
**Qualité du sol — Encagement in situ
d'escargots pour la mesure de la
bioaccumulation de contaminants**

*Soil quality — In situ caging of snails to assess bioaccumulation of
contaminants*

iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

ISO 24032:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/9396e07c-e2e5-4cf8-9ff4-cc4c49f70605/iso-24032-2021>



iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

ISO 24032:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/9396e07c-e2e5-4cf8-9ff4-cc4c49f70605/iso-24032-2021>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2021

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +41 22 749 01 11
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	2
5 Organisme et équipement d'essai	2
5.1 Matériel biologique	2
5.2 Équipement	3
6 Préparation des organismes pour l'exposition	4
7 Exposition des organismes d'essai	5
7.1 Généralités	5
7.2 Début de l'exposition	5
7.3 Fin de l'exposition — Jeûne	6
7.4 Prélèvement et préparation après exposition	7
8 Calcul et expression	7
8.1 Généralités	7
8.2 Pour les métaux (métalloïdes)	7
8.2.1 Valeur seuil indicative	7
8.2.2 Calcul de la somme des excès de transfert des métaux (métalloïdes): indice SET	8
8.3 Pour les autres substances chimiques	9
9 Validité de l'expérience	9
10 Rapport d'essai	9
Annexe A (informative) Sources et voies d'exposition des escargots aux contaminants sur le terrain	10
Annexe B (informative) Principales étapes du bioessai in situ	11
Annexe C (informative) Technique d'élevage des escargots	15
Annexe D (informative) Exemple de composition de la nourriture pour escargots	22
Annexe E (informative) Concentrations habituelles dans les viscères d'escargots subadultes avant encagement	23
Annexe F (informative) Dispositifs d'essai recommandés pour l'exposition in situ pour évaluer la bioaccumulation de contaminants chez les escargots	25
Annexe G (informative) Exemple de masse des escargots avant exposition	28
Annexe H (informative) Résultats de l'essai circulaire international	30
Annexe I (informative) Exposition ex situ pour évaluer la bioaccumulation de substances chimiques chez les escargots	48
Bibliographie	56

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est attirée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 190, *Qualité du sol*, sous-comité SC 4, *Caractérisation biologique*, en collaboration avec le comité technique CEN/TC 444, *Caractérisation environnementale des matrices solides*, du Comité européen de normalisation (CEN) conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

Introduction

Les escargots sont des macroinvertébrés omniprésents dans le sol, vivant à l'interface entre le sol, les végétaux et l'air. Ces mollusques gastéropodes pulmonés sont phytophages et saprophages (niveau trophique des consommateurs primaires et détritivores). Ils ingèrent des végétaux et du sol, et rampent sur le sol où ils pondent leurs œufs. De ce fait, ils intègrent de nombreuses sources et voies de contamination (voir [Annexe A, Figure A.1](#)). Les escargots participent aux échanges avec le sol et sont la proie de divers consommateurs (invertébrés: vers luisants, larves de carabidés, ou vertébrés: oiseaux, petits mammifères tels que les musaraignes, les hérissons et l'homme).

Parmi les espèces d'escargots, l'espèce recommandée est *Cantareus aspersus* O.F. Müller 1774¹⁾ (synonymes: *Helix aspersa aspersa*, *Cornu aspersum*), également connue sous le nom d'escargot de jardin, ou plus simplement «Petit-Gris» (voir [Annexe A, Figure A.2](#)). Cette espèce est un mollusque gastéropode pulmoné stylommatophore de la famille Helicidae, très répandue dans le monde^{[9],[28]} Cette espèce paléarctique peut s'acclimater à des régions présentant des climats de types différents: méditerranéen, océanique tempéré, continental tempéré, voire tropical. *Cantareus aspersus* (Müller, 1774) est d'origine européenne et a été introduit dans le monde entier. Il est désormais présent sur tous les continents hormis l'Antarctique. D'autre part, l'espèce est reconnue comme étant un escargot nuisible pour l'agriculture dans certains pays et doit être traitée avec précaution.

Les escargots juvéniles font l'objet de l'ISO 15952^[1], qui décrit comment déterminer ex situ, c'est-à-dire dans des conditions de laboratoire, les effets toxiques de substances chimiques ou de matrices contaminées sur la survie et la croissance d'escargots juvéniles (1 g MF).

À l'heure actuelle, il n'existe aucun bioessai in situ normalisé permettant d'évaluer sur le terrain le transfert de contaminants de l'environnement aux organismes de la faune du sol. En effet, bien que l'ISO 19204^[3] (relative à l'approche TRIADE) recommande l'application de trois éléments de preuve combinés (chimie, écotoxicologie et écologie) et souligne l'intérêt des bio-indicateurs d'effet et d'accumulation comme outils complémentaires pour l'évaluation des risques écologiques spécifiques à un site, peu de bioessais sont disponibles à cette fin. Comme décrit dans l'ISO 19204:2017, Annexe A, les analyses de la bioaccumulation dans les végétaux ou les organismes du sol sont donc utiles pour:

- évaluer la biodisponibilité réelle des contaminants du sol pour les organismes du sol;
- aborder le transfert dans la chaîne alimentaire et le risque d'empoisonnement secondaire des consommateurs.

Dans certains cas, la bioaccumulation peut donner lieu à des effets toxiques, mais ce n'est pas toujours le cas (voir ISO 17402^[2]).

L'élevage étant possible (voir l'ISO 15952:2018, Annexe B), des escargots au passé biologique connu peuvent être utilisés sur le terrain pour analyser la biodisponibilité des contaminants présents dans les habitats (sol, végétaux, air) en mesurant leur accumulation chez des individus encagés et exposés pendant une période déterminée.

C. aspersus peut être utilisé soit sur le terrain^{[10],[12],[13],[15],[19],[22],[23],[27],[29],[30]}, soit en laboratoire^{[14],[18],[20],[21]} pour évaluer le devenir et le transfert (à savoir la biodisponibilité environnementale, ISO 17402) des substances chimiques dans les sols. Ce bio-indicateur du sol a été appliqué sur de nombreux sites²⁾ pour évaluer la fonction d'habitat et de rétention des sols. Ce bioessai permet de déterminer la biodisponibilité des substances chimiques pour les escargots en mesurant leur concentration dans leur masse viscérale (qui contient principalement la glande digestive et quelques autres organes, comme décrit dans la Référence [\[16\]](#)). La masse viscérale est le principal site d'accumulation des contaminants chez les escargots.

1) Disponible à l'adresse : https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/199863/tab/taxo.

2) Disponible à l'adresse : <https://ecobiosoil.univ-rennes1.fr/ADEME-Bioindicateur/english/worksheet.php>.

Le présent document décrit la méthodologie pour exposer des escargots in situ pendant 28 jours et les préparer jusqu'à la réalisation d'analyses chimiques pour évaluer la bioaccumulation dans leurs viscères. Ce bioessai évalue le transfert de contaminants de l'environnement aux escargots petits-gris.

Il est applicable sur le terrain (par exemple, sites pollués, sols amendés, sols après dépollution, sites agricoles ou autres sites préoccupants et déchets) en mettant les escargots en cage pendant 28 jours sur le site/le sol/le déchet étudié. Les escargots intègrent des substances chimiques de toutes les sources terrestres (sol, végétaux, air). Après exposition, les concentrations en substances chimiques sont mesurées dans la masse viscérale des escargots.

En variante, cette méthode peut être utilisée en laboratoire (ex situ) pour évaluer la bioaccumulation de substances chimiques chez les escargots exposés uniquement au sol (voir [Annexe I](#)).

L'[Annexe H](#) présente les résultats d'un essai circulaire réalisé in situ par six laboratoires pour évaluer la méthode d'exposition et par quatre laboratoires de l'exposition jusqu'à l'analyse chimique

iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[ISO 24032:2021](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/9396e07c-e2e5-4cf8-9ff4-cc4c49f70605/iso-24032-2021>

Qualité du sol — Encagement in situ d'escargots pour la mesure de la bioaccumulation de contaminants

1 Domaine d'application

Le présent document décrit une méthode permettant d'évaluer la bioaccumulation de substances chimiques chez les escargots, c'est-à-dire les concentrations de métaux (métalloïdes) (ME) ou de composés organiques [tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les polychlorobiphényles (PCB)] accumulés dans leurs tissus.

Le présent document présente la méthodologie pour préparer les escargots pour un encagement in situ pendant 28 jours, la description de l'essai in situ, puis la méthodologie de collecte et de préparation des escargots jusqu'à leur conservation pour analyse ultérieure. Si une étude cinétique de l'accumulation est nécessaire, il est également possible de prélever des échantillons d'escargots à différents moments de l'exposition^{[13],[19],[22]}.

Le présent document exclut les méthodes analytiques. La préparation (extraction et minéralisation) des échantillons et la quantification des substances chimiques ne font pas partie du domaine d'application du présent document.

La méthode est applicable à des sols destinés à différentes utilisations (agricole, industrielle, résidentielle, forestière, avant et après dépollution, sur des sites potentiellement pollués, etc.) et aux déchets^{[8],[10]}, de préférence sur des sols recouverts d'une couverture végétale et/ou d'une couche d'humus.

La méthode est applicable sous réserve de certaines limites de température (période sans gel, c'est-à-dire généralement d'avril à octobre en région tempérée).

En option (voir [Annexe I](#)), la méthode peut être utilisée en laboratoire pour évaluer l'accumulation de contaminants [et, facultativement, l'indice Somme des excès de transfert (SET) pour les ME, HAP et PCB] des escargots exposés uniquement au sol.

2 Références normatives

Le présent document ne contient aucune référence normative.

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>;
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <https://www.electropedia.org/>.

3.1

cage

microcosme fermé permettant l'exposition des escargots par différentes voies et diverses sources

3.2

bioaccumulation

phénomène par lequel un produit chimique présent dans un milieu s'accumule dans un organisme vivant

Note 1 à l'article: Ce phénomène est observé lorsque le taux d'absorption dépasse le taux d'élimination du contaminant.

3.3

escargot inactif

escargot sans activité, généralement au sec quand il se colle (généralement par un simple disque de mucus séché) contre les parois de la boîte dans laquelle il est placé

3.4

estivation

escargots maintenus inactifs, au sec, à une température de 15 °C à 20 °C

3.5

parcelle

zone caractéristique et représentative du site

Note 1 à l'article: Il convient de consigner les coordonnées géographiques de chaque parcelle.

3.6

site

terrain (ou entité géographique) étudié et où les microcosmes sont placés pour évaluer la biodisponibilité des contaminants pour les escargots

Note 1 à l'article: Le site peut avoir une ou plusieurs parcelles et une ou plusieurs utilisations du sol, par exemple un champ, un pâturage, une forêt, un site industriel ou une décharge.

4 Principe

Les escargots sont encagés dans des microcosmes sur le site étudié pendant 28 jours. Quinze escargots petit-gris subadultes [masse corporelle de (5 ± 1) g] doivent être placés dans chaque microcosme. De la fin de leur élevage à leur mise en place sur le sol, ils peuvent être conservés dans des boîtes en bois sèches (boîtes rondes en bois, d'environ 12 cm de diamètre et 4 cm de haut; voir [Figure 1](#) et [Figure B.2](#)). Ils sont sortis d'estivation en les aspergeant d'eau quelques heures avant de les placer dans les microcosmes. Une fois dans ceux-ci, ils sont exposés au sol, aux végétaux qui ont poussé sur site et à l'air ambiant afin d'être soumis à des conditions d'exposition naturelles (aléas climatiques).

Après l'exposition, les escargots collectés sont ramenés au laboratoire sans nourriture pendant 48 h. Pendant cette période de jeûne, les fèces sont retirées toutes les 24 h. Les escargots sont ensuite congelés à -80 °C. Après décongélation, le corps mou est retiré de la coquille; la masse viscérale et le pied (voir [Annexe B](#), [Figure B.1](#)) sont séparés et préparés pour l'analyse chimique afin de déterminer la concentration interne en substances chimiques. L'[Annexe B](#) présente les principales étapes.

5 Organisme et équipement d'essai

5.1 Matériel biologique

Les organismes d'essai doivent être des escargots subadultes (pour éviter les variations de masse pendant la durée d'exposition et la dilution consécutive de la bioaccumulation par le gain de masse pendant la croissance ou les transferts de composés aux œufs pendant les phases de la reproduction). L'espèce recommandée est l'escargot petit-gris *Cantareus aspersus* (Müller, 1774) qui doit être âgé de 7 semaines à 12 semaines, avec une masse fraîche moyenne de (5 ± 1) g.

NOTE 1 Facultativement, le diamètre de la coquille peut être mesuré (moyenne \pm écart-type [ET] de $25 \text{ mm} \pm 5 \text{ mm}$; min./max. de 20 mm/30 mm).

Les escargots doivent être sélectionnés à partir d'un élevage synchrone afin d'obtenir une population la plus homogène possible au regard de la masse et de l'âge. Les techniques d'élevage des escargots sont décrites à l'[Annexe C](#). En résumé, après une période en nurserie et une période de croissance (de 3 semaines à 6 semaines, suivies de 4 semaines à 6 semaines), les escargots subadultes doivent être utilisés directement ou après une période d'estivation. Il convient que cette période [à savoir escargot inactif, collé sur la paroi d'une boîte sèche (boîte en plastique à éviter) dans une salle à température contrôlée entre 15 °C et 20 °C] ne dépasse pas 5 mois. L'estivation se déroule dans des boîtes rondes en bois (environ 12 cm de diamètre et 4 cm de haut; généralement 15 escargots par boîte, ce qui équivaut au nombre d'escargots par microcosme).

Les escargots doivent être élevés aux fins du projet (voir [Annexes C](#) et [D](#)) ou achetés auprès d'éleveurs d'escargots locaux.

NOTE 2 Il est possible d'utiliser un autre genre et/ou une autre espèce d'*Helicidae* (voir les exemples et les conditions dans l'Annexe G de l'ISO 15952:2018).

Un contrôle de la qualité chimique des escargots subadultes sélectionnés pour l'encagement (à savoir, des escargots non exposés) peut être effectué sur 6 escargots pour ce qui est des concentrations initiales des substances chimiques d'intérêt (Cescargot-t0). Ces escargots témoins peuvent être sélectionnés en même temps que les escargots utilisés pour l'encagement. L'analyse de la qualité chimique des escargots avant l'encagement peut être effectuée en même temps que l'analyse des escargots après exposition. Ce contrôle n'est pas obligatoire. En effet, après l'exposition, toutes les données sont comparées à la valeur seuil indicative (VSI) (voir [8.2.1](#)); cependant, s'il est possible d'obtenir ces données de contrôle, cela permet d'indiquer si les escargots n'étaient pas contaminés avant l'exposition. Pour les substances chimiques pour lesquelles aucune VSI n'est disponible, les données peuvent être comparées à différentes valeurs (voir [8.2.2.4](#)), parmi lesquelles les valeurs Cescargot-t0.

Les escargots subadultes utilisés doivent présenter des concentrations habituelles dans leur masse viscérale avant l'encagement (voir [Annexe E](#)). Pour les données relatives aux HAP et aux PCB, comme les extractions sont souvent réalisées sur des tissus frais, les données du [Tableau E.1](#) sont exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de masse fraîche de viscères (ces valeurs peuvent être converties en $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ MS sur la base de $\approx 15\%$ de masse sèche de la masse viscérale); pour les métaux (métalloïdes), les données sont exprimées en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de masse sèche de la masse viscérale.

5.2 Équipement

5.2.1 Microcosme, cylindres en acier inoxydable de 25 cm de diamètre et 25 cm de haut, recouverts d'un grillage de 0,5 cm ou 1 cm.

Un exemple est présenté à la [Figure 1](#) et à l'[Annexe F, Figure F.1](#).

NOTE 1 D'autres dispositifs peuvent être utilisés si le matériau qui les constitue ne peut être une source de contamination; pour certaines fins (par exemple, l'exposition des escargots à des substances chimiques pulvérisées sur le terrain), un microcosme entièrement grillagé peut être utilisé [voir, par exemple, Référence,^[11] qui utilise des cages en acier inoxydable de 25 cm × 25 cm × 15 cm (maillage: 1 cm) fermées par une grille en acier inoxydable de 30 cm × 30 cm (maillage: 1 cm) et maintenues par quatre piquets (voir [Annexe F, Figure F.2](#))].

NOTE 2 Dans certains cas, il peut être nécessaire de protéger le microcosme des prédateurs ou du bétail (voir exemples dans l'[Annexe F, Figure F.3](#)) ou du soleil (voir [Annexe F, Figure F.4](#)).

5.2.2 Grillage, 0,5 cm ou 1 cm de grillage, également en acier inoxydable.

5.2.3 Piquets, piquets en acier inoxydable (5 mm de diamètre et de 46 cm à 72 cm de long) pour maintenir le grillage sur la cage. La taille des piquets doit être adaptée en fonction du tassement du sol ou de la présence de pierres.

5.2.4 Morceaux de tuiles, voir [Figure 1](#) et [Annexe F](#).

5.2.5 Boîtes de conservation en bois. Les escargots inactifs peuvent être conservés et transportés avant exposition dans des boîtes rondes en bois (environ 12 cm de diamètre et 4 cm de haut), en plaçant les escargots au sec à une température entre 15 °C et 20 °C (voir [Figure 1](#), [Figure B.2](#) et [Annexe G](#)).

5.2.6 Boîtes de jeûne et de prélèvement. Pour la préparation des escargots en laboratoire (par exemple, pour conserver les escargots avant leur pesée individuelle), des récipients en plastique (RP) (par exemple, en polystyrène transparent ou tout autre récipient ayant des dimensions approximatives de 24 cm [longueur] × 10,5 cm [largeur] × 8 cm [hauteur]) peuvent être utilisés.

5.2.7 Pied à coulisse. Pied à coulisse d'une précision de 0,1 mm pour le mesurage du diamètre de la coquille.

5.2.8 Balance. Balance analytique ayant une précision d'au moins 10 mg.

5.2.9 Eau, au minimum déionisée.

5.2.10 Nourriture, qui doit être fournie sous forme de farine avec son taux d'humidité naturel (de 5 % à 10 %).

Afin que la croissance soit suffisante, il est recommandé d'effectuer les essais avec une nourriture à base de farine comprenant des céréales, du fourrage, des sels minéraux et des vitamines couvrant convenablement les besoins des escargots. Un exemple de composition de la nourriture est fourni dans [l'Annexe D](#).

5.2.11 Petit appareillage. Élastiques pour fermer les boîtes de conservation en bois ou les boîtes de jeûne et de prélèvement. Ruban adhésif pour étiqueter la boîte de conservation en bois et les boîtes de jeûne; marqueurs indélébiles; sacs refermables.

6 Préparation des organismes pour l'exposition

Après la fin de leur croissance (voir [Figure C.1](#), croissance 1, c'est-à-dire le temps nécessaire pour obtenir des subadultes ayant atteint la masse requise pour l'essai), les escargots doivent être conservés inactifs dans une boîte en bois ([5.2.5](#)). Leur masse diminue pendant cette période de conservation; c'est pourquoi dans certains cas (tels qu'une durée de conservation supérieure à une semaine), ils doivent être sortis d'estivation quelques jours avant le début de l'essai (voir [Article 6](#)).

En fonction de la durée de conservation entre la fin de la période de croissance (c'est-à-dire lorsque la masse moyenne requise est atteinte; voir [5.1](#)) et le début de l'essai sur le terrain, les escargots sont réveillés selon les scénarios suivants:

- si les escargots sont utilisés dans la semaine qui suit leur pesée et leur répartition en lots homogènes (15 escargots pour 1 microcosme), il est nécessaire de les réveiller quelques heures avant de les utiliser sur le terrain. Ils doivent être aspergés d'eau dans la boîte en bois. Cela facilite leur manipulation pour les sortir de la boîte en bois et les placer dans le microcosme une fois sur le terrain;
- s'ils ont été conservés pendant des périodes plus longues (>1 semaine, mais < 5 mois) avant exposition sur le terrain, il convient de les réveiller et de les nourrir avec des aliments pour escargots ([5.2.10](#)) pendant 2 jours à 5 jours afin qu'ils atteignent leur masse initiale. Après avoir été réveillés par aspersion d'eau dans la boîte en bois, ils sont placés dans des cages ou des boîtes en plastique (voir [Figure C.2](#) dans [l'Annexe C](#)) pendant 2 à 5 jours et nourris. Ils sont ensuite de nouveau pesés et répartis en lots homogènes (voir exemple dans [l'Annexe G](#), [Tableau G.1](#) et [Figure G.1](#)) dans la boîte en bois dans laquelle ils peuvent être conservés à court terme (de 0 à 1 semaine), avant d'être de nouveau réveillés et placés dans les microcosmes.

La proportion d'escargots non réveillés doit être inférieure à 20 %. Dès que les escargots redeviennent actifs (ils se décollent des parois de la boîte et commencent à se déplacer), ils doivent être transférés vers une boîte ayant été préalablement humidifiée avec de l'eau.

Tous les escargots nécessaires pour l'essai doivent être pesés et répartis en classes de masse distinctes (par exemple, regrouper tous les escargots de 4 g à 4,5 g, de 4,6 g à 5 g, de 5,1 g à 5,5 g, de 5,6 g à 6 g. Puis préparer un groupe de 15 escargots, chacun aussi homogène que possible en ce qui concerne la masse (même répartition de la masse moyenne du groupe, voir exemple dans l'[Annexe G, Figure G.1](#)).

NOTE Facultativement, le diamètre de la coquille peut être mesuré.

Les escargots prévus pour l'essai doivent être pesés individuellement et placés dans des boîtes de conservation en bois; 15 individus doivent être conservés par boîte, puisqu'un microcosme doit contenir 15 escargots pour l'exposition.

7 Exposition des organismes d'essai

7.1 Généralités

Les principales étapes du bioessai sont illustrées dans l'[Annexe E, Figures F.5](#) et [F.6](#) (un exemple de tableau de données est donné dans l'[Annexe G, Tableau G.1](#)).

7.2 Début de l'exposition

Trois microcosmes doivent être placés sur chaque parcelle. Pour tenir compte de l'hétérogénéité du sol en matière de propriétés intrinsèques et de profils de contamination, au moins 3 microcosmes par parcelle sont utilisés. Il convient que chaque microcosme contienne 15 escargots exposés au sol, à l'humus et à la végétation dans des conditions climatiques naturelles. C'est ainsi que les escargots sont exposés naturellement. Les végétaux, l'humus recouvrant le sol (et également le sol) constituent une source d'alimentation pour les escargots. Des morceaux de tuiles doivent être placés dans la cage pour fournir un abri et une surface de collage aux escargots.

Les escargots doivent être retirés avec précaution de la boîte en bois, sans tirer trop fort pour éviter de briser la coquille; ils ne doivent pas produire de mucus blanc (comme une mousse blanche), ce qui est le signe d'une mauvaise manipulation.

NOTE 1 Le nombre de microcosmes par parcelle peut être adapté en fonction du nombre ou de la masse de tissus d'escargot nécessaire pour l'analyse ou dans le cadre d'une étude préliminaire.

NOTE 2 S'il n'y a pas d'ombre sur site, un filet d'ombrage peut être placé au-dessus du grillage pour réduire la chaleur dans la cage. [Annexe F, Figure F.4](#).

Une fois sur le terrain, installer un microcosme sur le sol (enlever les pierres pour éviter tout espace entre le microcosme et le sol afin que le microcosme soit suffisamment enfoui dans le sol pour éviter que les escargots ne s'en échappent, puis enfoncer la cage dans la couche de sol supérieure de 0,5 cm à 1 cm). Déposer les escargots et les morceaux de tuiles utilisés comme abris (voir [Figure 1](#)). Pour finir, couvrir les microcosmes avec le grillage et fixer celui-ci avec les piquets. Environ 20 min sont nécessaires pour cette étape.



a) Escargot subadulte, masse fraîche totale de 4 g à 6 g



b) Microcosme ouvert



c) Microcosmes couverts par un grillage en acier inoxydable (maillage: 10 mm) solidement fixé sur le dessus du microcosme par 4 piquets



d) Microcosmes sur site

Figure 1 — Exposition in situ: biosurveillance active à l'aide de microcosmes où les escargots sont exposés

7.3 Fin de l'exposition — Jeûne

Tous les escargots d'un microcosme sont retirés et placés ensemble avec précaution, par exemple dans la boîte en bois utilisée pour conserver les escargots avant l'exposition.

De retour au laboratoire, les escargots doivent être nettoyés, si nécessaire en éliminant les particules de sol à l'aide d'une brosse et d'eau. Les escargots doivent ensuite être placés dans une boîte en plastique facile à nettoyer (par exemple, comme à la [Figure C.2](#)) pour la période de jeûne. Pendant le jeûne, les escargots doivent être privés de nourriture pendant deux jours (jusqu'à ce qu'ils ne produisent plus de fèces). Pendant cette période, les fèces doivent être retirées toutes les 12 h pour éviter que les escargots

ne les mangent à nouveau. Il est recommandé de peser les escargots à la fin de l'exposition et après le jeûne avant de les congeler.

NOTE Comme la masse est influencée par les conditions météorologiques sur le terrain, la pesée des escargots après le jeûne et une hydratation homogène facilitent les comparaisons entre les escargots exposés dans des conditions météorologiques très différentes, ou entre des expériences réalisées sur différentes années. Facultativement, le diamètre de la coquille peut être mesuré.

Les escargots sont ensuite congelés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ils peuvent être congelés dans des sacs refermables ou tout autre récipient pouvant être efficacement fermé.

Facultativement, un congélateur à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ peut être utilisé si un congélateur à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ n'est pas disponible. Un congélateur à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ permet une anesthésie létale par congélation plus rapide. Il est également nécessaire pour une conservation appropriée avant une analyse supplémentaire de biomarqueur.

7.4 Prélèvement et préparation après exposition

Pour la préparation de la masse viscérale, les escargots doivent être décongelés. En fonction de la température de la salle, attendre que le corps mou soit complètement ramolli (absence de glace dans le corps). Après la décongélation, les escargots doivent être pesés, le corps mou (c'est-à-dire le pied + la masse viscérale) doit être retiré de la coquille et la masse viscérale séparée du pied pour l'analyse des substances chimiques (voir étape 3 à la [Figure B.3](#)).

Le retrait de la masse viscérale prend environ 10 min pour les opérateurs non qualifiés et 2 min pour les opérateurs qualifiés.

Deux escargots par microcosme doivent être prélevés aléatoirement après 28 jours d'exposition. Le nombre total d'escargots qui doivent être prélevés pour l'analyse des métaux (métalloïdes) est de deux par microcosme, donnant un total de six individus par parcelle: trois microcosmes x deux escargots/microcosme). Les escargots restants [13 escargots (si aucune mortalité n'est survenue pendant l'exposition)] peuvent être conservés congelés pour analyse ultérieure. Cela assure une marge de sécurité en cas de mortalité, et permet également d'obtenir suffisamment de matériel biologique si l'analyse d'autres polluants [dibenzo-p-dioxines polychlorées et dibenzo-p-furanes polychlorés (PCDD/Fs), terres rares, composés polybromés, etc.] ou biomarqueurs est nécessaire.

NOTE 1 Pour l'analyse des composés organiques, si la masse des viscères n'est pas suffisante pour une analyse individuelle, les masses viscérales de deux escargots ou plus peuvent être regroupées pour atteindre la masse d'échantillon requise pour l'analyse.

NOTE 2 Si un seul microcosme est utilisé sur une parcelle (par exemple, dans le cadre d'une étude préliminaire), six escargots sont prélevés dans le microcosme.

8 Calcul et expression

8.1 Généralités

Il existe actuellement deux possibilités de calcul: l'une pour les métaux (métalloïdes), pour lesquels des valeurs indicatives sont disponibles, et l'autre pour les autres substances chimiques, pour lesquelles aucune valeur indicative n'est disponible au moment de la publication.

8.2 Pour les métaux (métalloïdes)

8.2.1 Valeur seuil indicative

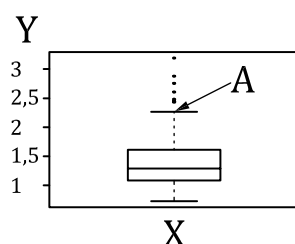
Pour 14 métaux (métalloïdes), les valeurs seuil indicatives [(VSI) auparavant appelées «concentrations internes de référence» (CIRef)^[22]] ont été déterminées chez les escargots sur la base des concentrations de métaux d'escargots exposés sur des sites non pollués ($n = 150$) (voir [Tableau 1](#), [Figure 2](#)).

Elles permettent de calculer l'indice SET (somme des excès de transfert) pour fournir une évaluation du transfert anormal de métaux (métalloïdes) aux escargots. En résumé, les concentrations de ME chez les escargots après 28 jours d'exposition sur le site étudié sont divisées par la VSI pour chaque ME afin de calculer le quotient d'accumulation (QA); les QA-1 sont ensuite additionnés pour chaque ME pour obtenir l'indice SET^{[18],[23],[24],[25],[26]}.

Tableau 1 — Valeur seuil indicative (VSI) des métaux (métalloïdes) dans les viscères des escargots après 1 mois d'exposition sur des sites non contaminés^[23]

ME	As	Cd	Co	Cu	Cr	Hg	Mo	Ni	Pb	Sb	Sn	Sr	Tl	Zn
VSI in situ (mg.kg ⁻¹)	0,307	2,27	6,676	184,7	2,01	0,198	4,428	5,249	12,9	0,076	0,058	125,7	0,259	1 490

NOTE Les VSI sont des valeurs médianes (voir [Figure 2](#)).



Légende

X parcelles non contaminées

Y C_{escargot} (mg.kg⁻¹)

A VSI Cd 2,27 mg.kg⁻¹

Figure 2 — Exemple de calcul de la VSI pour le cadmium

8.2.2 Calcul de la somme des excès de transfert des métaux (métalloïdes): indice SET

8.2.2.1 Généralités

Pour identifier le transfert de métaux de l'environnement aux escargots, la médiane de la concentration des viscères de l'escargot est comparée à la VSI. Si la concentration médiane dans l'escargot exposé à la parcelle étudiée est supérieure à la VSI, le sol présente alors un transfert de métal anormal à l'escargot.

8.2.2.2 Calcul du quotient d'accumulation (QA)

QA = [C_{escargot-28j}]/VSI pour chaque métal (métalloïde).

Avec [C_{escargot-28j}] = concentration médiane du métal (métalloïde) dans les viscères des 6 escargots exposés sur la parcelle étudiée.

Un QA > 1 identifie un excès de transfert.

8.2.2.3 Calcul de la somme des excès de transfert des métaux (métalloïdes): parcelle SET et site SET

SET_{parcelle} = Σ(QA-1); et

SET_{site} = Σ(QA-1) / n_{parcelle}.