

gen 76-2178

50 376
1998
293

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
UFR de BIOLOGIE

Année 1998

N° d'ordre

THESE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR de L'UNIVERSITE en
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par Claire GRELLE

Impact des métaux lourds sur les peuplements de macroinvertébrés de la faune du sol - Influence du cadmium et du plomb sur différents aspects de la physiologie de deux modèles biologiques : *Lithobius forficatus* (Myriapode Chilopode) et *Eisenia fetida* (Annélide Oligochète).

Présentée le 7 décembre 1998

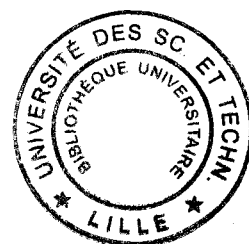
Directeur de thèse : Professeur M. DESCAMPS

JURY

Président : S. FRONTIER, Professeur Emérite

Rapporteur : R. LAFONT, Professeur
Rapporteur : J.C. WISSOCQ, Professeur

Examineur : M. DESCAMPS, Professeur
Examineur : Dr. A. LEPRETRE
Examineur : Dr. S. MARTIN



Remerciements

Je tiens à remercier :

M. le Professeur Michel Descamps qui m'a accueillie dans son laboratoire et qui a assuré le suivi de ce travail, pour la disponibilité dont il a fait preuve malgré ses nombreuses charges d'enseignement et pour la confiance qu'il m'a accordée.

M. le Professeur Emérite Serge Frontier qui m'a fait l'honneur de présider ce jury et envers qui j'ai le plus profond respect.

M. le Docteur Alain Leprêtre, pour l'intérêt qu'il a porté à l'aboutissement de cette thèse et pour les judicieux conseils qu'il m'a prodigués.

M. le Professeur René Lafont de l'Ecole Normale Supérieure qui a eu la gentillesse de bien vouloir être rapporteur malgré ces trois années écoulées depuis mon DEA.

M. le Professeur Jean-Claude Wissocq de l'Université de Picardie qui a accepté d'être rapporteur de ce travail malgré ses nombreuses autres charges.

M. le Docteur Serge Martin du Ministère de l'Environnement qui a accepté de faire partie des membres du jury et de juger la qualité de ce travail.

Je tiens également à exprimer tout particulièrement ma gratitude à Mlle Régine Leroux dont l'exceptionnel sens de l'organisation m'a toujours étonnée et bien des fois rendu service ; enfin pour son amitié tout simplement : merci.

Merci à ma famille pour ses encouragements de tous les instants.

Merci à Katheline, qui fut à l'origine de toute cette aventure.

Enfin que tous ceux qui ont, au cours de ces années contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

A Farid, pour tout et le reste...

Sommaire

Introduction	1
Présentation du programme de recherches	1
Présentation de l'étude	2
Chapitre I : Eléments préliminaires	4
I. La faune du sol et son activité biologique	4
I.1 définitions	4
I.2 La récolte des invertébrés du sol	4
I.2.1 Les Arthropodes	4
I.2.2 les vers de terre	6
I.3 Modes de classification de la faune invertébrée du sol	6
I.4 Importance dans la structuration des sols	8
I.5 Effet des métaux sur l'activité microbienne	9
II. Pollution par les métaux	10
II.1 Sources d'émission de métaux dans l'écosystème terrestre	10
II.1.1 Sources naturelles	10
II.1.2 Les apports d'origine anthropique	11
II.2 Classification des métaux « lourds »	11
II.3 Valeurs seuil de pollution par les métaux	12
III. Métaux et organismes vivants	12
III.1 Biodisponibilité	12
III.2 Métaux essentiels et métaux toxiques	14
III.3 La surveillance de l'environnement	16
III.3.1 La bioaccumulation	17
III.3.2 Les indicateurs biologiques d'effets	19
Chapitre II : Etude d'un secteur pollué par les métaux	22
I. Présentation	22
II. Matériel et méthodes	24
II.1 Caractérisation des sols	24
II.2 La faune	27
II.2.1 Technique de piégeage des invertébrés	27
II.2.2 Traitement statistique des données	27
a. Les Analyses factorielles de correspondances	28
b. Les Analyses factorielles de correspondances multiples	28
III. Résultats généraux	28
III.1 Campagne annuelle	29
a. Description des cycles de chaque station	29
b. Comparaison des stations entre elles	35

c. Comparaison avec des données climatiques.....	35
III.2 Campagne de juin 1996	38
IV. Etude des peuplements de Myriapodes et d'Isopodes	
« <i>Myriapods communities in heavy metals contaminated soils with data on Isopods</i> »	
C. Grelle, M.C. Fabre, M. Descamps (article soumis)	41
Chapitre III : Mise en oeuvre d'outils de diagnostic sur deux modèles d'invertébrés	57
Introduction.....	57
III.1 Le modèle Myriapode : <i>Lithobius forficatus</i>	59
III.1.1. Mécanisme de détoxification du cadmium et du plomb mis en oeuvre chez <i>Lithobius forficatus</i> (Myriapode, chilopode) :	
« <i>Cadmium and lead kinetics during experimental contamination and decontamination of the centipede Lithobius forficatus L.</i> ».	
M Descamps, M.C Fabre, C. Grelle, S. Gerard. Arch. Environ. Toxicol. 31, 350-353 (1996). .	61
III.1.2. Localisation intracellulaire des métaux lourds : L'autométallographie	
« <i>Implication of the midgut of the centipedes Lithobius forficatus in heavy metal detoxification process.</i> ».	
F. Vandebulcke, C. Grelle, M. Descamps. Ecotox. & Environ. Safety (sous presse).....	65
III.2. Le modèle Oligochète <i>Eisenia fetida</i>	89
III.2.1 « <i>Cadmium and Lead Accumulation in the earthworm Eisenia fetida (Savigny) and its impact on Cholinesterase and metabolic pathway enzyme activity</i> ».	
P. Scaps, C. Grelle & M. Descamps. Comp. Biochem. Physiol. Vol 116C, 233-238 (1997)	91
III.2.2 « <i>Heavy metal accumulation by Eisenia fetida and its effects on Glutathione-S-Transferase activity</i> ».	
C. Grelle & M. Descamps. Pedobiologia 42: 289-297. (1998)	97
III.2.3 « <i>L'autométallographie appliquée à un modèle Oligochète : Eisenia fetida typica. Avantages et limites de la technique</i> ».	
C Grelle et M. Descamps. Congrès de la Société Zoologique de France (LILLE , juin 1998), Communication orale.....	106
Discussion générale et conclusion	115
Liste des abréviations	129
Liste des tableaux et figures.....	130
Références bibliographiques.....	132

Annexes

Introduction

Introduction

Présentation du programme de recherches

Le Programme de Recherches Concertées (PRC) " Environnement et activités humaines " résulte d'une initiative prise en 1993 par le Conseil Régional Nord-Pas-de-Calais. Ce programme, inscrit au Contrat de Plan Etat/Région, est animé par la Direction de la Recherche et de la Technologie du Conseil Régional.

L'objectif du PRC est d'aboutir à la création d'un pôle de compétences en matière de recherche sur des problèmes d'environnement particulièrement aigus dans la région, en particulier les problèmes liés à la pollution des sols et à leur décontamination. Ce pôle regroupe des équipes de recherche dans des disciplines variées car il s'agit d'évaluer l'impact des pollutions (notamment des métaux) et, plus généralement, des activités industrielles, sur les milieux, les organismes, la santé humaine et les systèmes socio-économiques. Ces connaissances doivent permettre, à partir d'une étude pluridisciplinaire menée sur un secteur choisi, de prévoir l'évolution de ces différents compartiments et d'élaborer les méthodologies de diagnostic et de suivi applicables ultérieurement à d'autres secteurs. La démarche doit fournir des outils d'aide à la décision en matière de ressources (air, eau, sol) et d'aménagement du territoire - ces outils prenant des formes diverses: cartographies de divers paramètres, bases de données, méthodes d'analyses,...

L'ampleur de la démarche a nécessité, dans un premier temps, l'identification d'un secteur géographique commun qui permette aux différents partenaires scientifiques de travailler en synergie. Le terrain d'investigation choisi est situé au cœur d'un bassin minier dont la stabilisation tant économique que sociale est loin d'être atteinte. Il s'étend d'est en ouest entre Lens et Aubry et du nord au sud, entre Libercourt et Courcelles-les-Lens. Ce territoire, chevauchant les départements du Nord et celui du Pas-de Calais, inclut la limite de partage des eaux entre la Deûle et la Scarpe. Les paysages y sont variés puisque s'y juxtaposent des friches et zones industrielles, des terrils, des cités minières et des zones urbanisées, mais aussi de nombreux espaces ouverts imbriqués, tels que jardins, zones de loisir ou espaces agricoles périurbains. Rançon de la croissance industrielle passée, cette zone pâtit d'une altération significative de son environnement naturel (en particulier par une pollution de certains sols en métaux tels que le plomb, le cadmium ou le zinc).

Présentation de l'étude

L'objectif général des équipes avec lesquelles nous avons plus particulièrement travaillé consiste à décrire les mécanismes qui régissent la dynamique des éléments potentiellement toxiques (principalement le cadmium, le plomb et le zinc) et leurs interactions avec les organismes vivants (faune, flore spontanée et cultivée, microflore ainsi que la santé humaine). Au sein de cette vaste problématique écotoxicologique, nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur la faune des macro-invertébrés du sol. Différents objectifs ont sous-tendu notre travail :

1. Il s'agissait tout d'abord de réaliser un premier bilan de l'état de la faune invertébrée du sol au sein du vaste secteur pollué et étudié par les différentes équipes du PRC. Ce bilan devrait aider par la suite à la mise en oeuvre d'un outil de type indicateur écologique en apportant des informations encore peu développées dans la littérature notamment sur : le choix du niveau taxinomique le plus pertinent, la période d'échantillonnage favorable, l'intensité de l'effort et du type d'échantillonnage. L'étude du secteur pollué a, dans un premier temps, consisté à caractériser l'état de pollution des sols et la nature de la faune invertébrée présente dans diverses stations-types choisies selon des critères de pollution, mais aussi des critères écologiques (*e.g.* couverture végétale), d'usage des sols (culture, friche...) et d'exposition aux vents (donc sensibilité aux retombées polluantes). Toutes les stations que nous avons choisi d'étudier ne sont pas forcément communes avec celles des autres équipes de chercheurs, dans la mesure où les échelles d'approche optimales sont souvent très dissemblables d'une discipline à l'autre.

Nous avons donc réalisé un suivi faunistique, sur un cycle annuel complet, des différents sites afin de déterminer si à différents niveaux de pollution, la faune invertébrée était altérée par la présence de métaux toxiques dans le sol et dans les végétaux. L'ambition n'était pas de réaliser un inventaire complet ou exhaustif ni de décrire précisément les espèces indigènes, mais plutôt de caractériser de manière globale la structure des peuplements en place et de dégager éventuellement les grands groupes sensibles dans ces conditions de pollution et sur lesquels il serait judicieux de se focaliser.

2 - Dans un deuxième temps, il s'est agi de tenter de mettre en oeuvre différents outils biologiques (tests de toxicité, recherche de biomarqueur de pollution métallique) permettant de mesurer les risques engendrés par la présence de métaux polluants dans les sols tout en essayant d'évaluer leur biodisponibilité, d'observer les processus d'assimilation,

d'accumulation et de détoxification mis en oeuvre. Nous avons travaillé sur deux espèces appartenant à des niveaux trophiques différents et ayant des stratégies de détoxification radicalement opposées : en l'occurrence, un Myriapode Chilopode et une Annélide Oligochète.

Nous avons donc cherché à cerner un problème très concret - la pollution de sols par des métaux lourds - en nous appuyant sur plusieurs niveaux d'approches très différents : les peuplements, les organismes, les tissus, la cellule, voire même les molécules.

Le premier chapitre rappelle quelques éléments importants concernant la faune des macro-invertébrés édaphiques et son rôle dans le fonctionnement et la structuration du système sol. Nous y avons inclus une courte synthèse bibliographique des principales données existant sur les effets des métaux sur les différents organismes ainsi que sur les différents tests normalisés d'écotoxicité déjà opérationnels ou en cours de développement.

Dans un second chapitre, nous présentons les résultats obtenus lors de l'échantillonnage des peuplements d'invertébrés du secteur pollué par les métaux, secteur commun aux différentes équipes. Cette étude nous a permis de cibler deux groupes taxonomiques particulièrement intéressants du point de vue de leur sensibilité aux métaux polluants et au sein desquels nous avons choisi des modèles que nous avons étudiés plus en détail : le Myriapode Chilopode *Lithobius forficatus* et une espèce offrant des facilités en matière d'expérimentation, l'Annélide *Eisenia fetida*.

Le troisième chapitre est consacré à différents aspects concernant les stratégies de détoxification de ces deux modèles biologiques et à certains effets observés sur leur physiologie. Dans ce troisième volet, nous exposons également des techniques apportant un diagnostic des effets néfastes des métaux lourds sur la biologie de ces animaux.

Chapitre I

Chapitre I : Eléments préliminaires

I. La faune du sol et son activité biologique

I.1 Définitions

L'écosystème terrestre se subdivise en deux sous-unités : une sous-unité aérienne et une sous-unité terrestre. Sur la verticale, on distinguera trois compartiments : l'hypergaïon (strate herbacée proprement dite), l'épigaïon (surface du sol) et l'endogaïon (partie souterraine). La zoocoenose du sol, composée en grande majorité d'invertébrés, se répartit en trois ensembles distincts localisés dans l'un ou l'autre des compartiments cités ci-dessus. S'il est d'ailleurs relativement facile de distinguer les animaux liés à la strate herbacée, il est plus délicat de séparer ceux de la surface du sol de ceux qui vivent dans sa couche superficielle ou en profondeur. De plus, beaucoup d'invertébrés effectuent tout ou une partie de leur développement dans l'un ou l'autre des compartiments :

Les *géophiles inactifs*, comme certains phytophages tels que les Coléoptères Curculionidés, seront présents dans la strate herbacée la majeure partie de leur vie larvaire et adulte, ne descendant au sol que pour y subir leurs diapauses (estivales ou hivernales) ou pour s'y nymphoser.

Les *géophiles actifs* regroupent toute une catégorie d'animaux effectuant leur développement larvaire dans le sol. C'est à ce niveau qu'ils exercent l'essentiel de leur activité biologique et trophique. A l'état adulte, ils pourront soit continuer leur action au niveau du sol (Coléoptères Scarabéidés, Diptères saprophages), soit exploiter les ressources de la strate herbacée (Diptères prédateurs).

Les *géobiontes* passent toute leur vie dans le sol (Acaréens, Collembolés).

I.2 La récolte des invertébrés du sol

I.2.1 Les arthropodes

Il existe de nombreuses techniques de récolte des invertébrés (*e.g.* Southwood, 1978). Parmi celles-ci, un nombre plus limité conduit à un véritable échantillonnage quantitatif ou semi-quantitatif des arthropodes du sol. On peut distinguer trois grandes catégories de techniques:

- Les techniques d'échantillonnage, parmi lesquelles on peut retenir l'échantillonnage par la méthode des quadrats suivie d'une extraction à l'aide d'appareils de type Berlese-Tullgreen ou Kempson.

- Les techniques de piégeage par attraction ou par interception. Le piège d'interception au sol ou piège Barber (= *pitfall-trap*) ne mesure pas une densité mais caractérise l'activité des organismes circulant à la surface du sol. Sans fournir de densités absolues, ces pièges permettent de dégager des abondances relatives des populations.

- Les techniques typiquement qualitatives, telles que la chasse à vue et le tri manuel, qui permettent d'inventorier les espèces.

Le piégeage se montre globalement plus efficace que les deux autres types de techniques pour la recherche de la richesse spécifique (Branquart & Gaspar 1996). Le peuplement global résultant des piégeages est plus diversifié et équilibré : il est dominé par les individus adultes des grandes espèces mobiles, espèces qui échappent souvent à l'observation *in situ*. Les mesures d'activité se rapportent essentiellement à des individus adultes qui se déplacent activement à la surface du sol. Ce type de capture permet en outre la récolte des espèces présentes à de faibles densités et souvent "oubliées" par les échantillonnages par quadrats ou par les chasses à vue. Du fait de sa bonne efficacité pour la majorité des taxons et de son fonctionnement en continu, le piégeage permet de réaliser à peu de frais un inventaire qualitatif assez complet des populations présentes dans un site déterminé, notamment en ce qui concerne les Isopodes, les Diplopodes (Branquart & Gaspar 1996), les Arachnides (Uetz & Unzicker 1976 ; Topping & Sunderland 1992) et les Carabidés (Thiele, 1977). On considère en général que l'efficacité relative du piégeage est meilleure pour les groupes prédateurs que pour les espèces saprophages moins mobiles.

Les macroarthropodes saprophages présentent deux périodes d'activité de surface bien marquées et séparées par deux phases de repos. La première phase de repos est induite par la sécheresse estivale (éventuellement accompagnée de phénomènes de diapause), la seconde est déclenchée par le froid hivernal. Le principal pic d'activité est trouvé en général au printemps. Thiele (1977 in Branquart & Gaspar 1996) a donc formulé l'hypothèse que le niveau d'activité des Isopodes et des Diplopodes enregistré par piégeage pourrait être proportionnel au rôle joué dans la décomposition de la matière organique, tout comme chez les carabes le concept de " densité d'activité " est souvent relié à l'intensité de l'activité prédatrice.

On peut également se demander s'il existe une relation entre la densité et le niveau d'activité des différents taxons. Branquart *et al.* (1995) ont montré qu'une relation de ce type pouvait être vérifiée pour les espèces bien échantillonnées par la méthode "quadrat-extraction" et par piégeage, à la condition que le piégeage soit réalisé, sinon au cours d'un cycle annuel complet, du moins durant les phases majeures d'activité des animaux. Pour ces différentes raisons, nous avons choisi d'échantillonner nos stations à l'aide de plusieurs pièges Barber et

ceci sur un cycle annuel complet.

I.2.2. Les vers de terre

Bouché (1972) a établi plusieurs catégories écologiques pour les Lumbricidés :

- Les *épigés* vivent au dessus du niveau compact du sol et sont fondamentalement adaptés à la litière forestière. Ce sont des fousseurs nuls ou médiocres, leur musculature réduite au niveau des parois intersegmentaires diminuant leur force de pénétration. Ils sont en revanche très mobiles.

- Les *anéciques* sont de bons fousseurs qui descendent parfois très profondément dans le sol. Venant se nourrir en surface, ils ont une importante action de brassage du sol.

- Les *endogés* sont des animaux vivant constamment dans le substrat minéralo-organique du sol. Leurs galeries sont essentiellement horizontales. Cette catégorie est assez peu homogène du point de vue des caractères morphologiques mais bon nombre d'entre eux sont caractéristiques de la faune édaphique des profondeurs (albinisme).

Ces précisions sur les différents modes de vie des Oligochètes sont nécessaires pour apprécier l'efficacité relative des différentes techniques de récolte :

Plusieurs techniques font appel à des stimuli déclenchant l'ascension des vers de terre dans le sol et permettant ainsi leur récolte à la surface. On peut utiliser l'électricité ou la chaleur mais plus couramment, on arrose un demi mètre carré de sol avec 10 litres de solution formolée (Bouché 1972). On procède à quatre aspersion d'eau ayant reçu une dose croissante de formol (25, 25, 50, 50 cm³). La collecte des vers s'effectue ensuite à la surface. L'efficacité de cette méthode est liée au mode de vie des animaux (Bouché 1972). La récolte est relativement bonne pour les formes épigées comme les *Lumbricus* tandis qu'une fraction seulement des animaux anéciques et endogés se dégage du sol. Cette méthode, dans une certaine mesure permet d'apprécier l'activité des animaux.

D'autres techniques plus invasives consistent à excaver une certaine quantité de sol puis à extraire les vers ou les cocons se trouvant dans les échantillons.

I.3 Modes de classification de la faune invertébrée du sol

En dehors de la classification taxonomique, la faune des invertébrés du sol peut être classée suivant différents critères fonctionnels: la taille, le régime alimentaire, ou le type de

relation établie avec les micro-organismes.

La taille :

La taille est un critère pratique pour classer les invertébrés du sol. On distingue ainsi:

- La microfaune: de taille inférieure à 0,2 mm et vivant dans l'eau interstitielle du sol; elle est constituée essentiellement de protozoaires, de nématodes, de tardigrades et de rotifères;

- La mésofaune, dont la taille est comprise entre 0,2 et 2 mm, regroupe des animaux vivant à l'air libre dans les anfractuosités du sol et de la litière. Il s'agit surtout de Collemboles, Acariens, ou petits Oligochètes tels que les Enchytreides;

- La macrofaune, constituée d'animaux dont la taille est supérieure à 2 mm. Il s'agit des termites (Isoptères), des grands Arthropodes (Insectes, Crustacés Isopodes, Aranéides, Myriapodes, etc.), des Oligochètes capables de creuser et de modifier leur environnement pour l'adapter à leurs besoins.

Les régimes alimentaires :

L'organisation de la zoocoenose se dégage schématiquement à partir des régimes alimentaires des animaux :

- Les décomposeurs consomment de la matière organique morte d'origine animale ou végétale (débris végétaux, cadavres, excréments...) contribuant ainsi au recyclage des éléments. On y distinguera les saprophages, les coprophages, les nécrophages, *etc.*

- Les phytophages sont des consommateurs primaires qui se nourrissent de végétaux vivants (suceur de sève, insectes mineurs ou broyeurs).

- Les mycétophages sont des consommateurs primaires spécialisés dans la consommation d'une ou plusieurs sortes de champignons.

- Les prédateurs et les parasitoïdes sont des consommateurs secondaires qui s'attaquent à un grand nombre de proies et de ce fait contribuent au maintien de l'équilibre biologique.

Il existe également des polyphages ou omnivores possédant un large régime alimentaire, variable parfois avec l'âge.

Les relations avec les micro-organismes du sol :

Lavelle (1997) distingue trois groupes d'invertébrés selon la nature des relations qu'ils entretiennent avec les micro-organismes du sol et le type d'excréments qu'ils produisent, rendant alors davantage compte de leur activité directe ou indirecte sur la structuration des sols.

- Les *micro-réseaux trophiques* comprennent la microfaune (prédatrice de bactéries et de champignons) et ses propres prédateurs. La microfaune joue un rôle prépondérant dans la dynamique des populations bactériennes, populations indispensables à la dégradation de la matière organique et à sa minéralisation.

- Les *transformateurs de la litière* englobent la mésofaune et de plus grands arthropodes qui ingèrent la litière, l'humidifient et la fragmentent grossièrement, la rendant ainsi disponible pour la microflore. Ces animaux ont développé un mutualisme externe basé sur une digestion qui sera achevée par les micro-organismes au sein des fèces rejetés. Les nutriments seront ensuite facilement assimilés lors d'un deuxième passage dans le tube digestif.

- Les "*ingénieurs de l'écosystème*", comprenant les macroarthropodes, vers de terre, etc., qui ont développé des relations de type mutualiste avec la microflore au sein même de leur tube digestif. Ces interactions symbiotiques peuvent être de type facultatif ou obligatoire. L'assimilation est ainsi optimisée et les déjections fécales, intimement liées aux éléments minéraux, participent à la structuration de sols. De plus, ces animaux de grande taille sont capables de construire, de creuser des galeries et de modifier en profondeur leur environnement et donc le sol.

I.4. Importance dans la structuration des sols

Le sol réalise l'interface entre le milieu vivant et le milieu minéral. Les organismes du sol ont pour fonction principale de réaliser le recyclage de la matière organique constituant les déchets et rejets des animaux et végétaux. Dans cette décomposition de la matière organique, les invertébrés assurent un rôle de préparation en vue d'une minéralisation complète assurée par les micro-organismes. Les invertébrés interviennent en fragmentant la litière, multipliant ainsi les surfaces d'attaque potentielles par les bactéries. En ingérant cette litière et en rejetant des déchets riches en nutriments, ils facilitent l'action ultérieures des souches mycéliennes et bactériennes.

Le processus de fragmentation de la litière peut être schématisé de la manière suivante (Matthey, 1984) : les feuilles tombent au sol, sont lessivées par la pluie et leur surface est

envahie par la microflore. A ce moment, les feuilles ne sont pas encore à proprement parler attaquées. L'essentiel de l'activité des microarthropodes va justement consister à les fragmenter : elles sont d'abord attaquées par des Collemboles et certains Acariens qui perforent l'épiderme. Les petites larves de Diptères tels que les Sciaridés ou les Mycétophilidés agrandissent les trous et perforent les feuilles de part en part, ce qui favorise la pénétration de la microflore à l'intérieur. Jusqu'alors, il n'y a pas encore d'augmentation notable de la surface.

Les macroinvertébrés interviennent ensuite : les grandes larves de Diptères (Tipulidés, Bibionidés, Scatopsidés), les Diplopodes, les Isopodes et les limaces découpent les feuilles. Leurs excréments sont mangés soit par eux-mêmes, soit par des Collemboles, des Acariens ou de petites larves de Diptères.

Ainsi, cette matière de plus en plus pulvérisée va passer dans le tube digestif d'animaux de plus en plus petits. Les vers de terre, fousseurs, entraînent des feuilles entières dans leur terriers lorsqu'elles sont assez molles et c'est là qu'elles seront fragmentées.

L'augmentation de surface de la litière par découpages successifs peut être considérée comme la plus importante contribution des invertébrés à sa réduction finale. Les estimations reconnaissent une multiplication de 15 à 20 fois la surface initiale, ce qui permet un développement considérable des populations bactériennes ou fongiques.

Une seconde action très importante consiste à exercer un brassage à travers les différents horizons du sol soit par entraînement en profondeur de fragments végétaux, soit par dépôt d'excréments dans le sol, soit encore par rejet en surface de terre ingérée en profondeur.

Du point de vue des milieux perturbés et excessivement chargés en métaux, on assiste à une accumulation caractéristique et importante de la litière non dégradée. Dans la région, c'est le cas à Mortagne du Nord ou encore à Auby (petit bois des Asturies). Ce phénomène est largement décrit dans la littérature (Strojan 1978). Il est en général associé à une baisse de l'activité biologique et de l'efficacité de la décomposition. Watson *et al.* (1976 in Strojan 1978) avaient déjà noté que dans les zones riches en métaux lourds la densité et la biomasse totale des arthropodes était réduite. De même, Strojan (1978) observe une diminution du nombre d'Acariens au voisinage d'une zinguerie.

I.5 Effet des métaux sur l'activité microbienne

De même que les communautés d'invertébrés sont perturbées dans les zones riches en métaux, de nombreuses études établissent l'existence de troubles au sein des communautés de micro-organismes. Selon Tyler (1981 in Babich & Stotzky, 1985), les deux conséquences

principales observées aux niveau des populations sont:

- une réduction en quantité et en diversité des espèces
- un développement de populations microbiennes résistantes aux métaux

L'impact des métaux sur l'activité de dégradation de la matière organique par les micro-organismes peut avoir plusieurs explications (Babich & Stotzky, 1985). Les métaux peuvent ainsi agir :

- directement sur les décomposeurs, par des phénomènes de toxicité;
- en diminuant la dégradabilité du substrat dont se nourrissent les décomposeurs, par la présence de métaux liés à la matière organique;
- sur les processus de dégradation mis en place par les décomposeurs avec une inhibition de l'activité enzymatique.

En ce qui concerne le cycle de l'azote, qui dépend en partie de la minéralisation de la matière organique, l'effet des métaux lourds n'est pas net selon Babich & Stotzky (1985) : les taux d'ammonification, de nitrification, et de minéralisation nette de l'azote dans les sols pourraient être stimulés ou inhibés par l'ajout de métaux. Dans une revue bibliographique, Bååth (1989) aboutit aux mêmes conclusions.

Enfin, lorsque l'activité microbienne est évaluée par la respiration du sol, Bååth (1989) estime que dans la plupart des cas, de faibles concentrations en métaux ont peu d'influence sur le dégagement en CO₂ mais que ces dégagements diminuent à des niveaux de concentrations plus élevés.

De manière générale, les micro-organismes sont donc affectés négativement par les métaux et ceci aussi bien au niveau des populations (composition, diversité, nombre) qu'au niveau de leurs activités.

II. Pollution par les métaux

II.1. Sources d'émission de métaux dans l'écosystème terrestre

II.1.1 Sources naturelles

Les métaux traces sont des constituants normaux de l'écosphère (lithosphère, atmosphère et hydrosphère). Par des phénomènes d'érosion ou de lessivage des roches de la croûte terrestre, on assiste à une remobilisation d'une certaine quantité de métaux, mais le

phénomène naturel le plus actif dans ce domaine reste cependant le volcanisme, émetteur de très grandes quantités de poussières. Cet enrichissement est normal et inéluctable et la biosphère semble s'y être adaptée depuis des millénaires.

II.1.2 Les apports d'origine anthropique

Depuis l'exploitation industrielle des gisements métallifères, il est de plus en plus difficile de faire la part entre l'enrichissement naturel et l'enrichissement d'origine anthropique. Ainsi, plusieurs autres sources de pollution se sont développées : l'exploitation minière, la métallurgie lourde et toutes ses industries de transformation, la combustion d'une grande quantité d'énergie fossile parfois enrichie en métaux (le plomb des carburants). Tous ces rejets gazeux chargés de métaux sont transportés sur de plus ou moins longues distances puis redéposés par les précipitations. En agriculture, l'application répétée de pesticides à base de métaux (mercure, cuivre, étain, arsenic) voire de boues résiduelles de stations d'épuration ou de composts fabriqués à partir de déchets urbains, malheureusement parfois riches en éléments potentiellement toxiques (EPT), contribue à leur accumulation sur de vastes étendues.

II.2. Classifications des métaux " lourds "

La définition de "métaux lourds" est encore indécise et controversée. Habituellement, on définit comme " métaux lourds ", ceux dont la densité relative est supérieure à 5. Il existe cependant de nombreuses publications faisant mention de l'aluminium (lequel n'est pas " lourd ") ou même le sélénium (lequel n'est pas un métal). Loin de cette controverse de chimiste, il est plus judicieux pour les biologistes d'utiliser un autre type de classification (Nieboer & Richardson 1980) basée sur des propriétés chimiques, les propriétés des acides de Lewis. La théorie de Pearson (Pearson 1963) permet de classer les métaux en fonction de leurs affinités et donc de leur faculté de liaison soit avec l'oxygène (Classe A) soit avec les ligands porteurs d'azote ou de soufre (classe B). Entre les deux, on trouvera les métaux de classe intermédiaire (*borderline*) qui présentent des caractéristiques propres aux deux classes. Cette distinction reflète davantage la facilité des métaux à traverser les membranes cellulaires, à être stockés au sein de granules de détoxification ou à être complexés à des protéines fixatrices de métaux. Les différentes classes de métaux sont présentées au tableau 1.

Tableau 1 : Classement des métaux (d'après Hopkin 1989)

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

II.3. Valeurs seuils de pollution par les métaux

En France, il n'existe pas encore de normes ou de valeurs limites pour déclarer qu'un sol est pollué par les métaux. Il existe des valeurs limites au-dessus desquelles l'épandage des boues de station d'épuration ne peut plus se faire sur des sols agricoles (NFU 44-041, cf Tableau 2). Les valeurs limites de pollution au delà desquelles une décontamination devrait être réalisée varient considérablement d'un pays à l'autre. Cette absence de définition universelle explique en partie la difficile genèse de la réglementation française en la matière.

Tableau 2 : Exemples de la diversité des valeurs limites de pollution (mg/kg)

	Fond géochimique réf. Artois ϕ	Boues d'épandage NFU 44-041	USA*	Bade Wurtemberg *	Land de Hambourg*	Finlande*	Pays-bas*	Canada*
Cadmium	0.42	2	39	60	40	20	12	20
Plomb	38	100	nc	4000	3000	600	530	1000
Zinc	73	300	nc	nc	2000	3000	720	1500

ϕ : Teneurs de références acquises sur sols loessiques de l'Artois (Sterckeman, 1996)

* : Source Geostock, BRGM, *L'environnement 1997*.

III. Métaux et organismes vivants

III.1. Biodisponibilité

Les métaux sont présents dans l'environnement sous différentes formes chimiques qui résultent d'équilibres entre les ions métalliques et les complexes organiques ou inorganiques. Leur spéciation est un problème fondamental puisque leur biodisponibilité et donc leur toxicité, seront non seulement fonction de leur quantité mais aussi de leur forme chimique (dans l'eau, dans l'air et dans le sol, fixés ou non aux particules). Contrairement aux milieux aquatiques

marins ou dulçaquicoles, dans lesquels les polluants de la colonne d'eau sont dissous et peuvent être immédiatement assimilables et absorbés, la disponibilité biologique de polluants et notamment de métaux dans le compartiment " sol " est rendue plus complexe par l'existence de différents constituants (matière organique, limon, argiles, sable, eau interstitielle...) auxquels ils sont associés plus ou moins intimement.

Parmi les facteurs du sol reconnus comme influençant la disponibilité des métaux lourds vis à vis de la flore ou de la faune on peut citer: le pH, la texture, la teneur en matière organique, la salinité (ions Cl⁻), la capacité d'échange cationique, l'aération, l'humidité, la teneur en calcium... (Ma 1982, 1987, Ma *et al.* 1983, Beyer *et al.* 1987, Spurgeon & Hopkin 1996). Mais intervient également la quantité globale de métaux. La difficulté de maîtriser l'ensemble de ces paramètres a d'ailleurs conduit, dans une optique de tests de toxicité normalisés, à utiliser un substrat artificiel standard (Artisol-AFNOR 1984), ou un sol artificiel (OCDE 1984), voire même des tests sur papier filtre (contact test EEC 1985).

Par un phénomène de glissement, on associe, faute de mieux pouvoir appréhender cette notion de métaux biodisponibles (ou teneur utilisable ou assimilable), la notion de métaux solubles ou échangeables. Afin de prédire ou de mimer la disponibilité des métaux, de nombreux agents chimiques, supposés être capables d'extraire la même quantité de métal prélevée par les plantes, sont testés et utilisés. Parmi ces agents d'extraction plus ou moins drastiques, on citera: l'Acide Ethylène Diamine Tétracétique ou EDTA, l'acétate d'ammonium (norme NF X31-120), l'Acide Diéthylène Triamine Pentaacétique ou DTPA, l'acide acétique dilué (Abdul Rida & Bouché, 1997), le chlorure de calcium (0.01M), et même l'eau, celle-ci étant supposée recueillir les éléments solubles (Spurgeon & Hopkin, 1996). La quantité de métal extraite par ces agents plus ou moins efficaces varie selon la spéciation chimique du métal et le degré de contamination des différents types de sols. Ces mêmes agents ont été testés dans une optique de disponibilité des métaux lourds vis-à-vis de la faune. Il convient à ce stade d'émettre néanmoins quelques réserves : la notion de disponibilité biologique ou de métal assimilable du sol est alors, faute de mieux, traduite en terme de toxicité voire de bioaccumulation dans les tissus animaux. Il faut néanmoins conserver à l'esprit que la toxicité observée ou l'accumulation des xénobiotiques résultent de phénomènes physiologiques complexes comprenant vraisemblablement des phénomènes de détoxification voire même d'excrétion, nécessairement omis et amenant certainement à sous-estimer la quantité de xénobiotiques assimilés.

Par ailleurs, à la diversité de la pédofaune correspond une variabilité extrême dans la " disponibilité biologique " proposée aux différents individus; suivant leur mode de vie, les invertébrés seront plus ou moins sensibles à la quantité de métaux présente dans le sol.

Les insectes holométaboles sont de mauvais accumulateurs du fait de leur présence dans le sol uniquement à un stade particulier de leur cycle de développement. Les limaces et escargots passent une partie de leur cycle biologique (repos, abri, ponte, hibernation) au contact direct du sol, mais ingèrent surtout des métaux déjà métabolisés par les végétaux. Les protozoaires et les nématodes, qui vivent dans les fractions d'eau libre du sol, sont davantage en contact avec les métaux solubilisés (ADEME, 1996). Du fait de leur vie terricole, les Oligochètes sont en contact permanent avec les toxiques du sol, les assimilant d'une part via les téguments, et les ingérant de manière continue puisqu'ils sont géophages. Il est d'ailleurs vraisemblable qu'ils jouent un rôle non négligeable dans le transfert des polluants depuis la surface vers les zones profondes.

L'intérêt des Oligochètes en tant qu'indicateurs est renforcé par le fait qu'ils ne migrent pas sur de très longues distances et qu'ils sont parfaitement ubiquistes. C'est ce qui a présidé à leur choix comme modèle pour notre travail sur la biodisponibilité. Le choix précis d'*Eisenia fetida* (Sav.) vient du fait qu'il est actuellement recommandé par l'OCDE (1984) en tant qu'organisme test. Il faut pourtant remarquer que d'autres embranchements d'animaux sont candidats en tant qu'indicateurs biologiques et sont utilisés pour d'autres tests standardisés (cf § III.3).

Enfin, l'utilisation de l'ARTISOL (support siliceux inerte) dans de nombreuses études de toxicité sur *Eisenia fetida* se justifie lorsque le but du travail est de se focaliser uniquement sur les effets des polluants et de leur toxicité. Il s'agit alors de s'émanciper des problèmes liés à la disponibilité biologique des polluants et notamment des métaux. Il convient néanmoins de rappeler que la comparaison avec des phénomènes observés dans les conditions naturelles (zones polluées) est nécessaire pour aboutir à la description d'un ensemble explicatif cohérent. C'est donc volontairement, et ceci dans la mesure où l'objet du présent travail était focalisé sur le cas concret des sols pollués de la région que nous avons utilisé, pour tester différents paramètres sur les Oligochètes, de la terre issue de ces sols "naturels" et complexes.

III.2. Métaux essentiels et métaux toxiques

↳ Un certain nombre de critères sont retenus afin de définir si un élément est essentiel ou non. Un élément est considéré comme essentiel si :

- * La carence en cet élément entraîne un dysfonctionnement dans les mécanismes de croissance ou de reproduction;
- * Cette carence, qui peut s'accompagner d'effets pathologiques (dysfonctionnement au niveau de certaines enzymes, hormones...) est réversible par supplémentation en cet élément;

- * Les effets observés sont dose-dépendants;
- * Ces éléments forment avec des enzymes, des hormones ou d'autres substances, des complexes biologiquement actifs.

Les relations liant les performances et les concentrations en un élément essentiel ou non sont présentées à la figure 1 ci-après.

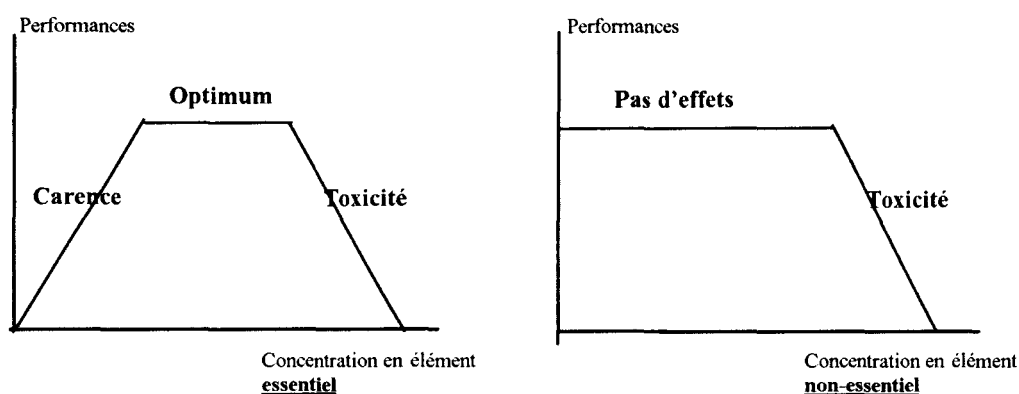


Figure 1: Relations entre les performances (croissance, fécondité, survie) et les concentrations en éléments essentiels ou non essentiels (d'après Hopkin 1989)

↳ Eléments essentiels pour les invertébrés terrestres

En plus du carbone, de l'hydrogène, de l'oxygène et de l'azote, les animaux ont en général besoin de 7 autres éléments qui entrent dans des mécanismes ou des synthèses biologiques: le calcium, le phosphore, le potassium, le magnésium, le sodium, le chlore et le soufre. Chez les vertébrés, d'autres éléments appelés "éléments-traces" semblent être, à de faibles doses, également nécessaires : le fer, l'iode, le cuivre, le manganèse, le zinc, le cobalt, le molybdène, le sélénium, le chrome, le nickel, le vanadium, le silicium, l'arsenic. Les éléments dont le rôle biochimique est reconnu sont présentés au tableau 3.

Tableau 3: Exemples d'éléments traces dont l'utilité biochimique est connue chez les vertébrés supérieurs.

Elément	Protéine, Vitamine ou Hormone	Exemple d'activité
Fer	Hémoglobine	Transport d'oxygène
Zinc	Anhydrase carbonique	Formation des carbonates de calcium
Cuivre	Cytochrome oxydase	Transport d'électrons
Molybdène	Xanthine oxydase	Dégradation des purines
Cobalt	Vitamine B ₁₂	Synthèse de nucléoprotéines
Sélénium	Glutathion-peroxydase	Réduction des agents peroxydes
Iode	Thyroxine	Hormone de croissance

Chez les invertébrés, ces problèmes ont essentiellement été abordés chez des insectes (pucerons et larves de lépidoptères) dont l'élevage a été réalisé sur des substrats artificiels. Il semble que le fer, le zinc, le cuivre, le manganèse, et le cobalt soient des éléments essentiels pour ces insectes, bien que cette liste ne soit pas exhaustive. D'autres études sont menées sur les invertébrés aquatiques tels que la daphnie (Crustacé Cladocère) qui semble avoir besoin de sélénium pour son bon développement.

↳ Toxicité

La toxicité intervient lorsque ces éléments entrent dans un processus biologique dont ils ne sont pas supposés faire partie. Les concentrations seuils au delà desquelles des effets néfastes sont observés sont en général supérieures pour les éléments essentiels que pour les éléments non essentiels. De même que la forme chimique sous laquelle ils se trouvent intervient dans les phénomènes de biodisponibilité, elle participe activement à leur toxicité. Par exemple, les sels de mercure inorganique relargués dans la baie de Minamata au Japon, une fois méthylés par des micro-organismes du sédiment, se sont révélés extrêmement toxiques. Au contraire, dans les écosystèmes terrestres, la méthylation qui peut se faire avec le sélénium et l'arsenic (In Hopkin 1989) réduit alors leur toxicité.

La plupart des métaux considérés comme polluants dans l'environnement sont ceux des groupes B ou "intermédiaires" qui forment des complexes inorganiques dans les solutions salines, sont extrêmement solubles dans les lipides et traversent alors très facilement les membranes cellulaires (Simkiss 1983 *in* Hopkin 1989).

III.3. La surveillance de l'environnement

Quand un écosystème subit une pollution, l'ensemble de ses compartiments (sol, eau et organismes vivants) est contaminé. Afin d'évaluer les risques liés à cette pollution, il s'agit alors non seulement d'en mesurer l'étendue mais aussi de comprendre les effets biologiques engendrés. L'objectif de l'écotoxicologie est de prévoir le devenir et de caractériser les effets néfastes des substances toxiques sur les populations des écosystèmes aquatiques ou terrestres. Ce souci est apparu comme une nécessité depuis les années soixante, au cours desquelles de nombreux accidents ont entraîné des altérations profondes dans certains écosystèmes. En parallèle à une réglementation sur l'utilisation de certains produits, il était nécessaire d'organiser une surveillance non seulement du degré de contamination (méthodes liées à la

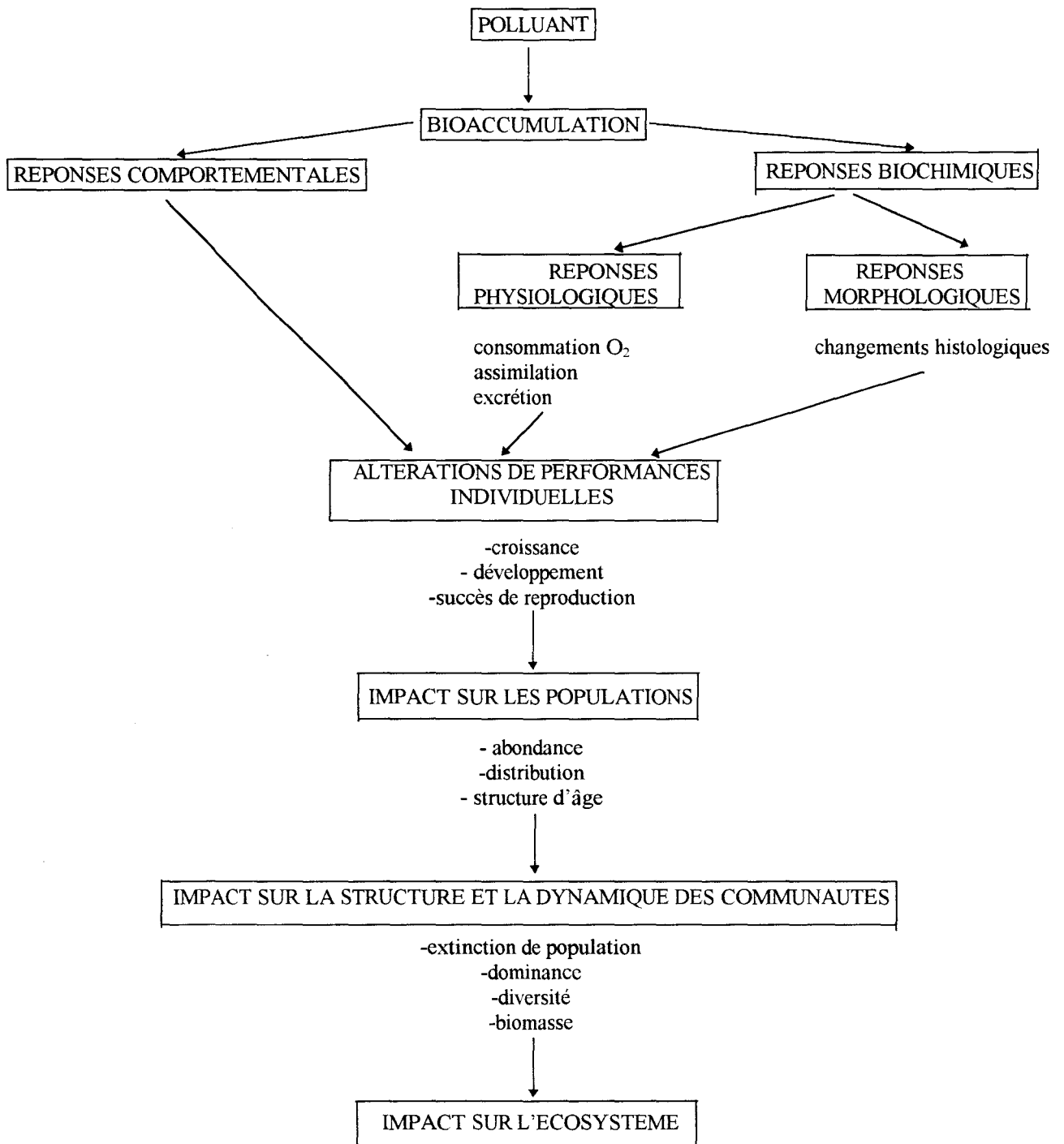


Figure 2. Schéma général des modalités d'action d'un polluant sur un écosystème - (d'après Ramade, 1992)

chimie analytique) mais également de leur toxicité. En effet, les analyses chimiques quantifient les concentrations en contaminants majeurs et recensés (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques ou HAP, Polychlorobiphényle ou PCB, métaux “ lourds ”, pesticides) dans les différents compartiments eau, sol, sédiments, mais elles ne donnent aucune indication sur leur forme chimique ne traduisant alors en aucune façon leur biodisponibilité ou leur toxicité. De plus, les limites des seuils de sensibilité peuvent être rapidement atteints, dans le cas d’analyses effectuées dans l’eau par exemple et sur des composés faiblement solubles. Le schéma général récapitulant les modalités d’action d’un polluant sur un écosystème est présenté Fig. 2.

III.3.1 La bioaccumulation

Lorsqu’ils sont réalisés sur des animaux (par exemple Mollusques filtreurs, ayant des capacités d’accumulation importantes), ces dosages donnent des indications sur la biodisponibilité des contaminants présents dans le milieu physique.

La bioaccumulation est un phénomène par lequel une substance présente dans un biotope pénètre dans un organisme même si elle n’a aucun rôle métabolique ou même si elle est toxique pour ce dernier (Ramade 1993, *in* ADEME, 1996). Le rapport de la teneur de l’organisme en une certaine substance à la teneur du milieu est généralement appelé facteur de bioconcentration. L’étude de la bioaccumulation permet donc d’indiquer le niveau de contamination d’un milieu.

Les métaux toxiques sont des polluants bien connus pour leur accumulation dans les organismes, notamment dans les organismes terrestres. Ce phénomène, bien que largement étudié, ne fait l’objet d’aucune proposition de protocole standardisé à l’heure actuelle en ce qui concerne les animaux terrestres (Phillips 1983 *in* ADEME 1996)

- Les micro-Arthropodes

Dans certains cas, les Collemboles, se sont montrés capables de concentrer des toxiques tels que les organochlorés ou certains métaux lourds. Crommentuijn *et al.* (1993 *in* ADEME 1996) a étudié la bioaccumulation du cadmium chez *Folsomia candida*. Selon Janssen *et al.* (1991), l’étude de l’ingestion et de l’excrétion du cadmium par certaines espèces serait une bonne méthode pour prédire les taux de polluants dans les invertébrés du sol et pour calculer les flux de ces polluants. Le principal obstacle à l’étude de la bioaccumulation chez les microarthropodes vient de leur faible taille et donc des problèmes analytiques posés par la faiblesse en concentration des polluants.

- Les Gastéropodes

Le pouvoir de bioaccumulation des Mollusques Gastéropodes (escargots et limaces) est également reconnu. La bioaccumulation varie considérablement pour des espèces très voisines ce qui a conduit certains auteurs (Dallinger 1993 *in* ADEME 1996) à distinguer des macro-concentrateurs (facteur de concentration >2) et des micro-concentrateurs (facteur de concentration de l'ordre de 1 à 2). Ainsi, *Helix pomatia* est macro-concentrateur pour le cadmium et pour le zinc et micro-concentrateur pour le plomb tandis que *Helix aspersa* est macro-concentrateur pour le cadmium et micro-concentrateur pour le zinc. Les Gastéropodes survivent bien sur les sites contaminés en métaux et ils font l'objet de nombreux travaux en tant qu'indicateurs de contamination (ADEME 1996). Néanmoins, il n'existe pas encore de tests standardisés pour mesurer l'accumulation des toxiques chez ces organismes.

- Les Isopodes

Les Isopodes terrestres ont également la faculté de concentrer les métaux, ceci au sein d'un organe particulier : l'hépatopancréas. Bien qu'il représente moins de 5% du poids sec de l'animal, on y retrouve plus de 75% du zinc, 95% du cadmium, 80% du plomb et 85% du cuivre mesuré dans le corps de l'animal (Hopkin & Martin 1982a, *in* Hopkin, 1989).

- Les Oligochètes

Chez les lombriciens, les teneurs en métaux *in vivo* varient selon le métal et/ou selon des critères propres aux organismes, mais également en fonction des conditions chimiques du sol (Ma, 1982 *in* ADEME 1996). Ainsi Terhivuo *et al.* (1994, *in* ADEME, 1996) travaillant sur l'impact des sols fortement pollués en plomb et sur des espèces écologiquement différentes (épigées et endogées), a pu montrer que des teneurs les plus élevées étaient mesurées chez un ver endogé *Aporrectodea caliginosa* alors que des vers à moeurs plutôt épigées (*Lumbricus rubellus* et *Lumbricus castaneus*) présentaient des facteurs de concentration beaucoup plus faibles. Ainsi, tout en proposant l'espèce *A. caliginosa* comme meilleur outil pour suivre la biodisponibilité du plomb, ces auteurs font également remarquer le phénomène important suivant. D'une part, l'exposition préalable de ces organismes aux métaux influe sur leur capacité à les accumuler. D'autre part, les métaux ne sont pas concentrés avec la même intensité : contrairement au plomb qui est moyennement accumulé, le cadmium est connu pour

être concentré de manière importante par les Oligochètes, induisant souvent des facteurs de concentration bien supérieurs à 1.

L'accumulation chez les Oligochètes est en outre un facteur agissant sur leur propre faculté de détoxification. Plusieurs voies d'intoxication sont possibles chez les Oligochètes. De par leur vie terricole, ils sont en contact perpétuel avec les toxiques du sol via le tégument, et ils les ingèrent également dans la mesure où ils sont géophages.

La détoxification peut se faire par stockage plus ou moins définitif des métaux dans des granules spécifiques (les chlorosomes) au sein de cellules entourant l'intestin (les chloragocytes) (Ireland & Richard 1981). Ces granules peuvent être relargués dans le liquide coelomique, excrétés via les néphridies ou bien stockés de façon permanente avec d'autres déchets dans les derniers segments. Ils pourront ensuite être perdus par autotomie (Andersen & Laursen, 1982). Chez certaines espèces possédant des glandes calcifères très actives (excrétant le calcium excédentaire dans le tube digestif), le plomb peut également être éliminé par leur intermédiaire. D'autre part, les métaux peuvent également être stockés dans les cellules intestinales et éliminés en même temps qu'elles par simple desquamation.

La bioaccumulation chez les Oligochètes est donc fonction non seulement des caractères physico-chimiques du sol, mais aussi de la biologie de l'animal et de l'espèce considérée.

III.3.2 Les indicateurs biologiques d'effets

Pour relier la toxicité d'un polluant à des effets écologiques, on a recours aux informations apportées par la réponse biologique des organismes aux polluants. Les études peuvent être suivies à plusieurs niveaux : du niveau moléculaire à celui de la communauté. Les avantages des uns et des autres sont différents : les indicateurs toxicologiques apportent des informations directes et précoces sur la toxicité des polluants mais n'ont que peu de signification écologique. Ces indicateurs sont assimilés à des systèmes d'alarme " précoces " d'une contamination dont les effets peuvent être réversibles (Echaubard, 1995 *in* ADEME 1996). Les indicateurs écologiques qui sont basés sur la description des peuplements ou des communautés, en termes de composition et de structure, soulignent, quant à eux, des effets déjà avancés.

* Les indicateurs toxicologiques

La majorité de ces indicateurs est basée sur la mortalité, sur les effets observés sur la croissance ou sur les performances de reproduction des animaux. Différentes études ont été menées sur les Enchytreïdes, les Lumbricidés, les Gastéropodes terrestres, les Isopodes, les Acariens et les Collemboles (ADEME 1996). Plusieurs de ces tests ont fait l'objet de normalisations ou de projets de normalisation (Tableau 4):

pour les Oligochètes : normes ISO 11268-2 (1993), ISO 11268-3 (1998)

pour les Collemboles : normes ISO 11267 (1998).

Tableau 4 : Tests normalisés ou proposition de tests standardisés d'après ADEME (1996)

	espèces	paramètres	source de contamination	durée du test	références
Enchytreïdes	<i>Cognettia shagnetorum</i>	croissance reproduction	sol: 70% sphaigne + 30% sol LUFA	10 semaines	Rundgren & Augustsson (1994)
Vers de terre	<i>Eisenia fetida</i>	survie	Artisol, sol artificiel	14 jours	Ferrière <i>et al.</i> (1981) AFNOR (1984) OCDE (1984)
		reproduction	sol artificiel	4 + 5 semaines	Van Gestel <i>et al.</i> (1989)
Gastéropodes	<i>Helix aspersa aspersa</i> <i>H. aspersa aspersa</i>	croissance	alimentation	1 mois	Gomot & Gomot (1996)
Collemboles	<i>Folsomia candida</i>	reproduction	sol artificiel	4 semaines	Riepert (1993)
Acariens	<i>Plathynothrus peltifer</i>	croissance reproduction	sol artificiel alimentation	2 à 10 semaines	Van Gestel & Doornekamp (1994)
	<i>Hypoaspis aculeifer</i>	croissance reproduction	sol artificiel	3 semaines	Lokke <i>et al.</i> (1994)
Isopodes	<i>Porcellio scaber</i>	croissance	alimentation	10 semaines	Fisher <i>et al.</i> (1994)
		reproduction		8 semaines	

* Les biomarqueurs d'exposition

On entend souvent par biomarqueurs d'exposition toutes les modifications physiologiques, biochimiques, cytologiques, immunologiques et moléculaire mesurables dans les systèmes biologiques, en relation avec l'exposition directe ou indirecte aux toxiques. Néanmoins, les principales cibles étudiées sont les enzymes de biotransformation (Cytochrome P450 et ses enzymes associées : EROD, ECOD...), les enzymes de phase II ou de conjugaison, les protéines de réponse à des stress plus ou moins spécifiques (métallothionéines, catalase, Heat Shock Protéins), mais également les cibles moléculaires (ADN, acétylcholine-estérase).

* Les indicateurs écologiques

Les données recueillies sur le terrain permettent d'avoir des informations sur la qualité des peuplements présents. Par comparaison avec des données de sites similaires témoins ou le même site avant et après la pollution on peut mesurer l'influence de cette pollution sur les communautés soumises au stress écotoxicologique.

Deux grands types de variables sont utilisés pour décrire la qualité d'un peuplement : les variables relatives à la densité (abondance d'une espèce, biomasse totale) et les variables relatives à la structure de ce peuplement. Ces dernières sont la richesse spécifique du milieu, appréciée par le nombre d'espèces recensées, et la diversité spécifique, fonction du nombre d'espèces et de l'importance numérique relative des espèces entre elles. De nombreux indices de diversité ont été développés en écologie et utilisés en écotoxicologie, mais le plus courant est celui de Shannon (1949) D'une manière générale, on observe que les milieux les plus perturbés présentent des indices de diversité plus faibles. Néanmoins, il semble que l'information apportée par ces différents indices soit maximale en cas de pollution sévère et que dans les écosystèmes modérément pollués, ceux-ci doivent être pris avec beaucoup de circonspection (Ramade, 1992). Par ailleurs, les indices de diversité sont fortement affectés par la qualité de l'échantillonnage opéré, si bien que les valeurs obtenues ne pourront être valablement comparées que dans le cas d'efforts d'échantillonnage équivalents.

Chapitre II

Chapitre II : Etude d'un secteur pollué par les métaux : Les peuplements d'invertébrés

I. Présentation

L'étude des peuplements d'invertébrés sur les différents sites choisis a nécessité de procéder d'abord à une description de ces sites pour dégager leurs spécificités en termes de composition de végétation, nature de la dynamique végétale, usage des sols, etc. Il s'agissait aussi de connaître certaines caractéristiques physico-chimiques propres à modifier la disponibilité des polluants vis à vis de la faune. La localisation précise de chacun de ces sites est présentée sur la carte 1 (Annexe 1). La carte d'isopollution, considérée pour le moment comme référence des teneurs en plomb, est présentée en annexe 2.

Dans tous les cas, les sites correspondent à des systèmes non naturels et fortement soumis à l'anthropisation. Sur ces sites, deux campagnes d'échantillonnage ont été réalisées : la première s'étalant sur plus de quatorze mois et sur sept stations ; la seconde, plus courte (juin 1996, soit 4 semaines), a été réalisée en collaboration avec les botanistes du laboratoire de *Génétique des Populations Végétales* de l'USTL afin de mettre en commun des observations de natures différentes sur un écosystème particulièrement contaminé: la pelouse métallicole située à Auby.

1. Campagne annuelle d'échantillonnage

Les stations d'échantillonnage :

Cinq stations, situées sur les communes d'Evin-Malmaison, de Leforest et de Courcelles-les-Lens, ont été échantillonnées sur une période de douze mois ou plus. Ces stations sont numérotées IA, IB, IC, II, III et sont présentées sur la carte 1 (Annexe 1).

Certaines stations correspondent à des zones plantées :

- sites à végétation semi-naturelle, dans le cas de la station IB, située sur une ancienne peupleraie.

- sites de culture intensive, représentés par la station IA, localisée en bordure de champ et donc soumise à différents traitements chimiques (engrais, pesticides...).

D'autres stations correspondent à des sites en cours de revégétalisation naturelle reposant sur des substrat particuliers :

- remblais de dragage de la Deûle (station II)
- remblais de chemin de fer désaffecté (station IC)

Enfin, la station III, située dans un sous-bois entretenu, en bordure d'un fossé, présente un sol caractérisé par une forte hydromorphie.

Les dispositifs d'échantillonnage des macro-invertébrés :

Dans chacune des stations, trois pièges (dont la description sera présentée plus bas) sont placés. Ces répliqués permettent de prendre en compte l'hétérogénéité à petite échelle de la répartition des invertébrés, et sont nécessaires pour l'étude statistique ultérieure.

Les stations-témoins :

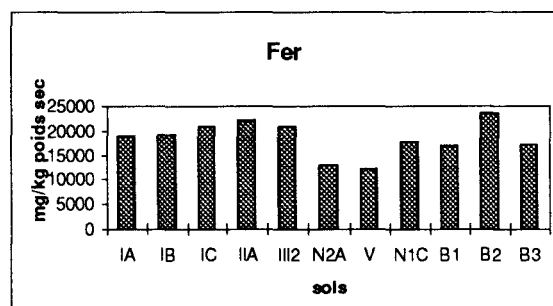
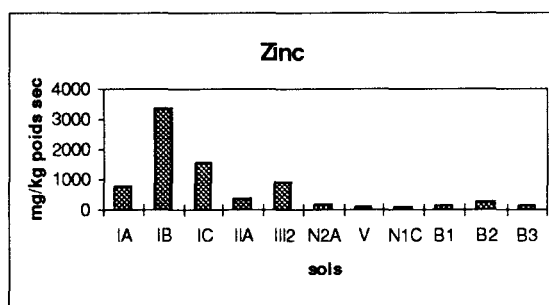
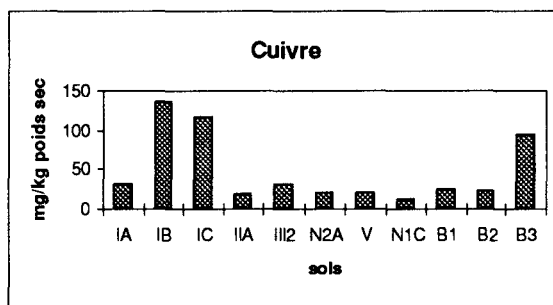
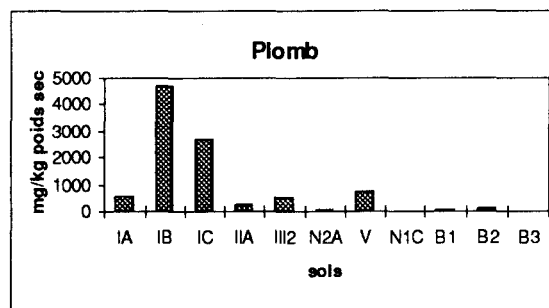
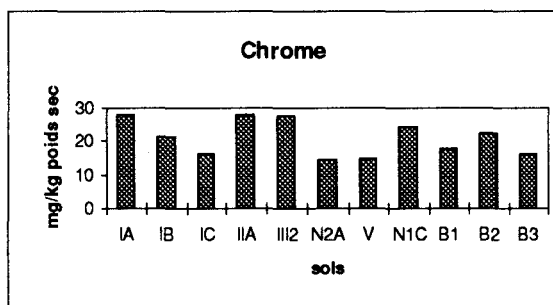
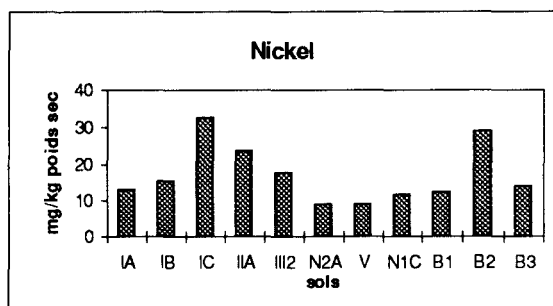
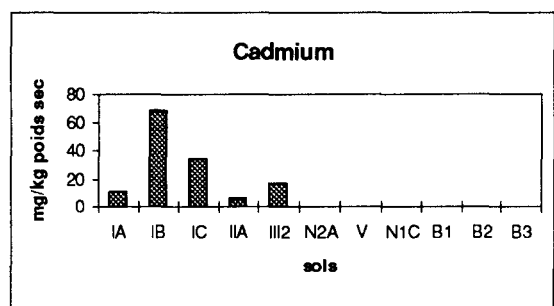
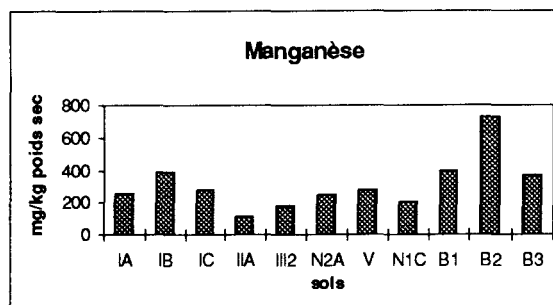
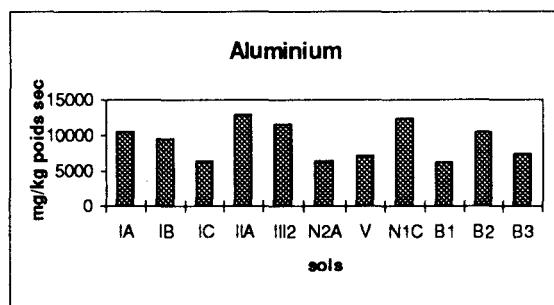
Parallèlement à l'échantillonnage de ces zones polluées, deux stations témoins situées sur le campus de l'Université de Lille I (à Villeneuve d'Ascq) ont été étudiées. Elles correspondent à une pelouse ou "prairie" non naturelle, fauchée régulièrement.

L'installation des pièges n'a été établie que progressivement : les stations IA, IB, IC et II ont été échantillonnées du mois d'octobre 1994 à décembre 1995 ; la station III n'a été installée qu'en novembre 1994, les stations témoins IV et V ont été échantillonnées de février 1995 à février 1996.

2. Campagne courte de juin 1996

En juin 1996, nous avons collaboré avec les botanistes travaillant sur la pelouse métallophile située à Auby, en vue de mieux comprendre la dynamique évolutive de cette zone extrêmement perturbée. Il s'agit en effet d'un écosystème particulièrement chargé en métaux et caractérisé par une végétation composée en majorité de plantes métallophytes ou pseudo-métallophytes (*Armeria halleri*, *Cardaminopsis halleri*, *Arrhenatherum elatius*). La dynamique de formation du sol dans ces zones est très fortement altérée, puisqu'on assiste à une accumulation de la litière peu ou faiblement décomposée (jusqu'à 30 cm d'épaisseur). Nous avons donc échantillonné deux stations dans cette zone (trois répliqués par station) en procédant à quatre relevés hebdomadaires successifs. Afin de disposer de données de référence au cours de cette période (le climat différant forcément de celui ayant régné pendant la campagne longue), nous avons également échantillonné, suivant le même protocole, deux autres stations situées à Nomain dans une zone non polluée. Les pièges y ont été disposés en bordure d'une peupleraie d'une part et à proximité d'un champ de maïs, d'autre part.

Fig. 3. Résultats des dosages des différents métaux (ICP AES)



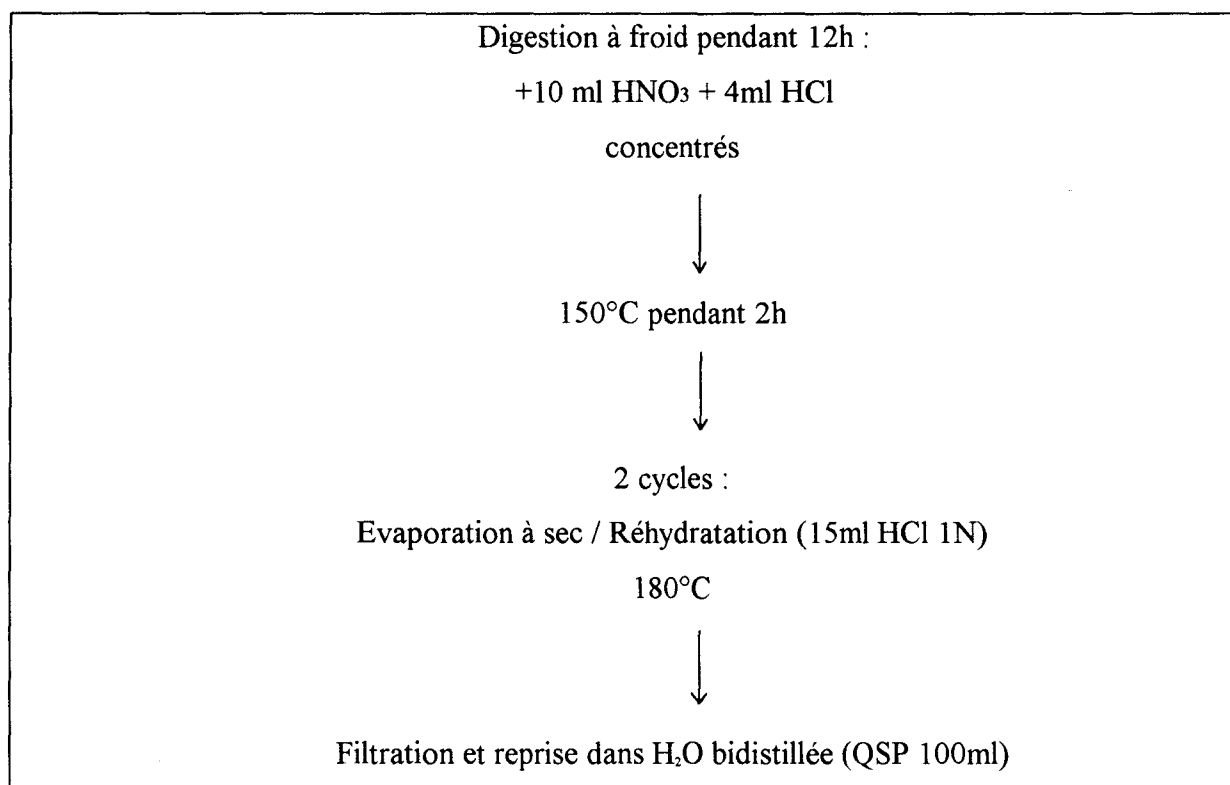
II. Matériel et méthodes

II.1 Caractérisation des sols

Trois carottes de sol (de 10 cm de profondeur) au minimum ont été prélevées à la tarière, à proximité immédiate de chacun des sites de piégeage des macroinvertébrés. Avant analyse chimique, les échantillons ont été séchés à l'étuve (80°C) jusqu'à l'obtention d'un poids constant, broyés manuellement à l'aide d'un mortier, puis passés sur un tamis de 2 mm.

II.1.1 Teneurs en métaux totaux:

Pour chaque échantillon de sol, trois aliquotes d'un gramme chacun ont subi une digestion à l'eau régale dans de la vaisselle en Téflon selon le protocole suivant :



Le dosage du cadmium, du plomb et du zinc, a été réalisé en spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) (Varian Spectr-AA-10) en utilisant un mélange air-acétylène et une correction UV.

Les autres métaux (nickel, manganèse, fer, cuivre, chrome, aluminium) ont pu être dosés en Torche à plasma au Laboratoire de Chimie Analytique et Marine (USTL) (ICP AES Varian liberty serie II). Les résultats sont présentés Figure 3.

II.1.2 Extraction des métaux à l'acétate d'ammonium en présence d'EDTA

Les métaux échangeables ont été extraits selon la norme NF X-31-120. Cinq grammes de sol sec ont été mélangés à 50 ml de solution d'extraction (acétate d'ammonium 1M, EDTA 0.01M). Après violente agitation pendant 2 heures, les échantillons ont été filtrés puis analysés.

II.1.3 Extraction des métaux à l'eau distillée

Les métaux solubles ont été extraits en mélangeant 3g de sol sec à 50 ml d'H₂O pure sous une violente agitation (150 rpm) pendant 2 heures à température ambiante. Après décantation, puis filtration, les échantillons ont été analysés. Aucune teneur suffisante en plomb et en cadmium n'a pu être décelée en SAA. Seules les teneurs en zinc ont pu être déterminées et sont présentées Tableau 5.

II.1.4 Extraction des métaux au chlorure de calcium

L'extraction douce des métaux au chlorure de calcium (0.01M) et les dosages dans chacun des sols ont été réalisés par le Laboratoire d'Analyse des Sols de l'INRA à Arras.

II.1.5 Dosage du carbone organique par oxydation sulfochromique

Principe :

La détermination de la teneur en carbone organique a été réalisée avec une technique adaptée de la "méthode Anne". La matière organique est un composant non différencié du sol, contrairement à l'azote, au phosphore ou au potassium. Elle est mesurée par une relation approximative avec le carbone organique. Le carbone organique est oxydé en gaz carbonique dans la méthode au bichromate provoquant la réduction du chrome hexavalent (Cr⁶⁺) en chrome trivalent (Cr³⁺) et un changement de couleur de l'orange au vert. L'intensité de la coloration verte est proportionnelle à la concentration du chrome trivalent qui est rapportée à la teneur en matière organique du sol.

10 ml de bichromate de potassium sont ajoutés à 1g de sol sec, l'oxydation sulfochromique est initiée par l'ajout de 20 ml d'acide sulfurique (95%) et stoppée 10 min plus tard par l'ajout de 100 ml d'eau distillée. Après filtration, l'absorbance est lue à 610 nm (spectrophotomètre HACH DR/2000).

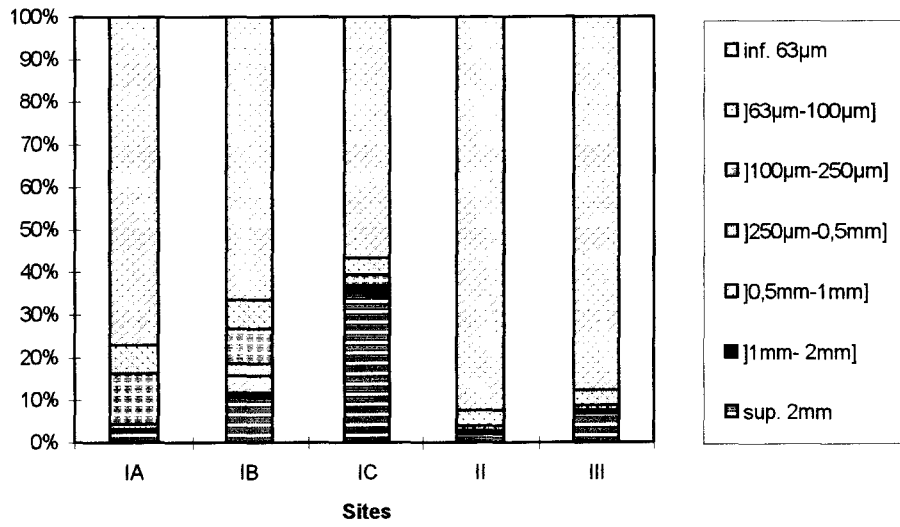


Figure 4. Granulométrie des différents sols

II.1.6 Dosage de l'azote total Kjeldahl

Le terme "azote total kjeldahl" se rapporte à l'ensemble de l'azote ammoniacal et de l'azote organique. Cependant, seul les composés dont l'azote organique est sous forme N_3^- sont déterminés par cette méthode. L'azote sous cette forme est converti en sels d'ammonium par l'action de l'acide sulfurique et de l'eau oxygénée. L'ammoniac est ensuite analysé par la méthode de Nessler modifiée (HACH 1989).

Le dosage de l'azote total Kjeldahl est réalisé selon une méthode adaptée de Hach *et al.* (1985). 300 mg de sol sec ont subi une digestion à l'acide sulfurique concentré et à l'eau oxygénée (140°C) (Digestdahl digestion apparatus-HACH 32130-20). 4 ml de minéralisat sont ensuite amenés à pH neutre à l'aide de KOH concentré et dilués dans un volume final de 25 ml dans une solution de sel de Rochelle (HACH: 40 ml/l). 1ml de réactif de Nessler est ajouté à l'échantillon et l'absorbance est lue à 460 nm (spectrophotomètre HACH DR/2000).

II.1.7 Dosage de la teneur en carbonates de calcium

Le dosage des carbonates se fait par détermination volumétrique du dioxyde de carbone (CO_2) dégagé sous l'action d'un acide fort à température ambiante (du laboratoire) par l'échantillon de terre préparé pour essai (X 31-105). La mesure se fait grâce à un calcimètre de Bernard et les résultats sont obtenus par comparaison avec une courbe d'étalonnage ($CaCO_3$ pur) et exprimés en pourcentage de matière sèche.

II.1.8 La granulométrie en phase humide

L'étude de la granulométrie consiste à séparer les grains de sédiments ou de sols en fonction de leur diamètre afin de comparer les différentes proportions des fractions. Six classes de fractions sont retenues par les différents tamis : > 2 mm, [2; 1 mm[, [1; 0.5 mm[, [500; 250 μm], [250; 100 μm], [100; 63 μm], <63 μm . Les résultats sont présentés Figure 4.

II.2 La faune

Chaque station a été échantillonnée par piégeage à l'aide de pots-pièges enterrés dits pièges de Barber, pendant un cycle annuel complet. Le rendement de ces pièges dépend de l'activité de déplacement des invertébrés à la surface du sol. Les données permettent donc de rendre compte de cette activité (donc indirectement de la densité) dans les diverses stations et de mettre en évidence les périodes d'activité maximale de ces invertébrés.

II.2.1. Technique de piégeage des invertébrés

La technique employée est celle des pièges-trappes ou pots pièges enterrés, communément qualifiés de pièges de Barber. Il s'agit d'un piège d'interception (SOUTHWOOD, 1978) permettant la capture des invertébrés au hasard de leurs déplacements à la surface du sol. L'intérêt de ce type de récoltes est qu'elles permettent de s'affranchir des rythmes nycthémeraux des animaux, puisque les pots sont actifs en continu pendant plusieurs jours.

Un piège est constitué d'une boîte de plastique de 20 cm X 10 cm enfoncée jusqu'au ras du sol. Pour drainer une quantité d'invertébrés plus importante, quatre ailettes (planchettes de bois) de 30 cm sont placées en croix autour du piège. La boîte est remplie d'éthylène glycol qui, en formant un film autour des invertébrés qui tombent dans le piège, provoque rapidement leur noyade et permet également une bonne conservation. L'ensemble du piège est recouvert d'un grillage à mailles larges qui empêche l'action des rongeurs et des oiseaux. Le contenu de chaque piège est recueilli toutes les semaines ou tous les quinze jours suivant les conditions climatiques et l'abondance de la faune. Il est ensuite conservé dans de l'alcool à 96° jusqu'à la phase de tri, détermination et comptage sous loupe binoculaire.

II.2.2 Traitement statistique des données.

Les tableaux de données ventilent, pour chaque relevé, l'ensemble des invertébrés recueillis en fonction de leur taxons d'appartenance (en lignes) et de la station (ou le piège) dans laquelle ils ont été capturés. Il s'agit donc, au sens statistique, d'un tableau de contingence.

- Les Analyses Factorielles des Correspondances

Le type de tableau obtenu peut être soumis à l'Analyse Factorielle des Correspondances ou A.F.C. (BENZEKRI, 1982), méthode d'analyse de données fondée sur le critère du Chi-2, permettant d'établir :

1) une typologie des colonnes, c'est-à-dire de représenter graphiquement le degré de ressemblance des différentes stations (ou pièges) sur la base de leur composition quantitative en différents taxons;

2) une typologie des taxons, c'est-à-dire représenter graphiquement la ressemblance de ces taxons au vu de leur répartition dans les différentes stations (ou pièges);

3) une relation de correspondance entre certaines stations (ou pièges) et certains taxons: ainsi, on trouvera dans un même secteur du graphe (plan factoriel) des stations qui se ressemblent du point de vue de leur composition faunistique et les taxons qui caractérisent ces stations (ou pièges).

Les graphiques de l'A.F.C sont des projections sur un plan d'un nuage de points multidimensionnel. La qualité de cette représentation est donnée par le pourcentage d'inertie (= variance) porté par chaque axe de ce plan. Une présentation simple de la méthode est donnée dans ESCOFIER & PAGES (1988).

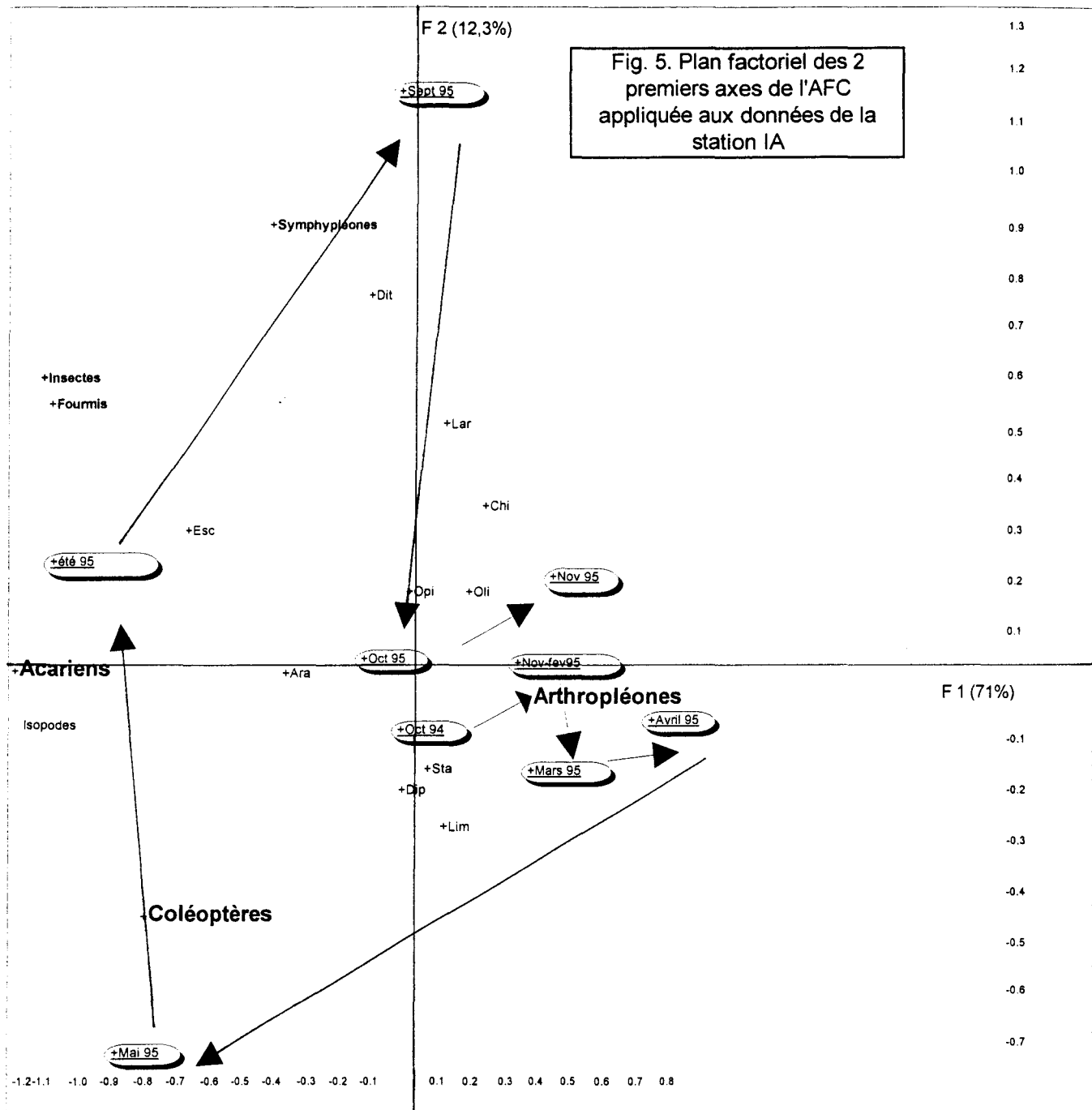
- Les Analyses des Correspondances Multiples

L'analyse factorielle des correspondances multiples (ou ACM) est une simple extension de l'analyse factorielle des correspondances. Alors que l'AFC met en correspondance deux ensembles de caractères (l'ensemble I des lignes et l'ensemble J) des colonnes, l'ACM croise un ensemble, celui des lignes avec un second ensemble, celui des modalités de réponse à plusieurs "questions". L'ensemble des données est un tableau à n lignes et j colonnes où j est le nombre total de modalités pour l'ensemble des questions. Le nombre de modalités que nous avons choisi pour chacune des variables est de trois ou quatre.

III. Résultats généraux

Les différentes caractéristiques physico-chimiques des sols et leur granulométrie sont récapitulées Tableau 5 et Figures 3 et 4.

Fig. 5. Plan factoriel des 2 premiers axes de l'AFC appliquée aux données de la station IA



III.1 Campagne annuelle :

a- Description des cycles de chaque station

Les évolutions temporelles des peuplements de chacune des sept stations sont présentées ci-dessous. Les résultats des A.F.C. présentés ne sont pas ceux obtenus lors de la première analyse des tableaux bruts, mais ceux obtenus dans une deuxième série d'analyses factorielles, après regroupements ou cumuls de certains prélèvements. En effet, dans un souci de clarté et afin de dégager les grandes tendances saisonnières, nous avons regroupé et cumulé certains mois dont les profils faunistiques se révélaient semblables.

Seules sont présentées les analyses des stations situées autour de l'usine Métaleurop et celles concernant les stations témoins échantillonnées pendant plusieurs mois (sur le campus de Lille 1: stations IV et V). Chaque analyse a porté sur le cumul des données de répliqués de pièges par station. Pour toutes les stations, le plan factoriel principal (plan des axes I et II) de l'AFC appliquée au tableau de données de la station étudiée est représenté; le numéro de figure est indiqué entre parenthèse, à la suite du nom de la station (*cf* ci-après).

-La station IA (fig. 5)

Les deux premiers axes de l'AFC appliquée aux données recueillies en station IA au long de la campagne annuelle, décrivent 83,1% de l'inertie totale du nuage de points. L'axe I isole les prélèvements réalisés de novembre 1994 à avril 1995 (caractérisés par une faune dominée majoritairement par les Arthropléones) et les oppose aux prélèvements effectués en mai et au cours de l'été 1995. Ces derniers relevés sont plutôt caractérisés par la présence d'Isopodes : majoritairement *Oniscus asellus* et dans une moindre mesure *Armadillidium vulgare* et *Porcellio scaber* et par l'abondance d'Acariens, voire de Coléoptères, de fourmis (*Myrmica scabrinodis*) ou d'autres insectes). En novembre 95, le cycle annuel semble se boucler puisqu'on retrouve la dominance des Arthropléones constatée en début de campagne. L'axe II caractérise essentiellement les prélèvements de mai 1995 (très riches en Coléoptères) et de septembre 1995 (plutôt caractérisés par les Diptères).

-La station IB (fig. 6)

Les deux premiers axes de l'AFC portent 82,5% de l'inertie totale du nuage de points. L'axe I décrit essentiellement les relevés de novembre 1994 à décembre 1994 (associés à la

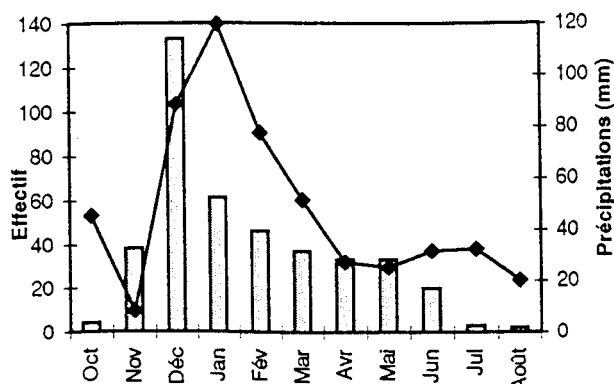
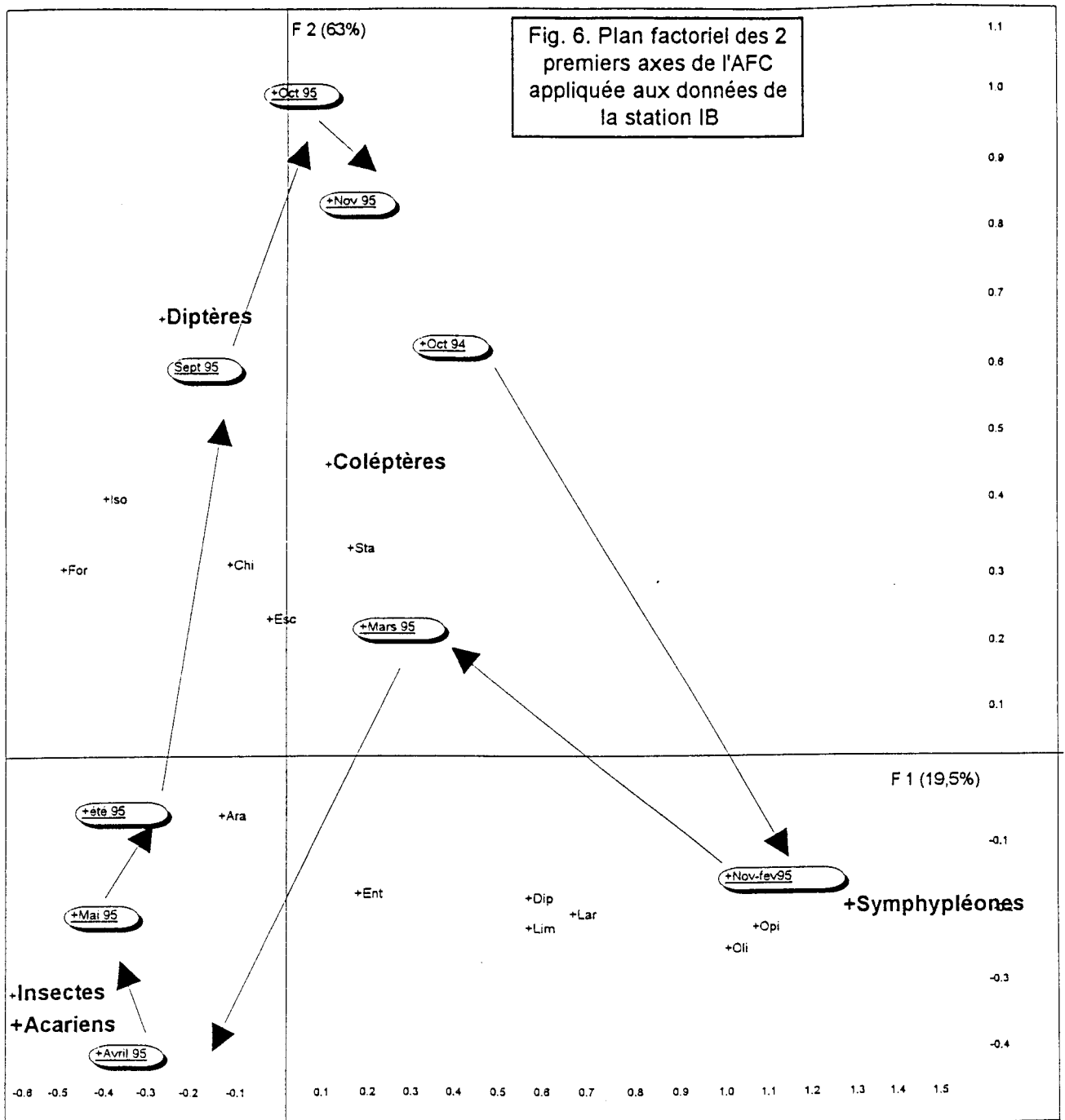


Fig. 7. Activité des Oligochètes (station IB) en relation avec l'abondance des précipitations

présence de nombreux Symphypléones) et ceux de janvier/février, davantage marqués par les Arthropléones, qu'il oppose aux prélèvements d'été (juin, juillet et août 1995) et de printemps (avril-mai 1995), plutôt caractérisés par la présence d'Acariens, d'Isopodes (*Porcellio scaber*, *Oniscus asellus* et exceptionnellement *Armadillidium vulgare*), de fourmis (*Myrmica rubra*) et d'insectes divers. Les prélèvements de septembre-octobre-novembre 1995 s'individualisent sur l'axe II qui caractérise davantage une quasi absence d'Acariens compensée par la dominance des Coléoptères et de Diptères. On remarquera que cette faible abondance en Acariens était aussi caractéristique du mois d'octobre de l'année précédente.

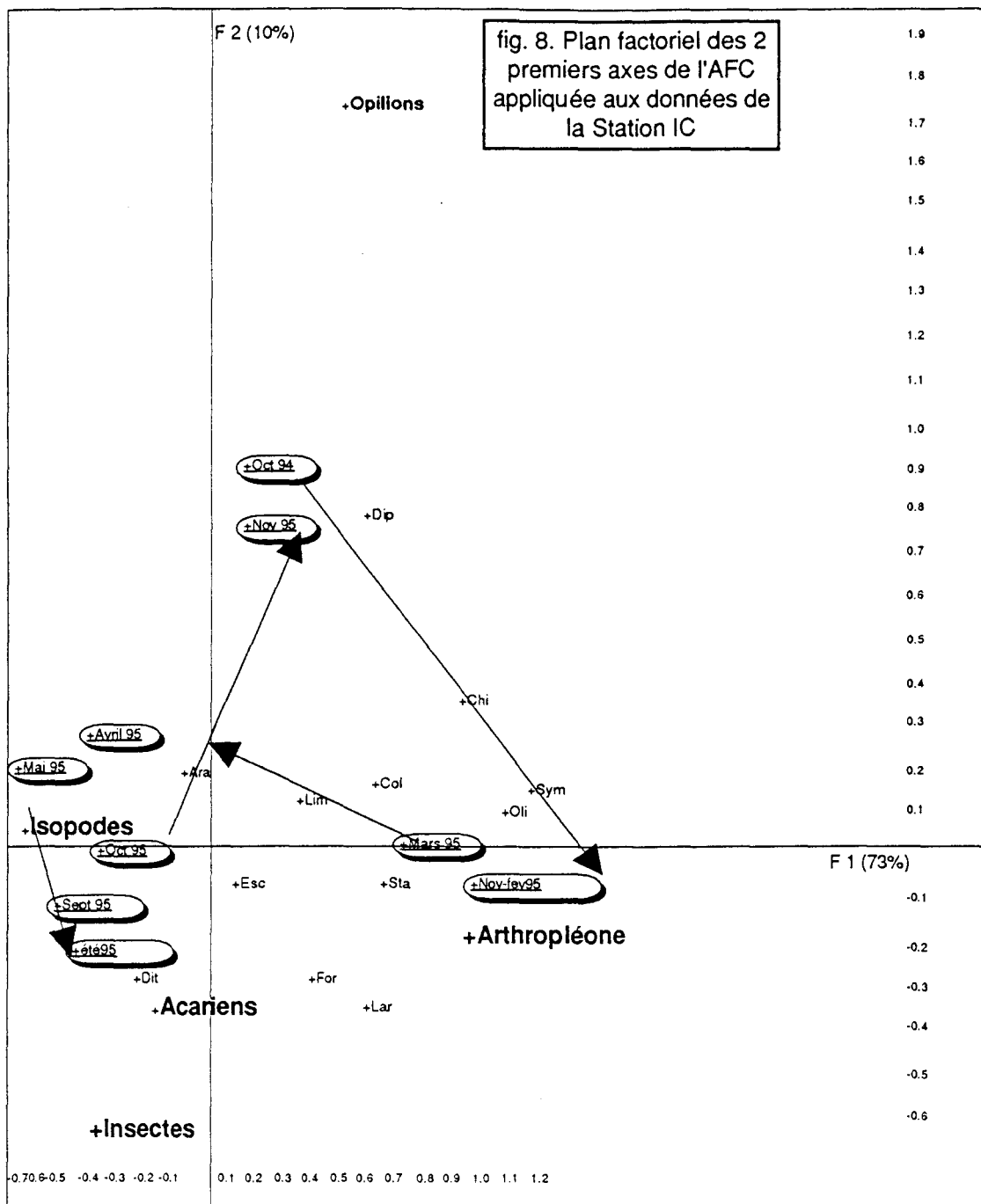
* les vers de terre

On pourra également noter que dans cette station, pourtant largement contaminée en métaux (Tableau 5), de nombreux Oligochètes ont été capturés. En effet, nous avons trouvé un grand nombre de vers dans chacun des pièges au cours de périodes hivernales marquées par de fortes pluies (Fig. 7). Les galeries ayant vraisemblablement été noyées par ces précipitations brutales (en cette période, la couronne des arbres, très peu touffue laisse passer 80 à 90 % des précipitations (Matthey, 1984), les oligochètes sont vraisemblablement remontés à la surface et piégés ensuite au gré de leur déplacement latéral. La présence et l'activité des lombriciens ont donc pu être mises en évidence, ceci dans un contexte de fortes teneurs en métaux qui leur sont supposées toxiques.

On notera au passage que la détermination de ces Oligochètes a été rendue difficile, voire souvent impossible, du fait de leur passage dans l'éthylène glycol, liquide conservateur adapté à l'échantillonnage des Arthropodes mais mal adapté à la conservation des vers de terre qui deviennent flasques et incolores après quelques jours.

-La station IC (fig. 8)

Les deux premiers axes décrivent 83 % de l'inertie totale du nuage de points. L'axe I oppose essentiellement les relevés réalisés de novembre 1994 jusqu'à février 1995, caractérisés par une faune relativement diversifiée (Coléoptères, Staphylins, Collemboles Symphypléones, larves diverses) quoique dominée par des Arthropléones, aux prélèvements d'avril à octobre 1995, nettement dominés en nombre par les Isopodes. Ces Isopodes sont représentés en grande majorité par *Porcellio scaber*, en moins grand nombre par *Oniscus asellus* et on y trouve exceptionnellement *Philoscia muscorum*. Les relevés de mars 1995 s'isolent du reste des prélèvements (sur l'axe 4) du fait de leur abondance relative en Staphylins. L'axe II oppose d'autre part, les prélèvements d'été (également riches en Acariens et insectes divers) aux



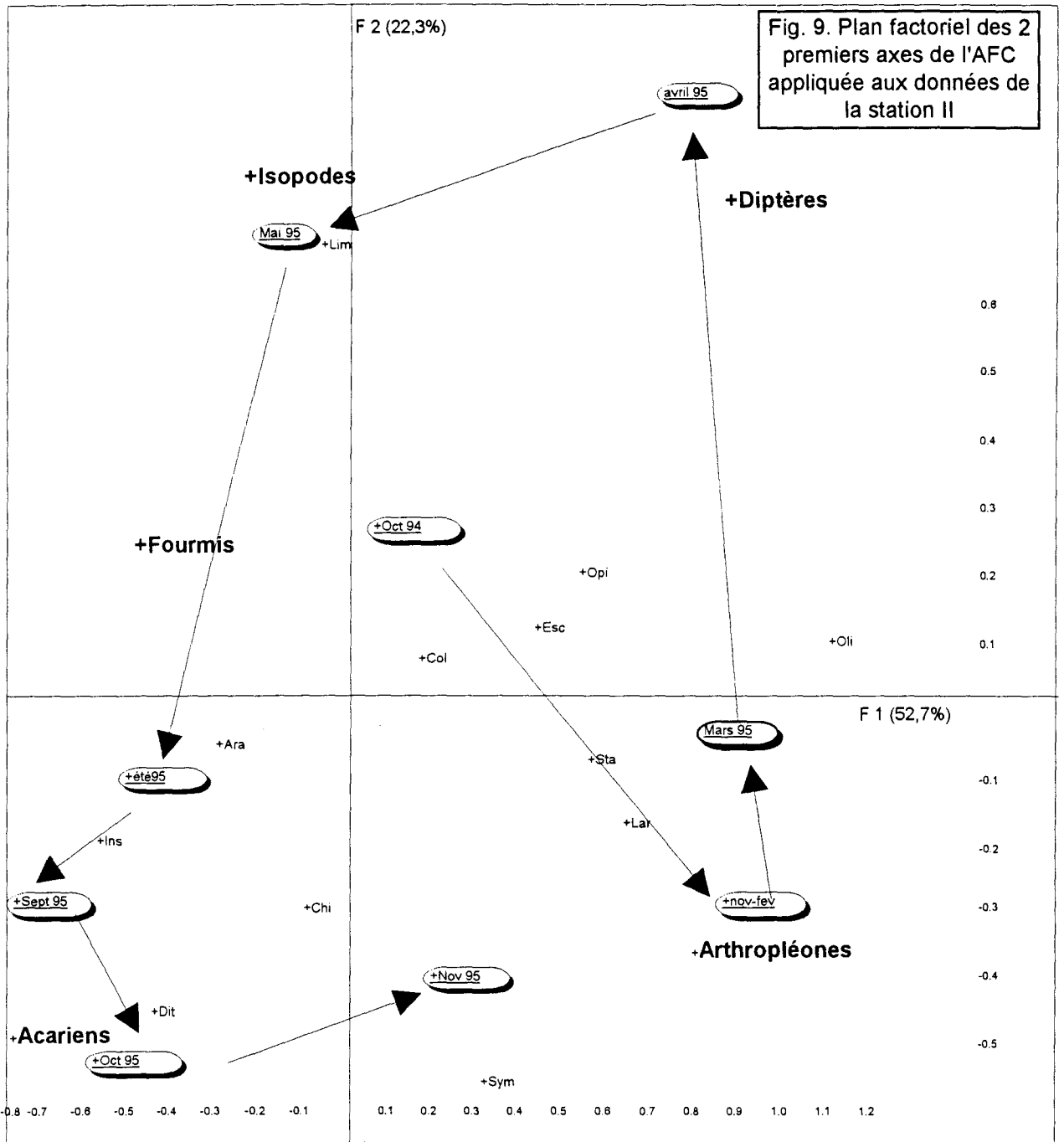
prélèvements d'octobre 1994 et ceux de novembre 1995 qui, isolés sur cet axe du fait de leur pauvreté en ces Acariens et insectes divers, sont plutôt marqués par la présence d'Opilions ou de Diplopodes (*Polydesmus angustus*, *Melogona gallicum*, *Nanogona polydesmoïdes*).

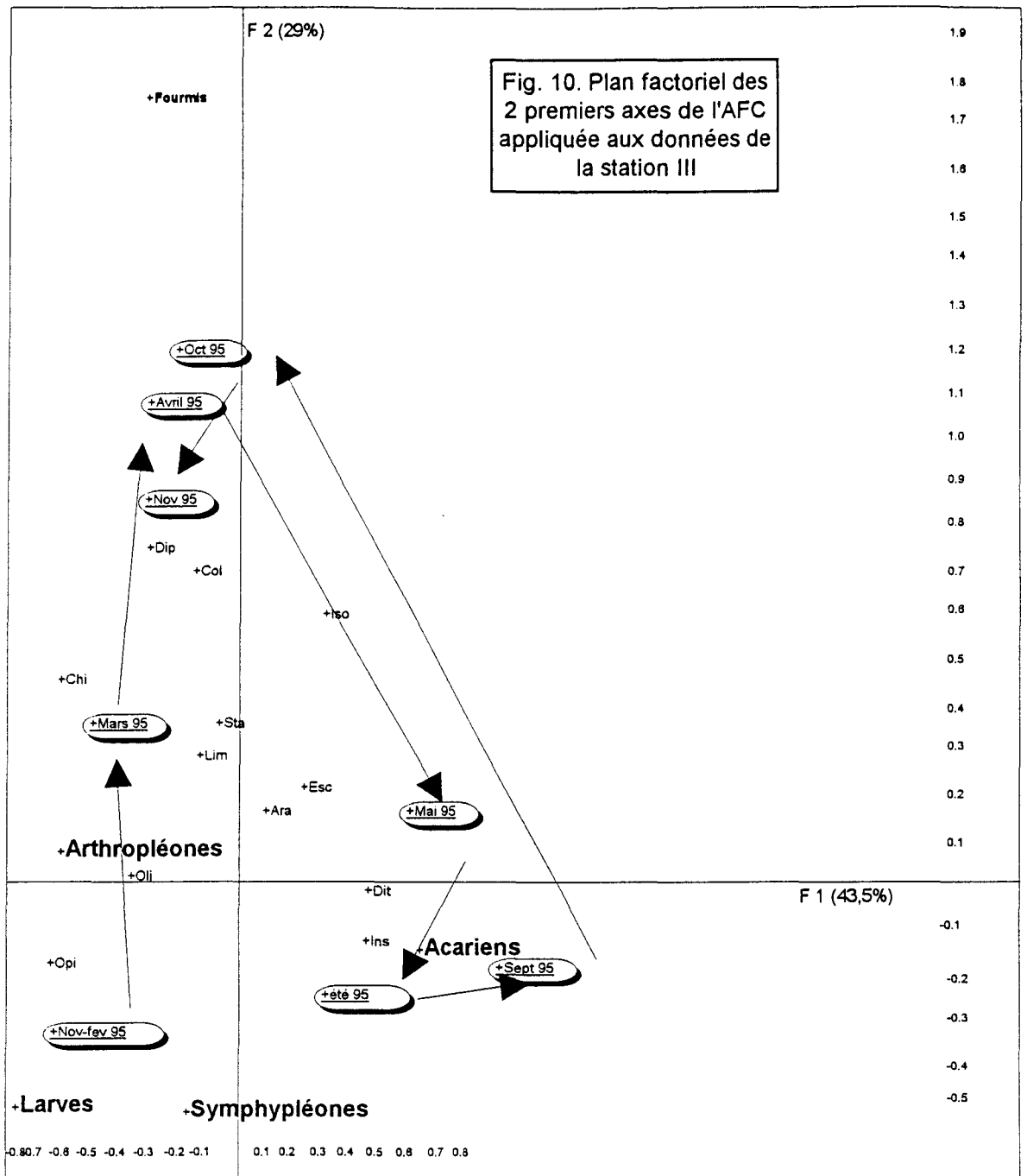
-La station II (fig. 9)

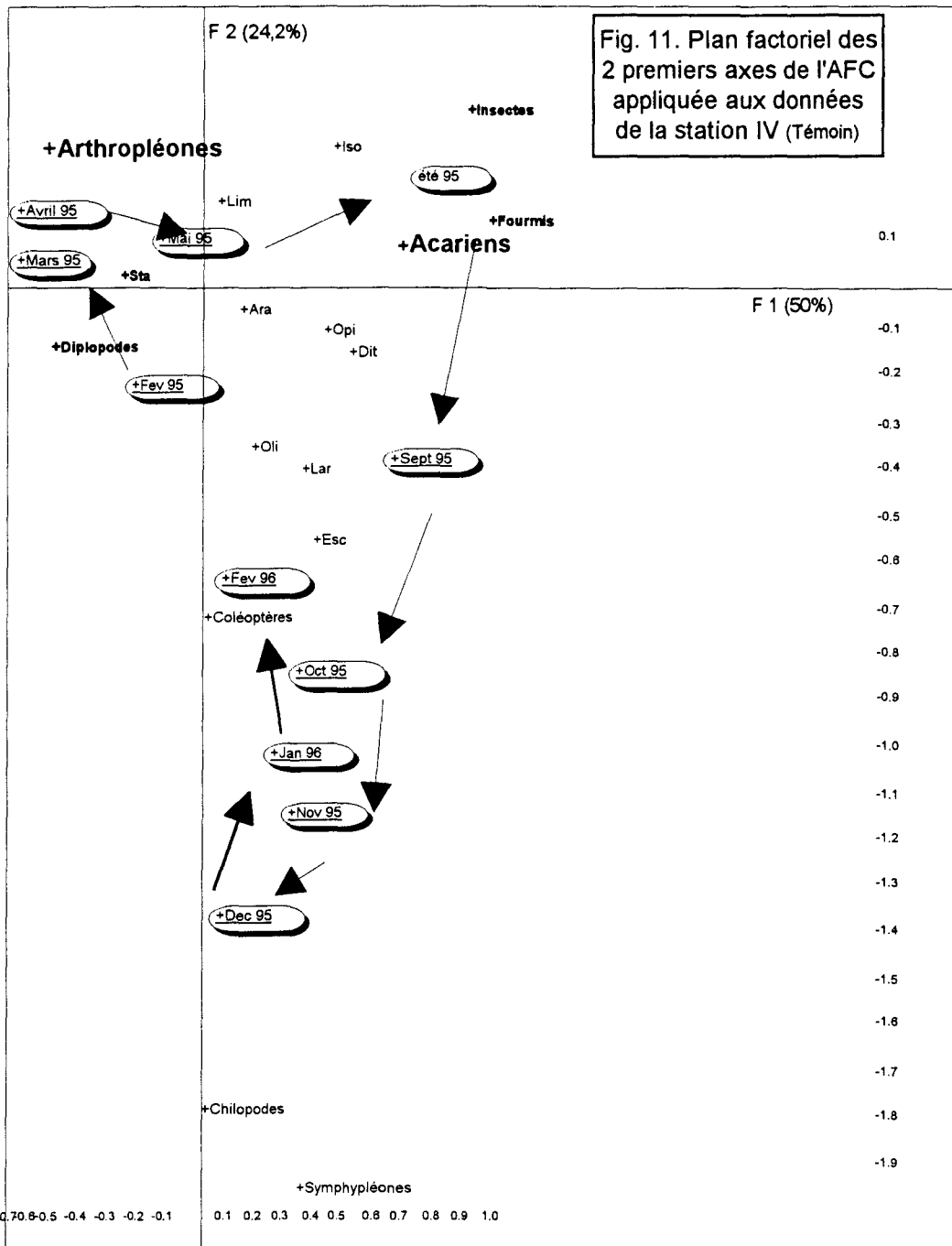
Les deux premiers axes décrivent 75 % de l'inertie totale du nuage de points. Sur l'axe I, on observe une opposition entre les prélèvements d'hiver et de printemps (novembre 1994 à avril 1995) d'une part, et les prélèvements d'été et d'automne 95, d'autre part. Cette opposition est liée à une plus grande richesse en Arthropléones en hiver, alors que les mois d'été sont plutôt riches en Acariens et en fourmis (*Myrmica scabrinodis*). Les mois d'avril et de mai 1995 sont très nettement décalés sur l'axe II, en raison d'une faune très caractéristique : avril présente une faune très nettement dominée par les Diplopodes (*Anoploiuulus pusillus*, déjà nombreux en octobre et novembre 1994) mais encore pauvre en Acariens; il s'agit également de la période d'apparition d'une activité des fourmis. Le mois de mai est marqué par des captures abondantes de fourmis et d'Isopodes, ainsi que par une augmentation des effectifs d'Acariens. Les Isopodes sont dominés par *Armadillidium vulgare*, espèce bien adaptée aux sols secs et calcaires du fait de la bonne imperméabilité de sa cuticule et caractéristique de cette station. Toutefois, on trouvera surprenant d'observer, en mai, une pullulation soudaine (et éphémère) de l'espèce *Philoscia muscorum*, espèce plutôt sylvicole et liée à une forte humidité. Cette pullulation n'est reliée ni à une brusque variation de précipitations ni à une augmentation ou baisse des températures. En septembre 1995, on revient ensuite à une situation plus favorable aux Arthropléones.

-La station III (fig. 10)

Les deux premiers axes décrivent 71,6% de l'inertie totale du nuage de point; l'axe III 12,8%, et l'axe IV 8,5%. L'axe I oppose les prélèvements effectués de novembre 1994 à février 1995 (riches en Arthropléones et larves diverses), aux prélèvements de mai à septembre 1995, dominés entre autres par l'abondance des Acariens. Entre les deux profils de faune, le mois d'avril s'isole sur l'axe II du fait de sa richesse en fourmis (*Formica fusca*). Les prélèvements de mai 1995 sont riches en Isopodes (*Ligidium hypnorum* et plus rarement *Oniscus asellus* et *Philoscia muscorum*), en Diptères, Insectes divers et Acariens. Les prélèvements estivaux suivants, pauvres en Isopodes sont plus riches en Collemboles Symphypléones, Diptères, Insectes divers et toujours en Acariens. Les prélèvements de septembre 1995 ne sont ensuite







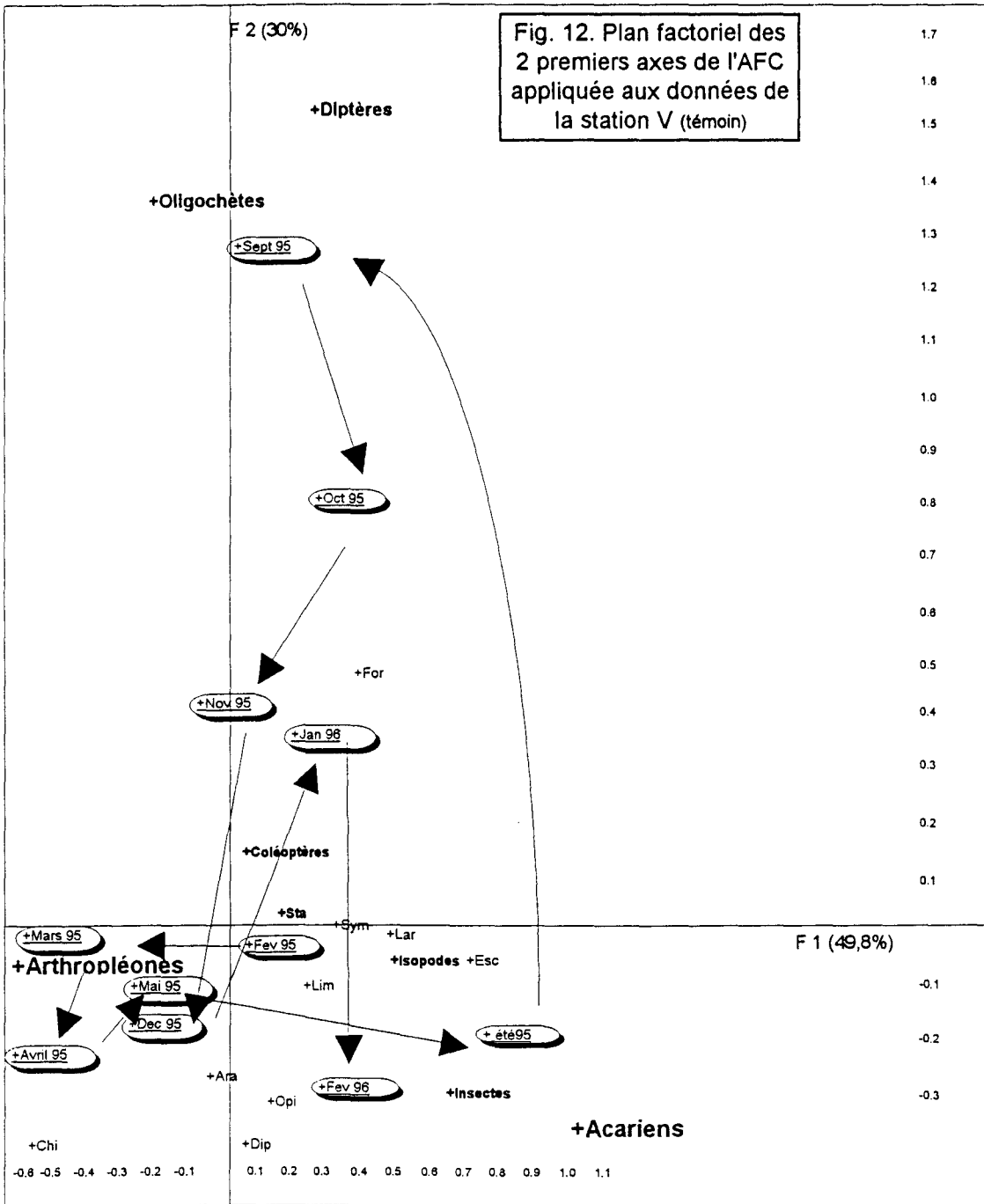
caractérisés que par la présence d'Acariens et de Diptères. A l'automne, en octobre et en novembre 1995, l'abondance des Coléoptères situe ces prélèvements sur un nouvel axe du plan factoriel (axe IV). A partir de novembre, on observera également un retour vers une faune "d'hiver", plutôt marquée par la présence de nombreux Arthropléones.

-La station témoin : IV (Fig.11)

Les deux premiers axes décrivent 74% de l'inertie du nuage de points. On distingue 4 types de groupements faunistiques se succédant au cours du cycle annuel. D'un côté de l'axe I (à gauche sur la figure), sont regroupés les prélèvements de février à mai 95 dans lesquels les Collembolés Arthropléones sont largement dominants. On trouve également à cette époque de nombreux Staphylinidés et relativement beaucoup de Diplopodes (majoritairement *Anoploiuulus pusillus*). Ces prélèvements se diversifient au fur et à mesure qu'on avance dans le printemps. Les prélèvements d'été (juin, juillet, août) s'individualisent de l'autre côté de l'axe I du fait de l'abondance d'Acariens et de leur faune relativement diversifiée (présence d'Insectes divers, de Formicidés *Formica fusca*, de Diptères et d'autres Coléoptères). On observe ensuite, dans les prélèvements d'automne (octobre, novembre, décembre 1995), une diminution progressive du nombre d'Acariens et une abondance relative des Coléoptères et Diptères. Le mois de novembre est isolé sur l'axe II du fait de la présence de quelques Symphypléones (non retrouvés dans les autres prélèvements). Les prélèvements d'hiver (décembre, janvier et février 1996) sont caractérisés par une faune très peu abondante, à mettre vraisemblablement en relation avec les basses températures moyennes observées (min : -1°C ; max. : +3°C).

-La station témoin : V (fig.12)

Les deux premiers axes décrivent 80% de l'inertie du nuage de points. On distingue 4 types de groupements faunistiques se succédant au cours du cycle annuel. D'un côté de l'axe I (côté gauche sur la figure), sont regroupés les prélèvements de mars à mai 95 dans lesquels les Collembolés Arthropléones sont largement dominants. Les prélèvements d'été révèlent ensuite une faune abondante et relativement diversifiée (beaucoup de larves et d'insectes divers dont de nombreux Coléoptères et des Isopodes parmi lesquels on notera *Porcellio scaber* et *Philoscia muscorum*). Les Collembolés Arthropléones sont toujours présents, mais largement dominés en abondance par les Acariens. Les prélèvements de septembre, et dans une moindre mesure, ceux d'octobre et de novembre 1995, s'isolent ensuite sur l'axe II du fait du grand nombre de Diptères récoltés. Il faut également noter au cours du mois de septembre



l'abondante récolte d'Oligochètes, à mettre en relation avec de fortes précipitations (90 mm d'eau en un mois). En effet, les anéciques, noyés dans leurs galeries, ont tendance à remonter en surface et sont alors susceptibles d'être recueillis par notre type de piégeage. Les faibles températures enregistrées en décembre 1995, janvier et février 1996 (min. : -1°C ; max : +3°C) expliquent ensuite la faiblesse en nombre et en diversité des prélèvements suivants.

Récapitulatif:

Globalement, pour toutes les stations, on retrouve deux types de faune: une faune "d'automne et d'hiver" caractérisée par une majorité de Collemboles Arthropléones, et une faune "d'été" plus diversifiée et dans laquelle les Collemboles quoique toujours présents sont supplantés par d'autres groupes (majoritairement des Acariens et des Isopodes, Coléoptères, fourmis et autres Insectes divers).

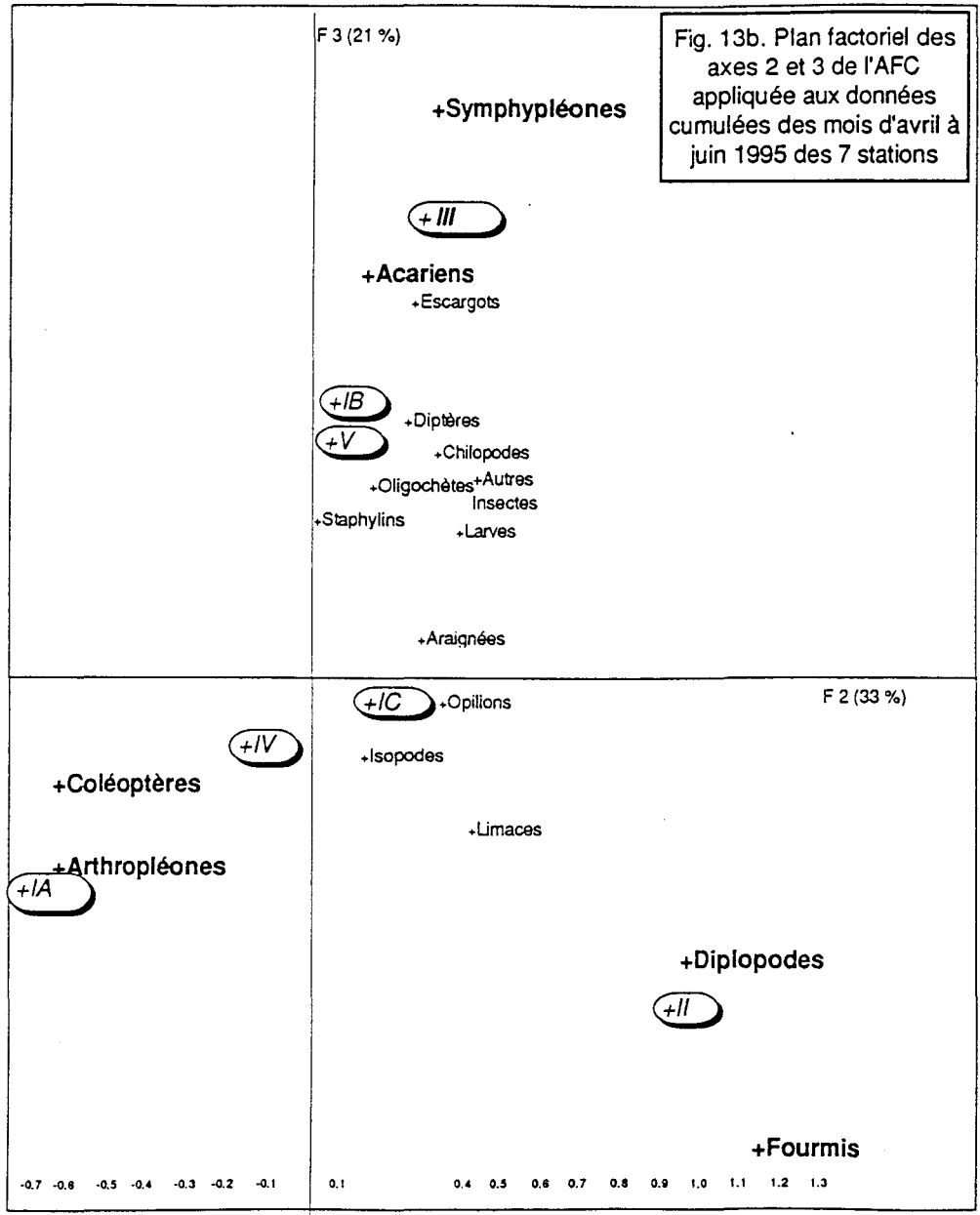
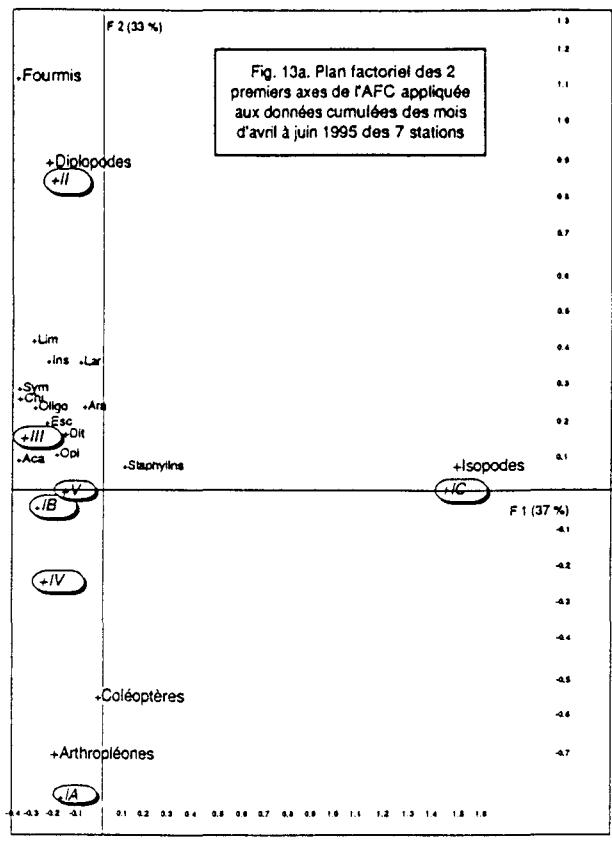
Malgré tout, il apparaît que chaque station étudiée présente une spécificité de cycle, une ou plusieurs caractéristiques qui la différencie des autres types de biotopes : les pièges de la station IA, situés en bordure de champs (de maïs et de petit-pois), sont envahis de Coléoptères dès le mois de mai et les mois d'été suivants.

Les stations du site IB (sous-bois d'une peupleraie) présentent une différence importante dans la faune de type hivernal par rapport à toutes les autres stations : les Collemboles Arthropléones, quoique présents, sont largement supplantés par un autre groupe de Collemboles : les Symphypléones. Il est à remarquer que le sol de ces stations est le plus chargé en métaux lourds.

Les stations situées en IC, à savoir sur un ancien remblais de chemin de fer, très riche en cailloutis et dont la recolonisation par les végétaux est en plein essor, sont caractérisées par une faune relativement variée en automne et hiver et par une pullulation de cloportes (*P. scaber*) en mai et en été.

Les stations du site II (talus de déblais de curage de la Deûle), dont le sol est très pauvre et la végétation poussive, sont envahies par de nombreuses fourmilières (visibles dès le mois de mai), et montrent deux pics successifs (en octobre, novembre 1994 puis en mars-avril-mai 1995) de Diplopodes (*Anoploiuulus pussillus*).

Les stations du site III (taillis humide en bordure d'un fossé) présentent un cycle un peu plus complexe et moins aisé à synthétiser : on retrouve les mêmes types de faunes (dominée en automne-hiver par les Collemboles Arthropléones et en été par les Acariens) mais les intersaisons sont dominées par des groupes différents (des fourmis en avril, des Coléoptères en octobre-novembre 1995).



La comparaison avec la faune des stations témoins (IV et V) ne met pas en évidence une quelconque perturbation engendrée par les métaux lourds à ce niveau de pollution et de détermination. Chaque station présente ses spécificités en relation avec les évolutions saisonnières du climat.

b- Comparaison des stations entre-elles

Pour comparer les sept stations, on a procédé au cumul, pour chacune de ces stations, des données obtenues au cours des périodes d'activité maximale des macroinvertébrés circulants, à savoir avril, mai et juin 1995.

Les plans factoriels de l'AFC appliquée au tableau décrivant les sept stations sont présentés Figures 13a et 13b. Nous avons également fait figurer les données brutes sous forme de tableau (Tableau 6) afin que l'on puisse éventuellement se rendre compte de la densité et du nombre des individus piégés.

Les deux premiers axes décrivent 70% de l'inertie totale du nuage de points, l'axe III, 21 % et l'axe IV, 6.7 %. Le premier axe met en évidence la station IC qui se distingue nettement de l'ensemble des autres stations par son extrême richesse en Isopodes (Fig. 13a). L'axe II montre une opposition entre les stations II et IA ; la première étant caractérisée par la présence de nombreuses fourmis et de Diplopodes, la seconde par celle des Collemboles Arthropléones et des Coléoptères.

L'axe III oppose ces deux stations fortement caractérisées par un ou deux taxons à un groupe de trois autres stations (III, IB, V) marquées par la présence de nombreux Collemboles Symphypléones, d'Acariens, de Diptères ou de Coléoptères Staphylinidés. On observe cependant une opposition visible sur l'axe IV entre les stations IB et V. Cet axe décrit un gradient entre les stations riches en Gastéropodes de type escargots et en Collemboles Symphypléones, et la station IB riche en Acariens.

c- Comparaison avec des données climatiques

- Influence sur l'activité des invertébrés

La représentation graphique du nombre global d'individus piégés chaque mois reflète les périodes d'activité intense de la faune invertébrée. A la station IB par exemple (Fig. 14), deux périodes d'activité sont observées : une période d'activité intense pendant laquelle de nombreux individus sont piégés et qui s'étend du printemps à l'automne, et une période de

Tableau 6 : Effectifs cumulés des récoltes d'invertébrés des mois d'avril, mai, juin 1995 des cinq stations de la zone polluée et des deux stations témoins (IV et V) situées sur le campus USTL.

Stations	IA	IB	IC	II	III	IV	V
Annélides Oligochètes	9	33	6	27	11	10	20
Gastéropodes							
Escargots	16	5	14	57	54	9	272
Limaces	208	28	93	527	121	158	280
Arachnides							
Acariens	871	1747	287	541	1644	194	761
Araignées	124	149	121	284	129	131	180
Opilions	22	10	5	25	1	9	36
Crustacés							
Isopodes	555	211	4256	673	260	78	321
Myriapodes							
Diplopodes	34	50	95	934	151	124	173
Chilopodes	1	12	1	6	1	2	5
Insectes							
Collemboles							
Arthropléones	6364	974	649	910	440	1391	1040
Symphypléones	48	48	51	123	491	13	496
Coléoptères							
Staphylins	160	155	277	205	227	193	260
Autres Coléoptères	2137	578	575	396	224	210	415
Diptères	84	231	111	185	251	158	123
Formicidés	148	270	48	2900	153	169	102
Autres Insectes	112	837	249	829	644	355	339
Larves diverses	60	177	141	314	183	99	268
Total	10953	5515	6979	8936	4985	3303	5091

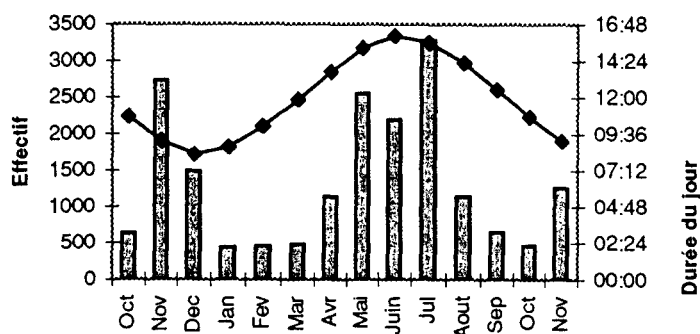


Fig. 14. Activité annuelle (1994-1995) des invertébrés à la station IB

repos durant l'hiver, au cours duquel peu d'individus sont récoltés. Ces constatations, présentées ici sur une des stations, sont généralisables à l'ensemble des autres stations. Parmi les différents facteurs météorologiques intervenant dans la reprise de l'activité printannière, il semble que l'augmentation de la durée du jour soit prépondérante.

- Influence sur la diversité

L'ACM permet de procéder à l'analyse simultanée de données faunistiques et de données explicatives telles que les données météorologiques. Les résultats obtenus après ACM sur les données des stations IA, IB, IC, II, III, et les stations témoins IV et V sont présentées Figures 15a et 15b. Les variables climatiques que nous avons fait intervenir sont : les températures (minimales et maximales), l'abondance des précipitations, et la longueur des jours. L'analyse a porté sur les cumuls par mois de chacun des trois réplicats des différentes stations. Nous avons volontairement exclu de l'analyse les données recueillies en décembre 1995, janvier 1996 et février 1996; en effet, leur pauvreté en nombre d'individus capturés correspond de manière évidente aux très faibles températures hivernales enregistrées.

Les deux premiers axes décrivent à eux seuls 50,2 % de l'inertie totale du nuage de point. L'axe I décrit essentiellement le gradient existant entre les périodes froides, à faible luminosité et à fortes précipitations (l'hiver) et les périodes chaudes, sèches et à durée du jour maximale. Nous mettons ainsi en évidence l'influence majeure des conditions météorologiques sur l'activité de surface des différents groupes inventoriés et ceci quels que soient les sites et leurs caractéristiques propres (pollution ou non). Deux points importants sont ainsi mis en évidence:

1- L'existence de deux grands types de faunes se succédant au cours du cycle annuel, correspondant aux deux saisons extrêmes et caractérisés par l'abondance de différents groupes d'animaux. On détermine ainsi les périodes d'activité majeures de ces animaux.

- En été (juillet et août), sont les plus actifs : les Insectes avec, entre autres, les différents Diptères et les fourmis, les Arachnides, en particulier les Acariens, ainsi que les Isopodes.

- L'hiver (décembre, janvier, février) est moins favorable aux groupes cités ci-dessus. Ils laissent alors la place aux Collemboles (Arthropléones et Symphypléones), aux Diplopodes, aux Oligochètes et aux Coléoptères Staphylinidés. Entre les deux types de situations, on assiste à un changement graduel de la diversité faunistique, qui caractérise les saisons intermédiaires.

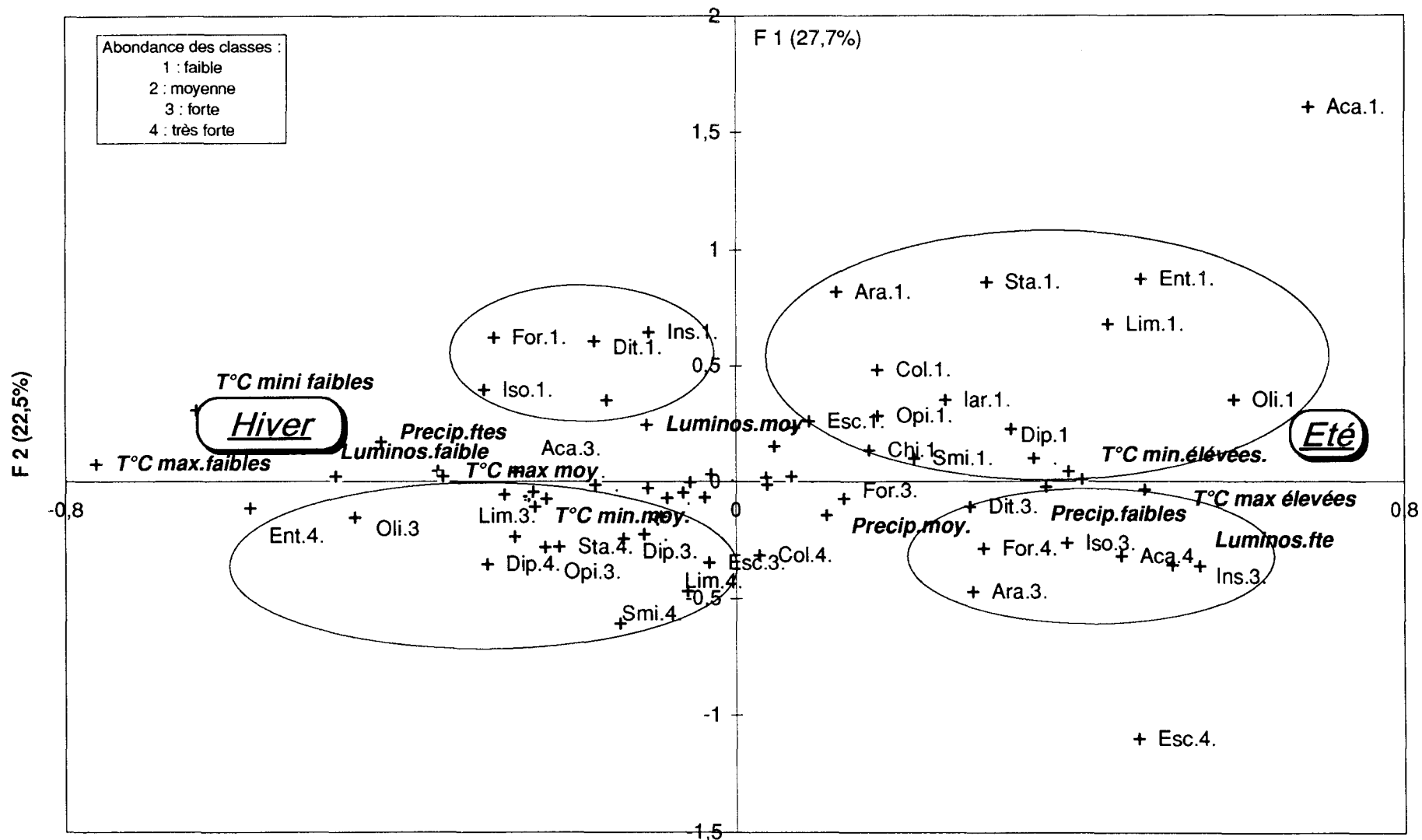


fig. 15a. Plan factoriel des 2 premiers axes de l'ACM appliquée au tableau de données faunistiques et climatiques. Représentation des différentes classes de groupes faunistiques et de paramètres climatiques

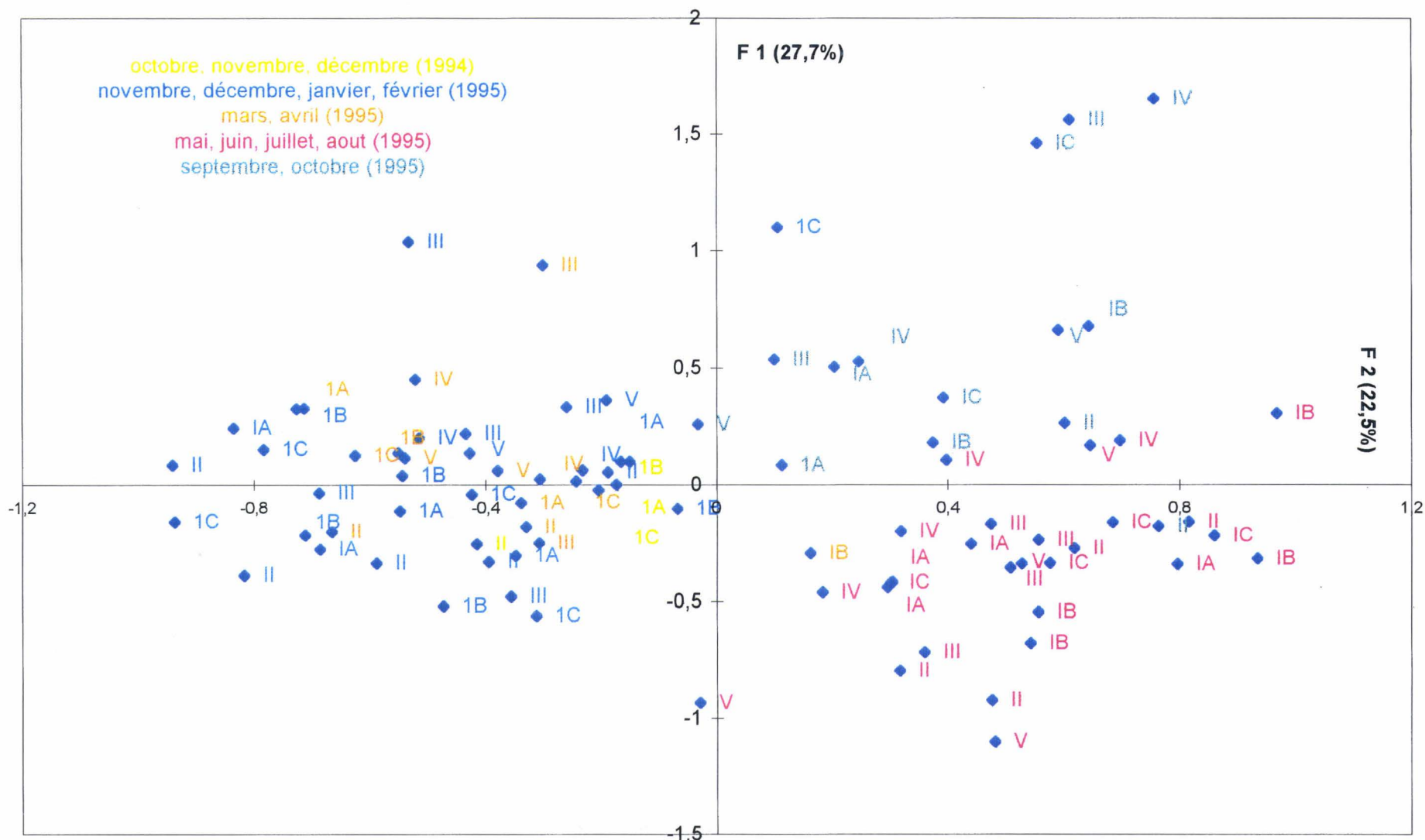


Fig. 15b. Plan factoriel des 2 premiers axes de l'ACM appliquée au tableau de données faunistiques et climatiques. Ségrégation des stations en fonction des saisons

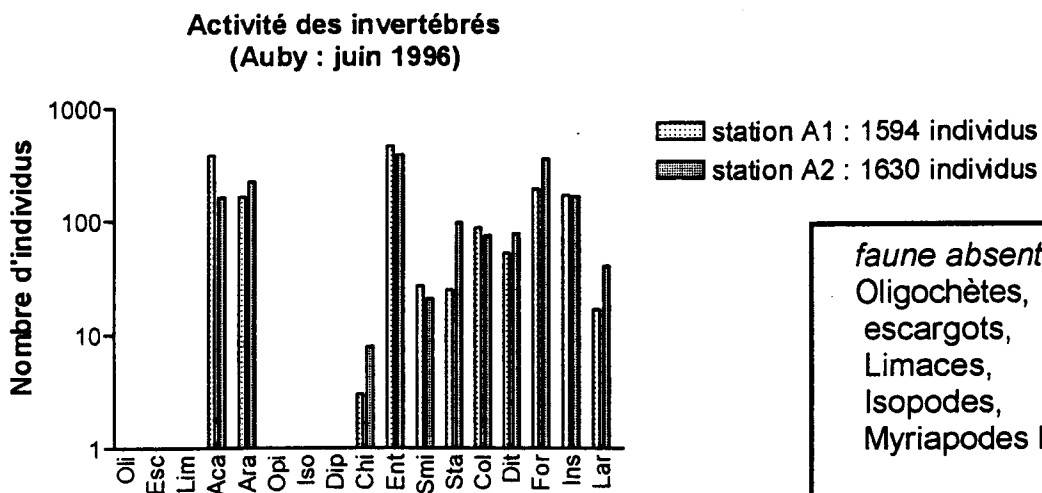
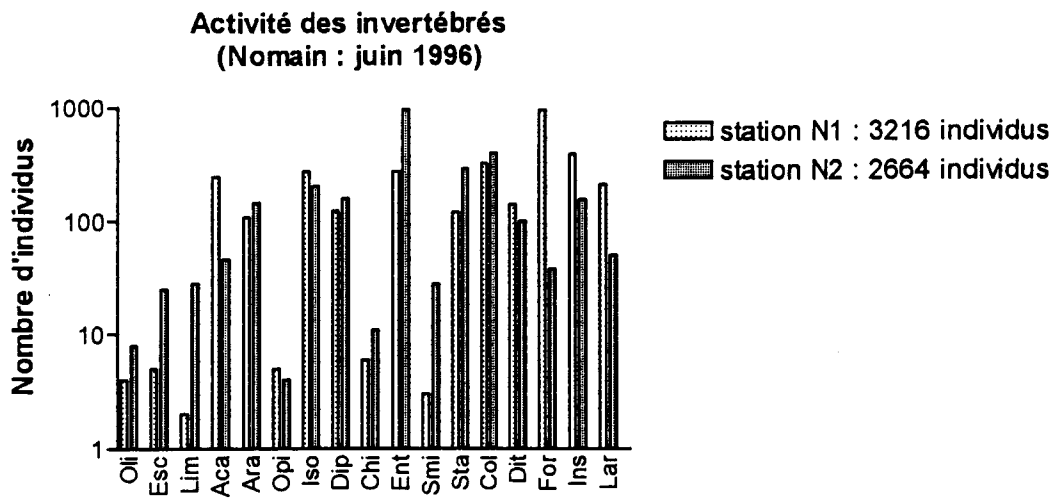


Fig. 16. Activités des différents groupes d'invertébrés récoltés au cours du mois de juin 1996 (trois pièges par station, échantillonnés toutes les semaines); Auby : pelouse métallicole. Nomain : station témoin.

2- Aucune station ne se détache plus particulièrement de toutes les autres à ce niveau d'observation : les stations contaminées en métaux ne présentent pas, à ce niveau de détermination taxonomique, de profils particuliers par rapport aux stations témoins. L'influence des facteurs climatiques est donc prédominante, même à ce niveau de pollution, vis à vis de la structure des peuplements et de leur évolution saisonnière.

III.2 Campagne de juin 1996

La somme des relevés hebdomadaires réalisés au cours du mois de juin 1996 au sein des deux stations (trois pièges par station) installées sur la pelouse métallicole est présentée à la Fig.16. Aux fins de comparaison, nous avons également fait figurer les relevés de deux autres stations témoins (présentant approximativement le même faciès de végétation, de type prairial, bien que les essences soient différentes), échantillonnées à la même époque.

La première observation concerne le nombre d'individus récoltés dans chacun des deux biotopes (pollué ou non). Il apparaît globalement que la faune récoltée par les pièges Barber au sein des zones témoins, soit plus abondante (ou au moins plus active) que celle des zones extrêmement polluées : 1594 à 1630 individus dans chacune des deux stations polluées contre 3216 et 2664 dans les stations témoins, soit pratiquement le double d'individus. Cette faible abondance des macroinvertébrés dans les pelouses métallicoles est un phénomène qui a également été observé par d'autres équipes (Nahmani, 1998), notamment à *Mortagne du Nord*.

Du point de vue qualitatif, il apparaît nettement que plusieurs catégories d'animaux font défaut (Fig. 16, 17): aucun Oligochète, ni aucun Mollusque (type escargot ou limace) n'a été piégé, mais surtout aucun Diplopode, ni aucun Isopode n'a été trouvé dans aucun des 6 pièges et ceci sur toute la période d'échantillonnage.

La représentation en pourcentage des principaux groupes écologiques identifiés (Fig. 17) fait entre autre apparaître une abondance toute particulière des Arachnides (araignées et Acariens) dans la pelouse métallicole : respectivement 34 et 24 % de la faune totale contre 11 et 6 % dans les stations témoins. L'abondance constante des fourmis sur l'ensemble de la pelouse métallicole semble être également une de ses caractéristiques ; nous avons pu observer plusieurs espèces, et il est vraisemblable que l'abondante litière non décomposée leur offre de nombreux abris de même qu'aux araignées et aux Acariens.

La répartition grossière de la faune en fonction des régimes alimentaires ne montre pas de différence nette si on compare les stations d'Auby (riches en fourmis) à la station témoin placée volontairement à proximité d'une fourmilière (Fig 18): les invertébrés prédateurs sont

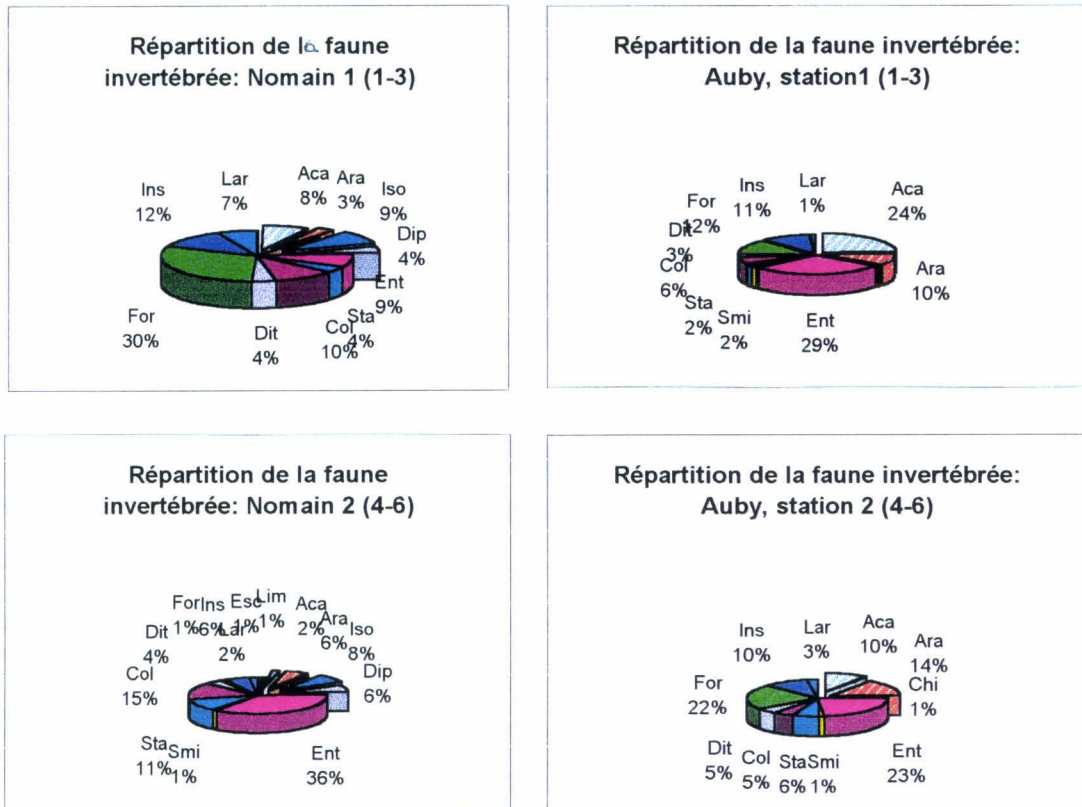


Fig. 17. Représentation en % des différents groupes écologiques

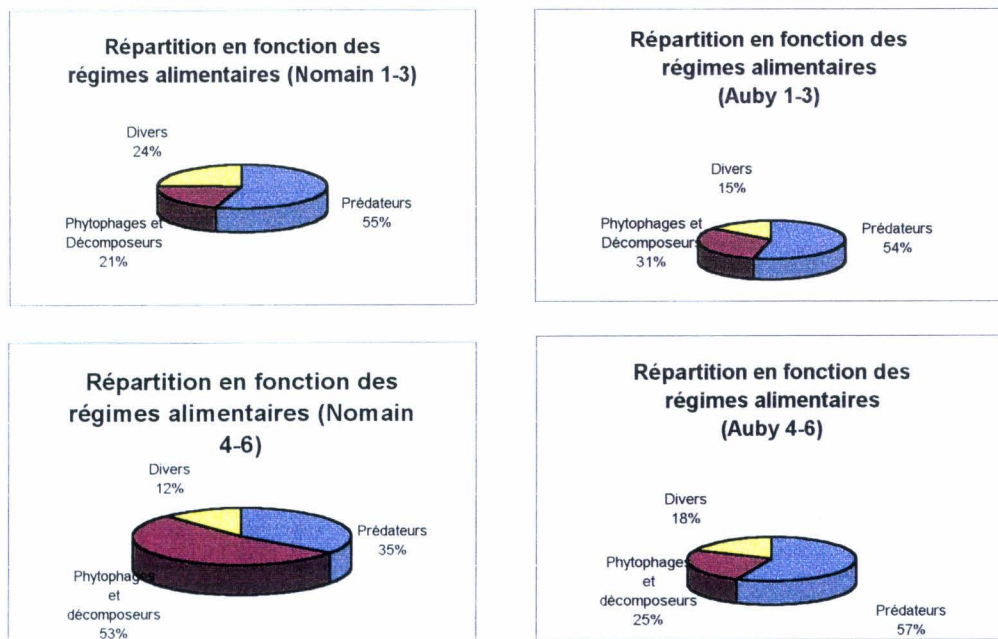


Fig. 18. Répartition de la faune récoltée à Auby et à Nomain en fonction des régimes alimentaires

alors en majorité par rapport aux invertébrés phytophages ou décomposeurs. Il faut remarquer que nous avons regroupé sous le terme "divers" les individus dont, l'identification à l'espèce n'ayant pas été faite, nous ne pouvions déterminer le régime alimentaire (Larves diverses, Diptères, Coléoptères et d'autres insectes). A ce niveau taxonomique trop général, il n'apparaît pas de dysfonctionnement flagrant de la biocénose. En revanche, si on s'intéresse à la répartition de la faune en classes trophiques, il apparaît nettement, comme il a été montré précédemment que parmi les prédateurs, les Arachnides et les fourmis étaient particulièrement favorisés.

Sur ce type de sites extrêmement chargés en métaux et dont les teneurs en plomb, zinc et cadmium de la litière peuvent atteindre respectivement 5410, 31175 et 305 mg/kg (données INRA, rapport PRC 1997), on observe que l'activité des invertébrés phytophages et des décomposeurs est extrêmement réduite. La litière s'accumule de manière anormale (jusqu'à 30 cm d'épaisseur), ce qui constitue une marque évidente de dysfonctionnement dans l'écosystème. Il est à supposer que de telles teneurs en métaux gênent fortement la "digestion" de cette litière par les invertébrés décomposeurs et inhibent la microflore.

Malgré la présence de métaux toxiques sur les cinq stations situées à Evin-malmaison, aucun effet n'est caractérisé à ce niveau de pollution sur la structure des peuplements, tout au moins quand on se limite à une identification à un niveau supra-spécifique. Par contre dans un milieu très chargé en métaux et de type pelouse métallicole, il apparaît clairement que les principaux invertébrés responsables de la fragmentation de la litière sont absents. Cette première étape manquante dans le processus de dégradation de la litière et nécessaire pour la minéralisation ultérieure exercée par la microflore explique en partie l'accumulation de la matière organique observée. De plus, il semble que certains groupes de prédateurs (fourmis et Arachnides) soient en grand nombre et donc nettement favorisés, vraisemblablement par la diversité des habitats proposés par ces milieux extrêmes.

Discussion

Il est vraisemblable qu'il existe des valeurs-seuils de pollution au-delà desquelles seule se développe une catégorie de végétaux - "métallophytes absolus ou pseudo metallophytes" - favorisés par leur aptitude à la tolérance. La toxicité de la litière qu'ils forment est sans doute à l'origine elle-même de sa mauvaise dégradation.

La disparition des Mollusques dans les zones extrêmement chargées en métaux a déjà été observée (Jones 1991 *in* Laskowski & Hopkin, 1996). Plusieurs hypothèses sont émises pour expliquer leur extinction : les effets toxiques des métaux peuvent se traduire par une diminution de la croissance, une prolongation de la période juvénile et donc une baisse de la capacité globale de reproduction (Russel *et al.*, 1981 *in* Laskowski & Hopkin, 1996). Mais il a également été montré que certains Mollusques pouvaient réduire leur consommation de nourriture si celle-ci s'avérait trop toxique, les individus finissant alors par mourir de faim (Laskowski & Hopkin 1996).

Le même phénomène a également été observé chez les Isopodes (Hopkin & Hames, 1994) : outre l'empoisonnement général dû au métaux, la réduction de la consommation de nourriture peut expliquer leur disparition totale de zones très polluées. Ces auteurs font mention de teneurs seuil en zinc dans la litière végétale de 5000 mg/kg. Dans le cas qui nous intéresse, ces teneurs sont largement dépassées.

Devant l'importance des effets de la toxicité des métaux (Cd, Pb, Zn) sur les populations de décomposeurs, nous avons décidé d'explorer plus en détail les populations de Myriapodes et d'Isopodes dans les zones que nous avons à étudier. L'ensemble de ces données a fait l'objet d'une publication actuellement soumise et que nous présentons ci-après.

Myriapod communities with some data on Isopods in heavy metal contaminated soils (article soumis à *Pedobiologia*)

Claire Grelle, Marie Chantal Fabre, Michel Descamps

Laboratoire de Biologie animale, Bât SN3, Université de Lille 1,

F.59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Summary: Soil invertebrate communities are affected by heavy metals. In this study, control and contaminated (with cadmium, zinc and lead) areas were sampled to follow seasonal variations and effects of soil properties on soil fauna species pattern. Saprophagous invertebrates (Diplopoda, Isopoda) and Chilopoda were sampled by pitfall-trapping from february to november in relatively low contaminated areas. For Myriapoda, two high activity periods were observed, the first in November and the second in spring (April, May), interrupted by two relatively inactive periods. Isopods were abundant from April to the end of summer. No clear correlation was found relating dominant species or number of myriapods or isopods with heavy metal levels in « low contaminated » areas. Dominant species didn't seem to be related to pollution but most likely to vegetation or soil characteristics. On the contrary, in very high contaminated soils (with metalliferous grassland), presenting a thick undecomposed litter layer, no isopods nor millipedes (nor Oligocheta, nor Mollusca) were sampled, but only Chilopoda and Symphyla. The only saprophagous invertebrates found were Collembola.

Key-words: Myriapoda, Isopoda, communities, cadmium, lead, zinc.

Introduction

Soil contamination by heavy metals is one of the major problems in heavy industry regions. Filtering of waste gases in recent years has led to a significant decrease of the amounts of metals emitted but the pollutions inherited from the beginning of the industrial period are still present. Numbers and diversity of soil arthropods inhabiting the litter decline in the vicinity of zinc smelters (Trojan, 1978). Moreover, the decomposition of organic litter and the microflora activity is disturbed (Bååth, 1989). We focused on Myriapoda (Chilopoda, Diplopoda) and Isopoda since they enhance (except for Chilopoda which are predators) to a large extent the decomposition of organic litter through their feeding activities by stimulating soil microflora activity.

Some data exist on myriapod communities in heavy metal contaminated woodlands (Hopkin et al., 1985; Read & Martin, 1990), but no data are available for other types of fields. It was shown by Hopkin et al. (1985) that a reduction in the millipede fauna occurred in polluted woods compared to uncontaminated ones. Results were not so clear in the Read and Martin study: the only significant relationships were between centipedes and copper or centipedes and cadmium and both were positive. Concerning Isopoda, especially *Porcellio scaber*, effects of toxicants or heavy metals have been mainly studied in order to develop toxicity tests (Köhler et al., 1996; Drobne, 1997). Little information is available on effects of metal on isopod communities though it is known that metals, such as zinc, disrupt moulting cycles or damage digestive glands and may affect food consumption, reproduction and finally the community structure (Drobne, 1997).

In the present study, fields in the vicinity of a lead and zinc smelting plant were used as an experimental area. Invertebrate soil communities were sampled with different methods (pitfall traps or Berlese extraction) in order to study seasonal variations and effects of soil properties on species pattern.

Material and methods

Animal sampling

Animals were sampled in seven different sites (Fig.1). Five contaminated sites, in the vicinity of a lead and zinc smelting works (located at Noyelles-Godault, between Lens and Douai, Northern France), were chosen according to their distance and exposure to wind (IA: 1.1 km N; IB: 0.75 km N; IC: 0.75 km N/NW; II: 0.75 km NW; III: 2.5 km E/SE). Two

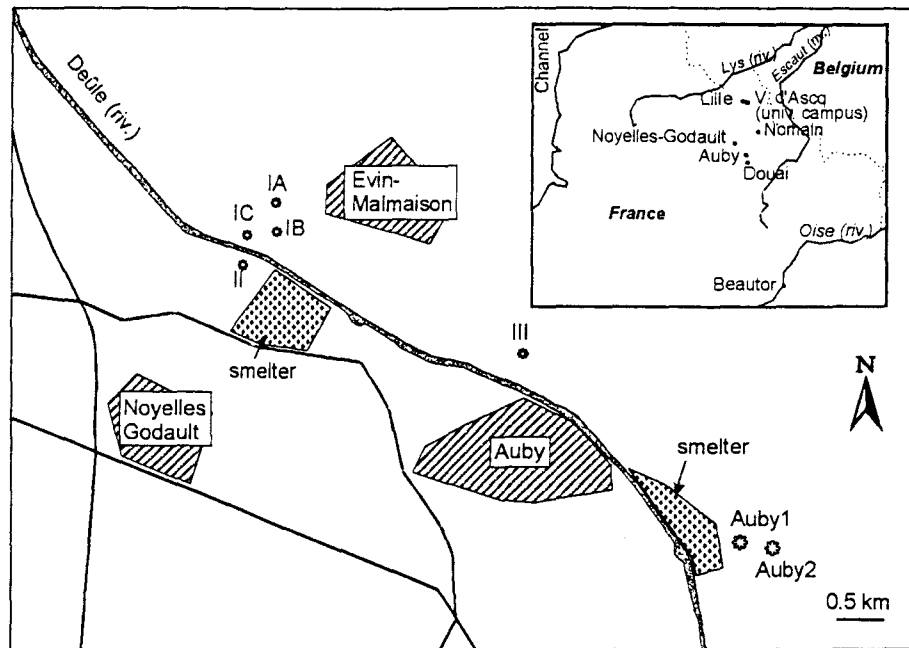


Fig. 1. Location of the sampling sites in the vicinity of the two zinc smelter (IA, IB; IC, II, III, Auby) and the controls (IV, V, Nomain 1, Nomain 2, Beautor)

control sites (IV and V, unpolluted by heavy metals) were chosen on the University campus of LILLE 1. Each site was sampled by three pitfall traps (16 x 9 x 7 cm, L x W x H), containing 250 ml ethylene glycol in water (25 %). Sampling was done from February 1995 to November 1995, roughly corresponding to the activity period of these invertebrates. Traps were emptied every week or every two weeks, depending the climatic conditions.

In addition, we choose to trap animals during a short period of maximal fauna activity in several very high contaminated locations. Located in Auby (Auby 1 and Auby 2), in the vicinity of another zinc smelter (0.5 km, SE), these sites are on a metalliferous grassland (vegetation is essentially made up of metallophytes or pseudometallophytes such as *Cardaminopsis halleri*, *Armeria maritima halleri* and *Arrhenatherum elatius*) where decomposition of organic litter is strongly affected. They were sampled by pitfall-trapping in June 1996 and for Berlese extraction in Autumn (November 1994). Three uncontaminated sites were also sampled to give information of « uncontaminated » fauna: two in Nomain (June 1996) and one in Beautor (mid July to end of August 1996 and October 1996). All these sites were sampled as previously described by pitfall-trapping. The heavy-metal uncontaminated sites were chosen according to their vegetation or soil type, in order to be compared with those of the contaminated area.

Berlese extraction was performed on soil litter (0.25 m² per site) with 8 days of extraction time after hand sorting of macrofauna. Berlese-funnels had 25 cm diameter with sifter mesh of 1 mm.

Diplopod species determination was done according to keys provided in Brolemann (1935), Schubart (1934) and Demange (1981). The help of Dr J.-P. Mauriès (Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris) is here acknowledged. Chilopod species determination was done according to keys provided in Brolemann (1930) and Demange (1981) and isopod species were determined according to Perrier (1964) and Vandel (1962) keys.

Soil analysis

Soil was collected from the top 10 cm layer after removing surface vegetation. Prior to analysis, samples were oven-dried (80° C) to constant weight, pulverised and sieved (2 mm mesh size). Samples were treated as described in Scaps et al. (1997) with an adapted normalised method (NF X31-151, AFNOR 1994) being digested with concentrated nitric and hydrochloric acid. In addition to this method giving the total amount of metals, and in order to have a better estimate of the potentially available fractions of metals in soil, other metal extracting techniques were performed: ammonium acetate and EDTA extracted metals were measured according to the NF X 31-120 method (AFNOR 1994). Extractable fractions by

Fig. 2a

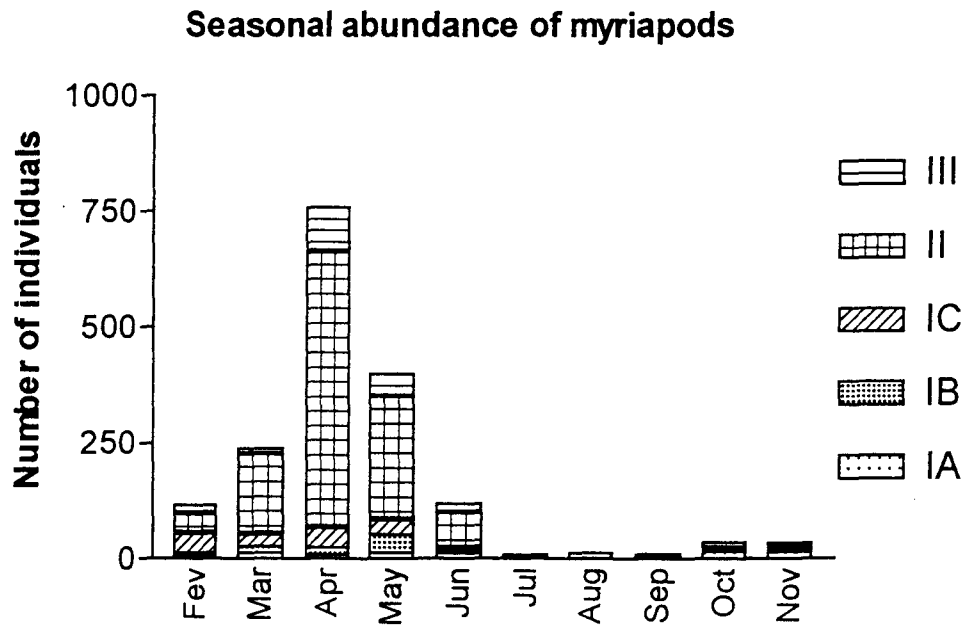


Fig. 2b

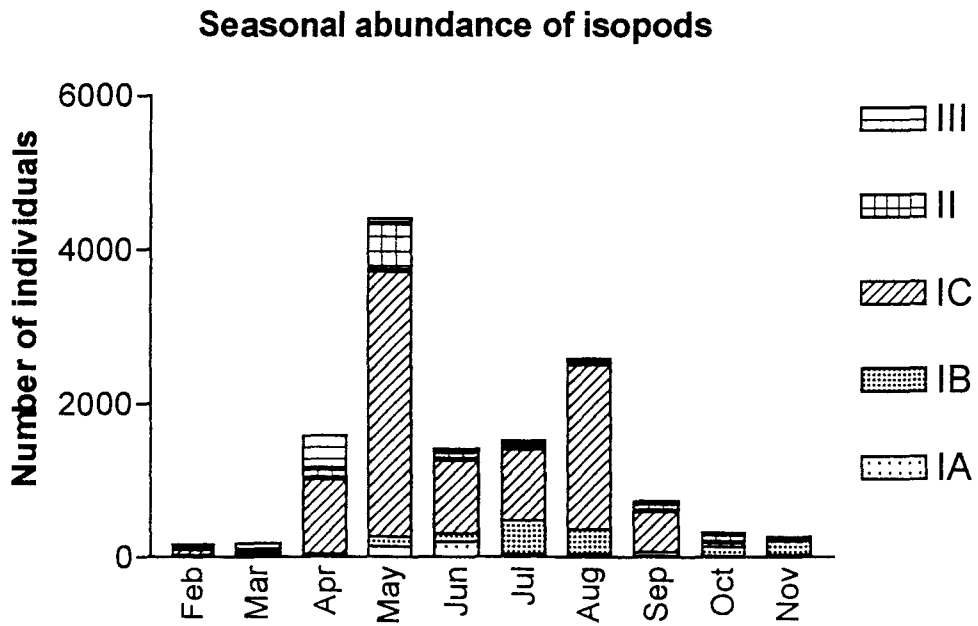


Fig. 2a, 2b. Seasonal abundance of myriapod or isopods: animals were sampled by pitfall traps in contaminated sites (IA, IB, IC, II, III).

CaCl₂ (0.01 M) were measured at the «*Laboratoire d'Analyses des Sols* of I.N.R.A. d'Arras ». Concentrations of cadmium, lead, copper or zinc in samples were determined by flame atomic absorption spectrophotometry (Varian Spectr-AA-10) using an air acetylene flame with deuterium lamp background correction. The same samples were also analysed by ICP AES (Varian Liberty Serie II, data not shown), giving comparable results for the metals studied. Soil pH was measured on water extracts. Determination of organic carbon was performed with an adapted sulfochromic oxidation (HACH 1989). Absorbency was measured at 610 nm with a HACH DR/2000 spectrophotometer. Carbonates levels were assayed by HCl digestion in a closed vessel according to the NF X31-105 method (AFNOR 1994). The volume of carbon dioxide which is produced was measured. Carbonate content (% dry weight) was then determined with respect to a calcium carbonate calibration curve. All soil characteristics are summarised in Table 1.

Statistical analysis

Correlations between heavy metal levels or other parameters in soil and the number of myriapods recorded in each site were conducted using Spearman rank correlation.

Results

Seasonal patterns of fauna abundance

The monthly total amount of the myriapods sampled in the pitfall traps of low contaminated sites (IA, IB, IC, II, III) are shown in Fig. 2a. In general, chilopods represented only a small part of the myriapod community compared to diplopods. High activity periods was revealed in spring (April, May). As expected, immobility periods occurred in summer corresponding to high temperatures and drought.

Isopods were numerous from April to August especially in IC sites (Fig. 2b). Major species found in the five sites are shown in Table 2. We found no isopods in the highest contaminated site (Auby) neither in pitfall-traps nor in Berlese extracted samples, though they were present at the same period in less contaminated or control areas. Each site was characterized by one or two dominant species which doesn't seem to be related to pollution level but most likely to vegetation or soil characteristics. *Ligidium hypnorum* were found only in site III which is humid (being coppice on stream banks) and have high organic matter content (Table 1). Soil properties of site II (dry and calcareous) are favorable to *Armadillidium vulgare* which is relatively well adapted to dryness. Curiously, though *A. Vulgare* is the main species in this site, we observed an unexplained very high abundance of another species: *Philoscia muscorum* in May, which is absolutely not adapted to dry conditions. This passing phenomenon was not correlated to variation of climatic conditions.

Hand-sorting and Berlese extraction of fauna in very high contaminated area (Auby)

The berlese-extracted fauna of metalliferous grassland in Auby is presented in table 3. We found no Isopoda or Diplopoda and only young or larvae of chilopods (Geophilids: rarely, Lithobiidae: exceptionally) were sampled by this method. On the contrary, Symphyla are relatively numerous. In fact, young or immatures were sampled by this technique whereas adults or sub-adults of myriapods were preferentially sampled by pitfall-trapping even during the same period.

Myriapoda species pattern

1. Diplopoda

Species spectrum

Altogether 11 diplopod species (compared to about 280 in France) were found during the different periods in the various sites studied (Tables 4 and 5). Only 9 occurred in contaminated sites, whereas 11 were found in the pitfall traps of control sites (IV, V, Nomain 1, 2). *Cylindroiulus londinensis* was the only species present in contaminated sites (IA) but absent in controls. One site presented, with 8 species, the highest species occurrence (uncontaminated Nomain 2): followed by a contaminated site (III, Table 4) with 7 species.

Dominance structure

Two diplopod species appeared to be eudominant (Table 6) in their sampling sites: *Polydesmus angustus* (IA, IB, IC, V: control, N1), *Anaploiulus pusillus* (II, IV: control). The only site where no eudominant species occurred was site III. In fact, no dominant species can be correlated with heavy metal levels since they were also found as dominant in control area (IV & V).

Abundance

The highest abundance was found in site II and was due to only one species (*A. pusillus*). Overall, the animals in the contaminated area were not numerous. It should be noted that the total amount of individuals recorded in Nomain traps (control: Nomain 1) for one month (132) was quite twice higher than the ten-month amount of IB (71), presenting approximately the same vegetation type (poplar woodland) but heavily contaminated.

2. Chilopoda

Species spectrum

Only 6 chilopod species (about 100 occur in France) were found on the various sites investigated (Tables 4 and 5). The highest occurrence (5 different species) was found in one of the contaminated sites (IB).

Dominance structure and abundance

One site presented absolutely no chilopod, the soil extremely pebbly being probably unpropitious to chilopods. The sites of Beautor presenting approximately the same type of soil are also very poor in chilopod fauna confirming this hypothesis. Accordingly, dominance structure will only be drawn for IA and IB. In these sites the eudominant species was a geophilomorph, *Schendyla nemorensis*.

Correlations

No correlation (Spearman rank correlation) was found between the number of myriapod individuals and the heavy metal levels found in low contaminated soils whatever the heavy metal extraction method used: nitric acid, calcium chloride or ammonium acetate extractable (data not shown). No correlation could be established between organic matter level and Myriapod abundance data.

Discussion

The first point to be discuss is the choice of the sampling method and period. Although pitfall-trapping is very efficient in determining predator invertebrate activity, e.g. chilopods, arachnids, Coleoptera (Uetz & Unzicker, 1976) because of their high mobility, it seems to be also efficient to know about saprophagous: two high mobility period have been observed for millipedes (saprophagous) and many isopods have been sampled by this method. Their activity is more or less supposed to be close to the decomposition process (Thiele, 1977 ; Branquart & Gaspar, 1996) and pitfall sampling, when realised on the total annual cycle or at least in high activity seasons, is efficient to have a good idea of density or richness of saprophagous (Branquart & Gaspar 1996). Moreover, it's interesting to note that pitfall traps method preferentially samples adults or subadults animals whereas berlese extraction seems to be more efficient for sampling larvae or immature invertebrates: in fact we found no adults in our berlese extracted samples of October (most likely after reproduction) but only immature individuals. In pitfall-traps even at the same period, we found adults or sub-adults of chilopoda.

The ability to determine whether or not a genus or a species is characteristic of a metal-free or a metal contaminated area is also to be discussed. It can be pointed out first that millipedes and isopods were absent from traps of the most polluted site (a metalliferous grassland).

Concerning millipedes, Hopkin et al. (1985) showed that most of the species were absent in heavy-metals contaminated woodlands, at odds with Read & Martin data (1990). These authors found no correlation between either the number of species recorded or the number of individuals collected, and the level of metal contamination. In the vicinity of heavy-metal

contaminated fields receiving chemical pesticides (IA, on the edge of a cultivated field), the number of millipede species recorded is low, and it is quite similar to the number found in the most contaminated site (excepted those on metalliferous grassland). Chemical treatment seems to have as toxic impact as heavy metals. Nevertheless, other factors must be taken in account, the comparable-site Nomain 2, uncontaminated site, showing a good diversity and a number of catches only a bit lower to that recorded during the same period in the uncontaminated poplar woodland (Table 5). In addition, uncontaminated sites may present also a low number of individuals collected. Such factors as disposable organic matter and soil structure (porosity) may play an important role in species abundance, as previously pointed out by Klinger (1992).

Despite the rather low number of individuals collected, the geophilomorph *S. nemorensis* is the prominent species in IA. The occurrence of this species can be explained by its euedaphic way of life: it's more difficult to chemical pesticides to reach these kind of animals. At the opposite, hemi-edaphic species such as lithobiomorphs, are more easily reached by these chemicals. Their cuticle, poorly protected by wax (Rosenberg & Bär, 1981) provide a less efficient protection than those of insects. The sensibility of lithobiomorphs to chemical pesticides was earlier pointed out by Anglade (1969).

Concerning very high contaminated areas (Auby), *L. pilicornis* was the only lithobiomorph collected in the traps of the metalliferous grassland. Nevertheless, it is not possible to correlate this fact to the level of heavy metals in soil or in litter: in another metalliferous grassland located in Flines-les-Mortagne with the same type of vegetation and presenting high heavy metal concentrations [from 6 to 76 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Cd), 90 to 3900 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Pb), 1010 to 8100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Zn), data from Descamps et al. 1996], the dominant species was *L. forficatus* (unpublished).

Effect of heavy metals on undecomposition of organic litter, as a result of the harmful effects of metals on microbes and/or soil inhabiting fauna is well documented (Bååth, 1989). Soil invertebrate activity (mesofauna) is necessary to stimulate the « dormant microflora » (Lavelle & Gilot, 1994). Microbial communities are both numerous and diverse in normal soil but they are largely dormant. Their inability to move in the compact soil environment limits their activity to the immediate microsite in which they reside. They are dependant on larger organisms, roots and soil fauna for access to new substrates. Saprophagous arthropoda such as millipedes or isopods ingest litter at different stage of decomposition and microbial communities are then modified in faecal pellets as a result of digestion, compaction, and fragmentation of the litter material (Hanlon, 1981 ; Hassal et al., 1987). It is interesting to notice that in our higher contaminated area (Auby) (where 10 cm of undecomposed litter can be observed) no Isopoda, Diplopoda, Mollusca or Oligocheta have been found, though they

have been found at the same period in uncontaminated or less contaminated areas. Heavy metal contents in these soils or in plants (which are accumulator of heavy metals) seems to have reach threshold values. Hopkin & Hames (1994) observed that isopods (*Porcellio scaber*) were absent from sites where zinc concentration in surface litter exceed 5 000 $\mu\text{g.g}^{-1}$ supporting the hypothesis that zinc, among other heavy metals, was the most toxic element. Moreover, Beyer & Anderson (1985) observed that 1 500 $\mu\text{g.g}^{-1}$ of zinc in leaf litter were sufficient to cause significant mortality in *Porcellio scaber* whereas the same effects were not observed with cadmium or lead unless the concentration exceeded 500 and 12 000 $\mu\text{g.g}^{-1}$ respectively. In our case, except in Auby where litter reach 30 000 $\mu\text{g.g}^{-1}$ of zinc, 300 $\mu\text{g.g}^{-1}$ of cadmium, and 5 000 $\mu\text{g.g}^{-1}$ of lead, levels of metals are compatible with survival. On the other hand in Auby, zinc is most likely responsible of the absence of isopods. In addition, in these type of soils, only metallophyte and/or accumulator plants are able to survive, leading to litter with very high heavy metals levels. Such litters are of course toxic for phytophagous or saprophagous invertebrates and only very well adapted invertebrates are able to survive. We only found decomposers such as collembola but no larger saprophagous or phytophagous animals, their lack probably resulting in the accumulation of litter. Collembola are present in high number in many soils. Their susceptibility towards heavy metals is well documented since they are candidate for toxicity tests. Rabitsch (1995) observed very high metal values in collembola from contaminated fields but no information was given about their density. It has been suggested by Hopkin (1989) that this thick layer could provides a stable habitat for collembola or mites explaining the high population densities he found in contaminated areas.

In short, depending on heavy metals soil burdens, the type of vegetation is modified (leading to metalliferous grassland) and then the invertebrate community and within it, saprophagous species are the most affected by this pollution.

Acknowledgements

The authors would like to thanks Drs J.P. Mauriès and J.-J. Geoffroy , both from « Muséum National d'Histoire Naturelle » for valuable discussions about myriapod ecology. This work was supported by funds from PRC « Environnement et activités humaines: Etude d'un secteur pollué par les métaux » from Conseil Régional: Nord-Pas-de-Calais.

References

- AFNOR, (1994) Recueil de normes françaises 1994 - Qualité des sols. AFNOR publications, Paris.
- Anglade, P. (1969) Etude de populations de Symphyles en sols cultivés; In: Muséum National d'Histoire Naturelle (ed), Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle. 1^{er} congrès international de Myriapodologie, **41**, 15-16.
- Bååth, F. (1989) Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). Water, Air, and Soil Pollution. **47**, 335-379.
- Beyer, W.N., Anderson, A. (1985) Toxicity to woodlice of zinc and lead oxides added to soil litter. *Ambio* **14**, 173-174.
- Branquart E., Gaspar, C. (1996) Etude comparative des techniques d'échantillonnage des macroarthropodes saprophages (Isopoda & Diplopoda); In: J.J. Geoffroy, J.P. Mauries, and M., Nguyen Duy-Jacquemin (eds), Acta Myriapodologica. Memoires du Museum. National d'Histoire Naturelle **196**, Paris.
- Brölemann, H.W. (1930) Eléments d'une faune des Myriapodes de France - Chilopodes. Imprimerie Toulousaine, Toulouse.
- Brölemann, H.W. (1935) Faune de France - Myriapodes Diplopodes. P. Lechevalier, Paris,.
- Descamps, M., Fabre, M.C., Grelle, C., Gerard, S. (1996) Cadmium and lead kinetics during experimental contamination and decontamination of the centipedes *Lithobius forficatus* L. Archives of Environment Contamination and Toxicology. **31**, 350-353.
- Demange, J.M. (1981) Les mille-pattes - Myriapodes, généralités, morphologie, écologie, éthologie; Détermination des espèces de France. S^{te} nouvelle des éditions Boubée, Paris.
- Drobne, D. (1997) Terrestrial Isopods - A good choice for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment. Environmental Toxicology and Chemistry **16**, 1159-1164.
- HACH, (1989) DR/2000 Spectrophotometer Handbook. HACH Compagny. Loveland, Colorado.
- Hanlon, R.D.G. (1981) Some factors influencing microbial growth on soil animal faeces. II. Bacterial and fungal growth on soil faeces. *Pedobiologia* **21**, 264-270.
- Hassall, L., Turner, J.G. and Rands, M.R.W. (1987) Effects of terrestrial isopods on the decomposition of woodland leaf litter. *Oecologia* **72**, 597-604.
- Hopkin, S.P. (1989) Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. Pollution Monitoring Series. Elsevier applied science, London and New york.

- Hopkin, S.P., Hames, C.A.C. (1994) Zinc, among a « cocktail » of metal pollutants is responsible for the absence of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* from the vicinity of a primary smelting works. *Ecotoxicology* **2**, 68-78.
- Hopkin, S.P., Watson, K., Martin, M.H. and Mould, M.L. (1985) The assimilation of heavy metals by *Lithobius variegatus* and *Glomeris marginata* (Chilopoda, Diplopoda). *Bijdragen tot de Dierkunde* **55**, 88-94
- Klinger, K. (1992) Diplopods and Chilopods of conventional and alternative (Biodynamic) fields in Hesse (FRG). In: Meyer, E., Thaler, K. & Schedl, W. (ed) *Advances in Myriapodology. Proceedings of the 8th International congress of Myriapodology. Berichte des naturwissenschaftlich-Medizinischen Vereins in Innsbruck, Suppl. 10.* Innsbruck.
- Kölher, H.R., Hüttenrauch, K., Berkus, M., Gräff, S. and Alberti, G. (1996) Cellular hepatopancreatic reaction in *Porcellio scaber* (Isopoda) as biomarkers for the evaluation of heavy metal toxicity in soil. *Applied Soil Ecology* **3**, 1-15.
- Lavelle, P., and Gilot, C. (1994) Priming effects of macroorganisms on microflora: A key process of soil function ? In: Ritz, K., Dighton, J. and Giller, K. (ed) *Beyond the biomass.* Wiley-Sayce, Chichester, UK.
- Perrier, R. (1964) *Faune de France illustrée. Arachnides & Crustacés.* Librairie Delagrave, Paris.
- Rabitsch, W.B. (1995) Metal accumulation in arthropods near a lead/zinc smelter in Arnoldstein, Austria, I. *Environmental Pollution* **90**, 221-237.
- Read, H.J., and Martin, M.H. (1990) A study of myriapod communities in woodlands contaminated with heavy metals. In: A. Minelli (ed), *Proceedings of the 7th International congress of Myriapodology.* Brill, Leiden.
- Rosenberg, J., Bär, E. (1981) Coxalorgane bei Chilopoden: Feinstruktur und Ionen-Transport. *Verhandlungen der Deutschen zoologischen Gesellschaft.* p. 263. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Scaps, P., Grelle, C. and Descamps, M. (1997) Cadmium and lead accumulation in earthworm *Eisenia fetida* (Sav.) and its impact on cholinesterase and metabolic pathway enzyme activity. *Comparative Biochemistry and Physiology* **116C**, 233-238.
- Schubart, O. (1934) *Die Tierwelt Deutschlands. Tausendfüßler oder Myriapod - I: Diplopoda.* Verlag von Gustav Fischer, Jena.
- Thiele, H.U. (1977) *Carabids beetles in their environments.* Springer-Verlag, Berlin.
- Trojan, C.L. (1978) Forest leaf litter decomposition in the vicinity of a zinc smelter. *Oecologia* **32**, 203-212.

Uetz, G.W. and Unzicker J.D. (1976) Pitfall trapping in ecological studies of wandering spiders. *Journal of Arachnology* **3**, 101-111.

Vandel, A. (1962) *Faune de France; Isopodes terrestres*. P. Lechevalier, Paris.

Table 1. Sites and soils characteristics

Sample site	Vegetation	OM (%)	CaCO ₃ (%)	pH	Cd ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt)	Pb ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt)	Cu ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt)	Zn ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry wt)
IA	border of field	2	0.7	7.3	13	538	31	973
IB	poplar woodland	11.6	0.3	7.3	89	4204	137	5581
IC	old ballast wooded with robinias	7.1	<0.1	7.5	29	1509	117	920
II	scrub on river sediment dredging	1.9	4	7.6	<0.5	513	19	463
III	coppice on stream banks	8.2	<0.1	6.6	24	687	31	1242
Auby 1 & 2 (A ₀ F horizon)	metalliferous grassland	48	-	6.5	149	2995	-	19690
IV & V (controls)	shrub and grassland	4	0.3	7.4	<0.1	<0.5	21	99
Domain 1 (control)	poplar woodland	3.5	<0.1	6.7	<0.1	<0.5	11	94
Domain 2 (control)	border of field	3.5	<0.1	6.7	<0.1	<0.5	-	161
Beautor	bushes on old ballast	1.5	-	6.5	<0.1	<0.5	23	132

OM = organic matter, levels of Cd, Pb, Cu or Zn are the nitric acid extractable metal contents

Table 2. Dominance class of isopod species sampled by pitfall traps in contaminated and control areas (June, July, August 1995)

Sites	IA	IB	IC	II	III	IV (control)	V (control)
<i>Ligidium hypnorum</i>	0	0	0	0	> 40%	0	0
<i>Philoscia muscorum</i>	0	0	0	> 40%	<10%	0	<10%
<i>Oniscus asellus</i>	> 40%	20-40%	<10%	0	10-20%	0	<10%
<i>Porcellio scaber</i>	<10%	> 40%	> 40%	0	0	> 40%	> 40%
<i>Armadillidium vulgare</i>	10-20%	<10%	<10%	> 40%	0	0	0

Table 3. Density of major invertebrate groups (number of individuals. m⁻²) extracted from undecomposed litter of very high contaminated area (Auby) in November 1994.

Myriapoda	Lithobiids (larvae & immatures)	12
	Scolopendrids (youngs)	12
	geophilids (youngs)	20
	Symphylids (youngs)	528
Arachnida	Acarii	5 600
	Araneids	56
Insecta	Collembola	1100
	Coleoptera (Staphylinids)	20
	Ants	10

Table 4. Myriapod species found in traps during the first period of sampling (February 1995 - November 1995)

Site	IA	IB	IC	II	III	IV (control)	V (control)	Total
Diplopoda								
<i>Polydesmus angustus</i>	42	60	108	0	46	28	125	409
<i>Polydesmus inconstans</i>	0	0	0	30	0	0	17	47
<i>Nanogona polydesmoides</i>	2	1	7	0	1	11	0	22
<i>Melogona gallicum</i>	0	8	35	0	7	0	0	50
<i>Anoploiulus pusillus</i>	10	0	0	1110	82	110	1	1313
<i>Proteroiulus fuscus</i>	3	0	14	1	5	2	0	25
<i>Cylindroiulus londinensis</i>	2	0	0	0	0	0	0	2
<i>Cylindroiulus punctatus</i>	0	0	3	0	4	2	0	9
<i>Cylindroiulus caeruleocinctus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Tachypodoiulus niger</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Leptoiulus belgicus</i>	0	0	0	1	52	1	0	54
<i>Leptoiulus kervillei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
larvae & immatures	6	2	16	6	24	44	47	145
species n°	5	3	5	4	7	6	3	9
total diplopods	65	71	183	1148	221	198	190	2076
Chilopoda								
<i>Lithobius forficatus</i>	1	0	0	3	0	2	5	11
<i>Lithobius crassipes</i>	4	4	0	4	0	0	0	12
<i>Lithobius pilicornis</i>	0	1	0	0	1	0	0	2
<i>Cryptops hortensis</i>	0	2	0	0	0	0	0	2
<i>Necrophloeophagus flavus</i>	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Schendyla nemorensis</i>	15	7	0	1	2	0	1	26
larvae & immatures	0	0	0	1	1	0	1	3
species n°	3	5	0	4	3	1	2	6
total chilopods	20	15	0	9	4	2	7	57

Table 5. Myriapod species found in traps during the second period of catches (June 1996 or mid-July-August or October 1996)

Site	Auby 1	Auby 2	Nomain 1	Nomain 2	Beautor 1	Beautor 2
Diplopoda						
<i>Polydesmus angustus</i>	0	0	69	22	5	2
<i>Polydesmus inconstans</i>	0	0	25	26	0	0
<i>Nanogona polydesmoides</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Melogona gallicum</i>	0	0	5	2	0	0
<i>Anoploiulus pusillus</i>	0	0	7	8	1	0
<i>Proteroiulus fuscus</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Cylindroiulus londinensis</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Cylindroiulus punctatus</i>	0	0	0	5	0	0
<i>Cylindroiulus caeruleocinctus</i>	0	0	0	1	6	3
<i>Tachypodoiulus niger</i>	0	0	0	3	0	0
<i>Leptoiulus belgicus</i>	0	0	7	2	1	3
<i>Leptoiulus kervillei</i>	0	0	1	0	0	0
larvae & immatures	0	0	18	50	0	0
<i>species n°</i>	0	0	6	8	4	3
total diplopods	0	0	132	119	13	8
Chilopoda						
<i>Lithobius forficatus</i>	0	0	4	7	1	0
<i>Lithobius crassipes</i>	0	0	0	1	1	0
<i>Lithobius pilicornis</i>	2	8	0	0	0	0
<i>Lithobius piceus</i>	0	0	0	0	2	0
<i>Cryptops hortensis</i>	0	0	0	1	0	0
<i>Necrophloeophagus flavus</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Schendyla nemorensis</i>	0	0	0	0	0	0
larvae & immatures	0	0	0	0	0	0
<i>species n°</i>	1	1	1	3	3	0
total chilopods	2	8	4	9	4	0

Table 6. Dominance status of myriapods in their sampling sites
(animals are named with their genus and species initials)

Site	IA	IB	IC	II	III	IV	V	N1	N2	Auby 1	Auby 2	Beautor 1	Beautor 2
Diplopoda													
Dominance class													
Eudominant (> 40%)	64.6% Pa	84.5% Pa	59% Pa	96.7% Ap		55.5% Ap	65.8% Pa	52.3% Pa					
Dominant (20 - 40%)					37.1% Ap				21.8% Pi				
					23.5% Lb								
					20.8% Pa								
Subdominant (10 - 20%)	15.3% Ap	11.2% Mg	19.1% Mg			14.1% Pa		18.9% Pi	18.4% Pa				
Recedent (<10%)	4.6% Pf	1.4% Np	7.6% Pf	2.6% Pi	3.1% Mg	5.5% Np	8.9% Pi	5.3% Ap	6.7% Ap				
	3.1% Np		3.8% Np	0.08% Pf	2.2% Pf	1% Pf	0.5% Ap	5.3% Lb	4.2% Cp				
	3.1% Cl		1.6% Cp	0.08% Lb	1.8% Cp	1% Cp		3.8% Mg	2.5% Tn				
					0.4% Np	0.5% Mg	0.5% Lb		0.8% Lk	1.7% Mg			
									1.7% Lb				
									0.8% Cc				
total diplopods	65	71	183	148	221	198	190	132	119	0	0	0	8
Chilopoda													
Eudominant (> 40%)	75% Sn	46.6% Sn											
Dominant (20 - 40%)	20% Lc	26.6% Lc											
Subdominant (10 - 20%)		13.3% Ch											
Recedent (<10%)	5% Lf	6.6% Lp											
		6.6% Nf											
total chilopods	20	15	0	9	4	2	7	4	9	2	8	0	0

Chapitre III

Chapitre III : Mise en oeuvre d'outils de diagnostic sur deux modèles d'invertébrés

Un des objectifs majeurs du PRC est de déboucher sur des applications pratiques, en particulier de mettre en oeuvre différents outils de diagnostic tels que les tests d'évaluation de la biodisponibilité des métaux, et des biomarqueurs de diagnostic d'intoxication transposables à d'autres secteurs pollués. Dans ce cadre, nous avons choisi deux modèles d'invertébrés intervenant à des niveaux trophiques différents et ayant chacun des stratégies et des comportements radicalement opposés vis-à-vis des métaux lourds.

Le premier est un Myriapode Chilopode, *Lithobius forficatus* L., prédateur d'autres invertébrés, que l'on trouve non seulement dans les zones faiblement contaminées mais aussi au niveau de pelouses métallicoles (Mortagne du Nord). Chez cette espèce qui, a priori, ne semble pas très affectée par la présence d'une grande concentration de métaux lourds, nous avons abordé l'étude des cinétiques d'accumulation et de décontamination mises en oeuvre par l'animal. Nous avons ensuite cherché à observer les effets délétères engendrés par les métaux au niveau de certains organes de détoxification tels que l'intestin et l'organe athrocytaire (Annexe 3). A cette occasion, nous avons pu développer une méthodologie simple, rapide et relativement peu coûteuse, de mise en évidence des métaux dans les tissus de l'animal : l'autométallographie.

Le deuxième modèle biologique choisi est un Oligochète : *Eisenia fetida typica*. L'importance bien connue des oligochètes dans la structuration des sols et la place qu'ils occupent dans la chaîne alimentaire justifient un tel choix, choix renforcé par le fait qu'*Eisenia fetida* est recommandée par l'OECD (1984) comme organisme-test de toxicité. En tant que géophages, les Oligochètes sont particulièrement exposés aux polluants du sol. Ils sont non seulement en contact perpétuel avec ces toxiques via le tégument, mais ils les ingèrent également de façon continue. L'intérêt des Oligochètes en tant qu'indicateurs de contamination est renforcé par le fait qu'ils ne migrent pas sur de très longues distances et qu'ils sont ubiquistes. Nous avons donc étudié les dynamiques d'accumulation des métaux à partir de sols pollués artificiellement et de prélèvements de sols opérés dans chacune de nos stations de terrain.

C'est aussi à l'aide de ce modèle Oligochète que nous avons abordé la notion de métaux biodisponibles. Le développement de techniques renseignant davantage sur les

métaux réellement assimilables par les plantes ou les animaux que sur leur simple présence dans le sol, est en effet d'une importance extrême. Nous avons également cherché à visualiser les effets de ces métaux sur certaines des enzymes de détoxification abondantes chez les Oligochètes (Glutathion-S-transférases). Enfin, nous avons appliqué à *E. fetida* la technique d'autométallographie développée préalablement sur le modèle *L. forficatus* afin de la valider.

Le modèle arthropode : *Lithobius forficatus* (Myriapode, Chilopode)

M. Descamps, M.C. Fabre, C. Grelle, S. Gérard : Cadmium and lead kinetics during experimental contamination and decontamination of the centipede *Lithobius forficatus* L. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31, 350-353 (1996).

F. Vandebulcke, C. Grelle, M.C. Fabre and M. Descamps : Implication of the midgut of the centipede *Lithobius forficatus* in heavy metals detoxification process. Journal of Ecotoxicology and Environmental Safety (sous presse).

L'étude du modèle Myriapode *Lithobius forficatus* se justifie dans la mesure où c'est un animal ubiquiste présent à la fois dans les zones extrêmement polluées comme dans les zones témoins. De plus, son statut de prédateur donne des indications sur les transferts de polluants dans les chaînes alimentaires.

Dans un premier temps, les cinétiques d'accumulation et d'excrétion du cadmium et du plomb ont été étudiées. Les animaux prélevés dans un site extrêmement contaminé (la pelouse métallicole de Mortagne du Nord) montrent une excrétion active du cadmium et ceci lorsqu'ils sont nourris avec des proies non contaminées mais également lorsqu'ils continuent d'ingérer du métal (après une brève période de stockage). De la même façon, les animaux nourris expérimentalement avec des proies chargées en plomb excrètent activement le métal toxique après une période d'environ une semaine d'accumulation. Un mécanisme efficace de détoxification des métaux présents dans l'environnement est ainsi mis en évidence - les animaux les excrétant activement, vraisemblablement par desquamation des cellules de la barrière intestinale, lieu de stockage privilégié.

Au cours de ces expérimentations, on a pu aussi mettre en évidence le passage, vraisemblablement à travers la cuticule, de métal tel que le plomb ionique contenu dans la terre. Ce phénomène, non pris en compte dans le cas d'intoxications expérimentales (les animaux vivant dans du papier filtre humide) doit absolument être considéré dans le cas d'un raisonnement plus global sur des contaminations *in situ*.

Dans un deuxième temps, l'étude ultrastructurale des cellules de l'intestin (barrière essentielle et lieu de stockage d'une part importante des métaux) d'animaux soumis à une contamination au cadmium et au plomb a été entreprise. De larges vacuoles, ainsi que de nombreux granules concentriques et d'autres à l'aspect spongieux, sont observés au moment où la charge métallique de l'animal atteint son maximum (une semaine à quinze jours). Un

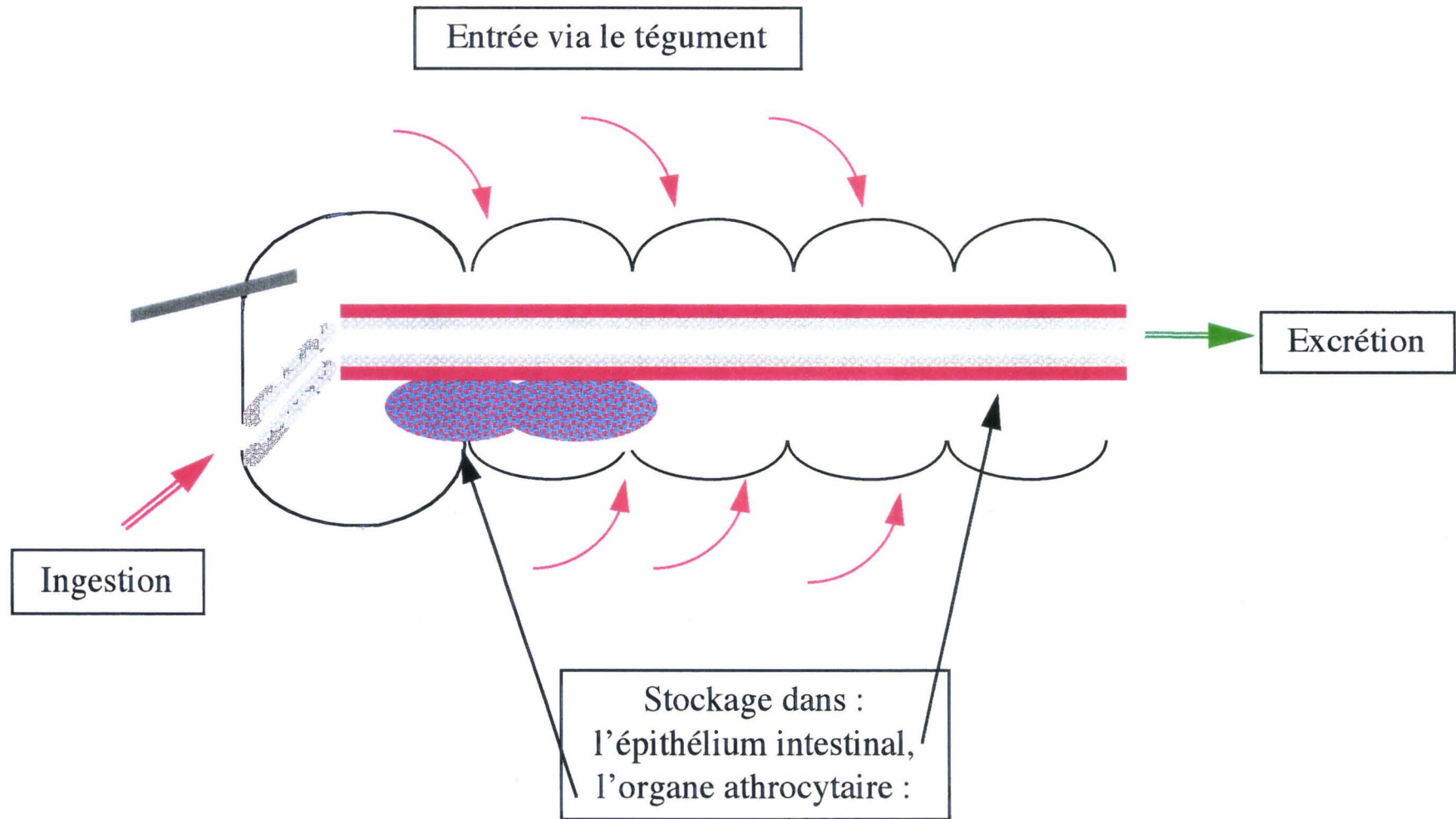


Fig. 19. Principales voies d'entrée, de sortie et lieux de stockage connus des métaux chez *Lithobius forficatus*

retour a une structure “ normale ” est observé après 45 jours d’intoxication, délai correspondant à la détoxification active.

Dans un souci de mise au point d’un outil aisé de diagnostic, la mise en évidence des métaux au sein des tissus par une technique peu coûteuse et facile à mettre en oeuvre a également été entreprise et mise en routine au sein du laboratoire (travaux entrepris par F. Vandebulcke). L’autométallographie s’est montrée particulièrement efficace pour visualiser au niveau cellulaire la présence de métaux tels que le cadmium ou le plomb chez cette espèce. Néanmoins, dans la mesure où *Lithobius forficatus* se montre capable d’une excrétion active des métaux, il est difficile de l’envisager comme modèle pour un outil de diagnostic ou de mesure des métaux biodisponibles. La suite des travaux présentera les résultats obtenus sur un autre animal- test, *Eisenia fetida* (Annélide Oligochète), dont la cinétique d’accumulation des métaux est totalement différente.

La figure 19 récapitule les principales voies d’entrée ou de sortie des métaux chez *Lithobius forficatus* ainsi que les sites de stockage connus.

Cadmium and Lead Kinetics During Experimental Contamination and Decontamination of the Centipede *Lithobius forficatus* L.

M. Descamps, M. C. Fabre, C. Grelle, S. Gerard

Ecophysiologie d'Invertébrés du Sol, Laboratoire de Biologie Animale, Université de Lille I, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Received 23 October 1995/Revised: 20 March 1996

Abstract. Kinetics of cadmium decontamination in *Lithobius forficatus*, performed in autumn experiments showed a decrease in Cd level, from about 30 mg/kg dw at the beginning of the experiment to about 12 mg/kg dw ten weeks later. Kinetics of cadmium contamination in animals showed in a first time a dramatic increase in Cd levels (up to a mean 80 mg/kg dw). Then a regular decrease was observed, although the animals were regularly fed with cadmium contaminated larvae. Difference between animals fed or not with cadmium containing diet ranged from 18 mg/kg dw to only 8 mg/kg dw at the end of the experimental series. Experiments conducted either in autumn or in spring showed comparable aspects in the evolution of level curves, if not the same values. Natural decontamination of lead in animals showed results that were not convincing, depending at least of the dose level present in animals. Therefore, when experimental intoxication was performed, a natural detoxification process took place where Pb levels in animals first increased dramatically and then regularly decreased which was assumed to be evidence of an active excretion. Moreover, animals living in an artificially lead polluted soil and fed with lead-free diet also showed a rapid increase in Pb level followed by a plateau. From these studies, it can be concluded that these centipedes can be contaminated both by food intake and by ion regain through the tegument.

Pollution by heavy metals is one of the main ecological problems of the industrial areas, at least for invertebrates (Hopkin 1989). Northern France was in the past, and is at the present, but to a less extent, a heavy industries area. Numerous plants were closed during the last 20 years and after demolition of furnaces and buildings, the resulting industrial wastelands were rehabilitated. Part of such a wasteland, located in Mortagne du Nord, previously a zinc smelter, was tentatively used as an

experimental area. In addition, around still working plants, soil is heavily contaminated, even if now the amounts of pollutants emitted are considerably reduced.

It has been shown in previous reports (Hopkin *et al.* 1985; Read and Martin 1990) that Chilopods are one of the invertebrate group able to survive in soil contaminated with heavy metals. Some data exist concerning the rate of assimilation of heavy metals by *Lithobius variegatus* (Hopkin and Martin 1984; Hopkin *et al.* 1985) and the kinetics of cadmium in some soil arthropods (Janssen *et al.* 1991), but no information is available about the dynamics of accumulation and detoxification of metals in centipedes.

Materials and Methods

Animals

Mature adults of *Lithobius forficatus* L. were collected from the metaliferous grassland located in Mortagne du Nord. In addition, for a comparison in natural populations, some animals were collected around a zinc smelter located in Evin-Malmaison. Animals not exposed to heavy metals were collected in various sites, particularly in Orchies, Genech and Rumezies, small towns without any metallurgy factories in their vicinity. For some cadmium experimental series, as the level of cadmium varied according to the place of sampling, animals from near-by sites were collected separately (reported as "A" [lawn], "B" [stub], and "C" [mixed poplar-willow-birch woodland] in the corresponding graph).

The centipedes were fed with *Chironomus* larvae bought from a fishing goods supplier and maintained either in metal free water or in water supplemented with 20 mg/L of CdCl₂, 5 mg/L of PbCl₂, or 50 mg/L of PbCl₂. When used for feeding, the Cd and Pb mean level in *Chironomus* larvae was respectively of 150, 23, and 219 mg/kg dw. It should be pointed out that these larvae were not rinsed with deionized water and actually contained at least two fold more metals than those used for analysis. Centipedes were starved 3 days before analysis in order to insure digestion and thus not measure the gut content.

Each point of the decontamination or of the experimental contamination curve resulted from three to five (and sometimes more) animals

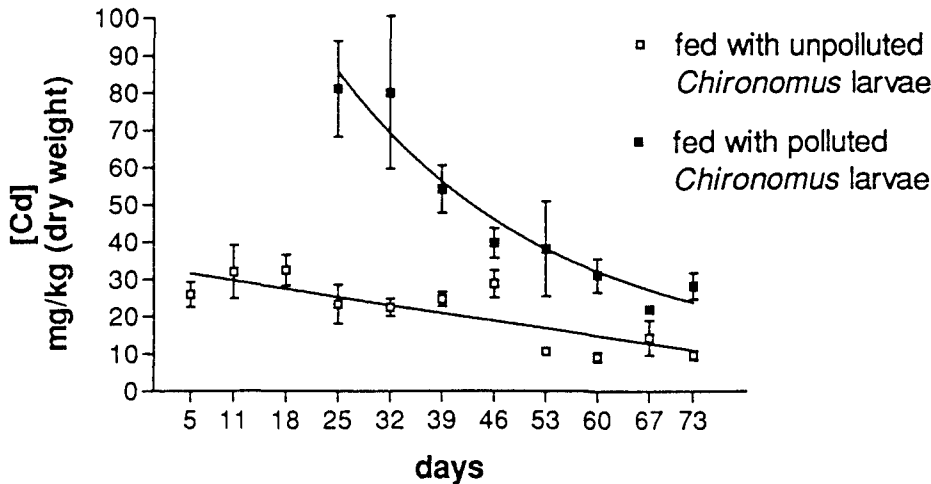


Fig. 1. Accumulation and elimination of cadmium in *Lithobius* during autumn experiments. Open squares: animals fed with metal-free diet; black squares: animals fed with Cd-polluted diet (starting on day 15). Means \pm SEM

analyzed individually. Data were analyzed by using Prism (GraphPad Software Inc.).

Mineralization

Animals were dried at 80°C (12 to 24 h) and weighed. The samples, reduced to powder, were poured into test tubes with 1 ml HNO₃ (Normapur, 65%) and kept overnight at room temperature. Samples were warmed up to 120°C for 2 h. One ml of a mixture of HNO₃-H₂SO₄ (65%)-HClO₄ (65%) (10v/2v/3v; Normapur grade) was added and warmed to 180°C. When half the solution was evaporated, the resulting mixture was diluted to 20 ml with deionized water after filtration.

The digests were analyzed by flame (Cd: Perkin Elmer 2380) or flameless (Cd and Pb: Varian AA 300; Pb: Perkin Elmer 1100) atomic absorption spectrophotometry. Results are expressed hereafter in mg of cadmium per kg of dry weight (mg/kg dw).

Results

The cadmium level in soil of Mortagne ranged from 6 to 76 mg/kg, whereas the mean level in agricultural soil of Northern France was 0.32 mg/kg (data from "Chambre d'Agriculture du Nord," October 1990). As a consequence, animals collected in Mortagne contained more cadmium (5 to 30 mg/kg dw) than those collected in unpolluted sites (for example, 4.2 mg/kg dw for animals collected in St-Amand 8 km southwest of Mortagne or 1.5 mg/kg dw for animals collected in Orchies, 15 km to the west of Mortagne).

Animals fed with an unpolluted diet showed a decrease in the level of Cd, as shown by non linear regression (one phase exponential decay; Figure 1). This indicates the existence of a detoxification process. Animals fed with Cd polluted diet (after 20 days of unpolluted feeding) showed a dramatic increase in the Cd level during two weeks. Then, although animals were still fed with polluted diet, decreased values were recorded, with a rate of elimination far higher than that observed in controls (Figure 1). Some animals of the same series were fed (starting on day 34) with unpolluted diet, and no significant difference in the detoxification rate was found with animals fed with Cd polluted diet (data not shown).

At the end of the experimental series, the values recorded

in the two kinds of animals were close enough (Figure 1); nevertheless, a statistical analysis performed on the last two points of sampling showed that they differ significantly.

In experiments conducted during spring, only experimental contamination was performed after about two weeks of natural detoxification in the laboratory. The same aspect of the curve was observed, as in autumn experiments: a dramatic increase followed by active decontamination (Figure 2a). In this peculiar case, the sample area of animals was recorded, so we were able to demonstrate the variations observed from one animal to another, according to the sample site (Figure 2b).

Concerning the assimilation rate of Cd, we have indirect evidence for a quick elimination or, best, a bad assimilation at the time of feeding. Indeed, based on the mean Cd level of the diet, an animal ingested about 5.5 μ g Cd per week and the maximum level recorded in centipedes a week after the beginning of polluted feeding reached a mean of 80 mg/kg of dry weight (Figure 1), corresponding to about 1.6 μ g of Cd per centipede, *i.e.*, 1 μ g more than at the beginning of the experiment.

Lead level in soil of the Mortagne site reached a mean of 1,900 mg/kg, ranging from 90 to 3,900 mg/kg according to the sample site. Animals collected in the middle of the metalliferous grassland ranged from 10 to 70 mg/kg dw, but when collected near the road, the mean level reached 140 mg/kg dw, demonstrating the influence of lead brought by car fuel. In Evin-Malmaison, samples were measured at 55 and 90 mg/kg dw, in soils respectively containing 1,350 and 1,950 mg/kg of Pb. Note that the level in animals collected in unpolluted sites showed great differences according to the vicinity of roads with more or less traffic. For example, animals collected in St-Amand near a small road in the forest contained only 4 to 5 mg/kg dw whereas the ones collected in Orchies contained up to 49 mg/kg dw of Pb (sample site near a connecting road). Animals from other sites ranged (in the same sample site) from 6 to 20 mg/kg dw.

In animals fed with metal-free diet, the data obtained fit into a model of decontamination (one phase exponential decay) but the size of standard errors was large and from a biological point of view was not convincing (data not shown). In a parallel experimental series, Pb level recorded in animals fed with cadmium polluted diet did not differ from the one of animals fed with metal-free diet (data not shown).

In another experimental series, both natural detoxification

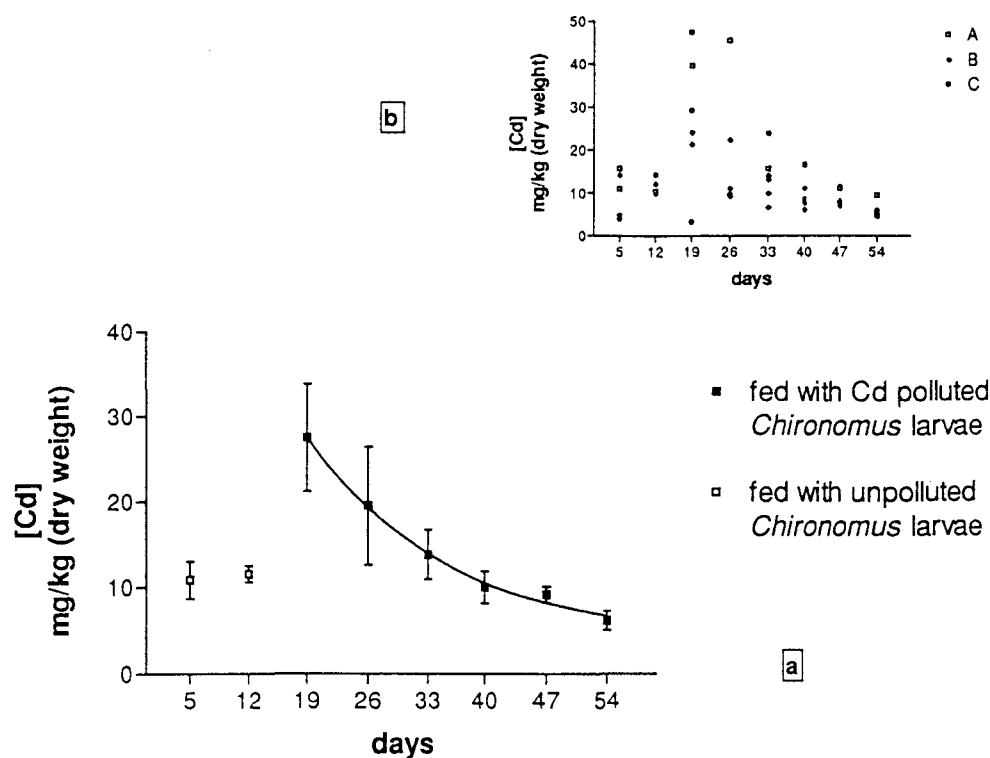


Fig. 2. (a) Accumulation and elimination of cadmium in *Lithobius* during spring experiments. Feeding with Cd-polluted diet starting on day 9. Means \pm SEM. (b) Same animals as in Figure 2a, but with individual values according to the sample site (A, B, C; for details, see text)

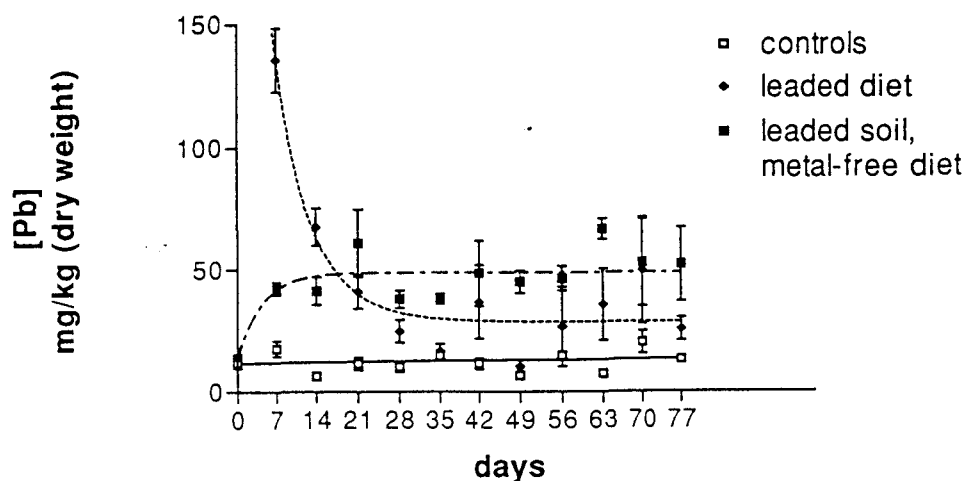


Fig. 3. Accumulation and elimination of lead in *Lithobius*. Open squares: controls fed with Pb-free diet; black diamond: fed (starting day 0) with lead-polluted *Chironomus* larvae; black squares: living in leaded soil, fed with lead-free diet. Mean \pm SEM

and experimental intoxication with Pb were studied. In this case, natural detoxification was clearly observed, from 26.22 ± 10.65 mg/kg dw to 3.77 ± 1.28 mg/kg dw (data not shown). As for cadmium experiments, animals fed with lead polluted diet showed a dramatic increase in the metal level followed by an active excretion leading at the end of the experimental series to levels of lead identical to those found in control animals.

Levels of Pb reached in centipedes after polluted feeding depend on the level of pollution: 38.67 ± 4.87 mg/kg dw (data not shown) was recorded when animals were fed with larvae containing 23 mg/kg dw of Pb and 135.67 ± 12.98 mg/kg dw (Figure 3) in animals fed with larvae containing 219 mg/kg dw. According to the amount of metal ingested by the centipedes, the percentage of retention, or assimilation varied from 30 to 10% when lead level in the diet is low (23 mg/kg dw) or high (219 mg/kg dw), respectively.

In order to show the influence of metal present in the soil, an experimental series where animals were kept in a soil supplemented with 200 mg $PbCl_2$ for 100 g of unpolluted garden soil was conducted. Feeding consisted, as for controls, in metal-free *Chironomus* larvae which were not delivered to animals directly on the soil in order to minimize the amount of metal likely to be ingested, but on a filter paper. As shown (Figure 3, black squares), compared to controls, the level of Pb rapidly increased in the animals living in the leaded soil and then was maintained to a plateau.

Discussion

The first point to be discussed is the ability of *Lithobius* to eliminate cadmium. Indeed, decreasing Cd levels were regis-

tered when animals were supplied with Cd-free diet. This rate of elimination in the autumnal experimental series is about 20 mg/kg dw for ten weeks. It must be noticed that in spring experiments the level of Cd in animals was lower than in fall experiments. This fact may be related to low amounts of metal ingested, consequence of the winter low rate of metabolism and poor feeding.

The second point concerns the dynamics of accumulation: animals reacted rather quickly to Cd supply. Only two points of analysis show high values: during two weeks the animals accumulate more Cd than they can eliminate; next, they eliminate more Cd than they assimilate. As the values recorded at the end of experimental series were quite comparable to those measured at the time of collection, we can consider that the latter are quite equilibrium values for animals when they are in a period of active physiology in metal polluted soil.

The assimilation rate of Cd deduced from our results (about 18%) is somewhat higher than the one (10%) found by Hopkin *et al.* (1985) but it must be kept in mind that the diet was not identical, and that *Chironomus* larvae bring Cd both as compounds linked to the body and as soluble CdCl₂ to be found in the water pellicule surrounding the body.

Concerning lead, the first point to be discussed is the presence of natural detoxification in animals collected in the field. When only low levels of metal were recorded, it was clearly demonstrated that no lead decontamination exist. The situation was different when animals came from a metal polluted area; according to experimental series, the data always fit well into models but, in some cases, the curves obtained are not biologically convincing.

When experimental intoxication was performed, whatever the level in the diet, a natural detoxification process took place, as in cadmium experiments. These results are at odds with those of Hopkin *et al.* (1985), obtained in another lithobiidae, *L. variegatus*, but it must be noted that these authors did not use the same diet, feeding their animals with lobes of digestive glands of woodlice contaminated by heavy metals. Indeed, they did not find any assimilation (or retention) of lead in opposition to that reported here. In addition, in Hopkins experiments, a high level of mortality occurred in series of animals collected in unpolluted areas and fed with polluted diet; such a phenomenon was not observed in our experimental series. These discrepancies could be explained by differences in the experimental design and/or the chemical nature of lead compounds ingested.

The concentration of lead reached in animals fed with lead polluted diet is dose-dependent, a higher level in diet leading to higher levels in animals. In all cases, a rapid process of detoxification took place, comparable to that recorded in cadmium experiments.

When living in polluted soil, with metal-free diet, the enrichment of animals in lead could be most likely related to the lack

of wax in the cuticle of Lithobiidae (Littlewood 1991) that expose animals to transpiration and water (and ion) regain through the integument. As an alternative, coxal glands could also play a role in ion uptake, as demonstrated by Rosenberg and Bär (1981).

In summary, the concentration of heavy metals in *Lithobius* depend mainly on specific mechanisms for excretion, as known in other arthropods (Janssen *et al.* 1991). A regulation process occurs, even for these non essential metals that are lead and cadmium and this finding agrees with those of various authors (Van Straalen *et al.* 1987; Hopkin 1989; Laskowski and Maryanski 1993). The results obtained with Pb point out the role of other factors than Pb concentration in diet or soil to explain the concentration in animals: bioavailability of such ions depends also of their (at least) chemical form, as suggested by differences in the present results and in those of Hopkins and Martin (1984). Similar observations extended to epigeic fauna and generalized to <<environmental factors>> were also made by Laskowski and Maryanski (1993).

Acknowledgments: The present study was supported by grants from the Espace Naturel Régional du Nord—Pas de Calais and the Fondation de France concerning the study of "Pelouse métallicole de Mortagne" and by the Région Nord—Pas de Calais, "Programme de Recherches Concertées: *Evaluation d'un site pollué en vue de sa requalification*". The authors thank Dr. C. Wattez for invaluable help with the English language.

References

- Hopkin SP (1989) Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. Elsevier Applied Science, NY
- Hopkin SP, Martin MH (1984) Assimilation of zinc, cadmium, lead and copper by the centipede *Lithobius variegatus* (Chilopoda). *J Appl Ecol* 21:535-546
- Hopkin SP, Watson K, Martin MH, Mould ML (1985). The assimilation of heavy metals by *Lithobius variegatus* and *Glomeris marginata* (Chilopoda; Diplopoda). *Bijdr Dierk* 55:88-94
- Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch Environ Contam Toxicol* 20:305-312
- Laskowski R, Maryanski M (1993). Heavy metals in epigeic fauna: trophic level and physiological hypotheses. *Bull Environ Contam Toxicol* 50:232-240
- Littlewood H. (1991) The water relations of *Lithobius forficatus* and the role of coxal organs (Myriapoda: Chilopoda). *J Zool* 223: 653-665
- Rosenberg J., Bär E. (1981) Coxalorgane bei Chilopoden: Feinstruktur und Ionen-Transport. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* 263
- Van Straalen NM, Burghouts TBA, Doornhof MJ, Groot GM, Janssen MPM, Joosse ENG, Van Meerendonk JH, Theeuwven JPJJ, Verhoef HA, Zoomer HR (1987) Efficiency of lead and cadmium excretion in populations of *Orchesella cincta* (Collembola) from various contaminated forest soils. *J Appl Ecol* 24:953-968

Implication of the midgut of the centipede *Lithobius forficatus* in heavy metals detoxification process

Franck Vandebulcke, Claire Grelle, Marie-Chantal Fabre and Michel Descamps#

Ecophysiologie d'Invertébrés du Sol, Laboratoire de Biologie Animale, Université de Lille I, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

Summary. Ultrastructural and autometallographic investigations of the midgut of experimentally intoxicated centipedes, *Lithobius forficatus*, have been performed to investigate the functional role of the epithelial cells in the detoxification of heavy metals. Ultrastructural study demonstrated that non-essential metals such as cadmium and lead may cause intracellular changes i.e., appearance of electron-dense granules with a sponge-like aspect and increase of the number and the size of concentrically-structured granules. The autometallographic procedure showed that both type of granules are the main organelles of the midgut to accumulate heavy metals. The permanent storage of metals in granules is a mechanism used by centipedes to reduce the toxic effects of heavy metals assimilated in excess. Consequently, midgut epithelium works as an efficient barrier to prevent excess of certain metals in the internal environment.

Key words: *Lithobius forficatus* midgut, detoxification process, heavy metals, ultrastructural, autometallography.

INTRODUCTION

In soil and leaf litter, chilopods are one of the most effective invertebrate predator group (Wignarah and Phillipson, 1977). Their general biology is well known (Lewis, 1981). It has been shown in previous works (Hopkin et al., 1985; Read and Martin, 1990) that chilopods are one of the invertebrate groups that is common in metal contaminated areas. Considering their position in the food chain, these animals are of great potential importance in transferring metals to higher carnivores. Some papers dealing with metal concentrations in whole chilopods do exist (Beyer et al., 1985b; Van Straalen and Van Wensen, 1986; Gerard et al., 1996; Descamps et al., 1996) and prove that these animals are able to withstand a high metal concentration and have the ability to concentrate different kinds of heavy metal ions. Data exist concerning the kinetics of cadmium in some arthropods (Janssen et al., 1991) and the dynamics of accumulation and detoxification of heavy metals in centipedes (Descamps et al., 1996). In this last study, experimental intoxications of *Lithobius forficatus* showed natural detoxification process in centipedes. In metal polluted areas, two routes of intoxication must be considered. Indeed, it has been demonstrated that these animals can be contaminated both by food intake and by ion regain through the tegument.

Few informations concerning the internal distribution of metals and detoxification mechanisms are available. The only authors to have examined this are Hopkin and Martin (1983; 1984b). Therefore, investigations at the cellular and organelle levels are required to provide a better understanding of metal accumulation and metabolism in centipedes.

Experiments were conducted on adult mature *Lithobius forficatus* specimens, this species being relatively abundant in european temperate regions. For experimental intoxication, animals were exposed to cadmium or lead, two non-essential elements widely distributed through metal polluted areas.

In the present work we focused our attention on the midgut. In Lithobiid, two thirds of the lenght of the digestive tract (a straight tube) is represented by the midgut. Like millipedes, centipedes do not possess large midgut diverticulae in which metals can be stored. The midgut epithelium consists of two kinds of cells. The epithelial cells possess a basal nucleus and are cylindrical and slightly widened at their distal microvillar end. The second cell-type is

endocrine, the cells are scattered between the epithelial cells, they have no microvillar margin and often fail to reach the lumen of the gut (see Minelli, 1993).

Hopkin and Martin (1983) demonstrated that the main site of metal storage in centipedes is the midgut suggesting a possible action of this organ in detoxification and excretory mechanisms. Consequently, the detoxification process observed by Descamps et al. (1996) might, at least partially, take place at the midgut level.

The aim of the present study was (i) to investigate the ability of the epithelial cells of the midgut to work as a barrier, (ii) to explore the intracellular localization of metals after experimental intoxication with cadmium or lead.

Material and methods

Centipedes collection and metal exposure

Mature specimens of *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda) were collected in a non polluted area and acclimated to the experimental conditions for several weeks. During the intoxication experiments, animals were kept at 18-20 °C and exposed to heavy metals. Heavy metals sources used were cadmium chloride (CdCl₂) or lead chloride (PbCl₂) (Merck) and two routes of experimental intoxication were explored: the food and the soil.

Food intoxication:

In the lab, the centipedes were fed with *Chironomus* larvae bought from a fishing goods supplier and maintained either in water containing 80 mg/l of CdCl₂ or 500 mg/l of PbCl₂. When used for feeding, cadmium and lead mean levels in *chironomus* larvea was respectively of 150 and 219 mg/kg dw. Control animals received *Chironomus* larvae maintained in tap water.

Soil intoxication:

This experience was performed in hortical mould added either with 80 mg/kg (dry weight) of CdCl₂ or 500mg/kg (dry weight) of PbCl₂. Control animals were maintained in normal hortical mould and all the animals were fed with normal larvae.

For both routes of intoxication (food and soil), two exposure times to heavy metals were studied i.e., 12 days and 45 days. These intoxication periods were determined from previously

published accumulation-detoxification kinetic curves (Descamps et al., 1996). After exposure, the midgut of each centipedes was excised and treated either for a classical ultrastructural study or for an autometallographic procedure (adapted from Danscher, 1981; Danscher et al., 1987).

Ultrastructural study

The animals were anesthetized with chloroform, tissues of interest were removed and fixed in 3% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer pH 7.4 for 2 h. After a post-fixation in 1% osmium tetroxyde in the same phosphate buffer for 1h, the pieces were dehydrated by acetone and embedded in Epon in the conventional manner (polymerization at 60°C for 48 h). Ultrathin sections (80-90 nm) were cut from the Epon blocks, placed on 200 mesh copper grids, counterstained routinely with uranyl acetate and lead citrate and observed in a JEOL CX 100 electron microscope.

Autometallography

Tissue processing for Epon embedding

The midguts were removed from the anesthetized animals, immediately immersed in a sodium sulphide solution (0.1% Na₂S in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4) for 2 min and fixed with a solution of 3% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4 for 15 min. This was followed by an immersion in the initial sulphide solution for 7 min. Then, the tissue was placed in the glutaraldehyde fluid for 1 h. Finally, the blocks rinsed for 2 x 5 min in 0.1M phosphate buffer, were dehydrated by acetone and embedded in Epon. The polymerization temperature was maintained at 45 °C for 72 h (a higher temperature might have caused the metal sulphides to decompose).

Light microscopy

Semithin sections of 1 mm were placed on glass slides in a small drop of distilled water, dried on a heating plate (45-55 °C for 1 h). The sections were then coated by dipping in a 0.5% gelatin solution and allowed to dry before being developed.

For development, the slides were placed in jars and covered with the physical developer, which was prepared immediately before use (for composition of the developer, see below). The jars were transferred to a water bath kept at 26°C in a dark room. After a development

time of 90 min (determined by preliminary studies), the slides were gently rinsed in running tap water at 40°C for 45 min to remove the protective gelatin coating and to reduce the possible silver fog. Sections were then placed in a 5% sodium thiosulfate solution for 10 min at room temperature, rinsed in distilled water and counterstained with Azur II blue (1%). When dry, the sections were examined with a Zeiss light microscope.

Electron microscopy

Ultrathin sections (80-90 nm thick) were cut directly from the original blocks and placed on parlodion coated 200 mesh nickel grids. For development, the grids were directly placed on freshly prepared physical developer with the sections facing the developer. After a development time of 50-60 min in a dark room at 26°C, the grids were washed in distilled water at least 5 x 5 min in order to remove the protective colloid. Grids were then placed on 5% sodium thiosulfate solution for 5 min at room temperature, rinsed in distilled water (2 x 5 min), counterstained with uranyl acetate and observed in a JEOL CX 100 electron microscope.

Developer

The following stock solutions were made up: 1) 50% solution of gum arabic made up from lumps of crude acacia tree resin; 2) citrate buffer, 25.5g of citric acid 1 H₂O + 23.5g sodium citrate 2H₂O dissolved in deionized water to a final volume of 100 ml; 3) reducing agent, 0.85g hydroquinone dissolved in 15 ml of deionized water; 4) silver ion supply, 0.11g silver lactate dissolved in 15 ml deionized water. All the products were purchased from Sigma. To make the developer, 60 ml of solution 1, 10 ml of solution 2, 15 ml of solution 3, and 15 ml of solution 4 were mixed together immediately before use (Danscher, 1981).

Results

Ultrastructural study

Midgut cells of controls showed no particularities, being comparable to those observed in insects (see Andries, 1982). There was no vacuole in the apical part of the epithelial cells and only scarce concentrically-structured granules were observed (Fig. 1).

When fed with contaminated *chironomus* larvae, large vacuoles appeared in the apical part of digestive cells as soon as the 12th day of intoxication (Fig. 2a; 2b). Inside these vacuoles, numerous concentrically-structured granules and large granules with sponge-like aspect (referred afterwards as sponge-granules) were observed (Fig. 2a; 2b). These large vacuoles result most likely of coalescence process from smaller structures (Fig. 2a). Except a bad tissue conservation in lead contaminated animals, no significative differences could be observed after 45 days of food intoxication (Fig. 3a; 3b).

In animals living in metal contaminated soils, even if the structure was not that of control, cell injuries were not at the level observed in « metal-fed » animals. In 12 days animals, vacuoles appeared in the apical part of the midgut cells. These vacuoles seemed more abundant in cadmium soil living animals (Fig. 2c) than in animals living in lead contaminated soils (Fig. 2d). In 45 days animals, a few concentrically-structured granules and sponge-granules could be seen (Fig. 3c; 3d).

Autometallography

Light microscopy

In semithin sections, the autometallographic staining of metals appeared in the form of a dark reaction product (dark silver deposits) (Fig. 4). This technic showed that metals were essentially present in the apical part of the midgut epithelial cells. The different conditions were compared to control animals which showed only a weak accumulation of reaction product over large clear granules (Fig. 4a).

In 12 days metal fed animals, both in cadmium and lead experiments, load of metal was heavy (Fig. 4b; 4c) and stayed at a high level in 45 days intoxicated animals (Fig. 4d; 4e). More precisely, metals seemed to be packed in granules contained in large vacuoles. It must be noted that the reaction product was less abundant in 45 days lead intoxicated animals and that the height of the epithelium in these conditions was reduced by half (Fig. 4e). This abnormal extent of the epithelium is to correlate with a great fragility observed at the time of the surgical removing of the midguts.

In contaminated soil experiments, control aspects were observed in 12 days animals (data not shown) whereas in 45 days experiments, weak traces of metal could be evidenced in epithelial cells and in the basal lamina (Fig. 4f; 4g). However, no injury was seen at the collagen fibers level.

Electron microscopy

The ultrastructural autometallographic study allows to identify the accumulation sites of heavy metals in cells, this was realized with 12 days food intoxicated animals. At the ultrastructural level, the reaction product were seen to consist of silver grains. These grains were situated almost exclusively over different types of electron dense granules.

In control animals, a few silver grains were observed within very large granules of a size ca. 2-6 μm (Fig. 5a).

In 12 days metal-fed animals, both in cadmium and lead experiments, the ultrastructural staining is similar. Silver grains were mainly detected over sponge-granules (1-3 μm in diameter) and concentrically-structured granules (0.4-1 μm in diameter). The sponge-granules, always stained by silver grains, could be rather irregular in shape and they often contained discreet areas of low density. Moreover, these granules seemed to be not surrounded by a membrane (Fig. 5b; 5c). Like sponge-granules, the concentrically-structured granules stained by autometallography were mainly observed in large vacuoles but, at high magnification, these concentric structures could be seen to be surrounded by a single membrane. It must be noted that the reaction products constituted a concentric layer (Fig. 5d).

Discussion

Autometallography is an autoinduced silver amplification method of certain metal atoms and metal molecules in biological sections by applying basic principles of photography. The principle has been described in detail elsewhere (Danscher, 1981; Danscher et al., 1987). Briefly, autometallography is a revised version of the sulphide silver method introduced by Timm (1958), a procedure allowing to detect the metals that form insoluble sulphides. Among these are toxic metals such as cadmium and lead (see Danscher, 1981; Danscher et al., 1987). In fact, under normal circumstances, most metals present in the tissue are precipitated as their sulphides following immersion in a sodium sulphide solution (Danscher and Schroder, 1979). As a result, autometallography is not metal specific. Nevertheless, among histological procedures, this technic is the most sensitive and effective method allowing to visualize metals in biological sections (Cajaraville, 1995, Soto-marigomez). Moreover, in the case of an experimental intoxication, the differences observed between contaminated and uncontaminated animals are due to the studied metal. Consequently, this technic is appropriate to study the metal accumulation and metabolism in centipedes midgut during an experimental intoxication with cadmium or lead. Further studies using more sophisticated analytical technics such as X-ray microanalysis will be necessary to precise the exact metal containing of the granules in animals living in natural polluted areas.

A conventional ultrastructural study was realized because the autometallographic procedure does not allow to explore simultaneously the intracellular distribution of toxic metals and the cell injuries caused by these metals. Indeed, the initial treatment with sodium sulphur and the exposure to the physical developer induced a serious damage in the morphology of the tissue.

An other methodological point to be discussed is the low autometallographic staining observed in control animals. Indeed, although the technic used is not metal specific, the reaction product is particularly rare both at the optical and ultrastructural levels. This reveal a very low basic metal concentration. Essential metals such as zinc, manganese, magnesium can also be detected by autometallography but a longer development period is required. Consequently, in this study, only the major metal accumulation sites (potentially the detoxification structures) are evidenced.

The morphology of the digestive system in centipedes is comparable to that of millipedes. The digestive tract is a simple tube and two thirds of its length is represented by the midgut. In 1983, Hopkin and Martin demonstrated that the main site of metal storage is the midgut, suggesting a possible action of this organ in detoxification and excretory mechanisms. Taking into account the literature, the midgut seems to be the most important regulatory organ for metals in centipedes (see Hopkin, 1989).

Active transport systems for non-essential metals are unknown and cadmium or lead are usually excluded from membrane passage. However, under heavy metal conditions, there is no doubt that these metals enter the epithelial cells. This is obvious when animals are fed with cadmium or lead contaminated larvae (see Results). Presence of metal occurred in granules located in large vacuoles, the latter being only observed in heavily intoxicated animals. These vacuoles are more developed and more abundant in food intoxicated animals than in soil intoxicated animals.

In millipedes, resorption of metal ions takes place in the midgut, i.e. an experimental intoxication study showed that cadmium and lead are predominantly stored in the midgut epithelial cells (Köhler et al., 1995). These authors demonstrated also that concentrically-structured granules (called spherites) are the main accumulation sites. No vacuole was evidenced.

As mentioned above, it was demonstrated that a natural detoxification process takes place in chilopods (Descamps et al., 1996). Like diplopods (Köhler et al., 1995), chilopods should possess effective mechanisms to bind and to detoxify toxic metals in the midgut epithelium in order to prevent these toxicants from being distributed throughout the whole body. The ability of these animals to bind and to store heavy metals in granules might be the cellular expression of a detoxification process. In fact, when charged, the granules might be voided into the lumen of the gut and expelled in the faeces. In some animals, metal-containing granules (heavily stained by autometallography) were observed into the lumen of digestive tract (data not shown). It must be noted that our study probably underestimate the number of granules in the faeces, the animals being starved 3 days before analysis in order to void the gut content. Moreover, the load of cadmium and the ultrastructural features of the midgut cells seemed comparable after 12 and 45 days of food intoxication while animals were still fed with cadmium contaminated food. These observations also support the existence of a detoxification process in these cells.

In opposition to that reported here, Hopkin et al. (1985) did not find any assimilation (or retention) of lead by an other Lithobiidae, *L. variegatus*. It must be noted that these authors did not use the same diet, feeding their animals with lobes of digestive glands of woodlice contaminated by heavy metals. In addition, in Hopkins experiments, a high level of mortality occurred in series of animals collected in unpolluted areas and fed with polluted diet. Such a phenomenon was not observed in our experimental series (no mortality at all). These discrepancies could be explained by differences in the experimental design and/or the chemical nature of metal compounds ingested. However, when animals are fed 45 days with a lead contaminated diet, the morphology of the midgut is quite different, i.e. the height of the epithelium is reduced by half and the tissue is strongly damaged. This is certainly due to poisoning of the cells by an excess of lead. The life expectancy of the animals in these conditions was not explored.

In 1996, Descamps et al. demonstrated that centipedes can also be contaminated by ion regain through the tegument. In our experimental series of soil intoxicated animals, control aspects were observed in 12 days animals whereas in 45 days experiments, a few large vacuoles containing small metal granules were evidenced. This suggest that the same detoxification process takes place in these conditions but to a lesser extent, the metal load being lower.

Concerning soil intoxication, the main point to be discussed is the presence of cadmium and lead in the midgut of 45 days contaminated animals. This metal accumulation might be due to the entry of metal through the tegument. Indeed, when living in polluted soil, with metal-free diet, the enrichment of animals in cadmium or lead could be most likely related to the lack of wax in the cuticle of Lithobiidae (Littlewood, 1991) that expose animals to transpiration, water and ion regain through the integument. As an alternative, coxal glands could also play a role in ion uptake, as demonstrated by Rosenberg and Bär (1981). Whatever their mode of uptake, heavy metals could be transported via hemolymph.

In 45 days soil intoxicated animals, metals are observed within the basal lamina. This metal accumulation, which is not evidenced in food contaminated animals, cannot be explained at this time.

Different ways of metal uptake in cells have been described i.e., active transports such as endocytose and ATP-dependant enzymes but also passive transport processes such as

diffusion, facilitated diffusion and channel proteins (Dallinger & Cajaraville 1995). All these ways of metal uptake can be considered for centipedes midgut epithelial cells.

After uptake, metals are stored in intracellular granules. Based on the chemical composition and the ultrastructural appearance of granules, Hopkin (1989; 1990) and Hopkin et al. (1989) distinguish three types of intracellular metal containing granules in terrestrial invertebrates. In Lithobiid midgut, metals are packed in two different types of intracellular granules.

Most of the metal-containing granules observed in this study possess a heterogeneous structure. These sponge-granules were not seen in control animals which suggests that they constitute a particular storage detoxification mode. Considering their characteristics, these granules belong to the B type described by Hopkin. From the literature, it appears that they usually consist of electron dense heterogeneous material. They are composed mainly of organic substance and always contain sulphur in association with metals such as cadmium, copper, mercury, zinc, lead and iron. This granule's type usually occurs in cells of the intestine and its appendices: in midgut cells of dipterans and cockroaches, in hepatopancreatic cells of spiders and isopods, in the chloragogenous tissue of earthworms, and in the fat body cells of homopterans (see Hopkin, 1989). Like in the present study, there is a strong evidence for a detoxificative function for type B granules.

Several authors consider that type B granules are composed largely of residues of metallothionein proteins because metals are mainly associated with sulphur (Jeantet et al., 1980; Morgan and Morris, 1982; Hopkin and Martin, 1984a). Furthermore, it was demonstrated that metallothioneins are synthesized within cells in response to the presence of cadmium, copper, mercury, zinc (Simkiss and Mason, 1983). Although the ability of chilopods to synthesize metallothioneins is not known, metallothioneins might constitute an organic part of the sponge-granules. This could explain the absence of type B granules in uncontaminated control animals. In metal conditions, a synthesis of these proteins might be induced.

The second type of metal-containing granules observed in the present study have to be integrated into type A granules described by Hopkin. These granules, concentrically structured, are usually composed of concentric layers of amorphous calcium and magnesium ortho- and pyro-phosphate with a small organic component (Howard et al., 1981; Taylor et al., 1986). They can contain different metals such as zinc, manganese, potassium, lead but cadmium, copper and mercury have not been detected (Mason and Simkiss, 1982; Hopkin,

1989). Type A granules occur, for example, in intestinal cells of collembolans, cockroaches, nematodes and diplopods, in hepatopancreatic cells of spiders and gastropods, and in cells of Malpighian tubules of diptera (see Hopkin, 1989; Köhler et al., 1995).

The only published observations on the distribution of metals in centipedes demonstrated the presence of concentrically-structured granules in the malpighian tubules of *Lithobius forficatus* (Fuller et al., 1966) and *Scolopendra subspinipes* (Wang and Wu, 1948). In the present study, these concentrically-structured granules are clearly able to accumulate potentially toxic metals such as cadmium and lead. Type A granules are not numerous and a major detoxification role seems unlikely. It is more probable that these structures are involved in calcium storage and regulation of intracellular calcium level (Simkiss, 1976a; 1976b; Hopkin, 1989). However, an involvement in a detoxification process cannot be excluded.

The third type of intracellular granules described by Hopkin, called type C, possess a crystalline structure or appear as deposits of flocculent material. Such granules were not seen in our study. Therefore, one must be prudent, type C granules can bear superficial resemblance to sponge-granules. The high iron content of these structures and their ultrastructural appearance led to the suggestion that they are storage sites for ferritin or its breakdown products (Cheung and Marshall, 1973; Taylor and Simkiss, 1984). In our experiments, a possible source of iron is the haemoglobin contained in the *chironomus* larvae but this seems not sufficient to initiate the formation of type C granules. Indeed, no metal containing granules were observed in control animals fed with normal *chironomus* larvae.

In summary, the detoxification process evidenced by Descamps et al. (1996) in chilopods takes place, at least partially, at the midgut level. The midgut epithelial cells are able to accumulate non-essential metals such as cadmium and lead in granules in order to reduce their toxic effects. These elements, when assimilated in excess, can be detoxified by incorporation into type B granules for permanent storage in an insoluble form, as known in other arthropods (see Hopkin, 1989). Then, the granules are voided into the lumen of the gut and expelled in the faeces. This detoxification process seems to be also involved in the case of a soil contamination (through the tegument). Concentrically-structured type A granules are involved in the detoxification process but to a lesser extent.

Acknowledgment: The present study was supported by grant from the Région Nord-Pas de Calais, Programme de Recherches Concertées: « Environnement et Activités Humaines », Etude d'un secteur pollué par les métaux.

FIGURE LEGENDS

Figure 1:

Typical ultrastructural features of the apical part of midgut epithelial cells of mature *L. forficatus* living in non polluted conditions. Numerous large granules and scarce small concentrically-structured granules (arrows) are observed.

Abbreviations: g, granule; mv, microvilli; asterisk, lumen of the gut.

Scale bar: 1 mm.

Figure 2:

Ultrastructural characteristics of midgut epithelial cells of *L. forficatus* after 12 days of experimental intoxication with cadmium or lead.

a. b. Food intoxication by cadmium (a) or lead (b). Large vacuoles are observed in the apical part of the digestive cells. Numerous concentrically-structured granules (arrows) and sponge-granules (arrowheads) are seen in these vacuoles.

c. d. Soil intoxication by cadmium (c) or lead (d). Some small vacuoles are observed in the apical part of the midgut cells of cadmium contaminated animals. No particular granules are observed in these vacuoles.

Abbreviations: g, granules; mv, microvilli; v, vacuole; asterisk, lumen of the gut.

Scale bars: 1 mm.

Figure 3:

Ultrastructural characteristics of midgut epithelial cells of *L. forficatus* after 45 days of experimental intoxication with cadmium or lead.

a. b. Food intoxication by cadmium (a) or lead (b). Large vacuoles are observed in the apical part of the digestive cells. Numerous sponge-granules (arrowheads) and concentrically-structured (arrows) are seen in these vacuoles.

c. d. Soil intoxication by cadmium (c) or lead (d). A few small concentrically-structured granules (arrows) and small sponge-granules are observed.

Abbreviations: g, granules; mv, microvilli; v, vacuole; asterisk, lumen of the gut.

Scale bars: 1 mm.

Figure 4:

Autometallographic demonstration of metals (dark silver deposits) in 1 mm thick semithin sections of the midgut epithelium of cadmium or lead intoxicated *L. forficatus*. The sections depicted in Figs. 4a-4g have all been subjected to autometallography and counterstained with Azur II blue. Arrow: basal lamina.

a. Control animals. A weak accumulation of silver grains can be seen over large clear granules.

b. c. Animals fed with a cadmium polluted diet (b) or a lead polluted diet (c) during a period of 12 days. An intense accumulation of dense reaction product is observed in the mid-apical part of the epithelial cells. The silver grains are situated within regular shaped granules. Most of these granules are contained in large vacuoles.

d. e. Animals fed with a cadmium polluted diet (d) or lead polluted diet (e) during a period of 45 days. Granules, contained in large vacuoles, are heavily stained in cadmium experiment (d). In lead experiment, the height of the midgut epithelium is reduced by half and the dense reaction product is not abundant (e).

f. g. Animals living in cadmium polluted soil (f) or lead polluted soil (g) since 45 days exhibit a moderate staining in the epithelial cells. A silver accumulation is also observed in the basal lamina.

Abbreviations: asterisk, lumen of the gut.

Magnification: x 1400.

Figure 5:

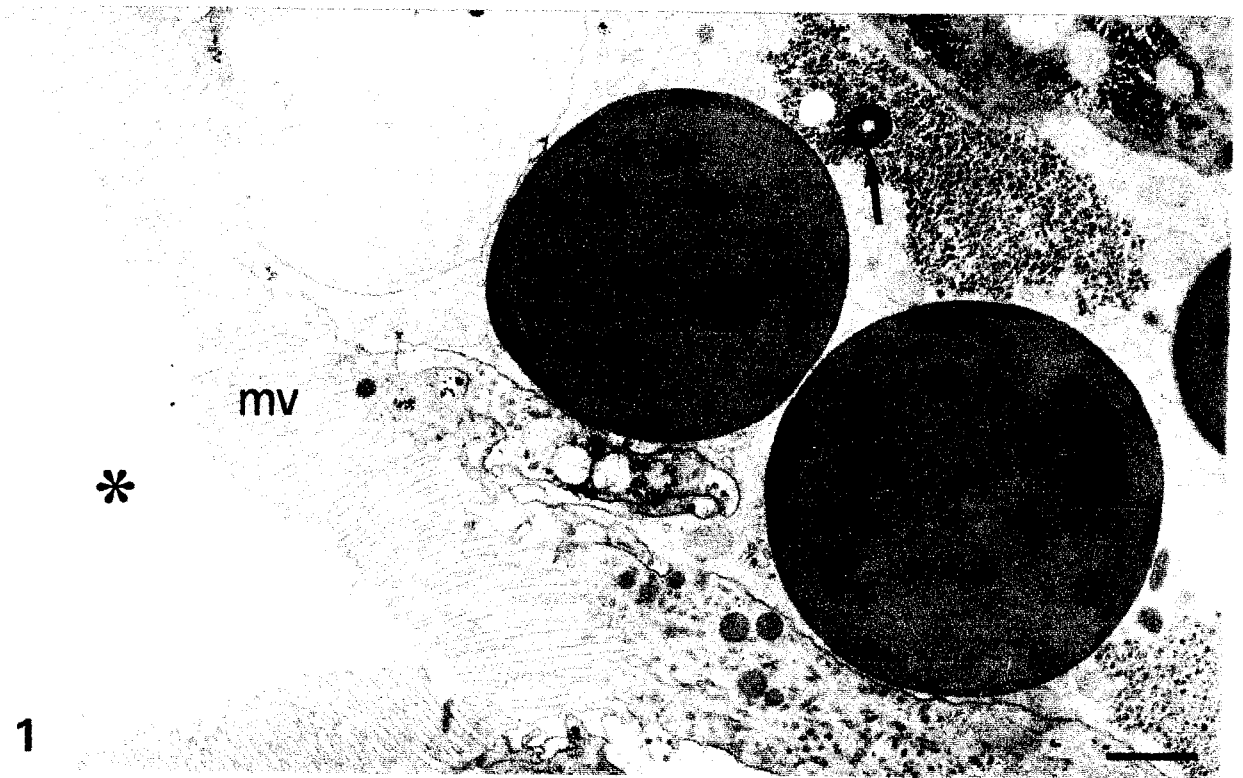
Autometallographic demonstration of metals (dark silver deposits) in ultrathin sections of the midgut epithelium of cadmium or lead intoxicated *L. forficatus*.

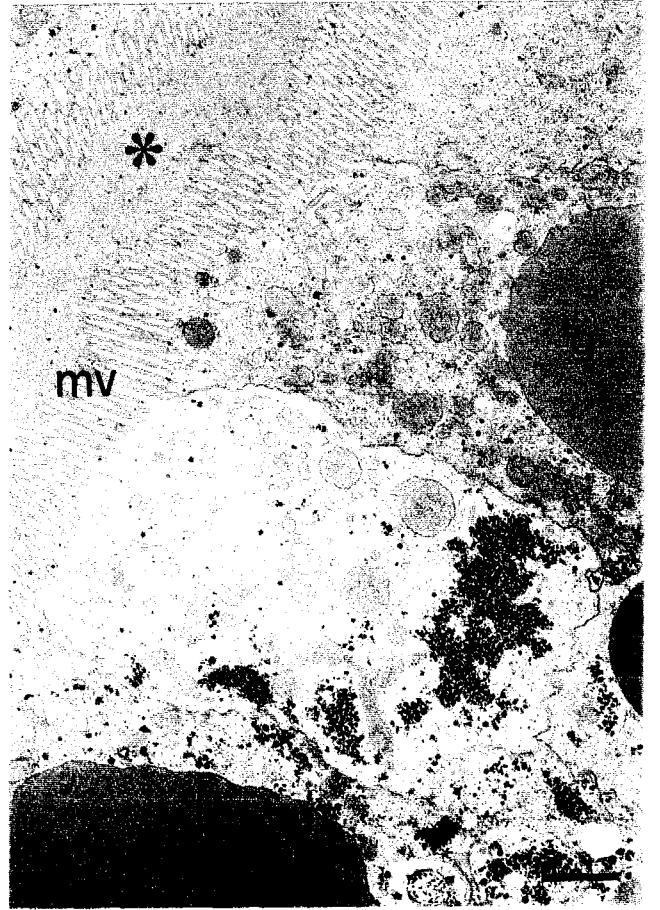
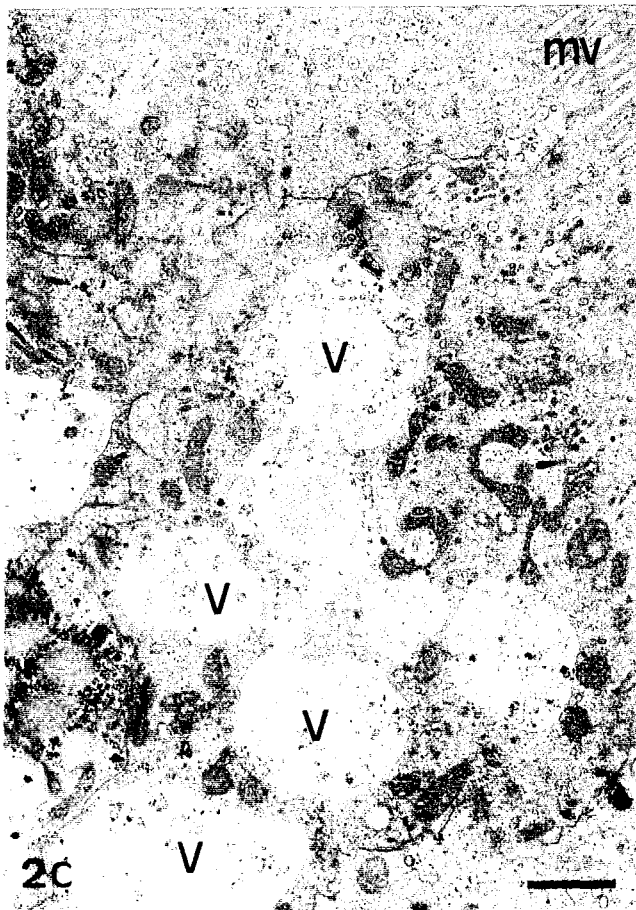
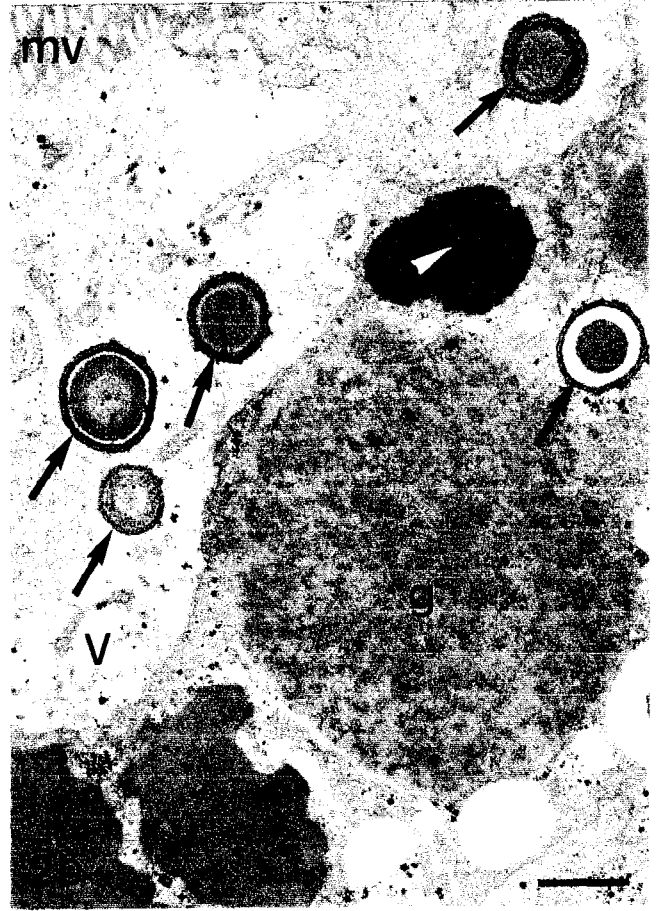
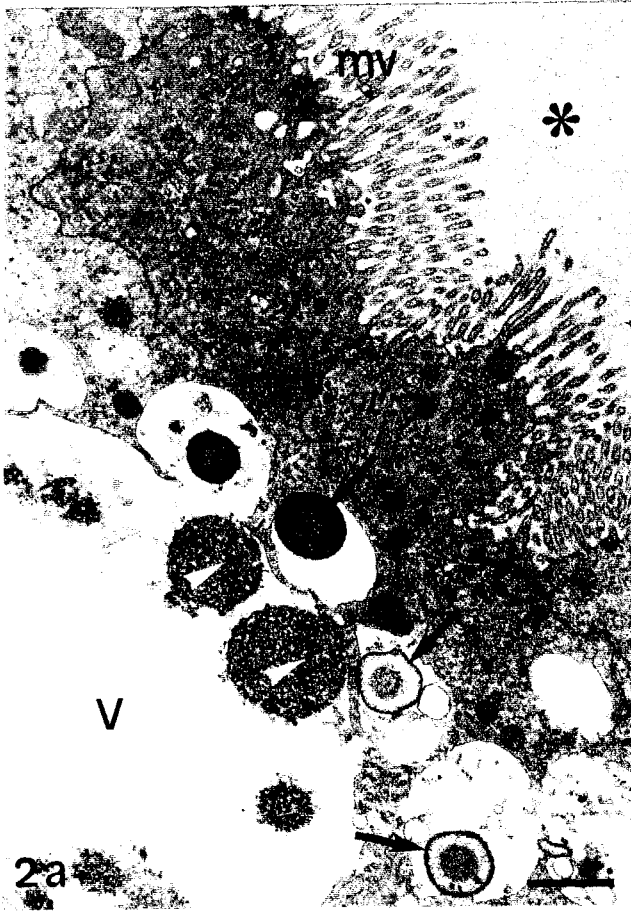
a. Control animals. A few silver grains are located within very large granules of a size ca. 2 to 6 μ m.

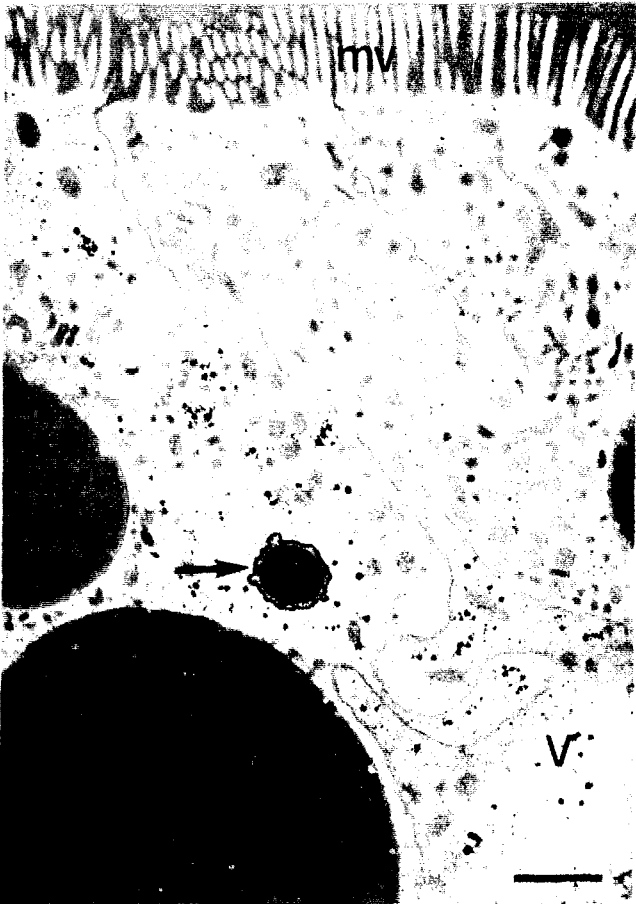
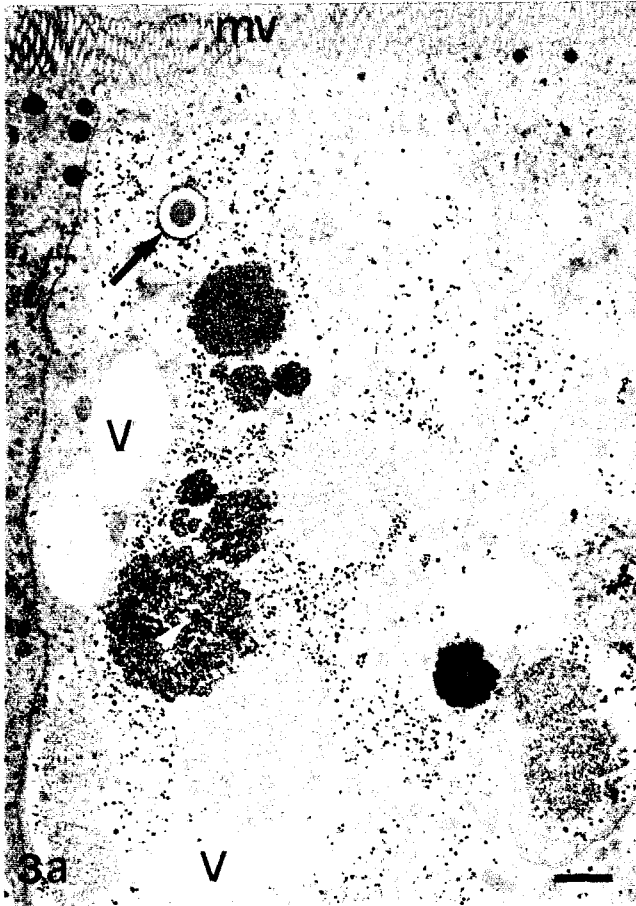
b. In animals fed with cadmium contaminated food during 12 days, silver grains are mainly detected over large-sized sponge-granules.

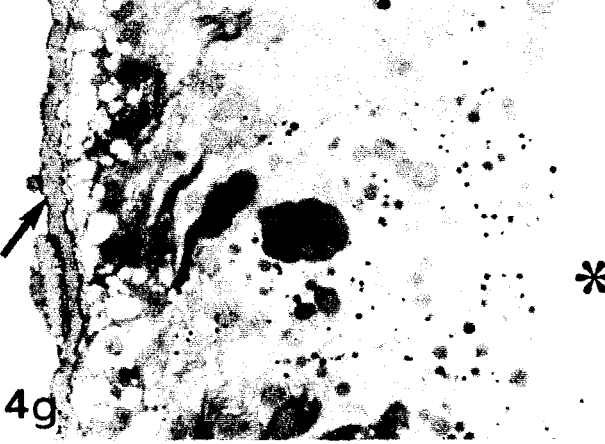
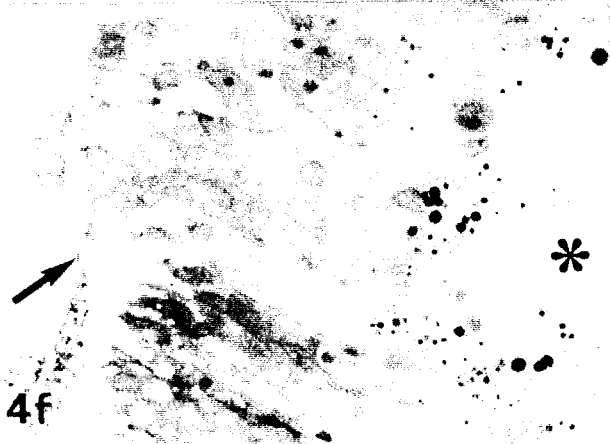
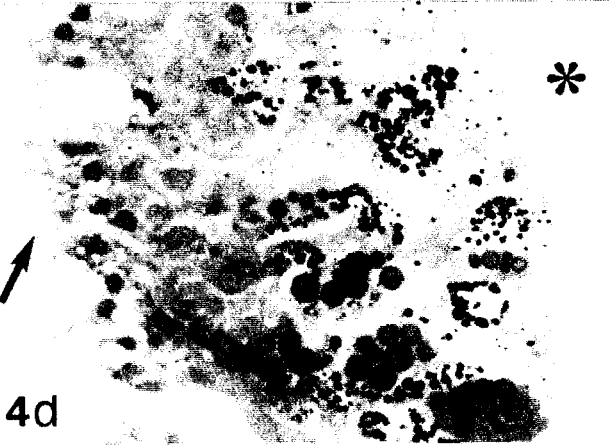
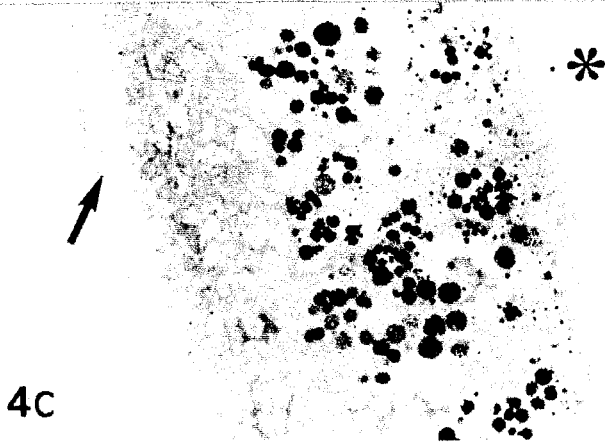
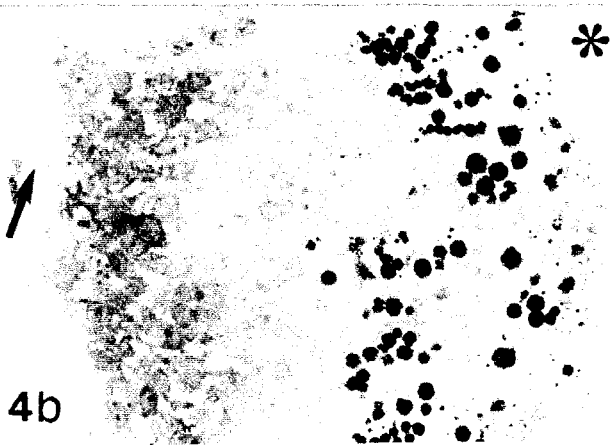
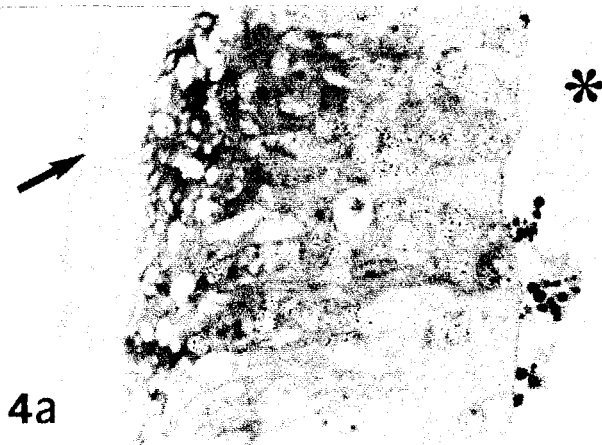
c. d. In animals fed with lead contaminated food during 12 days, an intense staining is observed over large-sized sponge-granules. Moreover, numerous concentrically-structured granules exhibit a concentrically silver staining.

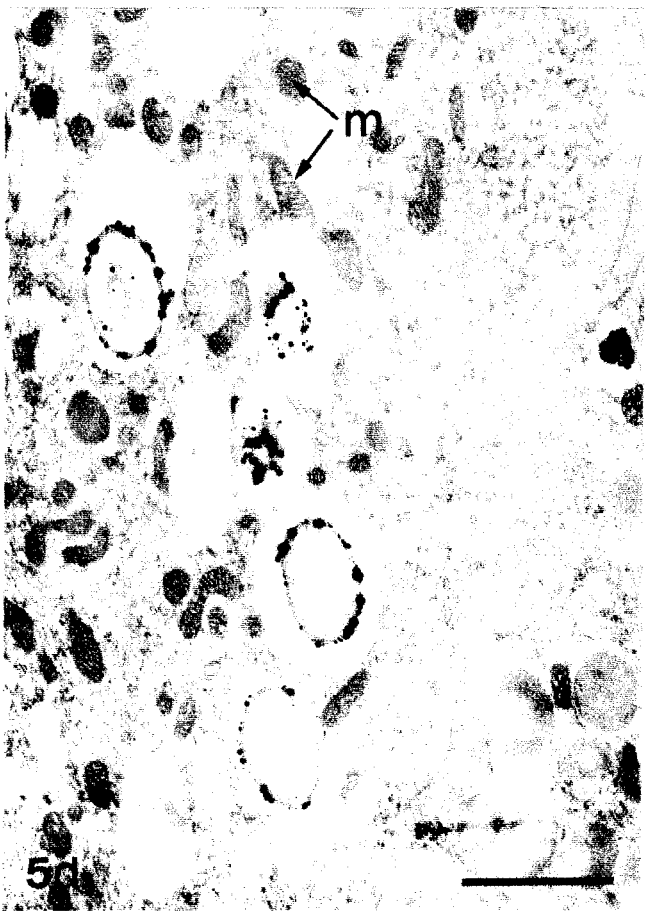
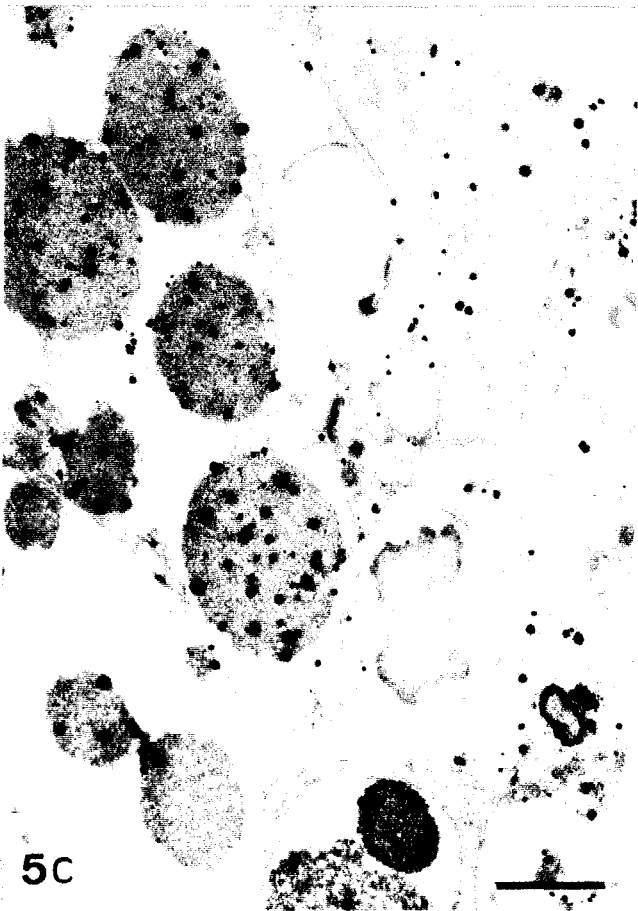
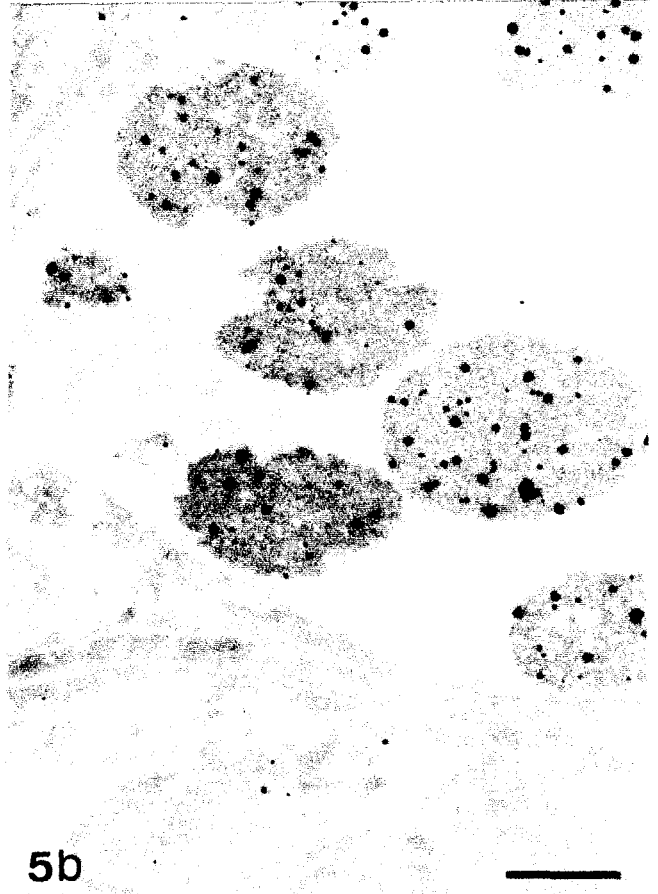
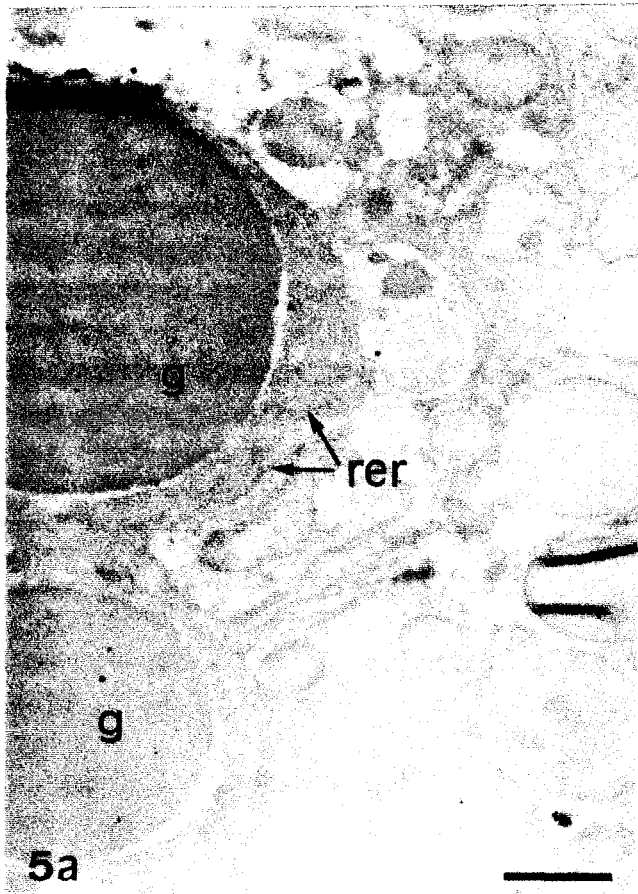
Abbreviations: g, granules; m, mitochondria; rer, rough endoplasmic reticulum. Scale bars: 1 μ m.











References

- Andriès JC (1982) L'intestin moyen des insectes. I : origine embryologique et ultrastructure. *Ann Biol T XXI*, fasc 2, 144-186
- Beyer WN, Pattee OH, Sileo L, Hoffman DJ, Mulhern BM (1985b) Metal contamination in wildlife living near two zinc smelters. *Environ Pollut* 38A, 63-86
- Cheung WWK, Marshall AT (1973) Studies on water and ion transport in homopteran insects : ultrastructure and cytochemistry of the cicapoid and cercopoid midgut. *Tiss cell* 5, 651-669
- Dallinger R (1995) Mechanisms of Metal Incorporation into Cells. In : *Cell biology in environmental toxicology* (Cajaraville MP ed) University of the Basque Country Press Service, Bilbo, 59-88
- Danscher G (1981) Histochemical Demonstration of Heavy Metals. A revised version of the Sulphide silver Method Suitable for both Light and Electronmicroscopy. *Histochemistry* 71, 1-16
- Danscher G, Rytter Norgaard JO, Baatrup E (1987) Autometallography : tissue metals demonstrated by a silver enhancement kit. *Histochemistry* 86, 465-469
- Danscher G, Schroder HD (1979) Histochemical Demonstration of Mercury induced Changes in Rat Neurons. *Histochemistry* 60, 1-7
- Descamps M, Fabre MC, Grelle C, Gérard S (1996) Cadmium and lead kinetics during Experimental contamination and decontamination of the centipede *Lithobius forficatus* L. *Arch Environ Contam Toxicol* 31, 350-353

- Fuller H (1996) Electronenmikroskopische Untersuchungen der malpighischen Gefäße von *Lithobius forficatus* L. *Z Wiss Zool* 173A, 191-200
- Gérard S, Fabre MC, Descamps M (1996) Cadmium kinetics in *Lithobius forficatus* (L.) during experimental contamination and decontamination. In : *Acta Myriapodologica. Mem Mus natn Hist nat* (Geoffroy JJ, Mauriès JP, Nguyen Duy, Jacquemin M, eds), Paris 169, 391-394
- Hopkin SP (1989) *Ecophysiology of metals in Terrestrial Invertebrates*. Elsevier Applied Science, New York 366p
- Hopkin SP (1990) Critical concentrations, pathways of detoxification and cellular ecotoxicology of metals in terrestrial arthropods. *Funct Ecol* 4, 321-327
- Hopkin SP, Hames CAC, Dray A (1989b) X-Ray microanalytical mapping of the intracellular distribution of pollutant metals. *Microsc Anal* 14, 23-27
- Hopkin SP, Martin MH (1983) Heavy metals in the centipede *Lithobius variegatus* (Chilopoda). *Environ Pollut* 6B, 309-318
- Hopkin SP, Martin MH (1984a) Heavy metals in woodlice. *Symp Zool Soc Lond* 53, 143-166
- Hopkin SP, Martin MH (1984b) The assimilation of zinc, cadmium lead and copper by the centipede *Lithobius variegatus* (Chilopoda). *J Appl Ecol* 21, 535-546
- Hopkin SP, Watson K, Martin MH, Mould HL (1985) The assimilation of heavy metals by *Lithobius variegatus* and *Glomeris marginata* (Chilopoda ; Diplopoda). *Bijdr Dierk* 55, 88-94
- Howard B, Mitcell PCH, Ritchie A, Simkiss K, Taylor M (1981) The composition of intracellular granules from metal accumulating cells of the snail *Helix aspera*. *Biochem J* 194, 507-511

- Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991) Comparison of cadmium kinetics of four soil arthropod species. *Arch Environ Contam Toxicol* 20, 305-312
- Jeantet AY, Ballan-Dufrancais C, Ruste J (1980) Quantitative electron probe analysis on insect exposed to mercury II. Involvement of the lysosomal system in detoxification processes. *Biol cell* 39, 325-334
- Köhler HR, Körtje KH, Alberti G (1995) Content, absorption quantities and intracellular storage sites of heavy metals in Diplopoda (Arthropoda). *Biometals* 8, 37-46
- Lewis JGE (1981) *Biology of Centipedes*. Cambridge University Press
- Littlewood H (1991) the water relations of *Lithobius forticatus* and the role of coxal organs (Myriapoda : Chilopoda). *J Zool* 263, 653-665
- Mason AZ, Simkiss K (1982) Sites of mineral deposition in metal accumulating cells. *Exp cell Res* 139, 383-391
- Minelli A (1993) Chilopoda. In: *Microscopic Anatomy of Invertebrates, vol 12: Onychophora, Chilopoda, and lesser Protostoma* (Wiley-Liss, Inc), 57-114
- Morgan AJ, Morris B (1982) The accumulation and intracellular compartmentation of cadmium, lead, zinc and calcium in two earthworm species (*Dendrobaena rubica* and *Lumbricus rubellus*) living in highly contaminated soil. *Histochemistry* 75, 269-287
- Read HJ, Martin MH (1990) A study of Myriapod communities in woodlands contaminated with heavy metals. In: *Proceedings of the 7th International Congress of Myriapodology* (Minelli A, ed) Brill, Leiden, 289-298
- Rosenberg J, Bär E (1981) Coxalorgane bei chilopoden : Feinstruktur und Ionen-Transport. *Vehr Dtsch Zool Ges* 263

- Simkiss K (1976a) Cellular aspects of calcification. In : *The Mechanisms of Mineralization in the Invertebrates and Plants* (Watanabe N & Wilbur K, eds) University of South Carolina Press, 1-31
- 30 Simkiss K (1976b) Intracellular and extracellular routes in bio-mineralization *symp soc Exp Biol* 30, 423-444
- 31 Simkiss K, Masson AZ (1983) Metal ions : metabolic and toxic effects. In : *the Mollusca* vol 2, *environmental Biochemistry & Physiology* Academic press, London & New York, 101-164
- 32 Soto M, Marigomez I (1995) Techniques for the study of metals in cell biology. In : *Cell biology in environmental toxicology* (Cajaraville MP ed) University of the Basque Country Press Service, Bilbo, 59-88
- 33 Taylor M, Simkiss K, Greaves GN (1986) Amorphous structure of intracellular mineral granules. *Biochem Soc Trans* 14, 549-552
- 34 Taylor MG, Simkiss K (1984) Inorganic deposits in invertebrate tissues. *Environ chem* 3, 102-138
- 35 Timm F (1958) Zur Histochemie der Schwermetalle, das Sulfid-Silber-Verfahren. *Dtsch Z Gesamte Gerichtl Med* 46, 706-711
- 36 Van Straalen NH, Van Wensem J (1986) Heavy metal content of forest litter arthropods as related to body-size and trophic level. *Environ Pollut* 42A, 209-221
- 37 Wang TH, WU HW (1948) On the structure of the Malpighian tubules of centipedes and their excretion of uric acid. *Sinensia* 18, 1-11
- 38 Wignarajah S, Phillipson J (1977) Numbers and biomass of centipedes (Lithobiomorpha : Chilopoda) in a *Betula-Alnus* wood land in N.E. England. *Oecologia* 31, 55-66

Le modèle *Eisenia fetida* (Annélide Oligochète)

P. Scaps, C. Grelle, M. Descamps : Cadmium and lead accumulation in the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny) and its impact on cholinesterase and metabolic pathway enzyme activity. *Comp. Biochem. Physiol.* 116C 233-238 (1997).

C. Grelle and M. Descamps : Heavy metal accumulation by *Eisenia fetida* and its effect on Glutathione-S-transferase activity. *Pedobiologia.* 42: 289-297 (1998).

C. Grelle et M. Descamps : L'autométallographie appliquée à un modèle Oligochète *Eisenia fetida typica*. Avantages et limites de la technique. Congrès annuel de la société zoologique de France (juin 1998, communication orale).

Les cinétiques d'accumulation des métaux ont été suivies chez *Eisenia fetida* (Annélide Oligochète) élevé dans du terreau contaminé artificiellement par du chlorure de cadmium ou de plomb. Les animaux ont montré une accumulation progressive dose-dépendante des deux métaux. Différentes activités enzymatiques ont été ensuite testées sur les animaux ainsi contaminés (Acétyl-choline estérases ainsi que d'autres enzymes du métabolisme : malate déshydrogenase, phosphoglucomutase, glutamate oxalate transférase). Aucun effet réel de la présence de ces métaux dans les conditions expérimentales n'a pu être mis en évidence.

Dans un deuxième temps et en vue de tester l'efficacité du modèle dans des conditions autres qu'expérimentales, nous avons étudié l'accumulation du cadmium, du zinc et du plomb sur des animaux maintenus dans des sols contaminés et prélevés autour de chacun des sites de piégeage présentés dans le chapitre II. Les animaux se sont montrés capables de réguler dans une certaine mesure le taux de zinc tissulaire mais ont accumulé d'importantes quantités de cadmium et de plomb. Le problème de la biodisponibilité des métaux a été soulevé dans la mesure où aucune relation simple n'a permis de relier les teneurs en cadmium total présentes dans les différents sols à celles effectivement accumulées par les animaux. Différentes techniques d'extraction des métaux des sols (extraction à l'eau, au chlorure de calcium, à l'acétate d'ammonium en présence d'EDTA) ont ensuite été testées afin de vérifier si l'une d'entre elles reflétait davantage la quantité de métal disponible pour les animaux. Seule l'extraction à l'acétate d'ammonium s'est montrée mieux corrélée, en ce qui concerne le zinc, à la quantité présente dans les animaux.

L'analyse des effets *in vitro* du cadmium, du zinc, du plomb et du cuivre sur l'activité glutathion-S-transférase des vers a également été réalisée. Parallèlement aux intoxications par les différents sols décrits précédemment, l'activité globale et les effets *in vivo* des métaux sur cette activité a été dosée : aucun effet inhibiteur ou activateur de la présence des métaux *in vitro* ou *in vivo* n'a pu être observé.

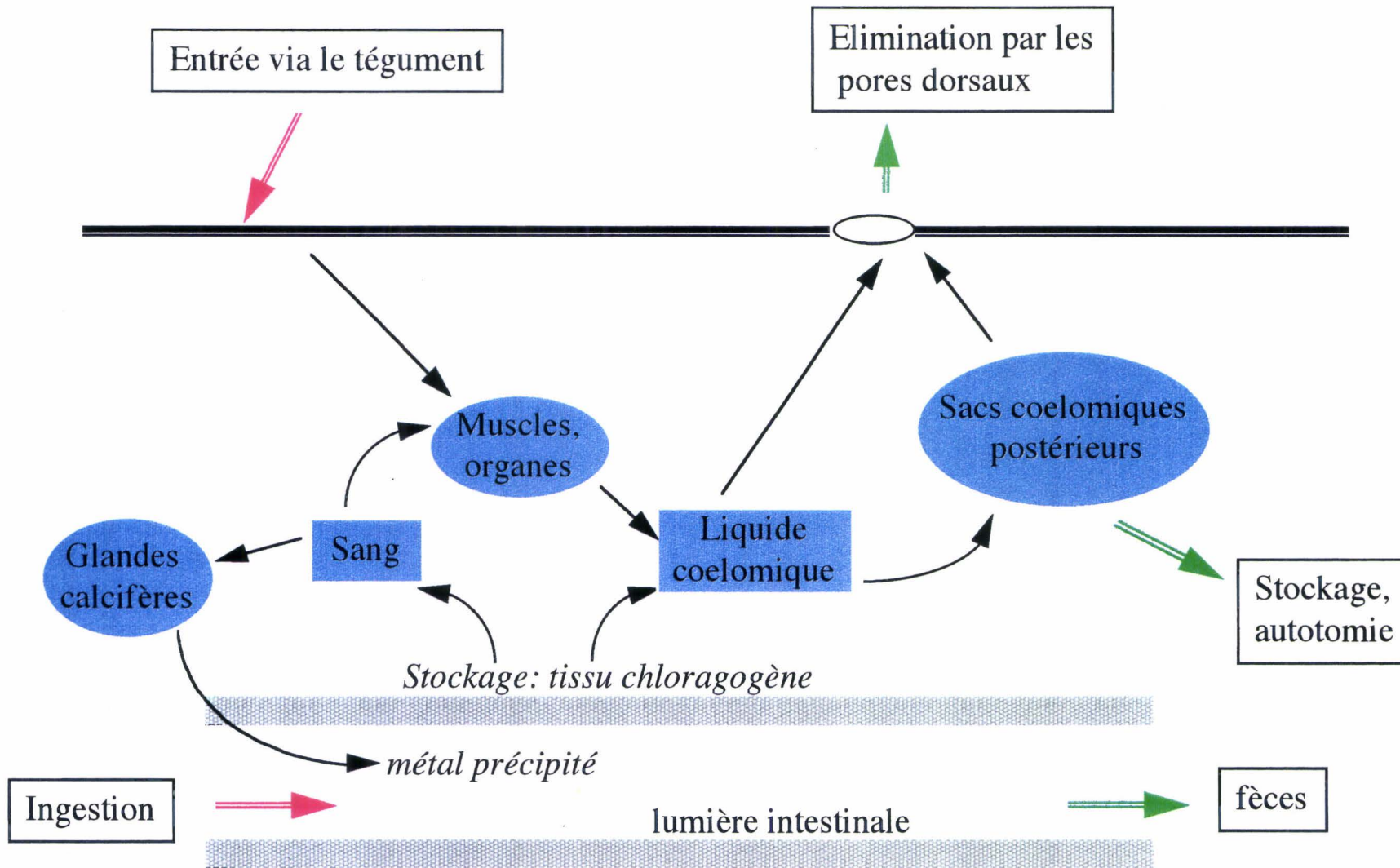


Fig. 20. Principales voies d'entrée et de sortie des métaux chez les Oligochètes.

Dans un troisième temps, dans le but de valider la technique d'autométallographie développée sur le modèle *Lithobius forficatus* en tant qu'outil de diagnostic pour la faune du sol, nous avons cherché à l'appliquer sur un modèle Oligochète. Il avait été observé que la lithobie, qui présente un mécanisme d'excrétion actif du métal, n'était pas le meilleur candidat pour donner des indications sur le métal assimilable. Les Oligochètes stockant le métal de manière cumulative, nous avons cherché à le visualiser au niveau tissulaire. Dans une première étape, seuls des animaux intoxiqués expérimentalement dans un terreau artificiellement contaminé en $CdCl_2$ et présentant une charge corporelle de 80 mg/kg (poids sec) ont été étudiés. L'un des principaux lieux de stockage des métaux chez les Oligochètes étant constitué par le tissu chlorogène, c'est à ce niveau que nous avons recherché le marquage autométallographique. Un important marquage a été observé et nous avons pu l'identifier comme étant principalement dû à une grande quantité de fer, reflet d'une activité métabolique normale sans lien avec une intoxication quelconque. La non spécificité de la technique d'autométallographie vis à vis d'un ou plusieurs métaux la rend ici inutilisable avec notre second modèle.

La figure 20 récapitule les principales voies d'entrée et de sortie des métaux chez les Oligochètes.



Cadmium and Lead Accumulation in the Earthworm *Eisenia fetida* (Savigny) and its Impact on Cholinesterase and Metabolic Pathway Enzyme Activity

Patrick Scaps, Claire Grelle, and Michel Descamps

LABORATOIRE D'ECOPHYSIOLOGIE D'INVERTÉBRÉS DU SOL,
UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE, F-59655 VILLENEUVE D'ASCQ, FRANCE

ABSTRACT. The uptake of cadmium and lead was studied in the earthworm *Eisenia fetida* (Annelida: Oligochaeta) using an artificial soil exposure. Although cadmium and lead are bioconcentrated in *Eisenia fetida* tissue, bioaccumulation is not shown for concentrations below 100 ppm for lead, individuals eliminating as much metal as they ingest or the interactions between lead and organic matter in our substratum reduce the bioavailability of lead at low concentration. The cholinesterase activity was not inhibited when individuals were exposed for 8 weeks to either 8 or 80 ppm of cadmium or 100 or 2,000 ppm of lead. Results are different from those reported in another species *Eisenia fetida andrei* (= *E. andrei*) showing an inhibitory effect of lead on ChE activity; thus, differences in cholinesterase inhibition reflects the existence of two separate species. No effect of cadmium and lead on the activity of esterases, malate dehydrogenase, phosphoglucomutase and glutamate oxalate transferase was found in our experimental conditions, but we observed the disappearance of the fast moving band after electrophoretic separation for phosphoglucose isomerase. COMP BIOCHEM PHYSIOL 116C;3:233–238, 1997. © 1997 Elsevier Science Inc.

KEY WORDS. Heavy metals, oligochaete, accumulation, cholinesterase, enzyme activity

INTRODUCTION

Metal pollution may disturb soil ecosystems by affecting the structure of soil invertebrate populations. Successful protection of communities demands knowledge of the ecophysiology of metals in invertebrates and their susceptibility to metal intoxication (1,2,3). Deposition of potentially toxic materials in soil ecosystems has led to the development of acute toxicity tests using earthworms as representative terrestrial invertebrates. Two procedures, the contact filter paper test and the artificial soil test, were adopted by the OECD (4) and the EEC (5). The artificial soil test has been used widely since the toxicity of chemicals can be determined in laboratory experiments and allows direct comparison with effects in the field (6).

In the context of pollutants biomonitoring in earthworms, cholinesterases (ChEs) have been proposed as biomarkers of pesticide pollution, because they are key targets for organophosphorus and carbamate pesticides. In this field, a great number of experiments have been conducted with *Eisenia fetida* (7,8,9). On the other hand, little is

known about the effect of heavy metals on ChE activity in the earthworm *E. fetida*. Labrot *et al.* (10) showed recently that the acetylcholinesterase activity of *E. andrei* was decreased after *in vitro* and *in vivo* exposures to lead and uranium. Moreover, the non-specific esterases play an important role in pesticide metabolism by attacking at the ester, amide, and phosphate linkages (11) and nothing is known about the effects of lead and cadmium on these activities in *E. fetida*.

This paper forms part of a wider study of the effects of metal fallout on soil invertebrates in the vicinity of a zinc and lead smelter located at Noyelles-Godault, Northern France. The aim of the present work was to determine the bioconcentration of cadmium and lead from artificial soils at levels of pollution corresponding to maximal values found around the smelter, and to study the effects of these heavy metals on ChE and some metabolic pathway enzyme activities.

MATERIALS AND METHODS

E. fetida typica (Savigny) used in this study were collected from local stock containers. They were removed from culture, rinsed with tap water, and placed on moistened paper towels in a covered glass container for 6 days to allow egestion of soil from the digestive tract. Then, the earth-

Address reprint requests to: P. Scaps, Laboratoire d'Ecophysiologie d'invertébrés du Sol, Biologie Animale, Batiment SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France. Tel. (33) 03-20-43-65-17; Fax (33) 03-20-43-68-49; E-mail: Patrick.Scaps@univ-lills.fr

worms were rinsed in tap water and blotted dry prior to exposure.

Artificial Soil Exposure

In order to mimic the soil conditions in the vicinity of metallurgy factories, commercial compost (horticultural compost SEM, culture support NFU 44-551; composition: peat, bark compost, pH 6.8) was used as artificial soil, in place of OECD artificial substratum (70% sand, 20% clay, and 10% organic matter). Earthworms were exposed to a single metal (cadmium or lead). Soils were supplemented with solutions of cadmium as CdCl₂ and lead as PbCl₂. Two concentrations of cadmium (8 or 80 ppm) and two concentrations of lead (100 or 2000 ppm) were used according to the highest concentrations found in contaminated soils of the vicinity of the zinc and lead smelter (89 ppm and 2259 ppm for cadmium and lead, respectively).

Ten and four adults were respectively introduced into each exposure tank containing 200 g of commercial compost for the study of metal accumulation and to effects on enzyme activities. Distilled water was added to give a moisture content of 30% wet weight. Three replicates were used for each designated time and the experiment was run for 56 days (8 weeks) in natural light at uncontrolled room temperature. The individuals in each container were fed with lime foliage containing cadmium (3.9 ± 0.8 ppm) and lead (13.9 ± 2.8 ppm). Given the amount of lime foliage eaten and the duration of the experiment, the metal input was relatively low compared with that coming from the soil. At weekly intervals, the earthworms were removed from each container, rinsed in tap water, and then prepared for analysis. Controls were performed in the same conditions as previously described, but in metal-free commercial compost.

Chemical Analysis

Earthworms were oven-dried in glass flasks at 105°C. The dried earthworms were digested overnight in nitric acid at a rate of 1 ml HNO₃ per mg dry weight of earthworm. After heating at 120°C and evaporation, 1 ml of HNO₃/H₂SO₄/HCl (10/2/3;v/v/v) was added. The solution was heated at 180°C; after cooling, samples were diluted with deionized water up to 20 ml. The concentrations of cadmium and lead in animals were determined by flame atomic absorption spectrometry using an air-acetylene-flame device (Perkin Elmer 2380). The sensibility of determination was 5 µg ml⁻¹ and 0.5 µg ml⁻¹ for lead and cadmium, respectively.

Sample Preparation and Cholinesterase Activity

Individuals were homogenized at 4°C in 4 vol of 0.01 M Tris/HCl, pH 8.0. The homogenates were then centrifugated for 30 min at 15,000 g. Aliquots of the supernatant

were frozen at -80°C until use. Protein content and ChE activity were determined according to the method of Bradford (12) and Ellman *et al.* (13), respectively; these methods were adapted for measurement with a microplate reader (Dynatech MR 500). For protein content measurements, 5 or 10 µl of 1/50 diluted tissue extract was adjusted to 160 µl with milli-Q water (Millipore); then 40 µl of a Bio-Rad protein reagent was added. The absorbance was read at 610 nm and the protein content of the sample determined with respect to a γ globulin calibration curve.

Kinetic measurements were performed at 20°C with acetylthiocholine iodide as substrate. Reactions were performed in 300 µl of a 0.01 M phosphate buffer, pH 8.0 containing (a) 20 µl of 0.01 M DTNB (5,5'-dithio-(2 nitrobenzoic acid)), (b) 20 µl of 0.075 M substrate, and (c) 10 µl of tissue extracts. The reaction was measured at 410 nm. The enzymatic activity was corrected for spontaneous hydrolysis of the substrate and was expressed as nmol/min/mg proteins.

Data Analysis

A one-way ANOVA was used to compare AChE activities from unexposed animals (control) and animals exposed to single metals, as a function of time. This analysis was followed by application of the Student-Neumann-Keuls multiple comparison method. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Electrophoretic Analysis

Polyacrylamide gradient gel electrophoresis (PAGGE) was performed on 5–30% acrylamide gel as described in Scaps *et al.* (14). PAGGE was performed at mid-time (28th day) and at the end of the exposure experiment (56th day), respectively. Fifty-six days representing the time at which accumulation of cadmium and lead is maximal in our experimental conditions (cf Results).

Identification of ChE isoenzymes was performed using the method of Koelle and Friedenwald (15) modified by elevation of the incubation pH to 8.0 as described in Scaps *et al.* (14).

The influence of cadmium and lead was studied on 12 enzymes: isocitrate dehydrogenase (IDH; EC 1.1.1.42), lactate dehydrogenase (LDH; EC 1.1.1.27), malate dehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37), phosphoglucosmutase (PGM; EC 5.4.2.2), leucine aminopeptidase (LAP; EC 3.4.11.1), phosphoglucuronate dehydrogenase (PGD; EC 1.1.4.4), phosphoglucose isomerase (PGI; EC 5.3.1.9), 6α glycerophosphate dehydrogenase (GPD; EC 1.1.1.8), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH; EC 1.1.1.44), alcohol dehydrogenase (ADH; EC 1.1.1.2), glutamate oxalate transferase (GOT; EC 2.6.1.1), and non-specific esterases (EST; EC 3.1.1).

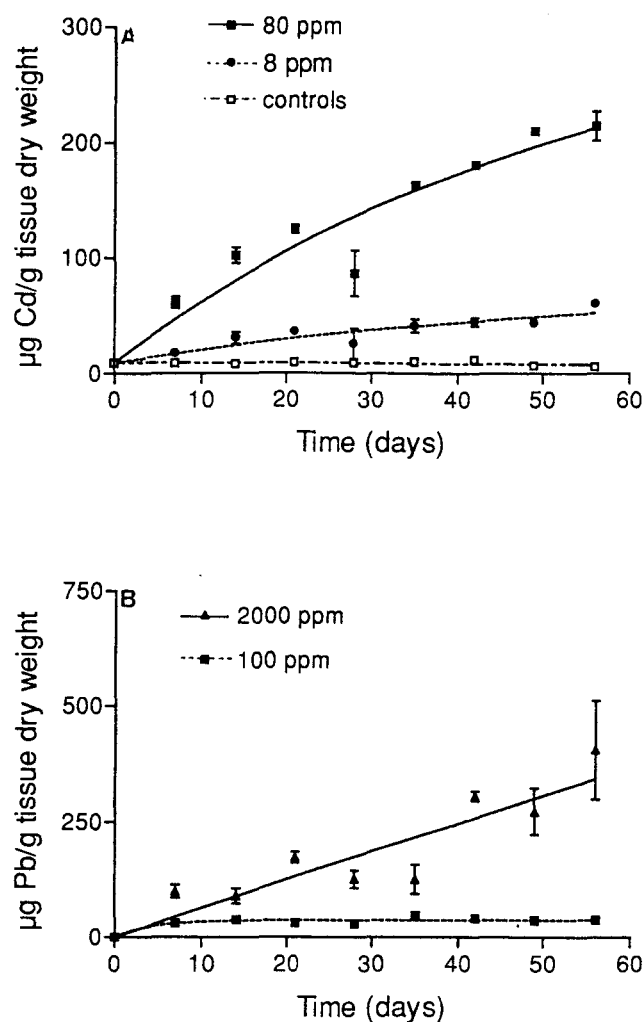


FIG. 1. Cadmium (A) and lead (B) uptake in *Eisenia fetida* from artificial soils. Data represent the mean \pm SE of the mean of three replicates, each comprising 10 worms.

After electrophoretic separation, each enzyme was specifically stained according to the method of Selander *et al.* (16).

RESULTS

Biokinetics of Cadmium and Lead in *Eisenia fetida* typica

No mortality of *E. fetida* occurred in the experimental exposure tanks. The uptake of cadmium is illustrated in Fig. 1A. The relationship between cadmium levels in earthworms and time of exposure could be fitted to a polynomial model for individuals exposed to the highest test concentration (Cd_{80} : $Y = 16.60 + 6.33x - 0.11x^2 + 1.11 e^{-3x^3}$, $r^2 = 0.92$) and to a linear model for individuals exposed to the smallest test concentration (Cd_8 : $Y = 13.04 + 0.76x$, $r^2 = 0.87$).

There was a regular accumulation of cadmium at the highest test concentration (80 ppm).

The uptake of lead is shown in Fig. 1B. The relationship between lead levels in earthworms and time of exposure for individuals exposed to the two test concentrations could be fitted to a linear model (Pb_{100} : $Y = 28.10 + 0.17x$, $r^2 = 0.96$; Pb_{2000} : $Y = 8.30 + 6.03x$, $r^2 = 0.83$). We observed a clear accumulation of lead at the highest test concentration (2000 ppm). No accumulation of lead occurred for the smallest test concentration (100 ppm). Control values were under the threshold of determination of the atomic absorption spectrophotometer.

Influence of Cadmium and Lead on ChE Activity

As for the biokinetics study, no mortality of *E. fetida* occurred in the experimental containers. Figures 2A and 2B

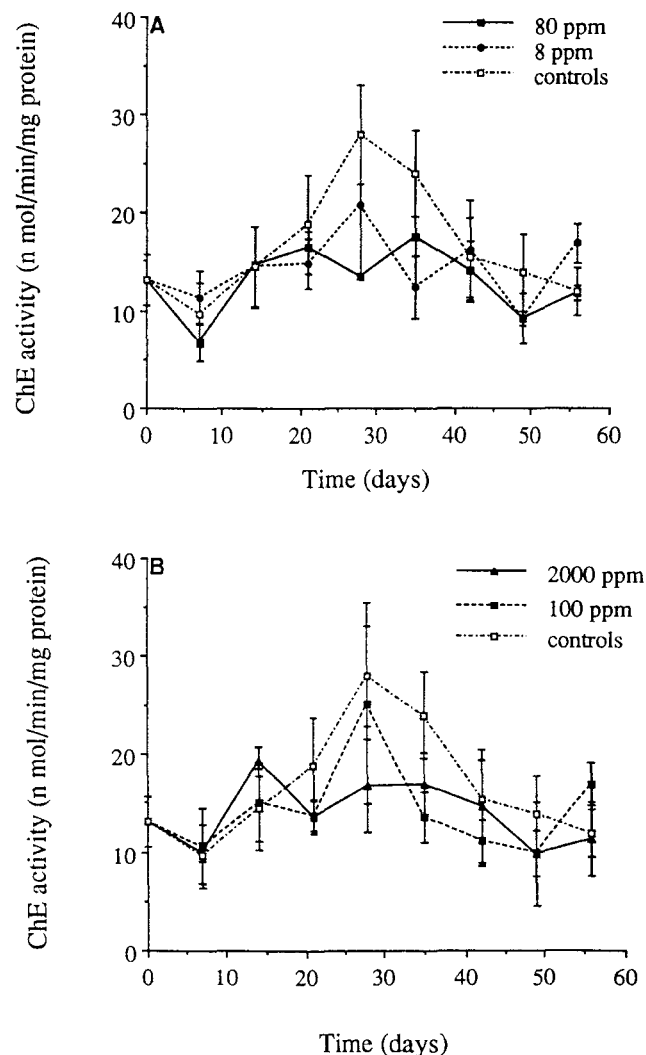


FIG. 2. Influence of cadmium (A) and lead (B) on *Eisenia fetida* ChE activity. Data represent the mean \pm SE of the mean of three replicates, each comprising four worms.

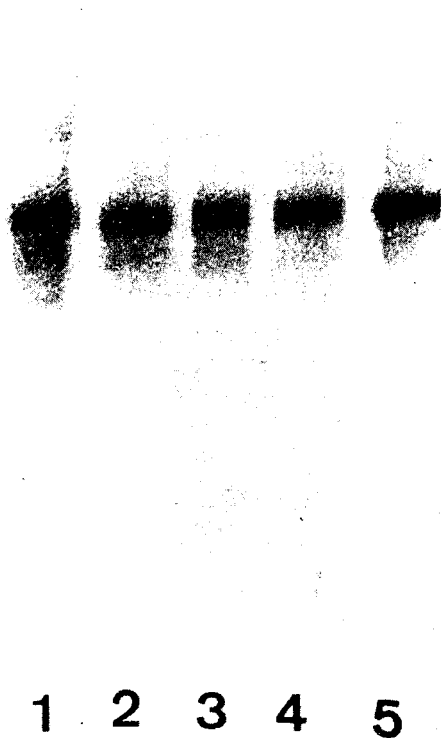


FIG. 3. Polyacrylamide gradient gel electrophoresis of ChEs from *Eisenia fetida*. (1) non-exposed control; individuals exposed to 8 ppm (2) or 80 ppm (3) of cadmium, and to 100 ppm (4) or 2000 ppm (5) of lead.

show ChE activity in relation to time of exposure for cadmium and lead. There was considerable variation in measured ChE activity throughout the experiment and in consequence no significant differences appeared between unexposed controls and earthworms exposed to cadmium (Fig. 2A) or lead (Fig. 2B). ChE activity was not inhibited when individuals were exposed to 8 or 80 ppm of cadmium and 100 or 2000 ppm of lead.

Nevertheless, we noticed a regular increase of ChE activity for controls until mid time of exposure (28 days) and then a decrease. This result could be interpreted as a response to the first rise of temperature in spring, since another experiment performed at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ did not show any increase of ChE activity (data not shown).

PAGE performed 28 and 56 days after exposure gave the same results. Three bands of activity were detected (Fig. 3). Electrophoretic analysis showed same levels of ChE activity in controls and in intoxicated animals both for the smallest and the highest test concentrations of cadmium and lead. The detection on polyacrylamide gels of ChE activity confirms the spectrophotometric measurements using the method of Ellman *et al.* (13).

Influence of Cadmium and Lead on Enzyme Activities

Consistent banding patterns were not obtained with IDH, LDH, LAP, PGD, GPD, G-6-PDH, and ADH.

Figure 4 shows the non-specific esterase zymograms of earthworms exposed to cadmium or lead and unexposed controls, at the 56th day. No modification of allele number or allozyme activity was observed. Same results were obtained 28 days after exposure.

The MDH, PGM, and GOT stained as a single band in all treatments and no modification of allozyme activity was detected. Cadmium and lead did not modify the activity of EST, MDH, PGM, and GOT in our experimental conditions. A two-banded zymogram was obtained for PGI control but not for individuals intoxicated with cadmium or lead. For both test concentrations the fast moving band disappeared from the zymogram (Fig. 5).

DISCUSSION

The bioaccumulation results reported in this paper are consistent with most other published studies on cadmium and lead in earthworms. Cadmium and lead are stored in granules in the chloragocytes (17). These granules (or chloragosomes) are discharged into the coelomic fluid and may be excreted via the nephridia in each segment, or stored permanently in large amorphous waste nodules, along with other excretory material in the posterior coelomic sacs (2).

Distribution of cadmium in *E. fetida* was studied recently by Honeycutt *et al.* (18) who showed that 60% of cadmium was localized in the intestinal tract, while most of the remaining cadmium was found in the body wall. There is both an oral and dermal route for uptake, since earthworms ingest

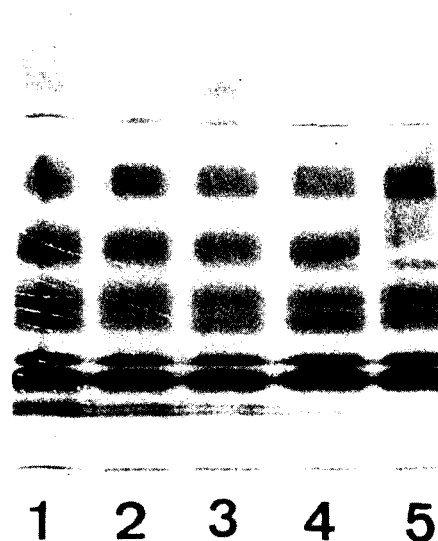


FIG. 4. Polyacrylamide gradient gel electrophoresis of Est from *Eisenia fetida*. (1) non-exposed control; individuals exposed to 8 ppm (2) or 80 ppm (3) of cadmium, and to 100 ppm (4) or 2000 ppm (5) of lead.

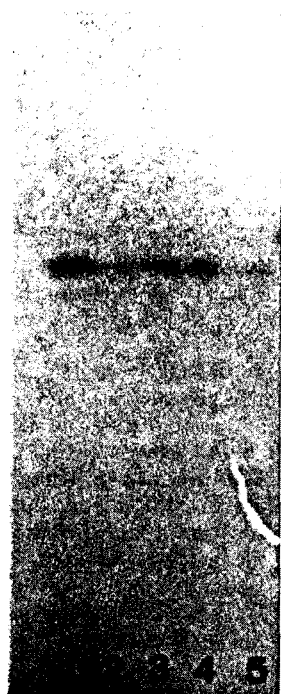


FIG. 5. Polyacrylamide gradient gel electrophoresis of PGI from *Eisenia fetida*. (1) non-exposed control; individuals exposed to 8 ppm (2) or 80 ppm (3) of cadmium, and to 100 ppm (4) or 2000 ppm (5) of lead.

the soil and their epidermis is in direct contact with the soil. The highest amounts of cadmium at the subcellular level were in the cytosolic fractions. This suggests translocation of the cadmium through the cell wall into the cytosol, where it is probably sequestered by metallothioneins. These authors have also shown in earthworms exposed via OECD artificial soil and with concentrations similar to those used in the present work (10 and 100 ppm) a faster uptake rate. The higher amount of accumulation is obtained 6 days after cadmium exposure and then remains stable. This difference may be related to the fact that their substratum consisted of industrial sand whereas our substratum was essentially organic. The difference in uptake rate may be related to differences in bioavailability between the two media; the bioavailability in organic soil being smaller because of the existence of more interactions between heavy metals and the substratum. It should be noted that the substratum in our experimental procedure mimics natural soil. The interactions between lead and organic matter in substratum could reduce the bioavailability of lead and could explain the absence of bioaccumulation at concentrations lower than 100 ppm in our experimental conditions or individuals could eliminate as much metal as they could ingest.

Very little is known about the influence on enzyme activity of toxic heavy metals like cadmium and lead in earthworms and in soil invertebrates. ChE activity was not inhibited in *E. fetida typica* at the concentrations tested. Our

results are different from those reported by Labrot *et al.* (10) on *E. andrei* (named by these authors *E. fetida andrei*). In this species significant decrease of ChE activities (up to 65%) both with lead and uranium after *in vitro* and *in vivo* exposures. However, it should be noticed that these authors carried out *in vivo* exposure with dishes moistened filter paper daily aerated as described in OECD. In another terrestrial invertebrate, the grasshopper *Aiolopus thalassinus* fed on a diet containing different concentrations of $HgCl_2$, $CdCl_2$, and $PbCl_2$, Schmidt and Ibrahim (19) showed that mercury and cadmium reduced ChE activity to about 23% compared to the untreated control. The decrease in ChE activity was independent of the amount of the heavy metal used for treatment. In contrast to this, lead increased ChE activity by about 14%. In the following F2 untreated adults, ChE activity was normal; no long-term effect was found. Our results are well in accordance with those reported by Bocquene *et al.* (20) obtained with four species of marine vertebrates and invertebrates. These authors showed that cadmium chloride did not inhibit ChE activity at the concentrations measured in the different marine compartments (water, sediment and living matter). In consequence, in contrast to pesticides, ChE activity can not serve as a biomarker of heavy metal pollution in earthworms of the species *E. fetida*.

Cadmium and lead did not inhibit the activity of non-specific esterases in *E. fetida*. On the basis of polyacrylamide gel electrophoresis of esterases in earthworm classified as *E. fetida*, Oien and Stenersen (21) revealed the existence of two species. The classification based upon esterase electromorph coincided with classification into two colour variants formerly described as subspecies under the names *E. fetida typica* and *E. fetida unicolor* [= *E. fetida andrei*; Bouché, (22)]. Sterile hybrids with hybrid esterase patterns were produced at a low rate in the laboratory, but were never found with certainty in the wild populations. Oien and Stenersen (21) proposed to name *E. fetida* and *E. unicolor* the two species. Therefore, the different results obtained for ChE inhibition by heavy metals in *E. fetida typica* and *E. fetida andrei* could be interpreted as another evidence of separate species.

Cadmium and lead did not inhibit malate dehydrogenase, phosphoglucomutase, and glutamate oxalate transferase in our experimental conditions, but we noticed the disappearance of the fast moving band for phosphoglucose isomerase after electrophoretic separation. At the present time, this study constitutes the first report of the effect of heavy metals on metabolic pathway enzyme activities in soil invertebrates. As a consequence no comparison can be made with other cases.

The authors wish to thank Ms. R. Leroux for her technical assistance during this work. This work was supported by funds from PRC Environment et Activités humaines: Etude d'un secteur pollué par les métaux from Conseil Régional Nord-Pas-de-Calais.

References

1. Dalinger, R.; Rainbow, P.S. Ecotoxicology of metals in terrestrial invertebrates. Chelsea: Lewis Publishers; 1993.
2. Hopkin, S.P. Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. London: Elsevier Applied Science; 1989.
3. Spurgeon, D.J.; Hopkin, S.P.; Jones, D.T. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida*. Environ. Pollut. 84:123-130; 1994.
4. OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). OECD guidelines for testing chemicals. Section 2: Effects on biotic systems. Method 207. Earthworm, acute toxicity tests, Paris, France; 1984.
5. EEC (European Economic Communities). Methods for the determination of ecotoxicology level 1. DG XI/127/82, Rev. 1., No. 79/831, annex V, part C, Brussels, Belgium; 1982.
6. Spurgeon, D.J.; Hopkin, S.P. Extrapolation of the laboratory-based OECD earthworm toxicity test to metal-contaminated field sites. Ecotoxicol. 4:190-205;1995.
7. Stenersen, J. Action of pesticides on earthworms. Part I: The toxicity of cholinesterase-inhibiting insecticides to earthworms as evaluated by laboratory tests. Pestic. Sci. 10:66-74; 1979.
8. Stenersen, J. Action of pesticides on earthworms. Part II: Elimination of parathion by the earthworm *Eisenia foetida* (Savigny). Pestic. Sci. 10:104-112;1979.
9. Stenersen, J.; Brekke, E.; Engelstad, F. Earthworms for toxicity testing: Species differences in response towards cholinesterase inhibiting insecticides. Soil Biol. Biochem. 34:1761-1764; 1992.
10. Labrot, F.; Ribera, D.; Saint Denis, M.; Narbonne, J.F. *In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: Lipid peroxidation, acetylcholinesterase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. Biomarkers 1:21-28;1996.
11. Hassall, K.A. The chemistry of pesticides. New York: Macmillan; 1982.
12. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254;1976.
13. Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V. Jr.; Featherstone, R.M. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7:88-95;1961.
14. Scaps, P.; Demuyne, S.; Descamps, M.; Dhainaut, A. Biochemical and enzymatic characterization of the cholinesterase of *Nereis diversicolor* (Annelida, Polychaeta): Comparison with those of *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). Biol. Bull. 190:396-402;1996.
15. Koelle, G.B.; Friedenwald, J.S. A histochemical method for localizing cholinesterase activity. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 70:617-622;1949.
16. Selander, R.K.; Smith, M.H.; Yang, S.Y.; Johnson, W.E.; Gentry, J.B. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus* I. Variation in the old-field mouse (*Peromyscus polionotus*). In: Wheeler, M.R. (ed). Studies in Genetics, Vol. 6. Austin, TX: University of Texas; 1971:49-90.
17. Ireland, M.P.; Richards, K.S. Metal content, after exposure to cadmium, of two species of earthworms of known differing calcium metabolic activity. Environ. Pollut. 26A:69-78; 1981.
18. Honneycutt, M.E.; Roberts, B.L.; Roane, D.S. Cadmium disposition in the earthworm *Eisenia fetida*. Ecotox. Environ. Saf. 30:143-150;1995.
19. Schmidt, G.H.; Ibrahim, N.M. Heavy metal content (Hg²⁺, Co²⁺, Pb²⁺) in various parts: Its impact on cholinesterase activity and binding glycoproteins in the grasshopper *Aiolopus thalassinus* adults. Ecotoxicol. Environ. Saf. 29:148-164;1994.
20. Bocquene, G.; Bellanger, C.; Cadiou, Y.; Galgani, F. Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species. Ecotoxicol. 4:266-279; 1995.
21. Oien, N.; Stenersen, J. Esterases of earthworms-III electrophoresis reveals that *Eisenia fetida* (Savigny) is two species. Comp. Biochem. Physiol. 78C:277-282;1984.
22. Bouché, M.B. Lombriciens de France-Ecologie et systématique. Paris: Inst. Natn. Rech. Agron.; 1972:671 pp.

Heavy metal accumulation by *Eisenia fetida* and its effects on Glutathione-S-Transferase activity

Claire Grelle and Michel Descamps

Ecophysiologie d'Invertébrés du Sol, Laboratoire de Biologie animale, Université de Lille I, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Accepted: 5. February 1998

Summary. Bioaccumulation of cadmium, zinc and lead by *Eisenia fetida typica* exposed to five contaminated field soils was studied. Worms regulate zinc burdens but not cadmium or lead. No linear regression was found relating worm cadmium burdens to total amount in soils, most likely due to differences of bioavailability. Ammonium acetate, calcium chloride and water extraction techniques of heavy metals from soils were tested and related to worm burdens. Except for zinc, which is more closely related to less drastic extraction techniques, total soil content of metal seems to be the most interesting to relate worm heavy metal burdens. Moreover, the effects of cadmium, zinc, lead, and copper chloride on worm glutathione-S-transferase activities were studied in vitro and in vivo. GST activity appears not to be affected by heavy metal bioaccumulation as no statistically significant effects were observed neither in vivo nor in vitro on total GST activity.

Key words: Heavy-metals, bioaccumulation, bioavailability, *Eisenia fetida*, glutathione-S-transferase

Introduction

Metal pollution may disturb soil ecosystems by affecting the structure of soil invertebrate populations. As earthworms are very well represented in soil, and as they play an important role in soil bioturbation and degradation of organic litter, a great deal of attention has been paid to their susceptibility to heavy metals. Laboratory and field studies regarding metal uptake by earthworms have shown that some metals such as cadmium, lead, zinc and copper are substantially concentrated in worms tissues (Scaps et al. 1997; Neuhauser et al. 1995; Spurgeon & Hopkin 1996b; Marinussen et al. 1997). Bioconcentration of heavy metals in worms depends on soil metal burdens but also on their bioavailabilities (Spurgeon & Hopkin 1995, 1996b). Generally, it has been found that various factors such as clay, organic matter content or pH influence the bioconcentration of metals (Abdul Rida & Bouché 1997; Spurgeon & Hopkin 1996b).

Another observation made in the literature concerns the lack of worms in highly contaminated fields (Spurgeon & Hopkin 1995). Several studies in artificially contaminated soil suggest that growth and reproduction performances are affected by heavy metals (Reinecke &

Correspondence to: M. Descamps, E-mail: Michel.Descamps@univ-lille1.fr

Reinecke 1996; Spurgeon & Hopkin 1996a). Nevertheless, little is known about effects of heavy metals on worm detoxification enzymes. Scaps et al. (1997) showed no observable effect of cadmium or lead on cholinesterase or on other metabolic enzyme pathways, but Goven et al. (1994) showed a negative effect of copper on lysosyme activity.

In vertebrates, since glutathione seems to serve as a first line of defence against heavy metal cytotoxicity prior to induction of metallothioneins (Susuki et al. 1996), several studies on the effects of metals on glutathione-S-transferases (GST) have been conducted. GST may play an important role in association with metallothionein-like lead-bound protein and zinc metallothioneins in the detoxification of lead (Susuki et al. 1996).

In invertebrates, Almar et al. (1987), using the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, found that cadmium exposure reduces GST activity in the hepatopancreas. Thaker and Haritos (1989) reported that cadmium exposure affects enzyme activity in the hepatopancreas of the shrimp *Callinassa tyrrhena*, producing in vivo increases in glutathione-S-transferase activity and esterase activity. In a species of crayfish *Astacus astacus*, it was found that after cadmium or lead exposure, the activity of three enzymes in the gills and hepatopancreas, namely succinic dehydrogenase, NADPH-cytochrome P450 reductase, glutathione-S-transferase, decreased (Meyer et al. 1991). Since glutathione-S-transferase seems to be an important group of enzymes which have a high activity in worms (Stenersen 1984), the effects of cadmium, lead, copper and zinc on GST activities of worms were studied.

In this paper, bioconcentrations of cadmium, zinc and lead by *Eisenia fetida* exposed to five contaminated field soils, collected in the vicinity of a zinc and lead smelter, were measured. To further investigate the relationships between bioconcentration and bioavailability of metals, total ammonium acetate and calcium chloride extractable metal contents of the five types of soils were measured. After six weeks of exposure, GST activity of the contaminated worms was then measured. In vitro activity of enzyme under heavy metals conditions were also tested.

Materials and Methods

Soil analysis

Five contaminated sites in the vicinity of a lead and zinc smelting works (located at Noyelles-Godault, between Lens and Douai, Northern France) were chosen according to their distance and exposure to wind (IA: 1.1 km N; IB: 0.75 km N; IC: 0.75 km N/NW; II: 0.75 km NW; III: 2.5 km E/SE). Soil was collected from the top 10 cm layer after removing surface vegetation. Prior to analysis, samples were oven dried (80 °C) to constant weight, pulverized and sieved (2 mm mesh size). Samples were treated as described in Scaps et al. (1997) with an adapted normalized method (NF X 31-151, AFNOR 1994) being digested with concentrated nitric and hydrochloric acid. The potentially available fractions of metals in soil were determined according to the NF X 31-120 (AFNOR 1994) after being extracted with ammonium acetate and EDTA. Fractions extractable by CaCl₂ (0.01 M) were measured at the «Laboratoire d'Analyses des Sols of I.N.R.A. d'Arras». Concentrations of cadmium, lead or zinc in soil or animal samples were determined by flame atomic absorption spectrophotometry (Varian Spectr-AA-10) using an air acetylene flame with deuterium lamp background correction. The same samples were also analysed by ICP AES (Varian Liberty Serie II, data not shown), giving comparable results for the three metals studied. Soil pH was measured on water extracts. Assessment of carbonates was made by HCl digestion in a closed vessel according to the NF X 31-105 method (AFNOR 1994). The volume of carbon dioxide which is produced is measured. Carbonate contents (% dry weight) were then determined with respect to a calcium carbonate calibration curve.

Determination of organic carbon was performed with an adapted sulphochromic oxidation (HACH 1989). Absorbance was measured at 610 nm with a HACH DR/2000 spectrophotometer. In order to determine total nitrogen content, a sulphuric acid and hydrogen peroxide digestion (Digesdahl digestion apparatus-HACH 32130-20) of soils was performed. Digested samples were then treated as described in HACH (1989).

Animals analysis

In all experiments we used *Eisenia fetida typica*. Ten adult specimens of *Eisenia fetida typica* were maintained in each exposure tank containing 200 g of contaminated soil. Three replicates were used for each designated sample of soil and the experiment lasted 6 weeks. Worms in each container were fed metal-free lime foliage and distilled water was added to give a moisture content of 30% wet weight. Controls were established under in the same condition but in metal-free commercial mould (coniferous bark and peat moss compost). After the exposure, earthworms were removed from their containers, rinsed in tap water and transferred to moist filter paper to void the gut content.

After two periods of exposure (21 days and 31 days), earthworms were digested as previously described (Scaps et al. 1997). Enzyme activity was measured after 6 weeks of exposure. Homogenates of worms were made in 5 ml Tris HCl (20 mM, pH 7.4, 4°C) buffer, centrifuged for 15 min at 2800 g (Beckman J2-21M/E) and the supernatants were frozen at -20°C. Before use, aliquots were centrifuged again for 30 min (4°C) at 17600 g (Sigma 2k15). Protein content and GST activity of the supernatant were determined according to the methods of Bradford (1976) and Habig et al. (1974) respectively, adapted for a microplate reader (Dynatech MR 5000). For protein content measurements, Bio-rad protein reagent was added to diluted tissue extract as described by Scaps et al. (1997), absorbance was read at 610 nm and the protein content of the sample determined with respect to a globulin calibration curve. GST activity was assayed in 250 µl of 50 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) with CDNB as electrophilic substrate (1 mM final) and GSH (1 mM final) as the second substrate.

In order to test the effects of heavy metals on GST activities in vitro, ZnCl₂, CuCl₂, CdCl₂, and PbCl₂ were added separately to samples of worm homogenates. Final concentrations of 200 µM ZnCl₂, 200 µM CuCl₂, 200 µM CdCl₂, 40 µM PbCl₂ were separately obtained and tested as described previously. Worms living in an artificially contaminated environment (80 mg/kg of CdCl₂ in soil) for two years were also analysed. All measurements for each condition were made in four replicates.

Results

Soil analysis

The levels of ammonium acetate-EDTA (NH₄Ac), calcium chloride (CaCl₂) extracted and total or nitric acid extractable (NAX), zinc, cadmium and lead for all contaminated field soils are shown in Table 1. A very high standard deviation for lead NAX content of site II soils (513 ± 390) can be explained by a very high heterogeneity of the samples (240 µg/g to 2269 µg/g dry weight). This phenomenon was not observed for zinc, suggesting a subsequent lead pollution type of certain samples. NH₄Ac extracted heavy metals are very significantly correlated to total (NAX) content (*r* test: *P* < 0.001) for all the three metals: $y = 0.884x - 258$, $r^2 = 0.97$ for lead, $y = 0.577x + 0.86$, $r^2 = 0.99$ for cadmium, $y = 0.329x - 32$, $r^2 = 0.95$ for zinc. NH₄Ac extracted heavy metal contents were approximately proportional to NAX contents. The percentage of extraction represented by the slope parameter is about to 88% for lead, 57.7% for cadmium and 32.9% for zinc. The only correlation found was between NAX and NH₄Ac extracted metals. No correlation was found with other tested parameters (organic matter content: OM%, calcium carbonate content: CaCO₃%, nitrogen content: NTK).

Concentration of metals in exposed earthworms

No mortality of *Eisenia fetida* occurred in the contaminated soil exposure tanks. The uptake of cadmium, zinc and lead is shown in Table 2. For cadmium and lead, the bioconcentration (ratio of metal content weight to total dry tissues weight) clearly increased with exposure time. Bioaccumulation factors (ratio of bioconcentration to total soil concentration) were calculated for each soil type after 31 days of exposure. These accumulation factors for cadmium are very variable between soil types: 0.67 for IB-soil (the most contaminated, Table 1) to 3.18 for IC-soil. Except for IB-soil, bioconcentration factors are higher than one.

Table 1. Heavy metal contents ($\mu\text{g/g}$ dry weight) of soil collected in the vicinity of a zinc and lead smelter located at Noyelles-Godault, between Lens and Douai (Nord-Pas de Calais, France). All values are the average of at least three replicate samples. Values in brackets give the SD. (NH_4Ac): ammonium acetate extractable heavy metals. (NAX): nitric acid extractable heavy metals. (CaCl_2): calcium chloride extractable heavy metals. OM (%): Organic matter content. CaCO_3 (%): Calcium carbonate content. NTK: Kjeldahl extractable nitrogen content

Sample	pH	OM (%)	CaCO_3 (%)	NTK mg g^{-1} dry wt	Cd (NAX) $\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt	Pb (NAX) $\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt	Zn (NAX) $\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt	Cd (NH_4Ac) $\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt	Pb (NH_4Ac) $\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt	Zn (NH_4Ac) $\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt	Cd (CaCl_2) $\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt	Pb (CaCl_2) $\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt	Zn (CaCl_2) $\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt
IA	7.3	2	0.7	1.8 (0.04)	13 (2.83)	798 (117.7)	973 (37.16)	5.5 (0.091)	538 (46.2)	207 (44.0)	0.21	<0.2	1.2
IB	7.3	11.6	0.3	5.35 (0.28)	89 (2.58)	4204 (529.45)	5581 (627.5)	52 (1)	3576 (178.2)	1860 (72.1)	5.05	2.6	159.70
IC	7.5	7.1	<0.1	7.14 (0.24)	29 (2.41)	1509 (116.48)	920 (126.21)	16 (1.04)	569 (60.82)	356 (32.74)	3.69	3.4	120.50
II	7.6	1.9	4	0.88 (0.45)	<0.5	513 (390)	463 (32.14)	<0.5	12.2 (1.07)	66 (11.10)	0.04	0.2	0.2
III	6.6	8.2	<0.1	3.12 (0.53)	24 (10.66)	687 (126.6)	1242 (507.05)	16 (5.96)	479 (60)	677 (281.45)	3.8	1.30	174.4
control	6.8	19.5	<0.1	9	<0.5	<5	<0.4	<0.5	<5	<0.4	–	–	–

Table 2. Bioconcentration of zinc, cadmium and lead by earthworms living in collected soils after two exposure times of 24 and 31 days. All values are the average of three replicate samples of ten adult specimens, values in brackets give the SD. Accumulation factor: ratio of bioconcentration (day 31) to total soil concentration

Sample	Zinc ($\mu\text{g/g}$ dry wt)			Cadmium ($\mu\text{g/g}$ dry wt)			Lead ($\mu\text{g/g}$ dry wt)		
	day 24	day 31	accumul. factor	day 24	day 31	accumul. factor	day 24	day 31	accumul. factor
IA	118 (20)	175 (28)	0.18	27 (3)	34 (4)	2.63	93 21	99 (10)	0.12
IB	191 (22)	174 (3)	0.03	56 (17)	60 (4)	0.67	521 (86)	534 (58)	0.13
IC	168 (18)	202 (81)	0.22	74 (5)	92 (7)	3.18	305 (31)	327 (63)	0.22
II	104 (10)	117 (9)	0.25	23 (5)	25 (12)	–	100 (15)	81 (24)	0.16
III	137 (12)	303 (99)	0.24	58 (4)	66 (3)	2.76	93 (11)	134 (5)	0.19
control	132 (8)	132 (24)	–	<0.5	<0.5	–	<5	<5	

Lead is also concentrated by worms, but to a lesser extent; the highest accumulation factors were found for IC (0.217) and III (0.196) soil type. Concerning zinc accumulation, the highest accumulation factor was found for II-soil and the lowest for IB-soil. It must be noticed that the soil of site II is the least contaminated, and has a very low organic matter content (1.9%). At the opposite extreme, IB-soil has a very high OM content (11.6%) with very high heavy metal contents.

In contrast with lead and zinc, worm cadmium burdens could not be related to soil content using a linear model. After 24 days of exposure, the relationship between the log of worm lead burdens to NAX soil values was significant: $P < 0.01$ (Fig. 1a). Log worm lead burdens related to log NH_4Ac soil values gave a less significant correlation: $y = 0.794x - 0.088$, $r = 0.816$ ($P < 0.05$) in contrast to the zinc values. Indeed, the correlation coefficient for log of

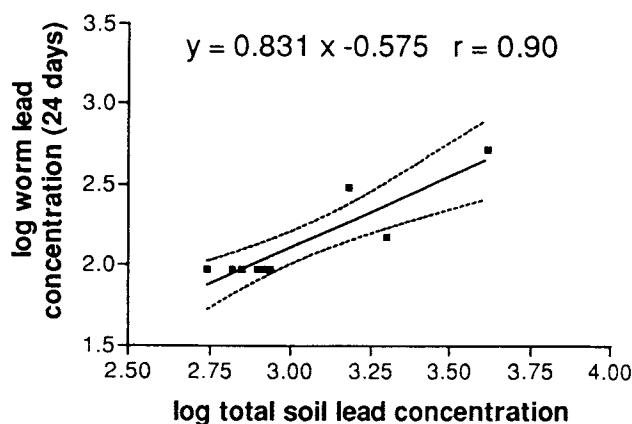


Fig. 1a. Lead concentration in worms after 24 days in contaminated soil, in relation to the nitric acid extractable field soil fractions. Regression equation and 95% of confidence intervals are given

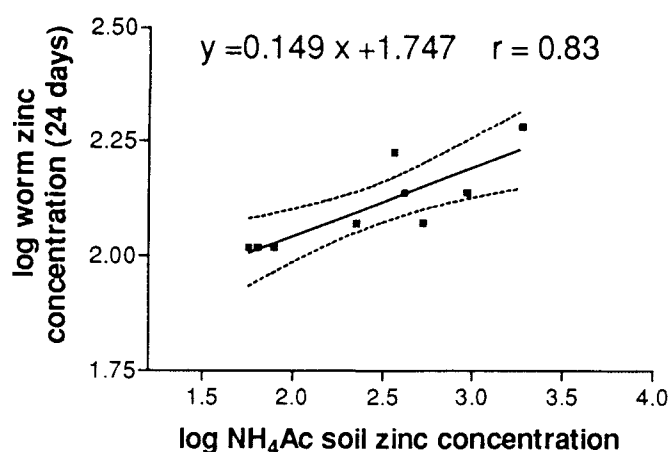


Fig. 1b. Zinc concentration in worms after 24 days in contaminated soil, in relation to the ammonium acetate extractable field soil fractions. Regression equation and 95% of confidence intervals are given

worm zinc burdens and log NH_4Ac extractable zinc (Fig. 1b): $r = 0.83$ ($P < 0.01$), was higher than for nitric acid extractable metal: $y = 0.227x + 1.43$, $r = 0.82$, indicating that worm burdens were more closely related to NH_4Ac extractable zinc than to NAX concentrations. Whatever the reason, the slope parameters for the two relationships with zinc are far below one, indicating that the accumulation of zinc in tissues may be regulated; this phenomenon has previously been observed by Spurgeon & Hopkin (1996b). This was not observed for lead. Concerning CaCl_2 extracted heavy metal content, one has to note that lead is under the detection limits for two soil types (IA and II); thus, it is not possible to draw any conclusion from these results. Cadmium extracted by this technique is far below the amount found in the worm tissues; therefore CaCl_2 extraction does not provide a reliable estimation of worm cadmium content.

Effect of heavy metals burdens on GST activities

GST activities of worms were measured after 6 weeks of exposure in the different contaminated soils. For comparison, worms living in commercial mould (in which no zinc, cadmium or lead has been detected) were subjected to the same treatment. Mean activities and SD (nkat/g of protein) are shown in Fig. 2. Differences between means of enzyme activities were tested for statistical significance by ANOVA. No significant differences between the control group and heavy metal exposed worms were found.

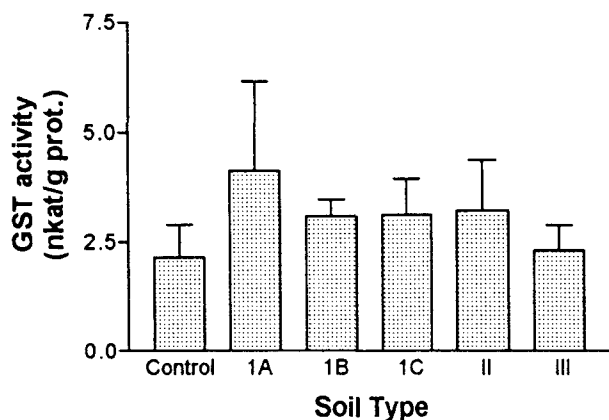


Fig. 2. GST activities (nkat/g prot.) in whole worms *Eisenia fetida* after 6 weeks of exposure to heavy metal contaminated soils. Mean and SD

In vitro effects of zinc, cadmium, lead and copper on GST activities of normal or "contaminated" worms (living and reproducing in artificially polluted soil with 80 mg/kg of CdCl₂ for two years) have been measured. Mean activities and SD are shown in Table 3. No significant differences between the control group and worms born and reproducing in cadmium artificially contaminated soil were found. No effect of any of these four metals was observed at these concentrations for any group of worms.

Table 3. Effects of zinc, cadmium, lead, or copper on GST activities (nkat/g prot.) in vitro in whole *Eisenia fetida* according to treatment. Means and SD of four replicates

Control worms					worms living in polluted soil (80 mg/kg CdCl ₂)				
control	zinc	cadmium	lead	copper	control	zinc	cadmium	lead	copper
1.21	1.21	1.20	1.13	1.10	1.27	1.29	1.23	1.06	1.00
±0.10	±0.18	±0.04	±0.37	±0.20	±0.22	±0.14	±0.42	±0.25	±0.12

Discussion

Cadmium uptake by earthworms is very efficient and the total burdens of worms are much greater than the Total or NH₄AC or CaCl₂ extracted soil content. This result is comparable to that found in other studies concerning different species of worms (Ma et al. 1983; Ireland 1979). Moreover, it was suggested by Neuhauser et al. (1995) that bioconcentration of worms collected in contaminated fields depends on the metal concentration in the soil, and that bioconcentration was greater at lower heavy metal concentrations. Such a phenomenon was observed in our experiments for cadmium uptake from IB-soil: worms living in the most contaminated soil (IB) had a smaller cadmium concentration factor. Nevertheless, other factors may explain the differences observed. Generally, it has been found that solubility and expected availability of contaminants to organisms were influenced by several soil factors such as pH, metal concentrations, organic matter or clay content (Spurgeon & Hopkin 1996b; Abdul Rida & Bouché 1997), zinc and cadmium being more soluble at lower pH and percentage OM values (Crommentuijn et al. 1997). In our experiments, IB-soil had a very high organic matter content (11.6%) and probably a low availability of metals.

Different chemical extraction techniques of metals have been tried by different authors to compare and evaluate the best expression of these results with earthworm heavy metal body burdens. Abdul Rida & Bouché (1997) observed that, generally, acid acetic or DTPA (diethylene triamine pentaacetic acid) extracted heavy metal fractions did not give better estimates of assimilable metals by earthworms than did total extraction. CaCl₂ extraction, useful for the estimation of availability of metals for plant uptake, cannot be used for estimation of Cu availability (Marinussen et al. 1997), since the 0.01 M extractable heavy metal contents were close to or below the determination limit. We found comparable results for lead. Moreover, Spurgeon et al. (1996b) observed that worm zinc burdens of exposed *Eisenia fetida* were more closely related to water soluble than nitric acid extracted concentration. In our experiments, except for zinc, water extractable contents of cadmium or lead were below the determination limit (data not shown). Water extraction of heavy metals seems to be unreliable (except for high zinc levels) and cannot be used to mimic bioavailability of metals to earthworms.

In conclusion, except for zinc, which seems to be more closely related to less drastic extraction techniques, total soil content of metals seems to be the most interesting technique to predict worm heavy metal burdens.

Worm heavy metal detoxification may involve metallothioneins (Susuki et al. 1980; Yamamura et al. 1981). Glutathione and glutathione-S-transferase system are also important in intracellular protection against toxic metals, oxidative mechanisms or xenobiotic substances. Though inducibility of GST with lead or copper has been found in several vertebrates (Susuki

et al. 1996; Manjeet & Ravindra 1996; Martinez-Lara et al. 1996), we observed no induction effect in the worm *Eisenia fetida typica*. The original function of GST in worms is not yet clear but its non-inducibility, as also for mixed-function-oxygenase system by organic compounds, seems to be a common phenomenon (Milligan et al. 1986; Stokke & Stenersen 1993; Borgerras et al. 1996). It may be suggested that the non-inducibility, compared to herbivorous arthropods or mammals is due to their detritus diet. The ability of enzyme induction has probably evolved as an adaptation to toxic secondary plant metabolites (Brattsten et al. 1977; Yu 1982).

The intrinsic function of GST in worms may be to support excretion of endogenous catabolic products, rather than to support detoxication of xenobiotics (Stenersen 1984). A ligand function of earthworm GST cannot be excluded (Stenersen & Øien 1981). No inhibition of GST by heavy metals was observed in worm extracts, in contrast to what has been observed in vitro in rat livers (Dierickx 1982). In vivo inhibition of oxidative enzymes by cadmium or lead has been observed in several aquatic invertebrates such as mussels (Prakash & Rao 1995), crayfish (Meyer 1991; Almar et al. 1987) or dragonfly larvae (Meyer et al. 1986). Nevertheless, the authors always notice that these effects are tissue or organ dependent (Almar et al. 1987; Meyer et al. 1991). Moreover, a decrease of enzyme activity in tissue where heavy metals are concentrated has generally been observed. In worm, although heavy metals are essentially concentrated in chloragogenous cells (Ireland & Richards 1981), the level of GST in these cells is low, whereas the higher activity of enzymes is found in the nephridia (Stenersen & Øien 1981). This may explain why no effect can be observed in vivo or in vitro on the whole worms.

Acknowledgements

The authors would like to thank Ms R. Leroux for her technical assistance, the "Institut National pour la Recherche Agronomique d'Arras" for extractable heavy metal measurements and Ms C. Engel for improving the English of this article. This work was supported by funds from PRC "Environnement et activités humaines: Etude d'un secteur pollué par les métaux" from Conseil Régional: Nord-Pas-de-Calais.

References

- Abdul Rida, A. M. M., and Bouché, M. B. (1997) Heavy metal linkages with mineral, organic and living soil compartments. *Soil Biology and Biochemistry* 29, 649–655.
- AFNOR (1994) Recueil de normes françaises 1994 – Qualité des sols. AFNOR publications, Paris.
- Almar, M. M., Díaz-Mayans, J., Romero, F. J. (1987) Glutathione content and GSH S-transferase activity in midgut gland of *Procambarus clarkii*. Sex differences, the effect of fasting and their implication in cadmium toxicity. *Comparative Biochemistry and Physiology* 87C, 433–435.
- Borgerras, J., Nilsen, K., Stenersen, J. (1996) Methods for purification of glutathione transferases in the earthworm genus *Eisenia* and their Characterisation. *Comparative Biochemistry and Physiology* 114C, 129–140.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Brattsten, L. B., Wilkinson, C. F., Eisner, T. (1977) Herbivore plant interactions: mixed function oxidases and secondary plants substances. *Science* 196, 1349–1352.
- Crommentuijn, T., Doornekamp, A., Van Gestel, C. A. M. (1997) Bioavailability and ecological effects of cadmium on *Folsomia candida* (Willem) in an artificial soil substrate as influenced by pH and organic matter. *Applied Soil Ecology* 5, 261–271.
- Dierickx, P. J. (1982) In vitro inhibition of the soluble glutathione S-transferases from rat liver by heavy metals. *Enzyme* 27, 25–32.
- Goven, A. J., Fitzpatrick, L. C., Venables, B. J. (1994) Chemical toxicity and host defense in earthworms. In: Beck, G., Cooper, E. L., Habicht, G. S., Marchalonis, J. J. (eds) Primordial immunity: Foundations for the vertebrate immune system. *Annals of the New York Academy of Sciences* Vol. 712. New York.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B. (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biology and Biochemistry* 249, 7130–7139.
- HACH (1989) DR/2000 Spectrophotometer Handbook. HACH compagny. Loveland, Colorado.

- Ireland, M. P. (1979) Metal accumulation by the earthworms *Lumbricus rubellus*, *Dendrobaena veneta* and *Eiseniella tetraeda* living in heavy metal polluted sites. *Environmental Pollution* 19, 201–206.
- Ireland, M. P. and Richards, K. S. (1981) Metal content after exposure to cadmium of two species of earthworms of known differing calcium metabolic activity. *Environmental Pollution* 26A, 69–78.
- Ma, W., Edelman, T., Van Beersum, I., Jans, T., (1983) Uptake of cadmium, zinc, lead and copper by earthworms near a zinc smelting complex. Influence of soil pH and organic matter. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 30, 424–427.
- Manjeet, S., and Ravindra, N. (1996) Induction of hepatic glutathione S-transferase (Pi) activity in rhesus monkey by cadmium. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 9, 41–46.
- Marinussen, M. P. J. C., Van der Zee, S. E. A. T. M., De Haan, F. A. M. (1997) Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field condition. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 36, 17–26.
- Martinez-Lara, E., Toribio, F., Lopez-Barea, J., Barcena, J. A. (1996) Glutathione S-transferase isoenzyme patterns in the gilthead seabream (*Sparus aurata*) exposed to environmental contaminants. *Comparative Biochemistry and Physiology* 113C, 215–220.
- Meyer W., Harisch, G., Sagredos, A. N. (1986) Biochemical and histochemical aspect of lead exposure in dragonfly larvae (Odonata: Anisoptera). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 11, 308–319.
- Meyer, W., Kretschmer, M., Hoffman, A., Harisch, G. (1991) Biochemical and histochemical observations on effects of low-level heavy metal load (lead and cadmium) in different organ systems of the freshwater crayfish, *Astacus astacus* L. (Crustacea-Decapoda). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 21, 137–156.
- Milligan, D. L., Babish, J. G., Neuhauser, E. F. (1986) Non inducibility of cytochrome P-450 in the earthworm *Dendrobaena veneta*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 85C, 85–87.
- Neuhauser, E. F., Cukic, Z. V., Malecki, M. R., Loehr, R. C., Durkin, P. R. (1995) Bioconcentration and biokinetics of heavy metals in the earthworm. *Environmental Pollution* 89, 293–301.
- Prakash, N. T., Rao, K. S. (1995) Modulation in antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalve *Perna viridis* during heavy metal exposure. *Molecular and Cellular Biochemistry* 146, 107–113.
- Reinecke, A. J., and Reinecke, S. A. (1996) The influence of heavy metals on the growth and reproduction of the compost worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Pedobiologia* 40, 439–448.
- Scaps, P., Grelle, C., Descamps, M. (1997) Cadmium and lead accumulation in the earthworm *Eisenia fetida* (Sav.) and its impact on cholinesterase and metabolic pathway enzyme activity. *Comparative Biochemistry and Physiology* 116C, 233–238.
- Spurgeon, D. J., and Hopkin, S. P. (1995) Extrapolation of the laboratory-based OECD earthworm toxicity test to metal-contaminated field sites. *Ecotoxicology*, 4, 190–205.
- Spurgeon, D. J., and Hopkin, S. P. (1996a) Effects of metal contaminated soil on the growth, sexual development and early cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*, with a particular reference to zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 35, 86–95.
- Spurgeon, D. J., and Hopkin, S. P. (1996b) Effects of variation of the organic matter content and pH of soils on the availability and toxicity of zinc to the earthworm *Eisenia fetida*. *Pedobiologia* 40, 80–96.
- Stenersen, J. (1984) Detoxication of xenobiotic by earthworms. *Comparative Biochemistry and Physiology* 87C, 249–252.
- Stenersen, J., and Øien, N. (1981) Glutathione S-transferases in earthworms (Lumbricidae) substrate specificity, tissue and species distribution and molecular weight. *Comparative Biochemistry and Physiology* 69C, 243–252.
- Stokke, K., and Stenersen, J. (1993) Non inducibility of the glutathione transferases of earthworm *Eisenia andrei*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 106C, 753–756.
- Susuki, K. T., Yamamura, M., Mori, T. (1980) Cadmium-binding proteins induced in the earthworm. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 9, 415–424.
- Susuki, T., Morimura, S., Diccianni, M. B., Yamada, R., Hochi, S. I., Hirabayashi, M., Yuki, A., Nomura, K., Kitagawa, T., Imagawa, M., Muramatsu, M. (1996) Activation of glutathione transferase P gene by lead requires glutathione transferase P enhancer I. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 1626–1632.
- Thaker, A. A., and Haritos, A. A. (1989) Cadmium bioaccumulation and effects on soluble peptides, proteins and enzymes in the hepatopancreas of the shrimp *Callinassa tyrrenna*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 94C, 63–70.
- Yamamura, M., Mori, T., Susuki, K. T. (1981) Metallothionein induced in the earthworm. *Experientia* 37, 1187–1189.
- Yu, S. T. (1982) Host plant induction of glutathione S-transferase in the fall armyworm. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 18, 101–106.

L'AUTOMETALLOGRAPHIE APPLIQUEE A UN MODELE OLIGOCHETE : *EISENIA FETIDA TYPICA*. AVANTAGES ET LIMITES DE LA TECHNIQUE

Claire GRELLE & Michel DESCAMPS

Laboratoire d'Ecophysiologie d'invertébrés du sol, Université de lillie I,
Bât. SN3, Biologie Animale 59650 Villeneuve d'Ascq

Résumé:

Dans le but de valider la technique d'autométagraphie en tant qu'outil de diagnostic pour la faune du sol, nous l'avons appliqué à l'oligochète *Eisenia fetida* en condition d'intoxication chronique par le cadmium (élevage dans un terreau contenant 80 mg/kg de cadmium). Nous avons recherché la présence de métal à la fois sur des coupes à la paraffine et sur des coupes à congélation de manière à minimiser les éventuelles pertes de métal dues à la fixation. Témoins et intoxiqués présentent un marquage important au niveau du tissu chloragène, à mettre en corrélation avec la présence de fer. Les seules différences observables chez les intoxiqués concernent d'une part un faible marquage au niveau de la cuticule et d'autre part la présence de terre cadmiée dans le tube digestif. Cette présence de terre n'est jamais observée chez les témoins et atteste d'un métabolisme perturbé. Compte tenu de la non spécificité des métaux vis-à-vis de la technique d'autométagraphie et à l'importante quantité de fer présente dans le tissu chloragène, nous concluons à l'impossibilité d'utiliser cette méthode comme outil de diagnostic chez l'oligochète *Eisenia fetida*.

Advantages and limits of autometallography : application to the earthworm *Eisenia fetida typica*.

In order to validate autometallography as a diagnostic tool for soil fauna, we have studied earthworms (*Eisenia fetida*) maintained in a cadmium contaminated soil (an hortical mould containing 80 mg/kg of cadmium). Autometallographic procedure was applied on paraffin sections (7 μ m) as well as on frozen sections (about 10 μ m), the latest in order to prevent the loss of metal due to the histological procedure (fixation, dehydration, paraffin embedding, etc.). Both controls and intoxicated animals showed silver deposits on chloragocytes, correlated to iron present in this cell type. The only differences observed in cadmium intoxicated animals concerned first a weak reaction over the cuticle and second, the presence of cadmiated soil in the digestive tract. The presence of non-digested soil in the digestive tract was never observed in controls and can be correlated to a disturbed physiology in intoxicated worms. As a conclusion, autometallography being not metal specific and due to the amount of iron always present in chloragocytes, the autometallographic procedure cannot be used as a diagnostic tool for soil contamination in the earthworm *Eisenia fetida*.

Introduction

Une activité industrielle importante a laissé dans la Région Nord-Pas de Calais de nombreuses friches et terrains pollués. Une des conséquences majeures de cette pollution est l'accumulation de métaux lourds dans la couche superficielle de certains sols. Cette concentration anormale en éléments étrangers entraîne parfois des altérations profondes de la biocoenose (flore et faune) nuisant à l'équilibre écologique du milieu.

Parmi les invertébrés jouant un rôle prépondérant dans la structuration des sols, les oligochètes sont particulièrement vulnérables aux pollutions métalliques, disparaissant alors parfois complètement. Les oligochètes sont capables d'accumuler d'importantes quantités de métaux (GRELLE & DESCAMPS, sous presse ; SCAPS *et al.*, 1997), vraisemblablement jusqu'à un seuil critique variable selon les espèces ou la biodisponibilité des métaux.

Chez les oligochètes, le cadmium est pour une grande partie stocké au niveau du tube digestif (plus de 60%) ainsi que dans la paroi du corps (HONEYCUTT *et al.*, 1995). Le tube digestif des oligochètes est entouré d'une couche de cellules, le tissu chloragène, composé de chloragocytes et d'éléocytes (in JAMIESON, 1981) qui intervient dans de nombreuses fonctions métaboliques (métabolisme et stockage du glycogène, des lipides, stockage des produits d'excrétion et de xénobiotiques, notamment les métaux lourds. Au sein des chloragocytes, on observe des structures concentriques denses aux électrons, les chloragosomes, contenant outre des sulfures et de la matière organique, du calcium, du magnésium et du phosphore. C'est au niveau de ces chloragosomes que se lie le plomb, très vraisemblablement à des ligands contenant du phosphore (MORGAN & MORGAN, 1989). Un deuxième type de granules, riches en soufre, est également observé et séquestre plus particulièrement le cadmium, lié alors vraisemblablement à des métallothionéines.

Lors d'une intoxication expérimentale, plusieurs techniques peuvent être envisagées afin de suivre le devenir des métaux (HOPKIN, 1989 ; CAJARAVILLE, 1995) :

- l'utilisation de précurseurs radioactifs qui seront métabolisés par l'animal. Cette technique est cependant très lourde et nécessite des précautions importantes de la part de l'expérimentateur ;
- la quantification des métaux par sonde à l'aide d'un microscope électronique est une méthodologie de choix mais qui reste onéreuse et peu envisageable en routine.
- la visualisation des métaux par autométallographie semble être une alternative satisfaisante pour l'étude de leur localisation et peut même dans certains cas être envisagée comme support d'une quantification (SOTO & MARIGOMEZ 1997). Il

s'agit par ailleurs d'une méthode relativement peu coûteuse pouvant être employée de façon routinière.

La technique autométallographique déjà appliquée avec succès à des invertébrés aquatiques (voir entre autres, CAJARAVILLE, 1995 ;). En ce qui concerne la faune du sol, la technique a également été appliquée avec succès au chilopode *Lithobius forficatus* L. (VANDENBULCKE et al., 1998 a, b) Cependant, comme ce myriapode présente une détoxification active, il est difficile de l'envisager comme modèle pour un outil de diagnostic et nous nous sommes tournés vers le modèle oligochète *Eisenia fetida* comme animal-test.

Matériel et méthodes

Animaux et méthode d'intoxication - La souche utilisée dans notre expérimentation est constituée d'*Eisenia fetida typica* vivant dans un terreau horticole contaminé au cadmium. La dose de 80 mg/kg a été choisie en fonction de dosages effectués sur le terrain, au voisinage d'une usine métallurgique. Avant toute manipulation, les vers sont systématiquement mis à jeûner environ une semaine sur du papier filtre humide afin de vider leur tube digestif de toute trace de terre.

Les vers vivent dans le sol contaminé et s'y reproduisent librement depuis environ trois années. Le taux moyen en cadmium des vers adultes se maintient aux environs de 80 mg/kg de poids sec.

Autométallographie - L'autométallographie est une technique d'autoamplification par l'argent de certains atomes métalliques qui est mise en évidence sur coupes par un procédé photographique (DANSCHER, 1981 ; DANSCHER *et al.*, 1987). L'autométallographie est une adaptation de la technique au sulfure d'argent de TIMM (1958), méthode qui permet de détecter les sulfures insolubles. Parmi ceux-ci se trouvent les sels de métaux toxiques, tels que le cadmium et le plomb (DANSCHER, 1981 ; DANSCHER *et al.*, 1987). De fait, en circonstances normales, la plupart des métaux présents dans les tissus sont précipités sous forme de sulfure suite au traitement par le sulfure de sodium (DANSCHER & SCHRÖDER, 1979). De ce fait, l'autométallographie n'est pas spécifique. Néanmoins, parmi toutes les techniques histologiques, c'est la plus sensible et la plus efficace pour visualiser les métaux sur coupe histologique (SOTO & MARIGOMEZ, 1995). De plus, dans le cas d'une expérimentation, les différences observées entre témoins et intoxiqués sont dues obligatoirement à l'intoxication par le métal.

Fixation et inclusion - Les pièces histologiques ont été immergées juste après prélèvement dans le sulfure de sodium (0,1 % dans un tampon phosphate 0,1 M, pH : 7.4) pendant 2 min

puis fixées dans une solution de glutaraldehyde (3 %, pH 7,4) pendant 15 min. Un nouveau traitement par le Na₂S (7 min) suit cette première phase, un bain d'une heure dans la solution de glutaraldehyde termine la fixation. Rincées 2 fois 5 min dans le tampon phosphate, les pièces histologiques sont déshydratées dans des bains d'alcool de concentrations croissantes (ethanol 70° : 30 min, 96 ° : 3 fois 30 min, 100° : 3 fois 1 heure, alcool butylique : 12 heures). L'imprégnation dans du paraplaste (*Paraplast Plus - Sherwood Medical Co.*) en fusion (60 °C) se fait dans 3 bains successifs en un minimum de temps (12 heures) afin d'éviter l'oxydation des sulfures métalliques.

Autométallographie - Des coupes, déparaffinées ou fraîchement décongelées sont plongées dans une solution de gélatine et séchées avant développement. Les lames, placées dans un récipient sont recouvertes par le révélateur physique, préparé juste avant l'emploi (composition : voir plus bas). Les récipients sont ensuite transférés dans un bain-marie à 26°C, à l'obscurité. Après un temps de développement de 90 min, déterminé par des essais préalables, les lames ont été rincées dans l'eau courante à 40°C pendant 45 min de manière à éliminer la gélatine et à réduire au maximum le bruit de fond. Les coupes sont enfin traitées par une solution de thiosulfate de sodium à 5% (10 min), rincées à l'eau distillée et colorées. Les coupes sont observées après montage.

Révélateur physique - Les solutions stock suivantes sont préparées : 1) solution de gomme arabique à 50%, préparée directement à partir des pastilles de résine d'acacia ; 2) tampon citrate, 25,5 g d'acide citrique 1 H₂O + 23,5 g de citrate de sodium 2H₂O en solution dans de l'eau déionisée pour un volume final de 100 ml ; 3) agent réducteur, 0,85 g d'hydroquinone en solution dans 15 ml d'eau déionisée ; 4) apport d'ions d'argent, 0,11 g de lactate d'argent en solution dans 15 ml d'eau déionisée. Tous les produits sont d'origine Sigma. Le révélateur final est confectionné en mélangeant 60 ml de solution 1, 10 ml de solution 2, 15 ml de solution 3 et 15 ml de solution 4 immédiatement avant l'emploi (DANSCHER, 1981).

Mise en évidence du fer : réaction au bleu de Prusse : Le fer ferrique présent dans les tissus est mis en évidence la technique au bleu de Prusse : les coupes déparaffinées sont traitées pendant 15 min dans une solution (v/v) fraîchement préparée de ferrocyanure de potassium à 2 % et d'acide chlorhydrique (2 %). Après rinçage, on effectuera une coloration des noyaux à l'azocarmin (15 min dans un mélange : Azocarmin 0.1g, acide acétique : 5 ml, H₂O : QSP 1 L).

Etude ultrastructurale en microscopie électronique - Les animaux sont anesthésiés au chloroforme et les tissus étudiés sont prélevés et fixés par le glutaraldéhyde (3 %) dans un tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4) pendant 2 heures. Après post-fixation par le tétr oxyde d'osmium (1 %) dans le même tampon (1 h), les pièces sont déshydratées et incluses dans

l'Epon (polymérisation à 60 °C pendant 48 h). Les coupes ultrafines (80-90 nm) contrastées à l'acétate d'uranyl et au citrate de plomb ont été observées grâce à un microscope électronique JEOL 100CX.

Résultats

Les images de marquage obtenue en autométallographie au niveau de l'intestin postérieur d'animaux témoins et intoxiqués sont présentés Figure 1, 2. On observe un marquage intense au niveau du tissu chloragogène chez les animaux témoins et chez les animaux intoxiqués. Un marquage du même type a pu être observé sur des coupes à congélation réalisées afin de vérifier que des interférences possibles dues à la fixation n'étaient pas à mettre en cause. Un faible marquage a pu être détecté au niveau de la cuticule et de l'épiderme et correspond vraisemblablement à une adsorption du métal ou à des particules de terre incrustées dans le tégument.

Ce marquage observé au sein du tissu chloragogène étant visiblement non spécifique du cadmium, nous avons cherché à identifier le métal responsable. Il est connu que le tissu chloragogène est riche en vacuoles contenant de l'hémoglobine et en sidérosomes contenant de la ferritine (In Jamieson 1981). Nous avons donc cherché à mettre en évidence le fer par une technique histochimique classique : la technique de mise en évidence du fer ferrique au Bleu de Prusse. Les images des coupes ainsi traitées sont présentée Figure 3, 4. Le fer apparaît comme extrêmement abondant dans le tissu chloragogène et peut certainement à lui seul expliquer l'intensité du marquage obtenu en autométallographie. Ce marquage obtenu n'est donc pas représentatif d'une intoxication mais est le reflet d'une activité métabolique sans lien avec le métal stocké.

Un autre fait observé mérite d'être mentionné : de nombreux résidus de terre cadmiée, non digérée mais marquée à l'argent ont été retrouvés dans le tractus intestinal des animaux intoxiqués. Ce phénomène n'étant jamais retrouvé chez les animaux témoins, il atteste vraisemblablement d'une mauvaise assimilation ou d'un métabolisme ralenti. Ceci peut être corroboré par la petitesse des animaux intoxiqués par rapport aux animaux témoins.

Une étude ultrastructurale des cellules intestinales et du tissu chloragogène a été réalisée en parallèle afin de déceler d'éventuels effets néfastes de la présence de cadmium dans les animaux. Aucune différence significative n'a pu être observée tant au niveau du tissu chloragogène qu'au niveau des cellules intestinales entre les animaux vivant dans la terre contaminée en cadmium et les animaux témoins. Par contre, de nombreux amas de glycogène caractéristiques d'un état de stress sont retrouvés dans les deux types cellulaires.

Discussion et conclusion

Compte tenu de la non spécificité de la technique vis à vis des différents métaux et contrairement à ce qui a été mis en évidence chez d'autres animaux (Myriapode Chilopode ou Mollusque Lamellibranche : VANDENBULCKE et al. a & b, SOTO & MARIGOMEZ 1997), il semble difficile d'utiliser cette technique chez les oligochètes ; en effet le stockage des métaux se fait au sein d'un tissu dont l'une des fonction est justement d'accumuler des déchets et d'autres métaux provenant du métabolisme normal. La visualisation du métal au niveau de la cuticule est trop aléatoire d'après ce qui a été observé pour être réellement utilisable.

D'autres expériences ont également été tentées en parallèle : Nous avons tenté de quantifier le cadmium sur coupes à la paraffine et à congélation par sonde à l'aide d'un microscope électronique à balayage environnemental (Electroscan : collaboration avec l'Ecole des Mines de Douai) qui aurait présenté l'avantage de pouvoir cartographier un tronçon relativement important (une coupe transversale entière par exemple) avec un minimum de préparation. Le même type d'expériences a été tenté avec un microscope analytique à rayon XGT-2000W (Oxford Instrument) sur des coupes à congélation épaisses (10 à 30 μm) et sur des intestins entiers d'animaux disséqués. Dans les deux cas, les résultats ont été peu concluants, la quantité de cadmium présent sur ce type de sections étant vraisemblablement insuffisante pour être détectable.

En conclusion si l'utilisation de l'autométallographie pour détecter les métaux polluants au sein des tissus animaux semble être une voie intéressante sur certains modèles (VANDENBULCKE et al, 1998, SOTO & MARIGOMEZ 1997), son utilisation sur l'Oligochète *Eisenia fetida* est rendue difficile de part le lieu même de stockage de la majeure partie des toxiques.

Remerciements

Le présent travail a reçu le soutien financier de la Région Nord-Pas de Calais (Programme de Recherches Concertées : « Evaluation d'un secteur pollué par les métaux en vue de sa requalification »).

Les auteurs souhaitent également remercier Mr Durr de l'Ecole des Mines de Douai, Mr Pasquier (Oxford Instrument), Mlle Leroux et Mr Brunet pour le soutien technique qu'ils ont apporté.

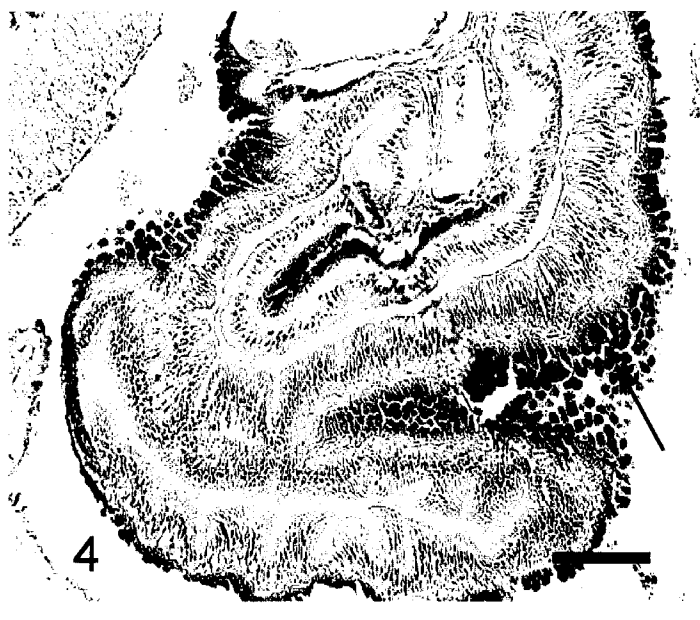
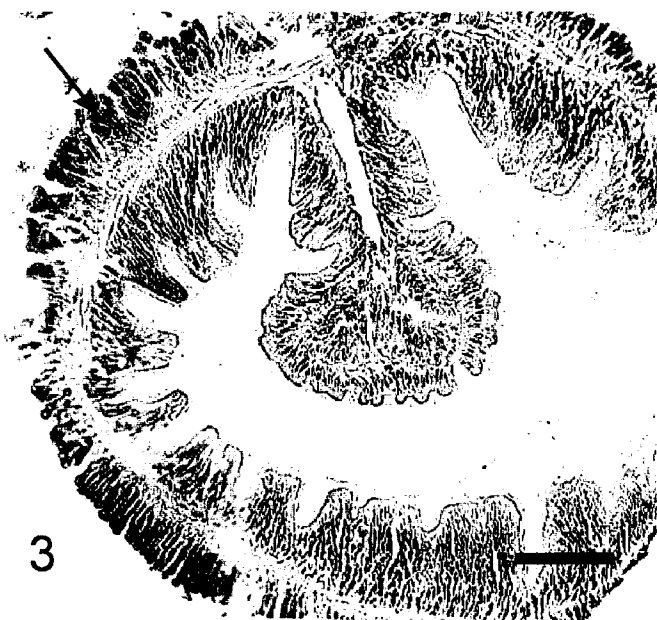
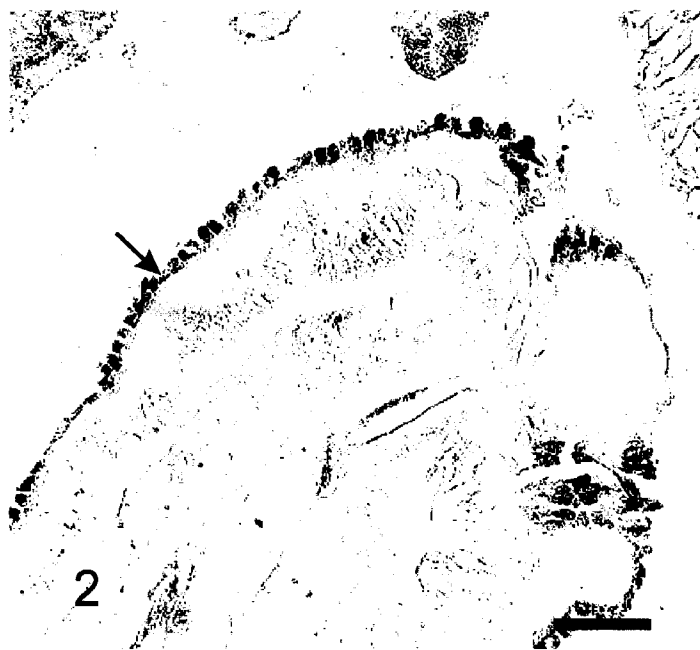
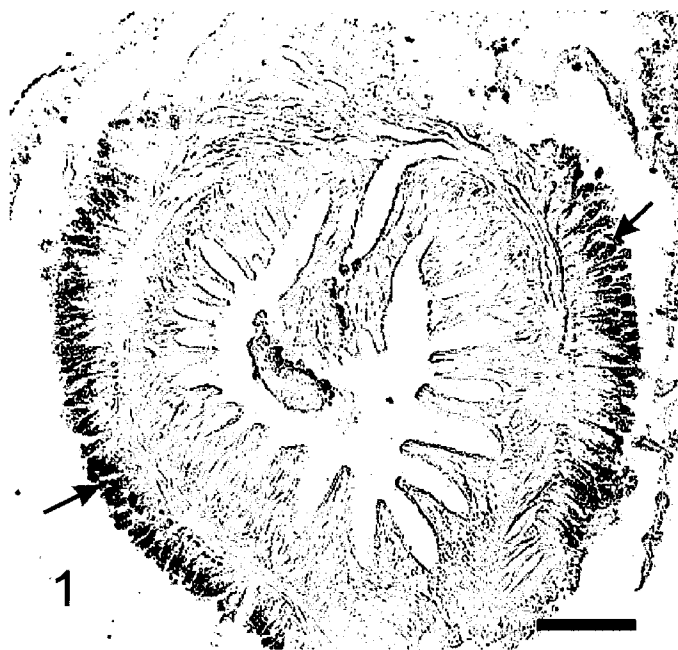


Figure 1, 2 : Marquage en autométallographie au niveau de l'intestin *Eisenia fetida* témoin (Fig. 1) et intoxiqué au cadmium (Fig. 2). Flèche : tissu Chloragogène, barre : 50 μ m

Figure 3, 4 : Marquage du fer au sein du tissu chloragogène chez *Eisenia fetida* témoin (Fig. 3) et intoxiqué au cadmium (Fig. 4). Flèche : tissu Chloragogène, barre : 50 μ m

REFERENCES

- CAJARAVILLE, M.P. (1995). - *Cell Biology in Environmental Toxicology*. University of the Basque Country Press Service, Bilbo.
- DANSCHER, G. (1981). - Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electronmicroscopy. *Histochemistry* **71**, 1-16.
- DANSCHER, G. & SCHRÖDER, H.D. (1979) Histochemical demonstration of mercury induced changes in rat neurons. *Histochemistry* **60**, 1-7.
- DANSCHER, G., RYTTER NORGAARD, J.O. & BAATRUP, E. (1987). - Autometallography: tissue metals demonstrated by a silver enhancement kit. *Histochemistry* **86**, 465-469.
- GRELLE, C. & DESCAMPS, M. (sous presse). - Heavy metal accumulation by *Eisenia fetida* and its effects on Glutathione-S-Transferase activity. *Pedobiologia*.
- HONEYCUTT, M.E., ROBERTS, B.L. & ROANE, D.S. (1995). - Cadmium disposition in the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotox. Environ. Saf.*, **30**, 143-150.
- HOPKIN, S.P. (1989). - *Ecophysiology of Metals in Terrestrial Invertebrates*. Elsevier Applied Science, New York.
- JAMIESON, B.G.M. (1981) - The ultrastructure of the Oligochaeta. Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco.
- MORGAN, J.E. & MORGAN, A.J. (1989). - The effect of lead incorporation on the elemental composition of earthworm (Annelida, Oligocheta) chloragosome granules. *Histochemistry*, **55**, 27-40.
- SCAPS, P., GRELLE, C. & DESCAMPS, M. (1997). - Cadmium and lead accumulation in the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny) and its impact on cholinesterase and metabolic pathway enzyme activities. *Comp. Biochem. Physiol.* **116C**, 233-238.
- SOTO, M. & MARIGOMEZ, I. (1995). - Techniques for the study of metals in cell biology. *In* : *Cell Biology in Environmental Toxicology* pp. 59-88, Cajaraville M.P. ed., University of the Basque Country Press Service, Bilbo.
- SOTO, M. & MARIGOMEZ, I. (1997). - Metal bioavailability assessment in « mussel-watch » programmes by automated image analysis of autometallographical black silver deposits (BSD) in digestive cell lysosomes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **156**, 141-150.
- TIMM, F. (1958). - Zur Histochemie der Schwermetalle, das Sulfid-Silber-Verfahren. *Deutsche Zeitschrift für die gesamte gerichtliche Medizin* **46**, 706-711.
- VANDENBULCKE, F., GRELLE, C., FABRE, M.-C. & DESCAMPS, M. (a, 1998). - Ultrastructural and autometallographic studies of the nephrocytes of *Lithobius forficatus* L. (Myriapoda Chilopoda): role in detoxification of cadmium and lead. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* **27**, 111-120.
- VANDENBULCKE, F., GRELLE, C., FABRE, M.-C. & DESCAMPS, M. (b, sous presse). - Implication of the midgut of the centipede *Lithobius forficatus* in heavy metals detoxification process. *Ecotox. Environ. Saf.*

*Discussion générale
et conclusion*

Discussion et conclusion

Avant de discuter de l'ensemble des résultats obtenus, il convient peut-être de les resituer par rapport aux objectifs initiaux de l'étude. Il s'agissait tout d'abord :

1- de réaliser un premier bilan de l'état de la faune invertébrée des sols au sein d'un espace très étendu et très varié tant du point de vue paysager que du point de vue de l'exploitation par l'homme et même du degré de pollution.

2- d'en déduire éventuellement le type de zone la plus pertinente à étudier de manière plus intense si on souhaite appréhender l'évolution globale de cette faune en fonction des degrés de pollution et d'apporter des informations qui seront utiles à la description voire à la mise au point d'un outil de diagnostic, d'un indice écologique de pollution par les métaux englobant la totalité de la faune du sol : détermination du niveau taxinomique le plus pertinent, de la période d'échantillonnage favorable, de l'intensité de l'effort et du type d'échantillonnage (piégeage, extraction au formol, berlesage).

3- De contribuer à la mise en oeuvre pratique sur le terrain d'outils biologiques (tests de toxicité, recherche de biomarqueurs) comme système de détection sensible des traces de métaux lourds.

4- de distinguer les groupes sensibles ou résistants aux pollutions qui pourraient être utilisés comme « sentinelle » ou sur lesquels des marqueurs d'effets précoces sont à rechercher.

Nous discuterons donc point par point de ces objectifs en les confrontant aux données recueillies :

1- Bilan de la faune invertébrée des différents sites

Le premier point qui sera soulevé concerne la généralisation ou l'extrapolation de l'ensemble des résultats obtenus sur l'étude des peuplements. Il convient en effet de conserver à l'esprit que l'ambition initiale de l'étude consistait tout d'abord à faire un premier bilan de l'état de la faune invertébrée du sol au sein d'un espace très étendu et très varié puisqu'il

regroupe plusieurs agglomérations. Dans un premier temps, nous avons donc prospecté et choisi différents sites les plus représentatifs possibles des différentes situations présentes dans la zone étudiée (zone cultivée, en friche, boisée, herbacée, humide ou sèche...). En plus de la variation des facteurs écologiques (couverture végétale, type de sols...), l'étude est rendue d'autant plus complexe que le degré de pollution des sols est lui aussi hétérogène au sein de la zone et donc d'un site choisi à l'autre. Nous avons d'ailleurs pu montrer que la biodisponibilité des métaux vis à vis de la faune était elle aussi variable en fonction de la nature du sol. Cette notion de biodisponibilité des métaux a été abordée à travers le modèle Oligochète et il est apparu qu'il s'agissait d'une notion fondamentale dans toute étude des effets des métaux sur la biocoenose qui doit nécessairement être conservée à l'esprit. En résumé, cette grande hétérogénéité inter-stations rend difficile leur comparaison et limite les conclusions concernant les effets propres aux métaux polluants.

Néanmoins, l'état de la faune invertébrée échantillonnée sur les différents sites localisés autour de l'usine de Noyelles-Godault ne semble pas fondamentalement perturbée par l'unique pollution des sols. Dans l'ensemble de ces zones, nous avons observé des groupes faunistiques abondants, divers et variés avec des cycles saisonniers tout à fait comparables à ceux des zones témoins. Il est vraisemblable que l'abondance des peuplements reflète alors davantage la sensibilité de la faune au mode d'exploitation du milieu qu'aux variables strictes de pollution : il semble logique que celle-ci soit plus abondante en milieu forestier qu'en prairie fauchée régulièrement ou qu'au milieu d'un champ cultivé. Il a d'ailleurs pu être observé par d'autres équipes travaillant sur une autre friche industrielle de la région (Nahmani, 1998), qu'au sein d'un même type de faciès végétal, cette abondance était plus importante dans une prairie peu polluée que dans une prairie polluée.

Il convient d'examiner à part le cas de la pelouse métallicole d'Auby qui représente un état extrême de perturbation dans lequel l'ensemble de la biocoenose est altéré : les végétaux tolérants aux métaux polluants y sont largement dominants et nous avons également pu mettre en évidence des altérations importantes tant au niveau quantitatif que qualitatif de la zoocoenose invertébrée. Néanmoins, il s'agit là d'un stade extrêmement critique de pollution et l'essentiel de la zone en est fort heureusement assez loin, bien que les teneurs en métaux y soient non négligeables.

Il est malaisé de généraliser nos observations qui, même si elles reflètent les tendances existantes dans différents types de situations (sous-bois, friches, zones d'exploitation agricoles...), n'en restent pas moins des données ponctuelles. On conviendra néanmoins

qu'échantillonner de manière systématique l'ensemble de la zone qui s'étend sur des kilomètres carrés n'aurait eu aucun sens mais il faut rappeler que, comme nous avons choisi d'observer un cycle annuel complet de la faune, l'étendue du travail à fournir justifiait que sur l'ensemble des sept stations suivies, seuls trois réplicats aient été réalisés. Même si la généralisation des résultats à l'ensemble de la zone n'a que peu de justification, les informations ainsi recueillies sont loin d'être négligeables. Le choix de l'échantillonnage annuel sur un cycle complet a été d'ailleurs récompensé puisqu'il nous a permis de visualiser les grandes tendances saisonnières de la faune invertébrée et que nous avons pu mettre en évidence le fait que la pollution ne suffisait pas à influencer sur la dynamique globale de la faune à cette échelle d'observation et à ces niveaux de pollution : les groupes dominants et caractéristiques des faunes « d'hiver » ou « d'été » sont retrouvés à la fois dans les stations polluées et les stations témoins.

La seule observation des données sur une courte période aurait mis en évidence la variabilité existant entre chaque station, vraisemblablement due aux variables écologiques ou d'exploitation mais n'aurait pas permis de conclure quant aux effets de la présence ou de l'absence des métaux. Inversement, disposant de l'ensemble des données permettant de décrire l'ensemble du cycle, nous pouvons observer que la dynamique dans sa globalité n'est pas modifiée, mais que chaque station peut être caractérisée par la dynamique d'un ou plusieurs groupes d'animaux.

2- Vers un indicateur écologique de pollution

2.1- Le choix des sites

Dans un objectif de mise au point d'outils, ou d'indice écologique de pollution par les métaux, englobant la totalité des représentants de la faune du sol, le choix d'une zone de type prairial, à végétation relativement homogène et assez étendue pour disposer d'un gradient de pollution serait bien entendu idéal ; on pourrait en effet alors appréhender de manière plus fine les effets dus uniquement à la pollution métallique sur l'évolution des peuplements spécifiques. Il convient en effet de disposer alors d'une zone stable, la moins modifiée possible par l'action humaine (par l'apport d'engrais, de pesticide ou par des modifications mécaniques (labour, fauchage...) qui pourrait être échantillonnée en avril, mai ou juin, période d'activité intense où tous les groupes sont représentés. Il serait donc peut-être judicieux d'utiliser, entre autres les différents sites de l'Observatoire de la Qualité des Sols, ainsi que ceux du « centre expérimental de dépollution des sols contaminés par les métaux lourds : « l'Espace Biotique », projet rassemblant, outre l'association « Environnement et Développement Alternatif »,

d'autres laboratoires de l'USTL et deux entreprises de la région spécialisées dans la dépollution. L'étude seule de zones sévèrement atteintes telles que les pelouses métallicoles doit être maniée avec circonspection : il s'agit là en effet du stade ultime de pollution et de perturbation : la végétation y est complètement modifiée, la dégradation de la litière et la structuration des sols très ralenties. La densité et la qualité de la faune invertébrée est également altérée : nous y avons observé une tendance particulière à savoir une surabondance d'Arachnides par rapport au reste des autres prédateurs et de la faune en général ainsi que la disparition du milieu des Isopodes, des Diplopodes, des Oligochètes et des Mollusques. Ces zones, somme-toute peu étendues doivent être considérées comme un écosystème à part. Par contre, il serait intéressant de vérifier si la tendance observée plus haut sur la diversité de la faune se confirme ou peut être observée de manière graduelle en fonction du degré de pollution. Il est vraisemblable que la qualité de la végétation qui s'y est développée, à savoir des espèces essentiellement métalphytes ou pseudo-métalphytes (*Armeria halleri*, *Cardaminopsis halleri*, *Arrhenatherum elatius*) contribue à modifier le panel d'espèces d'invertébrées : ces espèces végétales étant accumulatrices de certains métaux, les teneurs accumulées au sein des tissus gênent sans aucun doute d'une manière ou d'une autre leur dégradation par les bactéries mais aussi par la faune invertébrée. Réciproquement, l'accumulation d'une telle quantité de matière organique formant un véritable enchevêtrement de végétaux est très probablement favorable à bien des espèces qui y trouvent alors un habitat protecteur.

Lors d'une mise au point d'un indice de dégradation du milieu, l'introduction de données floristiques ou de la qualité de la litière serait donc vraisemblablement pertinente.

2.2- Les stratégies d'échantillonnage

Un autre point peut être soulevé concernant l'effort d'échantillonnage et la capture de la faune afin d'avoir une idée représentative de sa diversité et de son abondance : la technique de récolte doit alors être à la fois efficace et la moins contraignante possible. Il faudrait peut-être vérifier si le piégeage tel que nous l'avons utilisé n'écarte pas ou ne surestime pas un groupe écologique particulier par rapport à l'ensemble du peuplement : en effet, si son utilisation sur une période prolongée présente des avantages indiscutables (affranchissement des rythmes nycthémeraux des animaux, coût très faible, simplicité d'utilisation...) il conviendrait peut-être de le comparer aux autres techniques existantes et couramment utilisées lors de campagnes d'échantillonnages plus ponctuelles dans le temps. Il s'agit en général de la technique des quadrats suivie de l'extraction manuelle de la macrofaune puis du berlesage des

échantillons de sol. On trouve également l'extraction *in-situ* de la faune active par l'arrosage d'eau formolée (Nahmani, 1998).

L'échantillonnage par quadrat-extraction est en effet très souvent utilisé. Cependant Branquart & Gaspar (1996) ont pu montrer qu'en ce qui concerne à la fois les inventaires régionaux, les études de peuplements et les mesures d'activité, le piégeage se révélait efficace et la richesse spécifique globale était alors mieux appréhendée. A cela il convient d'ajouter que les jeunes immatures, les espèces peu mobiles ou ayant un mode de vie endogé sont vraisemblablement mieux échantillonnées par quadrat-extraction.

2.3- Le niveau taxinomique pertinent

Le choix du niveau taxinomique le plus pertinent n'a pas non plus pu être clairement déterminé de façon évidente : c'est d'ailleurs un problème récurrent dans toutes les recherches d'indicateurs écologiques. On considère en général comme souhaitable a priori de descendre à l'échelle spécifique. En effet, on a alors au sein d'une population la garantie d'une uniformité suffisante des réactions aux perturbations ; un ensemble regroupant plusieurs espèces pouvant inclure des populations à sensibilité très différentes.

Mais pratiquement, il faut considérer que pour être utilisable et efficace un indice écologique doit comprendre des espèces ou groupes d'espèces relativement aisés à déterminer par des non-spécialistes. Il s'agit alors de réaliser un compromis sur la finesse taxinomique afin de disposer d'indicateurs à la fois simples et opérationnels mais encore suffisamment sensibles pour fournir des informations utiles.

Dans l'étude que nous avons menée, compte tenu de la quantité très importante des individus récoltés, il n'a pas été possible de poursuivre la détermination au niveau de l'espèce dans chacun des groupes observés. Dans l'ignorance de ce qui pouvait être présent ou révélateur d'une situation donnée, nous avons réalisé un premier tri, grossier afin de dégager les grandes tendances des différents groupes présents. Dans certains cas (Oligochètes et Mollusques), la mauvaise conservation des échantillons due à la méthode de piégeage (eau et éthylène glycol) ne permet pas une détermination précise. D'autres techniques d'échantillonnages (chasse à vue ou prélèvement à l'eau formolée) seraient dans ces cas précis mieux indiquées. Les Arthropodes se prêtent mieux à ce type de piégeage et de conservation et nous avons pu pousser plus loin la détermination. Nous avons volontairement dans un premier temps poussé l'analyse sur les géobiontes, strictement inféodés au sol. Seuls les Myriapodes, les Isopodes et les Formicidés ont été déterminés dans leur majorité jusqu'à l'espèce. Néanmoins même à ce niveau de détermination, l'information ainsi recueillie n'a pas permis

d'éclairer de manière plus pertinente le comportement de ces groupes en condition de stress métallique. L'étude plus fine des Arachnides (essentiellement Araignées et Acariens) si abondants dans les pelouses métallicoles aurait sans doute mérité davantage d'attention : la connaissance de la composition spécifique de ces groupements apporterait certainement d'utiles informations pour expliquer leur abondance.

2.4- Généralités sur les indicateurs biologiques

Il convient peut-être à ce stade de la discussion de rappeler succinctement quelques notions fondamentales sur les indicateurs biologiques et sur leur qualités requises qui doivent sous-tendre toute recherche ou volonté d'aborder un tel sujet.

On entend par indicateur écologique : « une population ou un ensemble de populations qui par leur variation quantitative et/ou qualitative mettent en évidence l'action de facteurs susceptibles de modifier le fonctionnement de l'écosystème dont ces populations font partie (Molfetas & Blandin ?).

- Il est indispensable que les populations recherchées puissent être étudiées à l'aide de méthodes quantitatives ou semi-quantitatives fiables ; ce qui soulève à nouveau les problèmes de stratégies d'échantillonnage que nous avons évoqués plus haut.

- Ces populations doivent ensuite réagir aux perturbations par des variations de densité de grande amplitude qui puissent être perçues à coup sûr. Il est donc souhaitable d'utiliser des populations abondantes en conditions non perturbées ou qui le deviennent à la suite de perturbations.

- Il est nécessaire que les seuils de sensibilité des espèces aux facteurs de perturbation soient relativement bas afin qu'il soit possible d'observer, pour des niveaux de perturbation peu élevés, des variations quantitatives d'amplitude suffisante. Le rôle d'avertisseur de ces populations indicatrices sera ainsi pleinement rempli.

- Dans certains cas, il est préférable de choisir des espèces ne possédant pas de comportement leur permettant de se soustraire à l'action des facteurs polluants. La disparition locale d'une espèce est en soit une indication mais il est préférable peut-être de disposer d'une gamme d'informations plus nuancées afin de pouvoir construire une échelle caractérisant le niveau de perturbation.

- Enfin, un indicateur écologique aura d'autant plus d'intérêt qu'il peut être utilisé dans une aire géographiquement grande. La structure des peuplements sera donc d'autant plus intéressante qu'elle peut être retrouvée dans des écosystèmes homologues même si certaines

espèces impliquées sont différentes (à condition qu'elles aient des réactions de même type vis à vis des perturbations identiques).

Il s'agit là bien sûr de critères non exhaustifs, mais suffisamment contraignants pour qu'ils soient difficiles à remplir simultanément.

Si on compare ces notions aux données que nous avons obtenues, l'absence totale de certains groupes (au niveau des pelouses métallicoles) tels que les Oligochètes, les Mollusques, les Diplopodes ou les Isopodes représente donc une information non négligeable mais est en soi insuffisante pour nuancer l'état de pollution ou pour caractériser de manière graduelle le niveau de perturbation. Nos données sont insuffisantes pour écarter l'hypothèse selon laquelle, à un degré seuil de pollution, les conditions réunies tant du point de vue de la qualité des sols que du point de vue végétation ne soient pas responsables de leur disparition de manière brutale. Un rôle d'avertisseur des populations indicatrices est préférable à leur disparition totale. Par contre, la régression de certains groupes de prédateurs au profit des Arachnides ou des Formicidés est peut-être une voie d'étude à vérifier et éventuellement à approfondir.

En résumé, la recherche d'un indicateur écologique en milieu terrestre n'est abordée que par quelques équipes ; il s'agit là d'une entreprise extrêmement ardue. En effet, la variabilité des différents types de situations dues non seulement à l'historique du sol, à ses caractéristiques physico-chimiques mais encore à la densité ou à la nature du couvert végétal modifie le type de peuplement de la faune invertébrée. L'évaluation de l'impact de la pollution métallique est donc difficile à cerner en regard des autres facteurs biotiques. Il n'en reste pas moins qu'il s'agit d'une approche qui mérite de l'attention et qui devrait être intensifiée de manière plus systématique. On obtiendrait alors non seulement davantage de données mais peut-être même une classification des différents types de peuplements qui pourraient être éventuellement rapprochés d'un ou plusieurs types de situations données (en fonction des différents facteurs biotiques voire même des pollutions).

3- La recherche de biomarqueurs

Cette recherche n'est en rien redondante par rapport aux indices écologiques globaux discutés précédemment. En effet, on considère bien souvent que les espèces sentinelles ou les biomarqueurs d'exposition doivent apporter des indications « d'effets précoces » avant même que l'ensemble de la biocoenose soit affecté.

Du point de vue de l'étude des risques liés à l'exposition des organismes aux métaux polluants, nous avons choisi comme modèles, deux espèces appartenant à des niveaux trophiques différents et de sensibilités plus ou moins fortes (les Oligochètes sont supposés disparaître des milieux pollués alors que nous avons trouvé des lithobies au sein de la pelouse métallicole). L'étude des cinétiques d'accumulation a permis de montrer que les stratégies de ces animaux étaient totalement opposées : *Eisenia fetida* stocke de manière cumulative les métaux alors que la lithobie, après une brève période de stockage excrète le métal activement. Ce résultat met en lumière la nécessité de bien connaître les mécanismes de détoxification voire de tolérance des animaux susceptibles d'être utilisés comme organismes test. En effet, dans le cas de la lithobie, c'est un mécanisme de détoxification extrêmement efficace qui se met en oeuvre et qui engendre la tolérance même à des doses de métal excessivement élevées. Il est donc vraisemblable que pour des niveaux de contamination moindres, les éventuelles variations d'un marqueur ou d'un autre soient d'amplitude extrêmement faible et incompatible avec les qualités nécessaires à un indicateur précoce. D'autre part, il reste à vérifier que dans le cas d'une perturbation chronique, il est possible de déceler d'éventuelles perturbations physiologiques caractéristiques de la présence de polluants. Certes dans le cas des lithobies intoxiquées au plomb nous avons pu observer des lésions au niveau de l'épithélium intestinal mais il est peu vraisemblable que ce type de lésions soient spécifiques d'un stress donné et encore moins quantifiables.

L'utilisation d'*Eisenia fetida* en tant qu'organisme test de manière normalisée se fait de manière courante (ISO/DIS 11268-2, 1993). Néanmoins il s'agit d'un organisme inféodé aux zones extrêmement riches en matière organique (litières, fumier) et que l'on ne retrouve pas dans les sols proprement dits. De plus, *Eisenia fetida* est parfois critiqué pour la moins grande sensibilité qu'il présente vis à vis de nombreux polluants en comparaison avec d'autres lombriciens (Fitzpatrick *et al.*, 1996). D'autre part, chez *Eisenia fetida*, il existe un certain nombre de souches ou de sous espèces : parmi celles-ci, *E. f. Andrei* est alors actuellement considérée comme une espèce à part entière ; certaines différences existent entre *E. f. Typica* et *E. Andrei*. En particulier, il semblerait que les masses moléculaires des métallothionéines (Grumiaux *et al.* 1998) soient différentes. Les travaux qui ont été faits jusqu'alors et qui ont été réalisés chez *Eisenia fetida* au sens large, n'indiquent généralement pas la sous espèce ou la souche concernée, ce qui rend de ce fait les comparaisons entre résultats encore plus difficiles. De nombreuses recherches se sont orientées vers d'autres modèles : *Lumbricus terrestris*, *Dendrobaena veneta*, *Apporectodea caliginosa* (Marinussen *et al.* 1997 a, b, Fitzpatrick *et al.* 1996 ; Curl *et al.* 1987 in Stenersen 1992) sans que pour l'instant aucun ne fasse l'unanimité.

Néanmoins, chez *Eisenia fetida* au sens large, plusieurs cibles ont été étudiées afin d'être utilisées comme biomarqueur de pollution et nous avons tenté d'en dégager les principaux résultats.

3-1 Les activités de biotransformation

Les enzymes de biotransformation, essentiellement les enzymes de phase I (Cytochrome P450 dépendantes) et les enzymes de phase II (de conjugaison) sont largement étudiées chez les Vertébrés et chez les Arthropodes. En effet, elles sont bien souvent inductibles et sont par là même d'excellents candidats en tant que biomarqueurs de pollution (Stien *et al.* 1997, Fouchécourt & Rivière 1996, Lemaire *et al.* 1992). Cependant, même si l'existence de certaines d'entre elles a pu être montrée chez certains Oligochètes (In Stenersen 1984), il ne semble pas qu'elle soient inductibles (Milligan *et al.* 1986). En effet, l'inductibilité des GST ainsi que celle des mécanismes Oxygénases-Cytochrome P450-dépendantes seraient une caractéristique propre aux vertébrés ou aux Arthropodes herbivores, de par les contraintes liées à leur régime alimentaire. Certains auteurs émettent l'hypothèse d'une évolution de l'inductibilité des enzymes en tant qu'adaptation pour lutter contre les métabolites toxiques des plantes (Brattsen *et al.* 1977, Capua *et al.* 1991, Mullin 1988, Yu 1982) qui serait ensuite utilisée pour la tolérance vis-à-vis des pesticides (notamment chez les insectes). Les Oligochètes, en tant que détritivores seraient moins exposés à ces métabolites secondaires des plantes. Quoi qu'il en soit, ceci rend le choix des enzymes de biotransformation chez les Oligochètes comme biomarqueur des plus complexe.

3.2 Les activités cholinestérasiques

Les activités cholinestérasiques, en général indicateur d'exposition aux pesticides (carbamates et organophosphorés), ont également été étudiées dans le contexte des métaux lourds. Aucun effet du cadmium ou du plomb n'a été mis en évidence sur notre souche d'*Eisenia fetida* et dans les conditions de sols pollués telles que nous les avons pratiquées. Cependant, Labrot (1996) a pu observer des inhibitions de l'activité AchE sur l'espèce *Eisenia fetida* en utilisant le « contact test ». La multiplicité des espèces ou sous-espèces utilisées et surtout la diversité des méthodes d'intoxication rendent les résultats difficilement comparables. Ceci met néanmoins l'accent sur l'importance du mode de contamination utilisé dans les tests d'écotoxicité et sur la vérification de leur pertinence dans le cadre d'études liées à des sols pollués.

3.3 Les activités liées au stress oxydatif

Les réponses cellulaires oxydatives peuvent constituer une cible de choix pour évaluer l'exposition des organismes aux polluants métalliques dans la mesure où ils provoquent des dommages cellulaires. Ils peuvent en effet se lier à des molécules biologiques d'importance telles que l'acide désoxyribonucléique (ADN), les phospholipides, le glutathion, d'autres protéines ou encore altérer le métabolisme cellulaire (transport transmembranaire, fonctionnement des mitochondries, réplication de l'ADN...) (Viarengo *et al.* 1990, Christie & Costa 1984). Les paramètres étudiés peuvent être liés aux réponses adaptatives des systèmes antioxydants (enzymatiques ou non enzymatiques) ou alors être directement centrés sur les dommages oxydants de certaines molécules (peroxydation lipidique membranaire) (Labrot 1996). Les cibles qui ont été étudiées chez les Oligochètes (Labrot *et al.* 1996) sont la lipoperoxydation, les activités catalases, glutathion peroxydase, NADH, NADPH Cyt-réductases, Xanthine-oxydase et le taux de glutathion. A part une diminution de la peroxydation lipidique sous l'effet du plomb et de l'uranium, aucun autre effet n'a pu être mis nettement en évidence.

4.4 Les métallothionéines

L'existence de métallothionéines fixatrices de cadmium a été mise en évidence par différents auteurs (Yamamura 1981, Grumiaux 1997). L'inductibilité de cette protéine n'a pas encore été montrée mais pourrait constituer, si elle se vérifiait une voie intéressante dans la recherche de biomarqueurs de pollutions métalliques.

4. Les autres invertébrés en tant que cibles potentielles de bioindication

On trouve dans la littérature de nombreuses études portant sur la physiologie des invertébrés du sol en relation avec les métaux lourds. Les animaux les plus couramment étudiés sont les Mollusques (Gommot 1997 a, b ; Gomot & Pihan 1997 ; Laskowski & Hopkin 1996) ; les Crustacés Isopodes (Hopkin & Hames 1994, Köhler *et al.* 1996, Drobne 1997) ; Chez les Insectes, les plus étudiés sont sans conteste les Collembolés (Sandifer & Hopkin 1997 ; Smit & Van Gestel 1997 ; Crommentuijn *et al.* 1997 ; Van Gestel & Hensbergen 1997) et dans une moindre mesure les Formicidés (Rabitsch 1997 a, b, c ; 1995). Les Arachnides font l'objet d'assez peu de recherches exceptées quelques études sur les Acariens (in ADEME 1996). Le

choix d'une espèce ou d'une autre utilisable dans le biomonitoring d'une pollution doit provenir de l'étude des critères suivants (d'après Hopkin 1989) :

1. L'animal doit être commun dans les zones rurales ou urbaines pendant suffisamment de temps dans l'année pour pouvoir être collecté et identifié;
2. L'animal doit contenir des concentrations en métaux en relation avec son exposition aux polluants;
3. Il doit être suffisamment grand pour permettre la détection de métal intracorporelle de manière simple et rapide;
4. Sa répartition géographique doit être étendue pour permettre une comparaison des contaminations entre les différents sites;
5. Il est préférable qu'il ne migre pas sur de longues distances (excluant les Insectes volants);
6. L'animal doit être suffisamment résistant pour ne pas succomber lors de pollution modérée;
7. La biologie de l'animal doit être raisonnablement bien connue (régime alimentaire, fécondité, abondance saisonnière...) et il convient de disposer d'informations sur les réponses physiologiques vis à vis des métaux.

Nous discuterons donc des différents groupes d'animaux étudiés afin d'en faire ressortir pour chacun d'eux les avantages ou les inconvénients.

- les Mollusques

Les limaces et les escargots sont communs dans l'écosystème terrestre. Les escargots accumulent les métaux de manière significative ce qui les rend aptes à être utilisés dans le biomonitoring (Gomot & Pihan 1997, Gomot 1997 a,b). Gomot (1997b) ayant en grande partie maîtrisé les effets toxiques des métaux sur la croissance de l'espèce *Helix aspersa aspersa* a tenté d'étendre ces tests (standardisés en laboratoire) à des terrains effectivement pollués. Pour cela les animaux ont été placés *in situ* pendant un certain temps et la qualité des résultats obtenus concernant les pollutions par le cadmium a été suffisamment satisfaisante voire comparable selon l'auteur à celle obtenue sur les Oligochètes ou les Collemboles (Gomot 1997b). Le développement d'un test standardisé sur une telle espèce comparé aux tests normalisés réalisés sur *Eisenia fetida* pallierait le principal reproche que l'on peut lui faire concernant la quasi absence de cet Oligochète des sols en milieu naturel.

Les limaces font l'objet de peu d'études (Poham & D'Auria 1980 in Hopkin 1989). Nous avons pourtant trouvé un grand nombre d'individus dans les sites pollués et non pollués ; elles mériteraient donc certainement davantage d'intérêt.

- Les Isopodes terrestres

La capacité des Isopodes terrestres à accumuler le métal ainsi que leur abondance et leur ubiquité dans le milieu naturel les prédisposent à en faire des indicateurs de pollution potentiels. Il a d'ailleurs été proposé, du fait de leur régime alimentaire détritivore que leur utilisation dans des tests normalisés porte, non pas sur la qualité des sols comme les tests utilisant *Eisenia fetida* ou *Folsomia candida* mais plutôt sur la toxicité de la litière (Drobne 1997), ce qui serait tout à fait complémentaire et d'un grand intérêt. Les effets subléthaux des polluants ont été largement étudiés sur l'espèce *Porcellio scaber* (in Drobne 1997) mais rien n'empêcherait, dans des endroits où d'autres espèces sont prédominantes et écologiquement parlant plus significatives de les utiliser.

- Les Insectes

- Les Collemboles

Les études des effets toxiques des métaux lourds sur les Collemboles ont été largement réalisées. Actuellement, l'espèce *Folsomia candida* est retenue comme organisme test, les paramètres testés concernent la toxicité du sol sur la reproduction (projet ISO/DIS 11267, 1998, Van Gestel & Hensbergen 1997 ; Sandifer & Hopkin 1997 ; Van Gestel & van Diepen 1997). Néanmoins, l'extrapolation au milieu naturel des résultats obtenus sur des sols artificiellement contaminés reste encore à démontrer : les paramètres inhérents aux sols pollués dans l'environnement (type de sols, biodisponibilité des polluants...) modifient fortement l'intensité des effets toxiques observés « en laboratoire » (Smit & Van Gestel 1996). Ce problème de la biodisponibilité des polluants soulevé ici est d'ailleurs généralisable à tous les tests quelles que soient les espèces étudiées en tant qu'organismes cibles et il semble fondamental dans l'avenir d'intensifier les recherches utilisant des sols véritables et non plus seulement artificiellement contaminés afin d'avoir une vision cohérente et explicative des phénomènes observés dans les zones polluées.

- Les Formicidés

Récemment, plusieurs études ont été proposées traitant des effets toxiques des métaux sur les fourmis (Rabitsch 1995a, 1997a, b, c). Parfaitement ubiquistes, elles pourraient

également être des cibles de choix dans le biomonitoring. Cependant, il semble que la variabilité individuelle au sein d'une espèce et d'une même colonie (les fourmis ayant été recueillies sur un même site) soit extrêmement importante (Rabitsch 1997b). De plus, d'importants changements physiologiques saisonniers et plus particulièrement la variation pondérale des individus contribuent à faire fluctuer la concentration de métaux retrouvée au sein des animaux. Ces premières observations amènent à penser qu'il risque d'être difficile d'utiliser les Formicidés de manière simple et standardisée dans la surveillance de l'environnement.

- Les Arachnides

- Les Araignées

Très peu d'études ont été conduites sur ce groupe d'invertébrés qui nous a pourtant semblé intéressant puisqu'il semble très bien s'acclimater aux milieux très chargés en métaux. Les principaux arguments en leur défaveur trouvés dans la littérature concernent l'extrême hétérogénéité des réponses obtenues entre les différentes espèces (Hopkin 1989). D'autre part, certaines espèces étant exclusivement saisonnières et d'autres présentes tout au long de l'année, il serait souhaitable si l'on envisage de les utiliser en tant qu'indicateur, de bien choisir l'espèce à étudier selon que l'on cherche à faire un suivi saisonnier ou annuel.

- Les Acariens

L'effet des polluants sur les Acariens et plus particulièrement sur les espèces *Platynothus peltifer* (Oribate) et *Hypoopsis aculeifer* (Gammaside) a été plus particulièrement étudié dans la mesure où ils font l'objet de propositions de tests standardisés en laboratoire concernant leur croissance ou leur reproduction (van Gestel & Doornekamp 1994 ; Lokke *et al.* 1994). Néanmoins l'utilisation des populations d'Acariens dans le milieu naturel risque d'être rapidement difficile dans la mesure où elle nécessitera des spécialistes de leur détermination et de leur classification. De plus leur petite taille rend tout dosage ou recherche de biomarqueur quasiment impossible. Leur utilisation raisonnable ne peut donc se faire que dans le seul contexte de test de mortalité, croissance ou reproduction effectués en laboratoire.

En conclusion et comme cet inventaire permet de le constater, aucune espèce ne semble à même de remplir toutes les spécificités exposées plus haut. Vu l'extrême diversité des cibles potentielles, l'extrême variabilité des avantages ou des inconvénients respectifs des uns et des autres, il est raisonnable de penser que seule la multiplicité des tests réalisés sur des espèces de

sensibilités différentes, sera représentative de l'état d'un sol ou de sa toxicité. Les quelques tests standardisés ou en projet de standardisation actuellement disponibles méritent d'être renforcés par un panel d'autres outils. Une notion fondamentale est apparue concernant l'extension des études réalisées en laboratoire : elles doivent impérativement s'étendre au milieu naturel. Ceci présente de nombreuses difficultés liées entre autre à la biodisponibilité réelle des polluants, à la variabilité des différents sols, mais elle est nécessaire à la validation du biomonitoring.

*Liste des abréviations
tableaux et figures*

Liste des abbréviations

ACM : Analyse Factorielle des Correspondances Multiples
ADEME : Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
ADN : Acide Désoxyribonucléique
AFC : Analyse Factorielle des Correspondances
AFNOR : Agence Française de Normalisation
Cd : Cadmium
CdCl₂ : Chlorure de Cadmium
Cu : Cuivre
DTPA : Acide Pentaacétique Diéthylène Triamine
ECOD : Ethoxycoumarine O-déalkylase
EDTA : AcideTétraacétique Ethylène Diamine
EEC : European Economic Communities
EPT : Elément potentiellement Toxique
EROD : Ethoxyrésorufine O-déalkylase
GST : Glutathion S-Transférase
HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
HClO₄ : Acide perchlorique
HNO₃ : Acide nitrique
INRA : Institut National pour la Recherche Agronomique
ISO : International Standard Organization
NADH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide (réduit)
NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (réduit)
NTK : Azote Total Kjeldahl
OECD : Organization for Economic Coopération and Développement
Pb : Plomb
PCB : Polychlorobiphenyl
PRC : Programme de Recherches Concertées
SAA : Spectrophotométrie d'Absorption Atomique
USTL : Université des Sciences et Technologies de LILLE
Zn : Zinc:

Liste faunistique:

Oli : Oligochètes
Esc : Escargots
Lim : Limaces
Aca : Acariens
Ara : Araignées
Opi : Opilions
Iso : Isopodes
Dip : Myriapodes Diplopedes
Chi : Myriapodes Chilopodes
Ent : Arthropléones
Smi : Symphypléones
Col : autres Coléoptères
Dit : Diptères
For : Formicidés
Ins : autres Insectes
Lar : Larves

Liste des figures et tableaux

Listes des figures:

Figure 1. Relation entre les performances (croissance, fécondité, survie) et les concentrations en éléments essentiels et non essentiels.....	15
Figure 2. Schéma général des modalités d'action d'un polluant sur un écosystème.....	17
Figure 3. Résultats des dosages des différents métaux en ICP AES.....	24
Figure 4. Granulométrie des différents sols.....	25
Figure 5. Plan factoriel des deux premiers axes de l'AFC appliquée aux données de la station IA.....	29
Figure 6. Plan factoriel des deux premiers axes de l'AFC appliquée aux données de la station IB.....	30
Figure 7. Activité des Oligochètes (station IB) en relation avec l'abondance des précipitations.....	30
Figure 8. Plan factoriel des deux premiers axes de l'AFC appliquée aux données de la station IC.....	31
Figure 9. Plan factoriel des deux premiers axes de l'AFC appliquée aux données de la station II.....	32
Figure 10. Plan factoriel des deux premiers axes de l'AFC appliquée aux données de la station III.....	32
Figure 11. Plan factoriel des deux premiers axes de l'AFC appliquée aux données de la station IV (témoins).....	33
Figure 12. Plan factoriel des deux premiers axes de l'AFC appliquée aux données de la station V.....	34
Figure 13a. Plan factoriel des 2 premiers axes de l'AFC appliquée aux données cumulées des mois d'avril à juin 1995 des sept stations.....	35
Figure 13b. Plan factoriel des axes II et III de l'AFC appliquée aux données cumulées d'avril à juin 1995 des sept stations.....	35
Figure 14. Activité annuelle (1994 - 1995) des invertébrés récoltés à la station IB.....	36
Figure 15a. Plan factoriel des deux premiers axes de l'ACM appliquée aux tableaux de données faunistiques et climatiques. Représentation des différentes classes de groupes faunistiques et de paramètres climatiques ..	37
Figure 15b. Plan factoriel des deux premiers axes de l'ACM appliquée aux tableaux de données faunistiques et climatiques. Ségrégation des stations en fonctions des saisons.....	37
Figure 16. Activité des différents groupes d'invertébrés récoltés au mois de juin 1995 à Auby et à Nomain.....	38
Figure 17. Représentation en pourcentage des différents groupes écologiques identifiés.....	39
Figure 18. Répartition de la faune en fonction des régimes alimentaires.....	39
Figure 19. Voies d'entrée, de sortie et lieux de stockage connus des métaux chez <i>Lithobius forficatus</i>	60
Figure 20. Principales voies d'entrée et de sortie des métaux chez les Oligochètes.....	90

Liste des tableaux :

Tableau 1. Classement des métaux	12
Tableau 2. Exemple de la diversité des valeurs limites de pollution des sols	12
Tableau 3. Exemples d'éléments traces dont l'utilité biochimique est connue chez les vertébrés supérieurs.	15
Tableau 4. Tests normalisés ou proposition de tests standardisés.....	20
Tableau 5. Teneurs en métaux des sols collectés aux différents sites de piégeage près de l'usine Métaleurop (Noyelles-Godault).....	28
Tableau 6. Effectifs cumulés des récoltes d'invertébrés des mois d'avril, mai et juin 1995 des cinq stations de la zone polluée et des deux stations témoins (IV et V) situées sur le campus USTL.	36

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- Abdul Rida, A.M.M. and Bouché, M.B. (1997) Heavy metal linkages with mineral, organic and living soil compartments. *Soil Biol. Biochem.* 29: 649-655.
- ADEME (1996) La faune, indicateur de la qualité des sols. Direction scientifique- Service impacts & milieux.
- AFNOR : NF X31-105 : (1985) Calcaire total - Evaluation des carbonates.
- AFNOR : NF X31-120:(1992) Détermination du cuivre, du manganèse et du zinc - Extraction par l'acétate d'ammonium en présence d'EDTA.
- AFNOR X31-250 (1984) Qualités des sols. Détermination de la toxicité d'une substance vis à vis des lombriciens (espèce *Eisenia fetida*). Méthode « Artisol ». AFNOR Paris.
- Andersen, C. & Laursen, J; (1982) Distribution of heavy metals in *Lumbricus terrestris*, *Aporrectodea longa* and *A. Rosea* measured by atomic absorption and X-ray fluorescence spectrometry. *Pedobiologia*, 24: 347-356.
- Bååth, E. (1989) Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations 'a review'. *Water, Air and Soil pollution.* 47: 335-379.
- Babich H. & Stotzky, G. (1985) Heavy metal toxicity to microbe - mediated ecologic processes: a review and potential application to regulatory policies. *Environmental research.* 26: 111-137.
- Benzecri, J.P. et al. (1982) L'analyse des correspondances. Dunod-Bordas, Paris 632pp.
- Beyer, W.N., Hensler, G., Moore, J. (1987) Relation of pH and other soil variables to concentrations of Pb, Cu, Zn and Se in earthworms. *Pedobiologia* 30: 167-172.
- Bouché M.B. (1972) Lombriciens de France - Ecologie et systématique. Institut National de la Recherche Agronomique. *Annales de zoologie, Ecologie animale/ N° hors série.*
- Branquart, E. & Gaspar, C. (1996) Etude comparative des techniques d'échantillonnage des macroarthropodes saprophages (Isopoda & Diplopoda). In : Geoffroy J.J., Mauriès, J.P. & Nguyen Duy-Jacquemin, M. (eds), *Acta Myriapodologica. Mém. Mus. natn. Hist. Nat.* 169 : 485-492.
- Branquart, E., Kime, R.D., Dufrene, M., Tavernier, T. & Wauthy, G. (1995) Macroarthropod habitat relationships in oak forest in south Belgium. 1- Environment and communities. *Pedobiologia* 39: 243-263.
- Brattsen, L.B., Wilkinson, C.F., Eisner, T. (1977) Herbivore plant interactions: mixed function oxidases and secondary plant substances. *Science* 196: 1349-1352.
- Capua, S., Cohen, E., Gerson, U. (1991) Induction of aldrin epoxidation and Glutathione S-transferase in the mite *Rhizoglyphus robini*. *Entomol. Exp. Appl.* 59: 43-50.
- Christie, N.T. & Costa, M. (1984) In vitro assessment of the toxicity of metal compounds. IV Disposition of metals in cells: interaction with membranes, glutathione, metallothionein, and DNA. *Biological Trace Element Research.* 6: 139-158.
- Crommentuijn, T., Brils, J., Van Straalen, N.M. (1993). Influence of cadmium on life-history characteristics of *Folsomia candida* (Willem) in an artificial soil substrate. *Ecotox. Environ. Safety* 26: 216-227.
- Crommentuijn, T., Doornekamp, A., Van Gestel, C.A.M (1997) Bioavailability and ecological effects of cadmium on *Folsomia candida* (Willem) in an artificial soil substrate as influenced by pH and organic matter. *Applied Soil Ecology* 5: 261-271.
- Curl, E.A., Edward, P.J., Elliott, C., and Leahey, J.P. (1987). Metabolites of cypermethrin in earthworms. *Pestic. Sci.* 20: 207-222.

- Dallinger, R., Berger, B. & Gruber, A. (1993) Quantitative aspects on zinc and cadmium binding in *Helix pomatia* : differences between an essential and a non essential trace element. In : Dallinger, R. And Rainbow, P.S. (eds) Ecotoxicology of metals in invertebrates. Lewis publishers, Boca Raton, 315-332 pp.
- Drobne, D. (1997) Terrestrial Isopods-a good choice for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment. Environ. Toxicol. Chem. 16(6): 1159-1164.
- Echaubard, M. (1995) les animaux comme indicateurs biologiques de pollution. In: ANPP- Colloque international- marqueurs biologiques de pollution. ANPP annales, Chinon, 335-358 pp.
- EEC (European Economic communities) (1982). Methods for the determination of ecotoxicology level 1. DG XI/127/82, Rev.1., No 79/831, annex V, part C, Brussels, Belgium.
- Escofier, B. et Pages, J. (1988) Analyses factorielles simples et multiples. Objectifs, methodes et interprétation. Bordas, Paris 241pp.
- Ferrière, G., Fayolle, L. & Bouché, M.B. (1981) Un nouvel outil essentiel pour l'écophysologie et l'écotoxicologie : l'élevage des Lombriciens en sol artificiel. Pedobiologia, 22: 196-201.
- Fischer, E. Majer, J. Hornung, E., Farkes, S. & Molnar, L. (1994) - Sublethal toxicity test with the woodlouse *Pocellio scaber* (Latr. 1814) (Isopoda : Porcellionidae) In: H. Kula, U. Heimbach, H. Lokke (eds), Progress Report 1994 of Secofase, third technical report, Denmark, 139-158pp.
- Fitzpatrick, L.C., Murrati-Ortiz, J.F., Venables, B.J., Goven, A.J. (1996) Comparative toxicity in earthworms *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris* exposed to cadmium nitrate using artificial soil and filter paper protocols. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 57: 63-68.
- Fouchécourt, M.O. & Rivière, J.L. (1996) Activities of liver and lung cytochrome P-450 dependant monooxygenases and antioxidant enzymes in laboratory and wild rats exposed to reference and contaminated soils. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 30, 513-522.
- Gomot, A. & Pihan, F. (1997) Comparison of the bioaccumulation capacities of copper and zinc in two snail subspecies (*Helix*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 38: 85-94.
- Gomot, A. (1997a) Dose dependant effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 33: 209-216.
- Gomot, A. (1997b) Effects of heavy metals on snail development. Use of snails as bio-indicators of heavy metal pollution for the preservation of human health. Bull. Acad. Natl. Med. 181(1): 59-74.
- Gomot, L. & Gomot, A. (1996) Utilisation des escargots comme bioindicateurs de pollution par les métaux. Rapport ADEME n° 4930015 programme « Ecotoxicologie des sols et déchets » 30pp.
- Grumiaux, F. (1997) Caractérisation des métallothioneines chez *Eisenia*. Programme de Recherches Concertées (1997) Etude d'un secteur pollué par les métaux : Métaux polluants et organismes vivants. Vol. I : Biodisponibilité - Métaux et faune invertébrée du sol.
- Grumiaux, F., Sautière, P.E., Lemoine, J., Descamps, M. (1998) Etude préliminaire de la métallothionéine d'*Eisenia fetida* (Annelide Oligochète). Colloque de la Société Zoologique de France. LILLE, juin 1998.
- HACH (1989). Methodes d'analyses au spectrophotomètre DR/2000, mode d'emploi.
- Hach et al (1985), Standard methods for the examination of water and wastewater. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 33 : 1117-1123.

- Hopkin, S.P. & Hames, C.A.C. (1994) Zinc among a « cocktail » of metal pollutants is responsible for the absence of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* from the vicinity of a primary smelting works. *Ecotoxicology* 2: 68-78.
- Hopkin, S.P. & Martin, M.H. (1982). The distribution of zinc, cadmium, lead & copper within the woodlouse *Oniscus asellus* (Crustacea, Isopoda) *Oecologia*, 54: 227-232.
- Hopkin, S.P. (1989) *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. Pollution monitoring series. Elsevier Applied sciences. London & New York.
- Ireland M.P. & Richard, K.S. (1981). Metal content, after exposure to cadmium of two species of earthworms of known differing calcium metabolic activity. *Environ. Pollut.* 26A: 69-78.
- ISO/DIS 11267 (1998) *Projet de norme internationale : Qualité du sol - Inhibition de la reproduction de Collembola (*Folsomia candida*) par des polluants du sol.*
- ISO/DIS 11268-2 (1993) *Draft International Standard. Soil quality - Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Method for the determination of effects on reproduction.*
- ISO/DIS 11268-3 (1998) *Projet de norme internationale : Qualité du sol - Effet des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*). Partie 3 : Lignes directrices relatives à la détermination des effets sur site.*
- Janssen, M.P.M., Bruins, A., De Vries, T.H. & Van Straalen, N.M. (1991) Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305-312.
- Jones, S.D.T. (1991) *Biological monitoring of metal pollution in terrestrial ecosystems*; PhD thesis, university of Reading.
- Kölher, H.R., Hüttenrauch, K., Brekus, M., Gräff, S., Alberti, G. (1996) Cellular hepatopancreatic reactions in *Porcellio scaber* (Isopoda) as biomarkers for the evaluation of heavy metal toxicity in soils. *Applied Soil Ecology*, 3: 1-15.
- Labrot, F. (1996) *Le plomb et l'uranium dans l'environnement. Présence, biodisponibilité et toxicité.* Thèse d'université. Bordeaux 1.
- Labrot, F., Ribera, D., Saint Denis, M. & Narbonne, J.F. (1996) *In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead & uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non mammalian species.* *Biomarkers* 1: 21-28.
- Laskowski, R. & Hopkin, S.P. (1996) Effect of Zn, Cu, Pb and Cd on fitness in snail (*Helix aspersa*). *Ecotox. Environ. Saf.* 34: 59-69.
- Lavelle, P. (1997) *Faunal activities and soil processes: adaptative strategies that determine ecosystem fonction.* *Advances in ecological research*, vol. 27.
- Lemaire, P., Mathieu, A., Carrière, S., Narbonne, J.F., Lafaurie, M., Giugicelli, J. (1992) *Hepatic biotransformation enzyme in aquaculture european sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Kinetic parameters and induction with benzo(A)pyrene.* *Comp. Biochem. Physiol.* 103, 847-853.
- Lokke, H., Krogh, P.H., Folker-Hansen, P. & Holmstrup, M. (1994) *Sublethal toxicity test with the Gamasid mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: gamasida) preying on the collembolan *Folsomia fimetaria* Linne (Collembola: Isotomidae).* In: H. Kula, U. Heimbach, H. Lokke (eds), *Progress Report 1994 of Secofase, third technical report*, Denmark, 13-23pp.
- Ma, W., Edelman, T., Van Beersum, I., Jans, T. (1983) Uptake of cadmium, zinc, lead and copper by earthworms near a zinc smelting complex. Influence of soil pH and organic matter. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 30, 424-427.

- Ma, W.C. (1982) The influence of soil properties and worm related factor on the concentration of heavy metals in earthworms. *Pedobiologia* 30: 109-119.
- Ma, W.C. (1987) Heavy metal accumulation in the mole, *Talpa europea* and earthworms as indicator of metal availability in terrestrial environments. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 39: 933-938.
- Marinussen, M.P.J.C., Sjoerd, E.A.T.M. and De Haan, F.A.M. (1997 b) Cu accumulation in the earthworm *Dendrobaena veneta* in a heavy metal (Cu, Pb, Zn) contaminated site compared to Cu accumulation in laboratory experiments. *Environ. Pollut.* 2: 227-233.
- Marinussen, M.P.J.C., Van der Zee, S.E.A.T.M. and De Haan, F.A.M. (1997 a) Effect of Cd or Pb addition tu Cu-contaminated soil on tissue Cu accumulation in the earthworm, *Dendrobaena veneta*. *Ecotox. Environ. Safety*, 38: 309-315.
- Matthey, W., Della Santa, E., Wannenmacher, C. (1984) Manuel pratique d'écologie, Payot Lausanne.
- Milligan, D.L., Babish, J.G., Neuhauser, E.F. (1986) Non inducibility of cytochrome P-450 in the earthworm *Dendrobaena Veneta*. *Comp. Biochem. Physiol.* 85C, 85-87.
- Molfetas , S. & Blandin, P. (?) Quelques éléments de réflexion sur la notion d'indicateur écologique. Journées d'étude sur l'écologie appliquée.
- Mullin, C.A. (1988) Adaptative relationships of epoxide hydrolase in herbivorous arthropods. *J. Chem. Ecol.* 14: 1867-1888.
- Nahmani, J. (1998) Impact d'une pollution métallicole aigüe sur les peuplements de la macrofaune du sol. Mémoire de stage de Diplome d'études Doctorales, Université de Paris VI - ORSTOM.
- Nieboer, E. and Richardson, D.H.S. (1980) The replacement of the nondescript term « heavy metal » by a biologically & chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut.* 1B: 3-26.
- OECD (Organisation for Economic Cooperation and developpement) (1984) OECD guidelines for testing chemicals. Section 2 : Effects on biotic systems, method 207. Earthworm, acute toxicity test, Paris.
- Pearson R.G. (1963) Acids and bases. *Science*, 191: 172-177.
- Poham, J.D. & d'Auria, J.M. (1980) *Arion Ater* (Mollusca: Pulmonata) as an indicator of terrestrial environment pollution. *Water Air Soil Pollut.* 14: 115-124.
- Programme de Recherches Concertées (1997) Etude d'un secteur pollué par les métaux : Métaux polluants et organismes vivants. Vol. I : Biodisponibilité - Impact sur la microflore du sol.
- Rabitsch, W.B. (1995) Metal accumulmation in arthropods near a Lead/zinc smelter in Arnoldstein, Austria. II. Formicidae. *Environ. Pollut.* 2: 239-247.
- Rabitsch, W.B. (1997a) Levels of asymetry in *Formica pratensis* Retz. (Hymenoptera, Insecta) from a chronic metal-contaminated site. *Environ. Toxicol. Chem.* 7: 1433-1440.
- Rabitsch, W.B. (1997b) Tissue-specific accumulation patterns of Cd, Pb, Cu, Fe and Mn in workers of three ant species (Formicidae, Hymenoptera) from a metal polluted site. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 32: 172-177.
- Rabitsch, W.B. (1997c) Seasonal metal accumulation patterns in the red wood ant *Formica pratensis* (Hymenoptera) at contaminated and reference sites. *Journal of Applied Ecology.* 34: 1455-1461.
- Ramade, F. (1992) Précis d'écotoxicologie. Collection d'écologie 22. Ed. Masson, Paris, Milan, Barcelone, Bonn 300pp.
- Ramade, F. (1993) Dictionnaire encyclopedique de l'écologie et des sciences de l'environnement. Ediscience international, Paris 822pp.

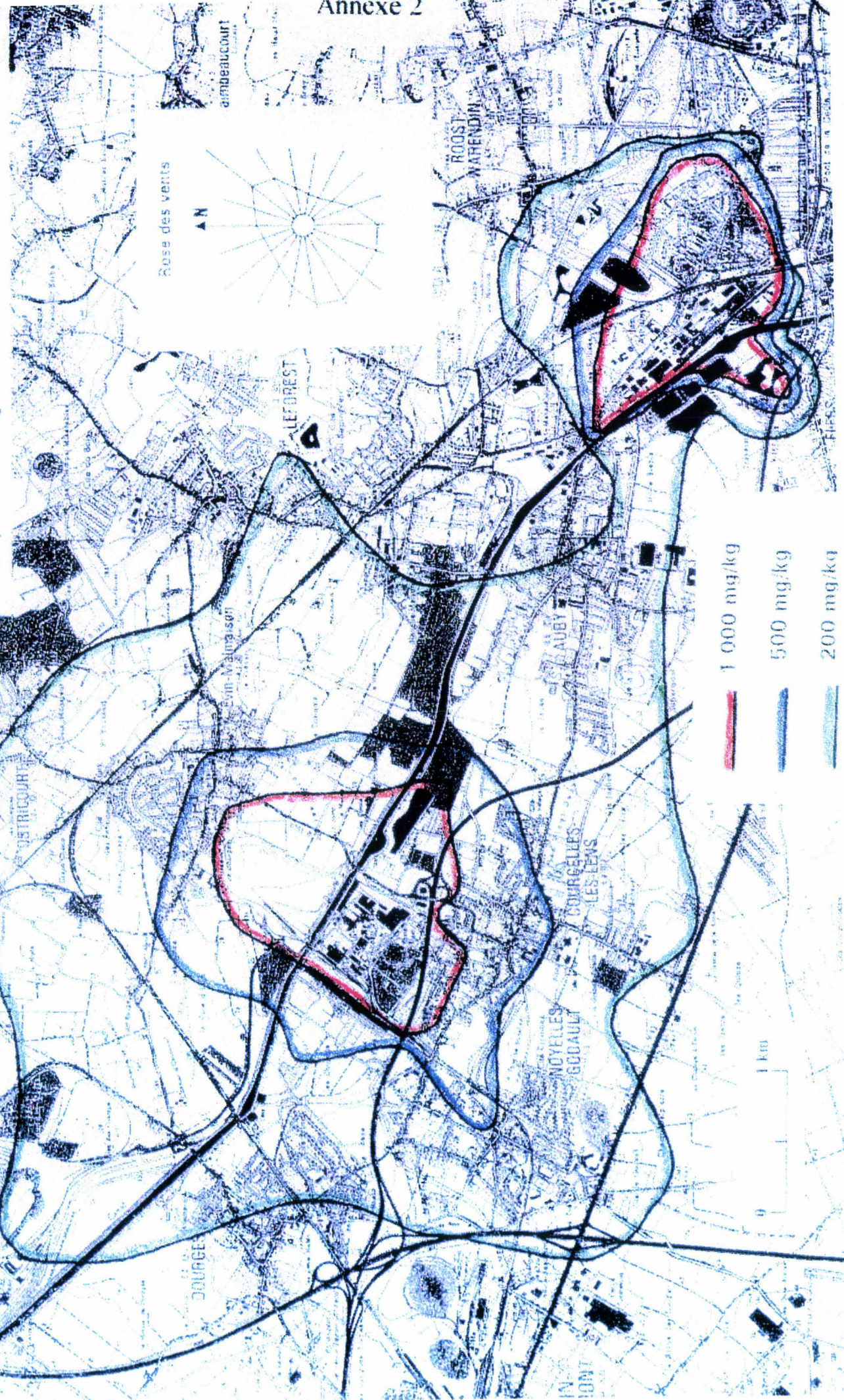
- Riepert, F. (1993)- ISO ring test for a method for determining the effects of soil contaminants on the reproduction of Collembola. ISO document 24pp.
- Rundgren, S. & Augustsson, A. (1994) Sublethal toxicity test with the enchytraeid worm *Cognettia sphagnetorum* (Vejdovsky, 1878), (Enchytraeidae : Oligochaeta) In: H. Kula, U. Heimbach, H. Lokke (eds), Progress Report 1994 of Secofase, third technical report, Denmark, 91-101pp.
- Russel, L.K., De Haven, J.I., Botts, R.P. (1981) Toxic effects of cadmium on the garden snail (*Helix aspersa*). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 26: 634-640.
- Sandifer, R.D. & Hopkin, S.P. (1997) Effect of temperature on the relative toxicities of Cd, Cu, Pb, Zn to *Folsomia candida* (Collembola). Ecotoxicol. Environ. Saf. 37: 125-130.
- Shannon, C.E. & Weaver, W. (1949) The mathematical theory of communication. University Illinois Press. 117 p.
- Simkiss, K. (1983) Lipid solubility of heavy metals in saline solutions. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 63: 1-7.
- Smit, C.E. & Van Gestel, C.A.M. (1996) Comparison of the toxicity of zinc for the springtail *Folsomia candida* in artificially contaminated and polluted field soils. Appl. Soil Ecology 3: 127-136.
- Smit, C.E. & Van Gestel, C.A.M. (1997) Influence of temperature on the regulation and toxicity of zinc in *Folsomia candida* (Collembola). Ecotox. Environ. Saf. 37: 213-222.
- Southwood, T.R.E (1978) Ecological methods. Chapman & Hall, London. 2nd ed. 524pp.
- Spurgeon, D.J. and Hopkin, S.P. (1996) Effects of variation of the organic matter content and pH of soils on the availability and toxicity of zinc to the earthworm *Eisenia fetida*. Pedobiologia. 40, 80-96.
- Stenersen, J. (1984) Detoxication of xenobiotic by earthworms. Comp. Biochem. Physiol. 87C: 249-252.
- Stenersen, J. (1992) Uptake and metabolism of xenobiotics by earthworms. In: Greig-Smith, P.W., Becker, H., Edwards, P.J., Heimbach, F. (Eds) Ecotoxicology of earthworms. Intercept Ltd, Andover 129-138pp.
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourrier, H. (1996) Programme de Recherches Concertées: Etude d'un secteur pollué par les métaux : Typologie et cartographie des sols, inventaire des polluants minéraux, étude de la migration verticale du Cd, Cu, Pb et Zn. Conseil Régional du Nord-Pas de Calais. Secrétariat d'état à la recherche - ISA, INRA 29 pp.
- Stien, X., Risso, C., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., Lafaurie, M. (1997) Effect of copper chloride in vitro and in vivo on the hepatic EROD activity in the fish *Dicentrarchus labrax*. Environ. Toxicol. Chem. 16, 214-219.
- Strojan, C.L., 1978. Forest leaf litter decomposition in the vicinity of a zinc smelter. Oecologia. 32: 203-212.
- Terhivuo, J., Pankakoski, E., Hyvarinen, H. & Koivisto, I. (1994) Pb uptake by ecological dissimilar earthworm (Lumbricidae) species near a lead smelter in south finland. Environ. Pollut. 85 : 87-96.
- Thiele, H.U. (1977) Carabid beetles in their environment. Berlin, Springer-Verlag 369pp.
- Topping, C.J. & Sunderland, K.D. (1992) limitation to the use of pitfall traps in ecological studies exemplified by a study of spiders in a field of winter wheat. J. Appl. Ecology 29: 485-491.
- Uetz, G.W. & Unziker, J.D. (1976) Pitfall trapping in ecological studies of wandering spiders. J. Arachnol. 3: 101-111.

- Van Gestel C.A.M. & Doornekamp, A. (1994)- Sublethal toxicity test with the oribatid mite *Platynothrus peltifer* (Koch, 1839) (Oribatida : Acari). In: H. Kula, U. Heimbach, H. Lokke (eds), Progress Report 1994 of Secofase, third technical report, Denmark, 63-80pp.
- Van Gestel, C.A.M. & Hensbergen, P.J. (1997) Interaction of Cd and Zn toxicity for *Folsomia candida* Willem (Collembola: Isotomidae) in relation to bioavailability in soil. Environ. Toxicol. Chem. 6: 1177-1186.
- Van Gestel, C.A.M. & Van Diepen A.M.F. (1997) The influence of soil moisture on the bioavailability and toxicity of cadmium for *Folsomia candida* Willem (Collembola: Isotomidae). Ecotox. Environ. Saf. 36: 123-132.
- Van Gestel, C.A.M., Van Dis, W.A., Van Breemen, E.M. & Sparenburg, P.M. (1989); Development of a standardized reproduction toxicity test with the earthworm species *Eisenia fetida andrei* using copper, pentachlorophenol, and 2,4-dichloroaniline. Ecotoxicol. Environ. Safety, 18: 305-312.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertca, H., Poli, G., Moore, M.N. & Orunesu, M. (1990) Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. Comp. Biochem. Physiol. 97C: 37-42.
- Watson, A.P., Van Hook, R.I. Jackson, D.R., Reichle, D.E. (1976) Impact of a lead mining-smelting complex on the forest floor litter arthropod fauna in the new lead Belt region of south west Missouri. ORNL/NSF/EATC-30, Oak Ridge National Laboratory.
- Yamamura, M., Mori, T. & Susuky, K.T. (1981) Metallothionein induced in the earthworm. Experientia 37: 1187-1189.
- Yu, S.T. (1982) Host plant induction of Glutathione S-transferase in the fall armyworm. Pestic. Biochem. Physiol. 18: 101-106.

Annexes

Courbes des isoteneurs en plomb dans l'horizon de surface des sols

D'après INRA Avignon (1979) et ENSTIMD (1981 - 1982)



ULTRASTRUCTURAL AND AUTOMETALLOGRAPHIC STUDIES OF THE NEPHROCYTES OF *LITHOBIUS FORFICATUS* L. (MYRIAPODA, CHILOPODA): ROLE IN DETOXIFICATION OF CADMIUM AND LEAD

Franck Vandebulcke, Claire Grelle, Marie Chantal Fabre and Michel Descamps*

Ecophysiologie d'Invertébrés du Sol, Laboratoire de Biologie Animale, Université de Lille I, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

(Received 20 June 1997)

Abstract—Ultrastructural and autometallographic investigations of the nephrocytes of the centipede *Lithobius forficatus* (Myriapoda: Chilopoda) and their role in detoxification of cadmium and lead are presented. This cell-type exhibits the characteristic features of podocytes, i.e. the typical pedicel-basal lamina complex and the well-developed lysosomal vacuolar system. Ultrastructural study demonstrated that heavy metals, such as cadmium and lead, may cause intracellular injuries. The autometallographic procedure showed that large electron-dense granules, referred to as cytosomes in the ultrastructural study, are the main organelles of the nephrocytes to accumulate heavy metals. Consequently, these cells may play an important role in the detoxification process. © 1998 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Index descriptors (in addition to those in the title): heavy metals, detoxification process, ultrastructure, autometallography.

INTRODUCTION

Chilopods are one of the most effective invertebrate predator groups in soil and leaf litter (Wignarajah and Philipson, 1977) and their general biology is well known (Lewis, 1981). It has been shown in previous works (Hopkin *et al.*, 1985; Read and Martin, 1990) that chilopods occur in metal-contaminated areas. Considering their position in the food chain, these animals are of great importance in transferring metals to higher carnivores. Some papers dealing with metal concentrations in chilopods (Beyer *et al.*, 1985; Van Straalen and Van Wensen, 1986; Gérard *et al.*, 1996; Descamps *et al.*, 1996) show that these animals are able to withstand a high metal concentration and have the ability to concentrate different kinds of heavy metal ions. However, little information concerning the internal distribution of metals in centipedes is available, except that of Hopkin and Martin (1983). Therefore, investigations at the cellular and organelle levels are required to provide a better understanding of metal accumulation and metabolism in centipedes.

Experiments were conducted on adult mature *Lithobius forficatus* specimens, relatively abundant in European temperate regions. Animals were exposed to cadmium or lead, two non-essential elements widely distributed in metal-polluted areas. It was demonstrated that centipedes can be contaminated both by food intake

and by ion entry through the integument (Descamps *et al.*, 1996). Therefore, these two routes of intoxication were explored.

In the present work, we focused our attention on the nephrocytes. These cells, forming conspicuous chains, are wrapped around salivary glands. First described as “cellules à carminate” (Duboscq, 1898), these cells were found to be accumulation kidneys (Ehrenberg, 1924) or nephrocytes and compared to insect pericardial cells (Palm, 1954). According to Scheffel (1969), they constitute a lymphatic tissue (“Lymphstränge”). The ultrastructural study (Seifert and Rosenberg, 1974) showed an external basal lamina on which were attached podocytes and coated vesicles could be observed near the plasma membrane. Structural variations were observed according to the molting cycle, leading the authors to conclude that they functioned as an ecdysial gland. Some histological and physiological features are comparable to those of the prothoracic glands in heterometabolous insect prothoracic glands. Immunoreactivity to ecdysteroid antisera was shown by Seifert and Bidmon (1988). Moreover, it was shown that, *in vitro*, the “lymphatic tissue” was able to secrete ecdysteroid in the culture medium (Leubert, 1986) and convert 5 β -ketadiol into 2-deoxyecdysone (Descamps and Lafont, 1993). All these recent arguments also support the idea that this tissue acts as an ecdysial gland. However, this role is not incompatible with that of detoxification.

The aim of the present study was (i) to demonstrate the ability of the cells of the lymphatic tissue to work as nephrocytes, (ii) to explore the intracellular localization of metals after experimental exposure to cadmium or lead.

* Author to whom correspondence should be addressed: Dr M. Descamps, Université de Lille, Ecophysiologie d'Invertébrés du Sol, Laboratoire de Biologie Animale, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. Tel.: 33 03 20 43 40 44; Fax: 33 03 20 43 40 44.

MATERIALS AND METHODS

Centipedes collection and metal exposure

Mature specimens of *Lithobius forficatus* ($n = 36$; 4 animals per group) were collected in a non-polluted area and acclimatized to the experimental conditions for several weeks. All experiments were performed in late autumn and winter in order to minimize changes due to the molting cycle. Animals were kept at 18–20 °C and exposed to cadmium chloride (CdCl₂) or lead chloride (PbCl₂) (Merck) via food and soil.

Via food. In the lab. the centipedes were fed with *Chironomus* larvae, maintained in water containing either 80 mg l of CdCl₂ or 500 mg l of PbCl₂. When used for feeding, cadmium and lead mean levels in *Chironomus* larvae were 150 and 219 mg kg (dry weight), respectively. Control animals received *Chironomus* larvae maintained in tap water.

Via soil. This experiment was performed in vegetable mold containing either 80 mg kg (dry weight) of CdCl₂ or 500 mg kg (dry weight) of PbCl₂. Control animals were maintained in metal-free mold and all the animals were fed with normal larvae.

For both routes (food and soil), two exposure times to heavy metals were studied i.e. 12 days and 45 days. These exposure periods were determined from previously published accumulation-detoxification curves (Descamps *et al.*, 1996). After exposure, the nephrocytes were excised from the centipedes and treated either for an ultrastructural study or for an autometallographic procedure (adapted from Danscher, 1981; Danscher *et al.*, 1987).

Ultrastructural study

A conventional ultrastructural study was carried out because the autometallographic procedure does not allow exploration simultaneously to the intracellular distribution of toxic metals and the cell injuries caused by these metals. Indeed, the initial treatment with sodium sulphur and exposure to the physical developer induced serious morphological damage in the tissue.

The animals were anesthetized with chloroform and the relevant tissues were removed and fixed in 3% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, for 2 h. After a post-fixation in 1% osmium tetroxide in the same phosphate buffer for 1 h, the pieces were dehydrated and embedded in Epon in the conventional manner (polymerization at 60 °C for 48 h). Ultrathin sections (80–90 nm) were cut from the Epon blocks, placed on 200-mesh copper grids, counterstained routinely with uranyl acetate and lead citrate and observed in a JEOL CX 100 electron microscope.

Autometallography

Autometallography is an autoinduced silver amplification method for certain metal atoms and metal molecules and is demonstrated in biological sections by photography (Danscher, 1981; Danscher *et al.*, 1987). Briefly, autometallography is a revised version of the sulphide silver method introduced by Timm (1958), a procedure that allows the detection of metals that form insoluble sulphides. Among these are toxic metals, such as cadmium and lead (Danscher, 1981; Danscher *et al.*, 1987). In fact, under normal circumstances, most metals present in the tissue are precipitated as their sulphides following immersion in a sodium sulphide solution (Danscher and Schröder, 1979). As a result, autometallography is not metal-specific. Nevertheless, among histological procedures, this technique is the most-sensitive and effective method to visualize metals in biological sections (Soto and Marigomez, 1995). Moreover, in the case of an experimental treatment, the differences observed between contaminated and uncontaminated animals are due to the studied metal. Consequently, this technique is appropriate to study the metal accumulation and metabolism in centipede nephrocytes during an experimental exposure with cadmium or lead. Further studies using more sophisticated analytical techniques, such as X-ray microanalysis, will be necessary to precisely show the presence of the metal in the granules in animals living in polluted fields.

A low autometallographic staining was observed in control animals (see Results). Indeed, although the technique used is not metal-specific, the reaction product is particularly rare both at the optical and ultrastructural levels. This reveals a very low basic metal concentration. Essential metals, such as zinc, manganese and magnesium can also be detected by autometallography, but a longer development period is required. Consequently, in this study, only the major metal accumulation sites (potentially the detoxification structures) are shown.

Tissue processing. The nephrocytes were removed from the anesthetized animals, immediately immersed in a sodium sulphide solution (0.1% Na₂S in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) for 2 min and fixed

with a solution of 3% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 for 15 min. This was followed by an immersion in the initial sulphide solution for 7 min. Then, the tissue was placed in glutaraldehyde for 1 h. Finally, the blocks rinsed for 2 × 5 min in 0.1 M phosphate buffer, were dehydrated by acetone and embedded in Epon. The polymerization temperature was maintained at 45 °C for 72 h (a higher temperature might have caused the metal sulphides to decompose).

Light microscopy. Semithin sections of 1 µm were placed on glass slides in a small drop of distilled water, dried on a heating plate (45–55 °C for 1 h). The sections were then coated by dipping in a 0.5% gelatin solution and allowed to dry before being developed. For development, the slides were placed in jars and covered with the physical developer, which was prepared immediately before use (for composition of the developer, see later). The jars were transferred to a water bath and kept at 26 °C in a darkened room. After a development time of 90 min (determined by preliminary studies), the slides were gently rinsed in running tap water at 40 °C for 45 min to remove the protective gelatin coating and to reduce the possible silver fog. Sections were then placed in a 5% sodium thiosulfate solution for 10 min at room temperature, rinsed in distilled water and counterstained with Azur II blue (1%). When dry, the sections were examined with a Zeiss light microscope.

Electron microscopy. Ultrathin sections (80–90 nm thick) were cut directly from the original blocks and placed on parlodion-coated 200-mesh nickel grids. For development, the grids were directly placed on freshly prepared physical developer with the sections facing the developer. After a development time of 50–60 min in a darkened room at 26 °C, the grids were washed in distilled water for at least 5 × 5 min in order to remove the protective colloid. Grids were then placed on 5% sodium thiosulfate solution for 5 min at room temperature, rinsed in distilled water (2 × 5 min), counterstained with uranyl acetate and observed in a JEOL CX 100 electron microscope.

Developer. The following stock solutions were made up: (1) 50% solution of gum arabic made up from lumps of crude acacia tree resin; (2) citrate buffer, 25.5 g of citric acid 1 H₂O + 23.5 g sodium citrate 2H₂O dissolved in deionized water to a final volume of 100 ml; (3) reducing agent, 0.85 g hydroquinone dissolved in 15 ml of deionized water; (4) silver ion supply, 0.11 g silver lactate dissolved in 15 ml deionized water. All the products were purchased from Sigma. To make the developer, 60 ml of solution (1), 10 ml of solution (2), 15 ml of solution (3), and 15 ml of solution (4) were mixed together immediately before use (Danscher, 1981).

RESULTS

The nephrocytes are located in the region of the posterior metameres of the head and maxilliped. The constitutive cells form "lymphatic strands" surrounding the salivary glands, the foregut, the dorsal tracheal stems and the maxillary nephridia (Seifert, 1990). Moreover, they exhibit a high micromorphological correspondence with the pericardial cells in many groups of arthropods (Seifert, 1990). The periphery of the nephrocytes is characterized by wide intercellular spaces and deep invaginations forming the cortical labyrinth (Seifert and Rosenberg, 1974). In the more central regions of the nephrocytes, the large vacuoles with various electron densities are called cytosomes; their function is not yet clear. These structures are presumed to be mostly fused lysosomes and endosomes (= phagolysosomes) but there may also be primary lysosomes among them (Seifert, 1990).

Ultrastructural study

Nephrocytes of controls showed no peculiarities, being comparable to those previously described by Seifert and Rosenberg (1974). Large intercellular spaces and clear granules were observed (Fig. 1).

When fed with contaminated *Chironomus* larvae, large electron-dense granules (referred to as cytosomes)

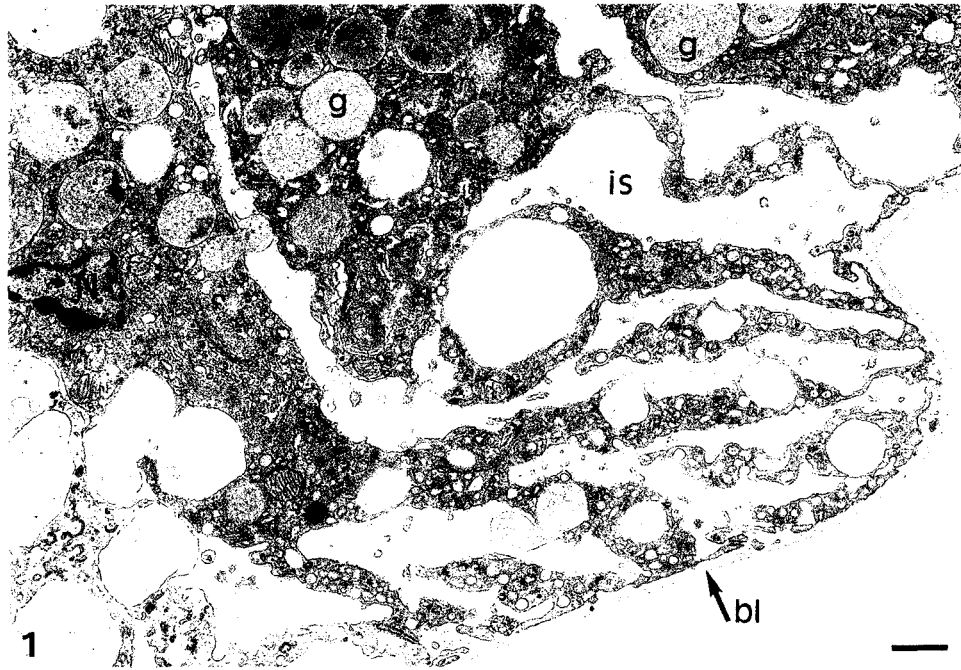


Fig. 1. Typical ultrastructural features of nephrocytes of mature *L. forficatus* living in unpolluted conditions. Numerous cytoplasmic clear granules and large intercellular spaces are observed. bl = basal lamina; g = granule; is = intercellular space; N = nucleus. Bar = 1 μ m.

appeared in the cells as early as day 12 of exposure (Fig. 2a and 2b). The central parts of the cytosomes were often totally opaque to electrons. Moreover, especially in lead-contaminated animals (Fig. 2b), large cytoplasmic lytic areas were seen. No significant differences could be observed after 45 days of exposure to food (Fig. 3a and 3b). Whatever the length of exposure, the intercellular spaces were still present, but less-developed than in controls.

In animals living in metal-contaminated soils, compared to controls, structural changes were also observed. In 12-day contaminated animals, small cytosomes appeared in the nephrocytes (Figs 2c and 2d). No differences were observed between cadmium-contaminated animals (Fig. 2c) and those in lead-contaminated soil (Fig. 2d). Moreover, cytoplasmic lytic areas were never seen. In 45-day-contaminated animals, numerous large cytosomes could be seen (Fig. 3c and 3d). Most of them contained an electron-opaque central part. Only scarce lytic areas were observed under these conditions.

Autometallography

Light microscopy. In semithin sections, the autometallographic staining of metals appeared in the form of a dark reaction product (dark silver deposits) (Fig. 4). This technique showed that metals were present in the entire gland, which means probably within all the nephrocytes. The different conditions were compared to control animals, which showed only scarce piles of reaction products within cells (Fig. 4a).

In 12-day metal-fed animals, the load of the metal was heavy (Fig. 4b and 4c) and stayed at a high level in 45-

day-treated animals (Fig. 4d and 4e). More precisely, metals seemed to be packed within regular-shaped granules. It must be noted that large spaces (possibly intercellular spaces and/or lytic areas) were regularly observed in the gland. It was not possible to determine the nature of these spaces at this level of magnification.

In contaminated-soil experiments, control aspects were observed in 12-day-contaminated animals (data not shown), whereas in 45-day-experiments, a heavy load of metal was present within cells (Fig. 4f and 4g). Large spaces were also seen under these conditions.

Electron microscopy. The ultrastructural autometallographic study allowed us to identify the accumulation sites of heavy metals in cells; this was realized with 12-days food-ingested animals. At the electron microscopic level, the reaction product was seen to consist of silver grains. These grains were situated almost exclusively over different types of electron-dense granules. In control animals, a few isolated silver grains were observed within the nephrocytes. Their localization did not seem to be linked to a peculiar type of granules (Fig. 5a).

In 12-day metal-fed animals, both in cadmium and lead experiments, the ultrastructural staining was similar. Silver grains were mainly detected over cytosomes (0.5–2 μ m in diameter). The cytosomes stained by silver grains could be rather irregular in shape and they often contained discreet areas of higher density (Fig. 5b–d). In many instances, silver grains seemed to be preferentially located on these higher density inserts. Occasionally, the reaction product was detected over concentrically-structured granules (0.4–1 μ m in diameter) and over heterogeneous granules with a sponge-like aspect (0.5–1 μ m

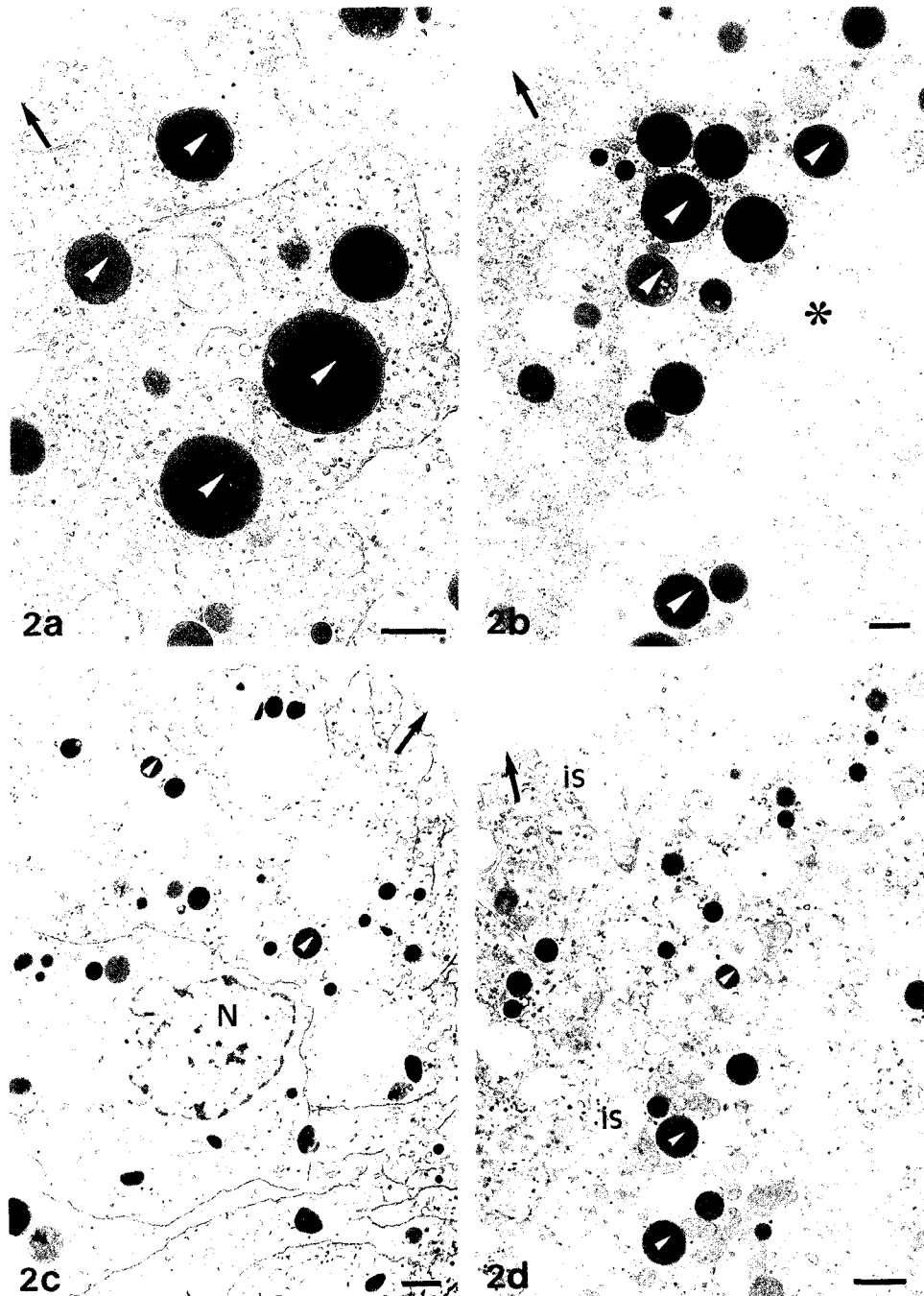


Fig. 2. Ultrastructural characteristics of nephrocytes of *L. forficatus* after 12 days of experimental exposure with cadmium or lead. **2a. 2b.** Exposure to food containing cadmium (2a) or lead (2b). Cytosomes (arrowheads) are observed in the cells. The central parts of numerous cytosomes are totally opaque to electrons and large cytoplasmic lytic areas are often seen (2b). **2c. 2d.** Soil contamination by cadmium (2c) or lead (2d). Numerous small cytosomes (arrowheads) are observed in the nephrocytes. No particular structures and lytic areas are observed in these cells. Arrow = basal lamina; asterisk = lytic areas; is = intercellular space; N = nucleus. Bars = 1 μ m.

in diameter). At high magnification, all types of granules described below could be seen surrounded by a single membrane (Fig. 5e).

DISCUSSION

In the present study, we clearly demonstrate that under heavy metal conditions, the nephrocytes accumulate large amounts of metal. These results support earlier works

(Duboscq, 1898; Ehrenberg, 1924). Furthermore, ultrastructural investigations showed that these cells are podocytes, well-characterized cells usually involved in ultrafiltration mechanisms.

Several studies support the idea that the "lymphatic strands" also constitute the ecdysial gland of chilopods. Indeed, this tissue exhibits a high micromorphological correspondence with the prothoracic gland of insects (Seifert, 1990). Ultrastructural changes during the molting

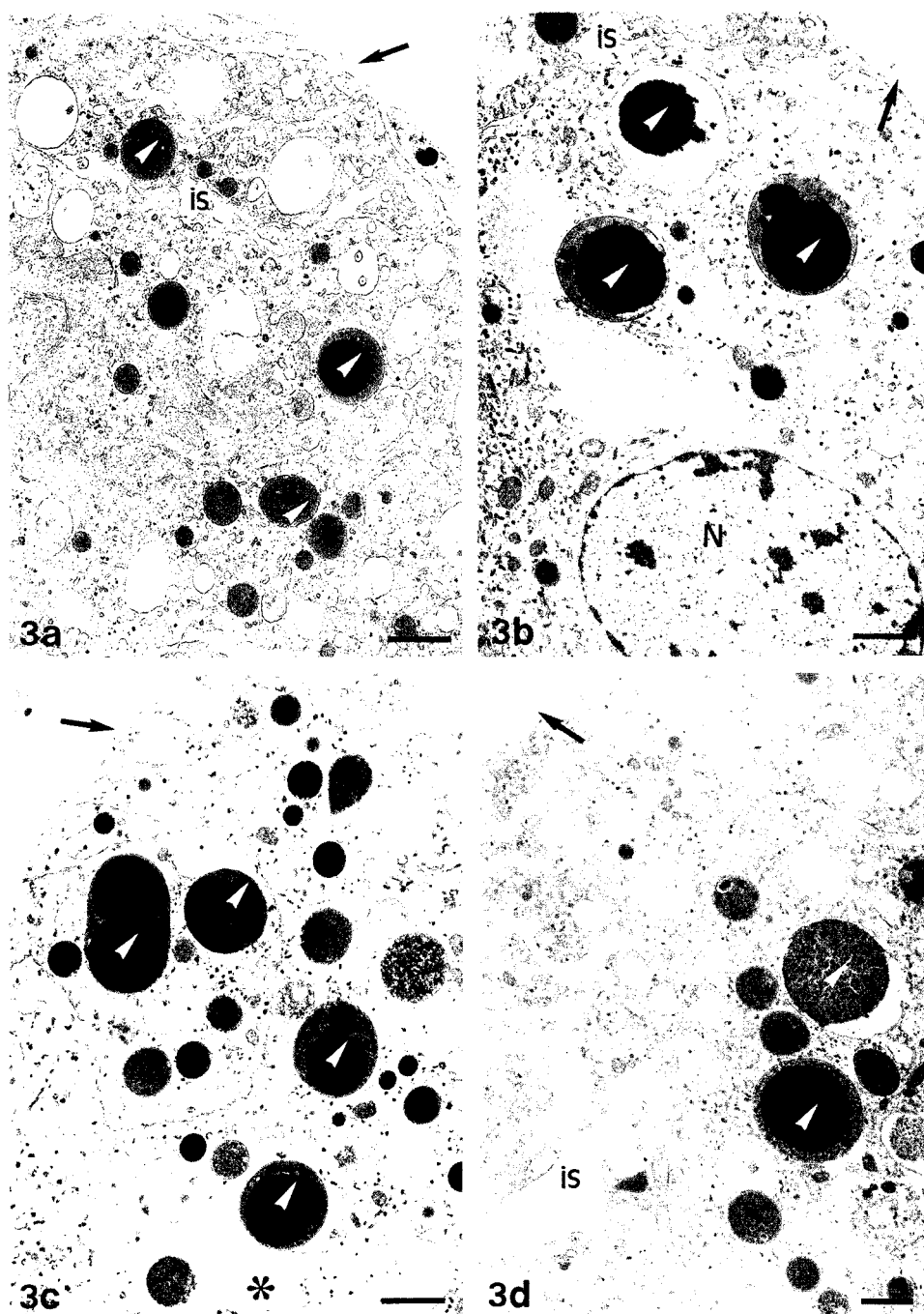


Fig. 3. Ultrastructural characteristics of nephrocytes of *L. forficatus* after 45 days of experimental exposure with cadmium or lead. **3a, 3b.** Food contamination by cadmium (3a) or lead (3b). Numerous large cytosomes (arrowheads) are observed within the nephrocytes. In most cases, the central part of these organelles is opaque to electrons. **3c, 3d.** Soil contamination by cadmium (3c) or lead (3d). Large electron-dense cytosomes (arrowheads) and cytoplasmic lytic areas are seen. is = intercellular space; N = nucleus; Arrow = basal lamina; Asterisk = cytoplasmic lytic area. Bars = 1 μ m.

cycle further support an ecdysial function for this organ (Seifert and Rosenberg, 1974). Moreover, Leubert (1982, 1986) demonstrated *in vitro* secretion of ecdysone and 20-hydroxyecdysone from isolated "lymphatic strands"—salivary gland complexes of adult *Lithobius forficatus*. Descamps and Lafont (1993) demonstrated that these complexes were also able to convert 5β -ketodiol into 2-deoxyecdysone. Furthermore, immunoreactivity to ecdysteroid antisera was shown by Seifert and Bidmond

(1988). Whatever the case, this organ might be implicated both in heavy metal accumulation and in steroidogenesis.

In the present work, presence of metals occurred in cytosomes located within the cells. The ability of the nephrocytes to bind and to store heavy-metals in cytosomes might be the cellular expression of a detoxification process. The accumulation of metals could be an effective mechanism to detoxify toxic metals present in the hemolymph. Considering their ultrastructural characteristics

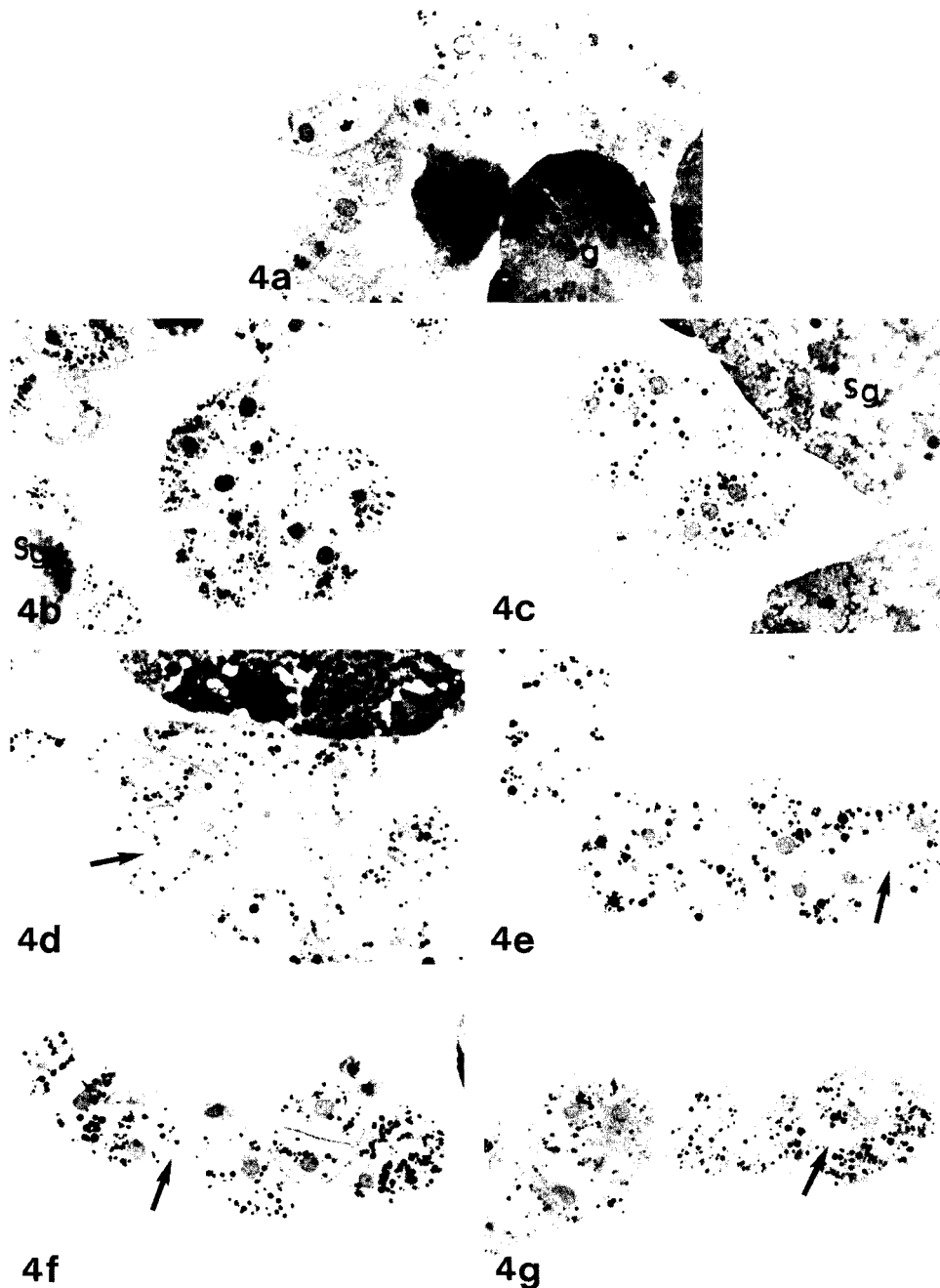


Fig. 4. Autometallographic demonstration of metals (dark silver deposits) in $1\ \mu\text{m}$ thick semithin sections of nephrocytes of cadmium- or lead-exposed *L. forficatus*. The sections depicted in Fig. 4a–4g were all subjected to autometallography and were counterstained with Azur II blue. **4a**. Control animals. Only scarce small clusters of silver grains can be seen in the nephrocytes. **4b, 4c**. Animals fed with a cadmium-polluted diet (4b) or a lead-polluted diet (4c) during a period of 12 days. An intense accumulation of dense reaction product is observed over spherical granules within the nephrocytes. **4d, 4e**. Animals fed with a cadmium-polluted diet (4d) or a lead-polluted diet (4e) during a period of 45 days. Numerous heavily stained granules are seen within cells. In both experiments, large spaces, possibly cytoplasmic lytic areas and/or intercellular spaces (arrows), are observed. **4f, 4g**. Animals living in cadmium-polluted soil (4f) or lead-polluted soil (4g) for 45 days, exhibit an intense staining over numerous spherical granules contained in nephrocytes. Large spaces (arrows) are also observed in these conditions. sg = salivary gland $\times 1400$.

(podocytes) described earlier (Seifert, 1990), nephrocytes might be involved in the excretory process involving uptake, accumulation, degradation and removal of hemolymph constituents. This has been demonstrated for pericardial cells in a mollusc (Giamberini and Pihan, 1996). Herein, animals were contaminated both by food and soil. Whatever the intake pathway of metals in

animals, heavy metals were transported to the nephrocytes via hemolymph.

It has been reported that the most important regulatory organ for metals in centipedes is the midgut (Hopkin, 1989). It was suggested that the epithelium of the digestive tract of the lithobiid, which is only one-cell thick, acts as a barrier to the passage of potentially toxic metals into

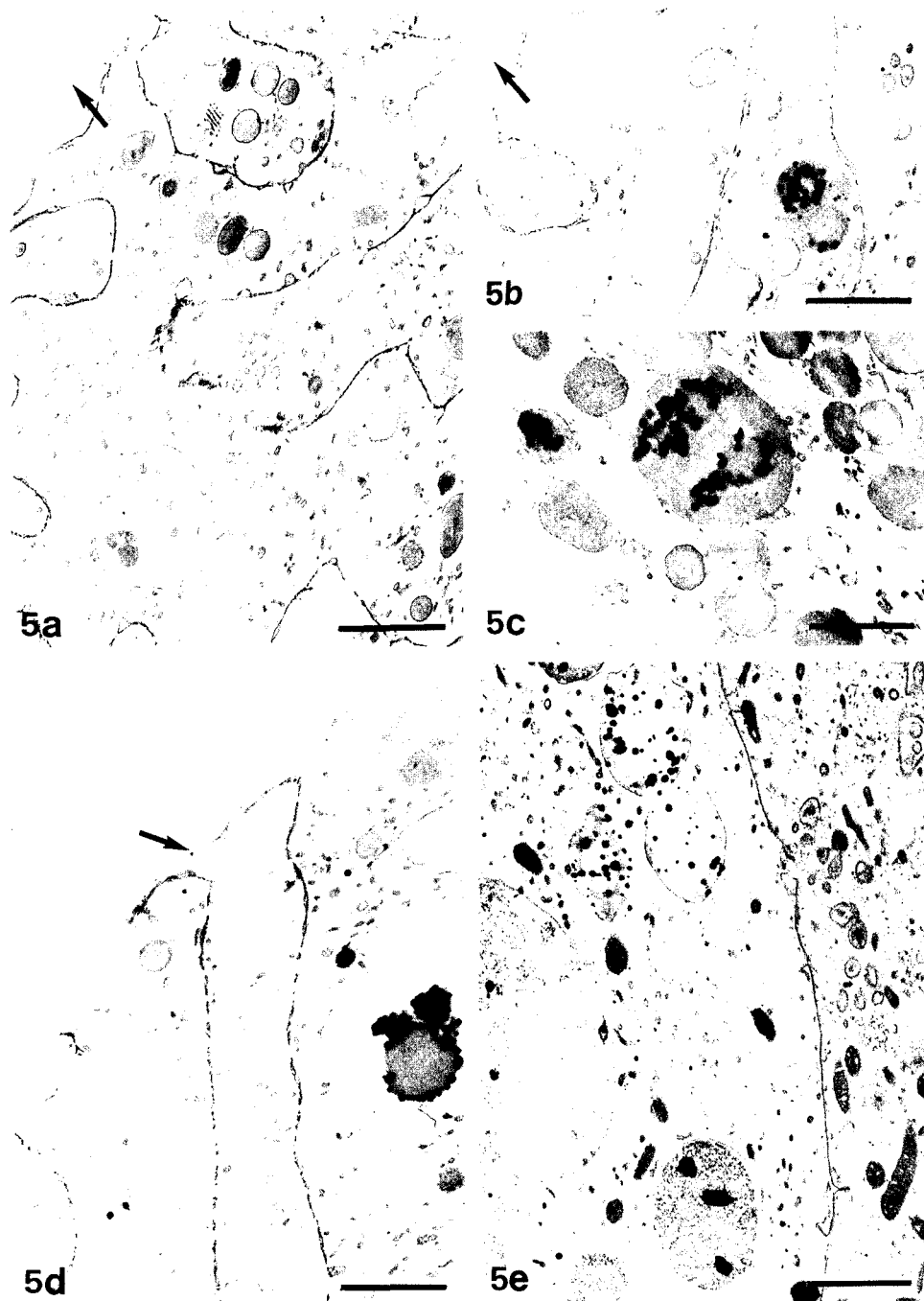


Fig. 5. Autometallographic demonstration of metals (dark silver deposits) in ultrathin sections of the nephrocytes of cadmium- or lead-intoxicated *L. forficatus*. **5a**. Control animals. Only a few isolated silver grains are seen. **5b**, **5c**, **5d**. In animals fed with cadmium-contaminated food during 12 days, silver grains are mainly detected over large-sized cytosomes. **5e**. In animals fed with lead-contaminated food during 12 days, an intense staining is observed over concentric-structured granules. Moreover, in some cases, granules with an heterogenous aspect exhibit a silver staining (arrowhead). Arrow = basal lamina. Bars = 1 μ m.

the rest of the body tissues (Hopkin *et al.*, 1985). The intestine is not an absolute barrier because cadmium and lead were detected within the nephrocytes as early as day 12 of exposure.

Concerning soil contamination exposure, the main point to be discussed is the presence of cadmium and lead in the nephrocytes of 45-day-contaminated animals. Indeed, Descamps *et al.* (1996) reported that centipedes can also be contaminated by ion reabsorption through

the integument. In our experimental series of soil-contaminated animals, control aspects were observed in 12-day-contaminated animals, whereas in 45-day experiments, numerous metal-containing cytosomes were found. Thus, the contamination of the nephrocytes by the soil requires a long period of exposure.

The metal accumulation might be due to the entry of metal through the integument. Indeed, when living in polluted soil, with metal-free diet, the accumulation of

cadmium or lead could be most likely related to the lack of wax in the cuticle of Lithobiidae (Littlewood, 1991) that expose animals to transpiration, water and ion reabsorption through the integument. As an alternative, coxal glands could also play a role in ion uptake, as demonstrated by Rosenberg and Bär (1981).

The detection of metals by autometallography does not allow to quantify the metal load. Therefore, an estimation is given by the number of silver-stained cytosomes. In contaminated food experiments, the metal load and the ultrastructural features of the nephrocytes seemed comparable after 12 and 45 days of exposure while the animals were still fed with metal-contaminated food. Moreover, for both routes of exposure, the number of metal-containing cytosomes in 45-day animals was comparable. These observations suggest that in polluted conditions, the metal load reaches the maximum. An elimination mechanism of the cytosome loads might be excretion via the maxillary nephridia.

Another possible way for the regulation of metals is the permanent storage of metal-containing granules. This appears to be the strategy adopted for copper and cadmium in terrestrial isopods (Hopkin and Martin, 1984a). Indeed, in uncontaminated sites, these short-life crustaceans are able to store all unwanted copper and cadmium in the S-cells of their hepatopancreas until their death (Hopkin and Martin, 1984). This strategy has also been adopted by adults of some Diptera for copper and iron, because they live only a few weeks after emergence (Tapp, 1975). In chilopods, a permanent storage of cadmium and lead in the nephrocytes seems unlikely, because these animals are able to live in polluted areas throughout their life (2–3 years).

Concerning the ultrastructural study, the point to be discussed is the presence of cytoplasmic lytic areas in heavily exposed animals. These cell injuries are the only evidence of cytotoxicity. They might be a consequence of the release of lysosomal hydrolases into the cytoplasm. Indeed, as demonstrated in molluscan pericardial gland, one can imagine that excessive concentrations of metal may overload the storage capacity of lysosomes and cause changes in the integrity of the lysosomal membranes (Moore, 1988; Sternlieb and Goldfisher, 1976; Variengo *et al.*, 1987; Giamberini and Pihan, 1996).

In contrast to that reported here, Hopkin *et al.* (1985) did not find any assimilation (or retention) of lead by another lithobiidae, *L. variegatus*. It must be noted that these authors did not use the same diet, feeding their animals with lobes of digestive glands of woodlice contaminated with heavy metals. In addition, in Hopkin's experiments, a high level of mortality occurred in a series of animals collected in unpolluted areas and fed with polluted diet. Such a phenomenon was not observed in our experimental series (no mortality at all). These discrepancies could be explained by differences in the experimental design and/or the chemical nature of metal compounds ingested.

Different ways of metal uptake in invertebrate cells

have been described, i.e. active transports such as endocytosis and ATP-dependant enzymes, but also passive transport processes such as diffusion, facilitated diffusion and channel proteins (Dallinger, 1995). All these ways of metal uptake can be considered for centipede nephrocytes. Therefore, the presence of coated pits, coated vesicles and large lucent vacuoles within the cortical region of nephrocytes suggests that endocytosis plays a major role in metal uptake.

After uptake, metals are stored in intracellular granules. Based on the chemical composition and the ultrastructural appearance of the granules, Hopkin (1989, 1990) and Hopkin *et al.* (1989) distinguished 3 types of intracellular metal-containing granules in terrestrial invertebrates. In lithobiid nephrocytes, metals are essentially packed in two main types of intracellular granules.

Most of the metal-containing granules observed in the present study are cytosomes. These structures are not abundant in control animals, which suggests that they constitute a particular storage detoxification mode. Considering their morphological characteristics, cytosomes cannot be linked to one of the granule-type described by Hopkin (1989). It is assumed that cytosomes have their origin in lysosomes; their heterogeneous appearance in thin sections and their ability to accumulate a wide range of elements are in favor of such a hypothesis (Seifert, 1990).

The second type of metal-containing granules observed in the present study have to be integrated into type A granules, described by Hopkin (1989, 1990). These granules, concentrically structured, are usually composed of concentric layers of amorphous calcium and magnesium ortho- and pyro-phosphate with a small organic component (Howard *et al.*, 1981; Taylor *et al.*, 1986). They can contain different metals, such as zinc, manganese, potassium, lead; but cadmium, copper and mercury have not been detected (Mason and Simkiss, 1982; Hopkin, 1989). Type A granules occur, for example, in intestinal cells of collembolans, cockroaches, nematodes and diplopods, in hepatopancreatic cells of spiders and gastropods and in the cells of malpighian tubules of Diptera (Hopkin, 1989; Köhler *et al.*, 1995).

The only published observations on the distribution of metals in centipedes demonstrated the presence of concentrically-structured granules in the malpighian tubules of *Lithobius forficatus* (Füller, 1966) and *Scolopendra subspinipes* (Wang and Wu, 1948). In the present study, these concentrically structured granules are clearly able to accumulate potentially toxic metals, such as cadmium and lead. Type A granules are not numerous and a major detoxification role seems unlikely. It is more probable that these structures are involved in calcium storage and regulation of intracellular calcium level (Simkiss, 1976a, 1976b; Hopkin, 1989). However, an involvement in a detoxification process cannot be excluded. A third type of metal-containing structure is represented by scarce and large granules with a sponge-like aspect. According to their

low number, their role seems to be of little interest in detoxification process.

In summary, nephrocytes are clearly able to accumulate non-essential metals, such as cadmium and lead in granules in order to reduce their toxic effects. These metals, when assimilated in excess, can be detoxified by incorporation into cytosomes. Putative excretion of heavy-metal detoxification compounds occurs more likely but remains to be confirmed.

Acknowledgements—The present study was supported by grant from the Région Nord-Pas de Calais, Programme de Recherches Concertées: "Environnement et Activités Humaines". Etude d'un secteur pollué par les métaux.

REFERENCES

- Beyer, W. N., Pattee, O. H., Sileo, L., Hoffman, D. J. and Mulhern, B. M. (1985) Metal contamination in wildlife living near two zinc smelters. *Environmental Pollution* **38A**, 63–86.
- Dallinger, R. (1995) Mechanisms of metal incorporation into cells. In *Cell Biology in Environmental Toxicology*, ed. M. P. Cajaraville, pp. 59–88. University of the Basque Country Press Service, Bilbao.
- Dansch, G. (1981) Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electronmicroscopy. *Histochemistry* **71**, 1–16.
- Dansch, G. and Schröder, H. D. (1979) Histochemical demonstration of mercury induced changes in rat neurons. *Histochemistry* **60**, 1–7.
- Dansch, G., Rytter Norgaard, J. O. and Baatrup, E. (1987) Autometallography: tissue metals demonstrated by a silver enhancement kit. *Histochemistry* **86**, 465–69.
- Descamps, M. and Lafont, R. (1993) Conversion of different putative ecdysteroid precursors in *Lithobius forficatus* L. (Myriapoda: Chilopoda). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **23**, 481–89.
- Descamps, M., Fabre, M. C., Grelle, C. and Gérard, S. (1996) Cadmium and lead kinetics during experimental contamination and decontamination of the centipede *Lithobius forficatus* L. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **31**, 350–53.
- Dubosq, O. (1898) Recherches sur les chilopodes. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale* **6**, 481–650.
- Ehrenberg, R. (1924) Die Exkretion (Tracheaten) II. 2. *Handbuch der vergleichenden Physiologie*, ed. Winterstein H. pp 695–759.
- Füller, H. (1966) Elektronenmikroskopische Untersuchungen der malpighischen Gefäße von *Lithobius forficatus* L. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie* **173A**, 191–200.
- Gérard, S., Fabre, M. C. and Descamps, M. (1996) Cadmium kinetics in *Lithobius forficatus* (L.) during experimental contamination and decontamination. In *Acta Myriapodologica*, eds J. J. Geoffroy, J. P. Mauriès and M. Nguyen Duy-Jacquemin, pp. 391–94. *Mémoires du Muséum national d'Histoire naturelle* (169), Paris.
- Gianberini, L. and Pihan, J. C. (1996) The pericardial glands of the zebra mussel: ultrastructure and implication in lead detoxification process. *Biology of the Cell* **86**, 59–65.
- Hopkin, S. P. (1989) *Ecophysiology of Metals in Terrestrial Invertebrates*. Elsevier Applied Science, New York.
- Hopkin, S. P. (1990) Critical concentrations, pathways of detoxification and cellular ecotoxicology of metals in terrestrial arthropods. *Functional Ecology* **4**, 321–27.
- Hopkin, S. P. and Martin, M. H. (1983) Heavy metals in the centipede *Lithobius variegatus* (Chilopoda). *Environmental Pollution* **6B**, 309–18.
- Hopkin, S. P. and Martin, M. H. (1984) Heavy metals in woodlice. *Symposia of the Zoological Society of London* **53**, 143–66.
- Hopkin, S. P., Hames, C. A. C., Dray, A. (1989) X-Ray microanalytical mapping of the intracellular distribution of pollutant metals. *European Microscopy and Analysis* **14**, 23–27.
- Hopkin, S. P., Watson, K., Martin, M. H. and Mould, H. L. (1985) The assimilation of heavy metals by *Lithobius variegatus* and *Glomeris marginata* (Chilopoda, Diplopoda). *Bijdragen tot der Dierkunde* **55**, 88–94.
- Howard, B., Mitchell, P. C. H., Ritchie, A., Simkiss, K. and Taylor, M. (1981) The composition of intracellular granules from metal accumulating cells of the snail *Helix aspersa*. *Biochemical Journal* **194**, 507–11.
- Köhler, H. R., Körtje, K. H. and Alberti, G. (1995) Content, absorption quantities and intracellular storage sites of heavy metals in Diplopoda (Arthropoda). *Biometals* **8**, 37–46.
- Leubert, F. (1982) Über Vorkommen und Bildungsorte von Ecdysteroiden bei *Lithobius forficatus* (L.) (Chilopoda). Dissertationen (A) Pädagogischen Hochschule Erturt, Mülhausen.
- Leubert, F. (1986) Untersuchungen zur Ecdysteroid-Biosynthese durch das Lymphstrang-Gewebe von *Lithobius forficatus* (L.) (Chilopoda). *Zoologischer Jahrbücher für Physiologie* **83**, 334–39.
- Lewis, J. G. E. (1981) *Biology of Centipedes*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Littlewood, H. (1991) The water relations of *Lithobius forficatus* and the role of coxal organs (Myriapoda: Chilopoda). *Journal of Zoology* **263**, 653–65.
- Mason, A. Z. and Simkiss, K. (1982) Sites of mineral deposition in metal accumulating cells. *Experimental Cell Research* **139**, 383–91.
- Moore, M. N. (1988) Cytochemical response of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Marine Ecology—Progress Series* **46**, 81–89.
- Palm, N. B. (1954) The elimination of injected vital dyes from the blood in Myriapodes. *Arkiv för Zoologi* **6**, 219–46.
- Read, H. J. and Martin, M. H. (1990) A study of Myriapod communities in woodlands contaminated with heavy metals. In *Proceedings of the 7th International Congress of Myriapodology*, ed. A. Minelli, pp. 289–98. Brill, Leiden.
- Rosenberg, J. and Bär, E. (1981) Coxalorgane bei Chilopoden: Feinstruktur und Ionen-Transport. *Verhandlungen der Deutschen zoologischen Gesellschaft* 1981, p. 263. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Scheffel, H. (1969) Untersuchungen über die hormonale Regulation von Häutung und Anamorphose von *Lithobius forficatus* (L.) (Myriapoda, Chilopoda). *Zoologische Jahrbücher für Physiologie* **74**, 436–505.
- Seifert, G. (1990) Morphology, histology and ultrastructure of the ecdysial glands in Myriapoda. In *Morphogenetic Hormones of Arthropods Vol. 2: Embryonic and Post-embryonic Sources*, ed. A. P. Gupta, pp. 309–38. Rutgers University Press, New-Brunswick and London.
- Seifert, G. and Bidmon, H. J. (1988) Immunohistochemical evidence for ecdysteroid-like material in the putative molting glands of *Lithobius forficatus* (Chilopoda). *Cell and Tissue Research* **253**, 263–66.
- Seifert, G. and Rosenberg, J. (1974) Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Häutungsdrüsen ("Lymphstränge") von *Lithobius forficatus* L. (Chilopoda). *Zeitschrift für Morphologie der Tiere* **78**, 263–79.
- Simkiss, K. (1976a) Cellular aspects of calcification. In *The Mechanisms of Mineralization in the Invertebrates and Plants*, eds N. Watanabe and K. Wilbur, pp. 1–31. University of South Carolina Press.
- Simkiss, K. (1976b) Intracellular and extracellular routes in bio-mineralization. *Symposium of the Society for Experimental Biology* **30**, 423–44.
- Soto, M. and Marigomez, I. (1995) Techniques for the study of metals in cell biology. In *Cell Biology in Environmental Toxicology*, ed. M. P. Cajaraville, pp. 59–88. University of the Basque Country Press Service, Bilbao.
- Sternlieb, I. and Goldfisher S. (1976) Heavy metals storage and lysosomes. In *Lysosomes in Biology and Pathology*, Vol 5, eds J. T. Dingle and T. T. Dean, pp. 185–97. North Holland Elsevier, Amsterdam.
- Tapp, R. L. (1975) X-ray microanalysis of the midgut epithelium of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Science* **17**, 449–59.
- Taylor, M., Simkiss, K., Greaves, G. N. (1986) Amorphous structure of intracellular mineral granules. *Biochemical Society Transactions* **14**, 549–52.
- Timm, F. (1958) Zur Histochemie der Schwermetalle, das Sulfid-Silber-Verfahren. *Deutsche Zeitschrift für die gesamte gerichtliche Medizin* **46**, 706–11.
- Van Straalen, N. H. and Van Wensem, J. (1986) Heavy metal content of forest litter arthropods as related to body-size and trophic level. *Environmental Pollution* **42A**, 209–21.
- Variengo, A., Moore, M. N., Mancinelli, G., Mazucotelli, A., Pipe, R. K. and Farrar, S. V. (1987) Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and accumulation in marine mussels: effects of cadmium in the presence and absence of phenanthrene. *Marine Biology* **94**, 251–57.



- Wang, T. H. and Wu, H. W. (1948) On the structure of the Malpighian tubules of centipedes and their excretion of uric acid. *Sinensia* **18**, 1-11.
- Wignarajah, S. and Phillipson, J. (1977) Numbers and biomass of centipedes (Lithobiomorpha: Chilopoda) in a *Betula-Alnus* woodland in N. E. England. *Oecologia* **31**, 55-66.