
Evaluation d'agents de remédiation des sols contaminés par les métaux : une approche écotoxicologique

Sébastien Lemièr*, Jean-Philippe Godet**, Marion Tanguy***
Franck Brulle*** & Alain Leprêtre***

* IUTA – Université Lille1, Département Génie Biologique
Boulevard Langevin - BP 179 59653 621 Villeneuve d'Ascq Cedex

** LSE-ISA, Institut Supérieur d'Agriculture, Laboratoire Sols et Environnement,
48 Boulevard Vauban - 59046 Lille Cedex

*** Université Lille 1, LENE, Laboratoire d'Ecologie Numérique et Ecotoxicologie,
Cité Scientifique, SN3 - 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex

sebastien.lemiere@univ-lille1.fr

Sections de rattachement : 67 & 68
Secteur : Secondaire

*RÉSUMÉ. Afin d'évaluer l'efficacité d'agents immobilisants pour la remédiation des sols contaminés par les métaux (cendres volantes, polymère commercial et mélange de phosphates) des expérimentations en microcosmes intérieures ont été réalisées en exposant *Eisenia fetida*. Différents substrats ont été utilisés : sol agricoles, sols urbains contaminés par le cadmium, le plomb et le zinc et un sol artificiel. Les paramètres suivants ont été étudiés chez les vers exposés pendant 56 jours : activités enzymatiques des systèmes antioxydants, allocation énergétique, expression de gènes, traits d'histoire de vie... Tous les substrats engendrent chez les vers exposés un stress général – qui se traduit en une induction des activités enzymatiques et en des changements qualitatifs et quantitatifs de leur composition biochimique – couplé à un stress plus modéré (augmentation de l'expression du gène de la métallothionéine principalement) dans le cas des sols contaminés. Des résultats acquis au niveau infra-individuel, il apparaît difficile de conclure sur les bénéfices écotoxicologiques des agents immobilisants testés. Des expérimentations complémentaires avec des végétaux et l'analyse des traits d'histoire de vie permettent de recommander plutôt le traitement avec le polymère que les deux autres étudiés.*

*MOTS-CLÉS : microcosmes, *Eisenia fetida*, contamination environnementale, remédiation des sols, éléments traces métalliques.*

1. Introduction et contexte

La contamination métallique des sols due aux activités anthropiques est préoccupante. Ce, en termes de risques pour la santé humaine et environnementale, des faits de la persistance, de l'accumulation, et du transfert possible de ces métaux vers les nappes souterraines et vers la chaîne trophique. La contamination des sols autour des usines métallurgiques de Noyelles-Godault et d'Auby (Nord, 59) est connue, notamment pour les sols agricoles environnants (Sterckeman *et al.*, 2002). En ce qui concerne les aires de jeux, les parcs municipaux, les potagers et les jardins individuels de cette zone densément peuplée, leur contamination commence à être connue mais le reste moins que pour les terrains agricoles (Douay *et al.*, 2005 ; Pruvot *et al.*, 2006). Pourtant, il est évident, que la consommation régulière de ses propres légumes représente une voie d'exposition des populations locales et qu'également pour le jeune enfant, le sol (et poussières) des jardins individuels et des aires récréatives pourrait constituer une source d'exposition majeure par le biais des contacts main-bouche.

Des agents immobilisants des métaux, minéraux, comme les cendres volantes issues de centrales thermiques à lit fluidisé circulant de combustion (cendres LFC) ou des amendements phosphatés et organiques, comme le polymère «industriel» à base de polyacrylate (absorbant fabriqué par ATOCHEM), appelé D60 pourraient constituer des méthodes alternatives et économiques pour la remédiation d'aires contaminées étendues, comme dans le cas de Noyelles-Godault et d'Auby. Certes, une telle remédiation par immobilisation des éléments métalliques n'a pas pour objectif de décontaminer les sols, mais vise à réduire la mobilité, la biodisponibilité et la bioaccessibilité des polluants, et intègre certains aspects opérationnels tenant compte de contraintes environnementales et socio-économiques des secteurs autour des usines métallurgiques de Noyelles-Godault et d'Auby.

Ces agents immobilisants des contaminants métalliques des sols urbains devraient cependant, parallèlement à leur développement ou antérieurement à leur production, usage et commercialisation, être évalués en termes d'effets écologiques et écotoxicologiques pour la macrofaune (et principalement les lombricides) des sols.

Afin d'évaluer les effets toxiques intrinsèques d'agents (cendres LFC, polymère D60 et amendement phosphaté) utilisables pour la remédiation de sols urbains contaminés par les métaux, ainsi que pour étudier l'efficacité de ces traitements, des expérimentations en microcosmes intérieurs ont été mises en œuvre avec l'annélide oligochète *Eisenia fetida*. Une telle approche en microcosmes intérieurs permet de travailler en conditions contrôlées d'expositions comme lors de tests d'écotoxicité normalisés et ceci tout en reflétant de manière réaliste la complexité des écosystèmes : fonctionnement plus réaliste du sol (respect des écoulements), compatibilité avec le modèle biologique (apport de nourriture, degré d'humidité, aération...), travail avec des effectifs susceptibles d'appréhender des effets s'exerçant au niveau des populations, expositions longues (mesure d'effets sur plusieurs générations)...

D'une façon générale, les vers de terre sont plus sensibles à la pollution en métaux que d'autres invertébrés du sol, particulièrement pour le zinc et le cuivre. Le choix du modèle animal utilisé s'est orienté vers l'oligochète *Eisenia fetida*. Il s'agit en effet d'un modèle reconnu en écotoxicité des sols et sélectionné par des instances nationales et internationales comme espèce bioindicatrice. Cette espèce répond aux différents critères des indicateurs biologiques (pertinence, fiabilité, robustesse, sensibilité, reproductibilité) et est utilisée en bioessais normalisés. De nombreux biomarqueurs ont été développés chez cet invertébré : activités enzymatiques des systèmes antioxydants, adduits à l'ADN, test des comètes pour la détection des lésions à l'ADN, métallothionéines, réserves énergétiques, gènes différenciellement exprimés... *Eisenia fetida* est de plus le modèle biologique principal du Laboratoire d'Ecologie Numérique et d'Ecotoxicologie de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, qui possède son propre élevage maîtrisé (Brulle *et al.*, 2006 ; Grumiaux *et al.*, 2007).

2. Plan expérimental, matériels et méthodes

Le dispositif expérimental est constitué de 18 microcosmes intérieurs, contenant différents types de sols amendés ou non (leur contamination est présentée dans le tableau 1) : les terres 05-852 (terre agricole témoin), 03-159 et 04-175 (terres de potagers provenant de la zone Aubry/Noyelles-Godault) et un sol artificiel de référence R (sol artificiel OCDE). Le sol artificiel (OCDE, 1984) est composé de 10 % de tourbe blonde tamisée, 20 % de kaolin, 69 % de sable de quartz industriel, et le pH de ce sol est ajusté à 6.0 ± 0.5 par ajout de CaCO_3 (≈ 1 %). Les différents sols ont été tamisés sur mailles de 6 mm. Chaque sol est ensuite traité ou non (sans ajout, ajout de 3 % de cendres, ajout de 0,2 % de D60 ou ajout de 0.95 % de phosphates (50 % d'hydrogénophosphate d'ammonium et 50 % d'hydroxyapatite)). Ils sont soumis ensuite à une réhydratation progressive jusqu'à atteindre 65 % de la capacité de rétention d'eau. Ils sont placés sous éclairage nyctéméral (12h jour/12h nuit), à $22^\circ\text{C} \pm 2$ °C, puis chacun des microcosmes a étéensemencé par 500 vers. L'évaluation des effets des amendements sur le modèle animal a été réalisée par le biais de différentes approches qui sont présentées dans le tableau 2.

	Cd	Pb	Zn
Sol urbain 04-175	16.10	371.04	1813.48
Sol urbain 03-159	19.71	1362.17	2012.99
Sol agricole 05-852	0.758	40.146	73.059

Tableau 1 . Teneurs en cadmium, plomb et zinc (en mg/ kg de terre, poids sec) des sols utilisés pour les expositions en microcosmes

<i>Paramètres étudiés chez les vers exposés</i>	<i>Références</i>
<u>Bioaccumulation métallique</u>	
Cd	Demuyne <i>et al.</i> , 2006
Pb	
Zn	
<u>Biomarqueurs</u>	
<i>Expression de gènes</i>	
Expression de la Cd-MT	Brulle <i>et al.</i> , 2006
Expression de la catalase	
Expression de la superoxyde dismutase	
<i>Activités enzymatiques des systèmes antioxydants</i>	
Activité catalase	Godet, 2007
Activité superoxyde dismutase	Lemière <i>et al.</i> , 2008
<i>Evaluation des réserves énergétiques</i>	
Teneurs en protéines	Godet, 2007
Teneurs en lipides	Tanguy, 2008
Teneurs en sucres totaux	
Teneurs en glycogène	Lemière <i>et al.</i> , 2008
Equivalents énergétiques	
<u>Analyse des traits d'histoire de vie</u>	
Croissance	Grumiaux <i>et al.</i> , 2007
Maturation	Tanguy, 2008
Mortalité	Lemière <i>et al.</i> , 2008
Reproduction	

Tableau 2 . Paramètres étudiés chez les vers exposés en microcosmes intérieurs pour l'évaluation des effets des amendements.

Les réponses suite à l'exposition en microcosmes des vers a été suivie sur une durée maximale de 56 jours pour la mesure des effets au niveaux moléculaire et biochimique avec choix de différents pas de temps pour les mesures en fonction des objectifs poursuivis et sur 18 semaines pour l'analyse des traits d'histoire de vie (croissance et

reproduction). Pour ces derniers, des observations hebdomadaires des microcosmes ont été réalisées pendant douze semaines pour relever le taux de mortalité, la masse des vers et l'état de développement sexuel. A la vingtième semaine, le nombre de cocons produits, le nombre de juvéniles et la biomasse produite ont été relevés.

3. Principaux résultats et discussion

3.1. *Cinétique d'accumulation des éléments minéraux dans Eisenia fetida*

Les concentrations internes en cadmium et en zinc ne diffèrent pas entre les vers exposés aux sols contaminés amendés ou non (D60, cendres LFC et amendement phosphaté). Les vers de terre exposés aux sols 05-852, 03-159 et 04-175 accumulent significativement plus de cadmium dès 2 jours et de zinc dès 7 jours en présence ou non des remédians comparativement aux vers témoins. Pour le cadmium, cette accumulation augmente tout au long des expositions des vers des microcosmes 03-159 et 04-175. Concernant le plomb, il n'a pu être quantifié seulement que pour les individus des microcosmes 03-159 à partir de 14 jours (microcosmes sans traitement) et à partir de 28 jours dans les individus exposés à ce sol traité avec les phosphates. Pour le zinc, les concentrations internes varient peu dans le temps. Cet élément semble être régulé par les vers. Les individus exposés au sol artificiel et au sol 05-852 accumulent très peu de métaux, ces sols ne sont en effet pas ou peu contaminés.

3.2. *Evaluation des effets des amendements au regard des biomarqueurs*

Concernant les observations infra-individuels pour les amendements D60 et cendres LFC, toutes les expositions aux substrats choisis engendrent un stress général chez les vers, couplé dans le cas des sols contaminés 03-159 et 04-175 à un stress additionnel du à la contamination des sols. L'expression de la métallothionéine (Cadmium-MT) est un des seuls paramètres pour lesquels une augmentation spécifique est observée dans le cas des sols contaminés 03-159 et 04-175. Cette réponse apparaît dès 48 heures d'exposition et est maintenue tout au long de l'exposition (56 jours). Dans les sols contaminés amendés, les niveaux d'expression de la Cd-MT mesurés sont plus faibles après 14 jours d'exposition. Cependant, à la fin de l'exposition (56 jours), l'expression du gène codant pour la Cd-MT est comparable dans les sols contaminés traités par le D60 et les cendres LFC. Elle reste diminuée pour les traitements avec l'amendement phosphaté. Dans tous les microcosmes, comparativement aux individus témoins, les activités des enzymes des systèmes antioxydants augmentent dès deux jours d'exposition et sont corrélées à une augmentation des protéines. Cette augmentation des

activités catalase et superoxyde dismutase est observée jusqu'à la fin de l'exposition (56 jours). Cependant, aucune inhibition enzymatique n'est rapportée à la toxicité des métaux comme cela est mentionné dans d'autres travaux avec des vers exposés à un stress métallique (Saint-Denis *et al.*, 1998). Aucun effet des agents remédiateurs n'a été observé au niveau de ces biomarqueurs.

3.3. *Analyse des traits d'histoire de vie*

L'analyse des courbes de croissance, de mortalité et de maturation montre que les traitements par le D60 pourraient entraîner certains effets négatifs modérés dans les sols naturels (03-159, 04-175 et 05-852) : mortalité augmentée, retard de maturation sexuelle, diminution de la fécondité... Ces effets négatifs sont atténués dans le sol artificiel. Concernant les traitements par les cendres LFC, aucune différence entre sols remédiés ou non n'est observée quel que soit le sol. L'analyse des paramètres de reproduction ne révèle aucun effet important consécutif à l'exposition aux substrats contaminés. Il semble cependant que le nombre de cocons décroît avec la contamination des sols (terres 03-159 et 04-175) comparativement au nombre de cocons produits par les vers dans le sol non contaminé 05-852 sans traitement. Le traitement de ce sol témoin par l'amendement D60 entraîne une diminution de la production de cocons par les vers. Au regard de la biomasse des juvéniles nés dans les différents microcosmes, ces observations ne sont plus retrouvées et aucun effet significatif consécutif à l'exposition aux substrats contaminés, remédiés ou non (D60 et cendres LFC) ne peut être mis en évidence, même s'il semble que la biomasse produite est plus faible avec l'amendement D60 pour le sol 04-175. L'évolution de la croissance (en masse) des vers élevés dans les microcosmes contenant les sols non contaminés ou contaminés est globalement la même. La contamination des sols n'a pas d'effet sur la masse finale des vers exposés. La présence de phosphates dans le sol artificiel semble accélérer la croissance des vers exposés par rapport au vers élevés dans le sol d'élevage. Cet agent de remédiation dans les sols naturels (05-852, 03-159 et 04-175) entraîne cependant un retard transitoire de croissance (pendant les 6 premières semaines).

4. **Conclusions**

Avec l'amendement D60 et les cendres, l'ensemble des résultats acquis ne permet pas de révéler une réelle efficacité des procédés de remédiation en termes de réduction de toxicité ou d'immobilisation des métaux dans les sols urbains contaminés pour les vers exposés. Au regard des observations infra-individuelles, l'addition de cendres ou de D60 dans le sol artificiel de référence (OCDE) n'entraîne pas de réponse toxique ou bénéfique excepté pour l'expression de la métallothionéine au cours de l'exposition. L'étude des traits d'histoire de vie montre que les traitements par le D60 pourraient

entraîner certains effets négatifs modérés pour des vers dans des sols naturels contaminés. Avec l'amendement phosphaté, l'ensemble des résultats acquis ne permet également pas de révéler une réelle efficacité de ce procédé de remédiation en termes de réduction de toxicité ou d'immobilisation des métaux dans les sols urbains contaminés pour le modèle animal considéré. Peu de différences ont été observées entre les vers exposés aux sols remédiés ou non et cet amendement semble n'avoir que peu d'effet (stimulant ou toxicité intrinsèque) pour les vers. Certains paramètres sont en cours d'acquisition pour cet agent remédiant et devraient permettre son évaluation complète, notamment les paramètres de reproduction qui sont apparus comme parmi les plus pertinents dans ce travail.

Bibliographie

Brulle F., Mitta G., Cocquerelle C., Vieau D., Lemièrre S., Leprêtre A. and Vandebulcke F., 2006, « Cloning and real-time PCR testing of 14 potential biomarkers in *Eisenia fetida* following cadmium exposure », *Environmental Sciences and Technologies*, 40(8), 2844-2850.

Demuyne S., Grumiaux F., Mottier V., Schikorski D., Lemièrre S. and Leprêtre A., 2006, « Metallothionein response following cadmium exposure in the oligochaete *Eisenia fetida* », *Comparative Biochemistry and Physiology part C*, 144(1), 34-46.

Douay F., Roussel H., Pruvot C. and Waterlot C., 2006, « Impact of a Smelter Closedown on Metal Contents of Wheat Cultivated in the Neighbourhood », *Environmental Science and Pollution Research*, 15, 162-169.

Godet J-P., 2007, « Effet de procédés de remédiation sur des sols urbains contaminés en métaux lourds : Réponses de l'invertébré terrestre (*Eisenia fetida*) exposé en microcosmes intérieurs », Master 2 Recherche Environnement Spécialité Ecotoxicité et Biodiversité. Univ. Paul Verlaine (Metz), 40p.

Grumiaux F., Demuyne S., Lemièrre S., Vandebulcke F. and Leprêtre A., 2007, Effect of Fluidized Bed Combustion Ashes used in metal polluted soil remediation on life history traits of the oligochaete *Eisenia andrei*, *European Journal of Soil Biology*, 43(S1), S256-S260.

Lemièrre S., Godet J.P., Grumiaux F., Delplace P., Demuyne S., Vandebulcke F., Douay F. and Leprêtre A., 2008, « *Eisenia fetida* responses to metal immobilizing agents for contaminated soil remediation: a microcosm evaluation », *SETAC Europe 18th Annual Meeting, World under stress: scientific and applied issues in environmental toxicology and chemistry*, Warsaw, Poland, 25-29 May 2008.

OCDE, 1984, *OECD guideline for testing chemicals*. Section 2: effects on biotic systems, Method, 207, Earthworm, acute toxicity tests, Paris, France, 207 pp.

Pruvot C., Douay F., Herve F. and Waterlot C., 2006, « Heavy metals in soil, crops and grass as a source of human exposure in the former mining areas », *Journal of Soils and Sediments*, 6, 215-220.

Saint-Denis M., Labrot F., Narbonne J. F. and Ribera D, 1998, « Glutathione, glutathione-related enzymes, and catalase activities in the earthworm *Eisenia fetida andrei* », *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35, 602-614.

Sterckeman T., Douay F., Proix N., Fourrier H. and Perdrix E., 2002, « Assessment of the contamination of cultivated soils by eighteen trace elements around smelters in the North of France », *Water Air and Soil Pollution* 135, 173-194.

Tanguy M., 2008, « Effet de procédés de remédiation de sols contaminés par les métaux : réponses d'*Eisenia fetida* exposés en microcosmes intérieurs », Master 2 Recherche Environnement Spécialité Ecotoxicité et Biodiversité. Univ. Paul Verlaine (Metz), 40p.