareolus*) and birds (*Parus major*) have shown an increase of MT concentrations in liver and kidneys in contaminated sites compared to reference sites (Damek-Poprawa, 2002; Rogival et al., 2007a; Vanparys et al., 2008). Swiergosv-Kowalewska et al. (2007) found that the relative expression of MT-I and MT-II genes were higher in animals from a contaminated site than those from the reference site. The differences between those studies and our results could be due to a different range of MTE concentrations. For instance, Cd, Pb and Zn soil concentrations in the study of Rogival et al. (2007a) were approximately one order of magnitude lower than in our case. Marques et al. (2008) did not find any significant differences in MT levels in Algerian mice between the abandoned mining site of Aljustrel and a reference area in southern Portugal. The authors did not present Cd measurements in Algerian mice but the presence of Cd in soils and animals has been confirmed by other studies conducted at Aljustrel site (Sánchez-Chardi et al., 2007c). However, the Cd levels still were lower than those measured in the surroundings of Metaleurop Nord.

Therefore, for biomonitoring purposes, the measurement of internal metal concentrations in the wood mouse and the bank vole would be a better marker of exposure than measuring MT levels. Indeed, accumulation of non-essential metals allowed discriminating the exposure of rodents to environmental contamination while the levels of MTs were poorly related to the environmental and the internal levels of metals as well. However, the induction of MT along the pollution gradient could be interpreted as a response to metal accumulation and metal-induced stress. The relationships between metal exposure and levels of MTs were strong for the common shrew, the levels of MTs in this species could therefore be considered as a relevant biomarker of both metal environmental exposure and metal accumulation. However, in a risk assessment purpose, *Sorex* species seemed not to be a good biomonitor because these shrews are relatively demanding in their habitat selection (Talmage and Walton, 1991) and may be less ubiquitous than, for instance, rodents like the wood mouse and the bank vole.

### III.3.5. Conclusions

The 4 sympatric species studied in this work exhibited different patterns in their responses to environmental pollution (accumulation of metals, levels of MTs), showing that both host factors and environmental parameters conditioned MTE bioavailability. Notably, differences in responses could be related to physiological and behavioural characteristics of the individuals (age, species, diet, capability to produce MTs...). Furthermore, the present work showed that age more than gender and species more than trophic group are key factors affecting the responses of wild small mammals exposed to metals.

The non-essential metal accumulation and the MT levels constitute 2 different responses of small mammals to environmental contamination, the first one being a response to metal external exposure, the second a response to metal accumulation. Taken together, metal and MT levels provide a better picture of the bioavailability (environmental availability and toxicological availability) of metals. Therefore, the MTE and MT levels constitute 2 complementary markers of exposure and cannot be interpreted properly when considered separately. Those results question the use of MTs solely as exposure biomarker in wild small mammals and suggest that associated measures of MT and MTE levels would be more meaningful in contributing to explain the exposure and the responses of small mammals to metallic pollution and thus, for biomonitoring purposes.

**Acknowledgements** - We gratefully thank Dr Renata Swiergosz-Kowalewska and Dr Pawel Koteja for their help in supplying bank voles from their reared colony. We also warmly thank Cécile Grand from ADEME (*Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie*) for many fruitful scientific discussions and Dominique Rieffel, Christiane Lovy, Jean-Claude Lambert and Thomas Schneider for their technical assistance. The STARTT programme is financially supported by ANR (*Agence Nationale de la Recherche*, contract n°ANR-05-ECCO-004) and ADEME (contract n°0572C0058). CF is financially supported by a grant from ADEME and the *Conseil Régional de Franche-Comté*. The authors are indebted to the two anonymous reviewers for improving the manuscript.

### III.3.6. References

- AFNOR, 1996. Qualité des sols - Méthodes chimiques - sols sédiments, mise en solution totale par attaque acide - NF X31-147. Association Française de Normalisation, Paris, France.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76, 160-202.
- Baker, S., Herrchen, M., Hund-Rinke, K., Klein, W., Kordel, W., Peijnenburg, W., Rensing, C., 2003. Underlying issues including approaches and information needs in risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 6-19.
- Barjaktarovic, L., Elliott, J.E., Scheuhammer, A.M., 2002. Metal and Metallothionein Concentrations in Scoter (*Melanitta* spp.) from the Pacific Northwest of Canada, 1989–1994. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 43, 0486-0491.
- Beernaert, J., Scheirs, J., Leirs, H., Blust, R., Verhagen, R., 2007. Non-destructive pollution exposure assessment by means of wood mice hair. *Environmental Pollution* 145, 443-451.
- Burger, J., Diaz-Barriga, F., Marafante, E., Pounds, J., Robson, M., 2003. Methodologies to examine the importance of host factors in bioavailability of metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 20-31.
- Butet, A., Paillat, G., Delettre, Y., 2006. Seasonal changes in small mammal assemblages from field boundaries in an agricultural landscape of western France. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 113, 364-369.
- Canova, L., Fasola, M., 1991. Communities of small mammals in 6 biotopes of northern Italy. *Acta Theriologica* 36, 73-86.
- Chwelatiuk, E., Włostowski, T., Krasowska, A., Bonda, E., 2005. Melatonin increases tissue accumulation and toxicity of cadmium in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *BioMetals* 18, 283-291.
- Cosson, R.P., 2000. Bivalve metallothionein as a biomarker of aquatic ecosystem pollution by trace metals: Limits and perspectives. *Cellular and Molecular Biology* 46, 295-309.
- Damek-Poprawa, M., 2002. The effect of heavy metal accumulation on metallothionein content in selected tissues of bank voles and yellow-necked mice caught near a steelworks and zinc smelter. *Folia Biologica* 50, 211-214.
- Davis, S.R., Cousins, R.J., 2000. Metallothionein expression in animals: A physiological perspective on function. *Journal of Nutrition* 130, 1085-1088.
- Depledge, M.H., 1990. New approaches in ecotoxicology - Can inter-individual physiological variability be used as a tool to investigate pollution effects? *Ambio* 19, 251-252.
- Douay, F., Pruvot, C., Roussel, H., Ciesielski, H., Fourrier, H., Proix, N., Waterlot, C., 2008. Contamination of urban soils in an area of Northern France polluted by dust emissions of two smelters. *Water, Air, and Soil Pollution* 188, 247-260.
- Douay, F., Pruvot, C., Waterlot, C., Fritsch, C., Fourrier, H., Lorient, A., Bidar, G., Grand, C., De Vaulfleury, A., Scheifler, R., 2009. Contamination of woody habitat soils around a former lead smelter in the North of France. *Science of the Total Environment* 407, 5564-5577.
- Eaton, D.L., Stacey, N.H., Wong, K.L., Klaassen, C.D., 1980. Dose-response effects of various metal ions on rat liver metallothionein, glutathione, heme oxygenase, and cytochrome P-450. *Toxicology and Applied Pharmacology* 55, 393-402.
- Elliott, J.E., Scheuhammer, A.M., 1997. Heavy metal and metallothionein concentrations in seabirds from the Pacific coast of Canada. *Marine Pollution Bulletin* 34, 794-801.
- Erry, B.V., Macnair, M.R., Meharg, A.A., Shore, R.F., 2000. Arsenic contamination in wood mice (*Apodemus sylvaticus*) and bank voles (*Clethrionomys glareolus*) on abandoned mine sites in southwest Britain. *Environmental Pollution* 110, 179-187.
- Forbes, V.E., Moller, V., Depledge, M.H., 1995. Intrapopulation variability in sublethal response to heavy metal stress in sexual and asexual gastropod populations. *Functional Ecology* 9, 477-484.
- Gamberg, M., Scheuhammer, A.M., 1994. Cadmium in caribou and muskoxen from the Canadian Yukon and Northwest Territories. *Science of the Total Environment* 143, 221-234.
- Garnier, R., 2005. Toxicité du plomb et de ses dérivés. *EMC - Toxicologie-Pathologie* 2, 67-88.
- Gonzalez, X.I., Aboal, J.R., Fernandez, J.A., Carballeira, A., 2008. Evaluation of some sources of variability in using small mammals as pollution biomonitors. *Chemosphere* 71, 2060-2067.
- Grafen, A., Hails, R., 2002. *Modern Statistics for the Life Sciences*. Oxford University Press.
- Hispard, F., De Vaulfleury, A., Martin, H., Devaux, S., Cosson, R.P., Scheifler, R., Richert, L., Berthelot, A., Badot, P.-M., 2007. Effects of subchronic digestive exposure to organic and inorganic cadmium on biomarkers in rat tissues. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70, 490-498.
- Hopkin, S.P., Hames, C.A.C., Dray, A., 1989. X-ray microanalytical mapping of the intracellular distribution of pollutant metals. *Microscopy and Analysis*, 23-27.
- Klaassen, C.D., Liu, J., Diwan, B.A., 2009. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 238, 215-220.
- Kojadinovic, J., Bustamante, P., Le Corre, M., Cosson, R.P., 2007. Trace elements in three marine birds breeding on Reunion Island (Western Indian Ocean): Part 2 - Factors influencing their detoxification. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52, 431-440.

- Komarnicki, G.J.K., 2000. Tissue, sex and age specific accumulation of heavy metals (Zn, Cu, Pb, Cd) by populations of the mole (*Talpa europaea* L.) in a central urban area. *Chemosphere* 41, 1593-1602.
- Kozakiewicz, M., 1976. The weight of eye lens as the proposed age indicator of the bank vole. *Acta Theriologica* 21, 314-316.
- Le Louarn, H., Quéré, J., Butet, A., 2003. *Les Rongeurs de France - Faunistique et biologie*, 2e édition revue et augmentée ed, Paris, France.
- Lugon-Moulin, N., 2003. *Les Musaraignes - Biologie, Ecologie, Répartition en Suisse*, Ayer, Switzerland.
- Ma, W., 1989. Effect of soil pollution with metallic lead pellets on lead bioaccumulation and organ/body weight alterations in small mammals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 18, 617-622.
- Marques, C.C., Gabriel, S.I., Pinheiro, T., Viegas-Crespo, A.M., Mathias, M.d.L., Bebianno, M.J., 2008. Metallothionein levels in Algerian mice (*Mus spretus*) exposed to elemental pollution: An ecophysiological approach. *Chemosphere* 71, 1340-1347.
- Mertens, J., Luyssaert, S., Verbeeren, S., Vervaeke, P., Lust, N., 2001. Cd and Zn concentrations in small mammals and willow leaves on disposal facilities for dredged material. *Environmental Pollution* 115, 17-22.
- Miles, A.T., Hawksworth, G.M., Beattie, J.H., Rodilla, V., 2000. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 35, 35-70.
- Milton, A., Johnson, M., 1999. Biomonitoring of contaminated mine tailings through age accumulation of trace metals in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Journal of Environmental Monitoring* 1, 219-225.
- Milton, A., Cooke, J.A., Johnson, M.S., 2003. Accumulation of Lead, Zinc, and Cadmium in a Wild Population of (*Clethrionomys glareolus*) from an Abandoned Lead Mine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44, 405-411.
- Nahmani, J., Hodson, M.E., Black, S., 2007. A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. *Environmental Pollution* 145, 402-424.
- Peakall, D., Burger, J., 2003. Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 110-121.
- Pernetta, J.C., 1976. Diets of shrews *Sorex araneus* L. and *Sorex minutus* L. in Wytham grassland. *Journal of Animal Ecology* 45, 899-912.
- R Development Core Team, 2006. R: A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org>, Vienna, Austria.
- Read, H.J., Martin, M.H., 1993. The effect of heavy metals on populations of small mammals from woodlands in Avon (England); with particular emphasis on metal concentrations in *Sorex araneus* L. and *Sorex minutus* L. *Chemosphere* 27, 2197-2211.
- Rogival, D., Van Campenhout, K., Infante, H.G., Hearn, R., Scheirs, J., Blust, R., 2007a. Induction and metal speciation of metallothionein in wood mice (*Apodemus sylvaticus*) along a metal pollution gradient. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 506-514.
- Rogival, D., Scheirs, J., Blust, R., 2007b. Transfer and accumulation of metals in a soil-diet-wood mouse food chain along a metal pollution gradient. *Environmental Pollution* 145, 516-528.
- Sadowska, E.T., Baliga-Klimczyk, K., Chrzascik, K., Koteja, P., 2008. Laboratory model of adaptive radiation: a selection experiment in the bank vole. *Physiological and Biochemical Zoology* 81, 627-640.
- Sample, B.E., Beauchamp, J.J., Efroymson, R.A., Suter II, G.W., 1998. Development and validation of bioaccumulation models for small mammals. Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, USA, p. 89.
- Sánchez-Chardi, A., Nadal, J., 2007. Bioaccumulation of metals and effects of landfill pollution in small mammals. Part I. The greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*. *Chemosphere* 68, 703-711.
- Sánchez-Chardi, A., Lopez-Fuster, M.J., Nadal, J., 2007a. Bioaccumulation of lead, mercury, and cadmium in the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*, from the Ebro Delta (NE Spain): Sex- and age-dependent variation. *Environmental Pollution* 145, 7-14.
- Sánchez-Chardi, A., Peñarroja-Matutano, C., Ribeiro, C.A.O., Nadal, J., 2007b. Bioaccumulation of metals and effects of a landfill in small mammals. Part II. The wood mouse, *Apodemus sylvaticus*. *Chemosphere* 70, 101-109.
- Sánchez-Chardi, A., Marques, C.C., Nadal, J., da Luz Mathias, M., 2007c. Metal bioaccumulation in the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*, inhabiting an abandoned pyrite mine site. *Chemosphere* 67, 121-130.
- Sánchez-Chardi, A., Ribeiro, C.A.O., Nadal, J., 2009. Metals in liver and kidneys and the effects of chronic exposure to pyrite mine pollution in the shrew *Crocidura russula* inhabiting the protected wetland of Doñana. *Chemosphere* 76, 387-394.
- Savva, D., Garcia-Aljaro, C., Lawes, K.P., Swiergosz-Kowalewska, R., 2002. Characterisation of DNA probes for the analysis of metallothionein gene expression in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Environment International* 28, 139-146.
- Shore, R., 1995. Predicting cadmium, lead and fluoride levels in small mammals from soil residues and by species-species extrapolation. *Environmental Pollution* 88, 333-340.
- Shore, R.F., Douben, P.E.T., 1994a. The ecotoxicological significance of cadmium intake and residues in terrestrial small mammals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 29, 101-112.
- Shore, R.F., Douben, P.E., 1994b. Predicting ecotoxicological impacts of environmental contaminants on terrestrial small mammals. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 134, 49-89.

- Shore, R.F., Rattner, B.A. (Eds.), 2001. *Ecotoxicology of Wild Mammals*. John Wiley & Sons, London, UK.
- Smith, P.N., Cobb, G.P., Godard-Codding, C., Hoff, D., McMurry, S.T., Rainwater, T.R., Reynolds, K.D., 2007. Contaminant exposure in terrestrial vertebrates. *Environmental Pollution* 150, 41-64.
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourrier, H., Perdrix, E., 2002. Assessment of the contamination of cultivated soils by eighteen trace elements around smelters in the North of France. *Water, Air, and Soil Pollution* 135, 173-194.
- Swiergosz-Kowalewska, R., Bednarska, A., Callaghan, A., 2007. Expression of metallothionein genes I and II in bank vole *Clethrionomys glareolus* populations chronically exposed in situ to heavy metals. *Environmental Science and Technology* 41, 1032-1037.
- Talmage, S., Walton, B., 1991. Small mammals as monitors of environmental contaminants. *Review of Environmental Contaminants and Toxicology* 119, 47-145.
- Topolska, K., Sawicka-Kapusta, K., Cieslik, E., 2004. The effect of contamination of the Krakow region on heavy metals content in the organs of bank voles (*Clethrionomys glareolus*, Schreber, 1780). *Polish Journal of Environmental Studies* 13, 103-109.
- Van Gestel, C.A.M., 2008. Physico-chemical and biological parameters determine metal bioavailability in soils. *Science of the Total Environment* 406, 385-395.
- Vandorpe, E., Verhagen, R., 1980. An age reference model for the wood mouse, *Apodemus sylvaticus* (Linnaeus, 1758), by use of the lens technique. *Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique* 109, 133-140.
- Vanparys, C., Dauwe, T., Van Campenhout, K., Bervoets, L., De Coen, W., Blust, R., Eens, M., 2008. Metallothioneins (MTs) and delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAd) as biomarkers of metal pollution in great tits (*Parus major*) along a pollution gradient. *Science of the Total Environment* 401, 184-193.
- Veltman, K., Huijbregts, M.A.J., Hamers, T., Wijnhoven, S., Hendriks, A.J., 2007. Cadmium accumulation in herbivorous and carnivorous small mammals: Meta-analysis of field data and validation of the bioaccumulation model optimal modeling for ecotoxicological applications. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 1488-1496.
- Venables, W.N., Ripley, B.D., 2001. *Modern applied statistics with S-PLUS*, Third ed. Springer-Verlag, New-York.
- Vijver, M.G., Van Gestel, C.A.M., Lanno, R.P., Van Straalen, N.M., Peijnenburg, W.J.G.M., 2004. Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: A review. *Environmental Science and Technology* 38, 4705-4712.
- Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B., 2006. *Principles of ecotoxicology*, Third ed. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA.
- Wijnhoven, S., Leuven, R., van der Velde, G., Jungheim, G., Koelemij, E., de Vries, F., Eijsackers, H., Smits, A., 2007. Heavy-Metal Concentrations in Small Mammals from a Diffusely Polluted Floodplain: Importance of Species- and Location-Specific Characteristics. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52, 603-613.
- Włostowski, T., 1992a. Postnatal changes in subcellular distribution of copper, zinc and metallothionein in the liver of bank vole (*Clethrionomys glareolus*): A possible involvement of metallothionein and copper in cell proliferation. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 103, 285-290.
- Włostowski, T., 1992b. Seasonal changes in subcellular distribution of zinc, copper, cadmium and metallothionein in the liver of bank vole (*Clethrionomys glareolus*): A possible essential role of cadmium and metallothionein in the hepatic metabolism of copper. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 101, 155-162.
- Włostowski, T., Krasowska, A., 1999. Subcellular distribution of metallothionein and cadmium in the liver and kidneys of bank voles (*Clethrionomys glareolus*) exposed to dietary cadmium. *BioMetals* 12, 173-179.
- Włostowski, T., Bonda, E., Krasowska, A., 2004. Photoperiod affects hepatic and renal cadmium accumulation, metallothionein induction, and cadmium toxicity in the wild bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58, 29-36.

---

## RESULTATS COMPLEMENTAIRES : ROLE DES METALLOTHIONEINES DANS LA PROTECTION CONTRE LE STRESS INDUIT PAR LES METAUX

---

### *Existe-t-il une relation entre état de santé des micromammifères et concentrations internes en ETMs et métallothionéines ?*

Les métallothionéines (MTs) ont un rôle dans la régulation homéostatique des métaux essentiels tels que le cuivre ou le zinc mais aussi dans la détoxification des métaux non-essentiels comme le cadmium (Miles et al., 2000; Amiard et al., 2006). Leur rôle protecteur vis-à-vis des effets délétères des ETMs chez les organismes a été étudié chez les invertébrés et chez certains vertébrés (principalement le rat et la souris), surtout en laboratoire (Miles et al., 2000; Amiard et al., 2006; Klaassen et al., 2009). Il a été suggéré que les micromammifères insectivores sont moins sensibles au stress induit par les métaux (alors qu'ils en accumulent de plus fortes concentrations) que les rongeurs, grâce à l'induction de MTs, mais cela n'a pas été démontré à ce jour (Shore and Rattner, 2001). Il apparaît donc essentiel de comprendre comment cette forme de stockage des métaux peut influencer les relations dose/effets chez les organismes exposés aux ETMs. Ce, d'une part pour affiner l'utilisation des données de concentrations internes en évaluation du risque, et d'autre part, pour améliorer la compréhension fondamentale des facteurs liés aux récepteurs qui peuvent influencer le transfert et les effets des contaminants métalliques dans les chaînes alimentaires. Nous avons montré que les micromammifères exposés de manière chronique *in situ* à un gradient de pollution montraient des réponses variables entre espèces, à la fois pour l'accumulation des métaux mais aussi pour la production de MTs. En complément à cette analyse, nous avons recherché si la production de MTs pouvait protéger les individus du stress induit par l'accumulation de métaux en étudiant l'état de santé des animaux.

Différents indices de condition corporelle et somatiques ont été mesurés sur les animaux capturés au printemps 2007 afin d'évaluer leur état de santé. Les méthodes mises en œuvre pour le calcul des indices sont décrites dans la partie 2 « Matériels et Méthodes » du présent manuscrit. Les indices suivants ont été calculés : indice de condition corporelle (ICC, basé sur la masse corporelle), indice hépatique (IH, basé sur la masse du foie), indice rénal (IR, basé sur la masse des reins), indice immunitaire (II, basé sur la masse de la rate) et indice d'adiposité (IA, basé sur la masse des tissus adipeux) (Ma, 1989; Møller et al., 1998; Green, 2001; Schulte-Hostedde et al., 2001; Norrdahl et al., 2004; Schulte-Hostedde et al., 2005). Les indices ont été calculés pour le Mulot sylvestre, le Campagnol roussâtre et la Musaraigne carrelet, les autres espèces capturées ne présentant pas d'effectifs suffisants pour cette analyse.

Les relations entre indices et concentrations rénales en métaux ont ensuite été explorées grâce à des modèles linéaires généralisés. Les données de concentrations internes en ETMs ont été transformées en utilisant une transformation logarithmique de base 10. La significativité des



variables a été testée grâce à un test de permutation (Monte-Carlo, 1000 permutations) et le coefficient de détermination a été calculé sur la base d'une analyse de variance (ANOVA).

**Tableau III.3.6.** Relations significatives ( $p < 0.05$ ) entre les concentrations rénales en ETMs et les indices corporel et somatiques (ICC : Indice de condition corporelle, IH : indice hépatique, IR : indice rénal, II : indice immunitaire, IA : indice d'adiposité). Les flèches indiquent le sens de la relation et  $R^2$  la valeur du coefficient de détermination.

		Cd	Pb	Zn	Cu
Mulot sylvestre	ICC		↘ $R^2 = 0,08$		↗ $R^2 = 0,08$
	IH	↗ $R^2 = 0,11$		↗ $R^2 = 0,07$	
	IR	↗ $R^2 = 0,11$	↗ $R^2 = 0,08$	↗ $R^2 = 0,04$	
	II				
	IA		↘ $R^2 = 0,05$	↘ $R^2 = 0,03$	
Campagnol roussâtre	ICC		↘ $R^2 = 0,07$		
	IH				
	IR				
	II				
	IA				
Musaraigne carrelet	ICC		↗ $R^2 = 0,09$		
	IH				
	IR				
	II		↗ $R^2 = 0,12$		
	IA				↗ $R^2 = 0,12$

Les résultats ne différant pas entre les sexes, les données sont présentées tous sexes confondus. Ces données montrent que plusieurs relations significatives existent entre les teneurs en ETMs dans les reins et les indices de santé (Tableau III.3.6). Le mulot est l'espèce pour laquelle on constate le plus grand nombre de relations significatives. Chez cette espèce, nous observons une diminution de l'indice de condition corporelle et des réserves adipeuses avec l'augmentation des concentrations en Pb notamment, et une augmentation des indices hépatiques et rénaux avec Cd, Pb et Zn. L'augmentation de la masse des organes a été suggérée comme étant un signe d'effet délétère des métaux chez les micromammifères car elle pourrait refléter la présence d'œdèmes dans les organes (Ma, 1989; Shore and Rattner, 2001; Milton et al., 2003).

Les résultats de concentrations en ETMs et MTs ont montré que les musaraignes présentaient une forte accumulation des métaux non-essentiels associée à une forte augmentation des teneurs hépatiques et rénales en MTs. Chez les rongeurs, l'accumulation des ETMs était élevée, mais plus

modérée que chez les musaraignes. Par ailleurs, les concentrations en MTs dans les organes chez le campagnol roussâtre augmentaient avec les concentrations internes en Cd, mais de manière moins prononcée que chez la musaraigne carrelet. Chez le mulot sylvestre, les concentrations en MTs augmentaient avec les teneurs en Cd dans le foie seulement, et avec un coefficient de détermination plus faible que pour les autres espèces. De plus, chez le Mulot sylvestre uniquement, les teneurs en Cu (métal essentiel) diminuaient le long du gradient de pollution. Les réponses particulières du mulot (diminution des teneurs rénales en Cu, absence de relation entre teneurs rénales en Cd et en MTs) suggèrent des atteintes rénales dues aux ETMs (Cf développements à ce sujet dans la partie précédente, Chapitre 3 : partie III.3.4). Les constats portés sur les indices de santé aboutissent aux mêmes conclusions. Le nombre de réponses des micromammifères en termes d'indices de santé augmentent dans le sens musaraigne < campagnol < mulot, soit l'inverse de l'accumulation des métaux non-essentiels et de la production de MTs.

Au regard des différents paramètres étudiés, les espèces peuvent être considérées comme étant plus ou moins à risque vis-à-vis d'effets délétères induits par la contamination environnementale avec des probabilités de risque différentes selon la réponse.

Considérant l'accumulation des ETMs et le dépassement des seuils toxicologiques de référence rénaux, les musaraignes présentent une forte probabilité d'encourir des effets délétères (Tableau III.3.7). De plus, ces espèces n'ont pas ou très peu été capturées sur les sites les plus contaminés, ce qui pourrait être interprété comme un signe d'effet défavorable des ETMs sur les populations de musaraigne. Par contre, les indices d'état de santé et leur capacité de production de MTs suggèrent un risque limité.

Concernant les campagnols, les paramètres indiquent des effets très limités tandis que chez les mulots, bien que l'accumulation soit la plus faible par rapport aux autres espèces et qu'il soit abondant sur les sites contaminés, les différents paramètres individuels suggèrent une forte probabilité d'occurrence d'effets négatifs.

**Tableau III.3.7.** Synthèse des paramètres à considérer pour une évaluation des risques lié aux ETMs pour les espèces considérées selon les différents paramètres étudiés. La coloration des cases indique niveau de risque : gris clair = « pas de risque », gris foncé = « pas d'évidence de risque », gris très foncé = « risque ».

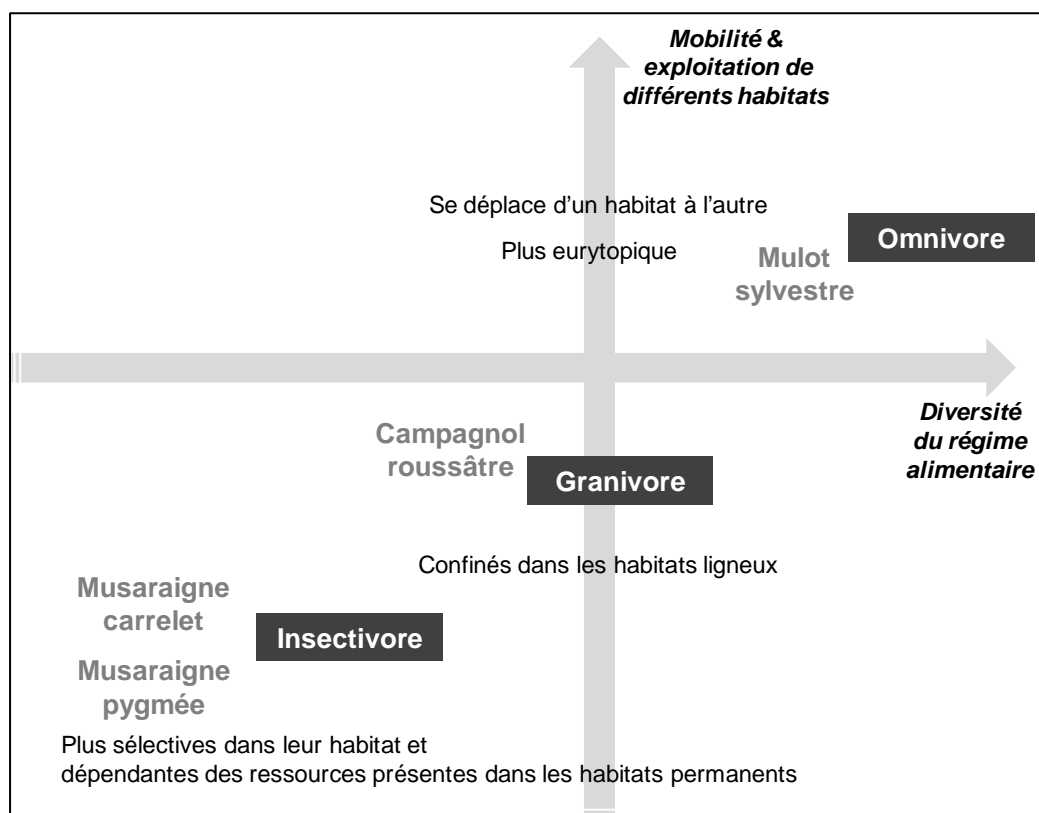
	Mulot sylvestre	Campagnol roussâtre	Musaraignes
Accumulation d'ETMs			
Production de MTs			
Etat de santé			
Valeurs toxicologiques			
Abondance sur les sites pollués			

Un examen des paramètres couramment utilisés en évaluation du risque environnemental (niveaux d'ETMs accumulés, valeurs toxicologiques de référence et abondance des espèces) laisse supposer un risque pour les musaraignes et une absence de risque pour les mulots. La considération d'autres paramètres indicateurs de risque paraît donner des résultats contradictoires, nos évaluations de l'état de santé tendant à montrer qu'un risque existe pour le mulot, pas pour la Musaraigne carrelet. De plus, si l'on considère les effectifs capturés non plus seulement dans le contexte de la pollution des sols mais en tenant compte de l'écologie des espèces, les faibles abondances des musaraignes pourraient être liées à des effets paysagers.

Considérant les indices d'état de santé mesurés ici, le Mulot sylvestre pourrait subir des effets délétères des ETMs tandis que nous n'avons pas observé d'influence des ETMs chez la Musaraigne carrelet. La production de MTs par les différentes espèces semble confirmer et justifier l'absence d'effets sur l'état de santé générale des musaraignes et l'occurrence d'effets chez le mulot. Enfin, l'occurrence d'effets sur l'état de santé du mulot pourrait être lié au fait grand nombre d'individus exposés à de fortes contaminations environnementales du fait de leur présence sur les sites les plus contaminés : une plus grande taille d'échantillon peut être à l'origine en partie de la détection d'effets en améliorant la puissance des tests statistiques.

Des effets directs des ETMs (toxicité entraînant une diminution de la survie des animaux et/ou de leur reproduction), et/ou indirects sur la qualité des ressources (habitat, alimentation), pourraient être à l'origine de la diminution des abondances des musaraignes du genre *Sorex* le long du gradient de contamination. Cependant, si des effets des ETMs ne peuvent être totalement écartés, les faibles abondances de musaraignes du genre *Sorex* sur les sites les plus contaminés peuvent s'expliquer au moins en partie par l'écologie de ces espèces et du paysage des sites considérés (Tableau III.3.1, Figure III.3.6). Le site le plus contaminé présente en effet des pourcentages d'occupation du sol de milieux agricoles et forestiers beaucoup plus faibles que les autres sites, mais des pourcentages d'occupation du sol de milieux urbain/industriel et de friches plus élevés. Si le Mulot sylvestre est plutôt eurytopique et opportuniste en termes de choix d'habitat (il se montre capable de changer de milieu au cours de l'année par exemple), les Musaraignes carrelet et pygmée sont plus exigeantes pour leur choix d'habitat, elles dépendent de ressources présentes dans les milieux permanents et sont plutôt confinées dans les milieux boisés. Pour les musaraignes, il est donc difficile de discriminer l'influence respective du paysage et de l'exposition aux ETMs pour expliquer les effectifs capturés.

Les données acquises ici suggèrent que les ETMs ont peu d'effets sur les musaraignes, probablement en partie grâce à leurs capacités de production de MTs, si bien que l'hypothèse d'une influence forte de l'habitat dans leur répartition sur la zone d'étude semble la plus probable.



**Figure III.3.6.** Schéma synoptique des caractéristiques des espèces étudiées en termes de diversité de régime alimentaire et de mobilité ou d'exploitation de différents habitats (Talmage and Walton, 1991; Canova, 1992; Abt and Bock, 1998; Ouin et al., 2000; Tattersall et al., 2001; Le Louarn et al., 2003; Lugon-Moulin, 2003; Millán de la Peña et al., 2003; Butet et al., 2006; Michel et al., 2006; Wijnhoven et al., 2006; Michel et al., 2007).

D'une manière générale, la sensibilité des micromammifères au stress induit par les ETMs est plus importante chez les rongeurs que chez les insectivores (Shore and Douben, 1994b; Shore and Douben, 1994a; Shore and Rattner, 2001). De précédents travaux sur des sites de référence et contaminés concernant l'histopathologie ont mis en évidence que les seuils de toxicité des métaux dans les organes des mulots forestiers (Mulot à collier) étaient plus faibles que ceux des campagnols roussâtres (Damek-Poprawa and Sawicka-Kapusta, 2004). Nos résultats aboutissent, en utilisant des indices intégrateurs de l'état de santé général, à des conclusions similaires sur la sensibilité des différentes espèces. En outre, nos résultats montrent que ces différences de sensibilité semblent être expliquées par la capacité des espèces à produire des MTs, renforçant ainsi l'hypothèse proposée par différents auteurs.

Ces conclusions peuvent avoir une forte implication pour le transfert des métaux dans les réseaux trophiques. Les musaraignes, en effet, accumulent de fortes quantités de métaux et semblent capables de les séquestrer, plus particulièrement dans le cas du Cd, sous des formes non-toxique par liaison avec des MTs. Or cette forme de stockage pourrait favoriser le transfert des ETMs dans les chaînes alimentaires, entraînant ainsi un empoisonnement secondaire chez les prédateurs (Wallace and Lopez, 1996; 1997; Wallace et al., 1998; Wallace and Luoma, 2003; Vijver et al., 2004).

En conclusion, il apparaît que plus les espèces ont la capacité de produire des MTs lorsque leurs teneurs internes en ETMs augmentent, moins elles montrent de signes de stress induit par les métaux sur leur état de santé général. Par ailleurs, il semble nécessaire d'améliorer l'estimation des valeurs toxicologiques de référence en prenant en compte les formes de séquestration des métaux dans les organismes. Enfin, il conviendrait de mieux considérer les différences interspécifiques dans les réponses des organismes à la contamination environnementale et de tenir compte des caractéristiques écologiques des espèces pour l'évaluation du risque environnemental.

N.B. : la bibliographie relative à ces résultats complémentaires est présentée dans la partie réservée aux références bibliographiques du manuscrit (Partie V Bibliographie).

---

## III.4. CHAPITRE 4

### VARIABILITE TEMPORELLE DE L'ACCUMULATION DES ETMS CHEZ LE CAMPAGNOL ROUSSATRE

---

*L'accumulation des ETMs chez le campagnol roussâtre montre-elle des différences inter-annuelles et/ou inter-saisonnières ?*

#### Résumé

Alors que les niveaux de polluants accumulés dans les organismes et les effets délétères associés peuvent varier dans le temps, peu de travaux ont étudié les variations inter-annuelles et inter-saisonnières de l'accumulation et des effets des ETMs chez les animaux terrestres exposés de manière chronique dans des environnements contaminés. Les concentrations en Cd, Pb et Zn ont été mesurées dans les foies et les reins de campagnols roussâtres (*Myodes ex-Clethrionomys glareolus*) sauvages le long d'un gradient de pollution en automne (2006) et au printemps (2007, 2008). Des indices de condition corporelle et somatiques, ainsi que les proportions d'individus montrant des concentrations rénales en Cd et b supérieures à des valeurs toxicologiques, ont été calculés afin d'évaluer un stress potentiel induit par les métaux. Les campagnols roussâtres accumulent les ETMs et les concentrations des organes en éléments non-essentiels atteignent des valeurs très élevées (jusqu'à 266 et 1085  $\mu\text{g.g}^{-1}$  ms pour Cd et Pb, respectivement). Nous observons des variations inter-annuelles et inter-saisonnières dans les niveaux d'ETMs accumulés, mais ces différences dépendent de l'organe et du métal considéré. Les résultats sont plus contrastés pour le Cd et le Zn que pour le Pb. Tandis que le Pb dans le foie et les reins montre des variations inter-saisonnières (printemps < automne), le Cd et le Zn ont des patrons différents entre organes, et des variations entre années sans effet saisonnier net. Les proportions d'individus dépassant les valeurs toxiques rénales et les relations entre concentrations internes et indices de condition corporelle et somatiques ne varient pas significativement entre saisons ou années. Dans des perspectives d'évaluation du risque environnemental, ces résultats remettent en question l'interprétation d'une mesure ponctuelle de l'accumulation des ETMs. Ils soulignent le besoin d'un suivi temporel du transfert des ETMs dans les réseaux trophiques, pour améliorer les connaissances fondamentales sur les facteurs affectant l'exposition des organismes et la biodisponibilité des métaux et aider au développement d'estimations du risque plus représentatives écologiquement.

**Mots-clés** : rongeurs, variabilité temporelle, vertébrés, bioaccumulation.

## Abstract

Although levels of pollutants accumulated in organisms and related deleterious effects may vary over time, few studies have investigated inter-annual and inter-seasonal variations in metallic trace elements (MTE) accumulation and effects in terrestrial animals chronically exposed in contaminated environments. Concentrations of Cd, Pb and Zn were measured in liver and kidneys of free-living bank voles (*Myodes ex-Clethrionomys glareolus*) along a metallic soil pollution gradient in autumn (2006) and spring (2007, 2008). Body condition and somatic indices, as well as proportions of individuals showing higher renal Cd and Pb than toxic thresholds, were calculated to assess potential metal-induced stress. Bank voles accumulated MTE and concentrations of non-essential metals reached high values (up to 266 and 1085  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw for Cd and Pb, respectively). We found inter-annual and inter-seasonal variations in MTE levels, but these differences were metal- and organ-dependent. Results were more contrasted for Cd and Zn than for Pb. While Pb in both liver and kidneys exhibited inter-seasonal variations (spring < autumn), Cd and Zn showed different patterns between organs and variations between years with no straightforward seasonal effect. The proportion of individuals exceeding toxic thresholds and the relationships between internal concentrations and body condition or somatic indices did not significantly differ between seasons or years. In an ERA perspective, these results question the interpretation of a single measure of MTE concentrations over time. Moreover, they highlight the need of temporal monitoring of MTE transfer in food webs, which could improve fundamental knowledge on factors affecting exposure and bioavailability and help in developing more ecological risk estimates.

**Keywords:** rodents, temporal variability, vertebrates, bioaccumulation.

## Publication relative :

*Heavy metal accumulation and effects in bank voles: inter-annual and inter-seasonal variations*

C. Fritsch<sup>1</sup>, M. Coeurdassier<sup>1</sup>, F. Raoul<sup>1</sup>, P. Giraudoux<sup>1</sup>, A. de Vaufleury<sup>1</sup>, R. Scheiffler<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Chrono-Environment, UMR 6249 University of Franche-Comté/CNRS Usc INRA, Place Leclerc, F-25030 Besançon Cedex, France

Communication orale au congrès européen 2010 de la Society of Environmental Toxicology & Chemistry, Séville, Espagne (Topic: Wildlife toxicology: temporal and spatial facets of exposure and effects).

### III.4.1. Introduction

It is commonly admitted that levels of pollutants accumulated in organisms and related deleterious effects may vary over time between and within years, because of differences in organism exposure, pollutant availability and organism physiology (Peakall and Burger, 2003; Smith et al., 2007). However, few studies have investigated the inter-annual and inter-seasonal variation in cadmium (Cd), lead (Pb) and zinc (Zn) accumulation and effects in free-living terrestrial animals chronically exposed in contaminated environment. Although small mammals are considered as a suitable biomonitor for risk assessment of metallic pollution, scarce information is available to estimate the ecotoxicological relevance of a single measure of metal accumulation over time. Moreover, it has been shown that consideration of spatial and temporal variation in exposure assessment can greatly affect risk estimate and improve risk assessment procedure (Linkov et al., 2002). Thus, recent recommendations for improving metal risk assessment highlight the need to consider temporal variations in metal accumulation (Fairbrother et al., 2007). The objective of the present work was to compare metallic trace elements (MTE) accumulation in free-living bank voles (*Myodes ex-Clethrionomys glareolus*) along a pollution gradient between years and seasons.

### III.4.2. Materials and methods

The study site was located in the surroundings of a former non-ferrous smelter (Metaleurop Nord, northern France). Three sites (500 x 500 m-sided squares) were chosen with increasing distance to the smelter, in order to obtain a pollution gradient but comparable landscapes (named “L”, “M” and “H” for “low”, “medium” and “high” pollution levels, respectively. Table III.4.1). In each one of the squares, 6-7 woody patches were considered, providing 20 sampling patches differing in their soil MTE contamination along the pollution gradient. Trapping authorization was given by the Direction Régionale de l'ENvironnement (DIREN) of the Nord – Pas-de-Calais. Animals were captured in woody patches during autumn of 2006 and springtime of 2007 and 2008 using baited snap traps. On each site, 10 lines of 10 snap traps (3 m-spaced) were placed through the woody habitats, where the soils were sampled (Figure III.4.1). The trap lines were checked once a day in a 72 h period. The individuals trapped were frozen as soon as possible and stored (-20°C) until dissection. The bank voles were aged (3 age classes: juveniles, non-reproducing and reproducing adults), sexed and dissected in order to sample liver and kidneys. The weights of the body (without digestive tract) and organs were recorded and the length of hind foot was measured to determine body condition and somatic indices (Ma, 1989; Green, 2001; Schulte-Hostedde et al., 2001; Schulte-Hostedde et al., 2005). The body condition index (BCI) was calculated as the body weight normalized upon foot length, age and sex. The indices for liver and kidney weights (hepatic index HI and renal index RI) were assessed as the organ weight normalized upon body weight, age and sex.



**Table III.4.1.** Characteristics of sampling sites: distance to Metaleurop former smelter (median, km), median and minimum-maximum (min-max) soil total concentrations of Cd, Pb and Zn ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw) and percentage of land uses

Sampling sites	L	M	H
<i>Distance to Metaleurop</i>	3.0	1.4	0.6
<i>Soil contamination</i>			
<i>n</i>	6	7	7
Cd	4.3 (1.5-6.0)	9.7 (3.6-19.5)	59.3 (15.3-236.5)
Pb	262 (149-333)	526 (245-1260)	1357 (755-6809)
Zn	323 (114-407)	586 (303-1044)	1802 (1069-6035)
<i>Landscape composition</i>			
Urban	1.7	5.3	12.6
Industrial	0.0	0.0	21.6
Ploughed fields	39.0	24.8	0.0
Grassland	2.2	0.0	1.2
Woodland	40.7	53.0	16.0
Scrub/ shrubland	10.5	10.3	24.9
Copses, hedgerows	6.1	7.0	17.0
Rivers and ponds	0.0	0.0	7.0

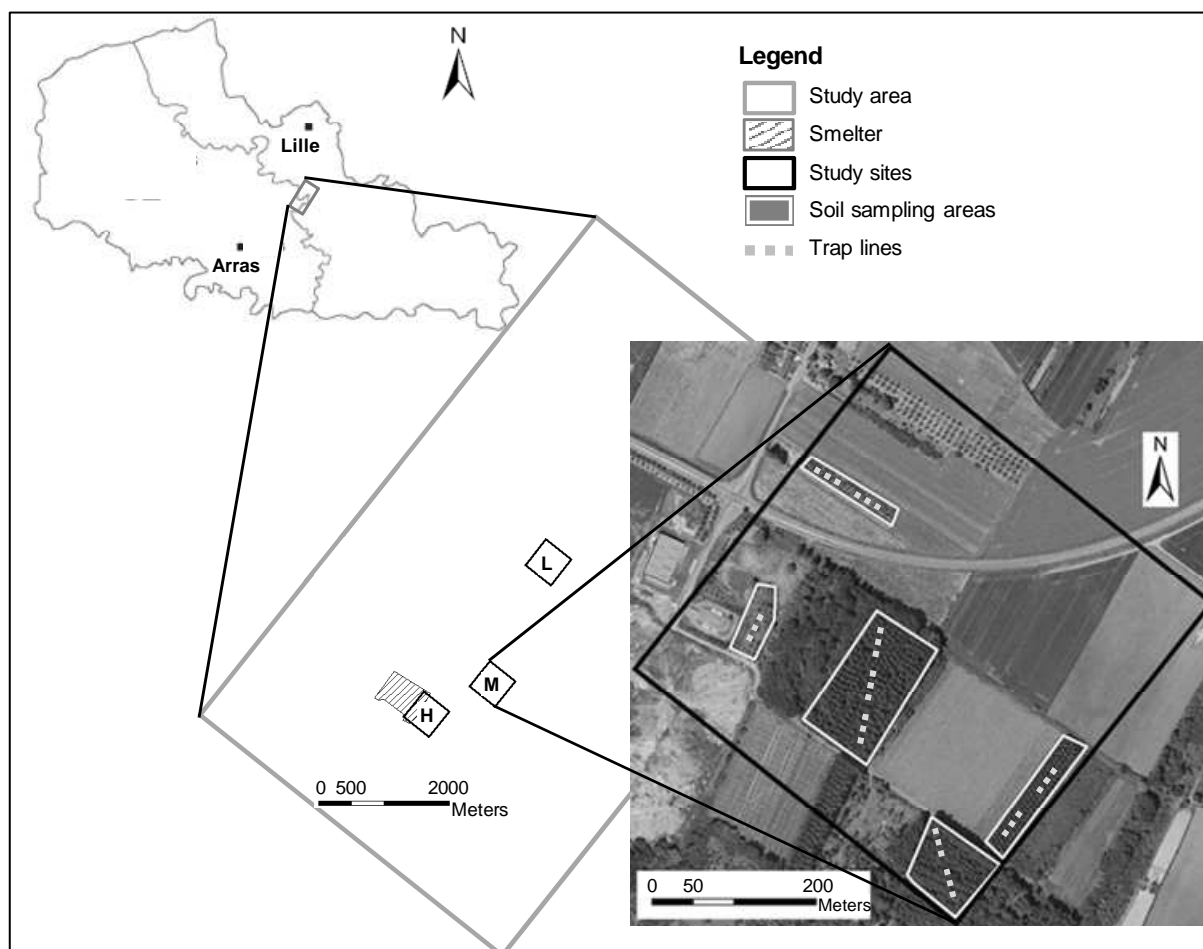


Figure III.4.1. Location of the study sites and sampling design for soils and small mammals.

Concentrations of MTEs were measured in liver and kidneys after acid digestion by furnace (Cd, Pb) and flame (Zn) atomic absorption spectrometry (AAS VARIAN 220Z and 220 FS, respectively). Digestion of samples was performed using dissolution in nitric acid (HNO<sub>3</sub>, 65%, Carlo-Erba analytical quality) in a dry oven (65°C) during 72h. After digestion, samples were diluted adding ultra-pure water (18.2 MΩ/cm<sup>2</sup>). Blanks (acid + ultra-pure water) and Certified Reference Materials (CRM, TORT-2 and DOLT-3, National Research Council, Canada) were prepared and analyzed using the same methods than the samples. Concentrations were expressed as μg.g<sup>-1</sup> dry weight (dw).

Statistical comparisons of sex ratio and age structure between sampling periods were conducted using  $\chi^2$  test. The analyses of the relationships between internal and soil concentrations, the relationships between internal Cd and Pb concentrations with body condition and somatic indices, and the influence of sampling period on these relationships were realized using general linear models (glm). The coefficient of determination ( $R^2$ ) was calculated on the basis of analysis of variance (ANOVA) and the significance of the variables was assessed by permutation test (Monte-Carlo, 1000 iterations). The distributions of metal concentrations being skewed, data were log-transformed using  $\log_{10}(x + 1)$ . As age and sex can influence internal MTE levels, the relationship between internal and soil MTE concentrations was investigated using internal MTE concentrations normalized upon age and sex (Fritsch et al., 2010). Measured renal Cd and Pb concentrations were compared with toxic thresholds reported in literature (Shore and Douben, 1994a; Shore and Douben, 1994b). Then, the proportion of individuals with concentration higher than the threshold value per sampling period was calculated, and differences between year or season were checked using  $\chi^2$  test. All statistical analyses were performed using R 2.7.1 software (R Development Core Team, 2006).

### III.4.3. Results

A total of 106 bank voles were caught ( $n = 46, 34$  and  $26$  individuals in 2006, 2007 and 2008, respectively). The sex ratio did not differ between the 3 samplings ( $\chi^2, p = 0.576$ ) while the age structure varied between autumn 2006 and springtime 2007 ( $\chi^2, 2006-2007: p = 0.019, 2006-2008: p = 0.696, 2007-2008: p = 0.154$ ), with a higher proportion of juveniles in autumn.

Hepatic MTE concentrations ranged from  $0.4$  to  $124.8 \mu\text{g.g}^{-1}$  dw for Cd, from  $0.02$  to  $199.91 \mu\text{g.g}^{-1}$  dw for Pb and from  $18.9$  to  $169.3 \mu\text{g.g}^{-1}$  dw for Zn (Table III.4.2). Renal MTE concentrations ranged from  $0.3$  to  $265.9 \mu\text{g.g}^{-1}$  dw for Cd, from  $0.1$  to  $1085.2 \mu\text{g.g}^{-1}$  dw for Pb and from  $7.4$  to  $154.5 \mu\text{g.g}^{-1}$  dw for Zn (Table III.4.2).

Inter-annual and inter-seasonal variations in MTE levels were found, however we failed to detect between and within years significant differences in accumulation pattern along the pollution gradient (slopes of the relationships). The levels of Cd and Zn varied between years rather than between seasons: renal and hepatic levels were higher in springtime 2008 than 2007 ( $p < 0.001$ , Figure III.4.2). Globally, the levels ranked in the order  $2008 > 2006 > 2007$  but these differences

were not systematically significant according to metal and organ of concern. Internal concentrations increased along the pollution gradient for Zn in liver in 2006 and for renal and hepatic Cd in 2007 only. The levels of Pb in both liver and kidneys showed inter-seasonal variations, with spring < autumn ( $p < 0.01$ ), and internal Pb sharply increased along soil pollution gradient regardless season or year ( $p < 0.001$ , Figure III.4.2). The differences in MTE levels between years or seasons are metal-dependent, and results are more contrasted for Cd and Zn than for Pb. Pb only exhibit inter-seasonal variations (autumn > spring), while Cd and Zn showed different pattern between organs and variations between years, but no straightforward seasonal influence.

**Table III.4.2.** Minimum (Min), median (Med) and maximum (Max) concentrations of Cd, Pb and Zn ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw) by organ and by sampling period (A 06: autumn 2006, S 07: spring 2007 and S 08: spring 2008).

Organ	Sampling	n	Cd			Pb			Zn		
			Min	Med	Max	Min	Med	Max	Min	Med	Max
Liver	A 06	46	0.61	16.35	113.98	0.12	2.02	199.91	18.94	97.38	169.27
	S 07	34	0.41	5.84	38.13	0.02	0.36	38.72	31.68	46.68	93.04
	S 08	26	1.56	32.52	124.77	0.07	0.66	14.39	75.42	106.66	143.22
Kidney	A 06	46	0.27	30.10	265.87	0.34	6.53	1085.19	7.42	88.84	144.09
	S 07	34	0.74	19.33	165.58	0.13	1.55	975.95	45.27	65.59	96.70
	S 08	26	11.47	53.90	191.30	0.31	1.68	473.38	71.61	111.29	154.51

Despite differences in accumulated MTE levels, the proportion of individuals exceeding toxic thresholds did not significantly differ between seasons or between years (Table III.4.3). The BCI decreased with hepatic Cd and with both hepatic and renal Pb ( $p < 0.05$ ) and RI increased with renal Cd ( $p = 0.028$ ). In these significant relationships, we failed to detect differences in slopes between samplings, suggesting that metal-induced stress was always related to similar responses in organs whatever was the season or the year. Further investigations still needed to interpret reliably the toxicological significance of body condition and somatic indices.

**Table III.4.3.** Percentage of captured animals by sampling period exhibiting renal concentrations higher than toxic thresholds for Cd and Pb.

Sampling	Cd	Pb
Autumn 2006	6.5	26.5
Spring 2007	4.3	17.6
Spring 2008	10.9	17.6

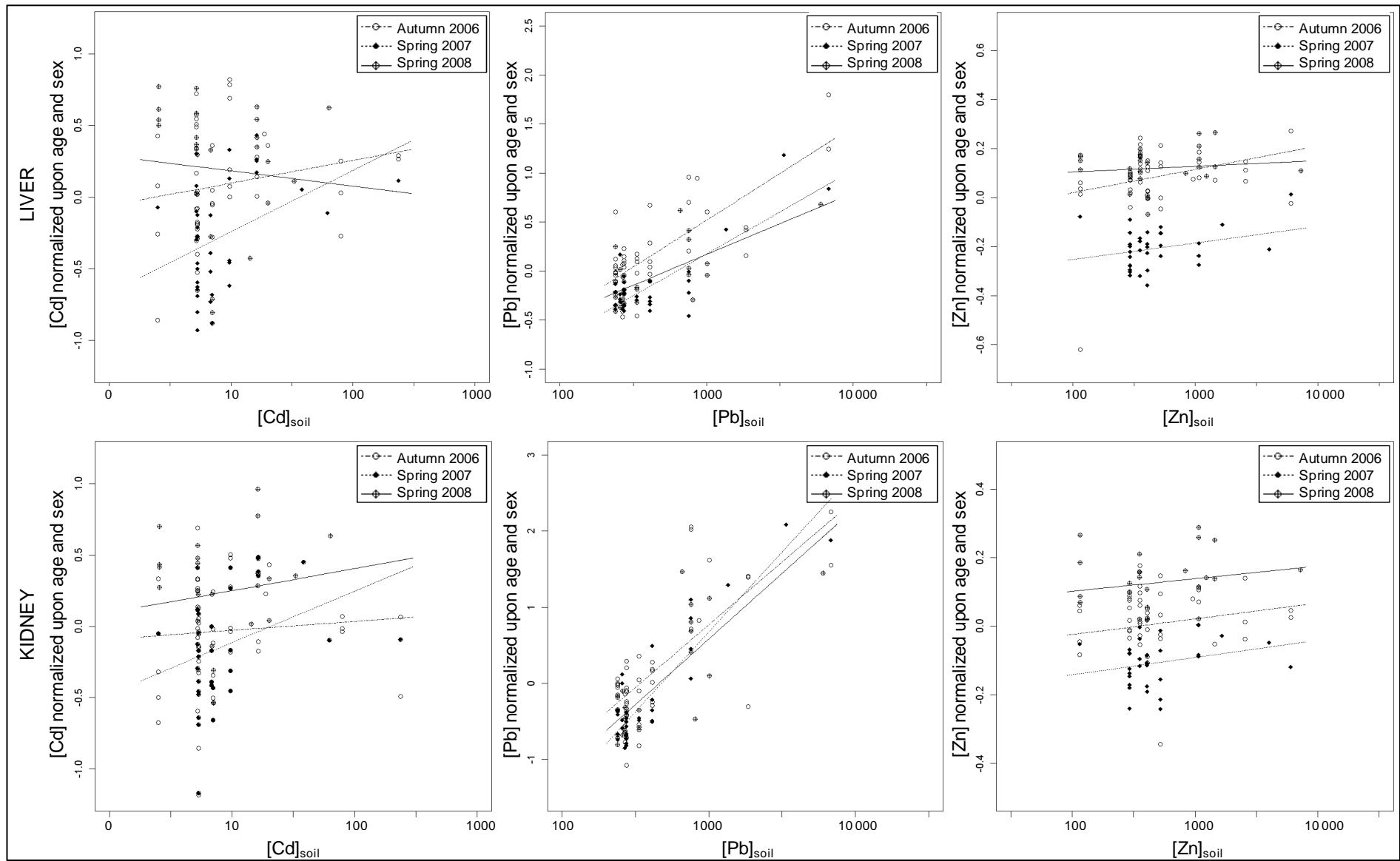


Figure III.4.2. Hepatic and renal concentrations of Cd, Pb and Zn normalized upon age and sex in relation to soil metal concentrations ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw).

### III.4.4. Discussion

The essential element Zn exhibited the lowest inter-individual, inter-annual and inter-seasonal variations, suggesting an efficient internal level regulation as it has been evidenced in small mammals under polluted environments (Shore and Rattner, 2001). The Cd exhibited a high inter-individual variability, even controlling for age and sex, and differences between sampling periods, contrarily to Pb. Such a different behaviour between Cd and Pb could be related to their environmental mobility (lower for Pb) (Alloway, 1995), their interactions with other elements in soils or organisms and to the metal-specific storage and excretion abilities of the bank voles (Shore and Rattner, 2001).

Our results did not exhibit a clear autumn *versus* springtime difference in Cd and Zn accumulation, suggesting that between year variations could be as important as within year for these metals. In other ecosystems, for both vertebrates and invertebrates, metal accumulation between years have also been observed, but the causes explaining such variations have not been elucidated (Gamberg et al., 2005; Vijver et al., 2007).

The differences between seasons in metallic or radioactive contaminants accumulated levels have been reported in several free-living animals chronically exposed in contaminated environments, but the influence of population age-structure on the inter-seasonal differences was not always considered. Regarding inter-seasonal differences in MTE levels in several vertebrates having a diversified diet (grass and seeds, mushrooms, invertebrates), a seasonal peak was generally revealed but the season of concern differed according to pollutants and animals (Włostowski, 1987; 1992; Rudge et al., 1993; Copplestone et al., 1999; Erry et al., 1999; Myklebust and Pedersen, 1999; Schroder et al., 2000; Pokorny and Ribarič-Lasnik, 2002; Hohmann and Huckschlag, 2005; Wijnhoven et al., 2007; Andráš et al., 2008). Regarding more specifically small mammals, an autumnal peak in contaminants internal levels has been revealed for As and <sup>137</sup>Cs (Rudge et al., 1993; Copplestone et al., 1999; Erry et al., 1999). Concerning Cd, Pb and Zn (studied here) or Mn, Fe and Se, results of the different studies were contradictory and seemed to be metal- and site-specific (dependence on pollution level, mixture of metals and geographical area), species-specific and organ-dependant (Włostowski, 1987; 1992; Schroder et al., 2000; Viegas Crespo et al., 2003; Wijnhoven et al., 2007; Andráš et al., 2008; Marques et al., 2008). However, considering the bank vole solely, Włostowski has evidenced inverse findings to ours, with absence of annual differences for Cd and Zn accumulation but seasonal differences with highest levels in spring and abrupt decline in autumn (Włostowski, 1987; 1992), while Wijnhoven et al. (2007) have shown highest Zn levels in spring and highest Cd levels toward winter. Włostowski and co-workers have evidenced recently that relative Cd intake ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  body weight $\cdot\text{week}^{-1}$ ) was higher in autumn, despite higher internal accumulated levels in spring (Włostowski et al., 2009). Nevertheless, most of the studies monitored internal levels considering inter-seasonal variations, more rarely inter-annual changes, which did not allow interpreting our results in the light of

observed patterns. As the liver MTE concentration has been suggested to reflect a more recent exposure than kidney concentrations, which integrate exposure throughout exposure duration (cumulative concentration), this could partly explain that the patterns of MTE concentrations between seasons varied between organs and differed between studies.

Inter-seasonal and inter-annual differences in MTE accumulated levels may be related to several factors related to exposure (diet, foraging behaviour...), and physiology (food intake, essential elements uptake and regulation, reproduction...in relation to biological cycles and environmental variations) of the organisms, which can also interact (Burger et al., 2003; Peakall and Burger, 2003; Smith et al., 2007). Moreover, temporal variations of MTE environmental availability are likely to occur (e.g. Römken et al., 2009). In some cases, temporal variations have been suggested to be related to variations in diet composition and/or contamination (Rudge et al., 1993; Pokorný and Ribarič-Lasnik, 2002; Hohmann and Huckschlag, 2005). However, Włostowski (1987) and Erry et al. (1999) showed inter-seasonal variations in As, Cd, Pb and Zn internal levels in the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*), the striped field mouse (*Apodemus agrarius*) and the bank vole, but did not detect inter-seasonal differences in diet contamination of polluted sites. In another hand, Włostowski et al. (2009) found that inter-seasonal differences in Cd internal levels are related to body iron status: the internal levels of essential Fe vary between seasons, depending on physiological requirements and environmental availability, and uptake of Cd is modulated by interactions with body Fe status.

All these discrepancies noticed in the literature and in the present study highlight the lack of knowledge on the factors that mainly govern temporal differences and on interactions between factors that may modulate their influence. Further researches are therefore needed to interpret temporal differences in internal levels. Such researches, based on long-term monitoring might allow identifying the main determinants of temporal variability in MTE accumulation and determining their relative weights and their interactions.

The differences in proportions of individuals exhibiting higher levels than toxic thresholds were not significant, and we failed in detecting temporal variations in the relationships between body condition and somatic indices and internal metals. This could be related to an insufficient sampling size, because we tested only 3 sampling periods with sample size of 46, 34 and 26 individuals, thus limiting potential of statistics to evidence significant differences (according to sample sizes and proportions observed here, the statistical power needed to detect a significant difference varied from 0.1 to 0.3). The influence of season and year on potential metal-induced adverse effects required to be studied more deeply, considering a larger number of individuals and more sampling periods through long term monitoring. Indeed, we probably did not reach a sufficient sample size as it could have been calculated for sample needed in biomonitoring studies using small mammals (Gonzalez et al., 2006). It would be better in such long term studies to use non-lethal sampling procedure, but such procedures have scarcely been developed until now when using small mammals in field ecotoxicological studies. Therefore, non-invasive measurable end-

points of metal-induced stress in individuals or populations have not been validated yet, and remain to be developed.

For contaminants having a cumulative accumulation (increasing internal levels with age), the inter-seasonal variations of population age-structure could have a great importance on the proportion of individuals within the population showing high internal concentrations. Such a phenomenon might have importance on population dynamics as the prevalence of metal-induced deleterious health effects could be increased for certain age-structure patterns over the year. Furthermore, this might be a subject of concern for predator exposure as the proportion of individuals showing elevated internal levels could be higher during certain periods, and therefore enhanced risk of secondary poisoning.

### III.4.5. Conclusions

Our results show organ- and metal-dependent inter-seasonal and inter-annual variations in levels of MTEs accumulated in free-living bank voles exposed along a metallic pollution gradient. In an ERA perspective, those results question the interpretation of a single measure of MTE concentrations over time and suggest that between and within year extrapolations of MTE accumulation may be specious. Our results highlight the need of temporal monitoring of MTE transfer in food webs, which could improve fundamental knowledge on factors affecting exposure, bioavailability, accumulation and effects. Moreover, such data would help in developing more ecologically relevant risk estimates.

**Acknowledgements** - The authors thank Cécile Grand from ADEME (*Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie*) and Francis Douay from Laboratoire Sols et Environnement (Institut Supérieur d'Agriculture, Lille). The authors also thank Simon-Pierre Babski, Nadia Crini, Alice labourier, Jonathan Paris and Dominique Rieffel for their technical help. The STARTT programme is financially supported by ANR (*Agence Nationale de la Recherche*, contract n°ANR-05-ECCO-004) and ADEME (contract n°0572C0058). CF is financially supported by a grant from ADEME and the Conseil Régional de Franche-Comté.

### III.4.6. References

- Alloway, B.J., 1995. Heavy metals in soils. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK.
- Andráš, P., Križáni, I., Šlesárová, A., 2008. The contamination of internal tissues of small mammals at the Banská Štiavnica mining area. *Ekologia Bratislava* 27, 1-10.
- Burger, J., Diaz-Barriga, F., Marafante, E., Pounds, J., Robson, M., 2003. Methodologies to examine the importance of host factors in bioavailability of metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 20-31.
- Copplestone, D., Johnson, M., Jones, S., Toal, M., Jackson, D., 1999. Radionuclide behaviour and transport in a coniferous woodland ecosystem : vegetation, invertebrates and wood mice, *Apodemus sylvaticus*. *The Science of the Total Environment* 239, 95-109.
- Erry, B.V., Macnair, M.R., Meharg, A., Shore, R., 1999. Seasonal Variation in Dietary and Body Organ Arsenic Concentrations in Wood Mice (*Apodemus sylvaticus*) and Bank Voles (*Clethrionomys glareolus*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 63, 567-574.
- Fairbrother, A., Wenstel, R., Sappington, K., Wood, W., 2007. Framework for Metals Risk Assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68, 145-227.
- Fritsch, C., Cosson, R.P., Coeurdassier, M., Raoul, F., Giraudoux, P., Crini, N., De Vaufleury, A., Scheifler, R., 2010. Responses of wild small mammals to a pollution gradient: host factors influence metal and metallothionein levels. *Environmental Pollution* 158, 827-840.
- Gamberg, M., Braune, B., Davey, E., Elkin, B., Hoekstra, P.F., Kennedy, D., Macdonald, C., Muir, D., Nirwal, A., Wayland, M., Zeeb, B., 2005. Spatial and temporal trends of contaminants in terrestrial biota from the Canadian Arctic. *Science of the Total Environment* 351-352, 148-164.
- Gonzalez, X.I., Aboal, J.R., Fernandez, J.A., Carballeira, A., 2006. Considerations on the sample size of wood mice used to biomonitor metals. *Science of the Total Environment* 366, 910-914.
- Green, A.J., 2001. Mass/length residuals: Measures of body condition or generators of spurious results? *Ecology* 82, 1473-1483.
- Hohmann, U., Huckschlag, D., 2005. Investigations on the radiocaesium contamination in wild boar (*Sus scrofa*) meat in Rhineland-Palatinate: a stomach content analysis. *European Journal of Wildlife Research* 51, 263-270.
- Linkov, I., Burmistrov, D., Cura, J., Bridges, T.S., 2002. Risk-based management of contaminated sediments: Consideration of spatial and temporal patterns in exposure modeling. *Environmental Science & Technology* 36, 238-246.
- Ma, W., 1989. Effect of soil pollution with metallic lead pellets on lead bioaccumulation and organ/body weight alterations in small mammals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 18, 617-622.
- Marques, C.C., Gabriel, S.I., Pinheiro, T., Viegas-Crespo, A.M., Mathias, M.d.L., Bebianno, M.J., 2008. Metallothionein levels in Algerian mice (*Mus spretus*) exposed to elemental pollution: An ecophysiological approach. *Chemosphere* 71, 1340-1347.
- Myklebust, I., Pedersen, H.C., 1999. Accumulation and distribution of cadmium in willow ptarmigan. *Ecotoxicology* 8, 457-465.
- Peakall, D., Burger, J., 2003. Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 110-121.
- Pokorny, B., Ribarič-Lasnik, C., 2002. Seasonal variability of mercury and heavy metals in roe deer (*Capreolus capreolus*) kidney. *Environmental Pollution* 117, 35-46.
- R Development Core Team, 2006. R: A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org>, Vienna, Austria.
- Römkens, P.F., Guo, H.Y., Chu, C.L., Liu, T.S., Chiang, C.F., Koopmans, G.F., 2009. Characterization of soil heavy metal pools in paddy fields in Taiwan: Chemical extraction and solid-solution partitioning. *Journal of Soils and Sediments* 9, 216-228.
- Rudge, S.A., Johnson, M.S., Leah, R.T., Jones, S.R., 1993. Biological transport of radiocaesium in a semi-natural grassland ecosystem: 2 - Small mammals. *Journal of Environmental Radioactivity* 19, 199-212.
- Schroder, J.L., Basta, N.T., Lochmiller, R.L., Rafferty, D.P., Payton, M., Kim, S., Qualls Jr, C.W., 2000. Soil contamination and bioaccumulation of inorganics on petrochemical sites. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 2066-2072.
- Schulte-Hostedde, A.I., Millar, J.S., Hickling, G.J., 2001. Evaluating body condition in small mammals. *Canadian Journal of Zoology* 79, 1021-1029.
- Schulte-Hostedde, A.I., Zinner, B., Millar, J.S., Hickling, G.J., 2005. Restitution of mass-size residuals: Validating body condition indices. *Ecology* 86, 155-163.
- Shore, R.F., Douben, P.E.T., 1994a. Predicting ecotoxicological impacts of environmental contaminants on terrestrial small mammals. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 134, 49-89.
- Shore, R.F., Douben, P.E.T., 1994b. The ecotoxicological significance of cadmium intake and residues in terrestrial small mammals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 29, 101-112.
- Shore, R.F., Rattner, B.A. (Eds.), 2001. *Ecotoxicology of Wild Mammals*. John Wiley & Sons, London, UK.



- Smith, P.N., Cobb, G.P., Godard-Codding, C., Hoff, D., McMurry, S.T., Rainwater, T.R., Reynolds, K.D., 2007. Contaminant exposure in terrestrial vertebrates. *Environmental Pollution* 150, 41-64.
- Viegas Crespo, A.M., Lopes, P.A., Pinheiro, M.T., Santos, M.C., Rodrigues, P.D., Nunes, A.C., Marques, C., Mathias, M.L., 2003. Hepatic elemental contents and antioxidant enzyme activities in Algerian mice (*Mus spretus*) inhabiting a mine area in central Portugal. *Science of the Total Environment* 311, 101-109.
- Vijver, M.G., Vink, J.P.M., Miermans, C.J.H., van Gestel, C.A.M., 2007. Metal accumulation in earthworms inhabiting floodplain soils. *Environmental Pollution* 148, 132-140.
- Wijnhoven, S., Leuven, R., van der Velde, G., Jungheim, G., Koelemij, E., de Vries, F., Eijsackers, H., Smits, A., 2007. Heavy-Metal Concentrations in Small Mammals from a Diffusely Polluted Floodplain: Importance of Species- and Location-Specific Characteristics. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52, 603-613.
- Włostowski, T., 1987. Heavy metals in the liver of *Clethrionomys glareolus* (Schreber, 1780) and *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771) from forests contaminated with coal-industry fumes. *Ekologia Polska* 35, 115-129.
- Włostowski, T., 1992. Seasonal changes in subcellular distribution of zinc, copper, cadmium and metallothionein in the liver of bank vole (*Clethrionomys glareolus*): A possible essential role of cadmium and metallothionein in the hepatic metabolism of copper. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 101, 155-162.
- Włostowski, T., Krasowska, A., Salinska, A., Włostowska, M., 2009. Seasonal changes of body iron status determine cadmium accumulation in wild bank voles. *Biological Trace Element Research*, 131, 291-297.

### III.5. CHAPITRE 5

#### VARIABILITE INTER-POPULATIONNELLE DES REPONSES A LA CONTAMINATION DE L'ENVIRONNEMENT : CAPACITES D'ADAPTATION DES ESCARGOTS

*Les populations d'escargots de Metaleurop montrent-elles des adaptations à la pollution métallique ?*

##### Résumé

Une étude de transplantation croisée a été menée pour explorer l'adaptation potentielle à la pollution métallique de populations d'escargot petit-gris (*Cantareus aspersus*, ex-*Helix aspersa*) et d'escargot des bois (*Cepaea nemoralis*). Des adultes ont été collectés aux environs d'une ancienne fonderie (origine « ME »), où les sols sont pollués par du Cd, du Pb et du Zn depuis des décennies, ainsi que dans un site non-pollué (origine « BE »), puis élevés en laboratoire jusqu'à reproduction. Des sub-adultes de la première génération (F1) ont été exposés en microcosmes dans le cadre d'une étude cinétique durant 28 jours. Nous avons choisi 4 sites avec une pollution du sol croissante (1 référence, 1 pollué et 2 fortement pollués) mais une végétation et des types de sols le plus semblable possible. Les concentrations internes en Cd, Pb et Zn et la condition corporelle des escargots ont été mesurées à différents temps de prélèvement. Les flux d'absorption et d'élimination ont été calculés par modélisation toxicocinétique. Les concentrations en ETMs atteignent des niveaux très élevés (moyenne les plus élevées par site : 286, 820, and 5264  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dans la végétation et 271, 187, 5527  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dans les tissus des escargots pour Cd, Pb et Zn, respectivement). Globalement, l'accumulation des ETMs augmente avec la pollution du sol. Les patrons des cinétiques d'accumulation sont similaires entre espèces mais *C. nemoralis* montre de plus forts niveaux en ETMs que *C. aspersus*. Bien que certaines différences entre origines existent pour l'accumulation des ETMs, les facteurs d'accumulation sol-animal et les cinétiques ne révèlent pas de réponses adaptatives. Nous ne détectons pas d'effets négatifs de l'exposition puisque la condition des escargots ne montre pas de variations entre sites d'exposition, et les résultats ne supportent pas l'hypothèse du « coût de la tolérance ». Si nous mettons en évidence des différences de poids corporel ou de croissance de coquille durant l'exposition, les données n'indiquent pas de différences de tolérance entre origines. Cependant, des signes d'adaptation apparaissent concernant le poids de la coquille : les escargots ME semblent capables de produire une coquille plus robuste que les BE sur les sites pollués. De plus un développement anormal de la coquille des adultes autochtones de *C. nemoralis* durant l'élevage en laboratoire suggère une acclimatation aux ETMs. Nous présumons que des interactions entre le métabolisme du Ca et l'accumulation du Cd et/ou du Pb pourraient être responsable de tels processus. Les individus produisant une coquille plus robuste, même dans des conditions de pollution, pourraient être plus compétitifs. Nos résultats suggèrent qu'acclimatation et adaptation existent dans les populations sauvages d'escargots vivant autour de la fonderie. Les impacts des ETMs au sein des

populations sauvages de sites pollués depuis des décennies induisent des variations subtiles dans les réponses des organismes qui ne peuvent pas être détectées par les mesures classiques utilisées en ERE (bioaccumulation par exemple). Des recherches supplémentaires sur l'implication des variations conchologiques dans la résistance des populations aux ETMs pourrait être une perspective prometteuse pour améliorer la compréhension de l'adaptation aux ETMs chez les mollusques gastéropodes terrestres.

**Mots-clés** : adaptation, résistance, invertébrés, bioaccumulation, mollusque gastéropode.

## Abstract

A cross-transplantation field experiment was performed to study the possible adaptation to metallic pollution of common garden snails *Cantareus aspersus* (ex-*Helix aspersa*) and grove (or brown-lipped) snail *Cepaea nemoralis* populations. Adults were collected in the surroundings of a former smelter (origin “ME”), polluted by Cd, Pb and Zn for decades, and on an unpolluted site (origin “BE”), and then reared in laboratory until reproduction. Subadults of first generation (F1) were exposed in microcosms in a kinetic study lasting for 28 days. Four sites with increasing soil pollution (1 reference, 1 polluted and 2 highly polluted sites) and with vegetation and soil type as similar as possible were chosen. Internal Cd, Pb and Zn concentrations were analysed and snail body condition assessed at different sampling times. Uptake and elimination fluxes were calculated using toxicokinetic modelling. Metal levels in plants and snail tissues reached extremely high values (highest averages by exposure site: 286, 820, and 5264 µg/g in vegetation and 271, 187, 5527 µg/g in snail soft tissues for Cd, Pb and Zn, respectively). Globally, MTE accumulation in snails increased with soil contamination. Accumulation kinetic patterns were similar between species but *C. nemoralis* showed greater MTE levels than *C. aspersus*. Although some inter-origin differences were revealed in MTE accumulation, considering biota-soil accumulation factor and accumulation kinetics, results did not reveal consistent differential adaptive responses. We did not detect negative effects of MTE exposure as snail body condition exhibited no variations between exposure sites, and results did not support the “cost of tolerance” hypothesis. Even if we evidenced some differences between ME and BE populations for body weight and shell size evolution over exposure duration, data did not indicate reliable differential tolerance. However, signs of adaptation were found concerning shell weight: ME snails seemed to be able to produce a more robust shell than BE snails in polluted sites. Moreover, abnormal shell development of autochthonous adults of *C. nemoralis* under laboratory rearing suggested physiological acclimatization to MTE exposure. We assume that interactions between Ca metabolism and Cd and/or Pb accumulation could be responsible for such processes. Individuals having a more robust shell, even under high MTE pollution, could be more competitive. Our study suggests that both acclimatization and adaptation occurred in snail free-living populations of the smelter surroundings. Impacts of ETMs within

populations free-living in sites polluted for decades induce subtle variations in organism responses which cannot be detected by classically used measures in ecological risk assessment (bioaccumulation for instance). Further researches on implication of conchological variations in population resistance to MTE may be promising perspectives to improve understanding of adaptation to MTEs in terrestrial gastropod molluscs.

**Keywords:** adaptation, resistance, invertebrate, bioaccumulation, gastropod mollusc.

**Publication relative :**

*Investigations of adaptation to metallic pollution in land snails (Cepaea nemoralis and Cantareus aspersus) from a smelter-impacted area*

C. Fritsch<sup>1</sup>, M. Cœurassier<sup>1</sup>, F. Gimbert<sup>1</sup>, N. Crini<sup>1</sup>, R. Scheifler<sup>1</sup>, A. de Vaufleury<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Chrono-Environment, UMR 6249 University of Franche-Comté/CNRS Usc INRA, Place Leclerc, F-25030 Besançon Cedex, France

En préparation pour Ecotoxicology.

Communication (poster) au congrès européen 2010 de la Society of Environmental Toxicology & Chemistry, Séville, Espagne (Topic: Metals in the environment: Speciation, bioavailability, effects and adaptation).

### III.5.1. Introduction

Environmental pollution by heavy metals is recognized as a subject of concern for organism and ecosystem health (Smith et al., 2006; Fairbrother et al., 2007). Metal trace elements (MTEs) are naturally present in the environment but soils can exhibit extremely high levels of these persistent pollutants due to anthropogenic activities, and such a contamination may lead to harmful effects for wildlife (Smith et al., 2006; Fairbrother et al., 2007). Presence of MTE pollution in the environment can be thought as an additional stressor applied to free-living organism and can therefore be responsible of micro-evolution processes by exerting a selective pressure (Bengtsson et al., 1992; Posthuma and Van Straalen, 1993; Kammenga and Laskowski, 2000; Morgan et al., 2007). Indeed, organisms are able to develop mechanisms to avoid negative effects of MTEs, namely avoidance behaviour, detoxification or sequestration under non-toxic forms, distribution through body reducing amounts in most sensitive tissues and excretion (Posthuma and Van Straalen, 1993). Such individual tolerance mechanisms to metal-induced stress can allow individuals to be more-competitive than non-tolerant ones under polluted environments, leading to selection of tolerant genotypes within population and ending in development of resistant adapted population. Therefore, organisms could be tolerant to metal exposure due to two main processes: acclimatization, adaptation, or both (Posthuma and Van Straalen, 1993; Morgan et al., 2007).

In the case of acclimatization, the expression of tolerance mechanisms is induced by exposure to pollutant, while in the case of adaptation the expression of tolerance traits is constitutive. Therefore, acclimatization and adaptation are conceptually truly different mechanisms, even if their consequences in responses to pollutants of free-living populations seemed similar. Actually, acclimatization traduces tolerance within populations: in this case stress is applied during individual's lifetime, responses are induced rather than fixed and due to phenotypic plasticity, and traits may be lost if stressor is removed. Adaptation characterizes resistance within population: stress responses evolve during multi-generational exposure to stressor, are genetically-constitutive and inherited in offspring, and population revert to the non-adapted state after stressor removal if the adaptation has fitness cost (Posthuma and Van Straalen, 1993; Morgan et al., 2007). Resistance may be the result of directional selection if genetic differences among individuals are significant, implying that a population has evolved a greater tolerance through natural selection, the more sensitive individuals of the original population being eliminated (Bengtsson et al., 1992; Posthuma and Van Straalen, 1993; Kammenga and Laskowski, 2000). If high metallic contamination in environment constitutes a strong environmental constraint for local populations and thus can lead to resistant-genotype selection, adaptation may be hampered by several opposing forces (gene flow, genetic drift, natural selection due to other ecological constraints, lack of genetic variation, and genetic architecture of underlying traits). Moreover, many species seem to fail to adapt to local contamination, as suggested by reduction of abundance or local disappearance of some species (Posthuma and Van Straalen, 1993; Kammenga and Laskowski,

2000).

When measuring responses to MTEs of individuals from different populations, it is extremely difficult to identify if observed individual tolerance result from adaptation or acclimatization processes (Posthuma and Van Straalen, 1993). To answer such an issue, two main types of studies are carried out: genetics (studying genetic structure of populations, gene expression, mutations, transcriptional regulation...), or comparison of offspring responses (metal accumulation, growth, life-history traits...) of populations originating from control and polluted sites (Tranvik et al., 1993; Belfiore and Anderson, 1998; Beeby et al., 2002; Jordaens et al., 2006b; Rozen, 2006; Roelofs et al., 2009). Adaptation to metal-polluted environments has been studied in numerous taxa including fungi, bacteria, plants, aquatic organisms, soil invertebrates, insects and arachnids (Posthuma and Van Straalen, 1993; Kammenga and Laskowski, 2000; Hendrickx et al., 2003; Rozen, 2006; Morgan et al., 2007). The occurrence of metal-tolerance evolution has been demonstrated in several cases, but numerous studies failed in detecting straightforward adaptation or distinguishing adaptation and acclimatization (Posthuma and Van Straalen, 1993; Kammenga and Laskowski, 2000; Morgan et al., 2007). Resistance is supposed to impose costs, notably energetic trade-offs, in adapted populations because maintaining tolerance mechanisms might be physiologically or energetically costly (Calow, 1991; Posthuma and Van Straalen, 1993; Shirley and Sibly, 1999; Kammenga and Laskowski, 2000; Lukasik and Laskowski, 2007). Such trade-offs can influence life-history traits of adapted populations and resulted in lower performance in uncontaminated environments than non-adapted populations. The comparison of life-history traits (growth, reproduction...) of offspring from potentially adapted and non-adapted populations under a safe environment can constitute a suitable protocol to evidence costs of resistance (Posthuma and Van Straalen, 1993; Shirley and Sibly, 1999; Lukasik and Laskowski, 2007).

Potential adaptation complicates the consideration of free-living populations under polluted environments for ecological risk assessment (ERA). Indeed, resistance to metal-induced stress can hamper the detection of pollutant individual or population effects in metal-resistant ecotypes (Kammenga and Laskowski, 2000; Spurgeon and Hopkin, 2000; Tannenbaum, 2005; Morgan et al., 2007). Land snails are known to be able to live under metallic pollution as shown by studies investigating their potential for bioindication in field studies on natural populations (Berger and Dallinger, 1993; Gomot-de Vaufleury and Pihan, 2000; Pihan and de Vaufleury, 2000). Survival of land snails in polluted sites may be due to a large variety of phenomenon; namely, physiological slight sensitivity to metal-induced stress, emigration-immigration processes from less polluted places, patchy soil metal spatial distribution which can allow weak exposure in localized spots, contaminated food avoidance, tolerance by acclimatization and/or resistance by adaptation. In respect to certain taxa such as plant or soil invertebrates, few studies have been devoted to the assessment of adaptation in natural land snail populations. However, these animals should be candidate for local adaptation because of weak spatial mobility (Cameron and Williamson, 1977; Baur and Baur, 1993; Kleewein, 1999) and slight gene flow over ranges larger than a kilometre

(Arnaud et al., 2001; Pfenninger, 2002; Schweiger et al., 2004). Moreover, they are known to accumulate great MTE amounts in their soft tissues under exposure to MTEs, which can allow sub-lethal exposure of free-living populations during several generations (Berger and Dallinger, 1993; Gomot and Pihan, 1997; Beeby and Richmond, 2001b). Most of studies concerning land snail adaptation to metallic pollution have been developed by Beeby and Richmond on garden snail populations exposed in Pb polluted sites. They evidenced some differences between populations from safe and Pb polluted sites. Notably, they showed variations in Pb accumulation in soft tissues, differences in Pb distribution between body and shell, and different patterns of interactions in the metabolism of Pb and Ca (Beeby and Richmond, 1988; Mulvey et al., 1996; Beeby and Richmond, 1998; 2001c; Beeby et al., 2002). In a study interesting in genetic variations in land snails *Cepaea nemoralis* and *Succinea putris* between unpolluted and metal-polluted sites, Jordaens et al. (2006) did not found significant evidence of adaptation to local pollution (Jordaens et al., 2006b). Such discrepancies between studied species and metals highlight the need to develop metal-adaptation studies in land snail populations, and investigate differential species responses to metallic pollution.

The garden snail, as several land snail species, has an important involvement in transfer of MTEs in food webs, because of its abilities to accumulate great amounts of metals in soft tissues and its position in trophic webs (detritivorous and herbivorous species, being dietary item of numerous invertebrate and vertebrate predators) (Beeby, 1985; Laskowski and Hopkin, 1996a). Among revealed adaptation mechanisms, the ability to store high levels of metals under a non-toxic form, by induction of metallothioneins and production of granules for instance, has been evidenced (Howard et al., 1981; Dallinger et al., 1999; Dallinger et al., 2000; Dallinger et al., 2004; Hispard et al., 2008b). As sequestration form by binding to proteins is supposed to be trophically available, an increase of bioavailable metal quantities could have a great implication for MTE transfer in food webs, and risk for secondary poisoning (Wallace and Lopez, 1996; Wallace et al., 1998; Scheifler et al., 2002; Wallace and Luoma, 2003; Vijver et al., 2004; Hispard et al., 2008a).

Within this context, the present study aimed at investigate adaptation to MTEs of land snail natural populations from a site polluted for decades comparing two species: the grove snail (also named brown-lipped snail) *Cepaea nemoralis* and the common garden snail *Cantareus aspersus* (formerly *Helix aspersa*). We exposed offspring reared in laboratory from control (unexposed) and metal-exposed populations in a cross-transplantation field experiment. Four sites exhibiting increasing soil metallic pollution but comparable soil properties and vegetation were chosen for field exposure. Measured responses were Cd, Pb and Zn body accumulation, and body condition (body weight, shell size, and shell weight).

By comparing body MTE concentrations between F1 of the two populations before and at the end of exposure, we tested whether exposed population exhibit adaptive response in metal accumulation. As adaptation could be related to changes in metal uptake and/or excretion, we compared assimilation and elimination rates (calculated by accumulation kinetic modelling)

between the 2 origins. We analyzed snail body condition under two hypotheses. (i) If body condition differed between exposure sites regardless the origin of the populations, this might reveal metal-induced stress. (ii) If body condition varied between origins within sites, depending on the way of difference, this might imply either a better tolerance to metallic pollution (in the case of a lower condition for control population than for metal-exposed population in polluted exposure sites) or that adaptation traded-off with body condition (in the case of a lower condition for metal-exposed population than control population in unpolluted exposure site).

### III.5.2. Materials and methods

#### III.5.2.a. Study site

This study was carried out in the surroundings of the former “Metaleurop-Nord” smelter in Northern France (Noyelles-Godault, Nord – Pas-de-Calais, 50°25'42 N 3°00'55 E). This area is considered as highly polluted with Cd, Pb and Zn for both levels of contamination and surfaces of concern (Sterckeman et al., 2002; Douay et al., 2008; Douay et al., 2009). Four sites were chosen on the basis of their soil contamination (in order to compare reference and polluted sites with increasing contamination) and vegetation cover (as similar as possible in vegetation composition). We retained a vegetation cover of grassland type, because this constituted a suitable habitat and food for the studied snail species. The reference site was located 10 km northeaster far away from the smelter, in a private garden (Tourmignies) and will be called hereafter “R”. The three contaminated sites were situated close to the former smelter (Courcelles-Les-Lens), two of them were located in the interchanges of a highway (named “P2” and “P3”) and the last one in a private garden (named “P1”). The soil characteristics and metallic contaminations are presented in Table III.5.1. The R and P sites had grassland vegetation with mainly Poaceae (*Arrhenatherum elatius*, *Dactylis glomerata*, *Lolium perenne* and *Poa trivialis*) and stringing nettles (*Urtica dioica*). Some other common species were also present but in a lesser extent, such as *Glechoma hederacea*, *Lamium album*, *Ranunculus repens* and *Stellaria* sp. Due to their extremely high soil metal contamination, P3 and P2 sites exhibited more particular vegetation composition, even if vegetation structure was also of a grassland type. The major represented species was *Arabidopsis halleri*. The rest of the vegetation cover was principally occupied by Poaceae (*Arrhenatherum elatius* and *Phalaris arundinacea*).

#### III.5.2.b. Animals

Two species of land snails were considered in the present work, the common garden snail *Cantareus aspersus* (*ex-Helix aspersa*) and the grove (or brown-lipped) snail *Cepaea nemoralis*. We collected adults (individuals presenting a clear ‘lip’ at the mouth of their shell) of the two species in the surroundings of the former Metaleurop Nord smelter (Evin-Malmaison and Noyelles-Godault) and of Besançon (Doubs) over springtime of 2007. Adult snails were reared until reproduction in our laboratory rearing (temperature: 20 ± 2 °C, photoperiod: 18h L/6h D, relative



humidity: 80-90%) (Gomot-de Vaufleury, 2000; ISO, 2006). Then, young individuals of this first generation (F1) were reared until exposure *in situ*. Animals were fed with uncontaminated meal snail food (Helixal®, Chays frères, Valdahon, France, containing  $0.29 \pm 0.01 \mu\text{g.g}^{-1}$  dry weight (dw) of Cd,  $0.19 \pm 0.10 \mu\text{g.g}^{-1}$  dw of Pb and  $98.99 \pm 12.82 \mu\text{g.g}^{-1}$  dw of Zn,  $n = 5$ ). Garden snails were calibrated to 6 g ( $5.986 \pm 0.326$  g) and grove snails to 2 g ( $1.873 \pm 0.174$  g), when exponential growth was ended and levelling began. Individuals of F1 whose parents came from Metaleurop site will be called hereafter “ME” and those from Besançon “BE”. The rearing of grove snails under laboratory conditions turned out difficult, compared to garden snail, and number of individuals weighting 2 g at the beginning of the field exposure was lower than expected, permitting a lower number of replicates as detailed hereafter.

### III.5.2.c. Exposure design

Snails were exposed in stainless-steel cylindrical microcosms (diameter and height: 0.25 m). This exposure design was recently used in both laboratory and field studies investigating the transfer of pollutants in soil-plant-snail food webs and constitutes a suitable design for snails under relatively long exposure durations (Scheifler et al., 2003; Fritsch et al., 2008; Gimbert et al., 2008b). The microcosms were putted up the soil with its natural vegetation and a stainless steel netting (mesh 10 mm-sized) was securely fitted over the top of the microcosm, avoiding escape of the snails and predation. Therefore, snails could feed on soil, litter and growing vegetation and could be exposed via dermal and digestive routes (Coeurdassier et al., 2002; Scheifler et al., 2006; Fritsch et al., 2008; Gimbert et al., 2008b).

The number of F1 snails which have reached the expected weight (calibre of 2 or 6 g for *Cepaea* and *Cantareus*, respectively) was insufficient to carry out the experiment using three replicates per species by site and by origin with sampling at all chosen durations. The number of used microcosms per site is reported in Table III.5.1. In each microcosm, 15 individuals were introduced. Among them, two individuals were randomly sampled after 0, 3, 7, and 14 days of exposure and all the remaining individuals were sampled after 28 days. Concerning the grove snail exposed at the R site only, the protocol was modified because we had a sufficient number of animals for only one microcosm, we therefore increased the number of sampled animals but reduced the number of sampling dates: four animals were sampled after 0, 3 and 14 days and the remaining individuals after 28 days. The animals were exposed during May 2008.

Following sampling, animals were starved for 72h. Then, they were weighted (total snail fresh weight, nearest 0.01 g) and shell size was measured (shell diameter, nearest 0.01 mm) and killed by freezing. Finally, snails were dissected, separating soft tissues from the shell. Bodies and shells were then dried to constant weight in a drying oven (70°C). The measurement of shell weight for body condition assessment was based on shell dry weight.

Vegetation samplings were performed at snail introduction, 14 days, and at the end of exposure. The most represented species were chosen (*Urtica dioica* at P1 and R sites,

*Arabidopsis halleri* at P2 and P3 sites), aerial parts of several plants were randomly collected within each site, constituting a composite sample at each time of sampling. Samples were dried at room temperature, ground to a powder, and dried again to constant weight in a drying oven (70°C).

**Table III.5.1.** Soil contamination and properties in microcosms of the 4 exposure sites (reference “R”, polluted “P”, highly polluted “P2” and “P3”). Soil metal concentrations (total and CaCl<sub>2</sub>-extractable) are given in  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw, soil granulometry (clay, silt, sand and organic carbon OC) in  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  dw, cation exchange capacity (CEC) in  $\text{cmol}\cdot\text{kg}^{-1}$  dw, CaCO<sub>3</sub> concentration in  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  dw, Ca<sup>2+</sup> in  $\text{cmol}\cdot\text{kg}^{-1}$  dw and Ca total concentration in  $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  dw.

Site	R	P1	P2	P3
<b>Soil contamination</b>				
Cd	1.4 ± 0.2	21.3 ± 3.8	77.7 ± 10.2	268.2 ± 63.4
Pb	115.8 ± 23.4	1201.6 ± 257.1	2816.7 ± 366.8	7821.7 ± 2860.4
Zn	152.0 ± 15.1	1497.3 ± 416.1	4630.0 ± 631.7	7611.7 ± 1843.8
CaCl <sub>2</sub> -Cd	0.17 ± 0.05	0.59 ± 0.10	2.80 ± 0.77	14.27 ± 6.51
CaCl <sub>2</sub> -Pb	0.06 ± 0.03	0.30 ± 0.04	0.38 ± 0.04	1.67 ± 0.82
CaCl <sub>2</sub> -Zn	3.83 ± 1.28	8.35 ± 3.85	21.63 ± 7.47	35.92 ± 16.01
<b>Soil properties</b>				
Clay <sup>a</sup>	281.4 ± 17.4	197.1 ± 2.7	208.0 ± 12.9	224.2 ± 19.2
Silt <sup>a</sup>	425.7 ± 21.1	585.9 ± 25.3	511.0 ± 16.1	461.2 ± 22.1
Sand <sup>a</sup>	292.9 ± 32.5	217.0 ± 30.9	281.0 ± 19.9	314.7 ± 29.8
OC <sup>b</sup>	43.9 ± 9.4	45.7 ± 7.6	39.9 ± 2.3	53.8 ± 4.3
pH <sup>c</sup>	5.81 ± 0.22	7.47 ± 0.08	7.89 ± 0.03	7.76 ± 0.14
CEC <sup>d</sup>	18.1 ± 1.1	14.2 ± 1.0	12.4 ± 0.3	13.1 ± 0.3
CaCO <sub>3</sub> <sup>e</sup>	UDL	45.4 ± 3.6	85.3 ± 8.5	86.7 ± 8.0
Ca <sup>2+</sup> <sup>f</sup>	17.2 ± 1.4	18.8 ± 0.9	17.9 ± 0.3	15.9 ± 1.2
Ca	0.5 ± 0.1	2.4 ± 0.1	4.1 ± 0.3	4.1 ± 0.4
<b>Number of microcosms</b>				
<i>Cepaea nemoralis</i>				
BE	0	3	0	0
ME	1	3	0	0
<i>Cantareus aspersus</i>				
BE	3	3	3	3
ME	3	3	1	3

<sup>a</sup> (AFNOR, 2003), <sup>b</sup> (ISO, 1995b), <sup>c</sup> (ISO, 1994), <sup>d</sup> (AFNOR, 1999), <sup>e</sup> (ISO, 1995a); UDL: Under Detection Limit, DL= 1  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  dw, <sup>f</sup> (AFNOR, 1999).

### III.5.2.d. Chemical analyses

Soil samples were dried at room temperature, disaggregated and homogenized before being sieved to 2 mm. Measurements of Cd, Pb and Zn concentrations were performed by the Laboratoire d'Analyse des Sols of the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) of Arras (France), which benefits from the COFRAC (French accreditation committee) accreditation

n°1-1380 for its analytical quality for soil characteristics and MTE concentration measurements. The soils were then disaggregated and homogenized before being sieved to 2mm (soil characteristics analysis) and 250  $\mu\text{m}$  (soil metal concentration analysis).

For total MTE and Ca concentration analyses, digestion of soil samples was realized by ashing at 450°C and dissolution in acid mixture (hydrofluoric and perchloric acids) according to NF X31-147 (AFNOR, 1996). In order to assess environmental availability of metals in soil, a selective extraction using calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ) was performed. Indeed, this chemical extractant is considered as relevant for the assessment of the bioavailable fraction of Cd, Pb and Zn in soils to some plants and soil invertebrates (Peijnenburg and Jager, 2003; Harmsen, 2007; Meers et al., 2007; ISO, 2008). For this, soil samples were shaken during 2 h (constant temperature: 20°C) with 25 ml of a  $\text{CaCl}_2$  0.01 M solution, the soil/extractant ratio being 1/10 (w/v). A centrifugation (3000 rpm, 10 min, 20°C) was then performed to separate extract from solid residues, and the solution was filtered (Millipore membrane, porosity of 0.22  $\mu\text{m}$ ). The filtrates were mineralized by acid digestion (suprapur  $\text{HNO}_3$ , v/v = 1%). Total concentrations of Cd and Pb, and  $\text{CaCl}_2$ -extractable concentrations of all MTEs were measured by inductively-coupled argon plasma mass spectrophotometry (ICP-MS). Concentrations of total Zn and Ca were measured by inductively-coupled argon plasma atomic emission spectrophotometry (ICP-AES). Calibration and protocol application were provided. Certified samples were used for quality control as well as samples from inter-laboratory comparisons, internal control samples and duplicates of the analysis.

Metal concentrations were measured in soft tissues (whole body except the shell) of the snails and vegetation by furnace or flame atomic absorption spectrometry (AAS, VARIAN 240Z and 240FS, respectively) and expressed as micrograms per grams dry weight ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw). More precisely, for Cd and Pb measurements, snail samples from sites R and P1, vegetation and meal snail food were analyzed using furnace AAS while samples from sites P3 and P2 (except T0 sample) were analyzed by flame AAS. Concerning Zn, all samples were analyzed by flame AAS. The digestion of snail soft tissues was performed using dissolution in nitric acid ( $\text{HNO}_3$ , 65%, Carlo-Erba analytical quality) in a dry oven (65°C) during 72h. The digestion of vegetation was performed using dissolution in a solution of nitric acid and hydrogen peroxide ( $\text{HNO}_3$  65%,  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%, Carlo-Erba analytical quality). After digestion, samples were diluted adding ultra-pure water (18.2  $\text{M}\Omega/\text{cm}^2$ ). Blanks (acid + ultra-pure water or acid + peroxide + ultra-pure water) and Certified Reference Materials (CRM, for animal tissues: TORT-2 and DOLT-3, National Research Council, Canada, for vegetation: ICHTJ-cta-VTL-2, Institute of Nuclear Chemistry and Technology, Poland) were prepared and analyzed using the same methods than the samples. Average recoveries of the CRM TORT-2 and DOLT-3 were calculated at 91%  $\pm$  9% ( $n = 12$ ) for Cd, 96%  $\pm$  12% ( $n = 12$ ) for Pb and 91%  $\pm$  6% ( $n = 14$ ) for Zn. Average recoveries of the CRM ICHTJ-cta-VTL-2 were calculated at 90%  $\pm$  4% ( $n = 9$ ) for Cd, 135%  $\pm$  7% ( $n = 9$ ) for Pb and 95%  $\pm$  7% ( $n = 9$ ) for Zn. The

detection limits (DLs) in snails *Cantareus* from sites R and P were 0.01 and 0.03  $\mu\text{g.g}^{-1}$  for Cd and Pb, respectively, and were 0.16 and 0.79  $\mu\text{g.g}^{-1}$  for Cd and Pb, respectively, in *Cantareus* from sites P3 and P2. DLs for Zn in all samples of snails *Cantareus* were of 0.23  $\mu\text{g.g}^{-1}$ . DLs in snails *Cepaea* were 0.02, 0.06 and 0.54  $\mu\text{g.g}^{-1}$  for Cd, Pb and Zn, respectively. DLs in meal snail food were 0.01, 0.01 and 0.09  $\mu\text{g.g}^{-1}$  for Cd, Pb and Zn, respectively. DLs in vegetation samples were 0.02, 0.03 and 1.6  $\mu\text{g.g}^{-1}$  for Cd, Pb and Zn.

### III.5.2.e. Statistical analyses

#### MTE concentrations and body condition

Firstly, we analyzed whether MTE snail concentrations before exposure varied between origins and species. We performed general linear models using MTE snail concentration as dependant variable and species and origin as explanatory variables. Secondly, we tested whether MTE snail concentrations at the end of the exposure (28 days) varied between sites, species, and origins. General linear mixed effect models (lme) were developed, allowing taking into account for pseudo-replication (nested random effect), using MTE snail concentration as dependant variable, site, species and origin as fixed variables and microcosm as random variable (Pinheiro and Bates, 2000; Crawley, 2007). To assess the evolution of body condition parameters over exposure, lme technique was applied, using body condition parameters (snail weight, shell size, shell weight) as dependant variables, placing time firstly in the model, and then adding site and origin in interaction with time as fixed variables and microcosm as random variable. The significance of the variables in the model was assessed by permutation test (Monte-Carlo, 1000 permutations). Pairwise comparisons between sites were realized by Tukey's "honest significant difference" test.

Correlation between  $\text{CaCl}_2$ -extracted and total concentrations was analyzed using Pearson's product moment correlation test. Soil concentration distributions being skewed, we transformed data using decimal logarithm, in order to obtain normal distribution and linear relationships.

#### Kinetic modelling and Biota-Soil Accumulation Factor

Even placing randomly microcosms within each site, both total and  $\text{CaCl}_2$ -extracted MTE concentrations in soil differed between origins for P2 and P3 sites. Therefore, to compare reliably differences between origins for metal accumulation, it was necessary to limit potential bias induced by variations in exposure MTE concentrations, i.e. considering MTE concentrations in soils. We decided thus to take into account  $\text{CaCl}_2$ -extracted concentrations in soils, rather than total MTEs to minimized the potential influence of soil properties on availability and thus on exposure concentrations, by 2 ways. Firstly, when studying accumulation kinetics, we modelled uptake rate constant  $k_1$  and used measured  $\text{CaCl}_2$ -extracted MTE concentration in soils of microcosms as  $C_e$ , the hypothesized bioavailable metal concentration in media (see Eq. 1) (Gimbert et al., 2006).

Secondly, we calculated Biota-Soil Accumulation Factor (BSAF) using  $\text{CaCl}_2$  extracts, which constituted a way to normalize upon soil contamination when comparing values.

The accumulation kinetics of MTE in snails were modelled for each species, origin and site using one-compartment model (Gimbert et al., 2006) following the equation:

$$C_{sn}(t) = C_{sn}(0) + \frac{k_1 \cdot C_e}{k_2} (1 - e^{-k_2 t}) \quad (\text{Eq. 1})$$

where  $t$  is the exposure time (d),  $C_{sn}$  the metal concentration in the snails ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{sn}}^{-1}$ ),  $C_e$  the hypothesized bioavailable concentration estimated through  $\text{CaCl}_2$  extracts from soil in each microcosm ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}_s^{-1}$ ),  $k_1$  the uptake rate constant ( $\text{g}_s\cdot\text{g}_{\text{sn}}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) and  $k_2$  the elimination rate constant ( $\text{d}^{-1}$ ).  $C_{sn}(0)$  is the constitutive MTE concentration measured in snails at the beginning of the experiment. Previous modelling attempts considering this pool as available for elimination demonstrated this pool to be of constant magnitude over the experiment duration.

The accumulation and elimination parameters were estimated by fitting the model with a non-linear mixed-effects procedure (Lindstrom and Bates, 1990; Ritz and Streibig, 2008) allowing for nested random effects. The within-group errors are allowed to be correlated and/or have unequal variances. The nlme integrates the species-origin-site combinations as fixed factors and the microcosms as random effect. Differences in kinetic parameter estimates between snail species, origin and site were judged from the overlap of 95% confidence intervals.

We calculated BSAF on the basis of measured and modelled accumulation: dividing snail metal concentrations at the end of exposure by  $\text{CaCl}_2$ -extracted metal concentrations in soils for measured accumulation, and dividing uptake rate constant by elimination rate constant for modelled accumulation.

All statistical analyses were performed using the software R 2.7.1 (R Development Core Team, 2006) with the additional packages: nlme, multcomp, and pgirmess.

### III.5.3. Results

At the beginning of the rearing of wild adult under laboratory conditions, some *Cepaea* snails coming from Metaleurop surroundings showed shell development abnormalities (9% of collected individuals, increasing number of individuals with the sampling location proximity to the smelter). The shell sharply increased (several mm per week) with an abnormal texture, being uncoloured, extremely thin and fragile (Figure III.5.1). Such a shell abnormal development stopped a few weeks after the start of laboratory breeding, and was observed exclusively in adult *Cepaea* snails originating from Metaleurop, neither on adult *Cepaea nemoralis* from Besançon nor on adult *Cantareus aspersus*.



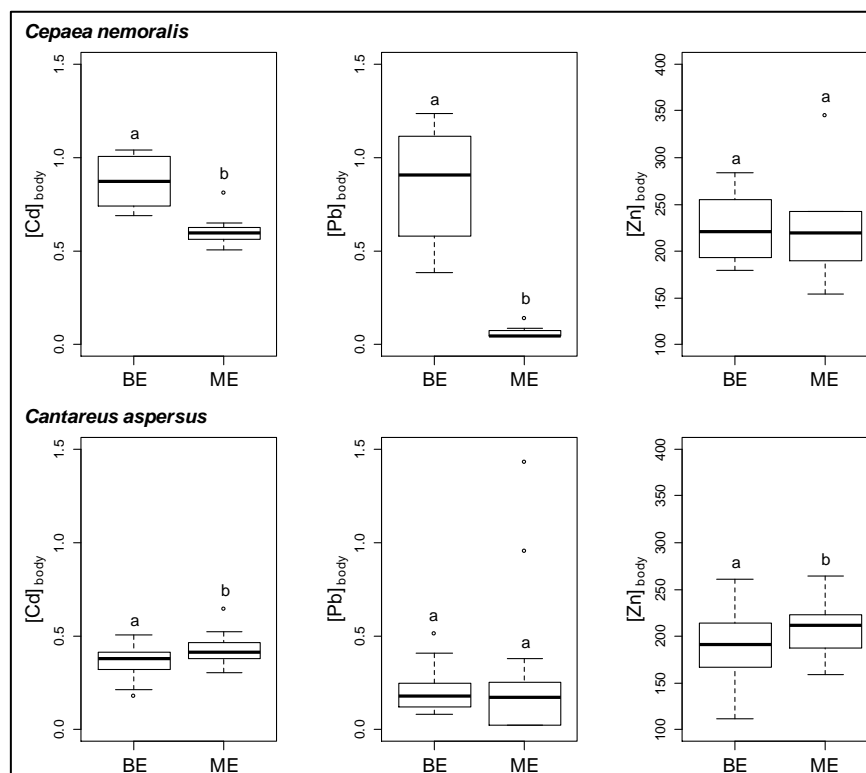
**Figure III.5.1.** Photography of shell development abnormality in several wild adults *Cepaea nemoralis* collected in *Metaleurop* surroundings. Shell abnormal development was observed during few months after the beginning of breeding under laboratory conditions.

Total and  $\text{CaCl}_2$ -extracted metal concentrations in soils of microcosms were highly correlated, extracted concentrations sharply increasing with total concentrations ( $p < 0.001$ , Pearson's  $r$  correlation coefficient: 0.97 for Cd, 0.97 for Pb and 0.90 for Zn). Proportions of extractable concentrations ranked from 2.55% to 18.10% for Cd, 0.01% to 0.09 % for Pb and 0.36% to 3.78% for Zn. Proportions of extractable Cd are, in average, 12.21%, 2.77%, 3.57% and 5.13% in R, P1, P2 and P3 sites, respectively. For Pb, they are 0.05%, 0.03%, 0.01% and 0.02% in R, P1, P2 and P3 sites, respectively. For Zn, they are 2.53%, 0.53%, 0.46% and 0.47% in R, P1, P2 and P3 sites, respectively.

Levels of Cd, Pb and Zn in plants increased with soil pollution and fluctuated over exposure time (Table III.5.2). However, if concentrations in *U. dioica* were always higher for P1 than for R site, concentrations in *A. halleri* were not systematically higher for P3 than P2 site. Indeed, considering means, accumulated concentrations in plants increased with soil pollution but considering values individually for each sampling time, concentrations in plants from P2 sometimes exhibited higher values than in plants from P3. The pattern of MTE concentration evolution over time seemed to be species- and site-specific. In certain cases, concentrations drastically diminished (for instance *A. halleri* for P2) or increased (for instance Cd in *A. halleri* at P3) between the beginning and the end of the experiment. In other cases, they remained stable (for instance Zn in *U. dioica* at R), or finally increased between 0 and 14 days and then decreased between 14 and 28 days (for instance Pb in *A. halleri* at P3 and *U. dioica* at R and P1). Nevertheless, as only one composite sample has been taken by site and by time, the statistical significance of such variations was not checked.

**Table III.5.2.** Concentrations of Cd, Pb, and Zn ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw) at times 0, 14 and 28 days of exposure and mean values in vegetation samples (*Urtica dioica* and *Arabidopsis halleri*) of the 4 exposure sites (reference “R”, polluted “P”, highly polluted “P2” and “P3”).

Site	Species	Metal	Cd				Pb				Zn			
			Time	0	14	28	Mean	0	14	28	Mean	0	14	28
R	<i>U. dioica</i>		0.07	0.11	0.06	0.08	1.51	6.02	1.80	3.11	48.51	44.67	55.71	49.63
P1	<i>U. dioica</i>		0.33	0.90	0.31	0.51	7.48	36.48	13.21	19.06	96.72	142.33	96.73	111.93
P2	<i>A. halleri</i>		186.63	116.35	123.34	142.11	429.59	288.43	202.36	306.80	6723.92	3277.99	3631.52	4544.48
P3	<i>A. halleri</i>		96.33	352.74	410.49	286.52	318.71	1963.46	176.91	819.69	4322.77	6673.69	4796.87	5264.44



**Figure III.5.2.** Concentrations of Cd, Pb and Zn in F1 snail soft tissues ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dw) before exposure for control origin (“BE”) and metal-exposed origin (“ME”). Letters symbolizes significant differences between origins within a given species: values that share similar origin letters are not significantly different ( $p > 0.05$ ).

### III.5.3.a. MTE accumulation in snails

Concentrations of Cd and Zn in snails before exposure were higher in *C. nemoralis* than in *C. aspersus* but did not significantly differ for Pb, regardless the origin of the populations ( $p < 0.001$  for Cd,  $p = 0.065$  for Pb and  $p = 0.031$  for Zn, Figure III.5.2). Before exposure (Figure III.5.2), both Cd and Pb concentrations in *C. nemoralis* differed between origins, being higher in BE than in ME snails ( $p = 0.002$  for Cd,  $p < 0.001$  for Pb and  $p = 0.998$  for Zn). For *C. aspersus* MTE concentrations before exposure also differed between origins, but conversely to *C. nemoralis*, Cd and Zn concentrations were higher for ME than for BE snails, while Pb levels did not differ between origins ( $p = 0.024$  for Cd,  $p = 0.855$  for Pb and  $p = 0.048$  for Zn).

At the end of exposure, for both R and P1 sites, *Cepaea* snails exhibited higher MTE concentrations than *Cantareus* snail, whatever the origin of the populations ( $p < 0.03$  for all metals, Tables III.5.3, III.5.4 and III.5.5). The BSAF of Cd and Pb differed between species only for ME origin, being higher in *Cepaea* for both R and P1 sites. The BSAF of Zn did not differ between species exposed at R site. However, in P1 site, it was higher in *Cantareus* than *Cepaea* for BE snails whereas lower in *Cantareus* than *Cepaea* for ME snails. Kinetic parameters for Cd did not evidenced differences between species whereas those of Pb and Zn sometimes varied between species, showing higher Pb and Zn uptake rate constants ( $k_1$ ) for *Cepaea* than for *Cantareus* for ME snails exposed at R site, and Pb elimination rate constant ( $k_2$ ) was lower for *Cepaea* than for *Cantareus* for ME snails exposed at P1 site.

Concentrations of Cd and Pb in *Cepaea* were higher for P1 than for R sites ( $p = 0.03$  and  $0.009$  for Cd and Pb, respectively) while Zn levels did not differ among sites ( $p = 0.415$ ) (Tables III.5.3, III.5.4 and III.5.5). The BSAF was higher for R than P1 site concerning Cd and Pb but did not differ concerning Zn (Cd and Pb:  $p < 0.001$ , Zn:  $p = 0.817$ ). No differences in kinetic parameters for this species were detected between sites for Cd and Pb, while for Zn,  $k_1$  was higher for R than for P1 site.

Accumulation parameters (i.e. MTE concentrations at the end of exposure, BSAF and uptake rate constant) generally increased with soil pollution but decrease for the highest contamination level, and showed metal- and origin-dependent pairwise differences between sites (Tables III.5.3, III.5.4 and III.5.5). The general trend of accumulated concentrations at the end of exposure ranking was  $R \sim P1 < P2 \sim P3$ , and globally, BSAF ranked in the order  $R \sim P1 < P3 < P2$ . This is reflected by kinetic parameters as uptake rate constant  $k_1$  varied with soil pollution level, with the following general trend  $R < P1 < P3 < P2$ . The elimination rate constant  $k_2$  exhibited less differences than  $k_1$ , as Cd  $k_2$  did not show significant variations among sites, Pb  $k_2$  varied between sites for ME snails only and Zn  $k_2$  differed between sites P and P3 for ME snails only.

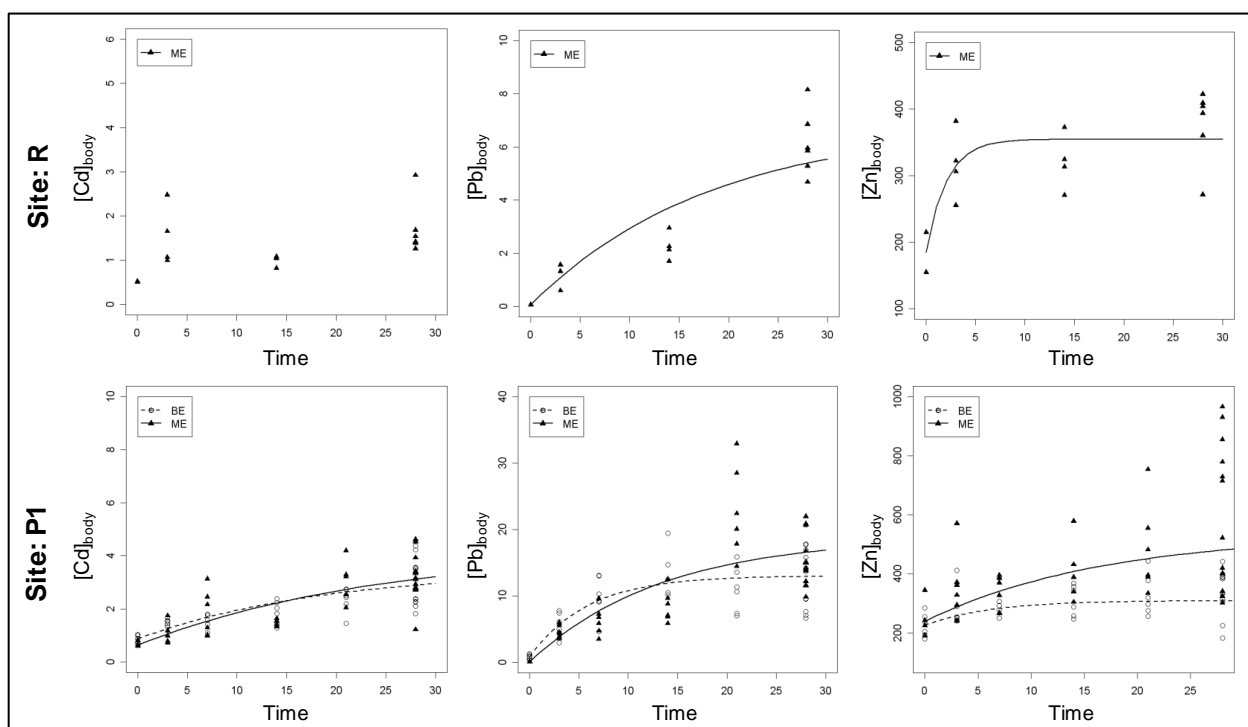
Regarding inter-origin differences in MTE accumulation for *Cepaea nemoralis* after field exposure, BSAF was significantly higher for ME than BE snails for Cd (Cd:  $p = 0.018$ , Pb:  $p = 0.072$ , Zn:  $p = 0.078$ ). We did not found differences in  $k_1$  or  $k_2$  between origins for Cd and Zn



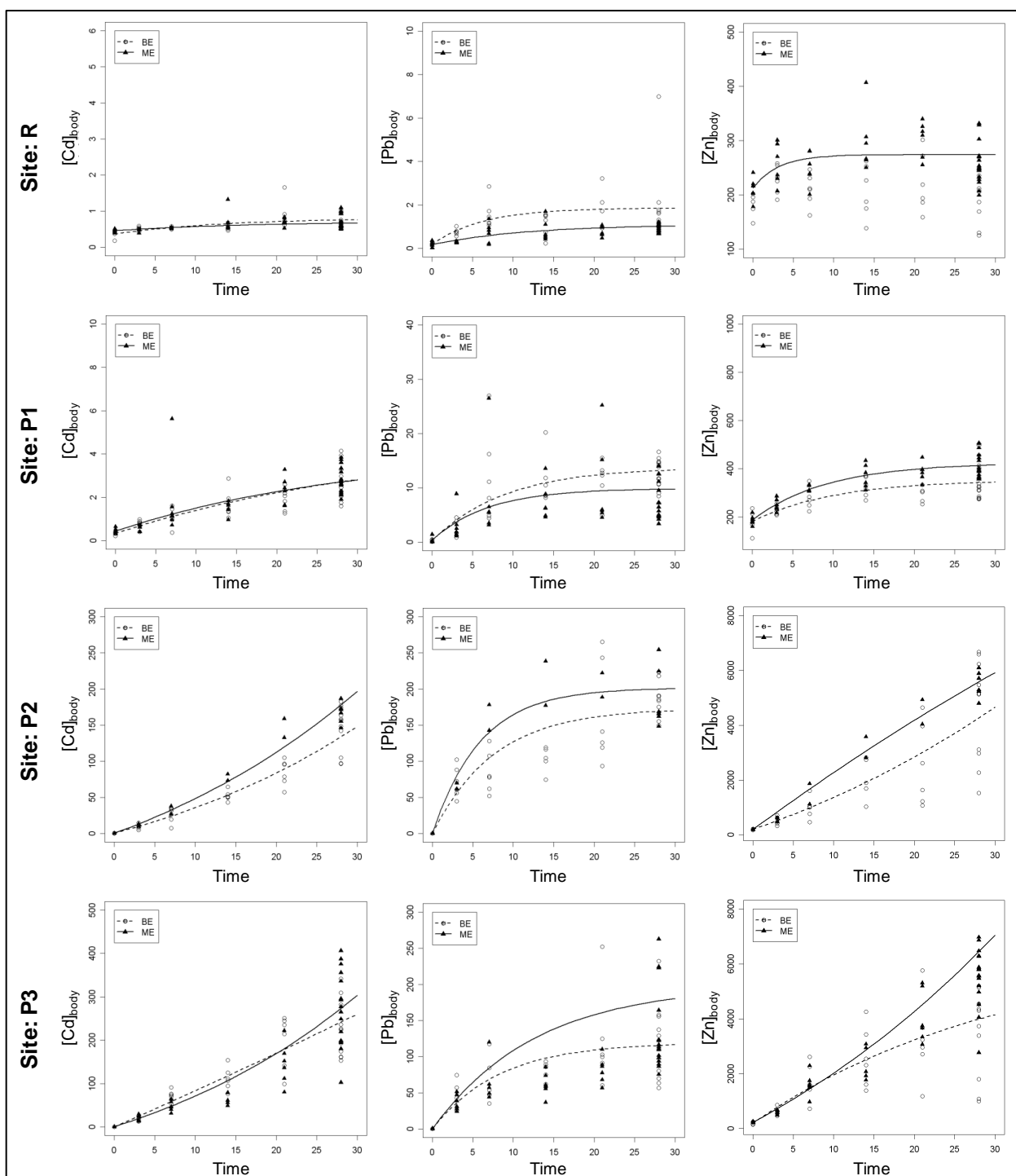
(Table III.5.3 and III.5.5, Figure III.5.3), while BE snails exhibited a higher Pb  $k_2$  that ME snails (Table III.5.4, Figure III.5.3).

Concerning *Cantareus aspersus*, BSAFs did not differ between origins whatever considered metal and site (Tables III.5.3, III.5.4 and III.5.5). Accumulated MTE concentrations showed a high inter-individual variability, which frequently led to non significant kinetic parameter estimates (particularly for elimination rate constant) and limited inter-origin comparisons. Uptake rate constant of Cd varied between origins, BE snails having a higher value than ME snails for P3 site (Table III.5.3, Figure III.5.4) while elimination rate constant of Cd did not show significant variations between origins. Uptake rate of Pb varied between origins with BE > ME for R site and elimination rate of Pb differed between origins with BE > ME for P3 site (Table III.5.4, Figure III.5.4). Uptake rate of Zn varied between origins with ME > BE for P2 site and BE > ME for P3 site whereas  $k_2$  of did not differ between origins (Table III.5.5, Figure III.5.4).

For both species and both origins, patterns of accumulation between metals differed: for Cd, a quite linear uptake curve was observed, for Pb, the steady-state concentrations in snails seemed to be achieved in most of cases and for Zn, uptake curve was linear in the most contaminated sites while steady-state concentrations could be considered to be reached in the less polluted areas (Figures III.5.3 and III.5.4).



**Figure III.5.3.** Accumulation of Cd, Pb and Zn in F1 *Cepaea nemoralis* soft tissues ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{ dw}$ ) over exposure time (days) for control origin ("BE") and metal-exposed origin ("ME") by exposure site (reference "R" and polluted "P1"). Accumulation curves were not presented when we failed in fitting kinetic model. Model parameters are given in Tables III.5.3, III.5.4 and III.5.5.



**Figure III.5.4.** Accumulation of Cd, Pb and Zn in F1 *Cantareus aspersus* soft tissues ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  dw) over exposure time (days) for control origin ("BE") and metal-exposed origin ("ME") by exposure site (reference "R", polluted "P1", highly polluted "P2" and "P3"). Accumulation curves were not presented when we failed in fitting kinetic model. Model parameters are given in Tables III.5.3, III.5.4 and III.5.5.

**Table III.5.3.** Measured Cd concentrations at the end of exposure ( $C_{sn}$  28days) and kinetic parameter estimates of Cd accumulation in snails.

Species	Origin	Site	Measured		Modelled						Predicted			
			$C_{sn}$ (28d) $\pm$ SE $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	BSAF	$k_1$ $\text{g}_s\cdot\text{g}_{sn}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	min/max	$p$ -value	$k_2$ $\text{d}^{-1}$	min/max	$p$ -value	$R^2$	$C_{sn}$ (28d) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	BSAF	
<i>Cepaea nemoralis</i>	BE	P1	$3.2 \pm 1.0^{\circ}$	$4.9 \pm 1.7$	0.213	0.174/0.251	<0.001	0.054	0.032/0.076	0.024	0.581	2.9	3.9	
		ME	$1.7 \pm 0.6^{\text{a}\circ}$	$10.2 \pm 3.7^{\text{a}\circ}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	P1	$3.2 \pm 0.8^{\text{b}\circ}$	$6.3 \pm 1.4^{\text{b}\ast\circ}$	0.292	0.235/0.349	<0.001	0.040	0.019/0.061	0.079	0.702	3.1	7.3		
<i>Cantareus aspersus</i>	BE	R	$0.7 \pm 0.1^{\text{a}}$	$4.0 \pm 2.1^{\text{a}}$	0.174 <sup>a</sup>	0.119/0.229	0.005	0.074	0.035/0.112	0.084	0.365	0.7	2.4	
		P1	$2.6 \pm 0.7^{\text{a}}$	$4.9 \pm 1.8^{\text{a}}$	0.221 <sup>a</sup>	0.166/0.276	<0.001	0.028	0.012/0.044	0.098	0.773	2.7	7.9	
		P2	$145.6 \pm 32.0^{\text{b}}$	$55.9 \pm 10.4^{\text{b}}$	1.198 <sup>b</sup>	1.111/1.286	<0.001	-0.030	-0.037/-0.023	<0.001	0.958	133.5		
		P3	$223.9 \pm 64.2^{\text{c}}$	$23.4 \pm 11.3^{\text{c}}$	0.789 <sup>c</sup>	0.702/0.876	<0.001	-0.004	-0.019/0.010	0.774	0.885	241.7		
	ME	R	$0.7 \pm 0.2^{\text{a}}$	$4.7 \pm 1.9^{\text{a}}$	0.095 <sup>a</sup>	0.064/0.127	0.007	0.059	0.003/0.115	0.319	0.613	0.7		
		P1	$2.7 \pm 0.6^{\text{a}}$	$4.3 \pm 1.1^{\text{a}}$	0.195 <sup>b</sup>	0.134/0.256	0.004	0.034	0.003/0.064	0.299	0.571	2.7		
		P2	$166.5 \pm 14.2^{\text{b}}$	$45.6 \pm 3.9^{\text{b}}$	1.143 <sup>c</sup>	1.045/1.240	<0.001	-0.028 <sup>a</sup>	-0.035/-0.021	0.003	0.953	177.7		
P3	$270.7 \pm 86.3^{\text{b}}$	$15.0 \pm 2.8^{\text{c}}$	0.329 <sup>d\ast}</sup>	0.259/0.400	<0.001	-0.032 <sup>a</sup>	-0.041/-0.022	0.002	0.909	273.1				

Letters symbolize significant differences between sites (for a species within an origin): values that share similar letters do not significantly differ ( $p > 0.05$ ). Asterisk (\*) symbolizes significant difference for a species between the two origins ( $p < 0.05$ ). Circle ( $\circ$ ) symbolizes significant differences for a site between the two species within a given origin ( $p < 0.05$ ).

Negative values of the elimination rates ( $k_2$ ) should be biologically considered as zero values. Kinetic parameters showing a non significant  $p$ -value ( $p > 0.05$ ) were not considered in inter-species, inter-site or inter-origin comparisons.

**Table III.5.4.** Measured Pb concentrations at the end of exposure ( $C_{sn}$  28days) and kinetic parameter estimates of Pb accumulation in snails.

Species	Origin	Site	Measured		Modelled					Predicted			
			$C_{sn}$ (28d) $\pm$ SE $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	BSAF	$k_1$ $\text{g}_s\cdot\text{g}_{sn}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	min/max	$p$ -value	$k_2$ $\text{d}^{-1}$	min/max	$p$ -value	$R^2$	$C_{sn}$ (28d) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	BSAF
<i>Cepaea nemoralis</i>	BE	P1	13.3 $\pm$ 4.7 <sup>o</sup>	42.2 $\pm$ 14.6	6.623	5.580/7.665	<0.001	0.171	0.135/0.207	<0.001	0.678	12.9	38.7
	ME	R	6.1 $\pm$ 1.2 <sup>ao</sup>	115.0 $\pm$ 23.1 <sup>ao</sup>	7.050 <sup>ao</sup>	5.833/8.267	<0.001	0.055 <sup>a</sup>	0.032/0.079	0.050	0.788	5.4	128.2
		P	15.0 $\pm$ 3.8 <sup>bo</sup>	57.6 $\pm$ 13.8 <sup>bo</sup>	5.325 <sup>a</sup>	4.604/6.045	<0.001	0.074 <sup>ao*</sup>	0.055/0.094	<0.001	0.654	16.6	72.0
<i>Cantareus aspersus</i>	BE	R	2.0 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	29.7 $\pm$ 18.1 <sup>a</sup>	3.921 <sup>a</sup>	2.935/4.907	<0.001	0.160 <sup>a</sup>	0.106/0.215	0.009	0.430	1.8	24.5
		P1	12.1 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	44.7 $\pm$ 15.6 <sup>a</sup>	5.347 <sup>a</sup>	3.950/6.744	<0.001	0.111 <sup>a</sup>	0.073/0.150	0.009	0.473	13.2	48.2
		P2	187.3 $\pm$ 25.9 <sup>b</sup>	523.2 $\pm$ 103.7 <sup>b</sup>	61.810 <sup>b</sup>	53.309/70.313	<0.001	0.132 <sup>a</sup>	0.106/0.158	<0.001	0.683	169.2	468.3
		P3	117.3 $\pm$ 52.5 <sup>c</sup>	92.5 $\pm$ 42.7 <sup>a</sup>	11.323 <sup>c</sup>	9.150/13.498	<0.001	0.122 <sup>a</sup>	0.099/0.145	<0.001	0.700	115.6	92.8
	ME	R	0.9 $\pm$ 0.2 <sup>a*</sup>	21.4 $\pm$ 10.8 <sup>a</sup>	1.374 <sup>a*</sup>	1.088/1.660	<0.001	0.086 <sup>ac</sup>	0.048/0.125	0.042	0.999	1.0	16.0
		P1	7.8 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup>	24.6 $\pm$ 13.1 <sup>a</sup>	4.219 <sup>b</sup>	2.567/5.872	0.021	0.146 <sup>ab</sup>	0.117/0.176	<0.001	0.641	9.7	28.9
		P2	187.3 $\pm$ 42.1 <sup>b</sup>	460.1 $\pm$ 103.5 <sup>b</sup>	84.107 <sup>c</sup>	70.253/97.962	<0.001	0.170 <sup>b</sup>	0.136/0.204	<0.001	0.831	199.8	494.7
	P3	132.2 $\pm$ 56.1 <sup>b</sup>	100.7 $\pm$ 104.8 <sup>a</sup>	7.585 <sup>b</sup>	4.142/11.029	0.045	0.079 <sup>c*</sup>	0.059/0.099	<0.001	0.641	177.2	96.0	

Letters symbolize significant differences between sites (for a species within an origin): values that share similar letters do not significantly differ ( $p > 0.05$ ). Asterisk (\*) symbolizes significant difference for a species between the two origins ( $p < 0.05$ ). Circle (°) symbolizes significant differences for a site between the two species within a given origin ( $p < 0.05$ ).

Negative values of the elimination rates ( $k_2$ ) should be biologically considered as zero values. Kinetic parameters showing a non significant  $p$ -value ( $p > 0.05$ ) were not considered in inter-species, inter-site or inter-origin comparisons.

**Table III.5.5.** Measured Zn concentrations at the end of exposure ( $C_{sn}$  28days) and kinetic parameter estimates of Zn accumulation in snails.

Species	Origin	Site	Measured		Modelled						Predicted		
			$C_{sn}$ (28d) $\pm$ SE $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	BSAF	$k_1$ $\text{g}_s\cdot\text{g}_{sn}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	min/max	$p$ -value	$k_2$ $\text{d}^{-1}$	min/max	$p$ -value	$R^2$	$C_{sn}$ (28d) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	BSAF
<i>Cepaea nemoralis</i>	BE	P1	338.3 $\pm$ 73.3 <sup>o</sup>	36.9 $\pm$ 17.0 <sup>o</sup>	1.243	0.406/2.079	0.171	0.166	0.034/0.298	0.245	0.153	308.5	
	ME	R	376.8 $\pm$ 55.7 <sup>ao</sup>	90.6 $\pm$ 13.4 <sup>a</sup>	20.066 <sup>ao</sup>	11.495/28.637	0.050	0.492	0.266/0.718	0.071	0.557	354.8	40.8
		P1	580.7 $\pm$ 241.4 <sup>ao</sup>	113.9 $\pm$ 66.3 <sup>ao</sup>	3.077 <sup>b</sup>	2.194/3.959	0.002	0.060	0.006/0.113	0.302	0.757	480.5	
<i>Cantareus aspersus</i>	BE	R	197.3 $\pm$ 45.5 <sup>a</sup>	54.0 $\pm$ 34.0 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	
		P1	346.9 $\pm$ 69.1 <sup>a</sup>	54.5 $\pm$ 19.2 <sup>a</sup>	2.520 <sup>a</sup>	1.951/3.088	<0.001	0.099	0.070/0.128	0.003	0.703	342.3	25.5
		P2	4669.2 $\pm$ 1860.9 <sup>b</sup>	231.2 $\pm$ 79.1 <sup>b</sup>	5.470 <sup>b</sup>	4.899/6.041	<0.001	-0.022	-0.003/-0.011	0.076	0.729	4262.1	
		P3	3551.2 $\pm$ 1553.3 <sup>b</sup>	112.4 $\pm$ 61.1 <sup>a</sup>	6.177 <sup>b</sup>	5.308/7.045	<0.001	0.032	0.015/0.050	0.088	0.605	3988.4	193.0
	ME	R	256.5 $\pm$ 36.2 <sup>ax</sup>	84.8 $\pm$ 25.3 <sup>a</sup>	6.227	3.104/9.351	0.067	0.325	0.145/0.504	0.096	0.155	274.0	19.2
		P1	409.4 $\pm$ 50.5 <sup>a</sup>	44.4 $\pm$ 9.0 <sup>a</sup>	2.751 <sup>a</sup>	2.343/3.159	<0.001	0.109 <sup>a</sup>	0.094/0.124	<0.001	0.849	413.3	25.2
		P2	5498.2 $\pm$ 482.1 <sup>b</sup>	187.0 $\pm$ 16.4 <sup>b</sup>	7.401 <sup>b*</sup>	6.429/8.373	<0.001	0.009	-0.001/0.020	0.427	0.967	5581.0	
	P3	5527.1 $\pm$ 1077.9 <sup>b</sup>	153.4 $\pm$ 50.6 <sup>b</sup>	4.073 <sup>c*</sup>	3.677/4.469	<0.001	-0.022 <sup>b</sup>	-0.031/-0.012	0.035	0.521	6438.0		

Letters symbolize significant differences between sites (for a species within an origin): values that share similar letters do not significantly differ ( $p > 0.05$ ). Asterisk (\*) symbolizes significant difference for a species between the two origins ( $p < 0.05$ ). Circle (°) symbolizes significant differences for a site between the two species within a given origin ( $p < 0.05$ ).

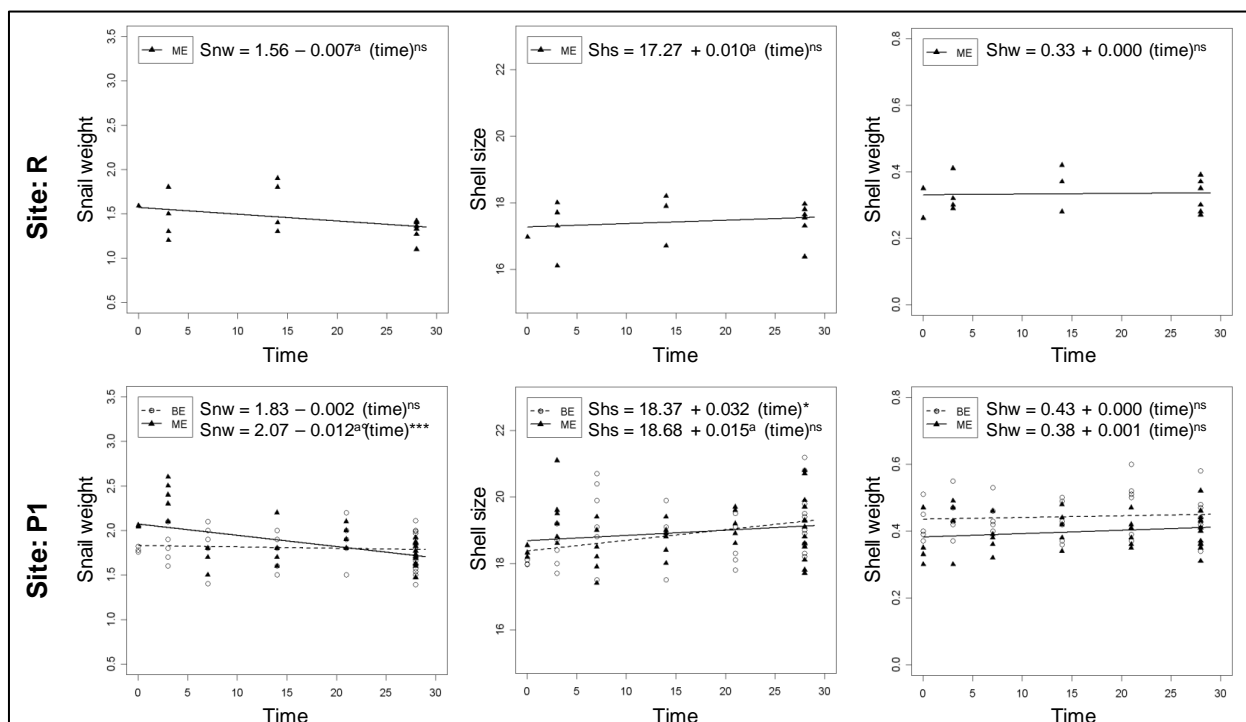
Negative values of the elimination rates ( $k_2$ ) should be biologically considered as zero values. Kinetic parameters showing a non significant  $p$ -value ( $p > 0.05$ ) were not considered in inter-species, inter-site or inter-origin comparisons.

### III.5.3.b. Snail body condition

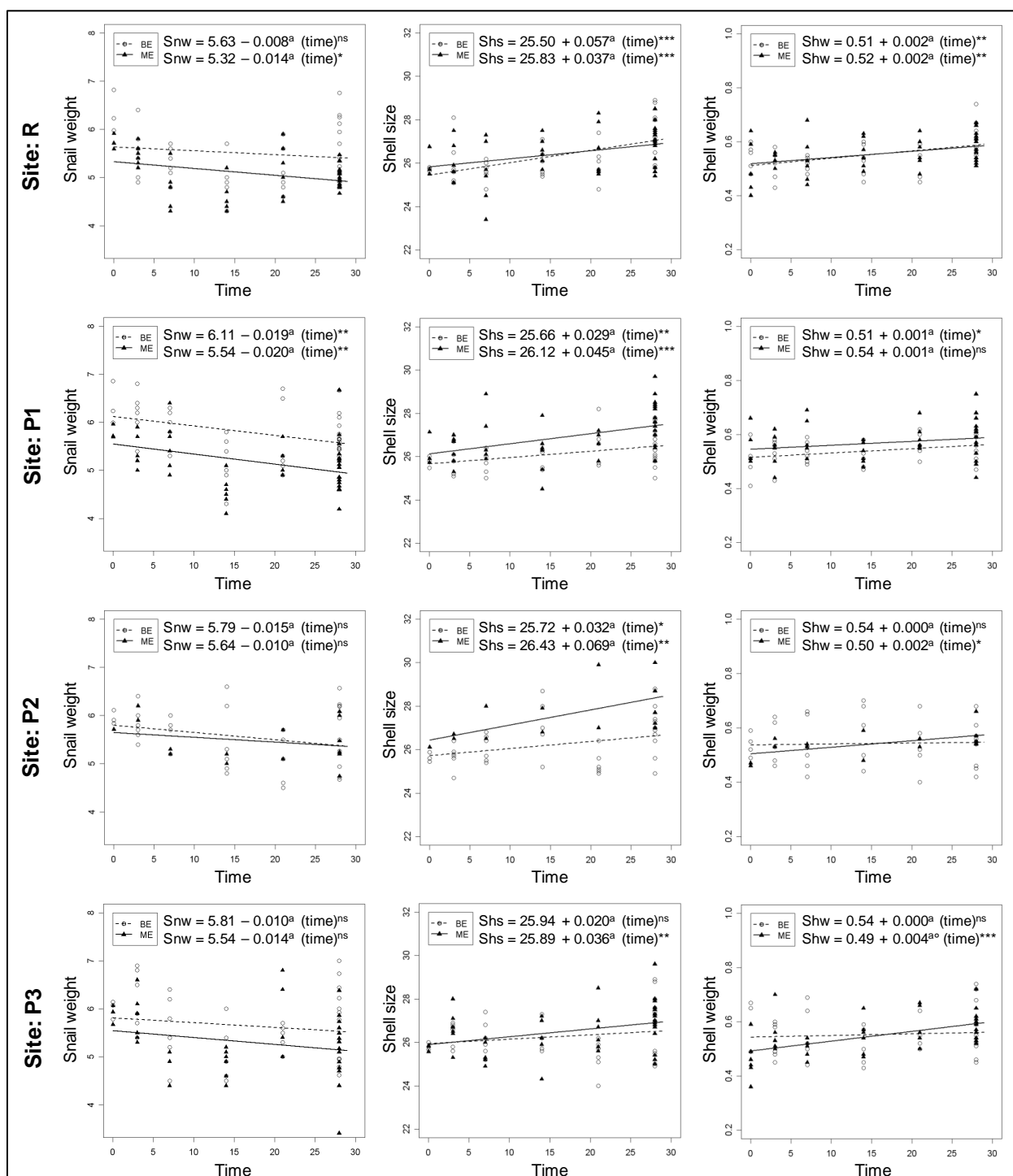
Mortality under exposure conditions in the field was extremely low: 7 individuals were found dead (5 from *Cepaea* species, 2 from *Cantareus*; 2 in R site, 4 in P1 site and 1 in P3 site), representing 1.9% of mortality. We measured a slight decrease of snail weight over exposure, and a slight increase of shell size and weight, indicating that snail maintain normal metabolism and still to weakly grow. Therefore, exposure devices used in this experiment could be considered as providing supportive conditions for snail well-being. Moreover, such a low mortality even in highly polluted conditions demonstrated that metal concentrations present in environment and accumulated in snails were insufficient to cause lethal effects.

For both *Cepaea nemoralis* and *Cantareus aspersus* we observed a slight decrease of snail weight (total snail fresh weight) over exposure, which was not systematically significant in respect with site and origin (Figures III.5.5 and III.5.6). This decrease did not differ between sites for a given species (interaction time \* site:  $0.378 < p < 0.819$ ). However, the decrease of snail weight varied between origins for *Cepaea*: BE snails showed a lower decrease than ME snails (*Cepaea*:  $p = 0.01$ ; *Cantareus*:  $p > 0.6$ , Figures III.5.5 and III.5.6).

Shell size and weight were positively correlated for both *Cepaea* and *Cantareus* snails (data not shown; *Cepaea*:  $0.015 < \text{slope} < 0.05$ ,  $p < 0.05$ ; *Cantareus*:  $0.016 < \text{slope} < 0.040$ ,  $p < 0.02$ ). Shell size increased significantly over exposure for *Cepaea* only for BE snails (Figure III.5.5). For *Cantareus*, shell size increased over exposure for all origins and sites, but not significantly for BE snails in P3 (Figure III.5.6). We did not detect difference in shell size increase between sites within a species (interaction time \* site:  $0.30 < p < 0.77$ ). No differences between origins were observed neither for *Cepaea* nor for *Cantareus* species ( $0.19 < p < 0.46$ , Figures III.5.5 and III.5.6). Conversely, shell weight increased for *Cantareus* but did not vary over exposure for *Cepaea* (Figures III.5.5 and III.5.6). However, concerning *Cantareus aspersus*, shell weight increase was not significant for ME snails in P1 site and for BE snails in P2 and P3 sites. Evolution of *Cepaea* or *Cantareus* shell weight over exposure did not show significant differences between sites ( $0.29 < p < 0.55$ ). No differences were observed between origins for *Cepaea*, while for *Cantareus*, ME snails exhibited a higher increase than BE snails in P2 and P3 sites, but this difference is significant only in P3 (Figures III.5.5 and III.5.6). We could notice that considering shell size and weight, ME snails of *Cantareus* species globally showed higher increase than BE snails in polluted sites but lower or equal increase in reference site, however, these variations were rarely significant. Moreover, concerning *Cepaea*, BE snails exhibited a shell size increase but no shell weight increase while ME snails did not show nor shell size neither shell weight increase. This suggested that BE snails had a less robust shell as its size increase but not its weight, whereas shell robustness of ME snails could be supposed to remain stable over exposure.



**Figure III.5.5.** Body condition of *Cepaea nemoralis*: evolution of snail weight (g), shell size (mm) and shell weight (g) over exposure (time in days) for control origin (“BE”) and metal-exposed origin (“ME”) by exposure site (reference “R” and polluted “P1”). Asterisk (\*) symbolizes the statistical significance of the variable of concern in the model (ns:  $p > 0.05$ , \*:  $0.01 < p < 0.05$ , \*\*:  $0.001 < p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ). Letters symbolize significant differences between sites (for a species within a origin): values that share similar letters do not significantly differ ( $p > 0.05$ ). (‡) symbolizes significant differences for a species between the two origins within a given site.



**Figure III.5.6.** Body condition of *Cantareus aspersus*: evolution of snail weight (g), shell size (diameter, mm) and shell weight (g) over exposure (time in days) for control origin (“BE”) and metal-exposed origin (“ME”) by exposure site (reference “R”, polluted “P1”, highly polluted “P2” and “P3”). Asterisk (\*) symbolizes the statistical significance of the variable of concern in the model (ns:  $p > 0.05$ , \*:  $0.01 < p < 0.05$ , \*\*:  $0.001 < p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ). Letters symbolize significant differences between sites (for a species within a origin): values that share similar letters do not significantly differ ( $p > 0.05$ ). (0) symbolizes significant differences for a species between the two origins within a given site.



### III.5.4. Discussion

#### III.5.4.a. Accumulation of MTEs in snails

Using for the first time F1 snails of *Cepaea nemoralis* and *Cantareus aspersus* for active biomonitoring comparing their accumulation under similar exposure to metallic pollution, we evidenced that these species accumulated high levels of MTEs in their soft tissues. Measured values were elevated in respect with results of other caging field studies in soils affected by different MTE contaminations (Gomot-de Vaufleury and Pihan, 2000; Scheifler et al., 2003; Viard et al., 2004; Gimbert et al., 2008b). MTE concentrations in snails exposed in the most contaminated sites were also relatively high in comparison with studies on autochthonous snails, which however could be supposed to have been exposed to MTE environmental contamination during a longer period than in our experiment (Berger and Dallinger, 1993; Beeby and Richmond, 2003; Notten et al., 2005). Our data therefore demonstrated an effective transfer of MTE in the soil-plant-snail food chain. Moreover, we observed high metal concentrations in *Arabidopsis halleri* in P2 and P3, which is consistent with the fact that *A. halleri* is a hyperaccumulator metallophyte species (Bert et al., 2000; Sarret et al., 2002; Bert et al., 2003; Zhao et al., 2006). Such findings reflect the high level of soil pollution in soils surrounding former Metaleurop Nord smelter, and the strong potential of MTE trophic transfer over this polluted area, as demonstrated by studies on autochthonous small mammals (Fritsch et al., 2010).

We evidenced that *Cepaea nemoralis* and *Cantareus aspersus* differed for accumulated levels: under both safe and metal-polluted exposure conditions, *Cepaea* snails exhibited higher MTE internal concentrations than *Cantareus aspersus*. Inter-species differences in MTE accumulation within land snails have been evidenced, even within closely related species (Gomot and Pihan, 1997; Menta and Parisi, 2001), and could be due to differences in exposure (food preferences, behaviour...) and/or physiology (food intake, metabolism, accumulation and excretion abilities...) (Peakall and Burger, 2003). In our study, *Cepaea nemoralis* was not exposed in the most polluted sites: further studies should be realized under heavy exposure to MTEs to investigate the differences in MTE accumulation between the 2 species, and its consequence on species respective sensitivity. Accumulation patterns differed more between metals than between species, suggesting that metal physico-chemical properties are important in explaining metal accumulation in snails, by conditioning availability and storage of MTEs. Kinetic analyses highlighted 3 different patterns of accumulation between the 3 MTEs: Cd showed an extremely slow elimination or even an absence of elimination, Pb was efficiently eliminated and Zn exhibited an intermediate behaviour. Thus, the ability to Zn elimination seemed to partly depend on soil contamination level, which has not been noticed previously. Accumulation and elimination patterns assessed in the present work for Cd, Pb and Zn were consistent with those observed by Williamson (1980) in a depuration study based on free-living *Cepaea hortensis* from a contaminated roadside place, and by Gimbert et al. (2008) in an accumulation and elimination

study under controlled conditions using *Cantareus aspersus* (Williamson, 1980; Gimbert et al., 2008a).

Our study confirmed that land snails are suitable sentinels for metallic pollution assessment by active biomonitoring according to the definition of Beeby (2001) (Beeby, 2001). Results indicated that MTE internal concentrations and metal uptake globally increased with soil pollution although differences were not significant for all pairwise comparisons. Indeed, as the relationships between accumulated levels in snails and total or chemically-extracted concentrations in soils are not linear and may be site-specific, MTE levels in snails allows to discriminate metal-polluted and unpolluted sites but do not always reflect the magnitude of soil pollution within contaminated areas (Beeby and Richmond, 2002; Notten et al., 2005; Gimbert et al., 2008b). When steady-state concentrations in snails seemed to be achieved (most of cases for Pb, in some cases for Zn), predicted BSAFs showed values close to measured ones. We found similar variations in BSAFs and  $k_1$  between exposure sites, accumulation increasing with soil pollution firstly, and decreasing between the two most polluted sites. These variations in kinetic parameters, which are supposed to be constant for similar exposure conditions, and such evolution of accumulation along soil pollution gradient highlight 3 major insights. Firstly, the existence of a threshold of MTE environmental pollution between the two most polluted sites, which reduce MTE accumulation in snails, could be suspected but clearly need further investigation to verify such a pattern on other pollution gradient and identify underlying mechanisms (environmental availability, toxicity, avoidance...). Secondly,  $\text{CaCl}_2$  extracts of MTEs in soils studied here does not constitute a reliable estimate of MTE bioavailability to snail in a soil-plant-snail food web. The relevance of chemical extractions to evaluate availability depends on soil parameters, on MTE and on organism of concern (Peijnenburg and Jager, 2003; Harmsen, 2007; ISO, 2008). Environmental availability of MTEs can drastically vary accordingly to soil parameters and contamination history, and thus, influencing bioavailability to organisms (Peijnenburg and Jager, 2003). Such a phenomenon can result in variations in uptake kinetics, as evidenced in earthworms *Eisenia fetida* and *Eisenia Andrei* (Peijnenburg et al., 1999; Spurgeon and Hopkin, 1999; Nahmani et al., 2009). Moreover, a lack of relationship between total or chemically-extracted soil MTE concentrations with accumulated levels in animals in field studies has been noticed in recent years (Hobbelen et al., 2006; Van Gestel, 2008). Our findings strongly suggest that soil properties, soil contamination levels and processes related to trophic transfer may limit the reliability of  $\text{CaCl}_2$  extracts within the framework of bioavailability assessment for snail. Actually, uptake and elimination rate constant could also be influenced by MTE levels and sequestration in vegetation because trophic transfer could be affected by bioavailability of MTEs in diet (Hopkin, 1989; Vijver et al., 2004). As levels and sequestration of MTE in plants vary according to species and exposure to metals (Clemens, 2006; Verkleij et al., 2009), and because MTE trophic availability for consumers is affected by metal storage form in foodstuffs (Vijver et al., 2004; Monteiro et al., 2008), bioavailability of MTE to snails may vary among sites because of characteristics of available vegetation. Thus, these parameters

should be considered for an accurate assessment of bioavailability of MTE in food webs including snails.

We calculated biota-soil accumulation factors using total Cd concentrations in soil to compare our results with those reported by Veltman et al. (2008), in a study dealing with Cd bioaccumulation factors based on meta-analyses considering *Cepaea nemoralis*, *Arion ater* and *Arianta arbustorum*. In the less polluted sites R and P1, BSAFs were systematically lower than those expected according to empirical regression presented in the meta-analysis (0.6 and 0.5 folds for *Cepaea* and 0.2 and 0.3 folds for *Cantareus* in R and P1, respectively) (Veltman et al., 2008). Conversely, BSAFs for *Cantareus* exposed in the most polluted sites were 19 and 23 folds higher in P2 and P3, respectively, than which could be predicted in respect with the empirical regression. Moreover, we did not observe the constant decrease of BSAF with soil pollution shown in this paper (Veltman et al., 2008). However, within each group of pollution level (the less polluted R and P1 versus the most polluted sites P2 and P3), the BSAFs tended to decrease. Similar patterns existed for BSAF based on total metal concentrations in soils for Pb and Zn. These authors highlighted that organic matter content is an important parameter influencing BSAFs, but this variable in our case does not fully explain differences between less and most polluted sites, as OC content in soils did not dramatically vary. However, such elevated BSAFs in the most polluted sites could be related to the presence of hyperaccumulator species *A. halleri*, therefore providing potentially highly contaminated food for snails.

We assume that exposure site pedological and biological parameters modulate MTE transfer in soil-plant-snail food web, and can therefore lead to either weak or sharp differences in snail MTE bioaccumulation between differently polluted sites, as suggested by other works on snails and other invertebrates (Beeby and Richmond, 2002; 2003; Hendrickx et al., 2004). These findings highlight the need of further researches to identify soil parameters and food-chain effects that modulate bioavailability of MTEs to snails.

**Table III.5. 6.** Synthesis of toxicological thresholds (EC50 or concentrations of exposure “[C]”) for Cd, Pb and Zn effects on growth and food consumption in the studied species. For each experiment, the name of the species of concern is accompanied by indication on age of studied individuals (“juv.”: juveniles, “ad.”: adults).

Experiment	Species	Cd	Pb	Zn	Reference
Growth 28 days EC50 food	<i>C. aspersus</i> (juv.)	140			Gomot et al. (1997)
Growth 28 days EC50 food	<i>C. aspersus</i> (juv.)		> 30 000	5500	Gomot-deVaufleury (2000)
Growth 28 days [C] food inducing growth depression	<i>C. aspersus</i> (juv.)	7.6 / 8.6 <sup>a</sup>	630 / 714 <sup>a</sup>	1615 / 1813 <sup>a</sup>	Gomot-deVaufleury and Bispo (2000)
Shell growth 98 days [C] food inducing growth depression	<i>C. aspersus</i> (juv.)		No depression at 500		Beeby and Richmond (2001c)
Shell mass 98 days [C] food inducing shell mass depression	<i>C. aspersus</i> (juv.)		Lighter shell at 500		Beeby et al. (2002)
Consumption 90 days EC50 food	<i>C. aspersus</i> (juv.)	206	13 900	4080 / 1880 <sup>b</sup>	Laskowski and Hopkin (1996)
Consumption 90 days EC50 food	<i>C. aspersus</i> (ad.)	396	10 000	3980 / 2760 <sup>b</sup>	Laskowski and Hopkin (1996)
Feeding rate 30 days [C] food inducing growth depression	<i>C. aspersus</i>	Depressed at 100			Russel et al. (1981)
Consumption 34 days [C] food inducing consumption reduction	<i>C. nemoralis</i> (juv.)		2.6 / 3.3 <sup>c</sup>	232 / 447 <sup>c</sup>	Notten et al. (2006)

<sup>a</sup> multi-contaminated soil with Cd, Cr Pb and Zn : value in soil-food mix at 75% / value in soil food-mix at 85%

<sup>b</sup> value with Zn alone / value with Zn mixed with Cd, Cu and Pb

<sup>c</sup> mean concentration in leaves in April / May

### III.5.4.b. Effects on snail body condition

The weak decrease of snail weight and the slight increase of snail shell are probably related to the change in food quality between laboratory and field conditions. However, we did not evidence neither enhancement of weight depletion, nor shell development reduction along soil pollution gradient. Several works have evidenced negative effects of exposure to Cd, Pb and Zn on growth, body weight or shell size (Laskowski and Hopkin, 1996b; Gomot, 1997; Gomot-de Vaufleury, 2000; Gomot-de Vaufleury and Bispo, 2000; Gomot-de Vaufleury and Pihan, 2000; de Vaufleury et al., 2006). Considering field studies, Gomot de Vaufleury and Pihan (2000) measured a growth reduction of *C. aspersus* with soil pollution in a four week experiment, while snails exhibited lower internal Cd, Pb and Zn concentrations than in the present study. Moreover, MTE contamination of food has been proved to lead, for both *Cepaea nemoralis* and *Cantareus aspersus*, to a reduction of food consumption (Laskowski and Hopkin, 1996b; Gomot-de Vaufleury and Bispo, 2000; Notten et al., 2006). Such a phenomenon is likely to produce a reduction in snail body condition which however was not observed here. Nevertheless, soils and vegetation of the present study exhibited high metal concentrations which are rarely reached in the field and accumulated levels of MTEs in snails assured that snails were truly exposed. More, appearance and colour of snail feces confirmed that they ate available vegetation in microcosms (personal observation). Snails can be exposed to pollutants via several routes: oral, dermal and respiratory (Gomot-de Vaufleury and Pihan, 2000; Coeurdassier et al., 2002; Regoli et al., 2006; Scheifler et al., 2006; Fritsch et al., 2008). Concerning oral exposure, they can be exposed via trophic pathway, by eating soil, litter and vegetation. Therefore, we did not aim to asses precisely the exposure dose of snails. To compare our data with toxicological studies, mostly based on MTE contamination of food, we would consider concentrations in analyzed plants (mean concentrations), but remaining aware that such comparisons are not truly representative and are only indicative. Indeed, such data provide an order of magnitude of metal concentrations in food but could either underestimate or overestimate exposure, as snails might eat soil and litter (more contaminated than *U. dioica* and *A. halleri* in respect with exposure site, data not shown) and/or other plant species (*Poaceae* for instance, having lower metal concentrations than *U. dioica* and *A. halleri*, data not shown). Considering toxicological thresholds reported for growth and food consumption in *C. aspersa*, measured concentrations of Cd and Zn in soil and/or vegetation were lower in R and P1 sites, whereas thresholds were exceeded in P2 and P3 in most of cases (Table III.5.6). If Pb contamination should not be a subject of concern for causing effects on growth and food consumption in the present work, values of P2 and P3 were in the range of magnitude of concentrations causing shell weight depletion (Table III.5.6). From these data, snails exposed in polluted sites might have been subject to depletion of snail body condition. The absence of negative effects on measured responses is therefore unexpected. However, body concentrations of Cd did not reach the IC50 for this metal calculated at 415  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  for growth inhibition in juvenile

*Cantareus aspersus* (de Vaufleury et al., 2006). Moreover, we studied subadult individuals, which growth is limited comparatively to juveniles, and this could have hampered the measure of metal-induced effect on this parameter. We suppose that interactions between natural environmental factors (temperature, hygrometry, food quality, soil properties...) and environmental pollution limit the detection of potential metal-induced negative effects on snail condition. For instance, if soils of sites P2 and P3 are more polluted than R and P1, they also present more Ca, and R site exhibit the lower pH. The essential element Ca is extremely important for snail growth and shell building, and a reduced provision of Ca in the diet results in a slower growth (Gomot et al., 1989). If MTE could be a limiting factor for snail growth in the most polluted sites, lower Ca levels and pH could be limiting factors in the less polluted sites. The absence of differences in snail condition parameters between the less and the most polluted sites could therefore be due to the fact that higher levels of Ca in soils of P2 and P3 compensate the negative effects of MTE on body weight and shell development. Indeed, Gimbert et al. (2008) evidenced a reduction of shell mass of snails exposed to Cd-contaminated soils ISO (20, 100 mg.kg<sup>-1</sup>), while no significant decrease of shell mass was observed for a natural Cd-contaminated soil exhibiting similar Cd concentrations than one of tested ISO (20 mg/kg), and suggested that the higher level of Ca in this natural soil allow reducing the induction of negative effects.

#### III.5.4.c. Adaptation and acclimatization

The present results did not permit to conclude unquestionably neither of presence nor of absence of adaptation. To summarize, certain data plead for absence of adaptation, a part of results suggested acclimatization in populations, an other part could be interpreted as adaptive responses. Actually, our findings on MTE internal levels, toxicokinetics and snail body weight suggested differential responses between origins, in respect with metal exposure level and species of concern, but did not clearly claim for adaptive responses. Otherwise, the present results did not clearly support the “cost of tolerance” hypothesis, because individuals originating from exposed population did not exhibit significantly lower performances than those from unexposed population in the reference exposure site. Observed differences could be due to intrinsic variations in populations, which differed by their geographic origin, not to metal-exposure adaptation. However, we assume that exposure to MTE influenced certain traits of snails in populations living in Metaleurop surroundings, notably traits related to conchological parameters.

Indeed, influence of snail origin on the interactions between pollution and shell development were suggested by abnormal shell development in adult *Cepaea* snails coming from Metaleurop surroundings at the beginning of laboratory rearing. Nevertheless, this abnormal shell development stopped after a few weeks of rearing, indicating that this trait is reversible and might imply acclimatization to metal-exposure in these free-living populations.

Furthermore, the most consistent inter-origin difference within F1 individuals concerned shell development, and such observations yet suggests adaptation. Exposure to a mixture of Cd, Pb and

Zn may result in a reduced shell thickness. Actually, several authors have evidenced that exposure to Cd or Pb cause shell mass reduction and delay shell lip formation in *C. aspersus* (Gomot, 1997; Beeby et al., 2002; Gimbert et al., 2008c) and negative relationships between shell Zn and Cd concentrations (which increase with exposure MTE levels) and shell strength (which partly depends on thickness) of *Cepaea nemoralis* have been found (Jordaens et al., 2006a). Some studies suggested that variations in conchological parameters of land snail populations from Pb-polluted areas reflected adaptive processes. Studying free-living adult *C. aspersus* snails from areas differing by their Pb pollution levels, Mulvey et al. (1996) have found that animals present a more robust shell (greater shell width/shell height ratio) in polluted locations (Mulvey et al., 1996). Beeby et al. (2002) have proposed that adaptation in *C. aspersus* population exposed to Pb results in a lesser shell weight depletion in adapted than in non-adapted individuals under Pb exposure, while shell height does not differ (Beeby et al., 2002). Our study reinforces the hypothesis of snail adaptation to metal-polluted environment through modification of conchological parameters, as we observed more robust shell in F1 originating from exposed populations for two species.

Previous works showed the existence of interactions between Ca metabolism and Pb accumulation and excretion in snails, and interactions between Ca and Cd have been demonstrated (Beeby and Richmond, 1988; Beeby, 1993; Sidoumou et al., 1997; Beeby and Richmond, 1998; 2001a; Beeby et al., 2002; Gimbert et al., 2008c). The excretion of Pb is partly realized by binding of Pb in intracellular granules, greatly constituted of Ca, and Cd has been found in Ca-containing granules, but Ca-containing granules are basically implied in regulation and mobilization of Ca for physiological processes, and notably shell building and reproduction (Brown, 1982; Beeby and Richmond, 1988; Hopkin, 1989; Dallinger and Rainbow, 1993; Bonneris et al., 2005). Furthermore, Ca ambient level has been found to be negatively related to Cd bioaccumulation in granule fraction (Bonneris et al., 2005). It has therefore been supposed that a larger pool of Ca is necessary under Pb and Cd exposure, to assure the sequestration in granules and concomitantly maintain sufficient levels of Ca for physiological requirements. The abnormal development of shell of adults *Cepaea nemoralis* from Metaleurop under unpolluted conditions strongly suggested that these individuals modified their Ca regulation, such a modification being either acclimatization or adaptive processes, or both. We assume that a variation in Ca regulation in this population results in an enhancement of Ca available pool, providing thus sufficient amount of Ca for both “normal” physiological requirements and Cd and Pb sequestration. When animals were transferred in the laboratory, under unpolluted conditions, such Ca regulation became unsuitable and leads to too large enough available pool of Ca, inducing abnormal shell development. In F1 exposed in microcosms, we could not detect particular interaction between pollution and shell development in ME animals as shell did not grow. However F1 snails from BE increased their shell size but not their shell weight, probably resulting in a loss of shell robustness over exposure duration, while thickness of shell of ME snails poorly varied because neither size nor weight evolved. Concerning *Cantareus aspersus*, we did not detect particular variations in adult

condition when rearing them in the laboratory. However, F1 from Metaleurop exhibited a greater increase of shell weight than F1 from Besançon under high environmental pollution solely, but no consistent differences for Cd and Pb accumulation. This fact suggests that F1 individuals originating from Metaleurop are able to provide more Ca for shell building than BE F1 individuals, even excreting the same amount of Pb and accumulating same amount of Cd.

The shell morphology, and notably shell thickness, is an important parameter for snail survival, providing protection against injury and predation (Quensen and Woodruff, 1997; Jordaens et al., 2006a; Schilthuizen et al., 2006). The maintain of a robust shell, even under polluted environment where the need for reducing Cd and Pb interactions with metabolism is a limiting factor for amount of available of Ca, can therefore constitute a selective trait. Animals able to build a robust shell and maintain Pb and Cd detoxification may thus become more competitive.

Except for conchological parameters, present data did not support consistent evidence of adaption or acclimatization for MTE accumulation and snail condition. We cannot exclude that a 28 days experiment was not long enough to detect adaptive responses. Moreover, resistance or tolerance of snails could result in variations of other traits than measured here, particularly life-history traits related to reproduction, metal sequestration under non-toxic forms (metallothioneins, granules) or metal distribution through the body (foot, viscera, reproductive tissues, shell). However, an absence of adaptation for accumulation and snail body weight might be considered, as numerous phenomena (related to environmental, population and genetic factors) hamper evolution processes (Kawecki and Ebert, 2004; Morgan et al., 2007). Among them, four major points could explain lack of adaptation in snails from Metaleurop site: (i) limits of the potential constraints represented by MTE pollution (ii) exposure to a mixture of MTEs, (iii) modulation of exposure by individual behaviour and processes of MTE transfer along food webs and (iv) high phenotypic plasticity.

We might consider that land snails are relatively lightly sensitive to metal exposure: environmental contamination by MTEs rarely reached toxicological thresholds. Over the polluted area surrounding former Metaleurop Nord smelter, few soils exhibited so high MTE concentration levels than those observed in interchanges P2 and P3, where metals could induce deleterious effects in snails according to toxic thresholds (Sterckeman et al., 2002; Douay et al., 2008; Douay et al., 2009; Fritsch et al., *submitted*). It is therefore possible that pollution levels in large areas surrounding Metaleurop Nord smelter, where snails live and were collected within the present work (between 1 and 2 km far away from the smelter), constitute an insufficient constraint, or lower constraint in comparison with other environmental stress, to induce adaptation in local populations. In the most contaminated areas close to the smelter (500 to 1000 meters), where pollutants levels could induce deleterious effects, abundances of *C. nemoralis* and *C. aspersus* were extremely reduced, suggesting either a toxic pressure leading to population extinction or an avoidance of snails resulting in migration to less polluted areas. Such a disappearance of populations might hamper adaptive processes. Land snails have been found to avoid consumption of metal-



contaminated plants in binary choice of food experiments (Boyd et al., 2002; Huitson and Macnair, 2003). Moreover, aquatic snails *Physella columbiana* can detect and avoid hot-spots of MTE contamination and move to less contaminated places, such a behaviour being observed in both adapted and non adapted populations (Lefcort et al., 2004). Therefore, even in heavy polluted areas, the selection (active and/or fortuitous because of ecological preference) of less contaminated food, food where MTE are poorly bioavailable, and/or less contaminated living places, could reduce snail exposure to MTEs and thus limit the potential for resistance development.

In the present case, autochthonous snails of Metaleurop surroundings live on soils showing high levels of a mixture of several metal trace elements. This fact could limit the possibility of adaptation, because several MTEs may affect physiological processes: this could lead to antagonist mechanisms for metal-induced stress tolerance, and genetic variations (allele frequencies at the same locus for instance) in opposite ways (Posthuma and Van Straalen, 1993; Jordaens et al., 2006b).

Moreover, studies on genetic variations in *C. nemoralis* and *C. aspersus* populations from differently areas did not evidenced pollution-related differences (Mulvey et al., 1996; Jordaens et al., 2006b). Differentiation of adapted and non-adapted populations on the basis of genetic traits remained difficult and such data are hard to interpret, but these studies question the potential for adaptation in these species. The large inter-individual variability might both limit adaptation potential and hamper detection of adaptation in our study. As differences between populations in responses to environmental pollution are likely to be subtle, high inter-individual variability limits the detection of significant differences between populations. Individual behaviour (activity, food selection) greatly affect snail exposure and, as a consequence, induce inter-individual differences in MTE accumulation and negative effects. Moreover, if *C. nemoralis* and *C. aspersus* are characterized by a high phenotypic plasticity, such a trait might hamper adaptation because a large proportion of individuals in the populations could be tolerant via physiological acclimatization, thus limiting the selection of a particular genotype.

Environmental variability (soil properties, MTE concentrations in soil and vegetation) might have also hidden inter-origin differences. Applied protocol complicated the detection of adaptive responses because of spatial and temporal heterogeneity of soil and vegetation MTE levels which are inherent to field conditions. Neighbour microcosms were distant of less than 1 meter but exhibited sometimes variation in MTEs of 2 folds, and in vegetation, we found drastic variations over 7 days only. Thus, determinants of intra-population variability in MTE accumulation and sensitivity may not only been studied in the light of individual physiology, but also through investigation on the role of spatial and temporal heterogeneity of snail exposure.

### III.5.5. Conclusions

Both *C. nemoralis* and *C. aspersus* can be used as sentinel species for active biomonitoring. The 2 species exhibited similar accumulation kinetics for Cd, Pb and Zn, but *C. nemoralis* showed higher MTE internal levels than *C. aspersus* under similar exposure conditions. For survival and MTE bioaccumulation, F1 individuals of two origins varying from geographical region and MTE environmental level did not differ, however, our results plead in favour of a co-occurrence of adaptation and acclimatization to metallic pollution concerning shell development for the 2 studied species. Impacts of ETMs within populations free-living in sites polluted for decades induce adaptation through fine variations of metabolism. These subtle effects on organism responses cannot be detected by classically used measures in ERA and passive biomonitoring (bioaccumulation for instance), and thus necessitate thorough investigations to be revealed. Our study also emphasize the relevance of active biomonitoring to study responses of organisms to environmental contamination, and show the importance to know both individual and population history for reliable interpretation of measures when performing pollution biomonitoring. Investigations of the physiological significance and the relevance as adaptive responses of conchological variations may be promising perspectives to improve understanding of adaptation to MTE exposure in terrestrial gastropod molluscs.

**Acknowledgements** – We gratefully thank Cécile Grand from ADEME (*Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie*) for many fruitful scientific discussions. We also warmly thank Elie Dhivert, Willy Gerbaud, Jean-Claude Lambert, Dominique Rieffel and Nicolas Tête for their technical assistance. The STARTT programme was financially supported by ANR (*Agence Nationale de la Recherche*, contract n°ANR-05-ECCO-004) and ADEME (contract n°0572C0058). Clémentine Fritsch was financially supported by a grant from ADEME and the Conseil Régional de Franche-Comté.

### III.5.6. References

- AFNOR, 1996. Qualité des sols - Méthodes chimiques - sols sédiments, mise en solution totale par attaque acide - NF X31-147. Association Française de Normalisation, Paris, France.
- AFNOR, 1999. Qualité des sols - Méthodes chimiques - Détermination de la capacité d'échange cationique (CEC) et des cations extractibles - NF X31-130. Association Française de Normalisation, Paris, France.
- AFNOR, 2003. Qualité des sols - Détermination de la distribution granulométrique des particules du sol - Méthode à la pipette - NF X31-107. Association Française de Normalisation, Paris, France.
- Arnaud, J.F., Madec, L., Guiller, A., Bellido, A., 2001. Spatial analysis of allozyme and microsatellite DNA polymorphisms in the land snail *Helix aspersa* (Gastropoda : Helicidae). *Molecular Ecology* 10, 1563-1576.
- Baur, A., Baur, B., 1993. Daily movement patterns and dispersal in the land snail *Arianta arbustorum*. *Malacologia* 35, 89-98.
- Beeby, A., 1985. The role of *Helix aspersa* as a major herbivore in the transfer of lead through a polluted ecosystem. *Journal of Applied Ecology* 22, 267-275.
- Beeby, A., Richmond, L., 1988. Calcium metabolism in two populations of the snail *Helix aspersa* on a high lead diet. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 17, 507-511.
- Beeby, A., 1993. The interaction of Pb and Ca assimilation in *Helix aspersa* with wounded shells *Polish Journal of Environmental Studies* 2, 9-13.
- Beeby, A., Richmond, L., 1998. Variation in the mineral composition of eggs of the snail, *Helix aspersa* between populations exposed to different levels of metal contamination. *Environmental Pollution* 101, 25-31.
- Beeby, A., Richmond, L., 2001a. Calcium provision to eggs in two populations of *Helix aspersa* by parents fed a diet high in lead. *Journal of Molluscan Studies* 67, 1-6.
- Beeby, A., Richmond, L., 2001b. Evaluating *Helix aspersa* as a sentinel for mapping metal pollution. *Ecological Indicators* 1, 261-270.
- Beeby, A., Richmond, L., 2001c. Intraspecific competition in populations of *Helix aspersa* with different histories of exposure to lead. *Environmental Pollution* 114, 337-344.
- Beeby, A., 2001. What do sentinels stand for? *Environmental Pollution* 112, 285-298.
- Beeby, A., Richmond, L., 2002. Evaluating *Helix aspersa* as a sentinel for mapping metal pollution. *Ecological Indicators* 1, 261-270.
- Beeby, A., Richmond, L., Herpe, F., 2002. Lead reduces shell mass in juvenile garden snails (*Helix aspersa*). *Environmental Pollution* 120, 283-288.
- Beeby, A., Richmond, L., 2003. Do the soft tissues of *Helix aspersa* serve as a quantitative sentinel of predicted free lead concentrations in soils? *Applied Soil Ecology* 22, 159-165.
- Belfiore, N.M., Anderson, S.L., 1998. Genetic patterns as a tool for monitoring and assessment of environmental impacts: The example of genetic ecotoxicology. *Environmental Monitoring and Assessment* 51, 465-479.
- Bengtsson, G., Ek, H., Rundgren, S., 1992. Evolutionary response of earthworms to long-term metal exposure. *Oikos* 63, 289-297.
- Berger, B., Dallinger, R., 1993. Terrestrial snails as quantitative indicators of environmental metal pollution. *Environmental Monitoring and Assessment* 25, 65-84.
- Bert, V., Macnair, M.R., De Laguerie, P., Saumitou-Laprade, P., Petit, D., 2000. Zinc tolerance and accumulation in metallicolous and nonmetallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *New Phytologist* 146, 225-233.
- Bert, V., Meerts, P., Saumitou-Laprade, P., Salis, P., Gruber, W., Verbruggen, N., 2003. Genetic basis of Cd tolerance and hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*. *Plant and Soil* 249, 9-18.
- Bonneris, E., Giguere, A., Perceval, O., Buronfosse, T., Masson, S., Hare, L., Campbell, P.G.C., 2005. Sub-cellular partitioning of metals (Cd, Cu, Zn) in the gills of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*: role of calcium concretions in metal sequestration. *Aquatic Toxicology* 71, 319-334.
- Boyd, R.S., Davis, M.A., Wall, M.A., Balkwill, K., 2002. Nickel defends the South African hyperaccumulator *Senecio coronatus* (Asteraceae) against *Helix aspersa* (Mollusca : Pulmonidae). *Chemoecology* 12, 91-97.
- Brown, B.E., 1982. The form and function of metal-containing granules in invertebrate tissues. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 57, 621-667.
- Calow, P., 1991. Physiological costs of combating chemical toxicants: Ecological implications. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 100, 3-6.
- Cameron, R.A.D., Williamson, P., 1977. Estimating migration and effects of disturbance in mark-recapture studies on snail *Cepaea nemoralis* L. *Journal of Animal Ecology* 46, 173-179.
- Clemens, S., 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88, 1707-1719.
- Coeurdassier, M., Gomot-de Vauflery, A., Lovy, C., Badot, P.-M., 2002. Is the cadmium uptake from soil important in bioaccumulation and toxic effects for snails. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53, 425-431.
- Crawley, M.J., 2007. *The R book*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, England.

- Dallinger, R., Rainbow, P.S. (Eds.), 1993. Ecotoxicology of metals in invertebrates. Lewis publishers, Boca raton, Florida, USA.
- Dallinger, R., Berger, B., Hunziker, P., Kagi, J.H.R., 1999. Structure and function of metallothionein isoforms in terrestrial snails, in: Klaassen, C.D. (Ed.), Metallothionein Iv. Birkhauser Verlag Ag, Basel, pp. 173-178.
- Dallinger, R., Berger, B., Gruber, C., Hunziker, P., Sturzenbaum, S., 2000. Metallothioneins in terrestrial invertebrates: Structural aspects, biological significance and implications for their use as biomarkers. Cellular and Molecular Biology 46, 331-346.
- Dallinger, R., Lagg, B., Egg, M., Schipflinger, R., Chabicovsky, M., 2004. Cd accumulation and Cd-metallothionein as a biomarker in *Cepaea hortensis* (Helicidae, Pulmonata) from laboratory exposure and metal-polluted habitats. Ecotoxicology 13, 757-772.
- de Vauflery, A., Coeurdassier, M., Pandard, P., Scheifler, R., Lovy, C., Crini, N., Badot, P.-M., 2006. How terrestrial snails can be used in risk assessment of soils. Environmental Toxicology and Chemistry 25, 797-806.
- Douay, F., Pruvot, C., Roussel, H., Ciesielski, H., Fourrier, H., Proix, N., Waterlot, C., 2008. Contamination of urban soils in an area of Northern France polluted by dust emissions of two smelters. Water, Air, and Soil Pollution 188, 247-260.
- Douay, F., Pruvot, C., Waterlot, C., Fritsch, C., Fourrier, H., Lorette, A., Bidar, G., Grand, C., de Vauflery, A., Scheifler, R., 2009. Contamination of woody habitat soils around a former lead smelter in the North of France. Science of the Total Environment 407, 5564-5577.
- Fairbrother, A., Wenstel, R., Sappington, K., Wood, W., 2007. Framework for metals risk assessment. Ecotoxicology and Environmental Safety 68, 145-227.
- Fritsch, C., Scheifler, R., Beaugelin-Seiller, K., Hubert, P., Coeurdassier, M., de Vauflery, A., Badot, P.-M., 2008. Biotic interactions modify the transfer of cesium-137 in a soil-earthworm-plant-snail food web. Environmental Toxicology and Chemistry 27, 1698-1707.
- Fritsch, C., Cosson, R.P., Coeurdassier, M., Raoul, F., Giraudoux, P., Crini, N., de Vauflery, A., Scheifler, R., 2010. Responses of wild small mammals to a pollution gradient: host factors influence metal and metallothionein levels. Environmental Pollution 158, 827-840.
- Fritsch, C., Giraudoux, P., Coeurdassier, M., Douay, F., Raoul, F., Pruvot, C., Waterlot, C., de Vauflery, A., Scheifler, R., *submitted*. Scales and variables affecting the spatial distribution of metals in smelter-impacted woody soils differ between total and extractable concentrations. Chemosphere.
- Gimbert, F., de Vauflery, A., Douay, F., Scheifler, R., Coeurdassier, M., Badot, P.-M., 2006. Modelling chronic exposure to contaminated soil: A toxicokinetic approach with the terrestrial snail *Helix aspersa*. Environment International 32, 866-875.
- Gimbert, F., Vijver, M.G., Coeurdassier, M., Scheifler, R., Peijnenburg, W.J.G.M., Badot, P.M., de Vauflery, A., 2008a. How subcellular partitioning can help to understand heavy metal accumulation and elimination kinetics in snails. Environmental Toxicology and Chemistry 27, 1284-1292.
- Gimbert, F., Mench, M., Coeurdassier, M., Badot, P.-M., de Vauflery, A., 2008b. Kinetic and dynamic aspects of soil-plant-snail transfer of cadmium in the field. Environmental Pollution 152, 736-745.
- Gimbert, F., de Vauflery, A., Douay, F., Coeurdassier, M., Scheifler, R., Badot, P.-M., 2008c. Long-term responses of snails exposed to cadmium-contaminated soils in a partial life-cycle experiment. Ecotoxicology and Environmental Safety 70, 138-146.
- Gomot-de Vauflery, A., Pihan, F., 2000. Growing snails used as sentinels to evaluate terrestrial environment contamination by trace elements. Chemosphere 40, 275-284.
- Gomot-de Vauflery, A., Bispo, A., 2000. Methods for toxicity assessment of contaminated soil by oral or dermal uptake in land snails. 1. Sublethal effects on growth. Environmental Science & Technology 34, 1865-1870.
- Gomot-de Vauflery, A., 2000. Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb, and Pentachlorophenol) with *Helix aspersa*. Ecotoxicology and Environmental Safety 46, 41-50.
- Gomot, A., Gomot, L., Boukraa, S., Bruckert, S., 1989. Influence of soil on the growth of the land snail *Helix aspersa*. An experimental study of the absorption route for the stimulating factors. Journal of Molluscan Studies 55, 1-7.
- Gomot, A., Pihan, F., 1997. Comparison of the bioaccumulation capacities of copper and zinc in two snail subspecies (*Helix*). Ecotoxicology and Environmental Safety 38, 85-94.
- Gomot, A., 1997. Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 33, 209-216.
- Harmsen, J., 2007. Measuring bioavailability: From a scientific approach to standard methods. Journal of Environmental Quality 36, 1420-1428.
- Hendrickx, F., Maelfait, J.-P., Speelmans, M., Van Straalen, N., 2003. Adaptive reproductive variation along a pollution gradient in a wolf spider. Oecologia 134, 189-194.
- Hendrickx, F., Maelfait, J.-P., Bogaert, N., Tojal, C., Du Laing, G., Tack, F.M.G., Verloo, M.G., 2004. The importance of biological factors affecting trace metal concentration as revealed from accumulation patterns in co-occurring terrestrial invertebrates. Environmental Pollution 127, 335-341.
- Hispard, F., de Vauflery, A., Cosson, R.P., Devaux, S., Scheifler, R., Coeurdassier, M., Gimbert, F., Martin, H., Richert, L., Berthelot, A., Badot, P.M., 2008a. Comparison of transfer and effects of Cd on rats exposed in a short experimental snail-rat food chain or to CdCl<sub>2</sub> dosed food. Environment International 34, 381-389.

- Hispard, F., Schuler, D., de Vauflery, A., Scheifler, R., Badot, P.M., Dallinger, R., 2008b. Metal distribution and metallothionein induction after cadmium exposure in the terrestrial snail *Helix aspersa* (gastropoda, pulmonata). *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1533-1542.
- Hobbelen, P.H.F., Koolhaas, J.E., van Gestel, C.A.M., 2006. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* in relation to total and available metal concentrations in field soils. *Environmental Pollution* 144, 639-646.
- Hopkin, S.P., 1989. *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. Elsevier, London, UK.
- Howard, B., Mitchell, P.C.H., Ritchie, A., Simkiss, K., Taylor, M., 1981. The composition of intracellular granules from the metal-accumulating cells of the common garden snail (*Helix aspersa*). *Biochemical Journal* 194, 507-511.
- Huitson, S.B., Macnair, M.R., 2003. Does zinc protect the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* from herbivory by snails? *New Phytologist* 159, 453-459.
- ISO, 1994. Soil quality - Determination of pH - ISO 10390:1994. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 1995a. Soil quality - Determination of carbonate content. Volumetric method - ISO 10693:1995. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 1995b. Soil quality - Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis) - ISO 10694:1995. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 2006. Soil quality - Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae). Determination of the effects on growth by soil contamination - ISO 15952:2006., *Acta Oecologica*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 2008. Soil quality - Requirements and guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials. ISO 17402:2008. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Jordaens, K., De Wolf, H., Vandecasteele, B., Blust, R., Backeljau, T., 2006a. Associations between shell strength, shell morphology and heavy metals in the land snail *Cepaea nemoralis* (Gastropoda, Helicidae). *Science of the Total Environment* 363, 285-293.
- Jordaens, K., De Wolf, H., Van Houtte, N., Vandecasteele, B., Backeljau, T., 2006b. Genetic variation in two land snails, *Cepaea nemoralis* and *Succinea putris* (Gastropoda, Pulmonata), from sites differing in heavy metal content. *Genetica* 128, 227-239.
- Kammenga, J., Laskowski, R. (Eds.), 2000. *Demography in ecotoxicology*. John Wiley & Sons Chichester, UK.
- Kawecki, T.J., Ebert, D., 2004. Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* 7, 1225-1241.
- Kleewein, D., 1999. Population size, density, spatial distribution and dispersal in an Austrian population of the land snail *Arianta arbustorum styriaca* (Gastropoda: Helicidae). *Journal of Molluscan Studies* 65, 303-315.
- Laskowski, R., Hopkin, S.P., 1996a. Accumulation of Zn, Cu, Pb and Cd in the garden snail (*Helix aspersa*): Implications for predators. *Environmental Pollution* 91, 289-297.
- Laskowski, R., Hopkin, S.P., 1996b. Effect of Zn, Cu, Pb, and Cd on fitness in snails (*Helix aspersa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 34, 59-69.
- Lefcort, H., Abbott, D.P., Cleary, D.A., Howell, E., Keller, N.C., Smith, M.M., 2004. Aquatic snails from mining sites have evolved to detect and avoid heavy metals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46, 478-484.
- Lindstrom, M., Bates, D.M., 1990. Nonlinear mixed effects models for repeated measures data. *Biometrics* 46, 673-687.
- Lukasik, P., Laskowski, R., 2007. Increased respiration rate as a result of adaptation to copper in confused flour beetle, *Tribolium confusum* Jacquelin du Val. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 79, 311-314.
- Meers, E., Samson, R., Tack, F.M.G., Ruttens, A., Vandegheuchte, M., Vangronsveld, J., Verloo, M.G., 2007. Phytoavailability assessment of heavy metals in soils by single extractions and accumulation by *Phaseolus vulgaris*. *Environmental and Experimental Botany* 60, 385-396.
- Menta, C., Parisi, V., 2001. Metal concentrations in *Helix pomatia*, *Helix aspersa* and *Arion rufus*: A comparative study. *Environmental Pollution* 115, 205-208.
- Monteiro, M.S., Santos, C., Soares, A., Mann, R.M., 2008. Does subcellular distribution in plants dictate the trophic bioavailability of cadmium to *Porcellio dilatatus* (Crustacea, Isopoda)? *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 2548-2556.
- Morgan, A.J., Kille, P., Stårzenbaum, S.R., 2007. Microevolution and ecotoxicology of metals in invertebrates. *Environmental Science and Technology* 41, 1085-1096.
- Mulvey, M., Newman, M.C., Beeby, A.N., 1996. Genetic and conchological comparison of snails (*Helix aspersa*) differing in shell deposition of lead. *Journal of Molluscan Studies* 62, 213-223.
- Nahmani, J., Hodson, M.E., Devin, S., Vijver, M.G., 2009. Uptake kinetics of metals by the earthworm *Eisenia fetida* exposed to field-contaminated soils. *Environmental Pollution* 157, 2622-2628.
- Notten, M.J.M., Oosthoek, A.J.P., Rozema, J., Aerts, R., 2005. Heavy metal concentrations in a soil-plant-snail food chain along a terrestrial soil pollution gradient. *Environmental Pollution* 138, 178-190.
- Notten, M.J.M., Oosthoek, A.J.P., Rozema, J., Aerts, R., 2006. Heavy metal pollution affects consumption and reproduction of the landsnail *Cepaea nemoralis* fed on naturally polluted *Urtica dioica* leaves. *Ecotoxicology* 15, 295-304.

- Peakall, D., Burger, J., 2003. Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 110-121.
- Peijnenburg, W., Baerselman, R., de Groot, A.C., Jager, T., Posthuma, L., Van Veen, R.P.M., 1999. Relating environmental availability to bioavailability: Soil-type-dependent metal accumulation in the oligochaete *Eisenia andrei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44, 294-310.
- Peijnenburg, W.J.G.M., Jager, T., 2003. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 63-77.
- Pfenninger, M., 2002. Relationship between microspatial population genetic structure and habitat heterogeneity in *Pomatias elegans* (OF Muller 1774) (Caenogastropoda, Pomatiasidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 76, 565-575.
- Pihan, F., de Vauflery, A., 2000. The snail as a target organism for the evaluation of industrial waste dump contamination and the efficiency of its remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46, 137-147.
- Pinheiro, J.C., Bates, D.M., 2000. *Mixed-effects Models in S and S-PLUS*. Springer-Verlag, New-York, USA.
- Posthuma, L., Van Straalen, N.M., 1993. Heavy metal adaptation in terrestrial invertebrates - A review of occurrence, genetics, physiology and ecological consequences. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* 106, 11-38.
- Quensen, J.F., Woodruff, D.S., 1997. Associations between shell morphology and land crab predation in the land snail *Cerion*. *Functional Ecology* 11, 464-471.
- R Development Core Team, 2006. R: A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org>, Vienna, Austria.
- Regoli, F., Gorbi, S., Fattorini, D., Tedesco, S., Notti, A., Machella, N., Bocchetti, R., Benedetti, M., Piva, F., 2006. Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: An integrated approach. *Environmental Health Perspectives* 114, 63-69.
- Ritz, C., Streibig, J.C., 2008. *Nonlinear regression with R*. Springer-Verlag, New-York, NY, USA.
- Roelofs, D., Janssens, T.K.S., Timmermans, M.J.T.N., Nota, B., Marien, J., Bochdanovits, Z., Ylstra, B., Van Straalen, N.M., 2009. Adaptive differences in gene expression associated with heavy metal tolerance in the soil arthropod *Orchesella cincta*. *Molecular Ecology* 18, 3227-3239.
- Rozen, A., 2006. Effect of cadmium on life-history parameters in *Dendrobaena octaedra* (Lumbricidae: Oligochaeta) populations originating from forests differently polluted with heavy metals. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 489-503.
- Russell, L.K., de Haven, J.J., Botts, R.P., 1981. Toxic effects of cadmium on the garden snail (*Helix aspersa*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 26.
- Sarret, G., Saumitou-Laprade, P., Bert, V., Proux, O., Hazemann, J.L., Traverse, A.S., Marcus, M.A., Manceau, A., 2002. Forms of zinc accumulated in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiology* 130, 1815-1826.
- Scheifler, R., Gomot-de Vauflery, A., Toussaint, M., Badot, P.-M., 2002. Transfer and effects of cadmium in an experimental food chain involving the snail *Helix aspersa* and the predatory carabid beetle *Chrysocarabus splendens*. *Chemosphere* 48, 571-579.
- Scheifler, R., Ben Brahim, M., Gomot-de Vauflery, A., Carnus, J.-M., Badot, P.-M., 2003. A field method using microcosms to evaluate transfer of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn from sewage sludge amended forest soils to *Helix aspersa* snails. *Environmental Pollution* 122, 343-350.
- Scheifler, R., de Vauflery, A., Coeurdassier, M., Crini, N., Badot, P.M., 2006. Transfer of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn in a soil-plant-invertebrate food chain: A microcosm study. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 815-822.
- Schilthuisen, M., Van Til, A., Salverda, M., Liew, T.S., James, S., Bin Elahan, B., Vermeulen, J.J., 2006. Microgeographic evolution of snail shell shape and predator behavior. *Evolution* 60, 1851-1858.
- Schweiger, O., Frenzel, M., Durka, W., 2004. Spatial genetic structure in a metapopulation of the land snail *Cepaea nemoralis* (Gastropoda : Helicidae). *Molecular Ecology* 13, 3645-3655.
- Shirley, M.D.F., Sibly, R.M., 1999. Genetic basis of a between-environment trade-off involving resistance to cadmium in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 53, 826-836.
- Sidoumou, Z., GnassiaBarelli, M., Romeo, M., 1997. Cadmium and calcium uptake in the mollusc *Donax rugosus* and effect of a calcium channel blocker. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 58, 318-325.
- Smith, R., Pollard, S.J.T., Weeks, J.M., Nathanail, C.P., 2006. Assessing harm to terrestrial ecosystems from contaminated land. *Soil Use and Management* 21, 527-540.
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., 1999. Comparisons of metal accumulation and excretion kinetics in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to contaminated field and laboratory soils. *Applied Soil Ecology* 11, 227-243.
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., 2000. The development of genetically inherited resistance to zinc in laboratory-selected generations of the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution* 109, 193-201.
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourier, H., Perdrix, E., 2002. Assessment of the contamination of cultivated soils by eighteen trace elements around smelters in the North of France. *Water, Air, and Soil Pollution* 135, 173-194.
- Tannenbaum, L.V., 2005. A critical assessment of the ecological risk assessment process: a review of misapplied concepts. *Integrated environmental assessment and management*. 1, 66-72.
- Tranvik, L., Bengtsson, G., Rundgren, S., 1993. Relative abundance and resistance traits of two Collembola species under metal stress. *Journal of Applied Ecology* 30, 43-52.

- Van Gestel, C.A.M., 2008. Physico-chemical and biological parameters determine metal bioavailability in soils. *Science of the Total Environment* 406, 385-395.
- Veltman, K., Huijbregts, M.A.J., Hendriks, A.J., 2008. Cadmium bioaccumulation factors for terrestrial species: Application of the mechanistic bioaccumulation model OMEGA to explain field data. *Science of the Total Environment* 406, 413-418.
- Verkleij, J.A.C., Golan-Goldhirsh, A., Antosiewicz, D.M., Schwitzguébel, J.-P., Schröder, P., 2009. Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts. *Environmental and Experimental Botany* 67, 10-22.
- Viard, W., Pihan, F., Promeyrat, S., Pihan, J.C., 2004. Integrated assessment of heavy metal (Pb, Zn, Cd) highway pollution: bioaccumulation in soil, Gramineae and land snails. *Chemosphere* 55, 1349-1359.
- Vijver, M.G., Van Gestel, C.A.M., Lanno, R.P., Van Straalen, N.M., Peijnenburg, W.J.G.M., 2004. Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: A review. *Environmental Science and Technology* 38, 4705-4712.
- Wallace, W.G., Lopez, G.R., 1996. Relationship between subcellular cadmium distribution in prey and cadmium trophic transfer to a predator. *Estuaries* 19, 923-930.
- Wallace, W.G., Lopez, G.R., Levinton, J.S., 1998. Cadmium resistance in an oligochaete and its effect on cadmium trophic transfer to an omnivorous shrimp. *Marine Ecology Progress Series* 172, 225-237.
- Wallace, W.G., Luoma, S.N., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). *Marine Ecology Progress Series* 257, 125-137.
- Williamson, P., 1980. Variables affecting body burdens of lead, zinc and cadmium in a roadside population of the snail *Cepaea hortensis* Müller. *Oecologia* 44, 213-220.
- Zhao, F.J., Jiang, R.F., Dunham, S.J., McGrath, S.P., 2006. Cadmium uptake, translocation and tolerance in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *New Phytologist* 172, 646-654.

# **PARTIE 4**

---

## **DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES**





---

## IV.1. SYNTHÈSE DES RESULTATS

---

Les réponses des organismes à la contamination de leur environnement sont conditionnées par de nombreux facteurs biologiques et environnementaux. Elles peuvent par conséquent présenter une forte variabilité dans l'espace, le temps mais aussi entre individus et populations. La compréhension des mécanismes de transfert et d'effets des polluants dans les écosystèmes terrestres nécessite d'être approfondie d'un point de vue fondamental et appliqué pour améliorer les procédures d'ERE. Le développement d'approches placées sous l'angle de l'écologie du stress et de l'écologie du paysage paraît pertinent et nécessaire pour atteindre ce but. Dans ce contexte, cette thèse avait pour objectif (i) d'identifier les principaux facteurs expliquant la contamination des sols, les concentrations en ETM dans les espèces retenues et de déterminer à quelles échelles spatiales ces facteurs interviennent ; (ii) de mesurer les réponses des espèces étudiées à différents niveaux d'organisation biologique et de rechercher des liens entre réponses individuelles et/ou populationnelles.

Les résultats apportés montrent l'implication de différents facteurs individuels (espèce, âge, sexe) et environnementaux (distribution des contaminations des sols, paysage) dans les réponses des organismes à la pollution de l'environnement. Les principaux résultats de la thèse sont présentés ci-après dans un schéma synthétique (Figure IV.1.1).

La distribution spatiale des concentrations en ETMs dans les sols diffère entre totales et extraites au  $\text{CaCl}_2$ , et les contaminations sont influencées par des variables agissant à différentes échelles. Les concentrations totales sont surtout dépendantes de la distance à Metaleurop, du vent et de la MO dans les sols, tandis que les concentrations extractibles dépendent principalement des paramètres pédologiques (pH notamment), et dans une moindre mesure, des concentrations totales. Les contaminations des sols sont modulées par l'usage du sol et le paysage. Les concentrations internes en ETMs chez des invertébrés et des vertébrés augmentent avec les concentrations totales en ETMs dans les sols. Les caractéristiques écologiques (régime alimentaire, préférences d'habitat) et physiologiques (capacités d'accumulation et d'excrétion) des récepteurs semblent conditionner la bioaccumulation des ETMs. Le paysage influence l'accumulation des ETMs et pourrait de plus expliquer la présence/l'absence de certaines espèces dans les milieux les plus pollués. Les micromammifères présentent des capacités de tolérance à l'exposition aux ETMs via la production de MTs, et des différences inter-spécifiques fortes existent, entraînant chez certaines espèces une sensibilité réduite. Les caractéristiques individuelles des récepteurs (âge et sexe), modulent leurs réponses à la contamination. Des variations inter-saisonniers et inter-annuelles dans les concentrations internes ont été mises en évidence chez le Campagnol roussâtre. Les populations autochtones d'escargots semblent montrer des capacités d'acclimatation et d'adaptation à la pollution métallique. Ces traits de tolérance et de résistance ne sont pas détectés pour la bioaccumulation des ETMs (cinétiques d'accumulation) mais concernent le développement de la coquille.

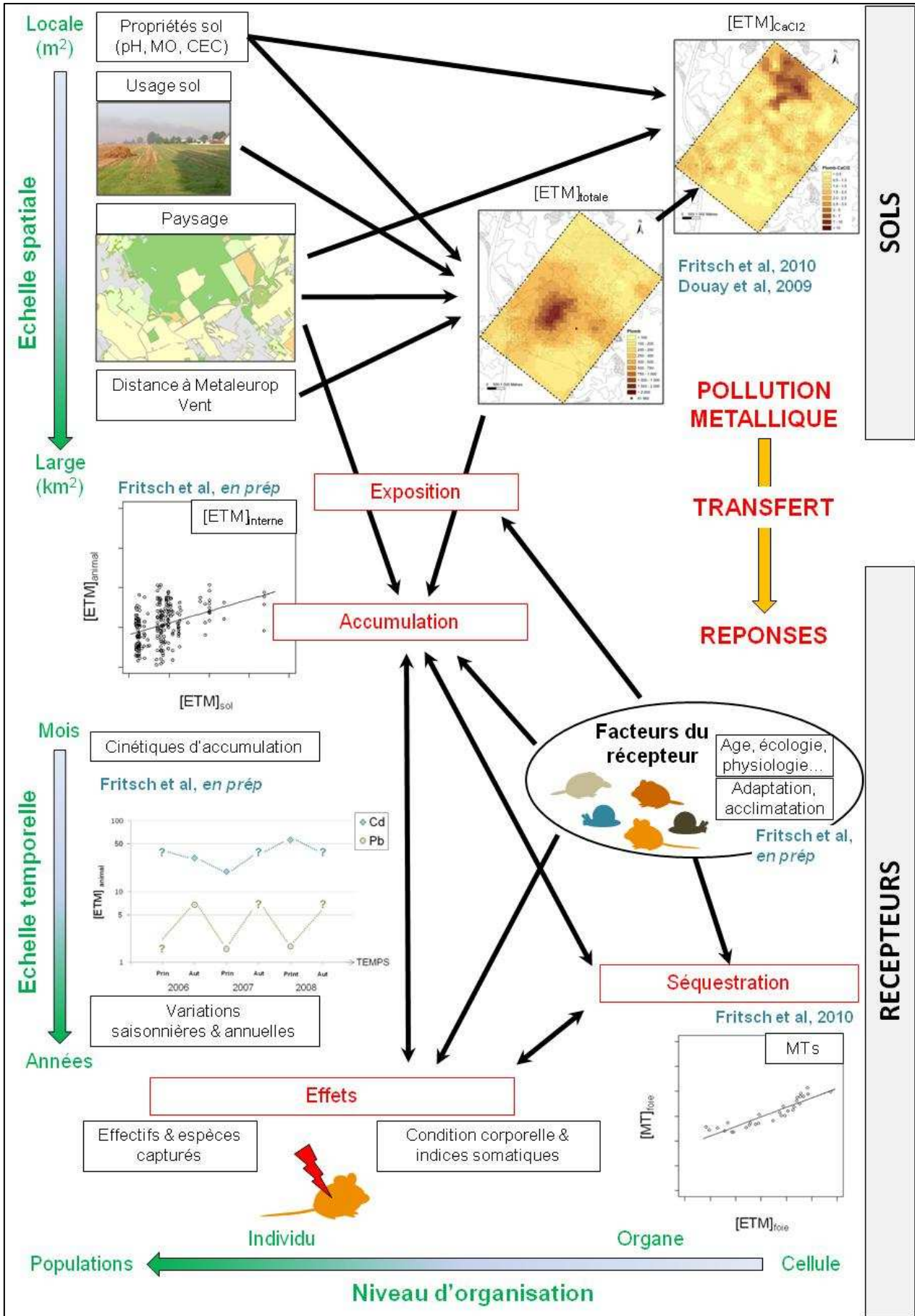


Figure IV.1.1. Représentation schématique synthétique des principaux résultats de la thèse.

---

## IV.2. DISCUSSION

---

### IV.2.1. Transfert des ETMs dans les réseaux trophiques

#### IV.2.1.a. Bioaccumulation des ETMs

Les concentrations en ETMs mesurées en un lieu, dans les sols comme dans les récepteurs, sont expliquées par des facteurs agissant à différentes échelles spatiales. En effet, on peut observer une forte hétérogénéité à large échelle (plusieurs km<sup>2</sup>), entre les sites les moins contaminés, éloignés de l'usine, et les plus contaminés, aux alentours de Metaleurop Nord. A une échelle plus locale (dizaines ha), les contaminations varient entre des mailles proches, en raison du paysage et de l'influence du vent notamment. Enfin, à une échelle très locale (dizaine m<sup>2</sup>), au sein de la maille, les contaminations varient également dans l'espace, ce qui semble en lien probablement avec l'occupation du sol, les paramètres pédologiques et les caractéristiques des récepteurs (espèce, âge, sexe) (Figures IV.1.1 et IV.2.1).

En étudiant la structure spatiale des concentrations rénales et hépatiques en Cd de l'Elan en Suède, Danielsson & Frank ont montré une augmentation de l'hétérogénéité des concentrations à large échelle, au-delà de la surface du domaine vital (25 km), liée aux variables environnementales et notamment à la contamination en Cd de l'environnement. Ils ont par ailleurs mis en évidence des différences inter-individuelles approximativement stables en deçà de 25 km, avec un fort effet pépité (dans une gamme de distance de 1 à 25 km, les plus fortes variances sont observées pour des individus distants de moins de 2 km), indiquant une hétérogénéité à échelle locale liée aux différences inter-individuelles d'exposition et d'accumulation, partiellement expliquées par l'âge et le sexe (Danielsson and Frank, 2009). Ainsi, les résultats acquis dans notre travail et dans un cadre très différent en termes de type de contamination, de récepteurs étudiés et de surfaces prospectées, mettent en lumière des patrons de structuration spatiale des concentrations internes en ETMs chez les récepteurs similaires.

Ces conclusions démontrent l'intérêt des approches multi-échelles pour l'étude des transferts de contaminants chimiques dans les écosystèmes terrestres, et peuvent être rapprochées des conclusions issues des études des transferts des contaminants biologiques (Giraudoux et al., 2002; Danson et al., 2003; Kitron et al., 2006).

Dans notre étude, nous avons montré que la bioaccumulation des ETMs dépend de la contamination de l'environnement, du paysage et des caractéristiques des récepteurs. Des interactions modulant l'exposition et les capacités d'accumulation des récepteurs existent entre ces différents paramètres, et conditionnent le transfert trophique des ETMs dans les écosystèmes.

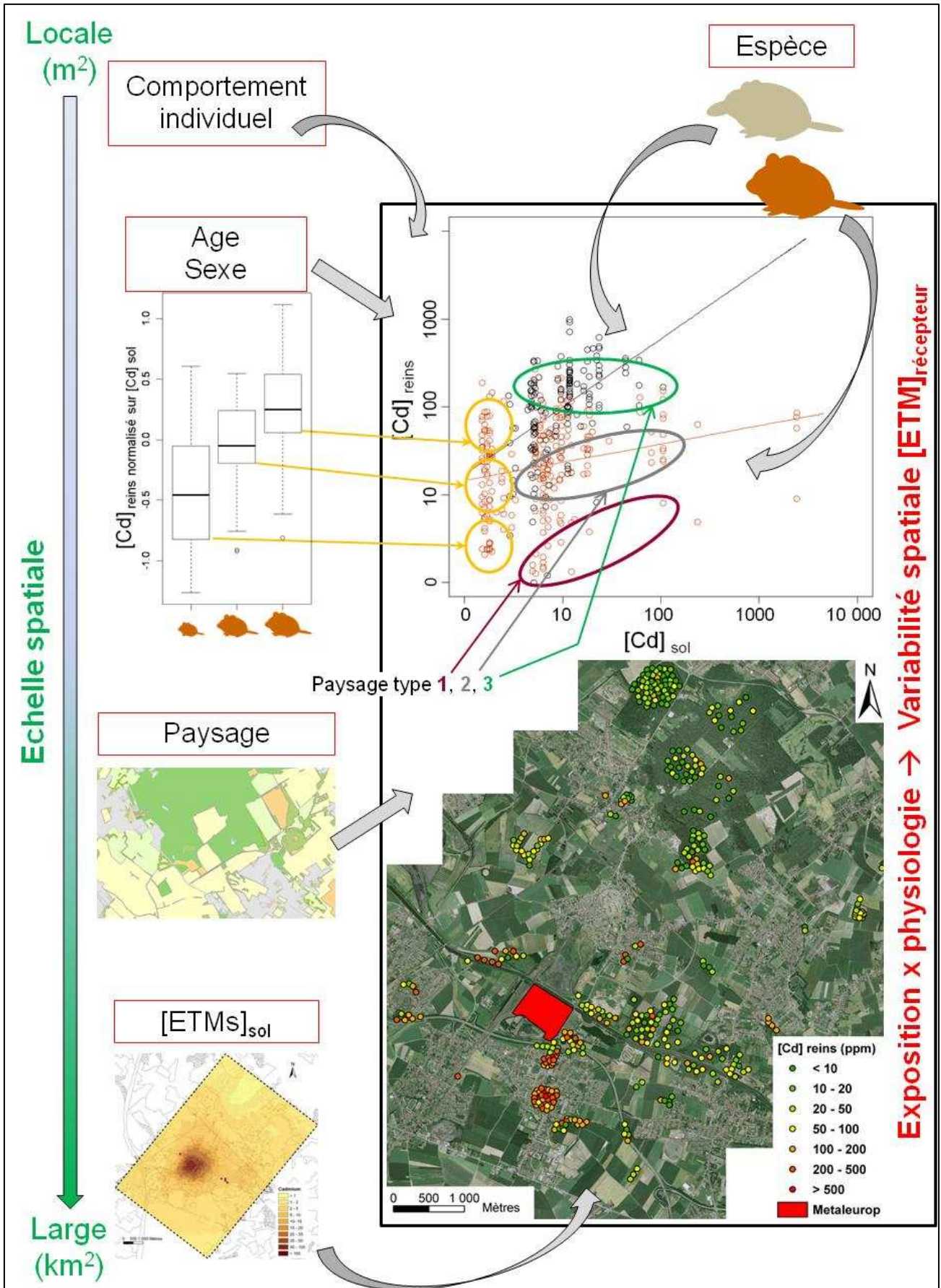


Figure IV.2.1. Variabilité spatiale des concentrations en ETMs dans les récepteurs.

### Relations entre concentrations en ETMs dans les sols et les récepteurs

Considérant l'ensemble des données acquises dans le cadre de la thèse et du programme STARTT, les concentrations internes en Cd, Pb et Zn dans les invertébrés (escargots) et les vertébrés (micromammifères) augmentent avec les concentrations totales en ETMs des sols (Dhivert, 2008; Paris, 2009). Par conséquent, la distribution spatiale des concentrations en ETMs des récepteurs dépend en grande partie des contaminations totales des sols.

Les équations décrivant les relations entre concentrations internes chez les micromammifères ou les escargots et les concentrations en ETMs dans les sols établies dans nos travaux et dans d'autres études présentent des valeurs de paramètres globalement du même ordre de grandeur, mais parfois supérieures ou inférieures selon le métal considéré, l'espèce, de la saison ou l'organe considéré (Shore, 1995; Sample et al., 1998; Notten et al., 2005; Veltman et al., 2007). Les études conduites dans les plaines inondables contaminées d'Afferdensche en Deestsche Waarden, en Hollande, présentent des résultats partiellement contradictoires avec nos propres constats et avec les méta-analyses présentées dans la littérature (Wijnhoven et al., 2007; Schipper et al., 2008). Les auteurs ont montré en effet de faibles relations entre les concentrations en ETMs des micromammifères et des sols, et une faible implication de l'hétérogénéité spatiale de l'exposition sur l'accumulation du Cd chez différents vertébrés.

L'accumulation des ETMs chez les micromammifères et les escargots exposés de manière chronique sur un site contaminé ne semble donc pas figée, mais varie dans l'espace (entre sites, et entre paysages au sein d'un site) et dans le temps (effets saisonniers entre autres). Les divergences relevées entre les différents travaux rendent difficiles toute tentative de généralisation et font apparaître que les patrons d'exposition des récepteurs aux contaminations des sols en ETMs varient considérablement avec les caractéristiques environnementales des sites considérés (caractéristiques des sols, niveaux de contamination, paysage, barrières physiques ou écologiques...). Ces caractéristiques environnementales influencent non seulement les patrons d'exposition mais aussi les transferts entre compartiments biotiques à travers des réseaux trophiques variés d'un site à l'autre. Un tel phénomène a été remarqué pour des invertébrés (amphipodes et araignées), les caractéristiques biologiques des espèces mais aussi les caractéristiques écologiques des sites eux-mêmes influençant la contamination des organismes (Hendrickx et al., 2004). On peut distinguer des patrons majeurs : (i) une faible relation à la contamination du sol (très forte variabilité inter-individuelle, le facteur de bioaccumulation sol-animal varie sur une très large gamme), (ii) une forte dépendance des concentrations internes à la contamination des sols, qui se caractérise aussi par les valeurs de niveaux (facteur de bioaccumulation sol-animal fort ou faible) et l'intensité de l'augmentation le long du gradient de pollution (facteur de bioaccumulation sol-animal : (a) augmente ou stable le long du gradient = intense augmentation, (b) diminue le long du gradient = faible augmentation ou absence d'augmentation). Si la contamination des sols constitue, d'après nos travaux, la variable déterminant la plus grande part de la variabilité des contaminations des organismes (par rapport

au paysage ou à l'âge et au sexe), une part significative (plus de 50%) de la variance intraspécifique des concentrations internes en ETMs reste inexpliquée.

#### Influence du paysage et interactions avec l'écologie des récepteurs

Les concentrations en ETMs dans les sols varient non seulement avec l'occupation du sol du point de prélèvement, mais aussi selon la composition du paysage environnant le point.

Le paysage affecte les concentrations internes mesurées dans les récepteurs : à la fois sur les niveaux internes d'ETMs mais aussi sur le patron d'augmentation des concentrations internes avec la contamination du sol. Nos travaux soulignent l'influence des caractéristiques écologiques sur la bioaccumulation des ETMs chez plusieurs espèces. Ils suggèrent en outre que le paysage module l'exposition en exerçant une influence sur la manière dont les organismes exploitent spatialement leur environnement. Par ailleurs, le paysage influence la présence de « points chauds » de contamination. L'effet paysager sur l'exposition paraît donc double : en modulant la répartition spatiale des contaminations et la présence de « points chauds », et en affectant la présence, les déplacements et les temps de résidence des animaux donc la probabilité et l'intensité du contact entre récepteur et polluant. Les abondances des différentes espèces au sein des assemblages semblent être en partie déterminées par le paysage. A ce titre, l'exposition des animaux est donc influencée par le paysage puisqu'il conditionne leur présence ou leur absence. Il apparaît en effet que la survie des espèces de différents groupes (diptères, carabes et micromammifères) peut être déterminée à l'échelle du site par la qualité de l'habitat, et à l'échelle du paysage par des processus liés au métapopulations, à la connectivité et à la disponibilité des habitats (Burel et al., 2004).

Certains travaux ont suggéré que l'exploitation spatiale du milieu par les récepteurs peut moduler l'exposition et conduire à de faibles relations entre concentrations internes et concentrations dans les sols au point de capture des animaux (Wijnhoven et al., 2007; Van den Brink et al., 2008). Grâce à la comparaison de 2 micromammifères dont les préférences d'habitat diffèrent, dans plusieurs paysages, nous avons montré des patrons d'accumulation des ETMs contrastés laissant supposer une influence effective de la manière dont les organismes exploitent leur environnement sur l'hétérogénéité spatiale de leur exposition.

L'influence de l'hétérogénéité spatiale de l'habitat sur l'exposition a surtout été étudiée à l'échelle des différences entre habitats (Hope, 2000; 2001; Kooistra et al., 2001; Kooistra et al., 2005; Purucker et al., 2007; Schipper et al., 2008; Vermeulen et al., 2009a; Loos et al., *In press*), et montre des résultats parfois contrastés, suggérant selon les cas que l'accumulation des polluants est faiblement ou fortement influencée par l'hétérogénéité spatiale du milieu. Nos travaux apportent un nouvel angle de vue sur l'influence de l'hétérogénéité spatiale du milieu sur la bioaccumulation des ETMs, en montrant non plus des différences au niveau des habitats d'une zone polluée, mais des différences au niveau de la mosaïque d'habitat. Ces 2 échelles de perception, habitat et mosaïques d'habitats, expliquent de manière complémentaire la variabilité spatiale de l'exposition des organismes aux pollutions de l'environnement.

Cette étude apporte par ailleurs de nouvelles indications sur l'implication de l'écologie des récepteurs dans leur exposition aux contaminants. Les préférences d'habitat et la manière dont les animaux exploitent leur environnement semblent expliquer en partie les différences interspécifiques d'accumulation des ETMs. Jusqu'à présent, la prise en compte des caractéristiques écologiques des récepteurs pour l'évaluation de l'exposition et de la bioaccumulation se basait quasi-exclusivement sur la considération de leur régime alimentaire (lequel est par ailleurs souvent insuffisamment connu) et parfois de la taille de leur domaine vital. Des travaux récents tentent de pallier à ce manque en développant des études de modélisation de l'exposition prenant en compte le régime alimentaire, mais aussi le comportement alimentaire, la préférence d'habitat et les déplacements (Hope, 2000; 2001; Kooistra et al., 2001; Gaines et al., 2005; Kooistra et al., 2005; Topping et al., 2005; Purucker et al., 2007; Schipper et al., 2008). Cependant, ces travaux se basent sur des modèles de déplacement individus-centrés, les calculs d'exposition et d'accumulation obtenus étant rarement vérifiés sur le terrain et ne permettant pas de clarifier l'influence des paramètres considérés. Nos résultats prouvent la réalité des hypothèses formulées pour la création de ces modèles, et soulignent par conséquent la nécessité de poursuivre la prise en compte de l'hétérogénéité spatiale de l'exposition et de l'accumulation par des mesures *in situ* aidant à développer et valider des modèles pertinents.

Notre étude met en évidence pour la première fois avec des données acquises *in situ*, une influence du paysage sur l'accumulation des ETMs chez les récepteurs, mais de plus amples recherches sont nécessaires pour améliorer la compréhension des mécanismes sous-jacents que reflète l'influence du paysage. En effet, la prise en compte du paysage présente un aspect intégrateur, de nombreux processus tenant place à ce niveau d'organisation biologique sont susceptibles d'avoir un impact sur l'exposition des organismes aux ETMs et sur leur bioaccumulation.

Ainsi, il semble probable que l'exposition des organismes varie entre paysages également à cause de différences de régime alimentaire liées à la disponibilité des proies et/ou à la structure des réseaux trophiques. Des travaux récents portant sur la modélisation de l'exposition du Hérisson aux polluants métalliques, ont développé des approches spatiales basées sur la mesure des déplacements des animaux, leur comportement, et les contaminations en polluants des sols et des proies dans différents types d'habitats (Vermeulen, 2009). Les auteurs soulignent que ce type d'approche ne permet pas à ce jour d'extrapoler des concentrations internes correctes à partir des modèles d'exposition, en raison principalement du manque de connaissances sur le régime alimentaire.

Nous avons montré ici une influence plus forte de l'hétérogénéité spatiale de l'exposition, liée à la variabilité spatiale des contaminations des sols et du paysage, que dans d'autres études (Schipper et al., 2008). Mais comme dans ces travaux, nous avons également mis en évidence qu'une large part de la variabilité intra-spécifique des concentrations internes en ETMs reste inexpliquée. Cette part de variabilité est probablement liée à des variations individuelles des traits



intra-spécifiques, ces variations étant d'ordre physiologique et/ou comportemental (Schipper et al., 2008).

#### Différences inter-spécifiques et inter-individuelles dans l'accumulation des ETMs

Ce travail montre l'importance des facteurs du récepteur sur la bioaccumulation des ETMs, et l'existence d'interactions entre ces facteurs. L'âge est un paramètre extrêmement important pour expliquer les concentrations internes des micromammifères et des escargots, parfois plus important que les contaminations environnementales. L'augmentation des concentrations internes en Pb dans les tissus mous avec l'âge n'avait jusqu'à présent pas été montrée de manière certaine chez les micromammifères insectivores (Shore and Rattner, 2001), mais nos résultats montrent qu'une telle augmentation existe chez les musaraignes du genre *Sorex* mais pas chez les rongeurs ni chez les musaraignes du genre *Crocidura*. Par conséquent, même pour des variables individuelles relativement bien connues pour influencer l'accumulation des ETMs, des travaux restent nécessaires afin de caractériser leur implication chez certaines espèces. L'influence de l'âge semble fortement liée au fait qu'il traduit la durée d'exposition aux ETMs, son influence en termes physiologiques (absorption, dilution par la croissance, excrétion...) et comportementaux (déplacements, régime alimentaire) mérite de futures investigations. Les résultats concernant l'influence du sexe sont plus contrastés, ce paramètre interagit probablement avec d'autres facteurs individuels et doit être plus amplement étudié.

Les différences physiologiques d'accumulation entre les espèces sont un facteur capital pour expliquer les concentrations internes, aussi important que l'exposition. La mesure des concentrations accumulées représente un paramètre intégrateur de différents processus, et ne reflète pas seulement l'exposition mais aussi les capacités physiologiques intrinsèques des organismes à stocker les polluants (Burger et al., 2003; Fairbrother et al., 2007; Smith et al., 2007). Les mesures des concentrations internes reflètent réellement l'exposition si le métal n'est pas régulé et si l'on tient compte des durées d'exposition, grossièrement en considérant l'âge ou plus finement en suivant les cinétiques d'accumulation. Par conséquent, les différentes capacités d'accumulation des ETMs par les organismes masquent en partie l'effet de leur mobilité spatiale sur leurs concentrations internes en ETMs. En outre, il apparaît des différences entre taxons mais aussi entre espèces d'un même taxon : les différences inter-spécifiques sont fortes et ne reposent pas seulement sur le régime alimentaire. Globalement, les carnivores présentent des concentrations internes plus fortes que les omnivores ou herbivores/granivores, tant pour les escargots que pour les micromammifères, ce qui est plutôt bien connu bien que cela ait rarement été étudié chez les escargots (Heikens et al., 2001; Shore and Rattner, 2001; Ramade, 2007). Cependant, des espèces appartenant aux mêmes taxons et ayant des régimes alimentaires comparables (Mulot sylvestre et Campagnol roussâtre, ou Escargot petit-gris et Escargot des bois) montrent des disparités d'accumulation des ETMs.

Les prédictions d'accumulation basées uniquement sur le régime alimentaire des espèces (herbivore, insectivore...), qui sont fréquemment proposées pour l'évaluation des risques (Sample

et al., 1998; Veltman et al., 2007), semblent peu pertinentes au vu des différences interspécifiques. D'autre part, une mesure quantitative et non plus seulement qualitative du régime alimentaire pourrait permettre d'améliorer la prise en compte de cette variable (van den Brink, 2009). Même en tenant compte du niveau d'exposition, de l'espèce, de l'âge et du sexe, les concentrations internes en ETMs non-essentiels montrent une forte variabilité inter-individuelle, sans doute en lien avec la physiologie des individus (différences génétiques et phénotypiques, statut nutritionnel, reproduction...) mais aussi avec leur comportement (activité, comportement alimentaire, déplacements...). Afin d'améliorer la compréhension de l'accumulation des ETMs, et ainsi de pouvoir en affiner la prédiction, il serait nécessaire de développer l'étude des facteurs individuels liés au comportement (alimentaire et spatial) qui déterminent l'exposition.

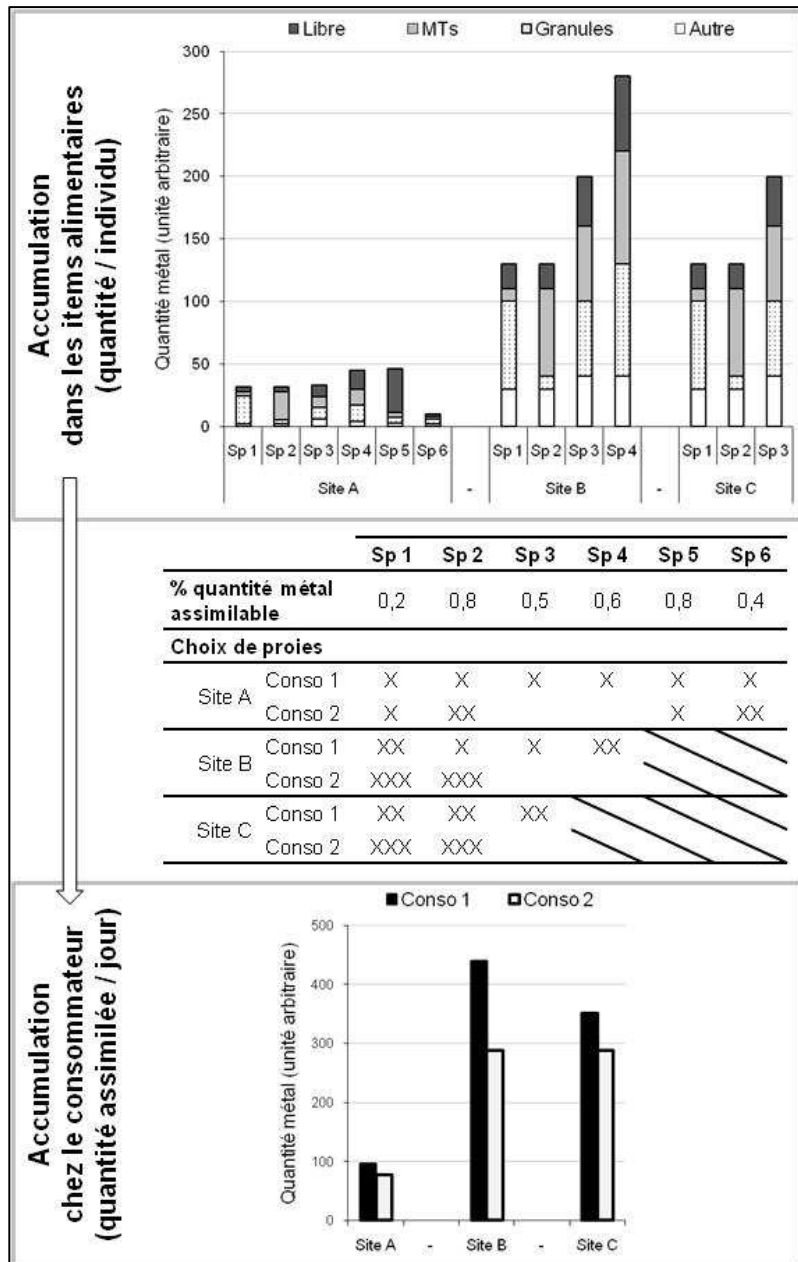
#### IV.2.1.b. Transfert trophique

Nous avons montré que les concentrations internes des récepteurs augmentent avec les concentrations totales en ETMs dans les sols, mais ne sont pas ou peu, corrélées aux concentrations en ETMs extractibles au  $\text{CaCl}_2$ . Pourtant, les concentrations extractibles au  $\text{CaCl}_2$  auraient pu le transfert des ETMs dans les réseaux trophiques puisqu'elles sont considérées comme une mesure pertinente de la biodisponibilité du Cd, du Pb et du Zn pour certains invertébrés du sol et plantes constituant les items alimentaires des organismes étudiés (Baker et al., 2003; Peijnenburg and Jager, 2003; Harmsen, 2007; Meers et al., 2007; ISO, 2008). D'autres études récentes mettent en évidence que les concentrations accumulées chez les micromammifères et les escargots autochtones dépendent plus des concentrations totales en ETMs qu'extractibles (Rogival et al., 2007b; Van Gestel, 2008). De plus, les études *in situ* sur l'accumulation des ETMs chez les oligochètes et dans la végétation montrent que la disponibilité dans les sols, estimée par extraction chimique, n'est pas le facteur déterminant expliquant les niveaux accumulés (Hobbelen et al., 2006; Bleeker and van Gestel, 2007; Migeon et al., 2009). Le caractère dynamique des processus d'exposition et d'accumulation peuvent être à l'origine de ces conclusions (Van Gestel, 2008). Notamment, ceci peut être en lien avec la diversité des voies d'exposition (Coeurdassier et al., 2002; Scheifler et al., 2006b; Smith et al., 2007), la diversité et la disponibilité des ressources alimentaires (Hendrickx et al., 2004) et/ou dû au fait que les facteurs qui affectent le transfert aux consommateurs ne sont pas seulement liés à la disponibilité des ETMs dans les sols, mais aussi à leur disponibilité dans les items alimentaires (Hopkin, 1989; Wallace and Luoma, 2003; Vijver et al., 2004; Monteiro et al., 2008). Il apparaît que les facteurs qui déterminent la partition des ETMs dans le sol expliquent bien leur biodisponibilité pour les producteurs primaires et les détritivores, mais ne permettent pas d'évaluer la biodisponibilité pour des organismes de niveau trophique supérieur, consommateurs primaires ou secondaires et les transferts des ETMs dans les réseaux trophiques.

Des résultats complémentaires acquis dans le cadre du programme STARTT montrent que les vertébrés (micromammifères, oiseaux) vivant sur le site de Metaleurop sont exposés aux ETMs

par ingestion de nourriture contaminée, et que l'augmentation des concentrations accumulées avec la pollution des sols est au moins en partie liée à l'augmentation des concentrations dans les items alimentaires. En effet, des études préliminaires ont été réalisées sur la composition et la contamination du régime alimentaire d'une partie des micromammifères capturés (Drouhot, 2008; Prudent, 2009). Les concentrations en ETMs des contenus stomacaux et des fécès augmentent avec les concentrations en ETMs dans les sols (sauf Zn chez les musaraignes). L'accumulation des ETMs dans les organismes semble donc liée à un transfert dans les réseaux trophiques. Un autre facteur déterminant pour le transfert trophique concerne la biodisponibilité des ETMs dans les compartiments biotiques. Une telle hypothèse a été proposée de longue date, mais a été peu étudiée dans les réseaux trophiques terrestres (Hopkin, 1989). Les réponses physiologiques des végétaux et des animaux à la contamination métallique du milieu, à travers la mise en place de mécanismes de tolérance, peut se traduire par des modifications de la séquestration des ETMs, et les capacités de séquestration varient entre espèces (Posthuma and Van Straalen, 1993; Kammenga and Laskowski, 2000; Vijver et al., 2004; Clemens, 2006; Verkleij et al., 2009). Or la bioaccessibilité des ETMs pour le consommateur varie selon la forme de stockage dans l'item alimentaire (Wallace and Luoma, 2003; Vijver et al., 2004; Monteiro et al., 2008). Ainsi, les formes de séquestration dans les items alimentaires pourraient moduler les transferts dans les réseaux trophiques et induire des différences de transfert selon le niveau de pollution (tolérance, résistance des proies) et le paysage (présence/absence de certaines proies). Par exemple, en milieu marin, Wallace et al. (1998) ont montré l'influence de la résistance d'une population de proies, qui se traduit par des modifications des formes de séquestration, sur la biodisponibilité du Cd pour le prédateur.

Nos résultats suggèrent que le transfert dans les réseaux trophiques dépend plutôt de la structure des réseaux et des stratégies d'accumulation et de séquestration dans les organismes que des concentrations en ETMs considérées comme disponibles dans les sols. Ce phénomène peut par ailleurs être impliqué dans les différences d'accumulation observées entre études. La Figure IV.2.2. présente un cadre conceptuel, reposant sur des données théoriques, permettant de poser des hypothèses pour la compréhension des processus qui affectent le transfert trophique. Les caractéristiques proposées reposent sur des observations rapportées dans la littérature dans différents travaux, mais les quantités présentées sont fixées dans une unité arbitraire. Ce genre d'hypothèse a été proposés auparavant mais de manière moins détaillée (Hopkin, 1989; Peakall and Burger, 2003; Hendrickx et al., 2004).



**Figure IV.2.2.** Exemple hypothétique expliquant les relations entre stratégies d'accumulation et de séquestration dans les proies et transfert d'un métal aux consommateurs, selon les caractéristiques des sites et des réseaux trophiques.

Dans cet exemple, 3 sites sont représentés : le site A est sain et les sites B et C pollués par le métal, les sites A et B ont le même paysage, celui du site C est différent.

Différentes espèces vivent dans ces milieux (« Sp 1 » à « Sp 6 »), constituant les items alimentaires des 2 consommateurs (« Conso 1 » et « Conso 2 »), de masse comparable et présentent des stratégies d'accumulation et de séquestration variables des ETMs. L'espèce 1 stocke majoritairement le métal par inclusion dans des granules, l'espèce 2 par liaison à des MTs. Les espèces 3 et 4 séquestrent les métaux grâce à des granules et des MTs en quantité comparable, mais Sp 4 accumule une plus forte quantité de métal. L'espèce 5 présente de faibles capacités de détoxification : le métal est majoritairement sous forme libre, et Sp 6 présente de fortes capacités d'excrétion du métal. Par conséquent, la proportion de métal bioaccessible pour un consommateur diffère entre les espèces.

Sur les sites contaminés, les espèces 5 et 6 sont absentes car sensibles au stress métallique (faible capacité de séquestration pour Sp 5, forte excrétion imposant un coût énergétique élevé limitant la survie pour Sp 6). Sur le site C, le paysage ne convient pas à Sp 4 qui est donc absente.

Les 2 consommateurs absorbent la même quantité de nourriture (6 ind./jour). Le consommateur 1 est généraliste et peut se nourrir de tous les items, tandis que Conso 2 ne consomme jamais Sp 3 et Sp 4. Sur les sites B et C, la disponibilité des proies est réduite par rapport à A, les consommateurs reportent leur prédation sur les items disponibles et consomment certaines espèces en plus grande quantité.

Sur le site A, les quantités assimilées par jour diffèrent très peu entre les 2 consommateurs, tandis que sur les sites B et C Conso 1 est plus fortement exposé. Les différences de disponibilité des proies entre les sites B et C n'affecte pas les quantités accumulées pour Conso 2 (qui se nourrit dans les 2 cas des mêmes items), mais entraîne des variations pour Conso 1.

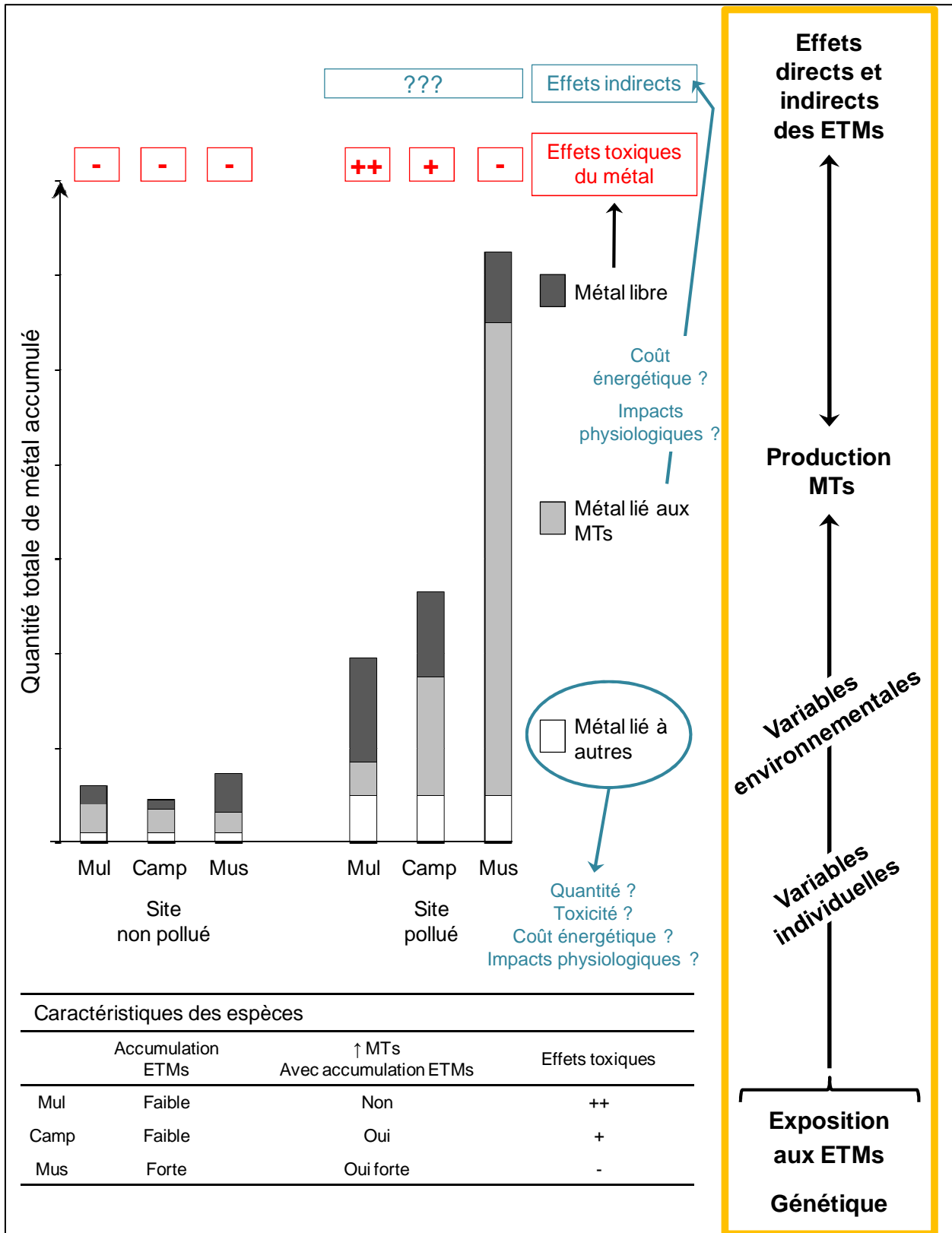
Ainsi, les quantités théoriques de métal accumulé chez les consommateurs varient selon la disponibilité des items alimentaires, la biodisponibilité du métal dans ces items pour le consommateur, et les caractéristiques écologiques du consommateur.

## IV.2.2. Réponses des récepteurs à la contamination de l'environnement : paramètres d'effets

### Tolérance au niveau individuel : séquestration des ETMs

Nos travaux soulignent la capacité de tolérance individuelle à l'exposition aux ETMs chez les micromammifères. Notre étude montre en effet pour la première fois que la bioaccumulation des ETMs élevée chez les musaraignes est accompagnée par une forte augmentation des teneurs hépatiques et rénales en MTs, ce qui permet un stockage des ETMs sous des formes non-toxiques et limiterait ainsi leurs effets sur la santé (Figure IV.2.3). L'implication de ces mécanismes de ces mécanismes de tolérance dans le développement de résistance au niveau populationnel reste à explorer. Les espèces montrent des différences de sensibilité aux stress induit par les ETMs : l'occurrence d'effets sur la santé individuelle est modulée par les capacités individuelles de séquestration des ETMs (Figure IV.2.3). La production de MTs est déterminée par des facteurs individuels (génétique, âge, condition corporelle...) et environnementaux (ETMs, autres stressors...), induisant par conséquent des différences de sensibilité entre espèces, mais aussi entre individus (Miles et al., 2000; Włostowski et al., 2004; Swiergosz-Kowalewska et al., 2007). Cependant, les effets indirects de la production de MTs (coût énergétique de production, compétition entre éléments essentiels et non-essentiels pour la liaison aux MTs induisant des carences) sont mal connus et nécessitent des travaux complémentaires (Kammenga and Laskowski, 2000). Cependant, la liaison aux MTs n'est que l'une des formes de détoxification possible, l'étude de l'implication d'autres formes de stockage dans l'accumulation, l'excrétion et les effets des ETMs chez les micromammifères semble par conséquent primordiale.

Bien que les micromammifères soient susceptibles de subir des effets délétères au vu des limites toxiques de référence, nous avons capturé des animaux dans les sites les plus contaminés et les concentrations internes en ETMs atteignent des valeurs rarement signalées dans la littérature. Les paramètres mesurés pour analyser le stress induit par les métaux montrent des relations entre les concentrations internes et les paramètres mesurés, mais ne semblent pas traduire d'influence dramatique de l'exposition sur la santé individuelle comme cela a pu être le cas dans d'autres travaux (Dmowski et al., 1998). Ces constats suggèrent que les paramètres choisis (indice de condition corporelle, indices somatiques) ne sont pas les plus pertinents pour juger du stress induit par les ETMs chez les micromammifères. D'autres mesures de stress sont en cours chez les Campagnols roussâtres, en analysant l'asymétrie fluctuante qui peut être un marqueur de stress durant le développement (Parsons, 1990; 1991; Leung and Forbes, 1997; Zakharov et al., 1997; Badyaev et al., 2000) et a montré son intérêt pour évaluer l'impact des perturbations de l'environnement (pollutions en ETMs ou radioactives) chez les micromammifères et les oiseaux (Pankakoski et al., 1992; Eeva et al., 2000a; Nunes et al., 2001; Eeva et al., 2003; Velickovic, 2004). Cette étude pourrait permettre de compléter l'interprétation des données sur les paramètres de condition corporelle et les effectifs capturés.



**Figure IV.2.3.** Bioaccumulation, production de métallothionéines et effets induits par les ETMs. Trois espèces sont figurées : Mulot sylvestre « Mul », Campagnol roussâtre « Camp » et Musaraigne carrelé « Mus ».

### Tolérance au niveau populationnel

Si les proportions importantes de Mulots sylvestres sur les sites les plus contaminés semblent indiquer un faible impact de la pollution sur les populations, les réponses individuelles mesurées suggèrent à l'inverse que le Mulot sylvestre est l'espèce la plus sensible. Il est possible que l'opportuniste, les faibles exigences en termes d'habitat, la grande mobilité et les fortes capacités de colonisation de cette espèce (Abt and Bock, 1998; Ouin et al., 2000; Tattersall et al., 2001; Le Louarn et al., 2003; Michel et al., 2006; Wijnhoven et al., 2006; Michel et al., 2007) permettent aux populations de se maintenir malgré un environnement dégradé, et des effets individuels marqués. Chez cette espèce, les caractéristiques écologiques et non plus physiologiques pourraient permettre le maintien des populations en milieu pollué.

Ces constats impliquent que le maintien des populations sur les sites contaminés peut être lié à des mécanismes de tolérance ou de résistance au niveau individuel mais aussi populationnel. Les densités, parfois importantes, de micromammifères dans des milieux où ils devraient avoir des difficultés à se maintenir d'après les données de la bibliographie, peuvent s'expliquer de façon non-exclusive par des phénomènes d'adaptation ou d'acclimatation ? De migrations (métapopulation) ? De modifications des traits d'histoire de vie (sur la croissance, la reproduction...) ? De modifications comportementales (régime alimentaire, mode de nourrissage...) ? Ces questions, non abordées au cours de ce travail, semblent être un point central pour interpréter les réponses des organismes à la pollution de l'environnement.

La comparaison des réponses d'escargots provenant de populations exposées et non-exposées aux ETMs suggère que les populations exposées sont capables s'adapter à un environnement pollué. Des phénomènes d'acclimatation et d'adaptation aux ETMs ont été mis en évidence chez de nombreuses espèces (Posthuma and Van Straalen, 1993; Kammenga and Laskowski, 2000), et il est possible que ces phénomènes existent également au sein des populations de micromammifères. Les escargots sont capables de synthétiser des MTs et stockent Cd et Zn par ce biais (Dallinger et al., 1999; Dallinger et al., 2000; Dallinger et al., 2004; Hispard et al., 2008b). Nous avons montré une tolérance individuelle à travers la production de MTs chez les micromammifères, la capacité de synthèse de MTs pourrait également représenter un trait adaptatif chez les populations d'escargots, comme cela pu être montré chez d'autres invertébrés (Spurgeon and Hopkin, 2000; Janssens et al., 2009; Roelofs et al., 2009)

### Effets directs et indirects sur les populations

Des effets de la contamination de l'environnement, notamment en ETMs, peuvent induire des effets sur la structure (structure d'âge, proportion d'individu reproducteurs...), la dynamique des populations et les assemblages de micromammifères (Dmowski et al., 1995; Dmowski et al., 1998; Kammenga and Laskowski, 2000; Lochmiller et al., 2000; Kataev, 2005; Phelps and McBee, 2009).

Considérant les 3 mailles échantillonnées à l'automne et au printemps, globalement les effectifs de micromammifères capturés diminuent avec l'augmentation du niveau de contamination.

Ce phénomène peut être dû au moins en partie au paysage, mais aussi à des effets directs et/ou indirects de la contamination des sols au niveau individuel et populationnel. Les effets directs peuvent être imputés aux effets toxiques de l'accumulation des ETMs et les effets indirects, entre autres, à la réduction de la disponibilité des ressources des micromammifères. D'un autre côté, le paysage particulier autour de l'usine, qui semble peu favorable à certains micromammifères est une conséquence indirecte de la pollution (présence importante de plantations d'arbres à des fins de phytostabilisation, faible occurrence de milieux cultivés...). Une part, qui reste à quantifier, de la diminution des effectifs de micromammifères sur les mailles contaminées ne serait donc pas liée à la toxicité des ETMs mais aux conséquences environnementales de la pollution et de la gestion du site.

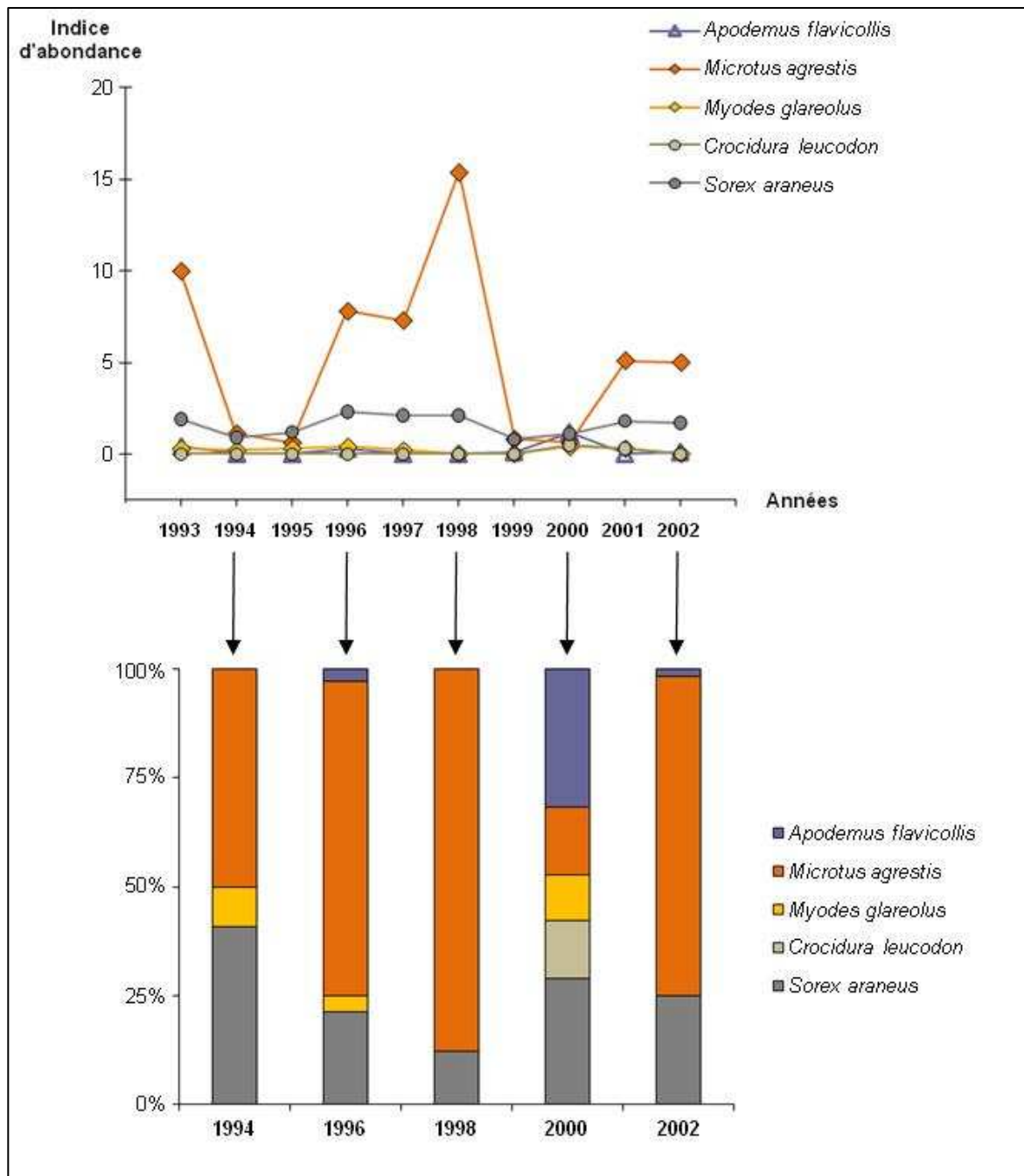
Des phénomènes de mauvaise dégradation de la litière et de dysfonctionnement du sol, conséquence des effets négatifs des ETMs présents dans les sols et les végétaux sur la micro- et macro-faune, ont été mis en évidence dans de nombreux sites pollués par des ETMs (McEnroe and Helmisaari, 2001; Nahmani and Lavelle, 2002; Nahmani et al., 2003b; Johnson and Hale, 2004; Boucher et al., 2005; van Oort et al., 2007). Il a par exemple été montré que la diversité et l'abondance invertébrés du sol, et notamment des vers de terre, pouvait diminuer avec la contamination du sol (Nahmani and Lavelle, 2002; Gillet and Ponge, 2003; Nahmani et al., 2003a; Nahmani and Rossi, 2003; Skubala and Kafel, 2004). Nous avons effectué des prélèvements de vers de terre et de faune marcheuse du sol sur les 4 mailles constituant le gradient de contamination : nos prélèvements montrent de très faibles effectifs de vers de terre et une faible diversité faune marcheuse tels que les carabes, mais de fortes abondances locales de cloportes sur les mailles les plus contaminées. Les excavations de sol réalisées pour ces prélèvements nous ont permis de noter, sur les sites les plus contaminés, la présence d'une litière épaisse, peu dégradée, présentant peu ou pas de signes de brassage ni d'incorporation aux horizons supérieurs du sol, ceci suggérant par conséquent une faible activité de la faune du sol. Par ailleurs, la diversité végétale peut également être affectée par la pollution des sols, allant jusqu'au développement de pelouses métallocoles dominées par une ou quelques espèces métallophytes (Banasova et al., 2006; Becker and Brandel, 2007; Dazy et al., 2009; van Oort et al., 2009), et nous avons observé pour les sols les plus pollués autour de Metaleurop une végétation herbacée quasiment monospécifique, dominée par une plante métallophyte, *Arabidopsis halleri*, accompagnée des poacées tolérantes *Arrhenatherum elatius* et *Phalaris arundinacea*. Sur un site contaminé en ETMs aux Etats-Unis, Galbraith et al. (1995) ont montré des relations entre pollution des sols et structure et composition de la communauté végétale. De plus, en estimant la qualité des habitats pour la faune sauvage, ils ont montré une diminution de la capacité des milieux à supporter des populations de Martre américaine et de Wapiti avec l'augmentation de la pollution des sols (Galbraith et al., 1995). Par ailleurs, Storm et al. (1993) ont mis en évidence une réduction de l'abondance de la faune vertébrée à proximité de 2 fonderies aux Etats-Unis en raison d'une faible qualité de l'habitat sur les sites les plus contaminés (Storm et al., 1993). Il est donc probable



que la forte contamination des sols en ETMs entraîne une diminution de la disponibilité des ressources en habitat et alimentaires des micromammifères, puisqu'abondance et diversité des invertébrés du sol et de la végétation diminuent drastiquement avec la pollution métallique des sols autour de Metaleurop.

Nos résultats soulignent une nouvelle fois que l'étude conjointe des effets directs et indirects des ETMs et des stressseurs naturels dans les écosystèmes est essentielle pour comprendre l'impact des contaminants (van Straalen, 2003; Kapustka, 2008; van Straalen and van Gestel, 2008).

L'interprétation des données d'abondance des animaux sur les sites contaminés comme signal d'effet toxique ou d'absence d'effets toxiques restent difficiles, notamment à cause des effets confondants par exemple du paysage (qui déterminent la qualité de l'habitat, les ressources et les contraintes comme la prédation régulant le maintien des populations), ou des fluctuations naturelles des densités de populations. Les micromammifères présentent des dynamiques de populations qui varient au cours du temps, de manière intra- et inter-annuelle, certaines étant cycliques, et variables selon le lieu (Giraudoux et al., 1994; Raoul et al., 2001; Huitu et al., 2004; Dupuy et al., 2009)(Figure IV.2.4). Les dynamiques des populations d'une même espèce peuvent être asynchroniques entre différents sites, et au sein d'un même site, les dynamiques peuvent être asynchroniques entre espèces. Les données obtenues concernant les effectifs d'une ou plusieurs espèces sur une ou quelques sessions d'échantillonnage doivent en conséquence être considérées avec précaution, dans la mesure où elle donne une image des abondances et des assemblages de micromammifères à un moment donné seulement. Cette information parcellaire, peut ne pas être représentative des patrons généraux des dynamiques de population dans le milieu considéré. Seule une étude sur les dynamiques des populations à long terme permettraient d'apporter une partie des réponses pour comprendre la signification des effectifs observés.



**Figure IV.2.4.** Abondance de différentes espèces de micromammifères dans des zones humides du Jura (France) sur une durée de 10 ans, d'après (Michelat and Giraudoux, 2006). Entre espèces, les dynamiques peuvent être synchrones ou asynchrones. En comparant par exemple 5 années de prélèvement (1994, 1996, 1998, 2000, 2002), on observe des différences drastiques dans les assemblages observés. Considérer une abondance ou un assemblage pour une année seulement, sortie du contexte temporel, peut amener à des conclusions bien différentes. Par exemple, les données de 1998 pourraient induire des interprétations opposées à celles de 2000.

Les études en milieu terrestre naturel qui ont tenté de lier les effets individuels et la structure et le fonctionnement des populations et communautés de vers de terre ont montré la difficulté de l'interprétation des données au niveau populationnel et communautaire (Bleeker and van Gestel, 2007; Klok and Thissen, 2009; van Gestel et al., 2009). Notamment, leurs résultats montrent que

différents facteurs biotiques et abiotiques (qualité et la quantité des ressources, prédation, caractéristiques pédologiques, perturbations...) interagissent avec les effets toxiques et que les abondances et biomasses varient temporellement de manière naturelle, empêchant de détection de l'influence des ETMs. Ainsi, si les marqueurs de toxicité laissent attendre des effets sur les populations et communautés, de tels impacts ne sont pas clairement détectés.

L'impact des contaminants sur les populations et les communautés ne peut être réellement évalué que dans le cadre de l'écologie du stress : seule une connaissance approfondie des facteurs abiotiques et biotiques qui conditionnent la structure et le fonctionnement des communautés peut permettre de discriminer les effets des polluants des autres perturbations naturelles ou anthropogéniques (van Straalen and van Gestel, 2008). Les suivis à long terme des dynamiques de populations, à des échelles spatiales pertinentes et en comparant diverses situations sous contrainte ou non de pollutions, sont impératifs pour identifier les impacts populationnels et communautaires des contaminants.

Les mécanismes de tolérance à la pollution en ETMs au niveau individuel et populationnel chez les vertébrés nécessitent de plus amples recherches afin de pouvoir identifier les caractéristiques physiologiques et les traits d'histoire de vie qui affectent la vulnérabilité (De Lange et al., 2009).

#### *IV.2.3. Variabilité temporelle de l'accumulation et des paramètres de santé individuelle*

Notre étude apporte des informations sur l'évolution temporelle de la bioaccumulation à plusieurs échelles de temps : court terme (1 mois) pour les cinétiques d'accumulation en microcosmes, et moyen terme en abordant les différences inter-saisonniers et inter-annuelles chez les organismes autochtones. L'évolution des concentrations internes, à ces 2 échelles, montre que les processus mis en jeu dans la bioaccumulation sont des processus dynamiques, et suggère fortement qu'une mesure ponctuelle dans le temps n'apporte qu'une information parcellaire sur les mécanismes de transfert et d'effets.

A court terme, les cinétiques d'accumulation dépendent majoritairement des caractéristiques physiologiques de l'accumulation (balance entre absorption et excrétion) de l'exposition. L'accumulation des ETMs chez le Campagnol roussâtre présente des différences inter-annuelles ou inter-saisonniers selon les métaux. L'étude des variations temporelles chez les autres vertébrés capturés n'ayant pas encore été menée, il n'est pas possible de déterminer si ces variations sont spécifiques à l'espèce. Concernant les escargots, les données acquises sur *Cepaea* aux différentes saisons en bioindication active et passive (Chapitres 2 et 5 et (Dhivert, 2008) montre que si à l'automne on n'observe pas d'augmentation significative des concentrations internes le long du gradient de pollution, les concentrations des individus sauvages capturés et des individus exposés en microcosmes au printemps augmentent avec la contamination du sol. A moyen terme, chez les micromammifères comme chez les escargots, les variations temporelles de l'accumulation au niveau individuel peuvent être liées à 3 raisons majeures : la durée d'exposition,

des variations dans la physiologie des métaux et dans l'ingestion de nourriture (dues au cycle de vie des organismes et aux variables environnementales : période de reproduction, température, photopériode...) et des variations de composition et/ou contamination du régime alimentaire (Burger et al., 2003; Peakall and Burger, 2003; Smith et al., 2007; Włostowski et al., 2009) (Figure IV.2.5).

Phénomènes temporels et paramètres biologiques sont liés : les variations à court terme sont plutôt en lien avec des facteurs individuels tandis que les variations à long terme sont plutôt en lien avec des facteurs populationnels. Par ailleurs, la variabilité temporelle de l'accumulation s'exprime à l'échelle de l'organe, de l'individu et de la population. Au niveau individuel, les concentrations internes varient avec la durée et l'intensité de l'exposition, mais aussi avec des caractéristiques d'ordre physiologiques (Figure IV.2.5). Au niveau populationnel, la structure d'âge peut influencer le niveau de contamination moyen des récepteurs, selon les proportions relatives d'individus sénescents et juvéniles par exemple. A moyen et long terme (intra- et inter-années), il est enfin possible que la disponibilité environnementale varie avec la météorologie et l'évolution de la spéciation des éléments dans le sol (Figure IV.2.5).

On observe plus de relations significatives entre concentrations internes et indices de santé en 2008 qu'en 2007 chez les rongeurs (Chapitre 3 et (Paris, 2009)). Les proportions d'individus « à risque » chez le Campagnol roussâtre sont parfois doublées entre sessions. L'année 2008 présente des résultats différents des autres années concernant l'accumulation du Cd et du Zn et les effectifs capturés le long du gradient de pollution. Il n'est pas possible de déterminer sans de nouvelles recherches si cette année peut être considérée comme « particulière » par rapport au fonctionnement général et présentait des conditions spéciales influençant le transfert des ETMs et les populations de micromammifères. Cette année présente-t-elle un caractère habituel et les précédentes étaient singulières ? Le patron global des transferts et effets des ETMs dans les écosystèmes se caractérise-t-il par de fortes fluctuations inter-annuelles ?

Il paraît important de noter que les conclusions basées sur un seul échantillonnage des récepteurs aboutissent à relever des résultats différents. Nous avons discuté le fait que ces variations peuvent être liées à des variations temporelles de l'exposition et de l'accumulation, mais ces phénomènes peuvent aussi être liés à la taille des échantillons étudiés. La taille des échantillons de printemps peut en effet paraître insuffisante au regard de la grande variabilité inter-individuelle, pour permettre d'observer des différences significatives liées à d'autres variables (Gonzalez et al., 2006; Danielsson and Frank, 2009; Munkittrick et al., 2009).

Ces résultats, qui pourraient paraître confus au premier regard mettent en lumière 3 implications majeures : l'importance de la taille d'échantillon pour la représentativité des données, la nécessité de limiter des effets confondants site-spécifiques à un niveau très local en étendant les surfaces d'études ou le nombre de sites considérés, et le besoin d'un suivi à long terme des transferts et effets des ETMs dans les chaînes alimentaires.

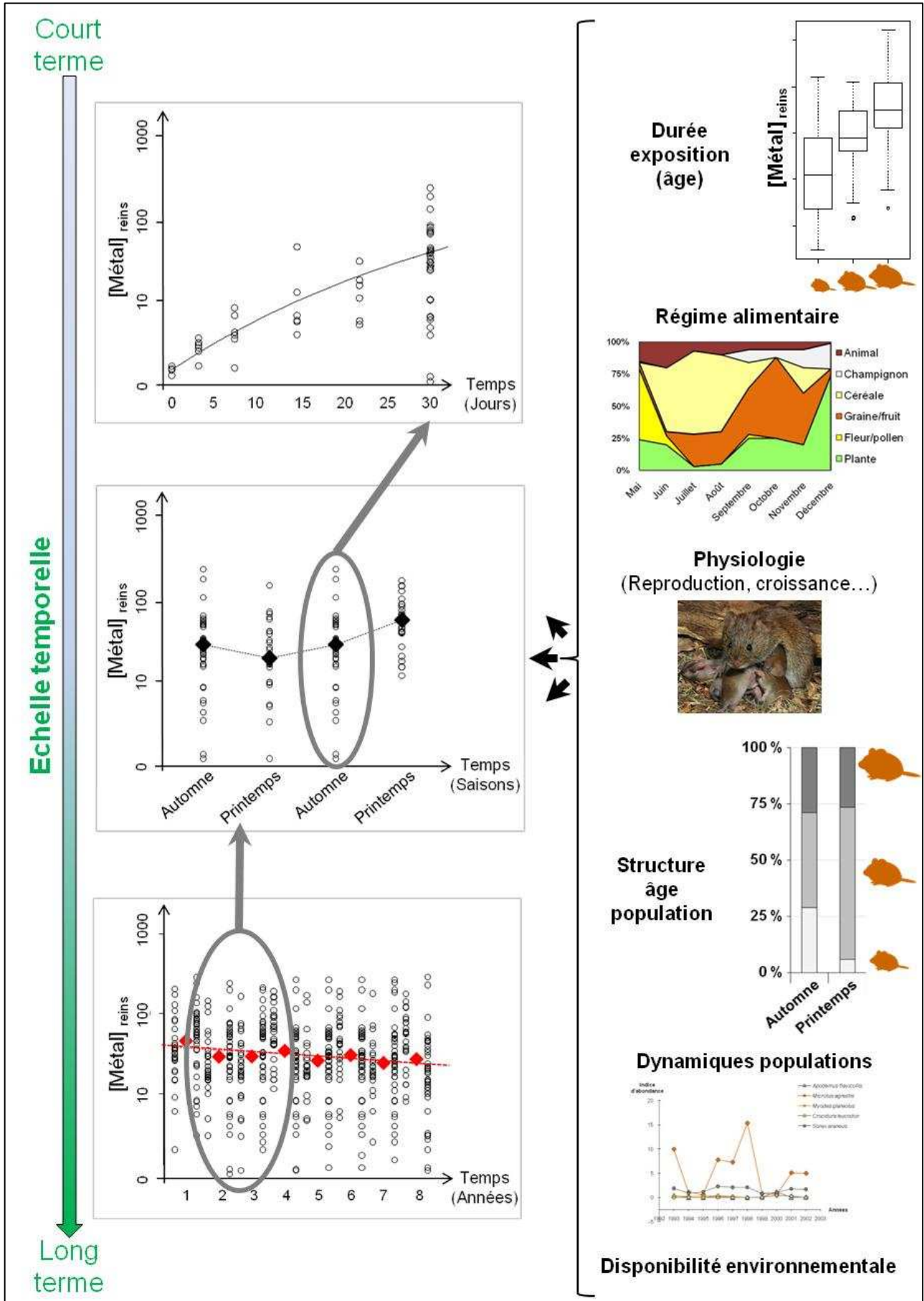


Figure IV.2.5. Variabilité temporelle de l'accumulation : exemple du Campagnol roussâtre.

#### **IV.2.4. Les apports d'une approche intégrée et implications dans le cadre de l'évaluation du risque environnemental**

##### *IV.2.4.a. Apports d'une approche intégrée dans l'ERE*

Le site de Metaleurop se caractérise à la fois par une contamination élevée (pour les niveaux atteints), et étendue (pour les surfaces concernées) des sols du secteur, mais aussi par un transfert fort des ETMs dans les chaînes alimentaires. Les données acquises peuvent par ailleurs permettre de développer des outils de modélisation des risques afin de prédire le transfert et les effets et constituer une aide à la décision pour la gestion des sites contaminés.

Notre travail met en effet en évidence l'intérêt de développer une approche intégrée pour l'évaluation des risques liés aux ETMs : intégrée pour les changements d'échelle spatiale et temporelle et de niveaux d'organisation biologiques, et par la comparaison de plusieurs types de réponses pour plusieurs récepteurs. Par conséquent nos résultats mettent en évidence plusieurs points pouvant constituer des limites aux méthodes d'ERE et permettent de proposer des approches qui contribueraient à améliorer les méthodes d'évaluation.

Il conviendrait de poursuivre le développement d'approches considérant plusieurs paramètres de réponse à différents niveaux d'organisation biologique et intégrant plusieurs récepteurs. Un seul paramètre (accumulation, biomarqueur comme MTs, indice somatique...) ne permet pas de conclure sur la réponse d'un organisme à la pollution, ce qui souligne l'intérêt d'approches multi-marqueurs, comme cela a déjà pu être signalé, pour interpréter l'impact des polluants (Lagadic et al., 1997; Jensen et al., 2006). Une mesure ne peut être comprise que si elle est mise en perspective dans son contexte global, en changeant niveau de perception, par la prise en compte des autres niveaux organisation biologiques, et des contextes temporel et environnemental (contamination, paysage). Chacun des récepteurs apporte une information différente et complémentaire sur l'exposition, l'accumulation et les effets des ETMs, plus ou moins pertinente selon le métal concerné et la réponse considérée. Les comparaisons inter-spécifiques amènent par conséquent une meilleure compréhension des phénomènes d'accumulation et d'effets en apportant des informations sur les processus sous-jacents.

La variabilité inter-individuelle des réponses observées implique la nécessité de travailler avec de grandes tailles d'échantillons pour discriminer les effets des polluants des variations naturelles dans le cadre de l'ERE (Gonzalez et al., 2006; Danielsson and Frank, 2009; Munkittrick et al., 2009). Pour certaines variables dont l'influence est bien identifiée, comme l'âge, il serait possible pour une application en biosurveillance, de développer des standardisations permettant d'utiliser la bioaccumulation quel que soit l'âge de l'individu capturé comme cela a pu être proposé pour d'autres bioindicateurs (Danielsson and Frank, 2009).

Nous avons montré que les différentes réponses des organismes à la contamination en ETMs de l'environnement ne s'expriment pas tant dans les niveaux des paramètres mesurés (concentrations en ETMs ou en MTs), que dans l'évolution de ces niveaux dans l'espace (augmentation ou diminution des concentrations), notamment le long du gradient de pollution et en

fonction du paysage. C'est l'évolution des réponses et non la valeur intrinsèque du paramètre qui renseigne sur les réponses des récepteurs : ceci entraîne une remise en cause de la pertinence des études comparant seulement 1 site pollué et 1 site témoin, et permet de limiter d'éventuels effets confondants site-spécifiques. Ceci souligne l'intérêt de mener des procédures d'évaluation du risque à de larges échelles spatiales, comme cela a été souligné dans une publication récente concernant les limites de l'ERE (Kapustka, 2008). Ces conclusions mettent également en avant la nécessité d'adapter la surface de la zone étudiée à la réponse recherchée : si l'on souhaite étudier les impacts des pollutions sur les populations des récepteurs, il faut conduire les études à l'échelle spatiale où s'expriment les processus qui régissent les dynamiques de populations. La contamination des sols et des récepteurs étant affectées par des processus agissant à des échelles spatiales relativement larges (dizaines à centaines d'hectares pour les groupes étudiés ici), l'évaluation des risques pourrait être améliorée en étudiant le transfert des ETMs à des échelles pertinentes au vu des facteurs mis en jeu.

Les relations entre concentrations dans les récepteurs et dans les sols variant dans l'espace et dans le temps, l'utilisation de modèles généraux pour prédire l'accumulation des ETMs dans les organismes exposés de manière chronique sur un site contaminé ne peut être qu'indicative et doit être confirmée avec des mesures *in situ*. Il paraît par conséquent nécessaire de développer des évaluations du risque environnemental site-spécifiques et en tenant compte du paysage. Certains paysages semblent en effet plus à risque que d'autres au sein d'un site contaminé. Ce type de paysage « à risque » se caractérise soit par un transfert fort même pour des niveaux de pollution relativement faibles, et/ou par une très forte augmentation du transfert avec l'augmentation de la contamination.

Les différences observées entre années et saisons montrent l'importance de la variabilité temporelle pour la pertinence de l'exploitation des données acquises *in situ*. Pour évaluer les risques sur les populations et les communautés, il est absolument nécessaire de conduire des suivis de long terme. La prise en compte des facteurs écologiques du récepteur, comme la préférence d'habitat, le régime alimentaire ou les dynamiques de populations, et du fonctionnement écologiques des milieux, par exemple la structure des réseaux trophiques et le paysage, peut permettre d'affiner l'ERE en augmentant sa représentativité écologique, ce qui a été mis en avant dans des réflexions récentes sur les procédures d'ERE (Kapustka, 2008).

En conclusion, notre étude ne met pas en lumière un paramètre clé permettant de définir s'il existe un risque, mais au contraire montre que la réponse à cette question ne peut être réalisée que par une approche intégrée synthétisant les informations apportées à différentes échelles et suggérant une probabilité d'occurrence ou d'absence d'effets. Ce type d'approche intégrée est préconisée pour l'ERE des sites pollués dans le cadre des approches « Triad », qui lient des outils de la chimie, la toxicologie et l'écologie à différentes échelles pour évaluer le risque en se basant sur le « poids de l'évidence » des différentes réponses apportées (Jensen et al., 2006; Dagnino et al., 2009). Cependant, les approches Triad actuelles menées en Europe laissent une très faible

part à l'utilisation de données d'exposition ou d'effets chez les vertébrés.

#### *IV.2.4.b. Utilisation de valeurs de « screening » des contaminations des sols pour estimer le risque*

Ni l'évaluation des concentrations disponibles en ETMs par extraction chimique (méthode proposée pour l'évaluation de la biodisponibilité des ETMs dans les sols (ISO, 2008)), ni l'utilisation des Eco-SSLs (USEPA, 2005a; b; c) ne permettent d'identifier les zones présentant un risque pour les récepteurs sur le site de Metaleurop. D'une part, les concentrations accumulées par les organismes sont plus liées aux concentrations totales qu'extractibles, d'autre part, les valeurs d'Eco-SSLs (USEPA, 2005a; b; c) paraissent surestimer fortement le risque, notamment pour les insectivores, et sur une partie des sols très contaminés présentant de fortes teneurs en matière organique, l'applicabilité des Eco-SSLs est limitée voire déconseillée. Pour certains organismes étudiés ici, les valeurs d'Eco-SSLs sont inférieures au fond pédo-géochimique : cela remet en cause la pertinence de ces valeurs puisque l'ensemble de la région présenterait un risque pour la survie des vertébrés insectivores. Cette surestimation du risque par les valeurs d'Eco-SSLs développées par l'US EPA ou d'autres pays, avec des valeurs d'Eco-SSLs parfois supérieures au fond naturel, a déjà été mentionnée et met en évidence la nécessité (i) d'utiliser les TRVs avec précaution (ii) d'affiner les TRVs, notamment en améliorant l'étude de la sensibilité des espèces (Jensen and Pedersen, 2006; Allard et al., 2009; Buekers et al., 2009; Cœurdassier et al., *Accepted*). Les TRVs pour les musaraignes sont calculées sur la base de données acquises majoritairement en laboratoire pour des micromammifères qui sont en grande partie des rongeurs. Or nous avons montré que les musaraignes ont une plus forte capacité de production de MTs, permettant une détoxification des ETMs et réduisant ainsi leur sensibilité. Ainsi, les quotients de risque calculés pour le site de Metaleurop sont bien supérieurs dans la majorité des cas pour les micromammifères insectivores que granivores/herbivores alors que nous résultats suggèrent fortement l'inverse.

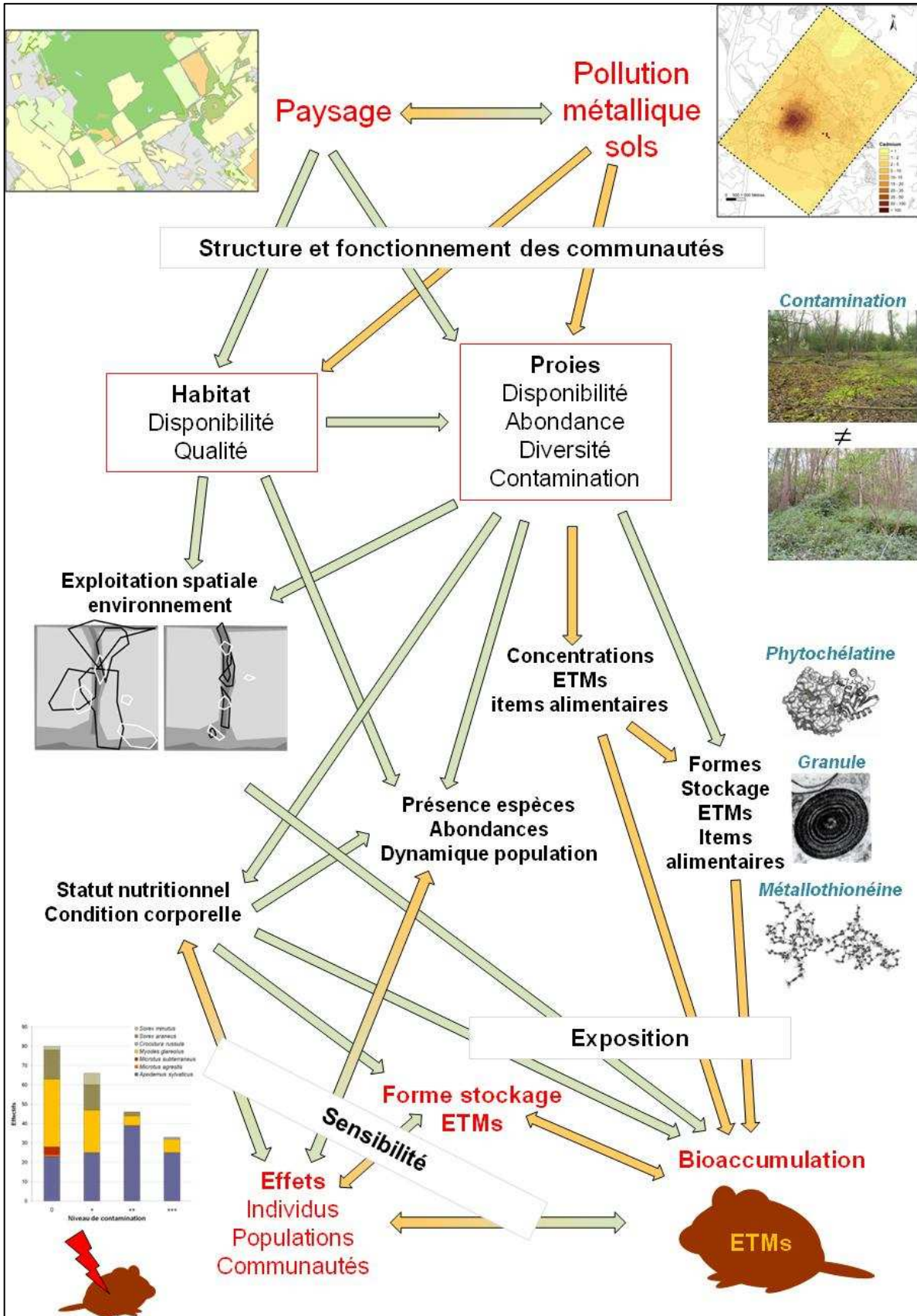
Les méthodes de bioindication apparaissent plus pertinentes et informatives que l'utilisation des valeurs seuils dans les sols pour évaluer les transferts et les effets des ETMs sur site pollué. La bioindication active renseigne sur le transfert potentiel des ETMs dans les réseaux trophiques, de manière plus réaliste que l'extrapolation de valeurs de concentrations considérées disponibles. La bioindication passive apporte des informations qui tiennent compte du comportement des individus dans leur milieu naturel et des processus physiologiques et écologiques qui modulent l'exposition et les effets. Elle permet de donner une image des transferts et effets à une échelle globale pertinente par rapport aux surfaces polluées et aux impacts potentiels, et présentant un caractère intégrateur de l'exposition au cours du temps.



## IV.2.5 Conclusions

Ce travail démontre qu'il est possible de développer des approches dans le cadre de l'écotoxicologie du paysage et de l'écologie du stress sur un site pollué, approches réclamées de longue date mais rarement appliquées *in natura* (Cairns Jr, 1993; Cairns Jr and Niederlehner, 1996; van Straalen, 2003; Barnthouse et al., 2008; Kapustka, 2008).

Nos résultats montrent en outre les apports d'études multi-échelles (espace, temps, niveau d'organisation biologique) pour améliorer la compréhension des transferts et des effets des contaminants dans les écosystèmes terrestres. L'interprétation des réponses observées et des mécanismes sous-jacents nécessite de pouvoir considérer les paramètres étudiés dans leur contexte global, ce qui est possible à travers des changements de niveau de perception. Nos résultats valident et illustrent des concepts jusqu'à présent proposés uniquement sur la base de modélisations mathématiques et montrent les limites des prédictions dans certains cas. Ils ouvrent de nouvelles perspectives pour les recherches futures en écotoxicologie de terrain, notamment en faisant émerger un schéma d'interaction entre paysage et pollution des sols qui pourrait influencer le transfert et les effets des polluants dans les écosystèmes terrestres (Figure IV.2.6). Ces 2 variables et leurs interactions semblent en effet déterminer, à travers de mécanismes toxiques et écologiques, une part majeure du transfert trophique et de la vulnérabilité des animaux. Ce schéma théorique peut constituer une base pour tester l'importance relative et la pertinence des actions et rétro-actions proposées dans de futurs travaux (Figure IV.2.6). Les 2 variables majeures mises en jeu varient dans l'espace et le temps, de même que les processus au travers desquels elles agissent sur le transfert ou les effets. Les réponses des organismes à la pollution nécessitent donc d'être étudiées au moyen de suivis à long termes et sur des étendues pertinentes par rapport aux processus écologiques impliqués, sans pour autant négliger les échelles de temps à court-terme et les échelles spatiales locales.



**Figure IV.2.6.** Synthèse des interactions entre paysage et contamination des sols et leur implication dans les transferts et les effets des ETMs dans les écosystèmes terrestres. Les flèches colorées en orange symbolisent des effets directs toxiques des ETMs, les flèches colorées en vert concernent des relations d'ordre écologique. La figure représentant les domaines vitaux pour la partie « Exploitation spatiale » est adaptée de (Tattersall et al., 2001).



### IV.3. PERSPECTIVES

Les travaux réalisés dans cette thèse répondent à des questions posées dans les objectifs de l'étude, mais soulèvent également de nouvelles interrogations pour la compréhension des mécanismes de transfert et d'effets dans les écosystèmes terrestres. Dans cette partie, nous proposons des perspectives de recherches pour répondre à ces questions.

#### IV.3.1. Exposition des organismes et transfert dans les réseaux trophiques

➤ Etudier le fractionnement subcellulaire des ETMs chez des proies et sa relation avec la bioaccumulation chez les consommateurs

Des travaux sur la séquestration des ETMs dans les végétaux et les animaux constituant le régime alimentaire des récepteurs, et l'évaluation de la bioaccessibilité et du transfert trophique en fonction des formes de stockage, semblent essentiels pour affiner la compréhension des transferts dans les réseaux trophiques et de l'empoisonnement secondaire des prédateurs.

➤ Améliorer la compréhension du rôle du paysage sur l'accumulation des ETMs. (i) En affinant la prise en compte des variables paysagères (composition mais aussi structure, hétérogénéité, connectivité...) (ii) En développant des travaux pour identifier et discriminer le rôle respectif de l'exploitation spatiale du milieu par les animaux, de leur comportement alimentaire et de la structure des réseaux trophiques (cf 2 points suivants)

La variable « paysage » telle qu'utilisée dans ce travail représente une mesure intégrative de différents processus écologiques, l'influence significative du paysage pourrait donc refléter l'impact de différents facteurs. Par ailleurs, notre approche est corrélative et nécessite de plus amples investigations pour comprendre les relations fonctionnelles.

➤ Rechercher si les animaux exploitent de manière différente leur environnement selon le niveau de contamination et identifier les facteurs clés qui, sur un site contaminé, affectent la manière dont les organismes exploitent leur environnement

Des études par suivi télémétrique ou par identification individuelle (génétique, implants de transpondeurs ou marques visuelles), dans le cadre d'expérimentations de capture-marquage-recapture, sont envisageable chez les micromammifères (Elbin and Burger, 1994; Harper and Batzli, 1996; Dell'Omo et al., 1998; Schulte-Hostedde et al., 2002; Peakall et al., 2006) et chez les escargots (Cameron and Williamson, 1977; Baur and Baur, 1993; Grimm and Paill, 2001; Baur and Baur, 2006). Ces techniques sont en effet employées avec succès chez ces animaux pour l'étude de leurs déplacements (Baur and Baur, 1992; Tattersall et al., 2001; Nams, 2005; Bentley, 2008; Kappes et al., 2009; Stoll et al., 2009; Stradiotto et al., 2009).

➤ Evaluer les variations spatiales et temporelles des compositions et contaminations du régime alimentaire

Des études complémentaires à celles entreprises sur le régime alimentaire chez les micromammifères pourraient être entreprises, basées sur l'analyse de la composition du contenu stomacal et des fécès

(détermination par analyse microscopique ou avec des outils de biologie moléculaire), qui représente une mesure ponctuelle dans le temps du régime alimentaire, mais aussi sur l'analyse des isotopes stables (Carreon-Martinez and Heath, 2010). Ce type d'analyse permet en effet une évaluation du niveau trophique plus intégrative dans le temps, et a montré son intérêt pour l'étude de l'exposition aux polluants chez différents vertébrés (Morrissey et al., 2009; Van den Brink, 2009).

- Développer des suivis de l'exposition aux ETMs par des mesures individuelles non-létales  
D'un point de vue éthique, et pour permettre de suivre l'évolution spatiale et temporelle des contaminations des récepteurs, il paraît nécessaire de développer des échantillonnages non-létaux. La mesure des concentrations internes est possible par des prélèvements peu invasifs comme l'échantillonnage de sang et de parties kératinisées (plumes, poils) (Dauwe et al., 2002; D'Havé et al., 2005; 2006; Pereira et al., 2006; Rogival et al., 2006; Scheifler et al., 2006a; Beernaert et al., 2007; McLean et al., 2009; Scheifler et al., 2009; Vermeulen et al., 2009b).
- Evaluer l'exposition des prédateurs (de micromammifères) aux ETMs, et améliorer la modélisation des transferts dans les réseaux trophiques
- Rechercher si la prédation est modulée par la contamination des récepteurs  
Les micromammifères constituent la proie de nombreux prédateurs. Dans le cas des rapaces, l'évaluation de l'exposition peut être menée par capture directe, modélisation (Gorree et al., 1995; Jongbloed et al., 1996; Kooistra et al., 2005; Van den Brink, 2010; Loos et al., *In press*), récolte de cadavres ou encore par analyse du contenu des pelotes de réjection (Mateo et al., 1999; Mateo et al., 2001; Gaca et al., 2004; Cœurdassier et al., *Submitted*). L'analyse des pelotes de réjection permettrait de déterminer si la prédation est influencée ou non par la contamination des organismes. Certains ETMs neurotoxiques induisent des modifications du comportement des vertébrés en altérant les fonctions d'apprentissage, ou encore en modulant l'activité et les déplacements (Silver and Nudds, 1995; Burger and Gochfeld, 1997; Moreira et al., 2001; Correa et al., 2004; Soeiro et al., 2007). Ces effets toxiques chez les proies pourraient modifier les probabilités de détection et de capture par leurs prédateurs. Lors des échantillonnages à Metaleurop, nous avons récolté des pelotes de Faucon crécerelle. Il est donc possible de comparer la distribution statistique des contaminations des restes de micromammifères dans les pelotes avec celle des contaminations des micromammifères capturés.

### IV.3.2. Impacts directs et indirects des ETMs sur les individus, les populations et les communautés

- Examiner les relations entre succès de reproduction et concentrations internes en ETMs  
Les ETMs entraînent des effets négatifs sur les organes reproducteurs et la reproduction des vertébrés et des invertébrés (Laskowski and Hopkin, 1996b; Gomot-de Vaufleury and Kerhoas, 2000; Shore and Rattner, 2001). Dans des conditions d'exposition *in situ*, les individus contaminés ont-ils un succès de reproduction réduit ? Le succès de reproduction peut être évalué chez les micromammifères par analyse génétique ou par suivi en mésocosme (Schulte-Hostedde et al., 2000; Schulte-Hostedde et al., 2002).

➤ Mettre en place des suivis non-létaux de la santé individuelle et des dynamiques des populations, et évaluer les effets sur les assemblages

Pour étudier les impacts des polluants au niveau individuel et populationnel, le développement de suivis à moyen et long terme par des méthodes non-létales serait pertinent. Ce type de suivi à long terme aurait en outre un intérêt tout particulier dans le cadre de la mise en place des observatoires de l'environnement proposés par le CNRS (INSU/INEE).

L'évaluation de la condition corporelle peut être menée sur des individus vivants, et des prélèvements sanguins permettraient la mesure différents paramètres, notamment des biomarqueurs d'exposition ou d'effets (hématologie, ALAD, statut anti-oxydant...), des hormones du stress (corticostéroïdes...) ou liées à la reproduction (testostérone...) (Eeva et al., 2003; Eeva et al., 2005; McFarland, 2005; Scheifler et al., 2009). Bien que ce type de méthodes soit encore peu utilisé en écotoxicologie de terrain, la mesure de biomarqueurs par prélèvement sanguin est réalisable chez les micromammifères et les escargots (Liebsch et al., 1978; Cooper, 1994; Leffler and Nyholm, 1996; Hoff, 2000; Pavlica et al., 2000; Sorensen et al., 2000; Knopper and Mineau, 2004; Mihok, 2004; Boonstra et al., 2005; Rogival et al., 2006; Joslin, 2009), et la mesure des niveaux de corticostérone (indicateur du niveau de stress) dans les fécès est possible (Pedersen and Greives, 2008). Le suivi des dynamiques de populations pourrait servir au développement de TRVs au niveau populationnel. Les données acquises au cours de la thèse pourraient être exploitées de manière à rechercher l'influence potentielle de la contamination sur les assemblages grâce à des techniques de modélisation (Vaniscotte et al., 2009). Des suivis à long terme seraient nécessaires pour explorer l'effet potentiel des ETMs sur la stabilité des communautés (Lochmiller et al., 2000).

➤ Rechercher si un un fonctionnement métapopulationnel source-puits permet de maintenir des populations de micromammifères dans les milieux les plus contaminés

D'autre part, il serait important de déterminer si des processus d'immigration peuvent intervenir dans le maintien des populations de micromammifères dans les milieux les plus contaminés. Le suivi des dynamiques par des techniques de capture-marquage-recapture peut servir à caractériser des fonctionnement en métapopulation (Williamson et al., 1977; Szacki, 1999). Des méthodes de génétique des populations permettraient de mesurer les flux de gènes entre populations et leur éventuel isolement tant pour les micromammifères que pour les escargots (Pfenninger, 2002; Jordaens et al., 2006; Vuilleumier and Fontanillas, 2007; Kozakiewicz et al., 2009). Ce type d'étude génétique apporterait également des indications sur le développement de génotypes adaptés à la survie en milieu contaminé, l'existence de flux de gènes important pouvant constituer un frein à des phénomènes de micro-évolution (Kawecki and Ebert, 2004). Elles peuvent aussi aboutir à la caractérisation d'écotypes de milieu pollué en ETMs.

➤ Etudier l'influence des effets indirects liés à la disponibilité des ressources alimentaires sur les effets des ETMs

Des ressources insuffisantes peuvent mettre en péril la survie des individus et/ou le succès de reproduction, et provoquer un stress additionnel accentuant les effets induits par les ETMs. De plus, des carences en éléments essentiels modifient (augmentent souvent) l'absorption des ETMs. Les effets indirects sont rarement considérés alors qu'il paraissent essentiels pour évaluer les impacts des pollutions métalliques dans les écosystèmes (van Straalen, 2003). Des études peuvent être développées

avec des protocoles de « supplément » de nourriture afin d'évaluer l'influence du stress nutritionnel sur la santé individuelle et le succès de reproduction des animaux (Eeva et al., 2003; Von Blanckenhagen et al., 2007).

- Etudier l'influence des effets indirects en s'attachant aux interactions entre contaminants biologiques (parasitisme) et chimiques (ETMs), notamment en recherchant si l'exposition aux ETMs module les prévalences des parasites

Les ETMs ont des impacts sur le statut immunitaire des animaux et peuvent ainsi moduler le parasitisme (Propst et al., 1999; Tersago et al., 2004). Le parasitisme induit des variations des taux d'hormones circulantes (corticostéroïdes...), et altère l'état de santé, ce qui peut moduler la bioaccumulation et la sensibilité des individus (Shimada et al., 1998; Sures et al., 2002; Klar and Sures, 2004). Ainsi, le parasitisme peut être considéré comme un paramètre d'effet individuel et communautaire des polluants (Lafferty, 1997; Marcogliese, 2005; Sures, 2007; Jacobson et al., 2009). De plus, le parasitisme représente un stress naturel, qui peut être augmenté ou diminué par l'influence de polluants. Par exemple l'atrazine a été mise en cause comme facteur du déclin d'amphibiens, car elle augmente l'exposition et la susceptibilité de l'hôte (Gendron et al., 2003; Rohr et al., 2008). Une modification des relations hôte/parasite par la pollution peut avoir des conséquences sur les dynamiques respectives des parasites et des hôtes, et sur les cycles parasitaires dans les systèmes. Ceci pourrait avoir des implications pour la gestion de zoonoses affectant l'homme.

### IV.3.3. Mettre plus d'« éco » dans l'écotoxicologie

- Utiliser des approches multi-échelles pour l'étude des transferts et des effets des contaminants dans les écosystèmes
- Etudier les transferts et effets des contaminants dans le cadre des transferts de matière, d'énergie mais aussi d'information dans les écosystèmes

Pour conclure, les perspectives majeures de ce travail concernent la poursuite de la mise en œuvre d'un cadre de travail pour les études en écotoxicologie où l'on intégrerait plus d'« éco » dans l'écotoxicologie. A travers le développement de nouveaux champs disciplinaires, l'écotoxicologie du paysage et l'écologie du stress, et en améliorant la prise en compte des mécanismes écologiques qui gouvernent les transferts de matière, d'énergie et d'information dans les écosystèmes. Les polluants, dont les ETMs, peuvent représenter des perturbateurs du transfert d'informations chimiques, à des doses environnementales non-toxiques, et entraîner des impacts graves dans le fonctionnement des écosystèmes (Lürling and Scheffer, 2007). Ce champ en développement nécessite l'attention des futures recherches en écotoxicologie. Les approches multi-échelles ouvrent des perspectives prometteuses pour l'étude des transferts et des effets de polluants dans les écosystèmes, la poursuite d'études placées dans ce contexte devrait permettre l'amélioration des connaissances dans ce domaine et leur utilisation pour l'évaluation du risque environnemental.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES





- Abt, K.F., Bock, W.F., 1998. Seasonal variations of diet composition in farmland field mice *Apodemus* spp. and bank voles *Clethrionomys glareolus*. *Acta Theriologica* 43, 379-389.
- Adriano, D., 2001. Trace elements in terrestrial environment: Biogeochemistry, bioavailability and risks of metals, 2nd ed. Springer-Verlag, New-York, NY, USA.
- Akçakaya, H.R.E., 2001. Linking population-level risk assessment with landscape and habitat models. *Science of the Total Environment* 274, 283-291.
- Albers, P., Heinz, G.H., Ohlendorf, H.M., 2000. Environmental contaminants and terrestrial vertebrates: effects on populations, communities, and ecosystems. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola, Florida.
- Ali-Khodja, H., Boumegoura, N., Habbas, B., 2005. Spatio-temporal deposition fluxes of dust and trace elements around a cement plant in the vicinity of Hamma Bouziane, Algeria. *Fresenius Environmental Bulletin* 14, 237-247.
- Allard, P., Fairbrother, A., Hope, B.K., Hull, R.N., Johnson, M.S., Kapustka, L.A., Mann, G., MacDonald, B., Sample, B.E., 2009. Recommendations for the development and application of wildlife toxicity reference values. *Integrated Environmental Assessment and Management* 6, 28-37.
- Alloway, B.J., 1995. Heavy metals in soils. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK.
- Alvarez, L.A., Gramaje, D., Abad-Campos, P., Garcia-Jimenez, J., 2009. Role of the *Helix aspersa* snail as a vector of *Phytophthora citrophthora* causing branch cankers on clementine trees in Spain. *Plant Pathology* 58, 956-963.
- AMAP, 2002. Chapter 6. Biological effects, Heavy Metals in the Arctic. Arctic monitoring and Assessment Programme, Oslo, Norway, p. 31.
- AMAP, 2004. AMAP Assessment 2002: Persistent Organic Pollutants (POPs) in the Arctic. Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP), Oslo, Norway, p. 310.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76, 160-202.
- Amini, M., Afyuni, M., Fathianpour, N., Khademi, H., Flühler, H., 2005. Continuous soil pollution mapping using fuzzy logic and spatial interpolation. *Geoderma* 124, 223-233.
- Andrews, S.M., Johnson, M.S., Cooke, J.A., 1984. Cadmium in small mammals from grassland established on metalliferous mine waste. *Environmental Pollution Series a-Ecological and Biological* 33, 153-162.
- Antonic, O., Legovic, T., 1999. Estimating the direction of an unknown air pollution source using a digital elevation model and a sample of deposition. *Ecological Modelling* 124, 85-95.
- Ares, J., 2003. Time and space issues in ecotoxicology: Population models, landscape pattern analysis, and long-range environmental chemistry. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 945-957.
- Auger, P., Lett, C., 2003. Integrative biology: linking levels of organization. *Comptes Rendus Biologies* 326, 517-522.
- Badyaev, A.V., Foresman, K.R., Fernandes, M.V., 2000. Stress and developmental stability: Vegetation removal causes increased fluctuating asymmetry in shrews. *Ecology* 81, 336-345.
- Baize, D., Sterckeman, T., 2001. Of the necessity of knowledge of the natural pedo-geochemical background content in the evaluation of the contamination of soils by trace elements. *Science of the Total Environment* 264, 127-139.
- Baker, S., Herrchen, M., Hund-Rinke, K., Klein, W., Kordel, W., Peijnenburg, W., Rensing, C., 2003. Underlying issues including approaches and information needs in risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 6-19.
- Banasova, V., Horak, O., Ciamporova, M., Nadubinska, M., Lichtscheidl, I., 2006. The vegetation of metalliferous and non-metalliferous grasslands in two former mine regions in Central Slovakia. *Biologia* 61, 433-439.
- Barbault, R., 2000. *Ecologie générale - Structure et fonctionnement de la biosphère*. Dunod, Paris, France.
- Barjaktarovic, L., Elliott, J.E., Scheuhammer, A.M., 2002. Metal and Metallothionein Concentrations in Scoter (*Melanitta* spp.) from the Pacific Northwest of Canada, 1989-1994. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 43, 0486-0491.
- Barnthouse, L.W., Munns, W.R.J., Sorensen, M.T. (Eds.), 2008. Population-level ecological risk-assessment. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA.
- BASOL, 2009. Base de données Basol, in: Ministère de l'Ecologie, d.D.e.d.I.A.D. (Ed.), <http://basol.environnement.gouv.fr/>.
- Baur, A., Baur, B., 1992. Effect of corridor width on animal dispersal - a simulation study. *Global Ecology and Biogeography Letters* 2, 52-56.
- Baur, A., Baur, B., 1993. Daily movement patterns and dispersal in the land snail *Arianta arbustorum*. *Malacologia* 35, 89-98.
- Baur, B., Baur, A., 2006. Dispersal of the land snail *Helicigona lapicida* in an abandoned limestone quarry. *Malakologische Abhandlungen* 24, 135-139.

- Becker, T., Brandel, M., 2007. Vegetation-environment relationships in a heavy metal-dry grassland complex. *Folia Geobotanica* 42, 11-28.
- Beeby, A., 1985. The role of *Helix aspersa* as a major herbivore in the transfer of lead through a polluted ecosystem. *Journal of Applied Ecology* 22, 267-275.
- Beeby, A., Richmond, L., 1987. Adaptation by an urban population of the snail *Helix aspersa* to a diet contaminated with lead. *Environmental Pollution* 46, 73-82.
- Beeby, A., Richmond, L., 1988. Calcium metabolism in two populations of the snail *Helix aspersa* on a high lead diet. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 17, 507-511.
- Beeby, A., Richmond, L., 1998. Variation in the mineral composition of eggs of the snail, *Helix aspersa* between populations exposed to different levels of metal contamination. *Environmental Pollution* 101, 25-31.
- Beeby, A., Richmond, L., 2001. Calcium provision to eggs in two populations of *Helix aspersa* by parents fed a diet high in lead. *Journal of Molluscan Studies* 67, 1-6.
- Beeby, A., 2001. What do sentinels stand for? *Environmental Pollution* 112, 285-298.
- Beeby, A., Richmond, L., Herpe, F., 2002. Lead reduces shell mass in juvenile garden snails (*Helix aspersa*). *Environmental Pollution* 120, 283-288.
- Beernaert, J., Scheirs, J., Leirs, H., Blust, R., Verhagen, R., 2007. Non-destructive pollution exposure assessment by means of wood mice hair. *Environmental Pollution* 145, 443-451.
- Bengtsson, G., Ek, H., Rundgren, S., 1992. Evolutionary response of earthworms to long-term metal exposure. *Oikos* 63, 289-297.
- Bentley, J.M., 2008. Role of movement, interremnant dispersal and edge effects in determining sensitivity to habitat fragmentation in two forest-dependent rodents. *Austral Ecology* 33, 184-196.
- Berger, B., Dallinger, R., 1993. Terrestrial snails as quantitative indicators of environmental metal pollution. *Environmental Monitoring and Assessment* 25, 65-84.
- Bertin, G., Averbeck, D., 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* 88, 1549-1559.
- Beyer, N., Connor, E., Gerould, S., 1994. Estimates of soil ingestion by wildlife. *Journal of Wildlife Management* 58, 375-382.
- Bidar, G., Pruvot, C., Garçon, G., Verdin, A., Shirali, P., Douay, F., 2009. Seasonal and annual variations of metal uptake, bioaccumulation, and toxicity in *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal-contaminated field. *Environmental Science and Pollution Research* 16, 42-53.
- Bivand, R.S., Pebesma, E.J., Gómez-Rubio, V. (Eds.), 2008. Applied spatial data analysis with R. Springer+Business Media, LLC, New York, USA.
- Bleeker, E.A.J., van Gestel, C.A.M., 2007. Effects of spatial and temporal variation in metal availability on earthworms in floodplain soils of the river Dommel, The Netherlands. *Environmental Pollution* 148, 824-832.
- Boonstra, R., Manzon, R., Mihok, S., Helson, J., 2005. Hormetic effects of gamma radiation on the stress axis of natural populations of meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 334-343.
- Boucher, U., Balabane, M., Lamy, I., Cambier, P., 2005. Decomposition in soil microcosms of leaves of the metallophyte *Arabidopsis halleri*: Effect of leaf-associated heavy metals on biodegradation. *Environmental Pollution* 135, 187-194.
- Branford, D., Fowler, D., Moghaddam, M.V., 2004. Study of aerosol deposition at a wind exposed forest edge using <sup>210</sup>Pb and <sup>137</sup>Cs soil inventories. *Water Air and Soil Pollution* 157, 107-116.
- Brown, B.E., 1982. The form and function of metal-containing granules in invertebrate tissues. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 57, 621-667.
- Buekers, J., Steen Redeker, E., Smolders, E., 2009. Lead toxicity to wildlife: Derivation of a critical blood concentration for wildlife monitoring based on literature data. *Science of the Total Environment* 407, 3431-3438.
- Burel, F., Baudry, J., 1999. *Ecologie du paysage. Concepts, méthodes et applications*. Tec & Doc, Paris, France.
- Burel, F., Butet, A., Delettre, Y.R., de la Pena, N.M., 2004. Differential response of selected taxa to landscape context and agricultural intensification. *Landscape and Urban Planning* 67, 195-204.
- Burger, J., Gochfeld, M., 1997. Lead and neurobehavioral development in gulls: A model for understanding effects in the laboratory and the field. *Neurotoxicology* 18, 495-506.
- Burger, J., Diaz-Barriga, F., Marafante, E., Pounds, J., Robson, M., 2003. Methodologies to examine the importance of host factors in bioavailability of metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 20-31.
- Butet, A., Paillat, G., Delettre, Y., 2006. Seasonal changes in small mammal assemblages from field boundaries in an agricultural landscape of western France. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 113, 364-369.

- Cairns Jr, J., 1993. Will there ever be a field of landscape toxicology? *Environmental Toxicology and Chemistry* 12, 609-610.
- Cairns Jr, J., Nlederlehner, B.R., 1996. Developing a field of landscape ecotoxicology. *Ecological Applications* 6, 790-796.
- Cameron, R.A.D., Williamson, P., 1977. Estimating migration and effects of disturbance in mark-recapture studies on snail *Cepaea nemoralis* L. *Journal of Animal Ecology* 46, 173-179.
- Canova, L., 1992. Distribution and habitat preference of small mammals in a biotope of the north Italian plain. *Bollettino di zoologia* 59, 417-421.
- Caquet, T., Hanson, M.L., Roucaute, M., Graham, D.W., Lagadic, L., 2007. Influence of isolation on the recovery of pond mesocosms from the application of an insecticide. II. Benthic macroinvertebrate responses. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 1280-1290.
- Carlsen, T.M., Coty, J.D., Kercher, J.R., 2004. The spatial extent of contaminants and the landscape scale: An analysis of the wildlife, conservation biology, and population modeling literature. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 798-811.
- Carreon-Martinez, L., Heath, D.D., 2010. Revolution in food web analysis and trophic ecology: diet analysis by DNA and stable isotope analysis. *Molecular Ecology* 19, 25-27.
- Carrillo-Gonzalez, R., Simunek, J., Sauve, S., Adriano, D., 2006. Mechanisms and pathways of trace element mobility in soils. *Advances in Agronomy* 91, 111-178.
- Chaline, J., Baudvin, H., Jammot, D., Saint Girons, M.-C., 1974. Les proies des rapaces. Petits mammifères et leur environnement, Doin ed, Paris.
- Charissou, I., 1999. Identification des restes trouvés dans les pelotes de réjection de rapaces. Supplément scientifique de la revue *E pops* 44, 1-31.
- Chesser, R., Rodgers, B., Wickliffe, J., Gaschak, S., Chizhevsky, I., Phillips, C., Baker, R., 2001. Accumulation of <sup>137</sup>Cs and <sup>90</sup>Sr from abiotic and biotic sources in rodents at Chernobyl, Ukraine. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 1927-1935.
- CITEPA, 2009. Inventaire des émissions de polluants atmosphériques en France - Séries sectorielles et analyses étendues, Rapport d'inventaire national. Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique, Paris, France, p. 299.
- Clemens, S., 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88, 1707-1719.
- Clements, W.H., Newman, M.C. (Eds.), 2002. *Community ecotoxicology*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Clements, W.H., Rohr, J.R., 2009. Community responses to contaminants: using basic ecological principles to predict ecotoxicological effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 1789-1800.
- Clifford, P.A., Barchers, D.E., Ludwig, D.F., Sielken, R.L., Klingensmith, J.S., Graham, R.V., Banton, M.I., 1995. An approach to quantifying spatial components of exposure for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 895-906.
- Cœurdassier, M., Scheifler, R., Mench, M., Crini, N., Vangronsveld, J., de Vaufleury, A., *Accepted*. Arsenic transfer and impacts on snails exposed to *in situ* stabilized and untreated As-contaminated soils. *Environmental Pollution*.
- Cœurdassier, M., Poirson, C., Paul, J.-P., Rieffel, D., Giraudoux, P., Scheifler, R., *Submitted*. Diet of migrant Red Kites during a vole outbreak in Eastern France and associated risk of secondary poisoning by bromadiolone (rodenticide). *Ibis*.
- Cœurdassier, M., Gomot-de Vaufleury, A., Badot, P.-M., 2000. Dose-dependent growth inhibition and bioaccumulation of hexavalent chromium in land snail *Helix aspersa aspersa*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 2571-2578.
- Cœurdassier, M., Gomot-de Vaufleury, A., Lovy, C., Badot, P.-M., 2002. Is the cadmium uptake from soil important in bioaccumulation and toxic effects for snails. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53, 425-431.
- Commision of the European Communities, 2002. Vers une stratégie pour la protection des sols. Communication de la Commission au Conseil, au Parlement Européen, au Comité Economique et Social et au Comité des Régions, Bruxelles, Belgique.
- Commision of the European Communities, 2006. Proposal for a directive of the European parlement and of the council establishing a framework for the protection of soil and amending Directive 2004/35/EC.
- Cooper, J.E., 1994. Bleeding of pulmonate snails. *Laboratory Animals* 28, 277-278.
- Correa, M., Roig-Navarro, A.F., Aragon, C.M.G., 2004. Motor behavior and brain enzymatic changes after acute lead intoxication on different strains of mice. *Life Sciences* 74, 2009-2021.
- Cressie, N., 1988. Spatial prediction and ordinary kriging. *Mathematical Geology* 20, 405-421.

- D'Havé, H., Scheirs, J., Mubiana, V.K., Verhagen, R., Blust, R., De Coen, W., 2005. Non-destructive pollution exposure assessment in the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*): I. Relationships between concentrations of metals and arsenic in hair, spines, and soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 2356-2364.
- D'Havé, H., Scheirs, J., Mubiana, V.K., Verhagen, R., Blust, R., De Coen, W., 2006. Non-destructive pollution exposure assessment in the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*): II. Hair and spines as indicators of endogenous metal and As concentrations. *Environmental Pollution* 142, 438-448.
- Dagnino, A., Sforzini, S., Dondero, F., Fenoglio, S., Bona, E., Jensen, J., Viarengo, A., 2009. A "weight-of-evidence" approach for the integration of environmental "Triad" data to assess ecological risk and biological vulnerability. *Integrated Environmental Assessment and Management* 4, 314-326.
- Dallinger, R., Wieser, W., 1984. Patterns of accumulation, distribution and liberation of Zn, Cu, Cd and Pb in different organs of the land snail *Helix pomatia* L. *Comparative Biochemistry and Physiology C - Pharmacology Toxicology & Endocrinology* 79, 117-124.
- Dallinger, R., Rainbow, P.S. (Eds.), 1993. *Ecotoxicology of metals in invertebrates*. Lewis publishers, Boca raton, Florida, USA.
- Dallinger, R., Berger, B., Hunziker, P., Kagi, J.H.R., 1999. Structure and function of metallothionein isoforms in terrestrial snails, in: Klaassen, C.D. (Ed.), *Metallothionein Iv*. Birkhauser Verlag Ag, Basel, pp. 173-178.
- Dallinger, R., Berger, B., Gruber, C., Hunziker, P., Sturzenbaum, S., 2000. Metallothioneins in terrestrial invertebrates: Structural aspects, biological significance and implications for their use as biomarkers. *Cellular and Molecular Biology* 46, 331-346.
- Dallinger, R., Lagg, B., Egg, M., Schipflinger, R., Chabicovsky, M., 2004. Cd accumulation and Cd-metallothionein as a biomarker in *Cepaea hortensis* (Helicidae, Pulmonata) from laboratory exposure and metal-polluted habitats. *Ecotoxicology* 13, 757-772.
- Damek-Poprawa, M., 2002. The effect of heavy metal accumulation on metallothionein content in selected tissues of bank voles and yellow-necked mice caught near a steelworks and zinc smelter. *Folia Biologica* 50, 211-214.
- Damek-Poprawa, M., Sawicka-Kapusta, K., 2004. Histopathological changes in the liver, kidneys, and testes of bank voles environmentally exposed to heavy metal emissions from the steelworks and zinc smelter in Poland. *Environmental Research* 96, 72-78.
- Danielsson, R., Frank, A., 2009. Cadmium in moose kidney and liver – age and gender dependency, and standardisation for environmental monitoring. *Environmental Monitoring and Assessment* 157, 73-88.
- Danson, F.M., Graham, A.J., Pleydell, D.R.J., Campos-Ponce, M., Giraudoux, P., Craig, P.S., 2003. Multi-scale spatial analysis of human alveolar echinococcosis risk in China. *Parasitology* 127, S133-S141.
- Danson, F.M., Armitage, R.P., Marston, G.G., 2008. Spatial and temporal modelling for parasite transmission studies and risk assessment. *Parasite-Journal De La Societe Francaise De Parasitologie* 15, 463-468.
- Das, A.K., Chakraborty, R., Cervera, M.L., de la Guardia, M., 1995. Metal speciation in solid matrices. *Talanta* 42, 1007-1030.
- Dauwe, T., Lieven, B., Ellen, J., Rianne, P., Ronny, B., Marcel, E., 2002. Great and blue tit feathers as biomonitors for heavy metal pollution. *Ecological Indicators* 1, 227-234.
- Davis, S.R., Cousins, R.J., 2000. Metallothionein expression in animals: A physiological perspective on function. *Journal of Nutrition* 130, 1085-1088.
- Dazy, M., Beraud, E., Cotelle, S., Grevilliot, F., Ferard, J.F., Masfaraud, J.F., 2009. Changes in plant communities along soil pollution gradients: Responses of leaf antioxidant enzyme activities and phytochelatin contents. *Chemosphere* 77, 376-383.
- De Burbure, C., Buchet, J.P., Leroyer, A., Nisse, C., Haguenoer, J.M., Mutti, A., Smerhovsky, Z., Cikrt, M., Trzcinka-Ochocka, M., Razniewska, G., Jakubowski, M., Bernard, A., 2006. Renal and neurologic effects of cadmium, lead, mercury, and arsenic in children: Evidence of early effects and multiple interactions at environmental exposure levels. *Environmental Health Perspectives* 114, 584-590.
- De Lange, H.J., Lahr, J., Van der Pol, J.J.C., Wessels, Y., Faber, J.H., 2009. Ecological vulnerability in wildlife: an expert judgment and multicriteria analysis tool using ecological traits to assess relative impact of pollutants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 2233-2240.
- De Ridder, K., Neiryck, J., Mensink, C., 2004. Parametising forest edge deposition effective roughness length. *Agricultural and Forest Meteorology* 123, 1-11.
- de Vaufléury, A., Gomot, L., 2006. Bioaccumulation, biomagnification des polluants dans la faune terrestre: un outil pour la biosurveillance des écosystèmes, Synthèse bibliographique réalisée dans le cadre de la convention Ademe-Université Franche-Comté n°01 75 037, p. 598.
- de Vaufléury, A., Coeurdassier, M., Pandard, P., Scheifler, R., Lovy, C., Crini, N., Badot, P.-M., 2006. How terrestrial snails can be used in risk assessment of soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 797-806.

- Debruyn, A.M.H., Gobas, F.A.P.C., 2006. A bioenergetic biomagnification model for the animal kingdom. *Environmental Science & Technology* 40, 1581-1587.
- Declercq, C., Ladrière, L., 2004. Programme de dépistage du saturnisme infantile dans 9 communes du Nord et du Pas-de-Calais. Observatoire Régional de la Santé du Nord-Pas-de-Calais, Arras, p. 32.
- Delattre, P., Pascal, M., Le Pesteur, M.-H., Giraudoux, P., Damange, J.-P., 1988. Caractéristiques écologiques et épidémiologiques de l'*Echinococcus multilocularis* au cours d'un cycle complet des populations d'un hôte intermédiaire (*Microtus arvalis*). *Canadian Journal of Zoology* 66, 2740-2750.
- Dell'Omo, G., Shore, R.F., Lipp, H.P., 1998. An automated system, based on microchips, for monitoring individual activity in wild small mammals. *Journal of Experimental Zoology* 280, 97-99.
- Denys, S., Caboche, J., Tack, K., Delalain, P., 2007. Bioaccessibility of lead in high carbonate soils. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 42, 1331-1339.
- Denys, S., Caboche, J., Feidt, C., Hazebrouck, B., Dor, F., Dabin, C., Floch-Barneaud, A., Tack, K., 2009. Oral bioavailability and bioaccessibility in humans of metals and metalloids from polluted soils: Definitions, measure protocols and international operational feedback. *Environnement Risques & Sante* 8, 433-438.
- Depledge, M.H., 1990. New approaches in ecotoxicology - Can inter-individual physiological variability be used as a tool to investigate pollution effects ? *Ambio* 19, 251-252.
- Deram, A., Denayer, F.O., Petit, D., Van Haluwyn, C., 2006. Seasonal variations of cadmium and zinc in *Arrhenatherum elatius*, a perennial grass species from highly contaminated soils. *environmental Pollution* 140, 62-70.
- Dhivert, E., 2008. Concentrations en éléments traces métalliques dans les communautés de mollusques terrestres le long d'un gradient de contamination. Université de Franche-Comté, UMR Chrono-Environnement, Besançon, France, p. 23.
- Dmowski, K., Kozakiewicz, M., Kozakiewicz, A., 1995. Ecological effects of heavy metal pollution (Pb, Cd, Zn) on small mammal populations and communities. *Bulletin of the polish academy of sciences. Biological sciences* 43, 1-10.
- Dmowski, K., Kozakiewicz, A., Kozakiewicz, M., 1998. Small mammal populations and community under conditions of extremely high thallium contamination in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41, 2-7.
- Dmowski, K., Kozakiewicz, M., Kozakiewicz, A., 2000. Small mammal response at population and community level to heavy metal pollution (Pb, Cd, Tl), in: Kamunega, J., Laskowski, R. (Eds.), *Demography in ecotoxicology*. John Wiley and Sons, p. 298.
- Dobson, S., Shore, R.F., 2002. Extrapolation for Terrestrial Vertebrates. *Human and Ecological Risk Assessment* 8, 45-54.
- Doran, J.W., Zeiss, M.R., 2000. Soil health and sustainability: Managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology* 15, 3-11.
- Douay, F., Roussel, H., Pruvot, C., Loriette, A., Fourrier, H., 2008a. Assessment of a remediation technique using the replacement of contaminated soils in kitchen gardens nearby a former lead smelter in Northern France. *Science of the Total Environment* 401, 29-38.
- Douay, F., Pruvot, C., Roussel, H., Ciesielski, H., Fourrier, H., Proix, N., Waterlot, C., 2008b. Contamination of urban soils in an area of Northern France polluted by dust emissions of two smelters. *Water Air and Soil Pollution* 188, 247-260.
- Douay, F., Roussel, H., Pruvot, C., Waterlot, C., 2008c. Impact of a smelter closedown on metal contents of wheat cultivated in the neighbourhood. *Environmental Science and Pollution Research* 15, 162-169.
- DRIRE, 2003. L'industrie au regard de l'environnement. Direction Régionale de l'Industrie de la Recherche et de l'Environnement, p. 308.
- Drouhot, S., 2008. Régime alimentaire du Campagnol roussâtre *Myodes glareolus* et concentrations en Pb et Zn dans le tube digestif, le contenu stomacal et les fécès, sur un ancien site métallurgique du nord de la France. Université de Franche-Comté, UMR Chrono-Environnement, Besançon, France, p. 22.
- Dupuy, G., Giraudoux, P., Delattre, P., 2009. Numerical and dietary responses of a predator community in a temperate zone of Europe. *Ecography* 32, 277-290.
- Edwards, C.A., 2002. Assessing the effects of environmental pollutants on soil organisms, communities, processes and ecosystems. *European Journal of Soil Biology* 38, 225-231.
- Eeva, T., Tanhuanpää, S., Rabergh, C., Airaksinen, S., Nikinmaa, M., Lehikoinen, E., 2000a. Biomarkers and fluctuating asymmetry as indicators of pollution-induced stress in two hole-nesting passerines. *Functional Ecology* 14, 235-243.
- Eeva, T., Ojanen, M., Räsänen, O., Lehikoinen, E., 2000b. Empty nests in the great tit (*Parus major*) and the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) in a polluted area. *Environmental Pollution* 109, 303-309.
- Eeva, T., Lehikoinen, E., Nikinmaa, M., 2003. Pollution-induced nutritional stress in birds: An experimental study of direct and indirect effects. *Ecological Applications* 13, 1242-1249.

- Eeva, T., Hasselquist, D., Langefors, A., Tummeleht, L., Nikinmaa, M., Ilmonen, P., 2005. Pollution related effects on immune function and stress in a free-living population of pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *Journal of Avian Biology* 36, 405.
- Eeva, T., Ahola, M., Laaksonen, T., Lehtikoinen, E., 2008. The effects of sex, age and breeding success on breeding dispersal of pied flycatchers along a pollution gradient. *Oecologia* 157, 231-238.
- Eeva, T., Ahola, M., Lehtikoinen, E., 2009. Breeding performance of blue tits (*Cyanistes caeruleus*) and great tits (*Parus major*) in a heavy metal polluted area. *Environmental Pollution* 157, 3126-3131.
- Elbin, S.B., Burger, J., 1994. Implantable microchips for individual identification in wild and captive populations. *Wildlife Society Bulletin* 22, 677-683.
- Elliott, J.E., Scheuhammer, A.M., 1997. Heavy metal and metallothionein concentrations in seabirds from the Pacific coast of Canada. *Marine Pollution Bulletin* 34, 794-801.
- Erry, B.V., Macnair, M.R., Meharg, A., Shore, R., 1999. Seasonal Variation in Dietary and Body Organ Arsenic Concentrations in Wood Mice (*Apodemus sylvaticus*) and Bank Voles (*Clethrionomys glareolus*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 63, 567-574.
- Ettler, V., Vanek, A., Mihaljevic, M., Bezdicka, P., 2005. Contrasting lead speciation in forest and tilled soils heavily polluted by lead metallurgy. *Chemosphere* 58, 1449-1459.
- European Commission, 2003. Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Version 2. European Chemical Bureau, p. 311.
- European Environment Agency, 2006. Overview of contaminants affecting soil and groundwater in Europe. EIONET priority data flow. CSI (015), in: <http://themes.eea.europa.eu/indicators/> (Ed.).
- European Environment Agency, 2007. Europe's environment: the fourth assessment. European Environment Agency, Copenhagen, Denmark, Luxembourg, p. 453.
- Fairbrother, A., Wenstel, R., Sappington, K., Wood, W., 2007. Framework for metals risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68, 145-227.
- Floret, N., Viel, J.F., Lucot, E., Dudermel, P.M., Cahn, J.Y., Badot, P.M., Mauny, F., 2006. Dispersion modeling as a dioxin exposure indicator in the vicinity of a municipal solid waste incinerator: A validation study. *Environmental Science and Technology* 40, 2149-2155.
- Forbes, V.E., Moller, V., Depledge, M.H., 1995. Intrapopulation variability in sublethal response to heavy metal stress in sexual and asexual gastropod populations. *Functional Ecology* 9, 477-484.
- Forbes, V.E., Forbes, T.L., 1997. *Ecotoxicologie. Théorie et applications*. INRA, Paris, France.
- Fowler, D., Skiba, U., Nemitz, E., Choubedar, F., Branford, D., Donovan, R., Rowland, P., 2004. Measuring aerosol and heavy metal deposition on urban woodland and grass using inventories of <sup>210</sup>Pb and metal concentrations in soil. *Water Air and Soil Pollution* 4, 483-499.
- Frangi, J.-P., Richard, D., 1997. Heavy metal soil pollution cartography in northern France. *Science of the Total Environment* 205, 71-79.
- Franssens, M., Flament, P., Deboudt, K., Weis, D., Perdrix, E., 2004. Evidencing lead deposition at the urban scale using "short-lived" isotopic signatures of the source term (Pb-Zn refinery). *Atmospheric Environment* 38, 5157-5168.
- Fritsch, C., Scheifler, R., Beaugelin-Seiller, K., Hubert, P., Coeurdassier, M., de Vaufléury, A., Badot, P.-M., 2008. Biotic interactions modify the transfer of cesium-137 in a soil-earthworm-plant-snail food web. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1698-1707.
- Gaca, P., Mietelski, J.W., Kitowski, I., Grabowska, S., Tomankiewicz, E., 2004. <sup>40</sup>K, <sup>137</sup>Cs, <sup>90</sup>Sr, <sup>238,239+240</sup>Pu and <sup>241</sup>Am in mammals' skulls from owls' pellets and owl skeletons in Poland. *Journal of Environmental Radioactivity* 78, 93-103.
- Gaines, K., Boring, C., Porter, D., 2005. The development of a spatial explicit model to estimate radiocaesium body burdens in raccoons (*Procyon lotor*) for ecological risk assessment. *Science of the Total Environment* 341, 15-31.
- Galbraith, H., Lejeune, K., Lipton, J., 1995. Metal and arsenic impacts to soils, vegetation communities and wildlife habitat in southwest Montana uplands contaminated by smelter emissions. 1. Field-evaluation. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 1895-1903.
- Gaston, K.J., 1994. *Rarity*. Chapman & Hall, London, UK.
- Gendron, A.D., Marcogliese, D.J., Barbeau, S., Christin, M.S., Brousseau, P., Ruby, S., Cyr, D., Fournier, M., 2003. Exposure of leopard frogs to a pesticide mixture affects life history characteristics of the lungworm *Rhabdias ranae*. *Oecologia* 135, 469-476.
- Gillet, S., Ponge, J.F., 2003. Changes in species assemblages and diets of Collembola along a gradient of metal pollution. *Applied Soil Ecology* 22, 127-138.

- Gimbert, F., 2006. Cinétiques de transfert de polluants métalliques du sol à l'escargots. University of Franche-Comté, Besançon, France, p. 192.
- Gimbert, F., Vijver, M.G., Coeurdassier, M., Scheifler, R., Peijnenburg, W.J.G.M., Badot, P.M., de Vaufleury, A., 2008a. How subcellular partitioning can help to understand heavy metal accumulation and elimination kinetics in snails. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1284-1292.
- Gimbert, F., Mench, M., Coeurdassier, M., Badot, P.-M., de Vaufleury, A., 2008b. Kinetic and dynamic aspects of soil-plant-snail transfer of cadmium in the field. *Environmental Pollution* 152, 736-745.
- Giraudoux, P., Delattre, P., Quere, J.P., Damange, J.-P., 1994. Structure and kinetics of rodent populations in a region under agricultural land abandonment. *Acta Oecologica* 15, 385-400.
- Giraudoux, P., Delattre, P., Takahashi, K., Raoul, F., Quéré, J.P., Craig, P., Vuitton, D., 2002. Transmission ecology of *Echinococcus multilocularis* in wildlife: what can be learned from comparative studies and multi-scale approaches ?, in: Craig, P., Pawlowski, Z. (Eds.), *Cestode zoonoses: Echinococcosis and Cystercosis. An emergent and global problem*. NATO Sciences Series, IOS press, Amsterdam, The Netherlands, pp. 251-262.
- Giraudoux, P., Craig, P.S., Delattre, P., Bao, G., Bartholomot, B., Harraga, S., Quere, J.P., Raoul, F., Wang, Y., Shi, D., Vuitton, D.A., 2003. Interactions between landscape changes and host communities can regulate *Echinococcus multilocularis* transmission. *Parasitology* 127, S121-S131.
- Gobas, F.A.P.C., de Wolf, W., Burkhard, L.P., Verbruggen, E., Plotzke, K., 2009. Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. *Integrated Environmental Assessment and Management* 5, 624-637.
- Gobat, J.-M., Aragno, M., Matthey, W., 2003. *Le sol vivant*, Deuxième édition ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne.
- Gomot-de Vaufleury, A., Kerhoas, I., 2000. Effects of cadmium on the reproductive system of the land snail *Helix aspersa*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 64, 434-442.
- Gomot-de Vaufleury, A., Pihan, F., 2000. Growing snails used as sentinels to evaluate terrestrial environment contamination by trace elements. *Chemosphere* 40, 275-284.
- Gomot-de Vaufleury, A., Bispo, A., 2000. Methods for toxicity assessment of contaminated soil by oral or dermal uptake in land snails. 1. Sublethal effects on growth. *Environmental Science & Technology* 34, 1865-1870.
- Gomot-de Vaufleury, A., 2000. Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb, and Pentachlorophenol) with *Helix aspersa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46, 41-50.
- Gomot-de Vaufleury, A., Pihan, F., 2002. Methods for toxicity assessment of contaminated soil by oral or dermal uptake in land snails: Metal bioavailability and bioaccumulation. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 820-827.
- Gonzalez, X.I., Aboal, J.R., Fernandez, J.A., Carballeira, A., 2006. Considerations on the sample size of wood mice used to biomonitor metals. *Science of the Total Environment* 366, 910-914.
- Gorree, M., Tamis, W.L.M., Traas, T.P., Elbers, M.A., 1995. BIOMAG: a model for biomagnification in terrestrial food chains. The case of cadmium in the Kempen, The Netherlands. *Science of the Total Environment* 168, 215-223.
- GRASS Development Team, 2008. Geographic Resources Analysis Support System (GRASS) Software. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://grass.osgeo.org>.
- Green, A.J., 2001. Mass/length residuals: Measures of body condition or generators of spurious results? *Ecology* 82, 1473-1483.
- Grimm, B., Paill, W., 2001. Spatial distribution and home-range of the pest slug *Arion lusitanicus* (Mollusca: Pulmonata). *Acta Oecologica* 22, 219-227.
- Hamers, T., van den Berg, J.H.J., van Gestel, C.A.M., van Schooten, F.-J., Murk, A.J., 2006. Risk assessment of metals and organic pollutants for herbivorous and carnivorous small mammal food chains in a polluted floodplain (Biesbosch, The Netherlands). *Environmental Pollution* 144, 581-595.
- Harmsen, J., 2007. Measuring bioavailability: from a scientific approach to standard methods. *Journal of Environmental Quality* 36, 1420-1428.
- Harper, S.J., Batzli, G.O., 1996. Monitoring use of runways by voles with passive integrated transponders. *Journal of Mammalogy* 77, 364-369.
- Hasselbach, L., Ver Hoef, J.M., Ford, J., Neitlich, P., Crecelius, E., Berryman, S., Wolk, B., Bohle, T., 2005. Spatial patterns of cadmium and lead deposition on and adjacent to National Park Service lands in the vicinity of Red Dog Mine, Alaska. *Science of the Total Environment* 348, 211-230.
- Hayet, A., Deram, A., Couffignal, B., 2009. Evaluation des risques écologiques (ERE) : vers une harmonisation des méthodes et des outils à l'échelle européenne. *Environnement Risques & Sante* 8, 137-147.
- Hayet, A., 2010. Contribution de l'écologie à la caractérisation de sites contaminés - Application à l'évaluation des risques écologiques. Thèse. Université Lille 2, Lille, France, p. 741.
- Heikens, A., Peijnenburg, W.J.G.M., Hendriks, A.J., 2001. Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates. *Environmental Pollution* 113, 385-393.



- Hendrickx, F., Maelfait, J.-P., Bogaert, N., Tojal, C., Du Laing, G., Tack, F.M.G., Verloo, M.G., 2004. The importance of biological factors affecting trace metal concentration as revealed from accumulation patterns in co-occurring terrestrial invertebrates. *Environmental Pollution* 127, 335-341.
- Hispard, F., de Vaufleury, A., Cosson, R.P., Devaux, S., Scheifler, R., Coeurdassier, M., Gimbert, F., Martin, H., Richert, L., Berthelot, A., Badot, P.M., 2008a. Comparison of transfer and effects of Cd on rats exposed in a short experimental snail-rat food chain or to CdCl<sub>2</sub> dosed food. *Environment International* 34, 381-389.
- Hispard, F., Schuler, D., de Vaufleury, A., Scheifler, R., Badot, P.M., Dallinger, R., 2008b. Metal distribution and metallothionein induction after cadmium exposure in the terrestrial snail *Helix aspersa* (gastropoda, pulmonata). *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1533-1542.
- Hobbelen, P.H.F., Koolhaas, J.E., van Gestel, C.A.M., 2006. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* in relation to total and available metal concentrations in field soils. *Environmental Pollution* 144, 639-646.
- Hoff, J., 2000. Methods of blood collection in the mouse. *Lab animal* 29, 47-53.
- Hope, B.K., 2000. Generating probabilistic spatially-explicit individual and population exposure estimates for ecological risk assessments. *Risk Analysis* 20, 573-589.
- Hope, B.K., 2001. A case study comparing static and spatially explicit ecological exposure analysis methods. *Risk Analysis* 21, 1001-1010.
- Hope, B.K., 2005. Performing spatially and temporally explicit ecological exposure assessments involving multiple stressors. *Human and Ecological Risk Assessment* 11, 539-565.
- Hope, B.K., 2006. An examination of ecological risk assessment and management practices. *Environment International* 32, 983-995.
- Hopkin, S.P., 1989. *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. Elsevier, London, UK.
- Huitu, O., Norrdahl, K., Korpimäki, E., 2004. Competition, predation and interspecific synchrony in cyclic small mammal communities. *Ecography* 27, 197-206.
- Hund-Rinke, K., Kordel, W., 2003. Underlying issues in bioaccessibility and bioavailability: experimental methods. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 52-62.
- Hunter, B.A., Johnson, M.S., 1982. Food chain relationships of copper and cadmium in contaminated grassland ecosystems. *Oikos* 38, 108-117.
- IPCS, 2004. *IPCS risk assessment terminology*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 2006. *Soil quality - Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae). Determination of the effects on growth by soil contamination - ISO 15952:2006.*, Acta Oecologica. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 2008. *Soil quality - Requirements and guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials. ISO 17402:2008.* International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Jacobson, T., Holmström, K., Sundelin, B., 2009. Parasite infection as PFOs toxicity end-point, SETAC Europe 19th Annual Meeting, Göteborg, Sweden.
- Janssen, M.P.M., Bruins, A., Devries, T.H., Vanstraelen, N.M., 1991. Comparison of cadmium kinetics in 4 soil arthropod species. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 20, 305-312.
- Janssens, T.K.S., Roelofs, D., Van Straalen, N.M., 2009. Molecular mechanisms of heavy metal tolerance and evolution in invertebrates. *Insect Science* 16, 3-18.
- Jensen, J., Mesman, M., Bierkens, J., Loibner, A., Rutgers, M., Bogolte, T., Celis, R., Dirven-van Breemen, E.M., Erlacher, E., Ehlers, C., Hartnik, T., Sorokin, N., Laak, T.L.t. (Eds.), 2006. *Ecological risk assessment of contaminated land - Decision support for site specific investigations*. RIVM, Bilthoven, The Netherlands.
- Jensen, J., Pedersen, M.B., 2006. Ecological risk assessment of contaminated soil. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 186, 73-105.
- Johnson, D., Hale, B., 2004. White birch (*Betula papyrifera* Marshall) foliar litter decomposition in relation to trace metal atmospheric inputs at metal-contaminated and uncontaminated sites near Sudbury, Ontario and Rouyn-Noranda, Quebec, Canada. *environmental Pollution* 127, 65-72.
- Johnson, P.T.J., Lund, P.J., Hartson, R.B., Yoshino, T.P., 2009. Community diversity reduces *Schistosoma mansoni* transmission, host pathology and human infection risk. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 276, 1657-1663.
- Jongbloed, R.H., Traas, T.P., Luttik, R., 1996. A probabilistic model for deriving soil quality criteria based on secondary poisoning of top predators: II. Calculations for dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and cadmium. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 34, 279-306.

- Jordaens, K., De Wolf, H., Van Houtte, N., Vandecasteele, B., Backeljau, T., 2006. Genetic variation in two land snails, *Cepaea nemoralis* and *Succinea putris* (Gastropoda, Pulmonata), from sites differing in heavy metal content. *Genetica* 128, 227-239.
- Joslin, J.O., 2009. Blood Collection Techniques in Exotic Small Mammals. *Journal of Exotic Pet Medicine* 18, 117-139.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 1992. Trace elements in soils and plants, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Kammenga, J., Laskowski, R. (Eds.), 2000. Demography in ecotoxicology. John Wiley & Sons Chichester, UK.
- Kappes, H., Jordaens, K., Hendrickx, F., Maelfait, J.P., Lens, L., Backeljau, T., 2009. Response of snails and slugs to fragmentation of lowland forests in NW Germany. *Landscape Ecology* 24, 685-697.
- Kapustka, L.A., Galbraith, H., Luxon, M., Yocum, J., 2001. Using landscape ecology to focus ecological risk assessment and guide risk management decision-making. *Toxicology and Industrial Health* 17, 236-246.
- Kapustka, L.A., 2008. Limitations of the current practices used to perform ecological risk assessment. *Integrated Environmental Assessment and Management* 4, 290-298.
- Kataev, G., 2005. The state of the mammal community of boreal forest ecosystems in the vicinity of a nickel-smelting plant. *Russian Journal of Ecology* 36, 421-426.
- Kaufman, C.A., Bennett, J.R., Koch, I., Reimer, K.J., 2007. Lead bioaccessibility in food web intermediates and the influence on ecological risk characterization. *Environmental Science & Technology* 41, 5902-5907.
- Kawecki, T.J., Ebert, D., 2004. Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* 7, 1225-1241.
- Kerney, M.P., Cameron, R.A.D., 2006. Guide des escargots et limaces d'Europe. Delachaux et Niestlé, Paris, France.
- Kitron, U., Clennon, J.A., Cecere, M.C., Gurtler, R.E., King, C.H., Vazquez-Prokopec, G., 2006. Upscale or downscale: applications of fine scale remotely sensed data to Chagas disease in Argentina and schistosomiasis in Kenya. *Geospatial Health* 1, 49-58.
- Klaassen, C.D., Liu, J., Diwan, B.A., 2009. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 238, 215-220.
- Klar, B., Sures, B., 2004. A nonlinear model of stress hormone levels in rats - The interaction between pollution and parasites. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59, 23-30.
- Klevezal, G.A., 1996. Recording structures of mammals. Determination of age and reconstruction of life history. Balkema, Rotterdam, The Netherlands.
- Klok, C., Thissen, J., 2009. Are laboratory derived toxicity results informative for field situations? Case study on earthworm populations contaminated with heavy metals. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 251-255.
- Knopper, L.D., Mineau, P., 2004. Organismal effects of pesticide exposure on meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) living in golf course ecosystems: Developmental instability, clinical hematology, body condition, and blood parasitology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1512-1519.
- Kojadinovic, J., Bustamante, P., Le Corre, M., Cosson, R.P., 2007. Trace elements in three marine birds breeding on Reunion Island (Western Indian Ocean): Part 2 - Factors influencing their detoxification. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52, 431-440.
- Kooistra, L., Leuven, R.S.E.W., Nienhuis, P.H., Wehrens, R., Buydens, L.M.C., 2001. A Procedure for Incorporating Spatial Variability in Ecological Risk Assessment of Dutch River Floodplains. *Environmental Management* 28, 359-373.
- Kooistra, L., Huijbregts, M.A.J., Ragas, A.M.J., Wehrens, R., Leuven, R., 2005. Spatial variability and uncertainty in ecological risk assessment: A case study on the potential risk of cadmium for the little owl in a Dutch river flood plain. *Environmental Science and Technology* 39, 2177-2187.
- Kozakiewicz, M., 1976. The weight of eye lens as the proposed age indicator of the bank vole. *Acta Theriologica* 21, 314-316.
- Kozakiewicz, M., Gortat, T., Panagiotopoulou, H., Gryczynska-Siemiakowska, A., Rutkowski, R., Kozakiewicz, A., Abramowicz, K., 2009. The spatial genetic structure of bank vole (*Myodes glareolus*) and yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*) populations: The effect of distance and habitat barriers. *Animal Biology* 59, 169-187.
- Lafferty, K., 1997. Environmental parasitology: what can parasites tell us about human impacts on the environment? *Parasitology Today* 13, 251-255.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. (Eds.), 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Masson, Paris, France.
- Lahr, J., Münier, B., De Lange, H., Faber, J., Sørensen, P.B., *In press*. Wildlife vulnerability and risk maps for combined pollutants. *Science of the Total Environment*.
- Laskowski, R., Hopkin, S.P., 1996a. Accumulation of Zn, Cu, Pb and Cd in the garden snail (*Helix aspersa*): Implications for predators. *Environmental Pollution* 91, 289-297.

- Laskowski, R., Hopkin, S.P., 1996b. Effect of Zn, Cu, Pb, and Cd on fitness in snails (*Helix aspersa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 34, 59-69.
- Le Louarn, H., Quéré, J., Butet, A., 2003. *Les Rongeurs de France - Faunistique et biologie*, 2e édition revue et augmentée ed, Paris, France.
- Lebourg, A., Sterckeman, T., Ciesielski, H., Proix, N., 1996. Intérêt de différents réactifs d'extraction chimique pour l'évaluation de la biodisponibilité des métaux en traces du sol. *Agronomie* 16, 201-215.
- Lefcort, H., Aguon, M.Q., Bond, K.A., Chapman, K.R., Chaquette, R., Clark, J., Kornachuk, P., Lang, B.Z., Martin, J.C., 2002. Indirect effects of heavy metals on parasites may cause shifts in snail species compositions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 43, 34-41.
- Leffler, P.E., Nyholm, N., 1996. Nephrotoxic effects in free-living bank voles in heavy metal polluted environment. *Ambio* 25, 417-420.
- Legendre, P., Legendre, L., 1998. *Numerical Ecology*, 2 ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Leroyer, A., Nisse, C., Hemon, D., Gruchociak, A., Salomez, J.L., Haguenoer, J.M., 2000. Environmental lead exposure in a population of children in northern France: Factors affecting lead burden. *American Journal of Industrial Medicine* 38, 281-289.
- Leroyer, A., Hemon, D., Nisse, C., Auque, G., Mazzuca, M., Haguenoer, J.M., 2001a. Determinants of cadmium burden levels in a population of children living in the vicinity of nonferrous smelters. *Environmental Research* 87, 147-159.
- Leroyer, A., Hemon, D., Nisse, C., Bazerques, J., Salomez, J.L., Haguenoer, J.M., 2001b. Environmental exposure to lead in a population of adults living in northern France: Lead burden levels and their determinants. *Science of the Total Environment* 267, 87-99.
- Leung, B., Forbes, M.R., 1997. Modelling fluctuating asymmetry in relation to stress and fitness. *Oikos* 78, 397-405.
- Lidicker, W.Z.J., 2008. Levels of organization in biology: on the nature and nomenclature of ecology's fourth level. *Biological Reviews* 83, 71-78.
- Liebsch, M., Becker, W., Gagelmann, G., 1978. Improvement of blood sampling technique for *Bomphalaria glabrata* using anesthesia and long-term relaxation and role of this method in studies of regulation of hemolymph glucose. *Comparative Biochemistry and Physiology A - Physiology* 59, 169-174.
- Linkov, I., Burmistrov, D., Cura, J., Bridges, T.S., 2002. Risk-based management of contaminated sediments: Consideration of spatial and temporal patterns in exposure modeling. *Environmental Science & Technology* 36, 238-246.
- Lochmiller, R., Rafferty, D.P., McBee, K., Basta, N.T., Wilson, J.A., 2000. Disruption of rodent assemblages in disturbed tallgrass prairie ecosystems contaminated with petroleum wastes, in: Albers, P., Heinz, G., Ohlendorf, H.M. (Eds.), *Environmental contaminants and terrestrial vertebrates: effects on populations, communities and ecosystems*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Brussels, Belgium, pp. 277-302.
- Loos, M., Ragas, A.M.J., Tramper, J.J., Hendriks, A.J., 2009. Modeling zinc regulation in small mammals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 2378-2385.
- Loos, M., Ragas, A.M.J., Plasmeijer, R., Schipper, A.M., Hendriks, A.J., *In press*. Eco-SpaCE: An object-oriented, spatially explicit model to assess the risk of multiple environmental stressors on terrestrial vertebrate populations. *Science of the Total Environment*.
- Lugon-Moulin, N., 2003. *Les Musaraignes - Biologie, Ecologie, Répartition en Suisse*, Ayer, Switzerland.
- Luoma, S.N., Rainbow, P.S., 2005. Why is metal bioaccumulation so variable? *Biodynamics as a unifying concept*. *Environmental Science and Technology* 39, 1921-1931.
- Lüring, M., Scheffer, M., 2007. Info-disruption: pollution and the transfer of chemical information between organisms. *Trends in Ecology & Evolution* 22, 374-379.
- Ma, W., 1989. Effect of soil pollution with metallic lead pellets on lead bioaccumulation and organ/body weight alterations in small mammals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 18, 617-622.
- Magiera, T., Zawadzki, J., 2007. Using of high-resolution topsoil magnetic screening for assessment of dust deposition: Comparison of forest and arable soil datasets. *Environmental Monitoring and Assessment* 125, 19-28.
- Marcogliese, D., 2005. Parasites of the superorganism: are they indicators of ecosystem health? *International Journal for Parasitology* 35, 705-716.
- Marinussen, M.P.J.C., van der Zee, S.E.A.T.M., 1996. Conceptual approach to estimating the effect of home-range size on the exposure of organisms to spatially variable soil contamination. *Ecological Modelling* 87, 83-89.
- Markert, B., 2007. Definitions and principles for bioindication and biomonitoring of trace metals in the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 21, 77-82.
- Marques, C.C., Gabriel, S.I., Pinheiro, T., Viegas-Crespo, A.M., Mathias, M.d.L., Bebianno, M.J., 2008. Metallothionein levels in Algerian mice (*Mus spretus*) exposed to elemental pollution: An ecophysiological approach. *Chemosphere* 71, 1340-1347.

- Martin, M.H., Coughtrey, P.J., 1982. Biological monitoring of heavy metal pollution : land and air, in: K., M. (Ed.). Applied science publishers, London, New-york, pp. 253-271.
- Martley, E., Gulson, B., Pfeifer, H., 2004. Metal concentrations in soils around the copper smelter and surrounding industrial complex of Port Kembla, NSW, Australia. *Science of the Total Environment* 325, 113-127.
- Mason, C.F., 1970. Food, feeding rates and assimilation in woodland snails. *Oecologia* 4, 358-373.
- Mateo, R., Estrada, J., Paquet, J.-Y., Riera, X., Dominguez, L., Guitart, R., Martinez-Vilalta, A., 1999. Lead shot ingestion by marsh harriers *Circus aeruginosus* from the Ebro delta, Spain. *Environmental Pollution* 104, 435-440.
- Mateo, R., Cadenas, R., Manez, M., Guitart, R., 2001. Lead Shot Ingestion in Two Raptor Species from Donana, Spain. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 48, 6-10.
- Matheron, G., 1969. Le krigeage universel. Les Cahiers du Centre de Morphologie Mathématique, Fascicule 1. Ecole des Mines de Paris, Fontainebleau, France.
- Matheron, G., 1970. La théorie des variables régionalisées, et ses applications. Les cahiers du Centre de morphologie mathématique de Fontainebleau, Fascicule 5. Ecole des Mines de Paris, Fontainebleau, France.
- McEnroe, N.A., Helmisaari, H.S., 2001. Decomposition of coniferous forest litter along a heavy metal pollution gradient, south-west Finland. *Environmental Pollution* 113, 11-18.
- McFarland, C.A., 2005. Delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) characterization and use in metal exposure assessment. Thesis, Texas Technology University, p. 170.
- McGeer, J.C., Henningsen, G., Lanno, R., Fisher, N., Sappington, K., Drexler, J., 2004. Issue paper on the bioavailability and bioaccumulation of metals, in: Beringer, M. (Ed.). US Environmental Protection Agency. Risk Assessment Forum, Washington DC, USA, p. 126.
- McLaughlin, J.F., Landis, W.G., 2000. Effects of environmental contaminants in spatially structured environments, in: Albers, P., Heinz, G., Ohlendorf, H.M. (Eds.), *Environmental contaminants and terrestrial vertebrates: effects on populations, communities and ecosystems*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Brussels, Belgium, pp. 245-276.
- McLaughlin, M.J., Hamon, R.E., McLaren, R.G., Speir, T.W., Rogers, S.L., 2000. Review: A bioavailability-based rationale for controlling metal and metalloid contamination of agricultural land in Australia and New Zealand. *Australian Journal of Soil Research* 38, 1037-1086.
- McLean, C.M., Koller, C.E., Rodger, J.C., MacFarlane, G.R., 2009. Mammalian hair as an accumulative bioindicator of metal bioavailability in Australian terrestrial environments. *Science of the Total Environment* 407, 3588-3596.
- Meers, E., Samson, R., Tack, F.M.G., Ruttens, A., Vandegehuchte, M., Vangronsveld, J., Verloo, M.G., 2007. Phytoavailability assessment of heavy metals in soils by single extractions and accumulation by *Phaseolus vulgaris*. *Environmental and Experimental Botany* 60, 385-396.
- Merian, E. (Ed.), 1991. *Metals and their compounds in the environment : Occurrence, analysis and biological relevance*. VCH, Weinheim, Germany.
- Mertens, J., Luysaert, S., Verbeeren, S., Vervaeke, P., Lust, N., 2001. Cd and Zn concentrations in small mammals and willow leaves on disposal facilities for dredged material. *Environmental Pollution* 115, 17-22.
- Michel, N., Burel, F., Butet, A., 2006. How does landscape use influence small mammal diversity, abundance and biomass in hedgerow networks of farming landscapes? *Acta Oecologica* 30, 11-20.
- Michel, N., Burel, F., Legendre, P., Butet, A., 2007. Role of habitat and landscape in structuring small mammal assemblages in hedgerow networks of contrasted farming landscapes in Brittany, France. *Landscape Ecology* 22, 1241-1253.
- Michelat, D., Giraudoux, P., 2006. Synchrony between small mammal population dynamics in marshes and adjacent grassland in a landscape of the Jura plateau, France: a ten year investigation. *Acta Theriologica* 5, 155-162.
- Migeon, A., Richaud, P., Guinet, F., Chalot, M., Blaudez, D., 2009. Metal accumulation by woody species on contaminated sites in the north of France. *Water Air and Soil Pollution* 204, 89-101.
- Mihok, S., 2004. Chronic exposure to gamma radiation of wild populations of meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*). *Journal of Environmental Radioactivity* 75, 233-266.
- Miles, A.T., Hawksworth, G.M., Beattie, J.H., Rodilla, V., 2000. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 35, 35-70.
- Millán de la Peña, N., Butet, A., Delettre, Y., Paillat, G., Morant, P., Le Du, L., Burel, F., 2003. Response of the small mammal community to changes in western French agricultural landscapes. *Landscape Ecology* 18, 265-278.
- Millennium Ecosystem Assessment, 2005. *Ecosystems and Human Well-being: Biodiversity Synthesis*. World Resources Institute, Washington, DC., USA, p. 100.
- Millsap, S.D., Blankenship, A.L., Bradley, P.W., Jones, P.D., Kay, D., Neigh, A., Park, C., Strause, K.D., Zwiernik, M.J., Giesy, J.P., 2004. Comparison of risk assessment methodologies for exposure of mink to PCBs on the Kalamazoo River, Michigan. *Environmental Science & Technology* 38, 6451-6459.

- Milton, A., Cooke, J.A., Johnson, M.S., 2003. Accumulation of Lead, Zinc, and Cadmium in a Wild Population of (*Clethrionomys glareolus*) from an Abandoned Lead Mine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44, 405-411.
- Mineau, P., 2005. A Review and Analysis of Study Endpoints Relevant to the Assessment "Long Term" Pesticide Toxicity in Avian and Mammalian Wildlife. *Ecotoxicology* 14, 775-799.
- Møller, A.P., Christe, P., Erritzøe, J., Mavarez, J., 1998. Condition, disease and immune defence. *Oikos* 83, 301-306.
- Monteiro, M.S., Santos, C., Soares, A., Mann, R.M., 2008. Does subcellular distribution in plants dictate the trophic bioavailability of cadmium to *Porcellio dilatatus* (Crustacea, Isopoda)? *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 2548-2556.
- Moreira, E.G., Vassilieff, I., Vassilieff, V.S., 2001. Developmental lead exposure: behavioral alterations in the short and long term. *Neurotoxicology and Teratology* 23, 489-495.
- Morgan, A.J., Kille, P., Stürzenbaum, S.R., 2007. Microevolution and ecotoxicology of metals in invertebrates. *Environmental Science and Technology* 41, 1085-1096.
- Moriarty, F., 1999. *Ecotoxicology. The study of pollutants in ecosystems.*, Third ed, San Diego, California, USA.
- Morrissey, C.A., Elliott, J.E., Ormerod, S.J., 2009. Resource requirements during egg production: implications for measuring contaminants in bird eggs, Setac Europe Annual Meeting, Göteborg, Sweden.
- Mulvey, M., Newman, M.C., Beeby, A.N., 1996. Genetic and conchological comparison of snails (*Helix aspersa*) differing in shell deposition of lead. *Journal of Molluscan Studies* 62, 213-223.
- Munkittrick, K.R., Arens, C.J., Lowell, R.B., Kaminski, G.P., 2009. A review of potential methods of determining critical effect size for designing environmental monitoring programs. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 1361-1371.
- Nahmani, J., Lavelle, P., 2002. Effects of heavy metal pollution on soil macrofauna in a grassland of Northern France. *European Journal of Soil Biology* 38, 297-300.
- Nahmani, J., Lavelle, P., Lapied, E., Van Oort, F., 2003a. Effects of heavy metal soil pollution on earthworm communities in the north of France. *Pedobiologia* 47, 663-669.
- Nahmani, J., Van Oort, F., Lapied, E., Rouland, C., Lavelle, P., 2003b. The effects of metals on the soil ecosystems. *Biofutur*, 40-42.
- Nahmani, J., Rossi, J.-P., 2003. Soil macroinvertebrates as indicators of pollution by heavy metals. *Comptes Rendus - Biologies* 326, 295-303.
- Nams, V.O., 2005. Using animal movement paths to measure response to spatial scale. *Oecologia* 143, 179-188.
- Nieboer, E., Richardson, D.H.S., 1980. The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical* 1, 3-26.
- Norrdahl, K., Korpimäki, E., 2002. Changes in individual quality during a 3-year population cycle of voles. *Oecologia* 130, 239-249.
- Norrdahl, K., Heinilä, H., Klemola, T., Korpimäki, E., 2004. Predator-induced changes in population structure and individual quality of *Microtus* voles: a large-scale field experiment. *Oikos* 105, 312-324.
- Notten, M.J.M., Oosthoek, A.J.P., Rozema, J., Aerts, R., 2005. Heavy metal concentrations in a soil-plant-snail food chain along a terrestrial soil pollution gradient. *Environmental Pollution* 138, 178-190.
- Notten, M.J.M., 2005. Origin, transfer and effects of heavy metals in a soil-plant-snail food chain in polluted ecosystems of Biesbosch National Park. Amsterdam University, Amsterdam, The Netherlands, p. 162.
- Nunes, A., Auffrey, J.-C., Mathias, M., 2001. Developmental instability in a riparian population of the algerian mouse (*Mus spretus*) associated with a heavy-metal-polluted area in central Portugal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 41, 515-521.
- Ouin, A., Paillat, G., Butet, A., Burel, F., 2000. Spatial dynamics of wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) in an agricultural landscape under intensive use in the Mont Saint Michel Bay (France). *Agriculture, Ecosystems & Environment* 78, 159-165.
- Pacyna, E.G., Pacyna, J.M., Fudala, J., Strzelecka-Jastrzab, E., Hlawiczka, S., Panasiuk, D., Nitter, S., Pregger, T., Pfeiffer, H., Friedrich, R., 2007. Current and future emissions of selected heavy metals to the atmosphere from anthropogenic sources in Europe. *Atmospheric Environment* 41, 8557-8566.
- Pankakoski, E., Koivisto, I., Hyvärinen, H., 1992. Reduced developmental stability as an indicator of heavy metal pollution in the common shrew *Sorex araneus*. *Acta Zoologica Fennica* 191, 137-144.
- Paquin, P.R., Gorsuch, J.W., Apte, S., Batley, G.E., Bowles, K.C., Campbell, P.G.C., Delos, C.G., Di Toro, D.M., Dwyer, R.L., Galvez, F., Gensemer, R.W., Goss, G.G., Hogstrand, C., Janssen, C.R., McGeer, J.C., Naddy, R.B., Playle, R.C., Santore, R.C., Schneider, U., Stubblefield, W.A., Wood, C.M., Wu, K.B., 2002. The biotic ligand model: a historical overview. *Comparative Biochemistry and Physiology C - Toxicology & Pharmacology* 133, 3-35.

- Paris, J., 2009. Etude des corrélations entre les concentrations internes en ETMs (Cd, Pb, Zn) et des indices de santé individuelle chez deux espèces de rongeurs: *Apodemus sylvaticus* et *Myodes glareolus*. Université de Franche-Comté, UMR Chrono-Environnement, Besançon, France, p. 21.
- Park, J.D., Liu, Y., Klaassen, C.D., 2001. Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals. *Toxicology* 163, 93-100.
- Parsons, P., 1990. Fluctuating asymmetry: an epigenetic measure of stress. 65, 131-145.
- Parsons, P., 1991. Fluctuating asymmetry: a biological monitor of environmental and genomic stress. *Heredity* 68, 361-364.
- Pascoe, G.A., Blanchet, R.J., Linder, G., 1996. Food chain analysis of exposures and risks to wildlife at a metals-contaminated wetland. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology (Historical Archive)* 30, 306-318.
- Pavlica, M., Klobucar, G.I.V., Vetma, N., Erben, R., Papes, D., 2000. Detection of micronuclei in haemocytes of zebra mussel and great ramshorn snail exposed to pentachlorophenol. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 465, 145-150.
- Peakall, D., Burger, J., 2003. Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 110-121.
- Peakall, R., Ebert, D., Cunningham, R., Lindenmayer, D., 2006. Mark-recapture by genetic tagging reveals restricted movements by bush rats (*Rattus fuscipes*) in a fragmented landscape. *Journal of Zoology* 268, 207-216.
- Pedersen, A.B., Greives, T.J., 2008. The interaction of parasites and resources cause crashes in a wild mouse population. *Journal of Animal Ecology* 77, 370-377.
- Peijnenburg, W.J.G.M., Jager, T., 2003. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 63-77.
- Peplow, D., Edmonds, R., 2005. The effects of mine waste contamination at multiple levels of biological organization. *Ecological Engineering* 24, 101-119.
- Pereira, R., Pereira, M.L., Ribeiro, R., Gonçalves, F., 2006. Tissues and hair residues and histopathology in wild rats (*Rattus rattus* L.) and Algerian mice (*Mus spretus* Lataste) from an abandoned mine area (Southeast Portugal). *Environmental Pollution* 139, 561-575.
- Pfenninger, M., 2002. Relationship between microspatial population genetic structure and habitat heterogeneity in *Pomatias elegans* (OF Muller 1774) (Caenogastropoda, Pomatiasidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 76, 565-575.
- Pfleger, V., 1989. Guide des coquillages et mollusques. Hatier, Parsi, France.
- Phelps, K.L., McBee, K., 2009. Ecological Characteristics of Small Mammal Communities at a Superfund Site. *American Midland Naturalist* 161, 57-68.
- Pihan, F., de Vaufleury, A., 2000. The snail as a target organism for the evaluation of industrial waste dump contamination and the efficiency of its remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46, 137-147.
- Pleydell, D.R.J., Yang, Y.R., Danson, F.M., Raoul, F., Craig, P.S., McManus, D.P., Vuitton, D.A., Wang, Q., Giraudoux, P., 2008. Landscape composition and spatial prediction of *alveolar echinococcosis* in Southern Ningxia, China. *Plos Neglected Tropical Diseases* 2, 10.
- Posthuma, L., Van Straalen, N.M., 1993. Heavy metal adaptation in terrestrial invertebrates - A review of occurrence, genetics, physiology and ecological consequences. *Comparative Biochemistry and Physiology C - Pharmacology Toxicology & Endocrinology* 106, 11-38.
- Propst, T., Lochmiller, R., Qualls, C., McBee, K., 1999. *In situ* (mesocosm) assessment of immunotoxicity risks to small mammals inhabiting petrochemical waste sites. *Chemosphere* 38, 1049-1067.
- Prudent, A.-S., 2009. Régime alimentaire de *Sorex araneus/coronatus* prélevées le long d'un gradient de pollution sur le site de Metaleurop Nord et dosages en Cd, Pb et Zn des tubes digestifs. Université de Franche-Comté, UMR Chrono-Environnement, Besançon, France, p. 20.
- Pruvot, C., Douay, F., Herve, F., Waterlot, C., 2006. Heavy metals in soil, crops and grass as a source of human exposure in the former mining areas. *Journal of Soils and Sediments* 6, 215-220.
- Purucker, S.T., Welsh, C.J.E., Stewart, R.N., Starzec, P., 2007. Use of habitat-contamination spatial correlation to determine when to perform a spatially explicit ecological risk assessment. *Ecological Modelling* 204, 180-192.
- R Development Core Team, 2006. R: A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org>, Vienna, Austria.
- Rainbow, P.S., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Cheung, M.S., Zhang, L., Zhong, H., Wang, W.X., 2007. Trophic transfer of trace metals: Subcellular compartmentalization in bivalve prey, assimilation by a gastropod predator and in vitro digestion simulations. *Marine Ecology Progress Series* 348, 128-138.
- Ramade, F., 2007. Introduction à l'écotoxicologie. Editions Tec & Doc. Lavoisier, Paris.

- Raoul, F., Defaut, R., Michelat, D., Montadert, M., Pepin, D., Quere, J.P., Tissot, B., Delattr, P., Giraudoux, P., 2001. Landscape effects on the population dynamics of small mammal communities: A preliminary analysis of prey-resource variations. *Revue D Ecologie-La Terre Et La Vie* 56, 339-352.
- Rauret, G., Lopez-Sanchez, J.F., Sahuquillo, A., Barahona, E., Lachica, M., Ure, A.M., Davidson, C.M., Gomez, A., Luck, D., Bacon, J., Yli-Halla, M., Muntau, H., Quevauviller, P., 2000. Application of a modified BCR sequential extraction (three-step) procedure for the determination of extractable trace metal contents in a sewage sludge amended soil reference material (CRM 483), complemented by a three-year stability study of acetic acid and EDTA extractable metal content. *Journal of Environmental Monitoring* 2, 228-233.
- Rawlins, B.G., Lark, R.M., Webster, R., O'Donnell, K.E., 2006. The use of soil survey data to determine the magnitude and extent of historic metal deposition related to atmospheric smelter emissions across Humberside, UK. *Environmental Pollution* 143, 416-426.
- Reeves, P.G., Chaney, R.L., 2008. Bioavailability as an issue in risk assessment and management of food cadmium: A review. *Science of the Total Environment* 398, 13-19.
- Regoli, F., Gorbi, S., Fattorini, D., Tedesco, S., Notti, A., Machella, N., Bocchetti, R., Benedetti, M., Piva, F., 2006. Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: An integrated approach. *Environmental Health Perspectives* 114, 63-69.
- Reinecke, A.J., Reinecke, S.A., Musilbono, D.E., hapman, A.C., 2000. The Transfer of Lead (Pb) from Earthworms to Shrews (*Myosorex varius*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39, 392-397.
- Richmond, L., Beeby, A., 1992. A comparative study of lead uptake by three populations of the snail *Helix aspersa*. *Polish Journal of Environmental Studies* 1, 9-13.
- Ricklefs, R.E., Miller, G.L., 2000. *Ecology*, 4th ed. W.H. Freeman & Co, New York, USA.
- Rieuwerts, J., Farago, M., 1996. Heavy metal pollution in the vicinity of a secondary lead smelter in the Czech Republic. *Applied Geochemistry* 11, 17-23.
- Roberts, R.D., Johnson, M.S., 1978. Dispersal of heavy metals from abandoned mine workings and their transference through terrestrial food chains. *Environmental Pollution* 16, 293-310.
- Rodriguez, J.A., Nanos, N., Grau, J.M., Gil, L., Lopez-Arias, M., 2008. Multiscale analysis of heavy metal contents in Spanish agricultural topsoils. *Chemosphere* 70, 1085-1096.
- Roelofs, D., Janssens, T.K.S., Timmermans, M.J.T.N., Nota, B., Marien, J., Bochdanovits, Z., Ylstra, B., Van Straalen, N.M., 2009. Adaptive differences in gene expression associated with heavy metal tolerance in the soil arthropod *Orchesella cincta*. *Molecular Ecology* 18, 3227-3239.
- Rogival, D., Scheirs, J., De Coen, W., Verhagen, R., Blust, R., 2006. Metal blood levels and hematological characteristics in wood mice (*Apodemus sylvaticus* L.) along a metal pollution gradient. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 149-157.
- Rogival, D., Van Campenhout, K., Infante, H.G., Hearn, R., Scheirs, J., Blust, R., 2007a. Induction and metal speciation of metallothionein in wood mice (*Apodemus sylvaticus*) along a metal pollution gradient. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 506-514.
- Rogival, D., Scheirs, J., Blust, R., 2007b. Transfer and accumulation of metals in a soil-diet-wood mouse food chain along a metal pollution gradient. *Environmental Pollution* 145, 516-528.
- Rohr, J.R., Kerby, J.L., Sih, A., 2006. Community ecology as a framework for predicting contaminant effects. *Trends in Ecology & Evolution* 21, 606-613.
- Rohr, J.R., Schotthoefer, A.M., Raffel, T.R., Carrick, H.J., Halstead, N., Hoverman, J.T., Johnson, C.M., Johnson, L.B., Lieske, C., Piwoni, M.D., Schoff, P.K., Beasley, V.R., 2008. Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. *Nature* 455, 1235-1239.
- Roussel, H., Waterlot, C., Pruvot, C., Bacquet, M., Martel, B., Leprêtre, A., Ciesielski, H., Philippe, S., Mazzuca, M., Douay, F., 2008. Remediation of metal polluted urban soils and evaluation of danger to human health assessed by *in vitro* oral bioaccessibility tests. Setac Europe 18th Annual Meeting, Warsaw, Poland.
- Rudge, S.A., Johnson, M.S., Leah, R.T., Jones, S.R., 1993. Biological transport of radiocaesium in a semi-natural grassland ecosystem: 2 - Small mammals. *Journal of Environmental Radioactivity* 19, 199-212.
- Sala, S., Cavalli, M., Vighi, M., *In press*. Spatially explicit method for ecotoxicological risk assessment of pesticides for birds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.
- Sample, B.E., Beauchamp, J.J., Efroymson, R.A., Suter II, G.W., 1998. Development and validation of bioaccumulation models for small mammals. Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, USA, p. 89.
- Sauvé, S., Hendershot, W., Allen, H., 2000. Solid-solution partitioning of metals in contaminated soils: dependence on pH, total metal burden, and organic matter. *Environmental Science and Technology* 34, 1125-1132.
- Sauvé, S., Manna, S., Turmel, M.C., Roy, A.G., Courchesne, F., 2003. Solid-solution partitioning of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn in the organic horizons of a forest soil. *Environmental Science and Technology* 37, 5191-5196.

- Savva, D., Garcia-Aljaro, C., Lawes, K.P., Swiergosz-Kowalewska, R., 2002. Characterisation of DNA probes for the analysis of metallothionein gene expression in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Environment International* 28, 139-146.
- Scanlon, P.F., 1987. Heavy metals in small mammals in roadside environments: implications for food chains. *Science of the Total Environment* 59, 317-323.
- Scheifler, R., Gomot-de Vaufléury, A., Toussaint, M., Badot, P.-M., 2002. Transfer and effects of cadmium in an experimental food chain involving the snail *Helix aspersa* and the predatory carabid beetle *Chrysocarabus splendens*. *Chemosphere* 48, 571-579.
- Scheifler, R., Ben Brahim, M., Gomot-de Vaufléury, A., Carnus, J.-M., Badot, P.-M., 2003a. A field method using microcosms to evaluate transfer of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn from sewage sludge amended forest soils to *Helix aspersa* snails. *Environmental Pollution* 122, 343-350.
- Scheifler, R., Schwartz, C., Echevarria, G., de Vaufléury, A., Badot, P.-M., Morel, J.-L., 2003b. "Nonavailable" soil cadmium is bioavailable to snails: evidence from isotopic dilution experiments. *Environmental Science and Technology* 37, 81-86.
- Scheifler, R., Coeurdassier, M., Morilhat, C., Bernard, N., Faivre, B., Flicoteaux, P., Giraudoux, P., Noel, M., Piotte, P., Rieffel, D., 2006a. Lead concentrations in feathers and blood of common blackbirds (*Turdus merula*) and in earthworms inhabiting unpolluted and moderately polluted urban areas. *Science of the Total Environment* 371, 197-205.
- Scheifler, R., de Vaufléury, A., Coeurdassier, M., Crini, N., Badot, P.-M., 2006b. Transfer of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn in a soil-plant-invertebrate food chain: A microcosm study. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 815-822.
- Scheifler, R., Fritsch, C., Faivre, B., Coeurdassier, M., Raoul, F., Giraudoux, P., Chastel, O., Douay, F., De Vaufléury, A., 2009. Accumulation and effects of Cd, Pb and Zn in blackbirds (*Turdus merula*) along a heavy metal pollution gradient, Setac Europe Annual Meeting, Göteborg, Sweden.
- Schipper, A.M., Loos, M., Ragas, A.M.J., Lopes, J.P.C., Nolte, B.T., Wijnhoven, S., Leuven, R.S.E.W., 2008. Modeling the influence of environmental heterogeneity on heavy metal exposure concentrations for terrestrial vertebrates in river floodplains. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 919-932.
- Schulte-Hostedde, A.I., Gibbs, H.L., Millar, J.S., 2000. Microsatellite DNA loci suitable for parentage analysis in the yellow-pine chipmunk (*Tamias amoenus*). *Molecular Ecology* 9, 2180-2181.
- Schulte-Hostedde, A.I., Millar, J.S., Hickling, G.J., 2001. Evaluating body condition in small mammals. *Canadian Journal of Zoology* 79, 1021-1029.
- Schulte-Hostedde, A.I., Millar, J.S., Gibbs, H.L., 2002. Female-biased sexual size dimorphism in the yellow-pine chipmunk (*Tamias amoenus*): Sex-specific patterns of annual reproductive success and survival. *Evolution* 56, 2519-2529.
- Schulte-Hostedde, A.I., Zinner, B., Millar, J.S., Hickling, G.J., 2005. Restitution of mass-size residuals: Validating body condition indices. *Ecology* 86, 155-163.
- Seebaugh, D.R., Goto, D., Wallace, W.G., 2005. Bioenhancement of cadmium transfer along a multi-level food chain. *Marine Environmental Research* 59, 473-491.
- Seebaugh, D.R., Estephan, A., Wallace, W.G., 2006. Relationship between dietary cadmium absorption by grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) and trophically available cadmium in amphipod (*Gammarus lawrencianus*) prey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 76, 16-23.
- Semenzin, E., Critto, A., Rutgers, M., Marcomini, A., 2008. Integration of bioavailability, ecology and ecotoxicology by three lines of evidence into ecological risk indexes for contaminated soil assessment. *Science of the Total Environment* 389, 71-86.
- Shimada, H., Takiguchi, M., Waalkes, M.P., 1998. Modification of the adverse effects of cadmium exposure by steroid compounds in rodents: A review. *Toxic Substance Mechanisms* 17, 267-284.
- Shirley, M.D.F., Sibly, R.M., 1999. Genetic basis of a between-environment trade-off involving resistance to cadmium in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 53, 826-836.
- Shore, R., 1995. Predicting cadmium, lead and fluoride levels in small mammals from soil residues and by species-species extrapolation. *Environmental Pollution* 88, 333-340.
- Shore, R.F., Douben, P.E.T., 1994a. The ecotoxicological significance of cadmium intake and residues in terrestrial small mammals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 29, 101-112.
- Shore, R.F., Douben, P.E., 1994b. Predicting ecotoxicological impacts of environmental contaminants on terrestrial small mammals. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 134, 49-89.
- Shore, R.F., Rattner, B.A. (Eds.), 2001. *Ecotoxicology of Wild Mammals*. John Wiley & Sons, London, UK.
- Sibly, R.M., Akcakaya, H.R., Topping, C.J., O'Connor, R.J., 2005. Population-level Assessment of Risks of Pesticides to Birds and Mammals in the UK. *Ecotoxicology* 14, 863-876.



- Sigel, A., 1986. Metal ions in biological systems. Vol. 20. Concepts on metal ion toxicity. Taylor & Francis Ltd, London, UK.
- Silver, T.M., Nudds, T.D., 1995. Influence of low-level cadmium and reduced calcium intake on tissue Cd concentrations and behavior of american black ducks. *Environmental Pollution* 90, 153-161.
- Skubala, P., Kafel, A., 2004. Oribatid mite communities and metal bioaccumulation in oribatid species (Acari, Oribatida) along the heavy metal gradient in forest ecosystems. *Environmental Pollution* 132, 51-60.
- Smith, P.N., Cobb, G.P., Godard-Codding, C., Hoff, D., McMurry, S.T., Rainwater, T.R., Reynolds, K.D., 2007. Contaminant exposure in terrestrial vertebrates. *Environmental Pollution* 150, 41-64.
- Smith, R., Pollard, S.J.T., Weeks, J.M., Nathanail, C.P., 2006. Assessing harm to terrestrial ecosystems from contaminated land. *Soil Use and Management* 21, 527-540.
- Soeiro, A.C., Gouvea, T.S., Moreira, E.G., 2007. Behavioral effects induced by subchronic exposure to Pb and their reversion are concentration and gender dependent. *Human & Experimental Toxicology* 26, 733-739.
- Sorensen, K., Abramsson Zetterberg, L., Nelson, D., Grawe, J., Tucker, J., 2000. The in vivo dose rate effect of chronic gamma radiation in mice: translocation and micronucleus analyses. *Mutation Research* 457, 125-136.
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., 2000. The development of genetically inherited resistance to zinc in laboratory-selected generations of the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution* 109, 193-201.
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourrier, H., 2000. Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environmental Pollution* 107, 377-389.
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourrier, H., Perdrix, E., 2002a. Assessment of the contamination of cultivated soils by eighteen trace elements around smelters in the North of France. *Water Air and Soil Pollution* 135, 173-194.
- Sterckeman, T., Douay, F., Fourrier, H., Proix, N., 2002b. Référentiel pédo-géochimique du Nord-Pas de Calais. Conseil Régional du Nord-Pas de Calais,
- Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, Lille, France, p. 130.
- Stoll, P., Oggier, P., Baur, B., 2009. Population dynamics of six land snail species in experimentally fragmented grassland. *Journal of Animal Ecology* 78, 236-246.
- Storm, G.L., Yahner, R.H., Bellis, E.D., 1993. Vertebrate abundance and wildlife habitat suitability near the Palmerton zinc smelters, Pennsylvania. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 25, 428-437.
- Stradiotto, A., Cagnacci, F., Delahay, R., Tioli, S., Nieder, L., Rizzoli, A., 2009. Spatial organization of the yellow-necked mouse: effects of density and resource availability. *Journal of Mammalogy* 90, 704-714.
- Sures, B., Scheef, G., Klar, B., Kloas, W., Taraschewski, H., 2002. Interaction between cadmium exposure and infection with the intestinal parasite *Moniliformis moniliformis* (Acanthocephala) on the stress hormone levels in rats. *Environmental Pollution* 119, 333-340.
- Sures, B., 2007. Host-parasite interactions from an ecotoxicological perspective. *Parassitologia* 49, 173-176.
- Suter II, G.W., 1993. Ecological Risk Assessment. Lewis Publishers.
- Swiergosz-Kowalewska, R., 2001. Cadmium distribution and toxicity in tissues of small rodents. *Microscopy Research and Technique* 55, 208-222.
- Swiergosz-Kowalewska, R., Bednarska, A., Callaghan, A., 2007. Expression of metallothionein genes I and II in bank vole *Clethrionomys glareolus* populations chronically exposed in situ to heavy metals. *Environmental Science and Technology* 41, 1032-1037.
- Szacki, J., 1999. Spatially structured populations: how much do they match the classic metapopulation concept? *Landscape Ecology* 14, 369-379.
- Talmage, S., Walton, B., 1991. Small mammals as monitors of environmental contaminants. *Review of Environmental Contaminants and Toxicology* 119, 47-145.
- Tannenbaum, L.V., 2001. What's so bad about weight loss, blood chemistry effects, kidney toxicity, etc. in a modeled ecological receptor? *Human and Ecological Risk Assessment* 7, 1765-1767.
- Tannenbaum, L.V., 2005. A critical assessment of the ecological risk assessment process: a review of misapplied concepts. *Integrated environmental assessment and management*. 1, 66-72.
- Tattersall, F.H., Macdonald, D.W., Hart, B.J., Manley, W.J., Feber, R.E., 2001. Habitat use by wood mice (*Apodemus sylvaticus*) in a changeable arable landscape. *Journal of Zoology* 255, 487-494.
- Tersago, K., De Coen, W., Scheirs, J., Vermeulen, K., Blust, R., Van Bockstaele, D., Verhagen, R., 2004. Immunotoxicology in wood mice along a heavy metal pollution gradient. *Environmental Pollution* 132, 385-394.
- Theocharopoulos, S.P., Wagner, G., Sprengart, J., Mohr, M.-E., Desales, A., Muntau, H., Christou, M., Quevauviller, P., 2001. European soil sampling guidelines for soil pollution studies. *The Science of the Total Environment* 264, 51-62.

- Tiller, K., 1972. Soil zinc and its uptake by plants. II. Soil chemistry in relation to prediction of availability. *Australian Journal of Soil Research* 10, 165-182.
- Toal, M.E., Walker, L.A., Shore, R.E., 2002. Modeling cadmium dynamics in the guts and tissues of small mammals: Dose implications for predators. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 2493-2499.
- Topping, C.J., Sibly, R.M., Akçakaya, H.R., Smith, G.C., Crocker, D.R., 2005. Risk Assessment of UK Skylark Populations Using Life-History and Individual-Based Landscape Models. *Ecotoxicology* 14, 925-936.
- Urban, D.L., O'Neill, R.V., Shugart, H.H.J., 1987. *Landscape Ecology*. Bioscience 37, 119-127.
- USEPA, 1992. Guidelines for exposure assessment. US Environmental Protection Agency, Washington DC, USA, p. 139.
- USEPA, 1998. Guidelines for ecological risk assessment. Environmental Protection Agency/Risk Assessment Forum, Washington DC, USA.
- USEPA, 2002. Guidance on choosing a sampling design for environmental data collection. US Environmental Protection Agency, Washington DC, USA, p. 166.
- USEPA, 2005a. Ecological soil screening levels for cadmium. US Environmental Protection Agency, Washington DC, USA, p. 236.
- USEPA, 2005b. Ecological soil screening levels for lead. US Environmental Protection Agency, Washington DC, USA, p. 242.
- USEPA, 2005c. Ecological soil screening levels for zinc. US Environmental Protection Agency, Washington DC, USA, p. 242.
- USEPA, 2005d. Guidance for developing ecological soil screening levels. US Environmental Protection Agency, Washington DC, USA, p. 85.
- Van den Brink, N.W., Baveco, H., Vermeulen, F., de Coen, W., 2008. Food web accumulation in a structured environment, SETAC Europe Annual Meeting, Warsaw, Poland.
- Van den Brink, N.W., 2009. Effects of soil concentrations, -properties, habitat and ecological factors on the accumulation of heavy metals in small mammals in The Netherlands, Setac Europe Annual Meeting, Göteborg, Sweden.
- Van den Brink, N.W., 2010. Breaking Ecotoxicological Restraints in Spatial Planning (BERISP). <http://www.berisp.org/>.
- Van den Brink, P.J., 2008. Ecological risk assessment: from book-keeping to chemical stress ecology. *Environmental Science & Technology* 42, 8999-9004.
- Van Den Hout, K.D., Bakker, D.J., Berdowski, J.J.M., Van Jaarsveld, J.A., Reinds, G.J., Bril, J., Breeuwsma, A., Groenenberg, J.E., De Vries, W., Van Pagee, J.A., Villars, M., Sliggers, C.J., 1999. The impact of atmospheric deposition of non-acidifying substances on the quality of European forest soils and the North Sea. *Water Air and Soil Pollution* 109, 357-396.
- Van Gestel, C.A.M., 2008. Physico-chemical and biological parameters determine metal bioavailability in soils. *Science of the Total Environment* 406, 385-395.
- van Gestel, C.A.M., Koolhaas, J.E., Hamers, T., van Hoppe, M., van Roover, M., Korsman, C., Reinecke, S.A., 2009. Effects of metal pollution on earthworm communities in a contaminated floodplain area: Linking biomarker, community and functional responses. *Environmental Pollution* 157, 895-903.
- van Oort, F., Labanowski, J., Jongmans, T., Thiry, M., 2007. Devenir des polluants métalliques dans les sols : révélateur de l'activité humaine sur la pédogenèse ? *Etude et Gestion des Sols* 14, 287-303.
- van Oort, F., Thiry, M., Jongmans, T., Bourennane, H., Cambier, P., Lamy, I., Citeau, L., Nahmani, J., 2009. Pollutions métalliques : distributions hétérogènes du Zn, Pb, Cd, et Cu et relations avec l'usage des sols, in: Cambier, P., Schvartz, C., van Oort, F. (Eds.), *Contaminations métalliques des agrosystèmes et écosystèmes péri-industriels*. Editions Quae, Versailles, France, pp. 15-45.
- van Straalen, N.M., 1996. Critical body concentrations : their use in bioindication, in: Van Straalen, N.M., Krivolustky, D.A. (Eds.), *Bioindicator systems for soil pollution*. Kluwer Academic, Amsterdam, pp. 5-16.
- van Straalen, N.M., 2003. Ecotoxicology becomes stress ecology. *Environmental Science and Technology* 37.
- van Straalen, N.M., van Gestel, C.A.M., 2008. A stress ecology framework for comprehensive risk assessment of diffuse pollution. *Science of the Total Environment* 406, 479-483.
- Vandecasteele, B., Samyn, J., Quataert, P., Muys, B., Tack, F.M.G., 2004. Earthworm biomass as additional information for risk assessment of heavy metal biomagnification: a case study for dredged sediment-derived soils and polluted floodplain soils. *Environmental Pollution* 129, 363-375.
- Vandorpe, E., Verhagen, R., 1980. An age reference model for the wood mouse, *Apodemus sylvaticus* (Linnaeus, 1758), by use of the lens technique. *Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique* 109, 133-140.

- Vaniscotte, A., Pleydell, D.R.J., Raoul, F., Quere, J.P., Qiu, J.M., Qian, W., Li, T.Y., Bernard, N., Coeurdassier, M., Delattre, P., Takahashi, K., Weidmann, J.C., Giraudoux, P., 2009. Modelling and spatial discrimination of small mammal assemblages: An example from western Sichuan (China). *Ecological Modelling* 220, 1218-1231.
- Vanparys, C., Dauwe, T., Van Campenhout, K., Bervoets, L., De Coen, W., Blust, R., Eens, M., 2008. Metallothioneins (MTs) and delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) as biomarkers of metal pollution in great tits (*Parus major*) along a pollution gradient. *Science of the Total Environment* 401, 184-193.
- Vanstraelen, N.M., Burghouts, T.B.A., Doornhof, M.J., Groot, G.M., Janssen, M.P.M., Joosse, E.N.G., Vanmeerendonk, J.H., Theeuwen, J., Verhoef, H.A., Zoomer, H.R., 1987. Efficiency of lead and cadmium excretion in populations of *Orchesella cincta* (Collembola) from various contaminated forest soils. *Journal of Applied Ecology* 24, 953-968.
- Velickovic, M., 2004. Chromosomal aberrancy and the level of fluctuating asymmetry in black-striped mouse (*Apodemus agrarius*): effects of disturbed environment. *Hereditas* 140, 112-122.
- Veltman, K., Huijbregts, M.A.J., Hamers, T., Wijnhoven, S., Hendriks, A.J., 2007. Cadmium accumulation in herbivorous and carnivorous small mammals: Meta-analysis of field data and validation of the bioaccumulation model optimal modeling for ecotoxicological applications. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 1488-1496.
- Veltman, K., Huijbregts, M.A.J., Hendriks, A.J., 2008. Cadmium bioaccumulation factors for terrestrial species: Application of the mechanistic bioaccumulation model OMEGA to explain field data. *Science of the Total Environment* 406, 413-418.
- Verkleij, J.A.C., Golan-Goldhirsh, A., Antosiewicz, D.M., Schwitzguébel, J.-P., Schröder, P., 2009. Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts. *Environmental and Experimental Botany* 67, 10-22.
- Vermeulen, F., Van den Brink, N.W., D'Havé, H., Mubiana, V.K., Blust, R., Bervoets, L., De Coen, W., 2009a. Habitat type-based bioaccumulation and risk assessment of metal and As contamination in earthworms, beetles and woodlice. *Environmental Pollution* 157, 3098-3105.
- Vermeulen, F., D'Havé, H., Mubiana, V.K., Van den Brink, N.W., Blust, R., Bervoets, L., De Coen, W., 2009b. Relevance of hair and spines of the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) as biomonitoring tissues for arsenic and metals in relation to blood. *Science of the Total Environment* 407, 1775-1783.
- Vermeulen, F., 2009. Spatially explicit exposure assessment of persistent pollutants through the food chain of the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). University of Antwerp, Belgium, Antwerp, p. 211.
- Vijver, M.G., Van Gestel, C.A.M., Lanno, R.P., Van Straalen, N.M., Peijnenburg, W.J.G.M., 2004. Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: A review. *Environmental Science and Technology* 38, 4705-4712.
- Von Blanckenhagen, F., Eccard, J.A., Ylonen, H., 2007. Animal protein as a reproductive constraint in spring reproduction of the bank vole. *Ecoscience* 14, 323-329.
- Vonproschwitz, T., 1994. *Oxychilus cellarius* (Müller) and *Oxychilus draparnaudi* (Beck) as predators on egg clutches of *Arion lusitanicus mabille*. *Journal of Conchology* 35, 183-184.
- Vuilleumier, S., Fontanillas, P., 2007. Landscape structure affects dispersal in the greater white-toothed shrew: Inference between genetic and simulated ecological distances. *Ecological Modelling* 201, 369-376.
- Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B., 2006. Principles of ecotoxicology, Third ed. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA.
- Wallace, W.G., Lopez, G.R., 1996. Relationship between subcellular cadmium distribution in prey and cadmium trophic transfer to a predator. *Estuaries and Coasts* 19, 923-930.
- Wallace, W.G., Lopez, G.R., 1997. Bioavailability of biologically sequestered cadmium and the implications of metal detoxification. *Marine Ecology Progress Series* 147, 149-157.
- Wallace, W.G., Lopez, G.R., Levinton, J.S., 1998. Cadmium resistance in an oligochaete and its effect on cadmium trophic transfer to an omnivorous shrimp. *Marine Ecology Progress Series* 172, 225-237.
- Wallace, W.G., Lee, B.G., Luoma, S.N., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Marine Ecology Progress Series* 249, 183-197.
- Wallace, W.G., Luoma, S.N., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). *Marine Ecology Progress Series* 257, 125-137.
- Webster, R., Oliver, M.A. (Eds.), 2001. Geostatistics for environmental scientists. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Wijnhoven, S., Van Der Velde, G., Leuven, R., Smits, A.J.M., 2005. Flooding ecology of voles, mice and shrews: the importance of geomorphological and vegetational heterogeneity in river floodplains. *Acta Theriologica* 50, 453-472.
- Wijnhoven, S., van der Velde, G., Leuven, R., Smits, A., 2006. Modelling recolonisation of heterogeneous river floodplains by small mammals. *Hydrobiologia* 565, 135-152.

- Wijnhoven, S., Leuven, R., van der Velde, G., Jungheim, G., Koelemij, E., de Vries, F., Eijsackers, H., Smits, A., 2007. Heavy-metal concentrations in small mammals from a diffusely polluted floodplain: importance of species- and location-specific characteristics. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52, 603-613.
- Williamson, P., Cameron, R.A.D., 1976. Natural diet of landsnail *Cepaea nemoralis*. *Oikos* 27, 493-500.
- Williamson, P., Cameron, R.A.D., Carter, M.A., 1977. Population dynamics of landsnail *Cepaea nemoralis* - A six-year study. *Journal of Animal Ecology* 46, 181-194.
- Williamson, P., 1980. Variables affecting body burdens of lead, zinc and cadmium in a roadside population of the snail *Cepaea hortensis* Müller. *Oecologia* 44, 213-220.
- Włostowski, T., 1987. Heavy metals in the liver of *Clethrionomys glareolus* (Schreber, 1780) and *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771) from forests contaminated with coal-industry fumes. *Ekologia Polska* 35, 115-129.
- Włostowski, T., 1992a. Postnatal changes in subcellular distribution of copper, zinc and metallothionein in the liver of bank vole (*Clethrionomys glareolus*): A possible involvement of metallothionein and copper in cell proliferation. *Comparative Biochemistry and Physiology C - Pharmacology Toxicology & Endocrinology* 103, 285-290.
- Włostowski, T., 1992b. Seasonal changes in subcellular distribution of zinc, copper, cadmium and metallothionein in the liver of bank vole (*Clethrionomys glareolus*): A possible essential role of cadmium and metallothionein in the hepatic metabolism of copper. *Comparative Biochemistry and Physiology C - Pharmacology Toxicology & Endocrinology* 101, 155-162.
- Włostowski, T., Krasowska, A., 1999. Subcellular distribution of metallothionein and cadmium in the liver and kidneys of bank voles (*Clethrionomys glareolus*) exposed to dietary cadmium. *BioMetals* 12, 173-179.
- Włostowski, T., Bonda, E., Krasowska, A., 2004. Photoperiod affects hepatic and renal cadmium accumulation, metallothionein induction, and cadmium toxicity in the wild bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58, 29-36.
- Włostowski, T., Krasowska, A., Salinska, A., Włostowska, M., 2009. Seasonal changes of body iron status determine cadmium accumulation in the wild bank voles. *Biological Trace Element Research* 131, 291-297.
- Wolda, H., Zweep, A., Schuitema, K.A., 1971. The role of food in the dynamics of populations of the landsnail *Cepaea nemoralis*. *Oecologia* 7, 361-381.
- Xu, S., Tao, S., 2004. Coregionalization analysis of heavy metals in the surface soil of Inner Mongolia. *Science of the Total Environment* 320, 73-87.
- Yang, K., Wang, X.H., Yang, G.J., Wu, X.H., Qi, Y.L., Li, H.J., Zhou, X.N., 2008. An integrated approach to identify distribution of *Oncomelania hupensis*, the intermediate host of *Schistosoma japonicum*, in a mountainous region in China. *International Journal for Parasitology* 38, 1007-1016.
- Zakharov, V.M., Demin, D.V., Baranov, A.S., Borisov, V.I., Valetsky, A.V., Sheftel, B.I., 1997. Developmental stability and population dynamics of shrews *Sorex* in central Siberia. *Acta Theriologica* 42, 41-48.



# ANNEXES



## Annexe 1. Noms latins et vernaculaires des espèces étudiées

Nom latin	Nom français	Nom anglais
Micromammifères : rongeurs		
<i>Apodemus sylvaticus</i>	Mulot sylvestre	Wood mouse
<i>Micromys minutus</i>	Rat ou souris des moissons	Harvest mouse
<i>Microtus agrestis</i>	Campagnol agreste	Field vole
<i>Microtus arvalis</i>	Campagnol des champs	Common vole
<i>Microtus (ex-Pitymys) subterraneus</i>	Campagnol souterrain	Common / European pine vole
<i>Myodes (ex-Clethrionomys) glareolus</i>	Campagnol roussâtre	Bank vole
<i>Mus musculus</i>	Souris grise ou domestique	Common house mouse
Micromammifères : insectivores		
<i>Crocidura leucodon</i>	Crocidure ou musaraigne leucode ou bicolore	Bicoloured white-toothed shrew
<i>Crocidura russula</i>	Crocidure ou musaraigne musette	Greater white-toothed shrew
<i>Sorex araneus</i>	Musaraigne carrelet	Common shrew
<i>Sorex minutus</i>	Musaraigne pygmée	Pygmy shrew
Escargots		
<i>Cantareus aspersus (ex-Helix aspersa)</i>	Escargot petit-gris	Common (brown) garden snail
<i>Capaea hortensis</i>	Escargot des jardins	White-lipped snail
<i>Cepaea nemoralis</i>	Escargot des bois	Brown-lipped / grove snail
<i>Oxychilus draparnaudi</i>	Oxychilus	Draparnaudi's glass snail



## Annexe 2. Calendrier général du déroulement de la thèse

Années	Année 1 (2006-2007)				Année 2 (2007-2008)				Année 3 (2008-2009)				2009-2010	
	Aut	Hiv	Prin	Eté	Aut	Hiv	Prin	Eté	Aut	Hiv	Prin	Eté	Aut	Hiv
<b>Echantillonnages et expérimentations</b>														
Bibliographie, préparation des échantillonnages	■	■				■								
Echantillonnages <i>in situ</i> des bioindicateurs	■		■				■							
Elevage des escargots en laboratoire				■	■	■								
Bioindication active : escargots en microcosmes <i>in situ</i>							■							
<b>Analyses (échantillons et données)</b>														
Dissections, identification et préparation des échantillons		■		■		■		■	■	■	■			
Dosages des ETMs		■		■		■		■	■	■	■	■		
Analyse des données, biostatistiques et géostatistiques				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
<b>Rédaction de synthèses, rapports et valorisation</b>														
Comité de pilotage					■									
Rédactions des rapports bisannuels		■		■		■		■		■		■		
Valorisation : articles, congrès				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Rédaction du rapport de thèse													■	■

*Annexe 3. Récapitulatif de l'implication de la thèse dans le programme STARTT : participation des personnels des différents laboratoires ou extérieurs dans les différentes expérimentations in situ du programme STARTT.*

	LCE	LSE	MMS	Techniciens (CDD)	Etudiants (Master)	BGS	CEBC	C. Fritsch
Définition de la stratégie d'échantillonnage	20%	20%						60%
Prélèvement et analyse des sols		100%						
Prélèvements bioindicateurs automne 2006 (micromammifères et escargots)	25%							75%
Prélèvements bioindicateurs printemps 2007 et 2008 (micromammifères, escargots et merle noir)	15%			20%	5%	10%		50%
Prélèvements invertébrés du sol printemps 2007 et 2008	15%			20%	5%			60%
Elevage des escargots en laboratoire	50%							50%
Microcosmes printemps 2008	40%				10%			50%
Identification, dissection et préparation des micromammifères	30%			10%	10%			50%
Identification, dissection et préparation des escargots	15%			20%	60%			5%
Dosage des ETMs dans les organismes	65%				10%			25%
Analyse des métallothionéines			95%					5%
Dosage hormones (sang merle noir)							100%	
Formule sanguine et parasitisme, statut anti-oxydant (merle noir)						100%		



## **Extended abstract**

Transfer and effects of 3 metal trace elements (MTEs: Cd, Pb and Zn) in terrestrial food webs were studied over a 40 km<sup>2</sup>-area polluted by the former smelter Metaleurop Nord (France). The objectives were (i) to identify main factors explaining MTE concentrations in soils and studied animals, to determine scales of action of these variables and whether landscape modulate contaminations; (ii) to measure responses of considered species at various biological organization levels and to investigate relationships between responses of individuals and/or populations. Samplings of soils in woody habitats (suitable habitats for studied species), and several species of land snails and small mammals were performed during 3 consecutive years over two seasons.

The spatial distribution analysis of soil contamination shows that variables explaining total soil concentrations (distance from the source, frequency of wind) act at relatively large spatial scales, while local factors (soil characteristics, notably pH) determine CaCl<sub>2</sub>-extracted soil concentrations (considered as available). Geostatistical methods of spatial interpolation, namely ordinary and universal kriging, allowed to produce soil contamination maps covering the whole study area and to establish a spatial risk assessment for invertebrates and vertebrates of woody habitats (based on US EPA Eco-SSLs).

Relationships between MTE concentrations in animals and in soils were studied in sympatric snail species (*Cepaea* sp and *Oxychilus draparnaudi*) and small mammal species (the greater white-toothed shrew *Crocidura russula* and the bank vole *Myodes glareolus*) having contrasted diet. Internal concentrations increase with soil contamination and are always better explained by total rather than CaCl<sub>2</sub>-extracted soil MTE concentrations, except in *Cepaea* sp. Landscape influences accumulated MTE levels and their increase along soil pollution gradient. The spatial scale for which correlation between internal and soil MTE concentrations was at best differed between species and landscape types. Both physiological and ecological factors, such as diet and also habitat preference and habitat exploitation, modulate MTE bioaccumulation.

The influence of receptor characteristics (sex, age, diet...) on accumulation and sequestration of MTEs was studied in several sympatric small mammals (wood mouse *Apodemus sylvaticus*, bank vole, common shrew *Sorex araneus* and pygmy shrew *Sorex minutus*). Age more than gender, and species more than trophic level, influence MTE and metallothionein (MT) levels and their relationships. Three patterns of relationships between MTE accumulation abilities and MTs production were identified. Individual health assessments suggest that receptor sensibility to MTEs (shrew < vole < wild mice) decrease when their MT production capability increase. Measure of MTs solely does not constitute a relevant exposure biomarker, however is necessary for interpretation of deleterious effect probability of occurrence.

Temporal variability of MTE accumulation was studied in the bank vole, showing inter-annual and inter-seasonal differences. Whereas Pb (liver and kidneys) exhibit inter-seasonal variations (spring < autumn), both Cd and Zn have different patterns among organs, and inter-annual variations without straight seasonal effect.

Potential adaptation to pollution in two autochthonous land snail species of study site, common garden snail *Cantareus aspersus* (formerly *Helix aspersa*) and grove (or brown-lipped) snail *Cepaea nemoralis* was investigated: offspring of parents from 2 origins (exposed to MTEs or not) were exposed in *in situ* microcosms within a cross-transplantation study. Analysis of MTE accumulation (biota-soil accumulation factor, kinetic modelling) does not show adaptation. However, shell characteristics suggest both acclimatization and adaptive processes through Ca metabolism modification.

Present work show that analysis of organism responses to environmental pollution must be based on several parameters (bioaccumulation, biomarker, health index, population...), and that understanding the significance of a single measure necessitate to put it in perspective within its global context, moving across perception levels (biological organization level, temporal and spatial contexts). Within ecological risk assessment framework and pollution biomonitoring, our work emphasizes the need of long-term monitoring and the necessity to develop procedures over relevant spatial ranges in respect with ecological processes which participate in observed responses, and taking landscape into account.

**Keywords:** ecotoxicology, landscape ecology, ecological risk assessment, bioavailability, pollutant transfer, toxic effects, spatio-temporal variability, biological organization level, metal trace, element, cadmium, lead, zinc, snails, small mammals, sequestration, metallothionein, biomonitor, biomarker, bioaccumulation, biological receptor, host factor, season, body condition, biota-soil accumulation factor.



## Résumé étendu

Le transfert et les effets de 3 éléments traces métalliques (ETMs : Cd, Pb et Zn) dans les réseaux trophiques terrestres ont été étudiés sur une zone de 40 km<sup>2</sup> polluée par l'ancienne fonderie de Metaleurop Nord (France). Les objectifs étaient (i) d'identifier les principaux facteurs expliquant les concentrations en ETMs dans les sols et les animaux étudiés, de déterminer à quelles échelles spatiales ces facteurs interviennent et si le paysage module les contaminations; (ii) de mesurer les réponses des espèces étudiées à différents niveaux d'organisation biologique et de rechercher des liens entre réponses individuelles et/ou populationnelles. Des échantillonnages portant sur les sols d'habitats ligneux (milieux boisés favorables pour les espèces étudiées) et plusieurs espèces d'escargots et de micromammifères ont été menés durant 3 années consécutives à plusieurs saisons.

L'analyse de la distribution spatiale de la contamination des sols montre que les variables expliquant les concentrations totales en ETMs dans les sols (distance à la source, fréquence du vent) agissent à des échelles spatiales relativement larges, alors que des facteurs locaux (caractéristiques des sols, notamment le pH) déterminent les concentrations extractibles au CaCl<sub>2</sub> (considérées comme disponibles). Des méthodes géostatistiques d'interpolation spatiale, krigeage ordinaire et universel, ont permis de générer des cartes de contamination des sols sur l'ensemble de la zone d'étude et d'établir une évaluation du risque spatialisée pour les invertébrés et vertébrés des habitats ligneux (basée sur les Eco-SSLs de l'US EPA).

Les relations entre les concentrations en ETMs des animaux et des sols ont été étudiées chez 2 espèces d'escargots (*Cepaea* sp et *Oxychilus draparnaudi*) et 2 espèces de micromammifères (Crocitude musette *Crocidura russula* et Campagnol roussâtre *Myodes glareolus*) sympatriques ayant des régimes alimentaires contrastés. Les concentrations internes augmentent avec la contamination des sols et sont toujours mieux expliquées par les concentrations totales qu'extractibles, sauf pour *Cepaea* sp. Le paysage influence les niveaux d'ETMs accumulées et leur augmentation le long du gradient de pollution. L'échelle spatiale à laquelle la corrélation entre les concentrations en ETMs dans les animaux et les sols est la meilleure varie entre espèces et entre paysages. Les facteurs physiologiques et écologiques, tels que le régime alimentaire mais aussi la préférence et l'exploitation d'habitat, modulent la bioaccumulation des ETMs.

L'influence des caractéristiques du récepteur (sexe, âge, régime alimentaire...) sur l'accumulation et la séquestration des ETMs a été étudiée chez plusieurs micromammifères sympatriques (Mulot sylvestre *Apodemus sylvaticus*, Campagnol roussâtre, Musaraigne carrellet *Sorex araneus* et Musaraigne pygmée *Sorex minutus*). L'âge plus que le sexe, et l'espèce plus que le niveau trophique, influencent les niveaux d'ETMs et de métallothionéines (MTs) et leurs relations. Trois patrons de relations entre capacité d'accumulation des ETMs et production de MTs ont été identifiés. Des mesures de santé individuelle suggèrent que la sensibilité des récepteurs aux ETMs (musaraigne < campagnol < mulot) décroît quand leur capacité de production de MTs augmente. La mesure des MTs seule ne constitue pas un biomarqueur d'exposition pertinent, mais elle est nécessaire pour interpréter la probabilité d'occurrence d'effets délétères.

La variabilité temporelle de l'accumulation des ETMs a été étudiée chez le Campagnol roussâtre, mettant en évidence des différences inter-annuelles et inter-saisonnières. Tandis que le Pb (foie et reins) montre des variations inter-saisonnières (printemps < automne), le Cd et le Zn ont des patrons différents entre organes, et des variations inter-annuelles sans effet saisonnier net.

L'adaptation potentielle à la pollution métallique de 2 escargots autochtones du site d'étude, l'escargot petit-gris *Cantareus aspersus* et l'escargot des bois *Cepaea nemoralis*, a été examinée : des individus issus de 2 origines (parents exposés ou non aux ETMs) ont été exposés *in situ* en microcosmes dans une expérience de transplantation croisée. L'analyse de l'accumulation des ETMs (facteur de bioaccumulation, paramètres cinétiques) ne montrent pas d'adaptation. Cependant, les caractéristiques de la coquille suggèrent des processus d'acclimatation et d'adaptation à travers une modification du métabolisme du Ca.

Ce travail montre que l'analyse de la réponse d'un organisme à la pollution doit s'appuyer sur la mesure de plusieurs paramètres (bioaccumulation, biomarqueur, indice de santé, population...), et que l'interprétation d'une mesure nécessite sa mise en perspective dans son contexte global en changeant de niveaux de perception (niveau d'organisation biologique, contextes temporel et spatial). Dans le cadre de l'évaluation du risque environnemental et de la biosurveillance, nos travaux soulignent la nécessité des suivis à long terme, et de la mise en place de procédures sur des étendues pertinentes par rapport aux processus écologiques qui participent aux réponses observées et tenant compte du paysage.

**Mots-Clés** : écotoxicologie, écologie du paysage, évaluation du risque environnemental, biodisponibilité, transfert de contaminant, effets toxiques, variabilité spatio-temporelle, niveau d'organisation biologique, éléments traces métalliques, cadmium, plomb, zinc, escargots, micromammifères, séquestration, métallothionéines, bioindicateur, biomarqueur, bioaccumulation, récepteur biologique, saison, condition corporelle, facteur d'accumulation sol-animal.







## Résumé

Le transfert et les effets d'éléments traces métalliques (ETMs : Cd, Pb et Zn) dans les réseaux trophiques terrestres ont été étudiés sur 40 km<sup>2</sup> pollués par l'ancienne fonderie Metaleurop Nord (France). Des échantillonnages de sols, d'escargots (*Cepaea* sp et *Oxychilus draparnaudi*) et de micromammifères (*Apodemus sylvaticus*, *Myodes glareolus*, *Crocidura russula*, *Sorex araneus*, *Sorex minutus*) ont été menés. Les variables expliquant la distribution spatiale des ETMs des sols varient entre concentrations totales et extractibles (CaCl<sub>2</sub>) et agissent à différentes échelles spatiales. Des méthodes géostatistiques (krigeage) ont permis de cartographier les teneurs en ETMs des sols et d'établir une évaluation du risque environnemental (ERE) spatialisée. La contamination des animaux augmente avec les concentrations totales en ETMs des sols, est influencée par le paysage, et montre des différences inter-annuelles et inter-saisonnières. Trois patrons de relations entre bioaccumulation et concentrations internes en métallothionéines ont été identifiés chez les micromammifères. Des facteurs physiologiques et écologiques modulent la bioaccumulation et les réponses au stress induit. Chez les escargots *Cantareus aspersus* et *Cepaea nemoralis*, il n'y a pas d'adaptation à la pollution métallique mise en évidence concernant la bioaccumulation mais acclimatation et adaptation semblent exister pour les caractéristiques de la coquille. Pour l'ERE et la biosurveillance, nos travaux soulignent la nécessité des suivis à long terme et du développement d'une « écotoxicologie du paysage » dans le cadre d'approches systémiques (analyses multicritères à travers des changements de niveaux de perception).

**Mots-Clés :** écotoxicologie, écologie du paysage, évaluation du risque environnemental, biodisponibilité, transfert de polluant, effets toxiques, variabilité spatio-temporelle, niveau d'organisation biologique, éléments traces métalliques, cadmium, plomb, zinc, escargots, micromammifères, séquestration, métallothionéines, bioindicateur, biomarqueur, bioaccumulation, récepteur biologique, saison, condition corporelle, facteur d'accumulation sol-animal.

## Abstract

Transfer and effects of trace metals (TMs : Cd, Pb and Zn) in trophic webs were studied over 40km<sup>2</sup> polluted by the former smelter Metaleurop Nord (France). Sampling of soils, snails (*Cepaea* sp and *Oxychilus draparnaudi*) and small mammals (*Apodemus sylvaticus*, *Myodes glareolus*, *Crocidura russula*, *Sorex araneus* and *Sorex minutus*) were performed. Factors explaining the spatial distribution of TMs in soils varied between total and extracted (CaCl<sub>2</sub>) concentrations and acted at different spatial scales. Geostatistics (kriging) allowed mapping TM concentrations in soils and developing a spatially explicit ecological risk assessment (ERA). Animal contamination increased with total TM concentrations in soils, were influenced by landscape, and showed inter-annual and inter-seasonal variations. Three patterns of relationships between bioaccumulation and internal concentrations of metallothioneins were identified in small mammals. Both physiological and ecological factors modulate bioaccumulation and responses of organisms to metal-induced stress. In the land snails *Cantareus aspersus* and *Cepaea nemoralis*, no adaptation was evidenced for bioaccumulation while acclimatization and adaptation seems to exist concerning shell characteristics. For ERA and biomonitoring, our work highlights the need of long-term monitoring and development of "landscape ecotoxicology" within the framework of systemic approaches (multicriteria analyses through changes of perception level).

**Keywords:** ecotoxicology, landscape ecology, ecological risk assessment, bioavailability, pollutant transfer, toxic effects, spatio-temporal variability, biological organization level, metal trace, element, cadmium, lead, zinc, snails, small mammals, sequestration, metallothionein, biomonitor, biomarker, bioaccumulation, biological receptor, host factor, season, body condition, biota-soil accumulation factor.

Ce travail a été réalisé au laboratoire Chrono-Environnement (UMR 6249 Université de Franche-Comté/CNRS, usc INRA).

Cette thèse a été financée (allocation de recherche et fonctionnement) dans le cadre du programme STARTT (Spatialisation des TrAnsferts dans les Réseaux Trophiques Terrestres) par l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME), l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR) et le Conseil Régional de Franche-Comté.

L'inscription universitaire en thèse de doctorat a été réalisée au sein de l'Ecole Doctorale Homme, Environnement, Santé de l'Université de Franche-Comté.

