

Etude expérimentale de la bioaccumulation des éléments traces métalliques Cd, Cu, Zn et Pb chez l'escargot *Helix aspersa*

Nedjoud GRARA¹, Mounir BOUCENNA², Amira ATAILIA²
Houria BERREBBAH² & Mohamed Réda DJEBAR²

1. Université 8 Mai 1945, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, Département de Biologie, Guelma 2400, Algérie. e-mail : grara120@yahoo.fr

2. Université Badji Mokhtar- Département de Biologie, Laboratoire de Toxicologie Cellulaire, B.P. 12. Annaba 23000, Algérie.

Résumé. Cette étude s'intéresse à l'évaluation expérimentale de l'impact des poussières métalliques recueillies au niveau du complexe sidérurgique d'El-Hadjar à Annaba (Algérie) et du cadmium et leurs effets sur l'escargot *Helix aspersa* bioindicateur de pollution. En effet, nous avons mis en évidence que la concentration des quatre métaux (Cd, Cu, Zn, Pb) au niveau des deux organes, l'hépatopancréas et le rein réputés comme organes cibles dans la bioaccumulation métallique, augmente d'une manière dose-dépendante. Ainsi, l'analyse par absorption atomique a montré une accumulation importante des métaux (Cd, Zn, Pb, Cu) au niveau des organes considérés.

Mots clés : *Helix aspersa*, poussières métalliques, Cadmium, pollution, bioaccumulation, hépatopancréas, rein.

Experimental study of the bio-accumulation of metallic trace elements Cd, Cu, Zn and Pb in the snail *Helix aspersa*.

Abstract. In this study we were interested in the evaluation of the impact of the metal dust collected from the steel industrial complex at Annaba (Algeria) and the Cadmium and their effects on *Helix aspersa* as a pollution bioindicator. Indeed, we highlighted that the metal trace concentrations (Cd, Cu, Zn, Pb) in two organs (hepatopancreas and kidney) increases depending of the metal levels in dust. Thus, the analysis by atomic absorption showed a significant accumulation of metals (Cd, Zn, Pb, Cu) in the considered organs.

Key words: *Helix aspersa*, dust metal, Cadmium, pollution, bio-accumulation, hepatopancreas, kidney.

INTRODUCTION

Les gastéropodes terrestres (escargots et limaces) présentent un important pouvoir bio-accumulateur de métaux. Ces derniers survivent bien sur des sites contaminés en métaux, ainsi, l'escargot est considéré comme l'un des concentrateurs les plus efficaces de métaux traces des habitats terrestres pollués. Cette résistance résulte de la capacité que présentent ces invertébrés terrestres de retenir et neutraliser les métaux toxiques soit par compartimentation intracellulaire et excrétion, soit par liaison avec des protéines, dont les métallothionéines, qui se lient fortement aux métaux surtout le Cadmium et permettent leur stockage durant de longues périodes (Le Bras 2007).

L'objectif de cette étude est d'évaluer dans les conditions de laboratoire l'accumulation des éléments traces métalliques (Pb, Cu, Zn, Cd) chez un organisme bioaccumulateur de métaux lourds, l'escargot *Helix aspersa* qui repose sur la mesure des concentrations internes de ces métaux après une durée d'exposition de 4 semaines.

MATERIEL ET METHODES

Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé est le gastéropode terrestre *Helix aspersa* recueilli dans la région de Guelma (Nord-Est algérien). Les escargots, de poids moyen de $8,5 \pm 0,15$ g, sont élevés dans les conditions suivantes que l'on considère comme optimales : photopériodes de 18 h de lumière / 24 h, température de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, hygrométrie de 80 à 95% ; alimentation à la farine de blé. Les escargots sont répartis dans des boîtes en plastique transparentes ($23,5 \times 16,5 \times 10,5$ cm) avec couvercle perforé. Chaque boîte contient une éponge mouillée pour maintenir l'humidité. L'alimentation est fournie régulièrement tous les 3 jours dans des boîtes de pétri de 9 cm de diamètre régulièrement (Gomot 1997, Coeurdassier *et al.* 2001).

Sources des métaux

Les poussières métalliques utilisées dans notre étude ont été collectées près d'un complexe sidérurgique à Annaba ; une analyse chimique par absorption atomique a

Tableau I. Composition en ppm des poussières rejetées par l'unité industrielle (ACE 1) et (ACE 2) (Klèche 2002).

Echantillon	Cu	Zn	Pb	Cr	Ni	Mn	Fe
Poussières ACE1	3,70	240,00	24,00	10,00	1,20	320,00	3000,00
Poussières ACE 2	7,00	480,00	62,40	12,00	1,30	540,00	3600,00
Total	10,70	720,00	88,40	22,00	2,50	860,00	6600,00

Tableau II. Accumulation de Cd, Cu, Zn, Pb dans l'hépatopancréas et le rein de l'escargot *Helix aspersa*.

Métal	organes	Concentrations du cadmium / poussières métalliques				
		0 µg	100 µg	500 µg	1000 µg	1500 µg
Cd	Hépatopancréas	0,25±0,006	2,36±0,004***	12,82±0,23***	52,27±0,07***	53,16±0,13***
	Rein	0,16±0,002	0,21±0,009***	0,53±0,008***	2,42±0,004***	2,44±0,003***
Cu	Hépatopancréas	0,51± 0,005	4,06±0,01***	5,32±0,15***	15,96±0,07***	16,10±0,14***
	Rein	0,71±0,004	0,83±0,001***	1,028±0,02***	1,17±0,008***	1,20±0,002***
Zn	Hépatopancréas	0,85±0,001	41,28±0,36***	119,7±1,34***	419,15±1,05***	420,37±0,52***
	Rein	0,40±0,008	5,38±0,01***	10,14±0,12***	12,6±0,32***	12,90±0,17***
Pb	Hépatopancréas	0,66±0,002	6,86±0,003***	12,01±0,02***	22,085±0,04***	23,03±0,02***
	Rein	0,23±0,003	0,71±0,005***	0,88±0,003***	1,75±0,005***	1,81±0,01***

(Avec * : Différence significative $P \leq 0,05$, ** : Différence hautement significative $P \leq 0,01$, *** : Différence très hautement significative $P \leq 0,001$)

été utilisée pour déterminer la composition de ces poussières. Cette analyse a révélé la présence de 7 métaux lourds (Tab. I).

Le chlorure de Cadmium (CdCl_2) (Panreac 99%) : le cadmium est considéré comme le polluant le plus toxique et le plus répandu dans l'environnement des zones à fortes activités humaines.

Mode opératoire

Le traitement des animaux a été effectué par addition de concentrations croissantes de poussières métalliques et de cadmium dans la farine de blé. Nous avons retenu 4 concentrations et un milieu témoin (100 ; 500 ; 1000 ; 1500 µg/g d'aliment) sur la base des travaux de Coeurdassier *et al.* (2001, 2002) et des essais au laboratoire, et un milieu témoin. Les escargots sont répartis en 10 lots de 5 escargots / lot. Le traitement a duré 4 semaines pour les 10 lots (Coeurdassier *et al.* 2001, 2002). La contamination est réalisée le jour précédant la mise en route des expérimentations. Les différentes substances testées sont ajoutées à la farine de blé sous forme d'une fine poudre.

A la fin des traitements, les escargots sont mis à jeun pendant 48 heures afin que le contenu de leur tube digestif soit vide, et d'éviter d'éventuelles interférences entre les contaminants présents dans l'aliment ingéré et les quantités de contaminants réellement accumulées dans les tissus. Les boîtes sont lavées après 24 heures pour éviter la réingestion des fèces. Les animaux sont ensuite sacrifiés, puis congelés

à -20°C et conservés à la même température (Coeurdassier 2001). Les fragments d'organes sont placés individuellement dans des tubes à vis puis séchés à l'étuve (50°C) entre 48 à 72 heures (Coeurdassier 2001).

Après pesée des fragments secs, 4 ml d'acide nitrique à 50% sont ajoutés dans chaque tube. Les tubes sont fermés hermétiquement avec des bouchons à vis puis mis à l'étuve à 60°C jusqu'à digestion complète des tissus sous pression (environ 72 heures). Ensuite, chaque échantillon est complété à 19 ml avec de l'eau distillée puis conservé à 4°C jusqu'à l'analyse (Coeurdassier 2001). Les concentrations en métaux dans les différents échantillons sont mesurées par spectrophotométrie d'absorption atomique (ICP-AES).

L'analyse statistique des données a été effectuée à l'aide du test T de Student qui sert à comparer entre eux deux échantillons (témoin et traité). Ce test a été réalisé à l'aide du logiciel d'analyse des données: Minitab (Version 14.0) (Dagnelie 1999).

RESULTATS

Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm (écart type) de n expériences (où n représente le nombre d'animaux utilisés avec $n=6$), les différences sont considérées significatives quand $P \leq 0,05$.

Le tableau II et les Figures 1 à 4 montrent l'évolution des concentrations de Cd, Cu, Zn et Pb au niveau de

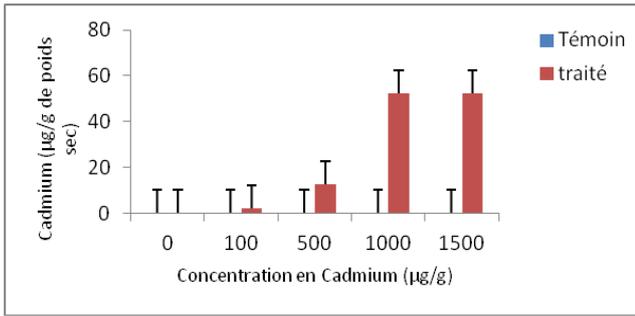


Figure 1-a. Evolution des concentrations en Cd au niveau de l'hépatopancréas chez *H. aspersa*.

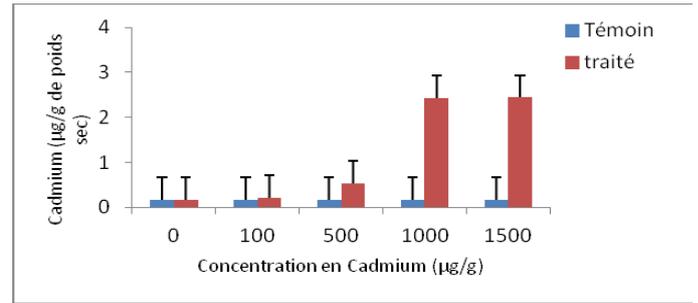


Figure 1-b. Evolution des concentrations en Cd au niveau du rein chez *H. aspersa*.

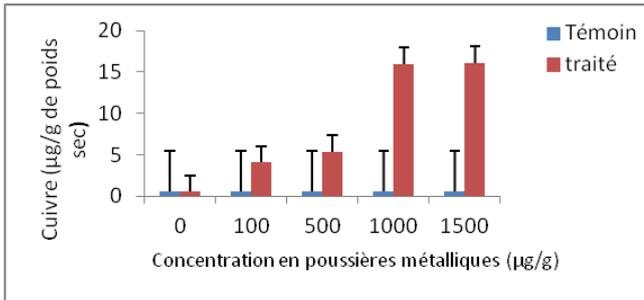


Figure 2-a. Evolution des concentrations en Cu au niveau de l'hépatopancréas chez *H. aspersa*.

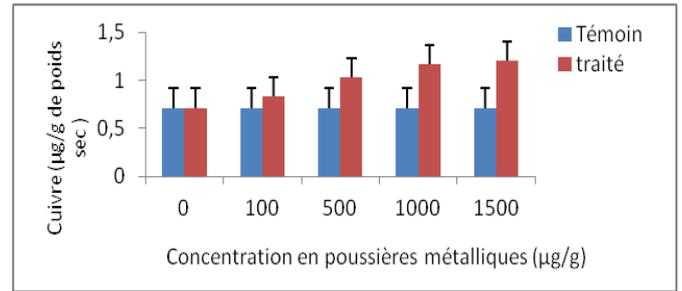


Figure 2-b. Evolution des concentrations en Cu au niveau du rein chez *H. aspersa*.

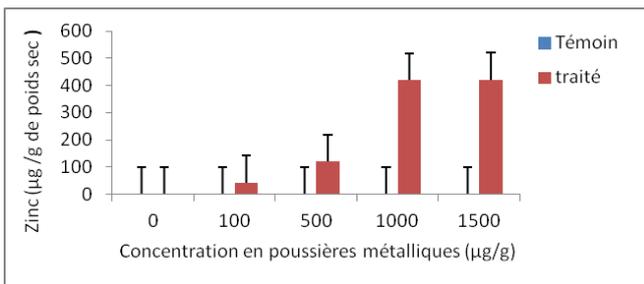


Figure 3-a. Evolution des concentrations en Zn au niveau de l'hépatopancréas chez *H. aspersa*.

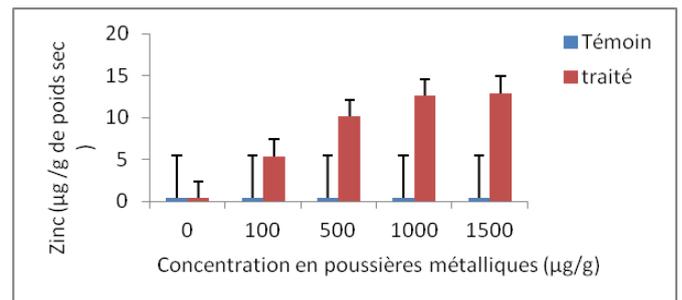


Figure 3-b. Evolution des concentrations en Zn au niveau du rein chez *H. aspersa*.

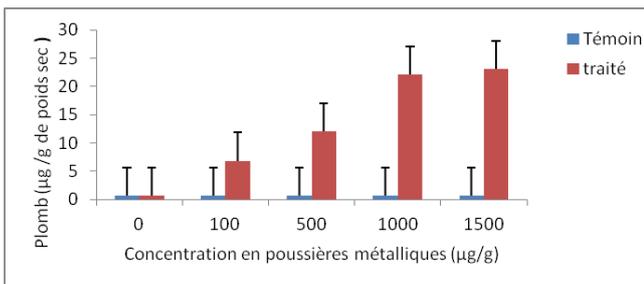


Figure 4-a. Evolution des concentrations en Pb au niveau de l'hépatopancréas chez *H. aspersa*.

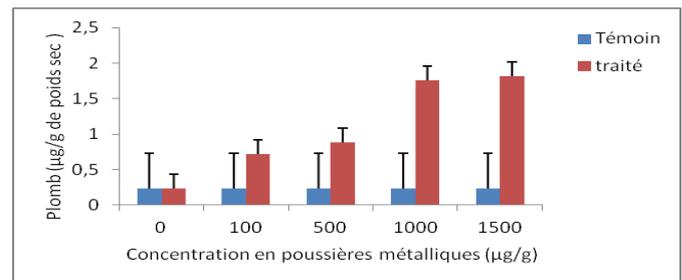


Figure 4-b. Evolution des concentrations en Pb au niveau du rein chez *H. aspersa*.

l'hépatopancréas et du rein chez les escargots au cours d'un traitement de 28 jours. Chez les individus traités, les concentrations des quatre métaux au niveau des deux organes tendent à augmenter de manière dose-dépendante et très hautement significative par rapport aux témoins pour toutes les concentrations testées, avec $P \leq 0,000$.

DISCUSSION

L'accumulation des métaux par les organismes invertébrés est le résultat des processus d'absorption-assimilation, de distribution, de stockage et d'excrétion (Dallinger 1993). Lorsque les métaux sont absorbés, les

gastéropodes terrestres ont une stratégie de non-régulation qui serait conditionnée, d'une part, par le métabolisme du calcium constituant majeur du corps des escargots (Notten *et al.* 2005), et d'autre part, par la nécessité d'éviter les pertes excessives d'eau (Dallinger *et al.* 2001).

L'évaluation de l'accumulation des ETM de *Helix aspersa* repose sur la mesure des concentrations internes après une durée d'exposition donnée, généralement 28 jours. Ce type d'approche à moyen terme a permis d'évaluer les capacités d'accumulation de *H. aspersa*, l'intensité du transfert des ETM depuis l'environnement (nourriture et/ou sol) et d'estimer, dans une première approche, leur biodisponibilité (Gimbert 2006).

Dans notre travail, nous avons montré que la concentration des quatre métaux au niveau des deux organes analysés (hépatopancréas et rein) augmente de manière dose-dépendante en présence des poussières métalliques et du cadmium seul. L'accumulation des métaux Cd, Cu, Zn, Pb par les mollusques gastéropodes est liée à leurs concentrations environnementales et à leur biodisponibilité à l'intérieur de l'organisme (Coourdassier 2001), comme l'indiquent Viard *et al.* (2004) qui ont mis en évidence une grande capacité d'accumulation des ETM, les plus fréquents (Cd, Cu, Pb et Zn) chez les mollusques gastéropodes.

D'un autre côté, selon Dallinger & Wieser (1984), le tube digestif semble également jouer un rôle majeur dans le stockage de Cd. Chabicoovsky *et al.* (2003) suggèrent que la grande affinité de la glande digestive vis-à-vis des métaux lourds est probablement liée à la capacité d'absorption et à la phagocytose possible des particules qui se produit dans la glande digestive. De plus, les cellules environnantes telles celles du rein sont responsables de l'absorption, de la phagocytose, de l'accumulation et de l'excrétion des métaux pendant les processus de digestion. Après absorption, les animaux tels que les gastéropodes terrestres accumulent d'importantes quantités d'éléments métalliques en les séquestrant dans des structures intracellulaires spécifiques dont la synthèse est induite par la présence des métaux. Ces deux grands types de structures de stockage sont les protéines de liaison et les granules lysosomaux (Coourdassier 2001).

Selon Gomot (1998), pour l'ensemble des espèces des gastéropodes qu'il a étudié (*Helix pomatia*, *Arianta arbustorum*, *Arion ater*, *Cepaea hortensis* et *Arion subfuscus*), le principal organe d'accumulation de Cd, Pb et Zn est l'hépatopancréas. En situation contaminée, il contient 70 à 90% de la quantité totale accumulée. D'autres tissus participent au stockage de ces métaux soit de façon temporaire, les métaux étant redirigés ensuite vers l'hépatopancréas, soit de façon définitive pour être excrétés à plus ou moins long terme. Le rein des pulmonés est associé aussi au phénomène d'absorption et d'excrétion des métaux par les urines. Il est probable que ces fonctions soient moins complexes que dans le cas des reins des vertébrés (Coourdassier 2001).

Chez différentes espèces de gastéropodes, le cadmium accumulé dans l'hépatopancréas est majoritairement fixé à des protéines cytosoliques dont les propriétés sont proches des métallothionéines et dont la synthèse est induite par l'exposition des animaux à Cd (Dallinger *et al.* 2000). Une protéine isoforme spécifique de Cd (Cd)-MT a été isolée et séquencée au niveau de l'hépatopancréas de *Helix pomatia* et 2 isoformes présentant des structures très proches ont été séquencées au niveau de l'hépatopancréas de *Arianta arbustorum*. Ces (Cd)-MTs ont toujours de très fortes affinités pour Cd (Coourdassier 2001).

Dans notre travail, la capacité à stocker Cu peut s'expliquer par son rôle essentiel comme constituant de l'hémocyanine, le pigment respiratoire des mollusques terrestres. En fonction des organes dans lesquels il est accumulé, le Cu est associé à différents types de structures de stockage. L'hémocyanine en contient une proportion importante, au moins chez les animaux non exposés. Au niveau de l'hépatopancréas, la majeure partie de Cu est liée à une MT (Métallothionine) et à l'hémocyanine, le reste étant séquestré dans des granules de pyrophosphates comme constaté chez *Helix pomatia*, *Helix aspersa* et *Arion ater* (Coughtrey & Martin 1976).

Au niveau du manteau de *H. pomatia*, Dallinger *et al.* (2000) ont isolé et séquencé une isoforme (Cu)-MT dont la synthèse *in vivo* n'est pas inductible par l'exposition à Cu et à Cd. Contrairement aux autres métaux, Cu est excrété efficacement par les gastéropodes depuis le manteau après redistribution du métal accumulé vers l'intestin et depuis l'hépatopancréas, par excrétion des granules de pyrophosphate (Coourdassier 2001). Certaines espèces apparaissent comme macro- ou micro-concentratrices de Zn (Dallinger 1993). Au niveau de l'hépatopancréas, Zn est principalement associé à des granules de pyrophosphate dans les cellules basophiles (Gimbert 2006). La part restante est fixée à des métallothionéines ou à d'autres protéines cytosoliques de faible poids moléculaire. Bien qu'également stocké dans l'hépatopancréas, Pb stimule l'activité lysosomale de plusieurs espèces de gastéropodes et s'accumule dans des granules de lipofuscine des cellules digestives de l'hépatopancréas (Coourdassier 2001).

CONCLUSION

Cette étude montre l'intérêt de *Helix aspersa* comme espèce modèle de gastéropode pulmoné terrestre pour l'évaluation de la bioaccumulation des métaux (poussières métalliques et du cadmium) dans des tests de laboratoire et pour la surveillance des milieux terrestres récepteurs en utilisant ces organismes dans une démarche de bioindication active. Il apparaît clairement que les concentrations des quatre métaux dans les deux organes (hépatopancréas et rein) des escargots sont dose-dépendante au niveau des types de tissus mais majoritairement au niveau de l'hépatopancréas.

Remerciements

Ce travail a été soutenu par la Direction Générale de la Recherche du Ministère Algérien de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.

Références

- Chabicoovsky M., Niederstätter H., Thaler R., Hödl E., Parson W., Rossmannith W. & Dallinger R. 2003. Localization and quantification of Cd- and Cu-specific metallothionein isoform mRNA in cells and organs of the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. *Toxicol. & Appl. Pharmacol.*, 190, 25-36.
- Coourdassier M. 2001. *Utilisation de mollusques gastéropodes pulmonés terrestres (Helix aspersa) et aquatiques (Lymnaea stagnalis et Lymnaea palustris) comme indicateurs de pollution par les éléments métalliques et les xénobiotiques*. Thèse Univ. Franche Comté, France, 281p.
- Coourdassier M., Gomot-de Vaufleury A., Lovy C. & Badot P.M. 2002. Is the cadmium uptake from soil important in bioaccumulation and toxic effects for snails? *Ecotoxicol. & Environment. Safety*, 53, 425-431.
- Coourdassier M., Saint-Denis M., Gomot-de Vaufleury A., Ribera D. & Badot P.M. 2001. The garden snail (*Helix aspersa*) as bioindicator of organophosphorus exposure: effects of dimethoate on survival, growth and acetylcholinesterases activity. *Environment. Toxicol. & Chem.*, 20, 1951-1957.
- Coughtrey P.J. & Martin M.H. 1976. The distribution of Pb, Zn, Cd, and Cu within the pulmonate mollusc *Helix aspersa* Müller. *Oecologia*, 23, 315-322.
- Dagnelie P. 1999. *Statistiques théoriques et appliquées. Tome 2 : références statistiques à une et à deux dimensions*. De Boeck & Larcier, Bruxelles, 659 p.
- Dallinger R. 1993. Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. In: Dallinger E. & Rainbow R. (eds) - *Ecotoxicology of metals in Invertebrates*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 245-289.
- Dallinger R. & Wieser W. 1984. Patterns of accumulation, distribution and liberation of Zn, Cu, Cd, and Pb in different organs of the land snail *Helix pomatia*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 79, 117-124.
- Dallinger R., Berger B., Gruber C., Hunziker P. & Sturzenbaum S. 2000. Metallothioneins in terrestrial invertebrates: structural aspects, biological significance and implications for their use as biomarkers. *Cell. Molec. Biol.*, 46, 331-346.
- Dallinger R., Berger B., Triebskom R. & Kohler H. 2001. Soil biology and ecotoxicology. In: Baker G.M. (ed) - *The biology to terrestrial molluscs*. CAB International, Oxon, Wallingford, UK, pp. 489-525.
- Gimbert F. 2006. *Cinétique de transfert de polluants métalliques du sol à l'escargot*. Thèse Univ. Franche Comté, France, 192 p.
- Gomot A. 1997. Effets des métaux lourds sur le développement des escargots. Utilisation des escargots comme bio-indicateurs de pollution par les métaux lourds pour la préservation de la santé de l'homme. *Bull. Acad. Natle. Méd.*, 181, 59-75.
- Gomot A. 1998. Biochemical composition of *Helix* snails: influence of genetic and physiological factors. *J. Moll. Stud.*, 64, 173-181.
- Kléche M. 2002. *Etude de la pollution des poussières aciéries du complexe sidérurgique d'El Hadjar sur la germination et le métabolisme respiratoire des végétaux*. Mémoire d'Ingénieur, Université d'Annaba, 35 p.
- Le Bras G.J. 2007. *Ecotoxicologie et méthodes d'investigation « les bio-indicateurs »*. version 2.0, ISA & Université Catholique de Lille, p. 91.
- Notten M.J.M., Oosthoek A.J.P. & Rozema J. 2005. Heavy metal concentration in a soil-plant-snail food chain along a terrestrial soil pollution gradient. *Environ. Poll.*, 138, 178-190.
- Viard B., Maul A. & Pihan J.C. 2004. Standard use conditions of terrestrial gastropods in active bio monitoring of soil contamination. *J. Environ Monitor.*, 6, 103-107.

Manuscrit reçu le 25 mai 2011

Version modifiée acceptée le 5 décembre 2012