

Quels bioindicateurs, pour quels besoins en sites contaminés ?

Cécile GRAND¹, Olivier FAURE², Jennifer HARRIS-HELLAL³, Mickaël HEDDE⁴, Marina LE GUEDARD⁵, Benjamin PAUGET⁶, Guénola PERES⁷, Cécile VILLENAVE^{8,9}, Annette DE VAUFLEURY⁶

¹ ADEME, 20 Avenue du grésillé BP 90406 49 004 Angers Cedex 01

² Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, UMR CNRS 5600 EVS-EMSE-Géosciences et Environnement, 158 cours Fauriel, F-42023 St-Etienne Cedex 2

³ BRGM, Equipe Biogéochimie de l'Environnement, 3 Av Claude Guillemin, 45060 Orléans Cedex 2

⁴ INRA Versailles, UR 251 PESSAC, 78026 Versailles Cedex

⁵ LEB Aquitaine Transfert – ADERA, Laboratoire de Biogenèse Membranaire, UMR 5200 CNRS-Univ. Bordeaux, INRA Bordeaux Aquitaine, 71 avenue Edouard Bourlaux, 33883 Villenave D'Ornon Cedex

⁶ Univ Franche-comté. UMR Chrono-Environnement, Place Leclerc, 25030 Besançon Cedex

⁷ Université de Rennes, UMR CNRS 6553 EcoBio, Station Biologique, 35380 Paimpont

⁸ ELISOL environnement, 2 place Viala, 34060 Montpellier Cedex 2

⁹ IRD, UME Eco&Sol, Supagro, 2 place Viala, 34060 Montpellier Cedex 2

Les sols sont en perpétuelle évolution et l'une des causes de cette évolution est imputée aux activités humaines : aménagements, urbanisation, pratiques culturelles ou forestières, apports diffus de contaminants par des dépôts atmosphériques ou par des activités industrielles. Parmi les menaces qui pèsent sur le sol, la contamination présente une importance majeure avec l'agrandissement des zones urbaines qui colonisent de plus en plus d'anciennes zones d'activités engendrant un impact sanitaire et environnemental qu'il est nécessaire d'évaluer.

Dans l'environnement, la présence de polluants entraîne des perturbations au niveau des êtres vivants (microorganismes, flore et faune) et des compartiments abiotiques fondamentaux des milieux (eau, sol et atmosphère). A l'heure actuelle, on a besoin d'outils capables d'apprécier de manière globale et intégrée l'impact des polluants afin d'améliorer les connaissances sur leurs transferts et leur comportement dans tous les compartiments de l'environnement.

La caractérisation des polluants présents dans le sol à l'aide de mesures physico-chimiques ne permet pas toujours de connaître leur impact sur le milieu vivant, d'où la recherche d'outils permettant de mesurer leur biodisponibilité, transferts et effets sur les écosystèmes terrestres. En effet, les outils biologiques permettent de renseigner sur l'ensemble des polluants (comme les substances issues de la dégradation des polluants organiques) et sur les effets des mélanges de substances qui sont peu pris en compte dans les études réalisées à partir d'analyses physico-chimiques. De plus, l'utilisation d'organismes vivants, *mesurés in situ*, présente l'intérêt d'observer les écosystèmes avec une vision plus écologique intégrant l'ensemble des facteurs environnementaux grâce à des organismes sentinelles (bioindication).

Actuellement, il existe un besoin de développer des outils pour répondre à plusieurs questions dans le souci d'améliorer les connaissances sur l'état biologique du sol et son fonctionnement ainsi que les phénomènes mis en cause :

- Comment mieux orienter le diagnostic physico-chimique des sols contaminés et détecter les substances polluantes (organiques et inorganiques) non suspectées ?
- Comment évaluer le comportement des polluants dans le sol, leur biodisponibilité et leur transfert vers les chaînes trophiques ?
- Comment évaluer un impact global d'un sol contaminé sur les écosystèmes terrestres (outils intégrateurs)?
- Comment évaluer l'état biologique d'un sol délaissé afin de le requalifier pour un usage futur ?

Dans le domaine des sites et sols pollués, les bioindicateurs terrestres ont été développés suivant 2 objectifs :

- I. évaluer le comportement des polluants, leur biodisponibilité et leur transfert vers les premiers maillons de la chaîne trophique (végétal ou animal),
- II. évaluer les effets des polluants vis-à-vis des écosystèmes terrestres et par conséquent évaluer l'état biologique du sol suite à un passé industriel ou suite à une remédiation (traitement physico-chimique ou biologique, phytotechnologie etc.).

La recherche d'outils de type bioindicateurs dans le domaine des sites et sols pollués ouvre de nouvelles perspectives pour une meilleure évaluation des services écosystémiques du sol en tant que matériau capable de stocker et recycler les contaminants organique et inorganique contenus dans les sols et en tant que support d'une biodiversité.

1. Les bioindicateurs terrestres dans le domaine des sols et sites contaminés

La notion de bioindicateur peut regrouper plusieurs concepts en fonction du niveau d'organisation biologique étudié : niveau infra-individuel (moléculaire, biochimique, cellulaire), niveau individuel (tissulaire ou morphologique) ou niveau populationnel.

Lorsque les effets observés concernent une réaction au niveau individuel, on pourra prendre la définition de Garrec et Van Haluwyn (2002) qui définissent un **bioindicateur** comme « un simple relais ne faisant référence qu'à des effets observables au niveau de l'individu se traduisant par des altérations morphologiques, tissulaires ou physiologiques (croissance et reproduction) ».

Ici, on parlera de **bioindicateurs terrestres** pour désigner l'ensemble des outils développés dans le cadre du programme Bioindicateurs II (*cf Figure 1*). Pour répondre aux besoins dans le domaine des sites contaminés, ils peuvent indiquer différents processus :

- Comportement des polluants dans le sol
- Bioaccumulation dans les plantes (absorption racinaire ou foliaire)
- Effets des polluants sur la flore
- Bioaccumulation des polluants dans la macrofaune (escargots, vers de terre ...)
- Bioaccumulation des polluants dans les micromammifères (transfert dans la chaîne trophique)
- Effets des polluants vis-à-vis des communautés de la microflore, la microfaune et la macrofaune du sol

Certains indicateurs sont adaptés pour mettre en évidence des changements à long terme des écosystèmes (les modifications, adaptations de communautés peuvent parfois être très longues à se produire et se stabiliser). D'autres indicateurs biologiques tels que des modifications cellulaires ou métaboliques (ex : Indice Oméga 3) permettent de détecter des effets précoces qui peuvent par la suite se transformer en atteintes irréversibles sur l'individu, la communauté ou l'écosystème et un effet long terme peut être suspecté.

Les indicateurs biologiques, mesurés *in situ*, sont complémentaires des tests écotoxicologiques réalisés au laboratoire pour lesquels les résultats sont parfois difficiles à interpréter car d'une part, les organismes utilisés sont très différents de ceux présents *in situ*, et d'autre part, les conditions d'exposition sont également très éloignées des conditions de terrain.

Dans le domaine des sites pollués, la réglementation est basée sur la compatibilité de l'état du milieu avec son usage constaté (*cf. Politique Nationale de Gestion des Sites et Sols Pollués, MEDD 2007 – Outils méthodologiques de gestion des sites pollués - <http://www.developpement-durable.gouv.fr/Outils-de-gestion>*). L'état du milieu est défini, le plus souvent, à partir d'une caractérisation physico-chimique du sol, ne tenant pas toujours compte du comportement des polluants dans le sol ni des facteurs de variation des transferts de ces polluants dans la chaîne trophique pouvant conduire à un risque pour les écosystèmes et à un mauvais fonctionnement biologique du sol. Les bioindicateurs peuvent être utilisés en apportant des éléments complémentaires aux diagnostics réalisés au cours de la démarche « Interprétation de l'état des milieux » et en participant à l'élaboration du schéma conceptuel (*cf. Politique Nationale de Gestion des Sites et Sols Pollués, MEDD 2007 – Annexe 2 : Comment identifier un site (potentiellement) pollué*..). Cette démarche consiste à caractériser précisément les différentes zones étudiées et se concrétise généralement par l'établissement d'un schéma présentant les interactions entre la ou les sources de polluants et les cibles potentielles. Il s'agit de réaliser un état des lieux des pollutions des milieux (eau, air et sol), des voies d'exposition à ces pollutions et des cibles aux regards des activités et des usages constatés.

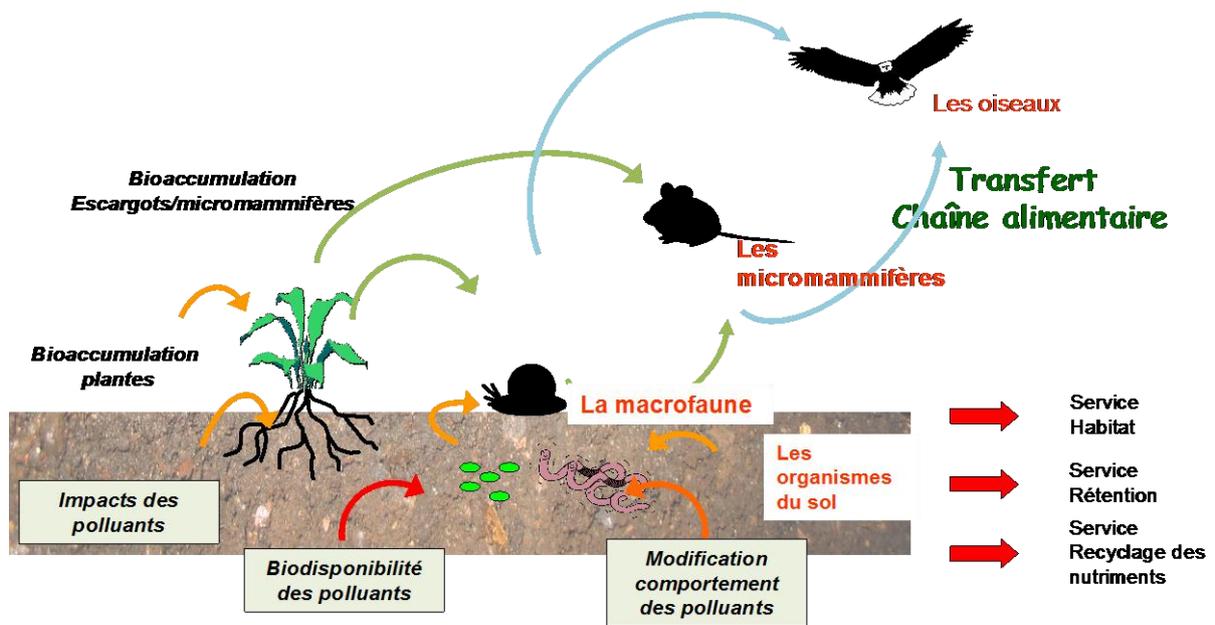


Figure 1 : Schéma conceptuel avec l'utilisation de bioindicateurs terrestres (adapté de Fritsch, 2010)

2. Les bioindicateurs pour évaluer le comportement des polluants, leur biodisponibilité, et leur transfert vers les chaînes trophiques (service rétention et habitat)

2.1. Contexte général

Les sols constituent l'habitat d'une grande diversité d'organismes, eux-mêmes interdépendants, notamment par le biais de relations alimentaires (= trophiques : relation producteur X, mangé par un consommateur Y, lui-même consommé par...) qui les lient (Jeffery et al, 2010). Pour caractériser cette aptitude du sol à héberger les nombreux microorganismes, végétaux et animaux impliqués dans les réseaux trophiques (ensemble de chaînes alimentaires), la connaissance des caractéristiques physico-chimiques des sols (structure, pH, matière organique, teneurs en minéraux...) est importante mais pas toujours suffisante, notamment quand des agents chimiques viennent perturber le système biotope-biocénose.

Par ailleurs, si le sol n'est pas en mesure d'assurer une rétention absolue des contaminants chimiques, une part plus ou moins grande de ces derniers va pouvoir être facilement disponible pour le vivant et contaminer un ou plusieurs maillons des chaînes alimentaires (producteurs primaires comme les végétaux, consommateurs 1^{aires} comme les escargots, consommateurs 2^{aires} comme les vers luisants, les hérissons ou détritvoro-décomposeurs comme les vers de terre, les bactéries). Ce transfert de contaminants peut engendrer des effets toxiques chez ces êtres vivants directement ou indirectement par la perturbation des relations trophiques (le toxique limite ou détruit une ressource alimentaire pour un consommateur de niveau supérieur).

La part biodisponible des contaminants du sol correspond à ce qui peut être absorbé, métabolisé par un récepteur humain ou écologique ou être disponible pour une interaction avec les systèmes biologiques (ISO 17402). Elle est difficile à déterminer car dépend de nombreux paramètres comme la nature des contaminants, des récepteurs écologiques, des voies et durées d'exposition de ces récepteurs. Cependant, le constat simple que les effets biologiques d'un contaminant ou sa bioaccumulation par un organisme ne sont pas systématiquement liés à la concentration totale du contaminant dans le sol (Lanno et al, 2004, Van Gestel, 2008, Pauget et al., 2012), a permis de montrer l'intérêt de la prise en compte de la biodisponibilité dans l'évaluation des risques de la contamination des écosystèmes et a nécessité de développer des méthodes pour l'évaluer. Parce qu'elle renseigne sur l'exposition réelle des organismes aux contaminants, la biodisponibilité est donc un élément incontournable de la caractérisation des sols contaminés.

2.2. Rappel sur les sites pollués du programme BIO 2

Parmi les 13 sites étudiés dans le cadre du programme « Bioindicateurs de l'état biologique des sols », 4 présentent des contaminations en divers éléments (éléments métalliques, ou organiques, tableau 1) les catégorisant en « sites contaminés » (cf fiches sites).

Ces 4 sites peuvent être brièvement décrits comme suit :

- Site Metaleurop : 10 modalités (ou zones d'étude) ont été sélectionnées permettant d'étudier des sols ayant différents niveaux de contamination (gradient de contamination en Cd, Pb et Zn principalement) et usages (Bois, Culture)
- Site SHSE ou crassier métallurgique stéphanois : 3 modalités ont été sélectionnées en fonction d'une contamination pluri-métallique d'âge différent ayant un couvert végétal différent (récent ; couvert végétal faible, intermédiaire : couvert végétal intermédiaire et ancien : fort couvert végétal).
- Site GISFI – Homécourt : ancienne cokerie dont les sols présentent différents niveaux de contamination en polluants organiques, notamment en HAP (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques). Sur ce site, deux zones d'étude ont été définies, l'une faiblement polluée (GHF) et l'autre moyennement polluée (GHM)
- Site Auzon : ancien site industriel de production produits de traitement de la vigne et produits phytosanitaires (acide arsénieux). Le site est contaminé par des scories issues du grillage du minerai et présente une contamination hétérogène sur l'ensemble du site (As, Hg). 6 zones d'études ont été étudiées

Tableau 1 : Contamination en éléments métalliques totaux (ETM_{tot}), HAP totaux (HAP_{tot}) et herbicides totaux (Herbicides_{tot}) des sols des 4 sites contaminés du programme Bio2.

Nom du site	[ETM] _{tot} (mg.kg-1) (min-max)	[HAP] _{tot} (mg.kg-1) (min-max)	[Herbicides] _{tot} (ng.kg-1) (min-max)
Metaleurop	228 – 4 597	0,3 – 1,7	1 864 – 8 180
Auzon	301 – 8 359	0,2 - 10	9 - 887
SHSE	6 375 – 9 493	5 – 31	5 915 – 82 005
GISFI	778 - 990	60 – 572	808 - 17 850

2.3 Evaluation de la biodisponibilité et des transferts des contaminants vers les organismes terrestres: outils de mesure existants et leurs objectifs

Pour évaluer la mobilité et les transferts des contaminants du sol, trois types d'outils peuvent être mis en œuvre :

- les méthodes biologiques basées sur des expositions de récepteur écologique au sol ou aux extraits de sol contaminé afin de mesurer la bioaccumulation et/ou de mettre en évidence des effets toxicologiques.
- les mesures chimiques qui visent à estimer, à l'aide d'extractants chimiques plus ou moins forts (eau, CaCl₂, acétate d'ammonium/EDTA, ...), la fraction mobile des contaminants du sol, supposée disponible pour les organismes ;
- les méthodes mathématiques qui consistent à modéliser le transfert d'un contaminant et ses effets chez un récepteur écologique au regard des caractéristiques du milieu et des contaminants.

Les avantages, les limites et la complémentarité de quelques approches chimiques et biologiques pour des applications en évaluation des risques pour les écosystèmes ont fait l'objet d'une synthèse (de Vaufleury et al., 2011) portant principalement sur des approches biologiques conduites au laboratoire. Seront développés ici des exemples d'utilisation *in situ* de bioindicateurs complémentaires, permettant de caractériser la biodisponibilité des contaminants d'un sol. Ces bioindicateurs sont de deux types : (i) deux bioindicateurs d'accumulation, basés sur l'évaluation des « excès de transfert » des polluants métalliques dans deux maillons d'une chaîne trophique terrestre (végétaux et escargots) et (ii) un biomarqueur d'effet, basé sur la mesure du taux de lipides de type « Oméga 3 » chez des végétaux exposés à des polluants métalliques et/ou organiques. L'utilisation de ces bioindicateurs vise à mieux évaluer la qualité d'un sol, notamment en ce qui concerne ses fonctions d'habitat pour la biodiversité et de rétention des contaminants.

2.3.1 Outils biologiques de caractérisation des sols : indices de phyto- et zoo-disponibilité

Les bioindicateurs présentés permettent de calculer 3 types d'indices différents de biodisponibilité : deux concernent le niveau trophique des producteurs primaires (indice Oméga 3 et bioaccumulation dans les végétaux) et un concerne un consommateur primaire et détritvore (bioaccumulation chez les escargots). Ces bioindicateurs ont été utilisés pour caractériser la biodisponibilité environnementale des polluants métalliques (bioindicateurs d'exposition) et la biodisponibilité toxicologique (biomarqueur d'effet) de l'ensemble des contaminants des sites étudiés dans le programme Bioindicateur 2 (Pérès et al, 2011).

La description détaillée de chacun de ces bioindicateurs fait l'objet de fiches outils. Le principe des 3 indices est brièvement exposé ici :

- **L'indice Oméga 3** : cet indice est un biomarqueur métabolique d'effet et d'exposition non seulement aux métaux mais aussi à différents types de polluants organiques (notamment HAPs et herbicides). Il consiste à déterminer la composition en acides gras des feuilles des végétaux et à évaluer la fraction d'Oméga 3 par rapport aux autres acides gras foliaires. Des travaux antérieurs ont montré que cet Indice Oméga 3 constitue un outil de choix pour indiquer la présence et la phytodisponibilité de contaminants dans les sols (Le Guédard et al, 2008 ; Le Guédard et al. 2012a, Le Guédard et al. 2012b, AFNOR, 2012).
- **Indice Global par métal (IG) et Charge Métallique Totale (CMT) chez les plantes.** Ces indices sont des bioindicateurs de la phytodisponibilité des métaux (Cd, Cr, Pb, Cu, Zn, Ni) ou des métalloïdes (As). Le principe de leur calcul est très simple : il consiste à mesurer les concentrations foliaires en métaux d'échantillons composites de plantes représentatives de la communauté végétale du site étudié. Une comparaison de la distribution des valeurs obtenues pour chaque métal (ou métalloïde) avec les valeurs de références mesurées en sites non contaminés (valeurs de références disponibles dans la base de données « Bioindicateurs ») permet de mettre en évidence d'éventuels « excès » de charge métallique par rapport aux concentrations « normales » attendues sur sites témoins. Les résultats de ces comparaisons peuvent être utilisés pour calculer « l'Indice Global par Métal » ($IG_{\text{métal}}$), qui mesure, pour chaque métal, la déviation relative pondérée de la médiane des concentrations foliaires observées sur le site, à la médiane mesurée en site non contaminé (Tableau 2). Les $IG_{\text{métal}}$ permettent donc de mettre en évidence et de quantifier des anomalies dans les concentrations foliaires d'un ou de plusieurs métaux dans des communautés végétales exposées, fournissant de ce fait une indication sur leur phytodisponibilité individuelle. Un descripteur plus général de la phytodisponibilité des métaux peut également être obtenu par le calcul de la « Charge Métallique Totale » (CMT), qui correspond à la somme des $IG_{\text{métal}}$. Le calcul de la CMT permet donc, par un seul chiffre, de disposer d'une quantification globale de la phytodisponibilité des métaux, ce qui peut notamment être utile pour la caractérisation et la comparaison de sites multi-contaminés.
- **Les Quotients d'Accumulation (QA) et la Somme des Excès de Transfert (SET) chez les escargots** sont des bioindicateurs de la zoodisponibilité des contaminants métalliques. On utilise des escargots de l'espèce *Cantareus aspersus* (syn. *Helix aspersa*) ou escargots Petits Gris, dont la large répartition géographique et les facilités d'élevage, permettent de les utiliser en bioindication active, c'est-à-dire par encagement sur site d'escargots issus de l'élevage au laboratoire. Ces escargots subadultes de passé biologique connu sont exposés *in situ* 28 jours durant lesquels ils se nourrissent des végétaux et du sol présents dans les microcosmes. A la fin de cette exposition, les concentrations en métaux dans les viscères sont déterminées. Le ratio concentration interne mesurée sur Concentration Interne de Référence (CIR_{ref}, établies à partir d'escargots exposés sur sites non contaminés) permet de calculer un quotient d'accumulation pour chaque métal (Tableau 2). La somme des QA-1 pour les divers métaux étudiés permet ensuite de calculer une somme des excès de transfert (SET) par modalité.

Paramètres mesurés	Végétaux	Escargots	Sol
Concentrations en métaux	mg.kg ⁻¹ MS		
Concentrations extractibles au CaCl ₂	-	-	mg.kg ⁻¹
Concentrations de référence d'organismes sur sites non contaminés (NC) (mg.kg ⁻¹)	Médiane et vibrisse supérieure* des distributions des teneurs foliaires en ETMs des communautés végétales sur sites NC.	CIR _{ref} : vibrisse supérieure* des concentrations d'escargots exposés sur sites NC (après élimination des outliers)	
Comparaison concentrations de référence et concentrations des organismes des sites étudiés. Calcul pour chaque métal(loïde)	IG : indice global = Déviation relative pondérée de la médiane observée à la médiane sur site non contaminé. Si IG > 0 alors anomalie de transfert	QA = quotient d'accumulation = rapport médiane des concentrations des escargots exposés sur site étudié / CIR _{ref} Si QA > 1 alors anomalie de transfert	
Indice final (intègre tous les métal(loïdes))	CMT = charge métallique totale = sommes des IG_{Metal} Si CMT > 0 alors excès de transfert d'1 ou plusieurs métal(loïdes)	SET = somme des excès de transfert = somme des QA-1 Si SET > 0 alors excès de transfert d'1 ou plusieurs métal(loïdes)	

Tableau 2 : Présentation des paramètres utilisés pour les bioindicateurs d'accumulation. *vibrisse supérieure : correspond à Q3 + 1,5 IQ où IQ = Q3-Q1 (Q= quartile)

2.3.2 Outils chimiques de caractérisation des sols

Les outils chimiques classiquement utilisés pour évaluer la biodisponibilité des contaminants dans le sol ont pour objectif de déterminer, à l'aide de divers extractants chimiques, la fraction mobile des contaminants du sol, supposée disponible pour les organismes.

La norme ISO 17 402 liste les approches chimiques et biologiques existantes d'évaluation de la disponibilité et de la biodisponibilité et spécifie les principes et les conditions limites des méthodes à utiliser ; elle ne fournit pas pour autant une sélection des meilleures méthodes applicables.

Dans le cadre de ce programme, la réponse des différents types de bioindicateurs étudiés a été confrontée aux concentrations métalliques mesurées dans les sols. Ainsi, deux types de mesures physico-chimiques ont été réalisées : les concentrations totales en métaux (extractions à l'acide fluorhydrique et à l'acide perchlorique) et les concentrations « mobilisables » (extractibles au CaCl_2 0,01M, selon la méthode AFNOR, 1996).

2.4 Pourquoi les bioindicateurs d'accumulation apportent des informations complémentaires aux analyses physico-chimiques ?

Les bioindicateurs végétaux et animaux de bioaccumulation révèlent les concentrations en polluants métalliques des sols de façon globalement similaire. **Un transfert qui a lieu chez les végétaux, a aussi lieu chez les animaux avec cependant des niveaux de concentrations différents, généralement plus élevés chez les escargots sauf pour As et Cr (cf figure 2).**

La figure 2 illustre également le fait que la bioaccumulation des contaminants métalliques dans les escargots et dans les plantes pour deux métaux différents ne peut être expliquée simplement par des analyses de leurs concentrations totales ou extractibles dans le sol :

- le Cd dans les escargots est corrélé avec la concentration totale ou extractible au CaCl_2 du sol (r^2 0.38 et 0.49) mais ce n'est pas le cas pour les plantes.
- le Pb dans les escargots n'est pas corrélé avec la concentration totale ou extractible au CaCl_2 du sol mais c'est le cas dans les plantes (r^2 : 0.27 et 0.49).

Les résultats obtenus sur d'autres métaux (figures non présentées) et sur l'ensemble des modalités étudiées dans le cadre du programme Bioindicateurs montrent que, chez les végétaux la bioaccumulation des métaux n'est expliquée de façon significative par les concentrations totales du sol que pour le Pb et le Cr ; pour les autres éléments mesurés (As, Cd, Cu et Zn), il n'y a pas de corrélation entre les teneurs totales du sol et les concentrations mesurées dans les plantes. De même, lorsque l'on considère les concentrations en métaux du sol extractibles au CaCl_2 (extractant largement utilisé pour simuler le transfert sol-plante lors d'une évaluation de la phytodisponibilité) seules les teneurs en Pb et Zn sont corrélées (r^2 : 0,49 et 0,37 respectivement) aux teneurs foliaires.

Chez les escargots les résultats sont sensiblement différents (figures non présentées): la bioaccumulation présente un lien significatif avec les teneurs totales et extractibles en As et Cd, et avec les concentrations totales en Cr et Zn. Pour les autres métaux (Cu, Pb) aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les concentrations mesurées dans les sols (totales ou extractibles) et celles mesurées dans les animaux.

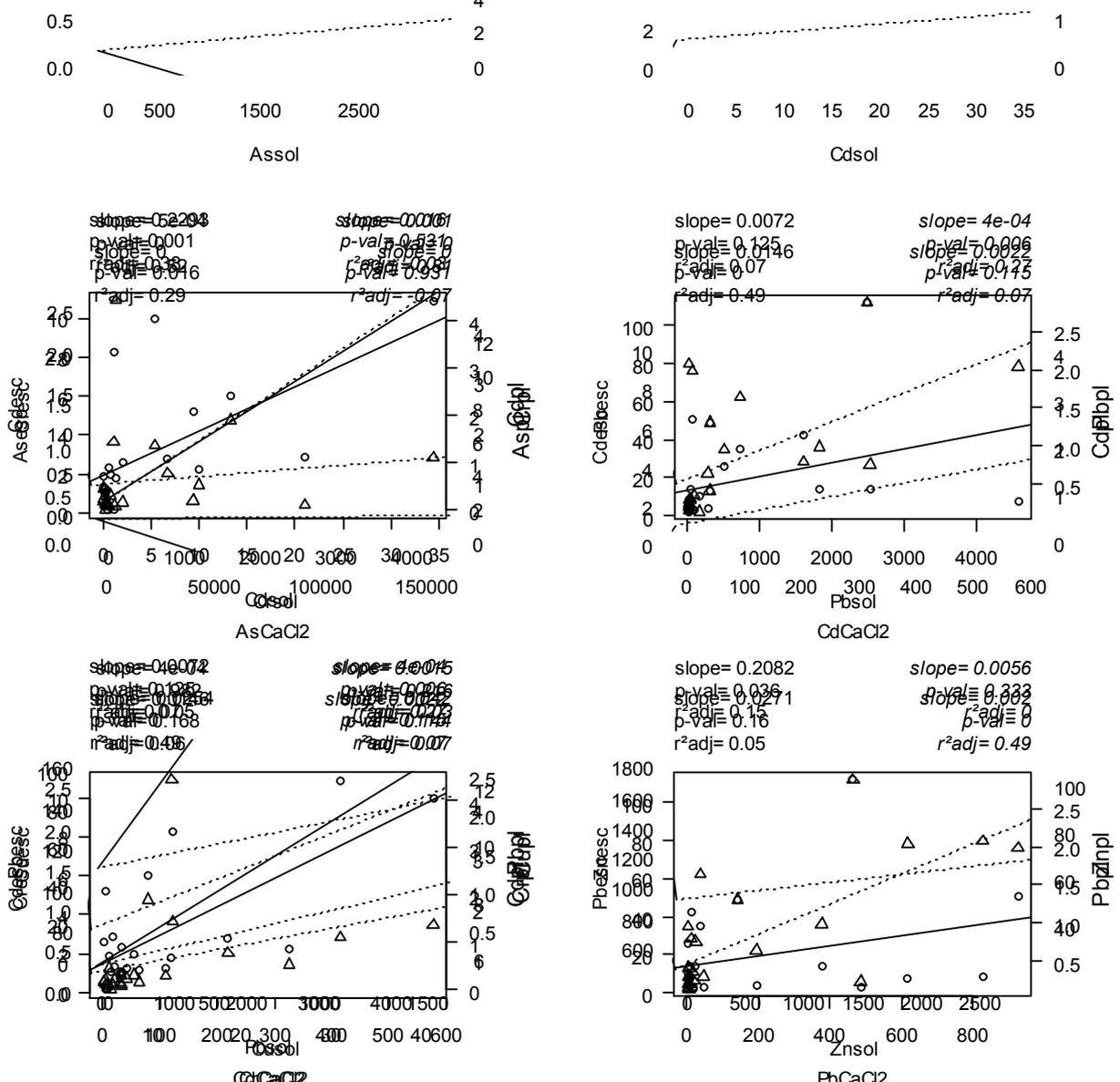


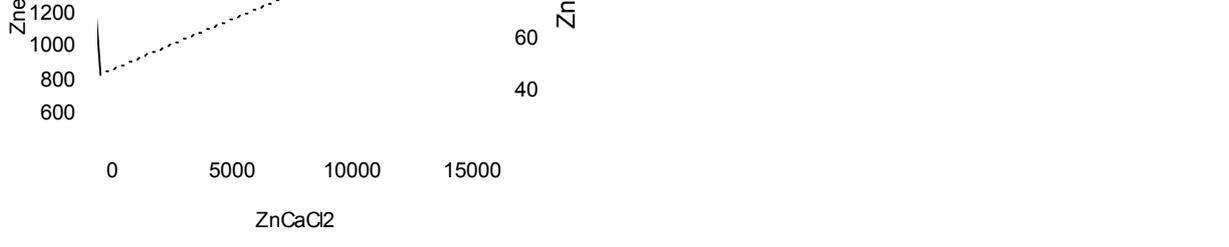
Figure 2 : Réponse des concentrations médianes en mg.kg^{-1} MS en A (gauche) et en B (droite) dans les escargots (○ : AsCdesc, Pbesc ; △ : CplBpl et PplBpl) et dans les plantes (○ : AsCdrpl et CplBpl) en fonction de la concentration totale (Cdsol, Pbsol en mg.kg^{-1} MS en haut) et de la concentration extractible au CaCl_2 (0.01M) (CdCaCl₂, PbCaCl₂ en $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS des sols en bas).

L'ensemble de ces résultats montre donc que les concentrations totales en polluants de sol, telles qu'elles sont classiquement réalisées dans les études à risques, permettent difficilement de prévoir la fraction métallique réellement biodisponible, c'est-à-dire celle susceptible d'être transférée vers les organismes vivants. Dans ces conditions, l'utilisation d'indicateurs biologiques, en renseignant directement sur les concentrations accumulées, représente une approche pertinente pour rendre compte de la biodisponibilité des métaux et mieux comprendre le comportement des polluants dans le sol.

2.5 Complémentarité des bioindicateurs

Le tableau 3 présente la réponse des deux indicateurs d'accumulation (escargots: SET; plantes: CMT) et du Bioindicateur végétal (Indice Oméga 3) sur six des sites étudiés dans le programme Bioindicateurs 2 (cf : fiches sites). Les résultats obtenus sur 4 sites contaminés (Metaleurop, Auzon, SHSE et GISFI), 4 sites forestiers (forêts du réseau RENEFOR) et 4 types de prairies (cf fiche site : Yvetot) sont exposés dans le tableau 3.

Globalement, les résultats confirment que les bioindicateurs d'accumulation, chez les plantes et chez les escargots, donnent des résultats très concordants. L'indice Oméga 3 apporte des réponses complémentaires et originales, notamment sur les contaminations autres que par les métaux.



Site	Modalité	SET	CMT	Oméga 3 (note relative)
Métaleurop	MeTEF	3,009	5,202	0,913
	Me103F	6,149	13,295	0,789
	Me117F	3,35	16,943	1
	Me98FA	11,47	16,47	0,975
Auzon	AuOBTe	0	0,007	0,809
	AuBTe	6,319	0,035	0,982
	AuBCo	0,86	0,35	0,643
	AuOBCo	3,332	39,196	0,807
	AuFCo	3,285	7,086	0,833
	AuBHCo	5,438	7,812	0,761
SHSE	StE-R	2,574	10,706	0,78
	StE-I	3,692	4,944	0,78
	StE-A	0,512	5,187	0,78
RENECOFOR	F57	0	8	
	F76	0	1,326	
	F08	2,915	6,312	
	F63	0,011	0	
GISFI	GHF	0	0	0,82
	GHM	0,021	0,034	1
Yvetot	YvSI	0	0,266	1
	YvSII	0	0,454	1
	YvS-IV	0	0	1
	YvPP	0	0	1

Légende des couleurs :

Indice	blanc	gris clair	gris foncé
Niveau de contamination en métaux	Non contaminée	Contamination faible à modérée	Contamination forte
SET	0-1	1-5	>5
CMT	0-1	1-10	<10
Indice Oméga 3	1-0.93	0.93-0.85	<0.85

Tableau 3 : Valeurs des 3 indicateurs pour chaque modalité ou zone de prélèvement (SET : somme des excès de transfert chez les escargots sur chaque modalité ; CMT : charge métallique totale des plantes ; Indice Oméga 3 : indice lipides végétaux), sur six sites étudiés dans le programme Bioindicateurs 2.

Si l'on considère l'ensemble des mesures chimiques et biologiques réalisées, la complémentarité des approches apparaît clairement et peut être résumée par quelques situations types :

- **1 - Les mesures biologiques convergent avec les mesures physico-chimiques (concentrations du sol et bioindicateurs):** dans le cas du site d'Yvetôt (différentes prairies : *cf fiche site*), les indicateurs d'accumulation sont en accord avec les informations relatives aux teneurs totales et extractibles des métaux dans les sols, qui indiquent une absence de contamination. L'indice oméga 3 confirme ces résultats en ne révélant aucun stress particulier chez les végétaux. Dans ce type de cas, on peut donc facilement conclure que le site n'est pas contaminé et ne pose aucun risque vis-à-vis des organismes vivants. De la même façon, dans le cas des modalités les plus contaminées du site d'Auzon (AuOBCo, AuFCo et AuBHCo), les analyses de sol sont en accord avec les bioindicateurs qui révèlent une biodisponibilité élevée des métaux, de même que l'indice Oméga 3 indique un stress chez les végétaux. Il est également facile de conclure que le site est contaminé et qu'il présente un risque pour l'environnement.

- **2 - Les mesures biologiques sont en désaccord avec les mesures physico-chimiques réalisées sur les sols** : par exemple, le site du GISFI, considéré comme fortement contaminé par des éléments métalliques d'après les analyses de sols, ne montre aucune anomalie de transfert vers les plantes ou vers les escargots. Dans ce type de cas, l'observation des bioindicateurs suggère que la biodisponibilité des contaminants est faible, malgré leurs concentrations élevées dans les sols. Inversement, des sols considérés comme non contaminés (modalités forestières (F57, F76 et F08) ou faiblement contaminés (Métaleurop 103F) d'après les analyses physico-chimiques, peuvent montrer des biodisponibilités anormalement élevées et donc présenter des risques initialement non suspectés. Dans ces deux cas, les bioindicateurs d'accumulation apportent donc une information nouvelle, non prévisible par les analyses chimiques, concernant la biodisponibilité effective des éléments métalliques.
- **3 - Les mesures de bioaccumulation et de l'indice Oméga 3 donnent des indications divergentes sur des sites multi-contaminés** : par exemple sur une des modalités d'Auzon (AuBCo, Bois contaminé en As et autres contaminants industriels) et sur une modalité du site GISFI (GHF, contamination métallique et organique pourtant moins contaminée à la fois par des métaux et par des HAPs que la modalité GHM), l'indice Oméga 3 révèle un stress alors que les 2 indices d'accumulation ne sont pas particulièrement élevés (<1). Sur ces sites, les risques potentiels sont donc probablement plus liés aux contaminants organiques (résidus d'herbicides notamment) qu'aux métaux très peu biodisponibles. Inversement sur la modalité la plus contaminée de Métaleurop (Me98F) les indicateurs d'accumulation répondent fortement tandis que l'indice Oméga 3 est faiblement affecté (>0,93). L'indice Oméga 3 apporte donc des réponses complémentaires et originales, notamment sur les contaminations autres que par les métaux. La confrontation des deux types de bioindicateurs (bioaccumulation et indice Oméga 3) permet de mieux caractériser les conditions d'exposition, ce qui est indispensable pour une évaluation des risques.

2.6 Conclusion

Les indicateurs d'accumulation, chez les plantes et les escargots, révèlent des transferts sur site de polluants métalliques qui ne sont généralement pas expliqués par les concentrations totales ou extractibles des métaux du sol. Par ailleurs ces deux indicateurs donnent des informations comparables, et complémentaires : les plantes sont exposées aux contaminants uniquement par le sol, alors que les escargots intègrent au moins deux sources d'exposition : l'une directe, par ingestion et contact avec le sol, et l'autre indirecte, *via* l'alimentation et notamment les végétaux ingérés. Dans une optique d'analyse du transfert dans les chaînes trophiques, les mesures de phytodisponibilité et de zoodisponibilité doivent donc être réalisées en parallèle, car complémentaires l'une de l'autre.

Par ailleurs, l'utilisation d'un bioindicateur (ou biomarqueur) tel que l'indice Oméga 3 permet de compléter les deux autres indices qui renseignent sur la bioaccumulation des métaux sans révéler d'effets toxiques au niveau individuel (du moins sur les sites étudiés et vis à vis des critères d'effets classiques comme survie et croissance et pour une durée d'exposition pour les escargots). L'indice Oméga 3 présente l'intérêt de détecter un impact global sur la plante, lié aux contaminations métalliques ou organiques du sol ou à l'influence des cocktails de contaminants.

Une synthèse des réponses mesurées sur les sites étudiés pour les bioindicateurs d'accumulation (plantes : CMT ; escargots : SET) et l'indice Oméga 3, est présentée dans la figure 3 qui souligne la complémentarité des outils biologiques et précise le type de contaminant probablement à l'origine des réponses différenciées des bioindicateurs :

- **Sur le crassier métallurgique stéphanois** : l'indice Oméga 3 révèle une toxicité du sol pour les végétaux alors que les 2 indices d'accumulation ne sont pas particulièrement élevés ;
- **Sur le site de Métaleurop** : les 3 indices (accumulation végétale et animale, indice Oméga 3) ne reflètent pas toujours les teneurs totales dans les sols et le gradient de contamination des modalités de ce site. Le Cd s'accumule de façon plus importante dans les escargots là où le transfert dans les plantes semble se stabiliser ;
- **Sur le site du GISFI** : l'indice Oméga 3 révèle un stress chimique alors que les 2 indices d'accumulation sont très faibles ;
- **Sur le site d'Auzon** : la biodisponibilité des métaux vis à vis des plantes et des escargots n'est pas toujours similaire : l'As par exemple est fortement zoodisponible sur la modalité AuBTe (bois témoin) tandis que pour les plantes, c'est le Cd qui apparaît fortement phytodisponible sur une autre modalité (AuOBCo Bois contaminé). Sur la modalité AuBCo, l'indice Oméga 3 révèle un fort effet sur les végétaux alors que rien ne le laissait présager (présence de contaminant(s) non analysé ?) ;
- **Sur les sites forestiers** : une bioaccumulation non attendue a été mise en évidence et n'était pas suspectée au regard des concentrations totales dans le sol. Elle serait liée à la biodisponibilité élevée du Pb ;

- **Sur le site d'Yvetot** : les 3 indicateurs biologiques ont été mesurés dans les prairies et l'ensemble des réponses est cohérent : les indicateurs biologiques sont en accord avec les indications relatives aux teneurs en métaux dans les sols. L'indice Oméga 3 ne révèle pas non plus d'autres contaminants ou stress.

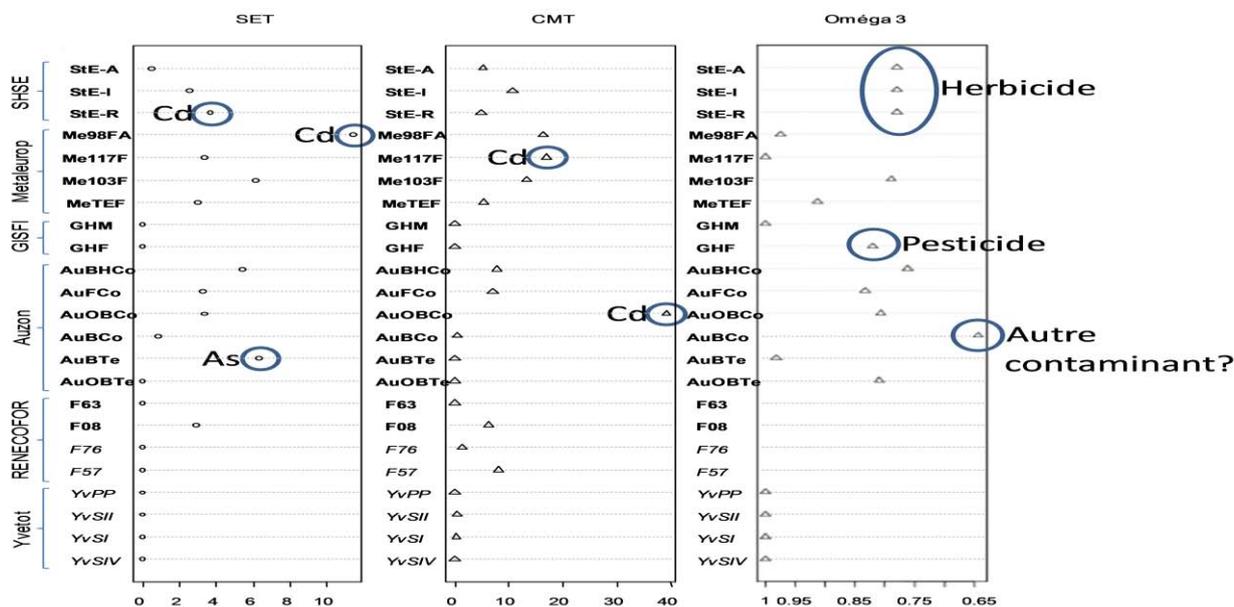


Figure 3: Synthèse des réponses des bioindicateurs d'accumulation (SET : somme des excès de transfert chez les escargots ; CMT: charge métallique totale chez les végétaux) et de l'indice Oméga 3. Pour chaque site, les modalités sont classées par ordre décroissant de contamination. Les points entourés d'un cercle précisent pour quelques modalités l'élément principal (métal(loïde) ou herbicide/pesticide) responsable des variations des indices.

Ainsi, l'utilisation de batterie de bioindicateurs *in situ* (c'est à dire combinant plusieurs organismes issus de niveaux trophiques différents et présentant des critères d'effets différents) apparaît adaptée pour évaluer l'état biologique du sol et son fonctionnement.

3. Les bioindicateurs pour évaluer le potentiel biologique d'un sol (services habitat, recyclage des nutriments)

3.1 Contexte général

Les facteurs environnementaux qui influencent les transferts des contaminants modifient également leurs effets sur les communautés et les populations d'organismes vivants dans le sol et par conséquent sur les services écosystémiques rendus par ces organismes (Blanchart, 2012). L'altération de la biodiversité des sols, qu'elle soit taxonomique (service habitat) mais surtout fonctionnelle, peut dès lors aboutir à un dysfonctionnement des sols, en termes de capacité de rétention (liée à la structure du sol et son état organique), du recyclage des nutriments, d'atténuation naturelle (fortement liée aux activités microbiennes, stimulées ou non par la faune du sol). Il est donc primordial, aujourd'hui de pouvoir disposer d'outils de mesure de l'état biologique du sol afin de rendre compte de ces différents services liés à l'habitat et/ou aux services de régulation rendus par le sol.

Le sol est le réservoir d'une multitude d'organismes vivants qui jouent un rôle fondamental dans son fonctionnement biologique. Parmi ces organismes du sol on distingue :

- **Les ingénieurs physiques de l'écosystème** (vers de terre, termites, fourmis...) qui agissent sur la structure du sol ;
- **Les régulateurs de l'écosystème** (ex : nématodes, collemboles, acariens, vers de terre...) qui impactent sur la dynamique des populations de microorganismes ;
- **Les ingénieurs chimistes de l'écosystème** (bactéries, champignons...) qui en association avec la faune du sol tel que les collemboles et vers de terre assurent la dynamique des éléments de dégradation de la matière organique mais aussi les cycles de transformations géochimiques.

Le fonctionnement du sol est également lié à plusieurs facteurs comme les caractéristiques physico-chimiques du sol, sa structure, son couvert végétal et les structures paysagères.

La mesure du fonctionnement biologique du sol à l'aide de bioindicateurs appartenant à ces différents groupes fonctionnels dans les sols non pollués permet d'établir une situation de référence dans divers contextes paysagers (forestiers, agricoles...). C'est ce qui a été entrepris avec les bioindicateurs (nématofaune, vers de terre et bioindicateurs microbiens). Cette référence (**cf chapitre 4**) permet ensuite de qualifier ou requalifier un sol après traitement (ou réhabilitation).

Dans le domaine des sites pollués, la démarche d'Interprétation des Milieux (IEM) permet de différencier les milieux qui présentent un état compatible avec leur usage des autres milieux qui sont susceptibles de poser un problème (*cf. Politique Nationale de Gestion des Sites et Sols Pollués, MEDD 2007 – Outils méthodologiques de gestion des sites pollués - <http://www.developpement-durable.gouv.fr/Outils-de-gestion/>*). Dans le cas où l'état des milieux est incompatible avec leurs usages, il est nécessaire d'élaborer un plan de gestion. Il s'agit alors de mettre en place des aménagements, une dépollution du site ou bien une modification des usages. Il est cependant nécessaire, quand la suppression totale des sources de pollution n'est pas possible (ex : zone à grande échelle), de s'assurer de la qualité des milieux en fonction des usages modifiés et restreints. La mesure du fonctionnement biologique du sol peut être une information complémentaire pour mieux définir les modalités de restriction ou les conditions d'un usage futur.

De même dans le cadre de la reconversion de friches industrielles, des éléments sur la qualité biologique du sol peuvent être pris en considération pour orienter le réaménagement.

3.2 Evaluation du potentiel biologique du sol à l'aide des communautés de Nématofaune

Comme l'illustre la figure 4 ci-dessous, l'analyse de l'abondance des nématodes du sol montre que plus la contamination est importante, moins les nématodes sont abondants. Plus particulièrement, les nématodes omnivores et carnivores, qui sont des organismes connus pour leur sensibilité aux polluants, sont présents à des densités très faibles dans les situations contaminées par rapport aux situations témoins (*cf fiches sites : site de Metaleurop et site du GISFI*) et à des densités très faibles dans les 3 situations des sites métallurgiques de Saint-Etienne (*cf fiche site : crassier métallurgique stéphanois*).

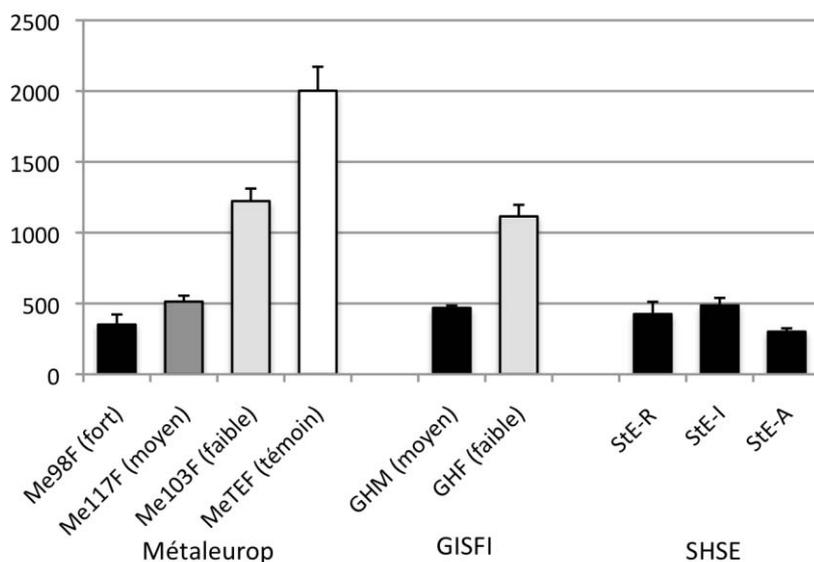


Figure 4: Abondance des nématodes du sol (individus pour 100 g⁻¹ de sol sec) dans des sols contaminés et leur situation témoin sur les sites de Métaeurop, du GISFI et de SHSE

Sur la base de la composition et de l'abondance de la nématofaune du sol, deux indices sont calculés qui servent pour le diagnostic du fonctionnement biologique du sol appelé aussi réseau trophique du sol :

- SI : Indice de Structure qui reflète la stabilité du milieu, plus il est élevé moins le milieu est perturbé. Il est fonction de l'abondance relative de plusieurs familles appartenant aux groupes trophiques suivants : les bactérivores et les fongivores (qui caractérisent le compartiment microbien), les omnivores et les prédateurs (qui représente les plus hauts niveaux de la micro-chaîne trophique du sol) ;
- EI : Indice d'Enrichissement qui donne une indication sur la dynamique des nutriments. Il est fonction de l'abondance de la guildes de la composante d'enrichissement : certains nématodes appartenant aux bactérivores et aux fongivores. Cet indice est particulièrement utile dans les agro-systèmes. L'indice d'enrichissement (EI) augmente avec la disponibilité en nutriments.

L'Indice de Structure (SI) permet de distinguer sur les zones autour de l'ancienne usine de Metaleurop le bois témoin des bois contaminés (figure 5 ci-dessous : les bois témoins sont représentés par la valeur la plus à droite sur les figures). En effet, le SI est plus élevé pour le bois témoin que les bois contaminés. Cet indice, calculé en tenant compte de l'abondance relative des différentes guildes fonctionnelles de nématodes, indique que la communauté de nématodes du bois témoin est plus complexe et contient des taxons fragiles qui sont absents des bois contaminés.

De même, l'Indice de Structure (SI) dans le bois le plus contaminé en contaminants organiques du site du GISFI est significativement plus faible que celui du bois moins contaminé.

Dans les sols issus des crassiers métallurgiques stéphanois (SHSE), l'Indice de Structure (SI) est toujours très faible (de 20 à 40) ; il n'est pas différent entre les 3 situations.

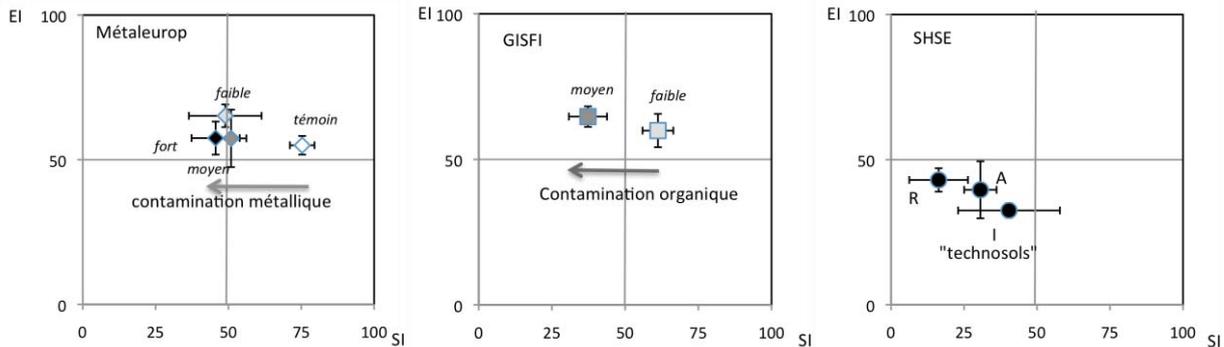


Figure 5 : Diagnostic du réseau trophique du sol : Représentation de l'Indice d'Enrichissement (EI) versus l'Indice de Structure (SI) dans trois sites contaminés. La flèche vers la gauche indique une contamination croissante des modalités du site étudié.

Dans ces trois sites où des bois sont comparés, il est à noter que l'Indice d'Enrichissement (EI) ne varie pas en fonction de la contamination. En effet, cet indice répond aux variations de disponibilité en nutriments ; il est significativement influencé par des pratiques de fertilisation ou de travail du sol.

Ainsi, l'analyse des communautés de nématodes peut renseigner sur l'influence d'une contamination sur le potentiel biologique du sol (*cf fiche outil : la Nématofaune*). Une réduction de l'abondance des nématodes du sol ainsi qu'une réduction de l'indice de structure sont mesurables dans les écosystèmes naturels soumis à une contamination importante métallique ou organique. Dans un objectif de réaménagement, des actions pourraient être menées conduisant à augmenter l'Indice de Structure (SI) jusqu'à une valeur 'seuil' sans modification de l'Indice d'Enrichissement.

3.3 Evaluation du potentiel biologique du sol à l'aide des communautés de vers de terre

Les résultats présentés ici correspondent à l'étude menée sur les zones autour de l'ancien site industriel de Metaleurop (*cf Fiche site Metaleurop*) permettant de croiser différents niveaux de pollutions métalliques (Pb, Zn, Cd) et deux usages de sols (F : friches-bois et C : culture).

Sur les zones autour de l'ancien site industriel de Metaleurop, des différences significatives sont observées entre les différentes modalités (*figures 6*) tant au niveau de l'abondance que de la biomasse des vers de terre. De même une forte interaction entre contamination et usage des sols est observée. Ainsi, les abondances lombriciennes sont significativement moins importantes sur les sols contaminés des modalités Bois-Friches (F) comparé aux abondances sur les modalités témoin (boisée ou cultivée) sans pour autant être corrélées au gradient de contamination. De même sur les modalités cultivées (MeTEC témoin, Me103C faiblement contaminée, Me117C moyennement contaminée), les abondances et biomasses ne sont pas du tout corrélées au gradient de contamination. Il apparaît que pour un même niveau de contamination, les abondances et biomasses lombriciennes sont donc aussi fortement impactées par le mode de gestion ; ainsi les pratiques culturales appliquées sur des sols faiblement contaminés permettent d'obtenir une abondance et une biomasse de vers de terre comparable ou supérieure aux parcelles témoin.

- **Biomasse moléculaire (figure 7)**

La mesure de biomasse moléculaire correspond au rendement d'extraction du sol de l'ADN total. La technique repose sur la quantification d'ADN sale (avant purification) car il s'agit de la quantité d'ADN la plus représentative de la quantité d'ADN totale contenue dans le sol (ADN microbien + ADN fongique).

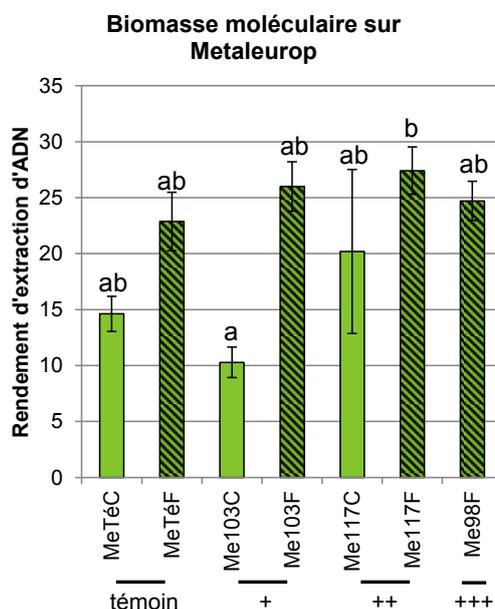


Figure 7. Biomasse moléculaire évaluée par mesure du rendement d'extraction de l'ADN total du sol. Les lettres différentes renseignent des modalités significativement différentes entre elles

Les analyses effectuées de la biomasse moléculaire sur les zones autour de l'ancien site industriel de Metaleurop (**cf figure 7**) montrent que cet indicateur rend compte de l'occupation des sols. Les résultats sont très liés aux caractéristiques physico-chimiques du sol et masquent un effet éventuel lié à la contamination en éléments métalliques.

- **Biologs (Figure 8)**

La diversité fonctionnelle mesurée par la méthode des Biologs consiste en la mesure de la capacité des communautés microbiennes présentes à dégrader un ensemble de 96 substrats carbonés. On mesure ainsi soit le nombre de substrats dégradés (= richesse fonctionnelle), soit l'intensité moyenne de la dégradation des substrats (AWCD) (**cf figure 8**).

L'analyse comparative des modalités indique un comportement métabolique (Richesse spécifique et AWCD) élevé pour les modalités 103F (faiblement contaminé – Forêt/Bois) et TEF (Témoin Forêt) comparativement à 117C (Culture moyennement contaminée). Ces différences d'activité sont également identifiées selon le mode d'occupation (Bois/Forêt > culture), Ainsi une zone contaminée telle que la zone boisée (98FA), l'activité microbienne peut être plus proche du témoin que d'une zone faiblement contaminée. Pour la mesure de l'activité microbienne, l'usage du sol est le paramètre qui influence le plus la réponse du bioindicateur.

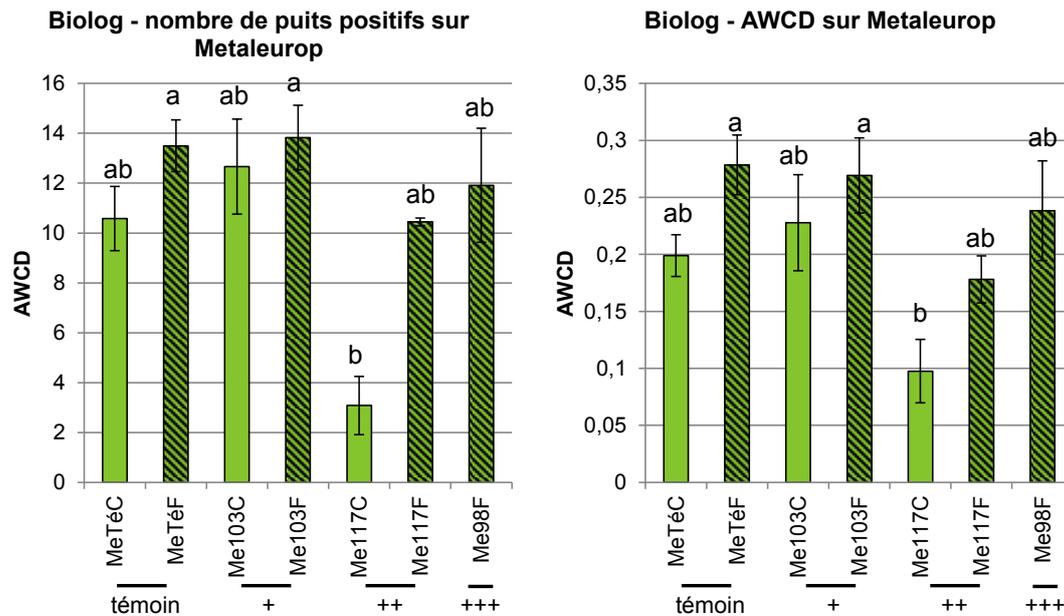


Figure 8. Richesse fonctionnelle et activité métabolique (AWCD) dans des sols contaminés et leur situation témoin sur les sites de Métaeurop. Les lettres différentes renseignent des modalités significativement différentes entre elles

- **Arylsulfatase (Figure 9)**

Les résultats de l'activité de l'Arylsulfatase (**cf figure 9**) montrent que l'activité de cette enzyme est très significativement différente entre les modalités en lien comme pour les autres indicateurs avec l'occupation du sol (F : forêts – C : culture) mais également avec le niveau de contamination des différentes modalités. En effet, l'activité Arylsulfatase des parcelles témoins est significativement supérieure à celle des parcelles les plus contaminées. Seule l'activité retrouvée sur la parcelle faiblement contaminée en forêt (modalité 103F) est proche de celle du site témoin Forêt.

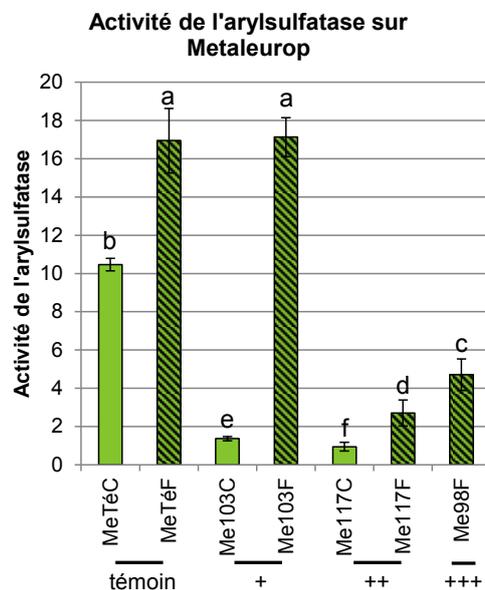


Figure 9 : Activité de l'Arylsulfatase sur le site de Métaeurop dans des sols contaminés et leur situation témoin sur les sites de Métaeurop. Les lettres différentes renseignent des modalités significativement différentes entre elles

Si l'on considère une par une les réponses de ces trois indicateurs qui renseignent sur, la diversité structurelle et fonctionnelle des communautés bactériennes et fongiques, il est difficile d'interpréter les résultats.

Les mesures de diversité structurelle (Biomasse totale) ou fonctionnelle (Biologs et Arylsulfatase) sont très liées à l'usage du sol et au contexte géomorphologique du sol (texture, structure, pH, teneur en matière organique..). Lorsque ces mesures sont étudiées de façon isolée, elles ne peuvent pas renseigner sur le fonctionnement biologique du sol car elles sont dépendantes d'une grande quantité de facteurs environnementaux.

Cependant lorsqu'elles sont utilisées dans un calcul de services écosystémiques, elles peuvent renseigner sur certaines fonctions du sol (Habitat, capacité tampon, recyclage des nutriments...) (Hedde 2012).

3.5 Evaluation du potentiel biologique du sol à l'aide du calcul des services écosystémiques potentiels (SEp)

On reconnaît que le sol a une multitude de fonctions environnementales se traduisant en services écosystémiques comme l'habitat (pour accueillir une biodiversité), la purification de l'eau, le traitement des déchets, la provision de ressources génétiques... La quantification des services doit permettre d'évaluer le fonctionnement biologique de tout type de sol (agricole, forestier, friches industrielles, prairies etc ..) afin de pouvoir rendre compte du potentiel d'un sol délaissé (sans usage) et aider à la gestion de son usage futur : gestion des sites à grande échelle, reconquête des sols en friche, valorisation des sols après traitement ou réhabilitation

Pour assurer ces services, la biodiversité du sol (microbienne, végétale et animale) joue un rôle fondamental dans le maintien de deux grandes fonctions.

- fonction habitat : capacité du sol/des matériaux du sol à servir d'habitat aux micro-organismes, aux végétaux, aux animaux vivant dans le sol et leurs interactions (biocénose)
- fonction rétention : la capacité du sol à stocker, dégrader ou à recycler la matière organique et inorganique

Ainsi, le fonctionnement biologique des sols est à la base de la fourniture de tous ces biens et services écosystémiques. L'Homme étant dépendant de ces biens et services, il est évident et nécessaire de gérer efficacement et durablement les sols, notamment en protégeant la biodiversité des sols, voire en l'utilisant pour accélérer la dégradation des polluants ou la reconquête de milieux dégradés.

Pour mettre en place et assurer la mesure des fonctions du sol, il est nécessaire de définir des indicateurs biologiques qui intègrent l'ensemble des stress environnementaux (pollutions, tassement, retombées atmosphériques, modifications biologiques ...) et renseignent sur l'état global du sol. Ils permettent par exemple d'identifier et de quantifier les perturbations, les transformations du sol et les impacts sur les écosystèmes terrestres et à terme, les services rendus.

A partir d'un travail bibliographique réalisé au sein du programme Bioindicateurs 2 (Hedde, 2012), deux services écosystémiques « **Biodiversité ou Habitat** » et « **Recyclage des nutriments** » ont pu être potentialisés à l'aide d'une sélection des fonctions associées (cf **Tableau 4**). Les services ont été calculés à partir des données acquises suite à l'application des bioindicateurs sur l'ensemble des sites du programme BIO2 (base de données),

Services écosystémiques	Fonctions requises	Indicateurs
Biodiversité	B1. Capacité d'accueil du sol	Biomasse microbienne Biomasse fongique Biomasse bactérienne Densité totale de nématodes Densité totale de microarthropodes Densité totale de macroinvertébrés Densité totale de lombriciens
	B2. Hébergement d'une forte diversité taxonomique	Nombre de familles de nématodes Nombre d'espèces de collemboles Nombre d'ordres de macroinvertébrés Nombre d'espèces de lombriciens
	B3. Hébergement d'une forte diversité fonctionnelle	Diversité catabolique microbienne (AWCD de Biolog) Respiration spécifique du carbone Minéralisation de l'azote Indice de structure des communautés de nématodes Nombre de groupes fonctionnels de collemboles Nombre de groupes fonctionnels de lombriciens
Recyclage des nutriments	R1. Capacité à décomposer les MOS	Respiration spécifique du carbone N minéralisable Activité glucosidase Activité arylamidase Activité phosphatase alcaline Activité glucosidase Densité de nématodes libres Biomasse de lombriciens endogés
	R2. Capacité à dégrader les MOS (fractionnement + enfouissement)	Densité totale de collemboles Densité totale de macrosaprophages (cloportes, diplopodes, lombriciens épigés, gastéropodes) Densité totale de lombriciens anéciques

Tableau 4 : Description des services écosystémiques, des fonctions du sol associées ainsi que la liste des bioindicateurs utilisés.

La Médiane des valeurs des **Services Habitat et Recyclage des Nutriments** a été calculée à partir des données acquises sur l'ensemble des **sites non contaminés** (sites agricoles, sites forestiers, sites de l'ANDRA et les témoins des sites pollués). On a ensuite ramené cette Médiane des valeurs obtenues sur sites non contaminés à une valeur de (0) pour faciliter les comparaisons avec les autres sites.

- Lorsque la valeur du SEp est supérieure à 0, cela signifie que la modalité présente un potentiel de service supérieur au service médian sur sites non pollués ;
- Lorsque la valeur du SEp est inférieure à 0, cela signifie que la modalité présente un potentiel de service inférieur au service médian sur sites non pollués.

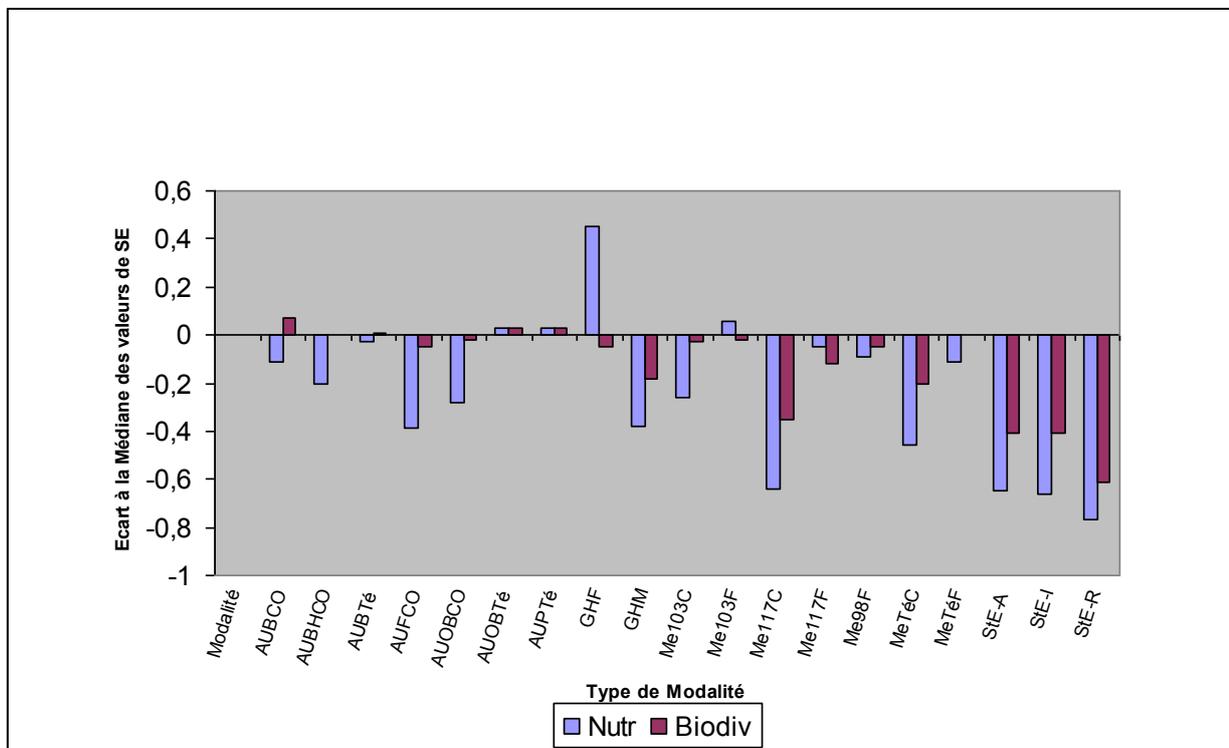


Figure 10 : Ecart à la médiane (0) des valeurs des Services Ecosystémiques Biodiversité et Recyclage des nutriments sur les sites contaminés

La plupart des sites contaminés présentent des potentiels de services écosystémiques inférieurs à ceux des sites non contaminés. Néanmoins certains sites sont très proches de la valeur obtenue sur les sites non contaminés pour le SEP « Habitat » (ex : site d'Auzon AU). *A contrario*, les modalités de l'ancien site métallurgique de Saint-Etienne (SHSE) présentent les valeurs les plus faibles pour les 2 services présentés.

Sur la parcelle du GISFI faiblement contaminé (GHF), le SEP « Recyclage des nutriments » présente une valeur très élevée avec un service « Habitat » proche de 0, ce qui signifie que les services rendus par cette modalité sont proches des services rendus par un site non contaminé.

Sur les zones autour de l'ancien site industriel de Métaleurop, les services rendus par le sol sont très proches de la médiane des sites non contaminés (excepté les parcelles agricoles Me103C et Me117C) ce qui signifie que les modalités boisées peuvent être proches de celle d'un site non contaminé en ce qui concerne les services « Habitat » et « Recyclage des nutriments »

Les services écosystémiques pourraient constituer un outil quantitatif d'aide au reclassement des sols en fixant des valeurs seuils pour un usage donné.

4. Les référentiels d'interprétation

Dans le domaine des sites et sols pollués, le référentiel est en général une zone témoin ne présentant pas de source de pollution et ayant les mêmes caractéristiques du sol que les zones contaminées.

Mais le programme BIO2 a permis de proposer différents types de référentiel qui peuvent se construire :

- à partir d'une valeur de référence définie à l'issue d'une analyse statistique robuste (ex : C1Ref-escargots, IG-plantes, (cf chapitre 4.1 : valeurs de référence)
- à partir d'un logigramme ou d'une grille de lecture construite à partir d'une base de données (cf chapitre 4.2 : logigramme nématofaune)
- à partir d'une comparaison avec les données acquises sur une zone témoin (cf chapitre 3.3 : mesure Arylsulfatase)

4.1 Référentiel : valeurs de référence

Le programme Bioindicateurs 2 a permis d'acquérir une importante base de données sur 13 sites ateliers. L'analyse statistique des données de bioaccumulation (43 modalités ou zones de prélèvement) permet de définir une valeur de référence (**CIRef pour les escargots et NC pour les plantes**) basée sur l'analyse de la vibrisse pour chaque teneur en métal dans le sol (*cf figure 11*).

Pour les indicateurs de bioaccumulation des valeurs de référence ont été déterminées dans les organismes prélevés (plantes) ou exposés (escargots) *in situ* sur les sites dont les sols étaient classés comme non contaminés (Tableau 5). Ces concentrations sont variables selon l'indicateur considéré en lien avec des besoins métaboliques différents ; elles sont généralement plus élevées chez l'escargot. Pour les métaux essentiels, Cu et Zn, les concentrations de référence sont plus élevées pour les 2 types d'organismes.

Nom des valeurs de référence	As	Cd	Cr	Pb	Ni	Cu	Zn
	mg.kg⁻¹						
Médiane NC plantes	0,53	0,16	0,6	0,25	1,7	9,1	48,9
CIRef escargots	0,307	2,27	2,01	12,92	5.1	184	1490

Tableau 5 : Concentrations de référence en éléments traces métalliques des plantes et escargots de sites non contaminés.

- **CIRef** : concentration interne de référence pour chacun des métaux après 28 jours d'exposition des escargots sur sites non contaminés. Les valeurs définies intègrent tous les paramètres physico-chimiques et biologiques qui peuvent influencer la biodisponibilité et le transfert et permet de proposer un référentiel à l'échelle nationale des transferts des métaux dans les escargots (*cf figure 11*). Au-delà de ces valeurs de référence, les teneurs en métaux dans les escargots sont considérées liées à un processus de bioaccumulation.
- **Médiane NC** : concentrations de référence dans des échantillons de plantes issus de sites non contaminés (NC) et poolés (de 5 à 10 espèces).

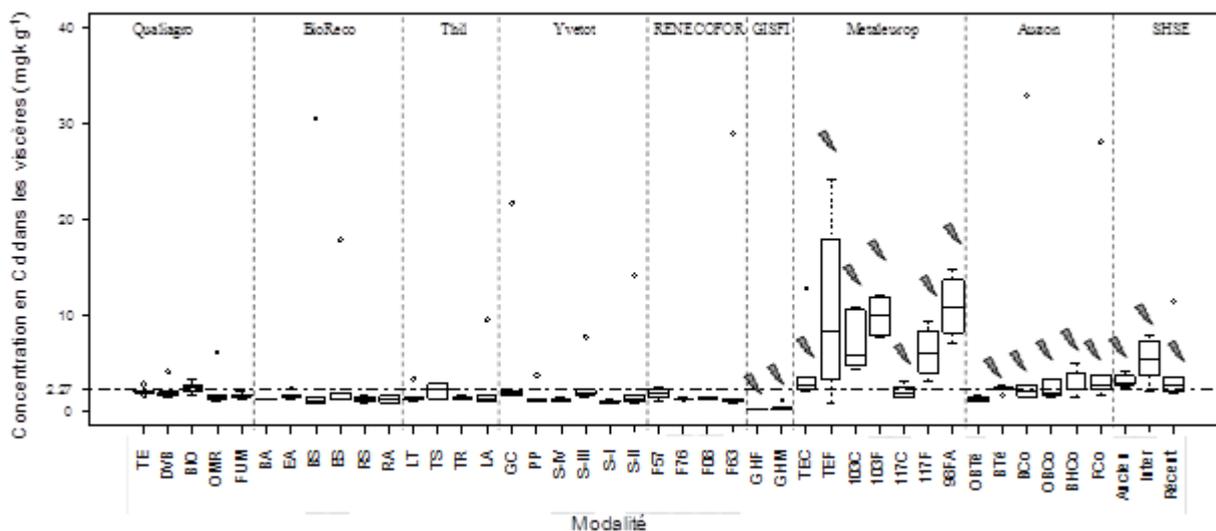


Figure 11 : Médianes des concentrations en Cd dans les viscères des escargots après 28 jours d'exposition *in situ* en microcosme. La ligne pointillée représente la CIRef du Cd ($2,27 \text{ mg}_{\text{Cd}} \text{ kgMS}_{\text{esc}}^{-1}$). Un éclaircissement identifie une modalité dont le sol est contaminé en Cd (concentration totale du sol en Cd $> 0,45 \text{ mg kg}^{-1}$).

4.2 Référentiel : base de données

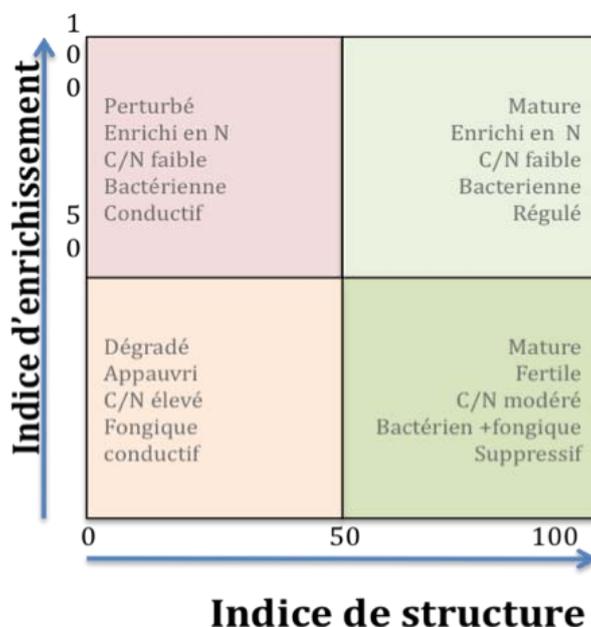
Logigramme Nématofaune

Pour d'autres bioindicateurs, comme les Indices (EI et SI) issus de l'analyse de la nématofaune des sols des référentiels spécifiques ont été développés. Un logigramme a été élaboré utilisable pour des données acquises sur des sites contaminés et non contaminés.

Chaque situation est représentée dans un plan représentant les valeurs de SI (Indice de Structure) en abscisse et EI (Indice d'Enrichissement) en ordonnée. Ce plan se divise en 4 cadrats qui caractérisent 4 grandes classes de fonctionnement de sols différents (Ferris et al., 2001) :

- EI<50 et SI<50 : sols dégradés, appauvris ;
- EI>50 et SI<50 : sols perturbés, enrichis, conductifs ;
- EI>50 et SI>50 : sols matures, fertiles, suppressifs ;
- EI<50 et SI>50 : sol matures, enrichis, régulés ;

L'analyse des situations sur ce plan est appelée le diagnostic du réseau trophique du sol. Ce graphique permet de situer l'échantillon prélevé par rapport à différentes situations de référence. L'indice d'enrichissement est basé sur la part relative de la nématofaune opportuniste d'enrichissement et de la nématofaune basale et reflète le recyclage des nutriments. L'indice de structure est basé sur la part relative de la nématofaune sensible et de la nématofaune basale et reflète la stabilité du milieu.



5. Conclusions et perspectives

Face à une demande de plus en plus forte pour requalifier les milieux délaissés (suite à une pollution ponctuelle, une pollution résiduelle ou un abandon de l'usage du sol) avec comme objectif de lui donner un nouvel usage (usage paysager, usage jardin d'ornement, usage résidentiel...), il est nécessaire de proposer de nouveaux outils permettant de mieux caractériser l'état des sols et leur fonctionnement biologique. Les outils de type bioindicateurs développés dans le cadre de ce programme, peuvent répondre à ce besoin d'évaluation du potentiel biologique du sol et de sa capacité à rendre des services à l'homme. Ils peuvent être utilisés comme :

- outils complémentaires pour améliorer un diagnostic de pollution,
- outils d'aide à la décision (à l'aide d'un référentiel et pour un usage donné) permettant de requalifier un sol après traitement ou réhabilitation,
- et pour fournir des informations globales permettant de comprendre et prévoir le fonctionnement d'un écosystème du sol dans le cadre de la reconversion d'un site abandonné sans usage futur.

Les bioindicateurs permettent d'identifier et de quantifier les perturbations, les transformations du sol et les impacts sur les écosystèmes et à terme, les services rendus. Cette notion de bon fonctionnement biologique des sols peut être approchée plus facilement en partant du(des) service(s) que l'on souhaite voir rendu(s) et donc des fonctions des sols à mettre en avant. Le niveau de chaque fonction étant mesuré par une liste d'indicateurs, il s'agit de traduire ces fonctions en services écosystémiques.

Ainsi les indicateurs biologiques s'avèrent indispensables pour caractériser certaines fonctions du sol et par là même le(s) service(s) écosystémique(s) qui en résultent et plus particulièrement les services « Rétention » (**cf chapitre 2**), « Habitat » et « Recyclage des nutriments » (**cf chapitre 3.4**). A terme, la quantification des services doit permettre d'évaluer le fonctionnement biologique de tout type de sol (agricole, forestier, friches industrielles, prairies etc...) afin de pouvoir rendre compte du potentiel d'un sol délaissé (sans usage) et aider à la gestion de son usage futur.

Les données acquises dans ce programme montrent l'intérêt d'utiliser ces outils pour évaluer certaines fonctions du sol et par conséquent les services que le sol peut rendre à l'homme en tenant compte non seulement de la contamination mais également des facteurs environnementaux qui influencent son fonctionnement. Dans le domaine des sites pollués, l'évaluation des services peut de venir un outil d'aide à la gestion des sites à grande échelle, à la reconquête des sols en friche, à la valorisation des sols après traitement ou réhabilitation

Dans un contexte plus général, le Grenelle de l'Environnement en 2007 puis la Stratégie Nationale pour la Biodiversité (SNB) en 2011 montrent également la volonté des pouvoirs politiques à mieux prendre en compte la préservation de la biodiversité dans de nombreux secteurs d'activité : réaménagement urbain, infrastructures de transport, agriculture, production d'énergie, Il s'agit non seulement de préserver et de restaurer les écosystèmes et leur fonctionnalité afin de préserver leur capacité à fournir des services mais également de lutter contre les espèces exotiques, envahissantes et contre les substances toxiques et toutes formes de pollution.

Remerciements

Les auteurs remercient l'ensemble des gestionnaires des sites pour leur collaboration : Douay Francis, Hitmi Adnane, Beguiristain Thierry, Alaphilippe Aude, Guernion Murielle, Houot Sabine, Legras Marc, Vian Jean-François ainsi qu'Antoine Richard du Laboratoire d'analyse des sols d'Arras pour la caractérisation des sols et les analyses physico-chimiques dans les sols

Bibliographie

- AFNOR 2012. Qualité du sol. Détermination des effets des polluants sur la flore du sol: Effets des sols contaminés sur la composition en acides gras foliaires de *Lactuca sativa*. XP X31-233. Association Française de Normalisation, Paris, France
- AFNOR 1996. Qualité des sols. Méthodes chimiques- sols sédiments, mise en solution par attaque acide – NF X31-147. Association Française de Normalisation, Paris, France.
- AFNOR 2008. ISO 23611-4. Qualité du sol - Prélèvement des invertébrés du sol - Partie 4: Prélèvement, extraction et identification des nématodes du sol.

- AFNOR 2008. ISO 17402:2008 - Soil quality - Requirements and guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials.. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland
- Blanchart E., 2012. Quels bioindicateurs pour une gestion durable des sols? Actes de la Journée technique ADEME "Bioindicateurs pour la caractérisation des sols". 7 pages.
- Bouché M.B., 1972. Lombriciens de France. Ecologie et Systématique. I.N.R.A. (Ann. Zool.-écol. anim. numéro hors série 72/2), Paris, 671p.
- De Vaufleury A., Bravin M., Ismert M, Grand C. 2011. Outils d'évaluation de la biodisponibilité des contaminants dans les sols. Actes du séminaire ADEME-URS « Quels outils pour l'évaluation des risques pour les écosystèmes terrestres liés à des terrains contaminés ? », 27-28 septembre 2011, 71-84 ([http://www.ademe/sites/pollués et sols/outils méthodologiques.](http://www.ademe/sites/pollués_et_sols/outils_méthodologiques.)).
- Ferris, H., Bongers, T., de Goede, R., 2001. A framework for soil food web diagnostics: extension of the nematode faunal analysis concept. *Applied Soil Ecology*, 18, 13-29.
- Fritsch, C. 2010. Utilisation intégrée de bioindicateurs pour la surveillance des sols et des écosystèmes terrestres. Thèse de l'université de Franche-Comté,
- Garrec J.P et Van Haluwyn C. 2002. Biosurveillance végétale de la qualité de l'air : concepts, méthodes et applications/préf. Bernard Festy. Paris : Tec et Doc, 117 p
- Hedde M. 2012. Evaluation de systèmes de culture? Actes de la Journée technique ADEME "Bioindicateurs pour la caractérisation des sols".
- Jeffery S., Gardi C., Jones A., Montanarella L., Marmo L., Miko L., Ritz K., Peres G., Römbke J. and van der Putten W. H. (eds.), 2010. European Atlas of Soil Biodiversity. European Commission, Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- Lanno R, Wells J, Conder J, Bradham K, Basta N. 2004. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotox Env Safety*, 57, 39-47.
- Le Guédard M., Faure O. and J.-J. Bessoule J.J. 2012a. Soundness of in situ lipid biomarker analysis: Early effect of heavy metals on leaf fatty acid composition of *Lactuca serriola*. *Environmental and Experimental Botany*, 76: 54-59.
- Le Guédard M., Faure O. and J.-J. Bessoule J.J. 2012. Early changes in the fatty acid composition of photosynthetic membrane lipids from *Populus nigra* grown on a metallurgical landfill. *Chemosphere*. 88, 693-698.
- Le Guédard, M., Schraauwers, B., Larrieu, I., Bessoule, J.-J. 2008. Development of a biomarker for metalbioavailability: the lettuce fatty acid composition. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27 (5), 1147 – 1151.
- Pauget B., Gimbert F., Scheifler R., Coeurdassier M., de Vaufleury A. 2012. Soil parameters are key factors to predict metal bioavailability to snails based on chemical extractant data. *Science of the Total Environment*, 431 (2012) 413–425.
- Pauget B. 2012. Détermination des facteurs du sol modulant l'accumulation et la biodisponibilité des métaux pour l'escargot *Cantareus aspersus*. Thèse de l'université de Franche-Comté,
- Pérès G, Vandenbulcke F, Guernion M, Hedde M, Beguiristain T, Douay F, et al. 2011. Earthworm indicators as tools for soil monitoring, characterization and risk assessment. An example from the national Bioindicator programme (France). *Pedobiologia*, 54S (2011) S77– S87.
- Qing Cao, QIN-HONG HU, BAISCH C, SARDAR KHAN,I and YONG-GUAN ZHU. 2009. Arsenate toxicity for wheat and lettuce in six Chinese soils with different properties.. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 28, No. 9, pp. 1946–1950
- Van Gestel, C.A.M. 2008. Physico-chemical and biological parameters determine metal bioavailability in soils. *Science of the Total Environment*, 406, 385-395.