

N° d'ordre : 2693

# THÈSE

présentée à

**L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I**

ÉCOLE DOCTORALE

Sciences du vivant, Géosciences, Sciences de l'Environnement

par **Aurélie CIUTAT**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPÉCIALITÉ : ECOTOXICOLOGIE

---

## **Impact de la bioturbation des sédiments sur les transferts et la biodisponibilité des métaux - Approches expérimentales**

---

Soutenue le : 11 juillet 2003

Après avis de :

**Mr G. STORA**, Directeur de recherche, CNRS Marseille  
**Mr B. SUNDBY**, Professeur, Mc Gill University, Montréal

Rapporteur  
Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

**Mr B. DUPRE**, Directeur de recherche, CNRS Toulouse  
**Mr P. ANSCHUTZ**, Maître de Conférences, Université Bordeaux I  
**Mr G. STORA**, Directeur de recherche, CNRS Marseille  
**Mr B. SUNDBY**, Professeur, Mc Gill University, Montréal  
**Mr A. BOUDOU**, Professeur, Université Bordeaux I  
**Mme M. GERINO**, Maître de Conférences, Université Toulouse III

Président  
Rapporteur de soutenance  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur



A mes grands-parents,  
Sylvie et Claude



*Tout au long de ces années de thèse, en raison du caractère pluridisciplinaire de mon travail mais aussi parce que les échanges sont à la base de l'activité de recherche, j'ai été amené à rencontrer et à travailler avec de nombreuses personnes qui m'ont aidées à avancer dans l'étude de ce sujet captivant mais très complexe. Je souhaite leur exprimer ici ma reconnaissance.*

*Je remercie tout d'abord le Professeur **Alain Boudou**, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir confié ce sujet de recherche qui m'a passionné. Il a guidé mon travail avec toute son expérience scientifique, en me laissant la liberté nécessaire à l'apprentissage et à la créativité. Il m'a soutenu dans mon désir de faire de l'enseignement en parallèle à mes activités de recherches. Il m'a ensuite enseigné l'exercice délicat de la rédaction d'articles et a enfin passé beaucoup de temps avec moi lors de la phase finale de rédaction de ce mémoire et de la soutenance de thèse.*

*J'adresse toute mon amitié à Madame **Magali Gérino**, ma co-directrice de thèse, qui m'a initié aux joies de l'étude de la bioturbation et m'a appris en particulier à comprendre et aimer ces chers petits tubificidés. Elle a toujours cru en mon travail et a été à mes côtés dans les moments de doutes, dès que j'ai eu besoin de conseils ou d'encouragements.*

*Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur **Bernard Dupré** pour avoir bien voulu présidé mon jury de soutenance et s'être intéressé à mon travail.*

*Je remercie vivement Monsieur **Pierre Anschutz**, qui m'a accompagné tout au long de cette thèse. Il m'a appris patiemment ses connaissances en géochimie et m'a aidé à les appliquer à mes expériences. Il a aussi accepté de faire partie de mon jury et d'être rapporteur de soutenance.*

*Je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance à mes deux rapporteurs, Monsieur **George Stora** et le Professeur **Bjorn Sundby** pour avoir jugé et commenté ce mémoire de thèse avec leurs grandes compétences scientifiques. Au début de mon travail de recherche, j'avais rencontré **Bjorn Sundby**, lors d'un de ses séjours à Bordeaux, et **Georges Stora**, au cours d'un congrès, et ils avaient déjà tous deux montré de l'intérêt pour mon travail et m'avaient encouragé dans cette voie de recherche.*



*Merci beaucoup à tous les membres du LEESA, permanents ou de passage. Sans eux, ces années de thèse n'auraient pas été aussi agréables. Je pense en particulier :*

- à **Jean-Charles Massabuau** qui n'a pas hésité à me secourir dans l'urgence à plusieurs reprises et qui m'a enrichi par ses connaissances et sa rigueur scientifique ;
- à **Bruno Etcheveria** et à son aide indispensable lors des longues journées de carottage et de découpage du sédiment ;
- à **Pierre Ciret**, inlassablement disponible pour dépanner et aider avec le sourire ;
- à **Nathalie Mesmer-Dudons** qui a réalisé toutes les coupes autométallographiques de ce travail et a participé à leur interprétation parfois périlleuse ;
- à **Gilles Durieu** qui m'a conseillé et corrigé dans l'art délicat des statistiques. Mais c'est surtout pour son amitié et nos soirées au Cosy ou dans les pubs de Bordeaux que je le remercie, sans oublier **Fikria** ;
- à **Régine Maury-Brachet** et **Agnès Fuerte-Mazel** qui ont été un appui précieux et sont toujours prêtes à écouter, à conseiller et surtout à remonter le moral ;
- à **Olivier Simon** qui m'a aidé dès mon arrivée au LEESA. Il m'a appris à monter un microcosme et à doser les métaux, deux choses fondamentales en écotoxicologie ;
- à **Cathy Charlot** qui a été une confidente précieuse et m'a souvent écouté quand j'avais besoin de raconter mes petits et mes grands malheurs ;
- à **Elodie Fournier, Laurent Caussieu et Ludovic Laurens** qui ont effectué des stages avec moi ;
- à **Magalie Baudrimont** et **Alexia Legeay** qui m'ont éclairé dans l'apprentissage de l'enseignement, en particulier pour les TP/TD de Deug .

*Merci également à **Florence Daniel**, à **Jean-Pierre Brindamour**, à **Véronique Roque-Duflo**, à **Jean-Paul Bourdineau**, à **Henri Bouillard** et à tous les étudiants passés et présents : **Caroline, Maud, Laure, Véronique, Tiphaine, Audrey**,... (j'en oublie beaucoup).*

*Je tiens à remercier également les membres du DGO avec qui j'ai travaillé :*

- **Olivier Weber** à qui j'adresse toute ma reconnaissance pour avoir participé et s'être intéressé à mon travail dès le début et pour avoir toujours pris le temps nécessaire pour analyser et discuter les résultats ;





- **Gérard Blanc, Jeorg Schäfer et Cécile Bossy** qui ont analysé mes nombreux échantillons en ICPMS et ont répondu à mes questions ;
- **Henri Etcheber** qui a lui-aussi réalisé des dosages sur mes échantillons de sédiment ;
- **Gwenaëlle, Karine, Stéphane et Sébastien** dont j'ai apprécié la compagnie lors de mes courts séjours au DGO.

J'ai aussi une pensée pour tous les **Corbicula, Hexagenia** et **Tubificidés** qui ont participé, de façon bien involontaire, à la réalisation de cette thèse.

Merci à **Delphine Paillard** dont l'amitié m'est si précieuse et dont les doutes, les joies et les craintes font souvent échos aux miens.

Pour terminer, je voudrais remercier mes proches, m'excuser pour les moments de stress et de tension que je leur ai fait subir et surtout leur exprimer ma profonde affection. C'est à eux que je dois la chance d'avoir réalisé cette thèse. Merci à **Célia**, ma sœur, pour avoir grandi avec moi, pour ses encouragements et son amitié ; merci à **Chantal**, ma mère, et à **Claude et Sylvie**, mes grands-parents, pour leur soutien, leur confiance en moi et leur amour ; merci à **Damien** pour son aide constante tout au long de ma thèse, pour sa patience et sa confiance et pour son amour.



---

# SOMMAIRE

---

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Partie I. Synthèse bibliographique</b> .....	6
<b>I.A. Le rôle des sédiments dans la distribution des métaux au sein des écosystèmes aquatiques</b> .....	7
I.A.1. Les sédiments, des réservoirs de stockage des métaux. Exemple du cadmium dans le continuum "Lot-Garonne-Estuaire de la Gironde" .....	7
I.A.2. Géochimie des sédiments de surface.....	10
I.A.2.1. Séquence de réactions lors de la diagenèse précoce .....	10
I.A.2.2. Comportement diagénétique des métaux dans les sédiments .....	12
I.A.2.3. Réactions chimiques contrôlant le comportement diagénétique des métaux.....	13
I.A.3. Importance de la bioturbation dans les flux métalliques .....	14
<b>I.B. La Bioturbation</b> .....	16
I.B.1. Les différents types de bioturbation.....	16
I.B.2. L'influence de la bioturbation sur les propriétés physico-chimiques des sédiments .....	18
I.B.3. L'influence de la bioturbation sur la répartition des métaux traces et sur les flux associés.....	22
<b>Partie II : Bases méthodologiques</b> .....	25
<b>II.A. Les systèmes expérimentaux</b> .....	26
II.A.1. L'Unité Expérimentale (UE).....	26
II.A.1.1. Structure.....	26
II.A.1.2. La colonne d'eau .....	26
II.A.1.3. Le sédiment .....	27
II.A.1.4. Les organismes.....	27
<i>Hexagenia rigida</i> .....	28
Biologie et écologie .....	28
Anatomie.....	29
Intérêts en Ecotoxicologie.....	29
Echantillonnage.....	30
Oligochètes tubificidés.....	32
Biologie et écologie .....	32



Intérêts en Ecotoxicologie.....	34
Echantillonnage.....	35
<i>Corbicula fluminea</i> .....	36
Ecologie et répartition géographique .....	36
Anatomie et biologie.....	37
Intérêts en Ecotoxicologie.....	38
Echantillonnage.....	39
<b>II.A.2. Les dispositifs expérimentaux .....</b>	<b>40</b>
II.A.2.1. Montages expérimentaux .....	40
II.A.2.2. Suivi des paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau .....	40
<b>II.A.3. Sources et facteurs de contamination, contrôles des conditions d'exposition.....</b>	<b>41</b>
II.A.3.1. Contamination par la colonne d'eau .....	41
II.A.3.2. Contamination par le sédiment.....	41
II.A.3.3. Contrôle des conditions d'exposition.....	42
<b>II.A.4. Plans d'expérience et traitement statistique des données .....</b>	<b>42</b>
II.A.4.1. Plans factoriels d'expérience .....	42
II.A.4.2. Analyses statistiques .....	43
<b>II.B. Les outils méthodologiques .....</b>	<b>44</b>
<b>II.B.1. Analyses géochimiques.....</b>	<b>44</b>
II.B.1.1. Microélectrodes polarographiques .....	44
Fabrication des microélectrodes polarographiques .....	44
Acquisition des données.....	45
II.B.1.2. Carottage et échantillonnage des eaux interstitielles et des phases particulières.....	46
II.B.1.3. Granulométrie.....	47
II.B.1.4. Carbone organique particulaire .....	47
<b>II.B.2. Mesure des métaux-traces.....</b>	<b>48</b>
II.B.2.1. Préparation des échantillons.....	48
II.B.2.2. Dosages des métaux-traces.....	48
Dosage du cadmium .....	48
Dosage du zinc .....	48
Echantillons certifiés .....	48
Dosages multi-élémentaires par ICP-MS .....	49
Technique de dosage.....	49
Procédure pour l'attaque totale des MES : mise en solution des métaux .....	50
<b>II.B.3. Localisation des métaux à l'échelle tissulaire par autométallographie.....</b>	<b>51</b>
II.B.3.1. Présentation de la technique .....	51
II.B.3.2. Application à la localisation du Cd chez les tubificidés .....	52



II.B.4. Etude de la bioturbation.....	53
II.B.4.1. Les traceurs particuliers fluorescents.....	53
II.B.4.2. Modélisation.....	54
II.B.4.3. La radioscopie RX.....	55
II.B.5. Mesure de l'activité valvaire de <i>Corbicula fluminea</i> par valvométrie.....	56
<b>Partie III. Résultats et Discussions .....</b>	<b>58</b>
<b>III.A. Etude de la bioturbation induite par les stades larvaires d'<i>Hexagenia rigida</i> ou par les tubificidés .....</b>	<b>60</b>
III.A.1 Larves d' <i>Hexagenia rigida</i> .....	61
III.A.1.1. Caractérisation et quantification de l'activité de bioturbation des larves d' <i>Hexagenia rigida</i> .....	61
Protocole expérimental.....	61
Résultats et discussion.....	62
III.A.1.2. La turbidité, un indice indirect de l'activité de bioturbation des larves d' <i>Hexagenia rigida</i> .....	64
III.A.1.3. Analyse radioscopique des galeries des larves d' <i>Hexagenia rigida</i> .....	66
Protocole expérimental.....	66
Résultats et discussion.....	66
III.A.2. Tubificidés .....	68
III.A.2.1. Caractérisation et quantification de l'activité de bioturbation d'une population de tubificidés ...	68
Protocole expérimental.....	68
Résultats et discussion.....	69
III.A.2.2. La turbidité générée par l'activité des tubificidés.....	71
III.A.2.3. Analyse radioscopique et granulométrique du reclassement du sédiment réalisé par les tubificidés sur le sédiment de Cajarc et évolution de la teneur en eau.....	73
Matériels et méthodes.....	74
Résultats .....	76
Discussion .....	78
Conclusion.....	83
<b>III.B. Influence de la bioturbation sur les flux métalliques de la colonne d'eau vers le compartiment sédimentaire. Biodisponibilité des métaux .....</b>	<b>85</b>
III.B.1. Effets des tubificidés sur les transferts et la distribution du cadmium dans les sédiments, à partir de la source de contamination "colonne d'eau" .....	86
Abstract .....	86
1. Introduction .....	86
2. Material and methods .....	88
3. Results .....	92





4. Discussion .....	95
5. Conclusion .....	100
References .....	102
Complément à cette étude : détails sur les profils d'oxygène déterminés à l'aide des micro-électrodes...	104
<b>III.B.2. Bioaccumulation du cadmium dans les tubificidés à partir de la source de contamination "colonne d'eau" et effets sur l'activité de bioturbation .....</b>	<b>105</b>
Abstract .....	105
1. Introduction .....	106
2. Material and methods .....	107
3. Results .....	111
4. Discussion .....	114
5. Conclusion .....	119
References .....	120
<b>III.C. Influence de la bioturbation sur les flux métalliques d'un sédiment contaminé vers la colonne d'eau. Biodisponibilité des métaux .....</b>	<b>123</b>
III.C.1. Larves d' <i>Hexagenia rigida</i> en tant que source de bioturbation : effets sur les transferts de cadmium et de zinc à partir de la source "sédiment" et sur la biodisponibilité des métaux à l'égard de bivalves benthiques ( <i>Corbicula fluminea</i> ) .....	123
Abstract .....	123
Introduction .....	124
Materials and methods .....	125
Results .....	128
Discussion .....	130
Conclusion .....	135
References .....	136
Complément à cette étude : bioaccumulation du cadmium dans les larves d' <i>Hexagenia rigida</i> à partir de la source sédiment .....	139
III.C.2. Tubificidés en tant que source de bioturbation : effets sur les transferts des métaux à partir de la source "sédiment" et sur leur biodisponibilité à l'égard de bivalves benthiques ( <i>Corbicula fluminea</i> ) .....	140
III.C.2.1. Impact de la bioturbation sur les transferts du cadmium .....	140
III.C.2.1.1. Effets des tubificidés sur le relargage du cadmium présent dans le sédiment de Cajarc et sur sa bioaccumulation par le bivalve benthique <i>Corbicula fluminea</i> .....	140
Matériels et méthodes .....	141
Résultats et discussion .....	143
III.C.2.1.2. Effet de la présence des tubificidés sur le transfert du cadmium entre le sédiment de Cajarc et la colonne d'eau : étude de la relation "activité ventilatoire/bioaccumulation" chez le bivalve <i>Corbicula fluminea</i> .....	152



Matériels et méthodes .....	153
Résultats et discussion .....	154
III.C.2.2. Transferts de neuf autres métaux présents dans le sédiment de Cajarc .....	159
<b>Partie VI : Synthèse générale et Perspectives.....</b>	<b>165</b>
Etude de la bioturbation .....	167
Structures biogènes .....	167
Bioturbation et transport du sédiment.....	168
Conséquences en terme de granoclassement, de profils verticaux de l'oxygène dissous et de turbidité au sein de la colonne d'eau.....	170
Impact de la bioturbation sur le devenir des métaux présents dans le compartiment sédimentaire ..	173
Transfert du cadmium du sédiment vers la colonne d'eau .....	173
Biodisponibilité du cadmium transféré vers la colonne d'eau à l'égard du bivalve benthique <i>C. fluminea</i> .....	175
Bioaccumulation du cadmium par les larves d' <i>H. rigida</i> et par les tubificidés .....	176
Impact de la bioturbation sur les transferts métalliques à partir de la colonne d'eau .....	178
Transfert du cadmium de l'eau vers le sédiment .....	178
Bioaccumulation du cadmium et atteintes fonctionnelles sur les organismes .....	179
Perspectives de recherches .....	181
<b>Partie VII : Références bibliographiques .....</b>	<b>183</b>
<b>Partie VIII : Annexe.....</b>	<b>201</b>
D. Tran, P. Ciret, A. Ciutat, G. Durrieu and J-C. Massabuau. 2003. Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: application to cadmium. <i>Environmental Toxicology and Chemistry</i> 22: 914-920.	

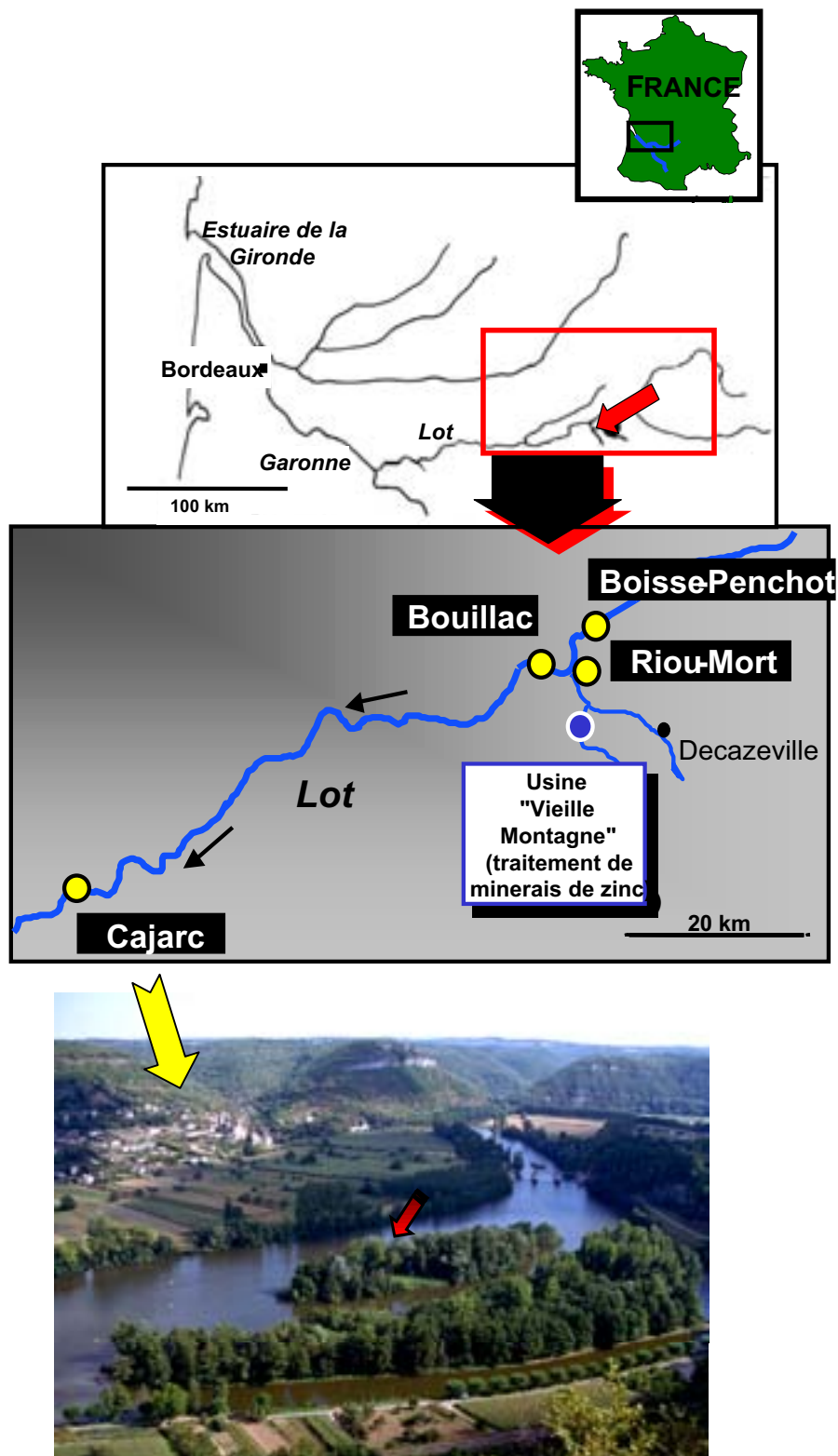


# **INTRODUCTION**



De grandes quantités de métaux sont rejetées par l'homme dans l'environnement. La plupart de ces métaux-traces sont toxiques pour les êtres vivants et, directement ou indirectement, pour les populations humaines. Les milieux aquatiques constituent un ensemble de réservoirs ou de réceptacles pour les métaux présents dans l'atmosphère (dépôts secs ou humides) et surtout au niveau des bassins versants, à partir des apports d'origine industrielle, agricole et urbaine. Les écosystèmes aquatiques continentaux, plus précisément les cours d'eau, représentent une étape de transit avant le milieu marin, qui est, à l'échelle de l'écosphère, le principal réservoir terminal de stockage des polluants métalliques. Dans les écosystèmes aquatiques, les métaux sont présents dans tous les compartiments : la colonne d'eau, les sédiments et les organismes, dans lesquels ils s'accumulent en concentrations parfois très élevées. La quasi-totalité des études menées *in situ* révèlent le rôle primordial des sédiments dans le cycle biogéochimique des métaux : d'une part, ils constituent des sites privilégiés pour l'accumulation de ces éléments, *via* les dépôts des matières en suspension, ces dernières se comportant comme de véritables "pièges" au sein de la colonne d'eau ; d'autre part, suite à des perturbations d'origine naturelle et le plus souvent anthropique, ils peuvent se comporter comme des sources endogènes de contamination, avec des modifications parfois très importantes de la spéciation chimique des métaux, modifiant ainsi leur biodisponibilité. Il est donc très important d'étudier le devenir des métaux dans ces différents compartiments abiotiques et biotiques et de définir les mécanismes qui conditionnent leurs transferts, leurs capacités de bioaccumulation et, *in fine*, leurs effets toxiques sur les différents niveaux biologiques d'intégration.

Notre programme de recherche a été centré sur l'étude des transferts de deux métaux – le cadmium (Cd) et le zinc (Zn) - à travers l'interface "eau-sédiment", et plus particulièrement sur l'influence de la bioturbation, résultant de la présence et de l'activité des organismes vivant à la surface et dans les strates superficielles des sédiments. Nous avons privilégié une approche expérimentale, à l'échelle du laboratoire, en recherchant un compromis entre d'une part, la représentativité des modèles utilisés par rapport à la complexité et à la diversité des processus se déroulant en conditions naturelles, et, d'autre part, le contrôle des principaux facteurs mis en jeu. Nos recherches ont été initiées et développées dans un contexte résolument pluridisciplinaire, afin de bénéficier des moyens d'investigation et de la complémentarité d'un nombre important de techniques mises en œuvre conjointement pour analyser l'impact de la bioturbation sur les flux métalliques. Ainsi, nos travaux ont été menés



**Figure I.1.** Localisation de la retenue hydroélectrique de Cajarc, sur la rivière Lot, en aval des rejets poly-métalliques d'origine industrielle, au niveau du site de Vieille Montagne, sur le Riou-Mort.



en étroite collaboration avec deux composantes de l'UMR CNRS 5805/EPOC, Université Bordeaux 1 – le LEESA (Laboratoire d'Ecophysiologie et Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques) et le DGO (Département de Géologie et Océanographie) - et le Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes (FRE CNRS-UPS 2630) de l'Université Toulouse III.

Nos approches expérimentales ont reposé sur la conception et la mise en place de microcosmes, associant un biotope mixte "colonne d'eau-sédiment" et une composante biologique mono ou pluri-spécifique. Les sédiments utilisés ont été systématiquement collectés en milieu naturel, le long du *continuum* "Lot/Garonne/Estuaire de la Gironde", qui constitue un site-atelier dans le cadre des Programmes de recherche du GIS-ECOBAG<sup>1</sup>. La rivière Lot, qui prend sa source dans le Sud du Massif Central, subit une pollution polymétallique d'origine industrielle (Usine Vieille Montagne, à proximité de Decazeville, Aveyron – traitement de minerais de zinc), depuis la fin du 19<sup>ème</sup> siècle. De très importants rejets de cadmium et de zinc sont associés à d'autres éléments nettement moins abondants, comme le cuivre ou le mercure par exemple. Un petit affluent du Lot, le Riou-Mort, est à l'origine des apports métalliques dans le réseau hydrographique de la Garonne et, environ 400 kilomètres en aval, dans l'estuaire de la Gironde (Figure 1). Soulignons que cette pollution pose actuellement d'importants problèmes socio-économiques dans la zone estuarienne et au niveau du bassin de Marennes-Oléron, eu égard à la norme européenne de consommation des bivalves (huîtres, moules, coques, palourdes, ...) qui a été divisée par un facteur 2 au printemps 2002, passant de 10 à 5 mgCd/kg de corps mou (poids sec). Depuis 1995, la zone aval de l'estuaire de la Gironde a été classée en zone "D" au regard des normes conchylicoles ; cet arrêté a conduit à une interdiction de récolte des bivalves, à des fins de consommation humaine, de reparcage ou de purification. La problématique "cadmium" occupe actuellement une grande importance pour les Services de l'Etat en charge de la gestion de la qualité de l'Environnement, de la Santé publique mais également de l'Aménagement du Territoire (Agence de l'Eau Adour-Garonne, DRIRE, DIREN, DASS, ...). Parmi les questions prioritaires, conjointement à la limitation, voire à la suppression de la source de contamination au niveau du site industriel de Vieille Montagne, celle relative aux sédiments déposés le long du fleuve Lot revêt une grande importance. En effet, le cadmium et le zinc

---

<sup>1</sup> Le Groupement d'Intérêt Scientifique ECOBAG est un réseau d'environ 40 laboratoires, appartenant aux trois pôles universitaires de Bordeaux, Pau et Toulouse, au CNRS, à l'INRA et au Cemagref. Les travaux de recherche sont axés sur l'étude pluridisciplinaire des anthroposystèmes du Bassin Adour-Garonne (bassins versants et hydrosystèmes, incluant les deux estuaires de l'Adour et de la Garonne).



sont très rapidement complexés avec les matières en suspension (MES) présentes dans la colonne d'eau, ces dernières assurant plus de 90 % du transport métallique jusqu'à l'entrée de la Garonne dans l'estuaire de la Gironde. Le Lot ayant subi de nombreux aménagements à des fins de navigation et de production d'électricité, plus de 50 retenues et barrages ont été construits entre la zone amont et la confluence avec la Garonne ; ils représentent des sites importants de dépôt des MES, et donc de stockage des métaux associés à la phase particulaire. A titre d'exemple, le barrage hydro-électrique de Cajarc, situé environ 40 km à l'aval de la confluence "Lot/Riou-Mort", renferme plus de 25 tonnes de Cd et 1000 tonnes de Zn dans le compartiment sédimentaire [Lapaquellerie *et al.*,1995]. Le concept de "chemical bomb" élaboré par Lacerda et Salomons (1998) s'applique pleinement, avec actuellement un nombre très limité de connaissances sur le devenir des métaux ainsi séquestrés et sur les risques écotoxicologiques encourus, au niveau local mais aussi sur l'ensemble du bassin hydrographique en aval, incluant le réceptacle estuarien et la zone marine côtière.

Afin d'analyser le rôle des organismes en tant que source de bioturbation, deux modèles biologiques ont été sélectionnés pour étudier comparativement deux modes de perturbation des sédiments et, conjointement, d'impact sur les transferts des métaux : (i) les stades larvaires de l'éphémère *Hexagenia rigida*, qui creusent des galeries dans les strates superficielles des sédiments, assurent un courant d'eau à des fins respiratoires et se nourrissent par ingestion de la matière organique détritique ; (ii) des oligochètes Tubificidae, qui sont positionnés verticalement dans le sédiment, le prostomium en bas, assurant un transfert des sédiments ingérés depuis les couches réduites en profondeur jusqu'à la zone d'interface avec la colonne d'eau, *via* le dépôt des pelotes fécales. Dans certaines expériences, nous avons utilisé le bivalve benthique *Corbicula fluminea* en tant qu'indicateur de la biodisponibilité des métaux transférés dans la colonne d'eau à partir des sédiments : cette espèce vit enfouie dans le substrat et filtre d'importants volumes d'eau à l'interface "eau/sédiment" (fonctions respiratoire et nutritionnelle). Elle permet ainsi, grâce à de très fortes potentialités d'accumulation, de quantifier la part des métaux transférés dans l'eau et capables d'accéder et ensuite de traverser les différentes barrières biologiques séparant l'organisme de son milieu environnant (branchies, manteau, paroi du tractus digestif).

Ces différents supports expérimentaux, couplés à un ensemble de techniques complémentaires, nous ont permis d'analyser les transferts du cadmium et du zinc à partir des sources initiales de contamination "sédiment" ou "colonne d'eau" et de préciser les liens entre



les processus géochimiques, incluant le devenir des métaux, et les processus biologiques (activités de bioturbation, cinétiques de bioaccumulation, ...).

La première partie de ce mémoire présente une synthèse bibliographique relative au rôle des sédiments dans la distribution des métaux au sein des écosystèmes aquatiques continentaux et aux principales caractéristiques de la bioturbation et de ses conséquences sur la géochimie des sédiments et sur les interactions avec les métaux.

La deuxième partie est consacrée à la présentation des principales bases méthodologiques, complémentaires les unes des autres, utilisées au cours des différentes expériences.

Les résultats obtenus sont ensuite détaillés et discutés dans la troisième partie, sous forme de publications. Ils sont organisés autour de trois axes : le premier aborde la caractérisation de la bioturbation induite par les deux modèles biologiques utilisés (larves d'*H. rigida* et tubificidés), sans aborder les relations avec les métaux ; le deuxième est consacré à l'analyse de l'influence de la bioturbation sur les flux de métaux de la colonne d'eau vers le sédiment ; le troisième est relatif à l'influence de la bioturbation sur les flux inverses, du sédiment vers la colonne d'eau, et sur la biodisponibilité des métaux à l'égard des bivalves benthiques.

La quatrième partie du mémoire repose sur une synthèse des résultats provenant de l'ensemble des expériences mises en œuvre, afin de dégager les principales conclusions, d'examiner les possibilités d'extrapolation aux processus se déroulant en milieu naturel et de présenter les perspectives de recherche.

Les deux dernières parties regroupent les références bibliographiques et les annexes, dont une publication à laquelle nous avons participé, visant à analyser les potentialités de l'activité ventilatoire de *C. fluminea*, via des mesures en continu de valvométrie, à détecter la présence de produits toxiques dans l'eau [Tran *et al.*, 2003].



**PARTIE I**

**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**





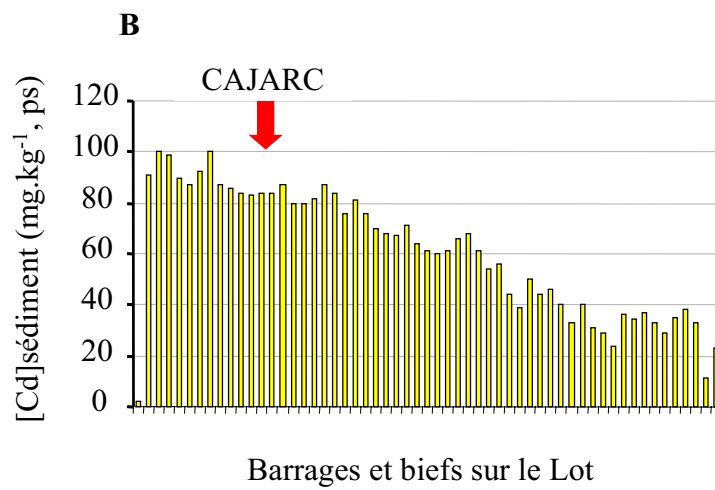
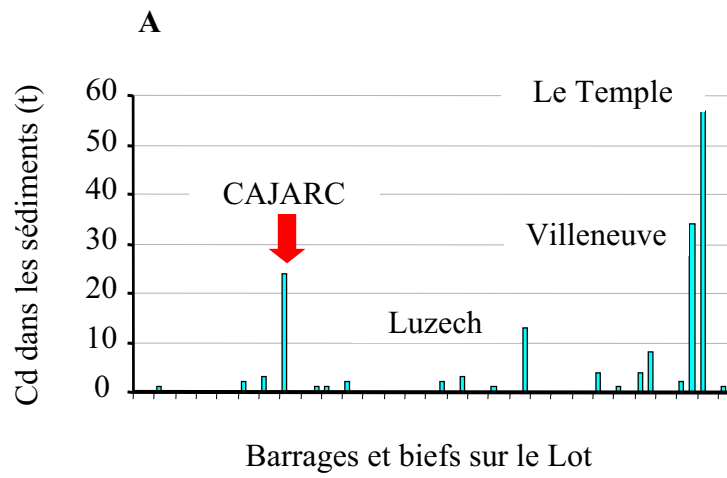
## **I.A. LE ROLE DES SEDIMENTS DANS LA DISTRIBUTION DES METAUX AU SEIN DES ECOSYSTEMES AQUATIQUES**

---

### **I.A.1. LES SEDIMENTS, DES RESERVOIRS DE STOCKAGE DES METAUX. EXEMPLE DU CADMIUM DANS LE *CONTINUUM* "LOT- GARONNE-ESTUAIRE DE LA GIRONDE"**

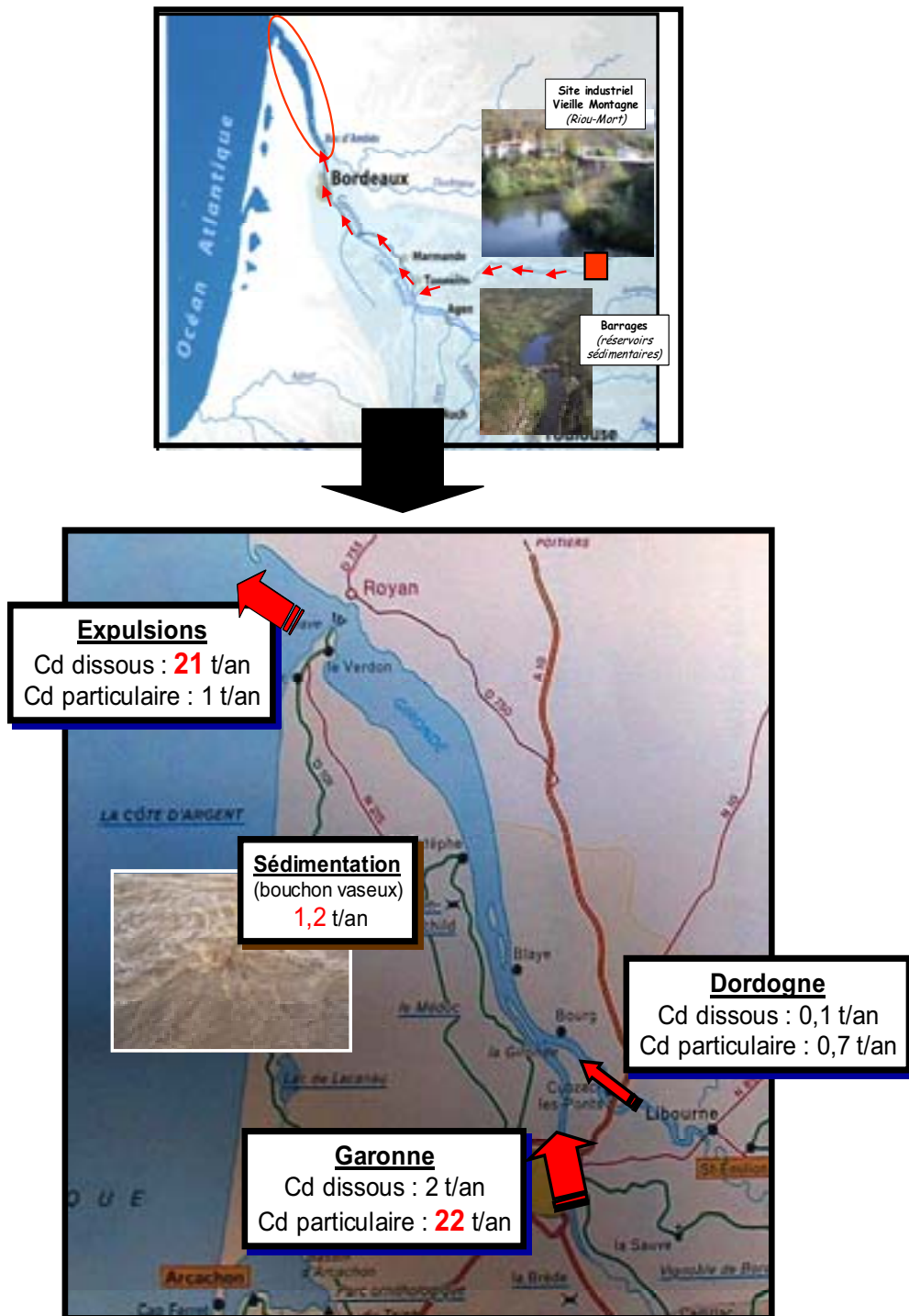
Les sédiments jouent un rôle clef dans les cycles biogéochimiques des métaux-traces à l'échelle des systèmes aquatiques. Ils constituent le réservoir de stockage le plus important pour les métaux d'origine naturelle et/ou anthropique. Leur entrée dans le compartiment sédimentaire se fait par diffusion directe depuis la colonne d'eau et/ou par précipitation, et surtout par la sédimentation des matières en suspension, qui sont des pièges pour les métaux *via* les réactions d'adsorption. Dans les écosystèmes lacustres, par exemple, les métaux accumulés dans les couches superficielles du sédiment peuvent représenter plus de 90 % de la teneur métallique totale estimée pour l'ensemble des compartiments abiotiques et biotiques [Luoma, 1989 ; Tessier et Campbell, 1988]. Selon l'ancienneté de la pollution, les sédiments peuvent se comporter comme une source ou comme un puit pour les métaux-traces [Soster *et al*, 1992]. La distribution des métaux dans les sédiments, les réactions de spéciation chimique et les capacités d'échanges sont le résultat d'un ensemble complexe de processus physiques, chimiques et biologiques, non encore complètement élucidés.

Le Sud-Ouest de la France est particulièrement concerné par ce problème de contamination métallique, puisque la rivière Lot subit depuis plus d'un siècle une pollution polymétallique d'origine industrielle. La Société "Vieille Montagne", spécialisée dans l'extraction et le traitement du minerai de zinc, est située à proximité de Decazeville (Aveyron), sur un petit affluent du Lot, le Riou-Mort. Installée depuis 1871, cette usine produisait du zinc à partir de minerais (calamine puis blende). Ces minerais contiennent environ 50 % de zinc, le reste étant constitué de cadmium, de plomb, d'argent et de soufre. L'extraction et la purification du zinc par électrolyse est réalisée en plusieurs étapes, qui conduisent à la fabrication d'acide sulfurique et à la formation de boues contenant les résidus métalliques non extraits [Jozereau, 1997]. Des techniques de traitement permettent de récupérer environ 50 % du Cd présent dans ces boues. L'augmentation de la production dans les années 60 a conduit à stocker les boues résiduelles dans un crassier, proche de l'usine.



**Figure I.2.** Stocks de cadmium (Cd) dans les sédiments en amont des barrages et des biefs sur la rivière Lot (d'après Blanc et al., 1999, modifié).

Une grande quantité de métaux a été rejetée dans le Riou-Mort et la rivière Lot, par l'intermédiaire des processus de lessivage et d'érosion, au niveau du bassin-versant. Parmi les nombreux métaux transportés vers l'aval, le zinc et le cadmium font l'objet d'une attention particulière en raison de leurs concentrations élevées, voire très élevées, conduisant aux fortes accumulations mesurées par l'intermédiaire du RNO (Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin) dans les huîtres "sauvages" colonisant les rives à l'aval de l'estuaire de la Gironde (stations de Bonne Anse, Pontailac, La Fosse). Les quantités de métaux arrivant dans l'estuaire sont contrôlées par les processus de stockage et de relargage en amont, et elles sont étroitement dépendantes des variations de débit [Blanc *et al.*, 1999]. Ainsi, plus de 200 tonnes de Cd et plusieurs dizaines de milliers de tonnes de Zn ont été accumulées au niveau des dépôts sédimentaires, en amont des barrages et retenues construits sur le Lot [Lapaquellerie *et al.*, 1995] (Figure I.2). Il est intéressant de mentionner que les estimations du flux annuel de Cd apporté par la Garonne dans l'estuaire indiquaient, au début des années 80, une valeur moyenne de 24 tonnes, 91 % de ce métal étant complexé avec les MES [Jouanneau *et al.*, 1990 ; Lapaquellerie *et al.*, 1995] ; parallèlement, le flux apporté par la Dordogne était très nettement inférieur, proche de 0,8 t/an. En aval de la Gironde, suite aux mécanismes géochimiques complexes qui se déroulent dans le gradient estuarien, notamment au niveau du "bouchon vaseux", 95 % du Cd se retrouve sous forme dissoute au-delà d'une salinité de 5 à 7 ‰ [Kraepiel *et al.*, 1997 ; Robert *et al.*, 2003] (Figure I.3). Les bivalves colonisant la zone aval de l'estuaire se trouvent ainsi face à une fraction métallique majoritairement biodisponible et ils présentent des très fortes concentrations en Cd, qui ont conduit, comme nous l'avons mentionné dans le chapitre introductif, à l'interdiction de leur production et de leur collecte (classement en catégorie "D"). Les données récentes obtenues par l'équipe de Géochimie du DGO, dirigée par G. Blanc, indiquent une diminution des flux métalliques, en relation directe avec les aménagements réalisés au niveau du site industriel de Vieille Montagne ; néanmoins, les apports au niveau de la source *via* le Riou-Mort sont encore supérieurs à 5 tonnes de Cd par an (6 t en 2000) et le flux moyen annuel estimé à l'aval de la Garonne (La Réole) est de 14 tonnes (Figure I.4) [Audry *et al.*, 2003 ; Blanc *et al.*, 2003]. Dans ce bilan des flux métalliques, les réservoirs sédimentaires jouent un rôle important (déstockage : 5 t) et les mécanismes contrôlant les processus mis en jeu sont mal connus. Le *continuum* "Riou-Mort/Lot/Garonne/Estuaire de la Gironde" constitue un remarquable modèle de terrain pour analyser les processus géochimiques contrôlant les transferts des métaux et leurs liens avec les capacités de bioaccumulation par les espèces aquatiques. Notons que ce *continuum* fluvio-estuarien a été retenu en tant que site-atelier dans

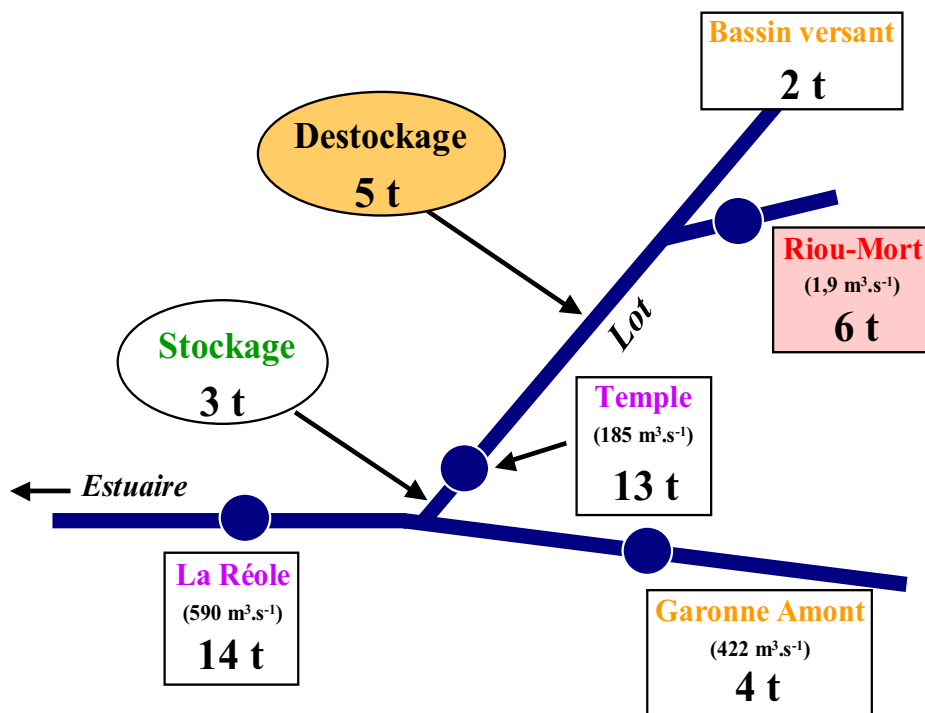


**Figure I.3.** Bilan de masse et flux de Cd dans la Gironde (d'après les données de l'IFREMER 1989 – citées par Bourg, 1992).

le cadre de la mise en place en 2002 par le GIS ECOBAG de la Zone Atelier "Adour-Garonne", en réponse à l'appel d'offres initié par le Programme "Environnement, Vie et Sociétés" du CNRS.

Le cadmium s'est révélé un métal toxique à haut risque suite à l'apparition, après la seconde guerre mondiale, de la maladie "Itaï-Itaï", dans le bassin du fleuve Jintsu, au Japon. Cette maladie invalidante et douloureuse était la conséquence d'une intoxication provoquée par l'ingestion de riz fortement contaminé par des rejets de Cd d'origine industrielle (usine de retraitement de minerai de zinc). L'absorption de Cd par la voie alimentaire a provoqué des atteintes au niveau du squelette (ostéoporose et pseudo-fractures osseuses) avec des difficultés de déplacement, ainsi que des dysfonctionnements du foie et des reins et des atteintes pulmonaires. Plusieurs études toxicologiques et épidémiologiques ont montré que le cadmium est également impliqué dans plusieurs types de cancers [Aldridge, 1996]. Les atteintes biochimiques après une exposition au Cd sont diverses : stress oxydant, peroxydations lipidiques, inhibition des transports ATP-dépendants, perturbations des fonctions mitochondriales et des enzymes cytosoliques en relation avec les propriétés thioloprives du métal, effets de compétition avec le calcium et le zinc, réactions apoptotiques, ... [Geret *et al.*, 2002 ; Roméo *et al.*, 2000]. Toutefois, plusieurs systèmes cellulaires de "défense" peuvent être mis en place pour minimiser, voire neutraliser, les effets toxiques du Cd : citons, par exemple, les métallothionéines (MTs), protéines cytosoliques riches en cystéine (30 % environ) dont la biosynthèse peut être induite en réponse à une entrée progressive du métal dans le cytosol, conduisant à une séquestration du Cd suivie dans certains cas par une élimination *via* la voie lysosomiale [Roesijadi et Robinson, 1994].

Le cadmium ( $Z = 48$  ; masse molaire = 112,41 g ; densité = 8,64 g.cm<sup>-3</sup>) est un métal qui fait partie du groupe II B de la classification périodique des éléments. Il occupe le 67<sup>ème</sup> rang d'abondance au sein de l'Ecosphère. Sa concentration moyenne estimée dans l'écorce terrestre est de 0,3 mg.kg<sup>-1</sup> ; elle est inférieure à 20 ng.L<sup>-1</sup> dans les océans et les eaux douces, en absence de contamination d'origine anthropique. Sa structure électronique conduit, par oxydation, à la formation de l'ion divalent Cd<sup>2+</sup>. A l'état naturel, le Cd est associé aux minerais de zinc ( $Z = 30$  ; masse molaire = 65,37 g). Il est utilisé dans différents traitements de surface, dans la galvanoplastie, dans la fabrication d'accumulateurs ou de batteries et de pigments. Mentionnons que des concentrations relativement élevées de Cd ont été mesurées dans le tabac et dans la fumée de cigarettes, en relation avec les capacités d'absorption racinaire du métal par cette plante cultivée et, à la différence avec la majorité des autres végétaux terrestres, de transfert vers les compartiments foliaires [Aldridge, 1996].



**Figure I.4.** Estimation des flux de cadmium le long du *continuum* "Riou-Mort/Lot/Garonne", en tonnes pour l'année 2000 (d'après Blanc et al., 2003).

Les chiffres entre parenthèse indiquent les débits moyens des cours d'eau.

Les rejets de Cd dans l'environnement sont essentiellement liés aux activités humaines, dans un rapport 7:1 [Wright et Welbourn, 1994]. En 1990, 21000 t de Cd ont été produites au niveau mondial, moins de 5 % du métal utilisé par l'industrie étant recyclé [Cossa et Lassus, 1989 ; Wright et Welbourn, 1994].

Dans les eaux naturelles, le Cd peut être présent sous forme dissoute, colloïdale et particulaire. La distinction entre ces trois formes est relativement arbitraire et se fait en fonction de la taille des particules. Plusieurs facteurs physico-chimiques et biologiques contrôlent le passage d'une forme à l'autre. En eau douce, le Cd dissous se trouve principalement sous forme de l'ion libre  $\text{Cd}^{2+}$ , avec, selon les conditions physico-chimiques du milieu, la présence d'autres espèces neutres ou chargées :  $\text{CdCl}^+$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{CdHCO}_3^+$ ,  $\text{CdCO}_3$ , ... Notons que l'ion libre  $\text{Cd}^{2+}$  est considérée comme la plus biodisponible pour de nombreuses espèces aquatiques, compte-tenu des mécanismes de transport du métal au travers des membranes cellulaires par l'intermédiaire de transporteurs (canaux calciques potentiel-dépendants, DMT1<sup>2</sup>) [Andrews, 1999 ; Fleming *et al.*, 1998 ; Foster et Morel, 1982 ; Morel et Henrig, 1993]. En milieu estuarien et marin, les chlorocomplexes sont dominants<sup>3</sup> :  $\text{CdCl}^+$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{CdCl}_3^-$  et  $\text{CdCl}_4^{2-}$ . Comme le montre le diagramme thermodynamique de la Figure I.5, quelles que soient les conditions de salinité, le Cd est toujours présent sous forme d'un mélange d'espèces chimiques, avec une abondance relative de l'ion libre comprise entre 10 et 100 %. A ce niveau, la spéciation chimique du Cd en solution diffère notablement de celle du mercure inorganique (HgII), pour lequel l'ion libre  $\text{Hg}^{2+}$  est inexistant, hormis pour des conditions de pH inférieures à 2 [Morel et Kraepiel, 1998].

## I.A.2. GEOCHIMIE DES SEDIMENTS DE SURFACE

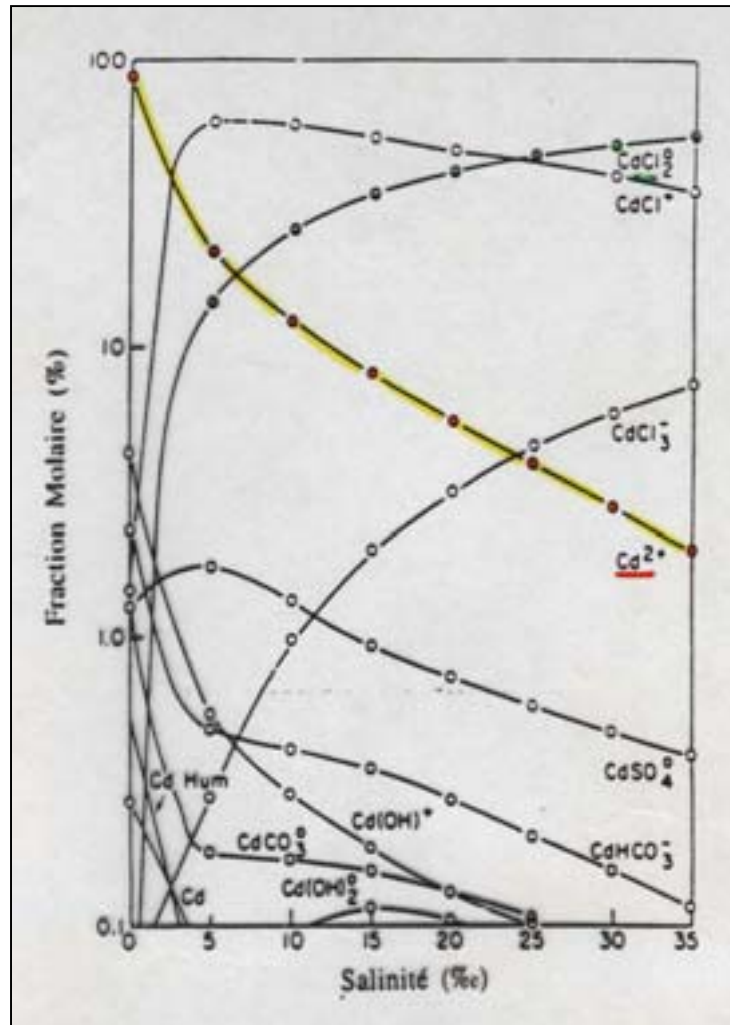
### I.A.2.1. Séquence de réactions lors de la diagenèse précoce

Le terme de diagenèse désigne l'ensemble des processus physiques, chimiques et biologiques qui transforment un sédiment en roche sédimentaire. Ces processus débutent dès le dépôt des particules et se poursuivent au cours de leur enfouissement. La diagenèse précoce correspond aux transformations qui se déroulent au cours de l'enfouissement, à des

---

<sup>2</sup> DMT1 : "divalent metal transporter" 1, impliqué dans le transport par diffusion facilitée de nombreux cations métalliques (Zn, Fe, Mn, Co, Ni, Pb, Cu, Cd).

<sup>3</sup> Le gradient de salinité au niveau de l'estuaire de la Gironde joue un rôle prépondérant au regard du passage du Cd de la forme particulaire, dominante dans la zone aval de la Garonne, à la forme dissoute, majoritaire au-delà d'une salinité de 5 à 7 pour mille en moyenne [Robert *et al.*, 2003].

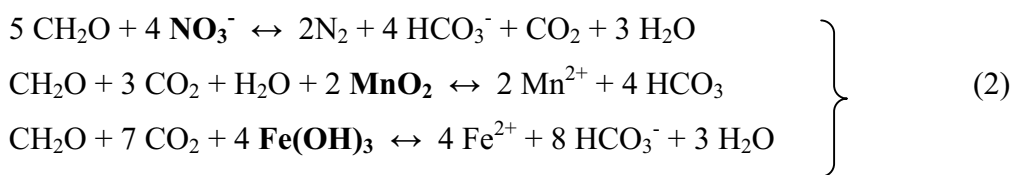


**Figure I.5.** Diagramme de spéciation chimique du cadmium en solution, en fonction de la salinité (pH = 8.0).



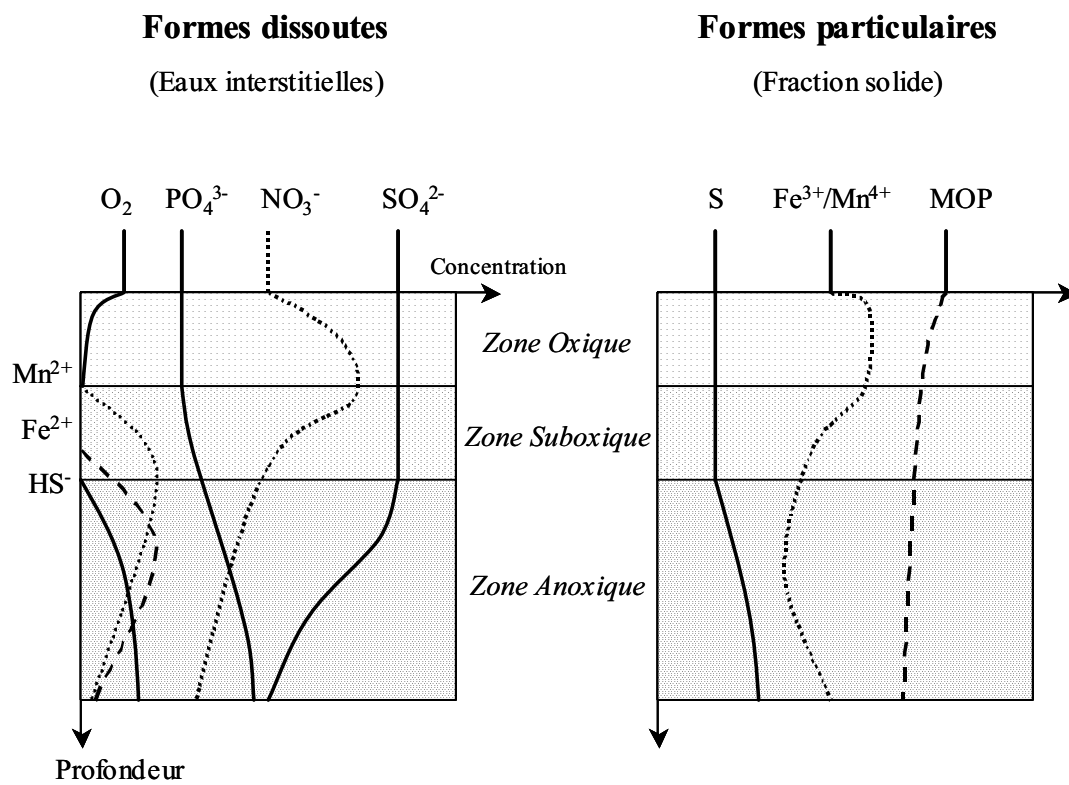
températures peu élevées (près de la surface) et dans des sédiments dont les pores sont remplis d'eau interstitielle [Berner, 1980]. Les transformations diagénétiques varient d'un environnement sédimentaire à un autre et se traduisent par des transferts de matière à l'interface "eau-sédiment" ainsi qu'entre les phases solides et dissoutes constitutives des sédiments.

Les principales réactions chimiques qui se produisent lors de la diagenèse précoce sont schématisées sur la Figure I.6. A l'interface arrivent une fraction oxydée et une fraction réduite : la fraction réduite est constituée essentiellement par de la matière organique particulaire ; la fraction oxydée est principalement représentée par l'oxygène, les nitrates et les sulfates, qui sont à l'interface sous forme dissoute, et par les oxydes et hydroxydes de manganèse et de fer. Ces composés oxydés serviront d'accepteurs d'électrons lors de la dégradation de la matière organique par les bactéries (processus de minéralisation). L'ordre d'utilisation de ces oxydants est déterminé par l'énergie libre libérée lors des réactions d'oxydation, les agents oxydants les plus énergétiques étant utilisés en premier. Ceci explique la séquence verticale des réactions d'oxydo-réduction sous l'interface "eau-sédiment". D'après les données thermodynamiques, il y a tout d'abord réduction de l'oxygène en sub-surface (et formation de nitrate = nitrification), suivie, en profondeur, par la réduction des nitrates (dénitrification), des oxydes de manganèse, des oxydes de fer, des sulfates, puis du CO<sub>2</sub> (méthanogenèse) [Froelich *et al*, 1979]. Si, pour simplifier, le sucrose est retenu en tant que constituant modèle de la matière organique, cette suite de réactions peut être schématisée de la façon suivante [Berner, 1980 ; Gonzalez, 1992] :



Le compartiment sédimentaire peut ainsi être découpé verticalement en trois zones :

- une zone oxique, où l'oxygène peut être consommé par la respiration des organismes benthiques, pour l'oxydation de la matière organique (1) et la nitrification de l'ammonium ;



**Figure I.6.** Représentation schématique des principales réactions chimiques d'origine diagénétique (d'après Froelich et al., 1979 ; Berner, 1980).

MOP : Matière organique particulaire

- une zone sub-oxique, juste sous la zone oxique et dans laquelle il n'y a plus d'oxygène. Ce sont les nitrates, les oxydes et hydroxydes de fer et de manganèse qui sont utilisés comme oxydants (2) ;

- une zone anoxique plus profonde, dans laquelle il n'y a plus ni oxygène, ni nitrates, ni oxydes métalliques réactifs. Ce sont les sulfates qui sont utilisés pour oxyder la matière organique. Leur réduction conduit à la formation de sulfures (3). En dessous de la zone de réduction des sulfates, le CO<sub>2</sub> est utilisé comme oxydant de la matière organique, au cours de la méthanogénèse (4).

Les composés qui intègrent le sédiment vont passer progressivement d'une zone à une autre, au cours de leur enfouissement. Cependant, dans certains sédiments, cette zonation verticale ne s'applique pas nécessairement et la position des composés oxydés et réduits peut être très perturbée, par exemple en raison de la bioturbation par la faune benthique, qui assure un mélange des couches sédimentaires.

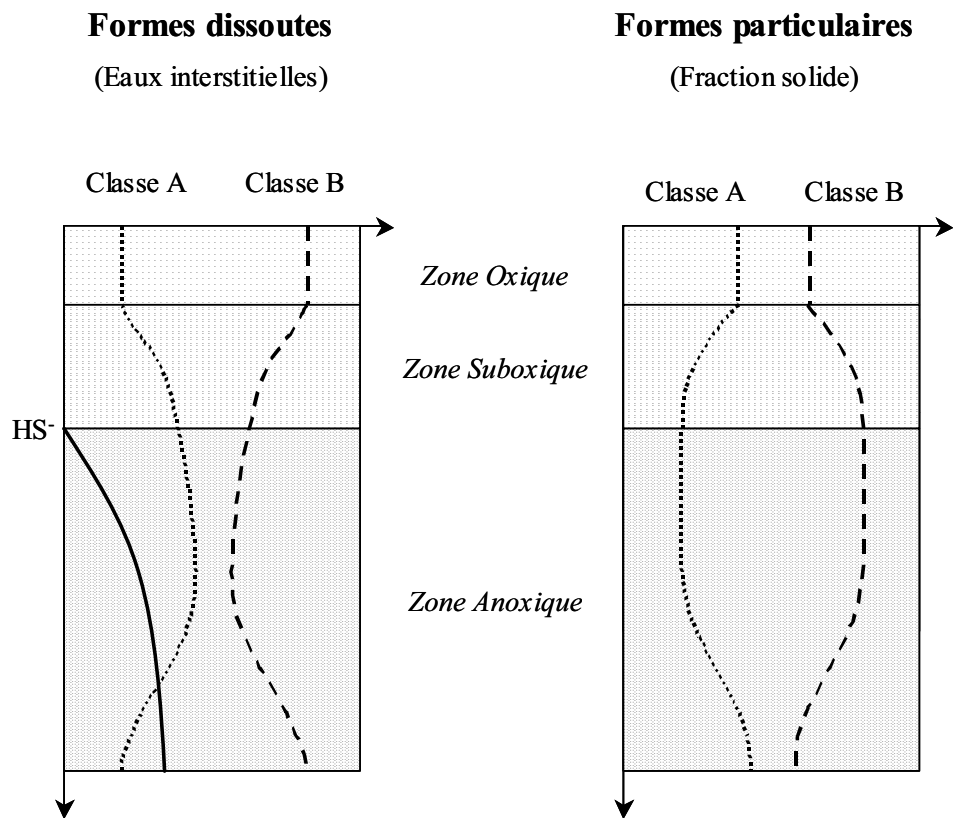
### **I.A.2.2. Comportement diagénétique des métaux dans les sédiments**

Le comportement diagénétique d'un élément est fonction de ses propriétés physico-chimiques. Les éléments métalliques parviennent à l'interface "eau-sédiment" principalement associés à des phases solides (MES) de natures différentes. Dans les matières en suspension et dans les sédiments, plusieurs types d'association existent entre les métaux et les particules [Forstner et Wittman, 1981 ; Campbell *et al.* 1988]. Les métaux peuvent être :

- intégrés dans la structure cristalline de minéraux détritiques ou biogénétiques
- associés à la fraction organique (pelotes fécales, débris d'organismes animaux ou végétaux, ...)
- précipités ou co-précipités avec différentes espèces minérales (carbonates, phosphates, oxydes et hydroxydes de fer et de manganèse, sulfures, ...)
- adsorbés sur différentes phases (argiles, matière organique, oxydes et hydroxydes de fer et de manganèse, ...).

Les réactions diagénétiques vont entraîner des modifications de la phase géochimique du métal et/ou le faire passer en phase dissoute. D'après leur comportement en fonction des conditions oxique ou anoxique du sédiment, deux groupes de métaux sont distingués [Jacobs et Emerson, 1982 ] (Figure I.7) :

- les métaux de classe A, comme le fer ou le manganèse, qui sont stables sous forme d'oxydes et hydroxydes insolubles en présence d'oxygène et se solubilisent dans les



**Figure I.7.** Représentation schématique du comportement diagénétique des éléments métalliques dans les sédiments (d'après Jacobs et Emerson, 1985, modifié).

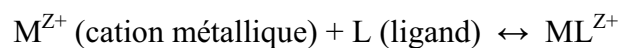
couches anoxiques, conduisant à la formation de cations divalents. A saturation et en conditions très réductrices, ils peuvent précipiter avec des sulfures (MnS, FeS) ou des carbonates (MnCO<sub>3</sub>) ;

- les métaux de classe B, comme le cadmium et le zinc, qui sont solubles en milieu oxygène et précipitent sous forme de sulfures en milieu anoxique. Ils peuvent être associés aux différentes phases citées précédemment.

### **I.A.2.3. Réactions chimiques contrôlant le comportement diagénétique des métaux**

Différentes réactions chimiques vont contrôler le comportement diagénétique des métaux, en fonction des associations établies avec les différentes phases du sédiment :

- réactions de complexation/dissociation. Elles sont du type :



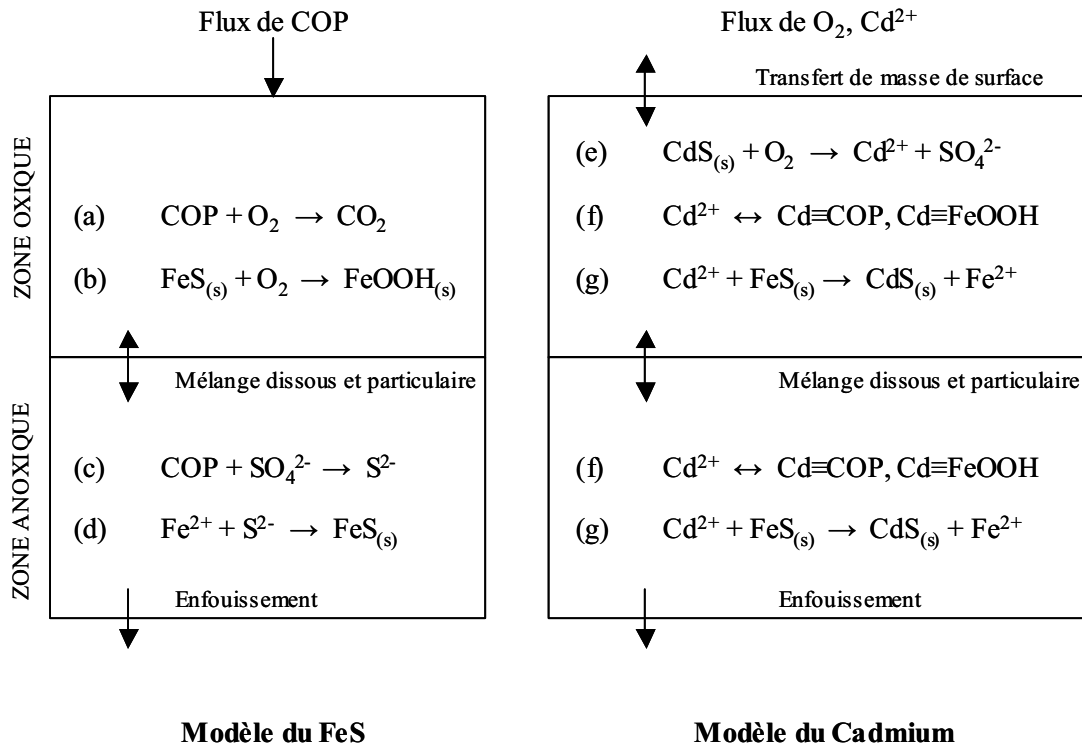
Les ligands peuvent être minéraux (OH<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, HS<sup>-</sup>) ou organiques (matière organique dissoute ou particulaire, vivante ou détritique) [Westerlund *et al.*, 1986]. Les métaux peuvent être liés aux carbonates.

- réactions d'oxydation/réduction. Elles sont abiotiques ou biotiques et concernent les métaux possédant plusieurs états d'oxydation (mercure par exemple).

- réactions d'adsorption/désorption. Elles constituent le mécanisme dominant dans les sédiments oxygènes. Les métaux s'adsorbent à la surface de particules de différentes natures (argiles, matière organique, oxydes et hydroxydes de fer et de manganèse en particulier, acides humiques...) [Campbell *et al.*, 1988 ; Tessier et Campbell, 1987, 1988].

- réactions de dissolution/précipitation. Dans les sédiments anoxiques, elles sont décrites comme contrôlant la répartition des métaux entre les phases dissoute et particulaire. Dans les eaux interstitielles des sédiments anoxiques, les métaux co-précipitent avec les sulfures comme FeS (qui donne sa couleur noire au sédiment anoxique) [Campbell *et al.*, 1988].

Dans la zone oxygène des sédiments marins ou d'eau douce, la biodisponibilité des métaux est principalement contrôlée par leur liaison avec le carbone organique et leur complexation avec les oxy-hydroxydes de manganèse et surtout de fer [Tessier *et al.*, 1993 ; Fu et Allen, 1992]. Dans les sédiments anoxiques, la biodisponibilité des cations divalents est contrôlée par leur liaison avec les sulfures volatiles extractibles à l'acide (AVS ou "Acid-Volatile Sulfides"), principalement constitués de monosulfures de fer (FeS) [Di Toro *et al.*, 1990], et



**Figure I.8.** Modèle schématique pour le sulfure de fer (FeS), le carbone organique particulaire (COP) et le cadmium (Cd<sup>2+</sup>). Le tableau de gauche illustre les processus affectant le COP et le FeS dans les zones oxiques puis anoxiques du sédiment : le flux de COP de la colonne d'eau dans le sédiment, le mélange de matériel dissous et particulaire entre les zones et l'enfouissement. Les réactions sont : oxydations du COP (a) et du FeS (b) dans la zone oxique ; production de sulfures par sulfato-réduction (c) et précipitation des sulfures formés (d) dans la zone anoxique. Le tableau de droite illustre l'oxydation des sulfures de cadmium (CdS) (e), l'adsorption du Cd sur le COP et les oxy-hydroxydes de fer (FeOOH) et le déplacement de la réaction (f). Les 2 dernières réactions se produisent en zone oxique et anoxique (d'après Di Toro et al., 1996, modifié).

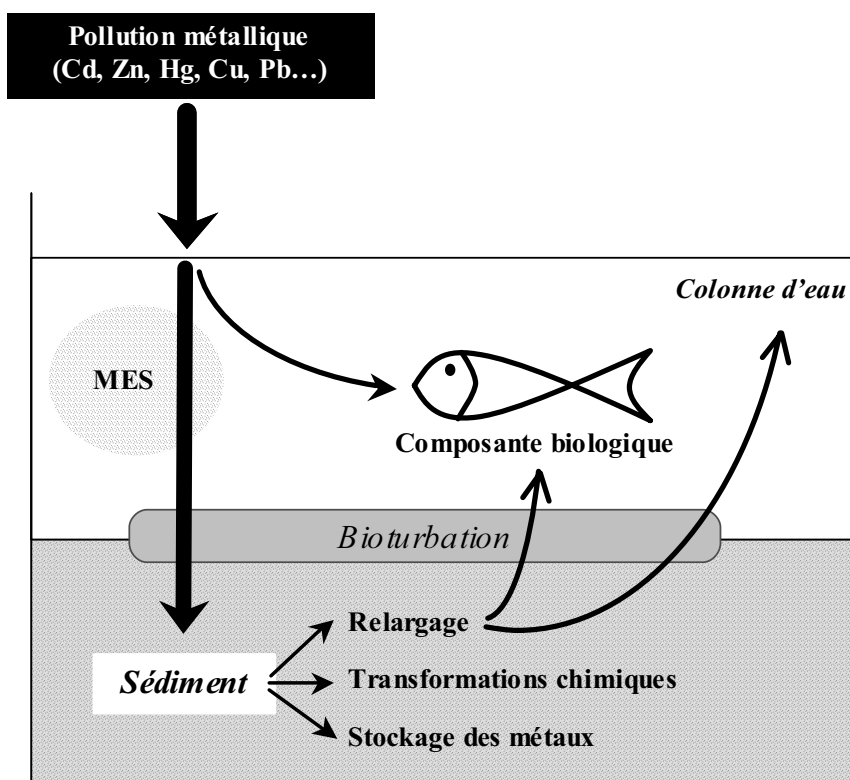
(s) = solide

par leur répartition sur la matière organique [Hansen *et al.*, 1996]. Les sulfures métalliques sont insolubles et la concentration en métaux dissous dans l'eau interstitielle est généralement très faible. Di Toro *et al.* (1990) ont proposé un modèle basé sur les AVS et la fraction des métaux simultanément extraite par le traitement à l'acide (SEM ou "Simultaneously Extracted Metals"), pour expliquer la toxicité du cadmium à l'égard d'espèces benthiques et pélagiques, à partir des sédiments marins et d'eau douce. La Figure I.8 illustre les équilibres entre la matière organique, le cadmium, les sulfures et le fer, qui ont lieu dans les zones oxiques et anoxiques du sédiment. Les sulfures sont produits lors de la diagenèse, par les bactéries sulfato-réductrices qui utilisent le sulfate comme accepteur d'électrons pour oxyder le carbone organique particulaire.

La prise en compte simultanée des AVS et de la fraction "SEM", pour un sédiment donné, permet une estimation de la toxicité du sédiment [Di Toro *et al.*, 1992 et 1996 ; Allen *et al.*, 1993]. Lorsque la concentration en soufre des AVS est supérieure à celle des métaux des SEM ( $SEM/AVS \leq 1$ ), la concentration en métaux dans l'eau interstitielle est très faible ; les métaux sont très peu biodisponibles et donc pas ou très peu toxiques. Lorsque le rapport "SEM/AVS"  $> 1$ , les métaux peuvent exister à l'état dissous dans l'eau interstitielle et exercer une toxicité, qui est d'autant plus marquée que le rapport est élevé [Di Toro *et al.*, 1990 et 1992]. Dans certains cas cependant, même si ce rapport est supérieur à 1, la toxicité n'est pas observée parce que le  $Cd^{2+}$  est lié à du carbone organique [Mahony *et al.*, 1996] ou parce que la concentration du  $Cd^{2+}$  disponible est faible et les organismes étudiés assez résistants [Hare *et al.*, 1994].

### **I.A.3. IMPORTANCE DE LA BIOTURBATION DANS LES FLUX METALLIQUES**

Les sédiments peuvent accumuler des métaux en grande quantité. Ils se comportent donc comme un "puit", un réservoir de stockage pour les éléments introduits naturellement ou artificiellement, mais ce stockage n'est pas toujours définitif (Figure I.9). Les sédiments peuvent en effet constituer une source endogène de contamination pour les écosystèmes aquatiques. Rappelons à ce niveau le concept de "chemical bomb", utilisé pour souligner le risque écotoxicologique généré par ces stocks métalliques et que nous avons évoqué dans le chapitre introductif de ce mémoire [Lacerda et Salomons, 1998]. Plusieurs processus peuvent



**Figure I.9.** Importance des sédiments en Ecotoxicologie aquatique.

MES : Matières en suspension



être à l'origine de transferts directs ou indirects des métaux stockés dans les sédiments vers le reste de l'écosystème :

- les métaux peuvent diffuser depuis l'eau interstitielle des sédiments vers la colonne d'eau, en fonction de leur gradient de concentration ;

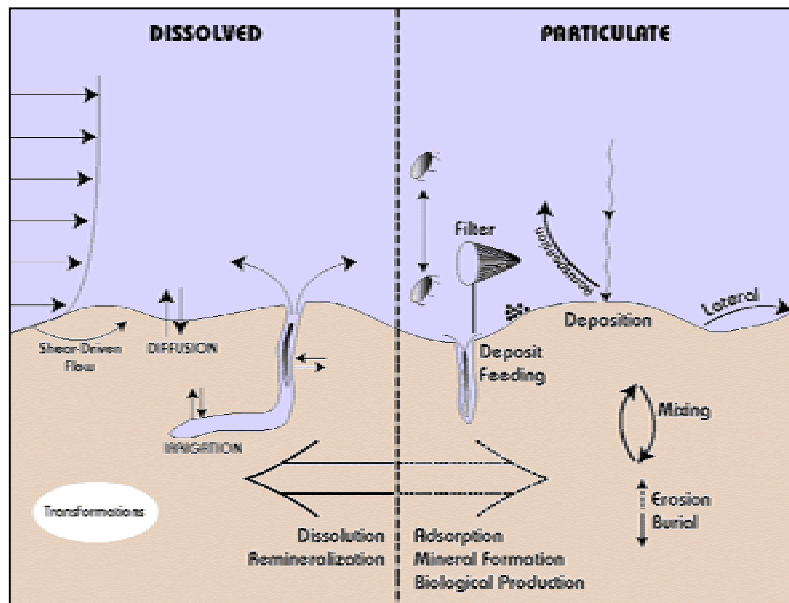
- des brassages mécaniques, d'origine naturelle (crues par exemple) et/ou anthropique (lâchers de barrage, dragages, ...), peuvent entraîner la remise en suspension des particules sédimentaires et des métaux associés [Krantzberg, 1985] ;

- les organismes benthiques peuvent accumuler les métaux et les transférer, en tant que proies contaminées, vers les réseaux trophiques benthiques et pélagiques ;

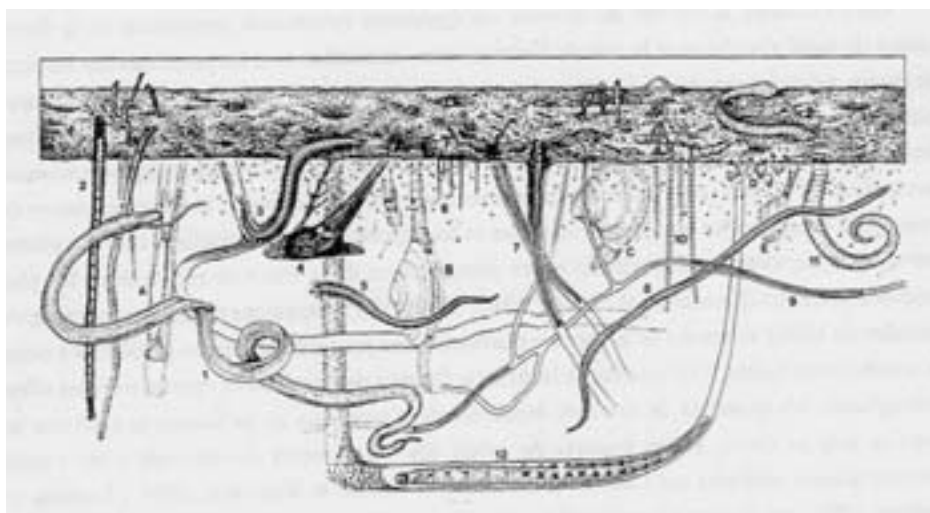
- la bioturbation peut également conduire au relargage des métaux stockés dans les sédiments, sous forme de particules remises en suspension ou de transferts liés aux modifications des conditions physico-chimiques.

La bioturbation induit un ensemble de perturbations physiques et chimiques des sédiments, qui peuvent modifier la distribution des métaux au sein de la colonne sédimentaire, leur répartition entre les phases solide et dissoute et la spéciation chimique de ces métaux au sein des eaux interstitielles [Peterson *et al.*, 1996 ; Ciarelli *et al.*, 1999 ; Vale et Sundby, 1998]. Les transferts des métaux entre les sédiments et la colonne d'eau peuvent être modifiés, et ceci dans les deux sens : de la colonne d'eau vers le sédiment [Rasmussen *et al.*, 2000 ; Wall *et al.*, 1996] et du sédiment vers la colonne d'eau [Petersen *et al.*, 1998].

Si de nombreuses recherches ont été menées sur les rôles des processus physiques et chimiques à l'égard des flux des métaux-traces entre les sédiments et l'eau surnageante, un nombre limité d'études a porté sur les effets directs et indirects de la bioturbation sur le stockage des métaux dans les sédiments et sur les processus de relargage. Cette carence est d'autant plus significative que la quasi-totalité des milieux benthiques d'eau douce sont colonisés par des communautés abondantes et variées de macro- et de micro-invertébrés. Nos objectifs de recherche s'inscrivent directement dans cette problématique, les approches expérimentales mises en œuvre visant à analyser les effets de la bioturbation, en conditions contrôlées, sur la géochimie des sédiments et sur les flux métalliques entre les compartiments "colonne d'eau" et "sédiments" et également vers les organismes (cinétiques de bioaccumulation).



**Figure I.10.** Processus biologiques et géochimiques et flux dissous et particulaires à l'interface "eau-sédiment".



**Figure I.11.** Diversité de la faune intra-sédimentaire dans les systèmes marins (d'après Ader et Loveland, 1991).

## I.B. LA BIOTURBATION

---

La bioturbation peut être définie comme le résultat de l'ensemble des activités de la macro- et micro-faune vivant à l'interface "eau-sédiment" ou dans les couches supérieures du sédiment [Rhoads, 1974 ; Matisoff *et al.*, 1985 ; Matisoff, 1995]. Elle est donc le produit des interactions entre les organismes et le substrat [Matisoff et Wang, 2000].

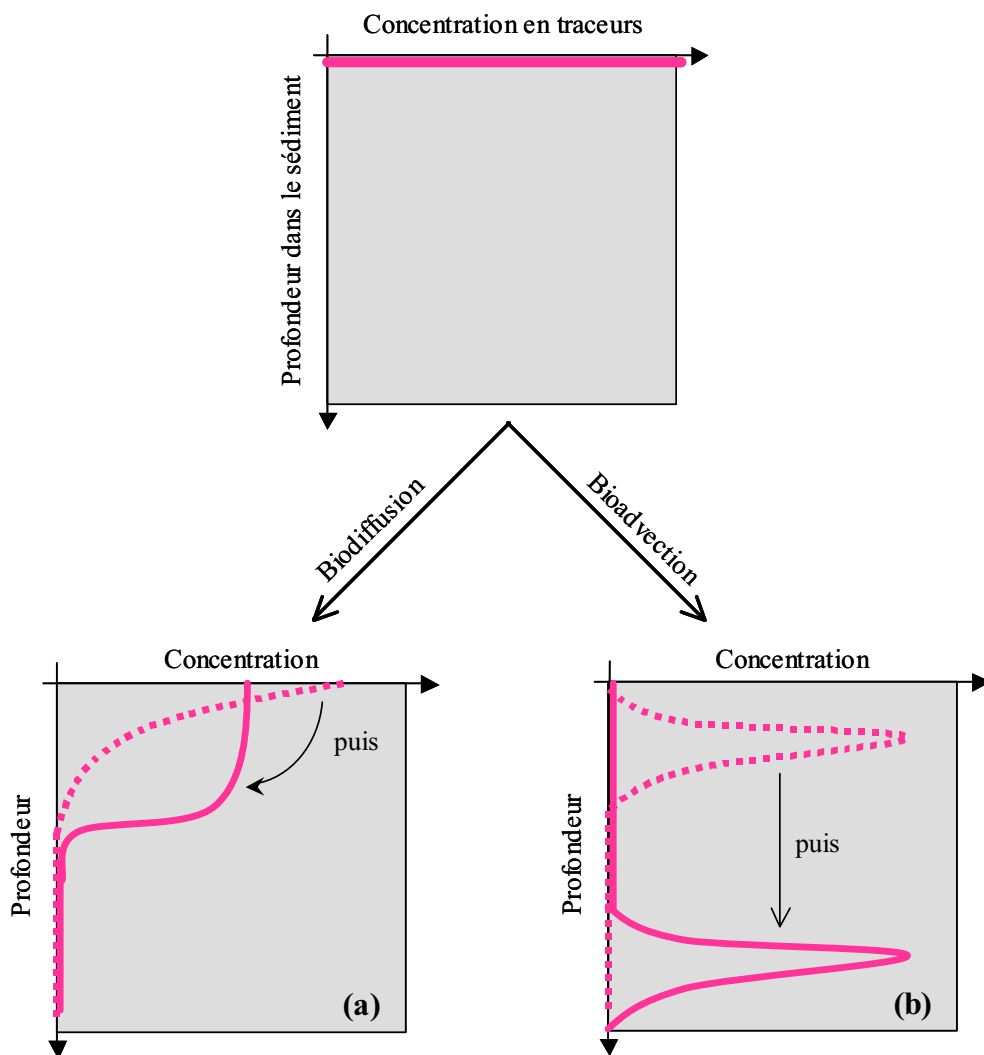
### I.B.1. LES DIFFERENTS TYPES DE BIOTURBATION

Sous le terme de bioturbation, il faut distinguer les mécanismes biologiques actifs et les conséquences de l'activité benthique sur les propriétés de l'interface "eau/sédiment". L'ensemble des mécanismes biologiques actifs (Figures I.10 et I.11) résulte de la présence et de l'activité des organismes dans le sédiment et se manifeste de différentes façons :

- creusement de galeries et de terriers, provisoires ou durables, à une ou plusieurs entrées et dont les parois sont de natures diverses : ils constituent les structures biogènes de la bioturbation ;
- formation de sillons ou de pistes créés par le déplacement des organismes à la surface ou à l'intérieur du sédiment ;
- ingestion de sédiment, la composante organique détritique constituant la base alimentaire pour de nombreuses espèces détritivores ;
- production de fécès à la surface ou à différents niveaux dans le sédiment ;
- circulation d'eau dans les galeries, afin d'assurer un apport d'oxygène aux organismes.

Toutes ces modifications sont corrélées à plusieurs paramètres auto-écologiques, comme le mode de nutrition des organismes, la profondeur de la zone d'ingestion, le degré de mobilité, la taille des individus, la densité des populations, la profondeur des terriers, ... [Rhoads et Boyer, 1982].

Le mode de bioturbation est principalement lié à l'éthologie des espèces, en particulier à leur mode de nutrition [Rhoads, 1974]. Les organismes benthiques peuvent être classés en quatre groupes trophiques : herbivores ; carnivores (se nourrissent d'animaux vivants ou morts) ; suspensivores (filtrent le seston) ; déposivores (consomment les particules organiques déposées sur ou dans le sédiment : déposivores de surface ou de sub-surface).



**Figure I.12.** Evolution avec le temps de la répartition d'une couche de traceurs particulières déposée à la surface du sédiment, en présence d'activités de bioturbation de type biodiffusion (a) ou bioadvection (b).

Les effets de la bioturbation sont classiquement décrits sous quatre formes principales : la biodiffusion, la bioadvection et la bioirrigation, suivie de la régénération :

- la biodiffusion est le résultat de l'activité d'organismes qui vivent dans les premiers centimètres du sédiment et s'y déplacent, en homogénéisant le substrat de façon mécanique et aléatoire. C'est le cas de beaucoup de bivalves benthiques, comme la palourde, ou des amphipodes. Ces bivalves sont appelés des "bulldozers" en raison de leur effet sur le sédiment. La conséquence de ce type de bioturbation sur une couche de traceurs déposés en surface est illustrée sur la Figure I.12.a.

- la bioadvection ou bioconvoyage est provoquée par des organismes qui ingèrent des particules sédimentaires en profondeur, dans la zone anoxique, et rejettent leurs pelotes fécales à la surface du sédiment. Le sédiment réduit se retrouve ainsi à l'interface "eau-sédiment", le plus souvent en milieu oxic, après avoir été transféré le long du tractus digestif des organismes pour ingérer une partie de la matière organique assimilable. Ce transport est donc orienté et induit un lien direct entre deux strates géochimiquement différentes [Fisher *et al.*, 1980]. Les organismes sont qualifiés de convoyeurs, comme les capitellidés et les maldanidés en milieu marin, ou les tubificidés en eau douce. Ce type de bioturbation est illustré sur la Figure I.12.b.

Outre ces convoyeurs vers le haut, il existe aussi des convoyeurs vers le bas qui ingèrent du sédiment de surface et déposent leurs pelotes fécales en profondeur, entraînant un transport de matériel sédimentaire vers le bas. C'est le cas, par exemple, de certains polychètes Nereidae.

- la bioirrigation est générée par certains organismes qui construisent des galeries ou des terriers dans le sédiment, qu'ils irriguent en générant un courant d'eau, à des fins respiratoire et nutritionnelle. Ce type de bioturbation peut se superposer à la biodiffusion ou à la bioadvection.

- lorsque les terriers sont abandonnés, ils vont progressivement se remplir de particules sédimentaires : ce phénomène porte le nom de régénération. Les larves d'insectes ont en général ce type d'action sur le sédiment : les larves de l'éphémère *Hexagenia rigida*, que nous avons retenu comme deuxième modèle de bioturbation, entrent dans cette catégorie.

Les conséquences directes de la bioturbation sont le mélange/brassage des particules sédimentaires et le transport de l'eau interstitielle et des solutés associés. Ces modifications engendrent de nombreuses conséquences indirectes sur les propriétés physico-chimiques et biologiques des sédiments et sur les flux de métaux à l'échelle des écosystèmes aquatiques.



## I.B.2. L'INFLUENCE DE LA BIOTURBATION SUR LES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES SEDIMENTS

De nombreuses études ont été réalisées en eau douce afin de quantifier la biodiffusion et la bioadvection. Robbins *et al.* (1979), Fisher *et al.* (1980), Mermillod-Blondin *et al.* (2002) Matisoff *et al.* (1999) et Matisoff et Wang (2000) ont mesuré expérimentalement des coefficients de biodiffusion et de bioadvection créés par différents organismes, ainsi que leurs zones d'ingestion, à l'aide de  $^{137}\text{Cs}$  ou de traceurs particuliers fluorescents (luminophores) déposés à la surface des sédiments. Ils ont utilisé différents organismes : des amphipodes (*Pontoporeia hoyi*), des chironomes (*Chironomus sp.*, *Coelotanypus sp.* et *Prodiamesa*), des larves d'éphémères (*Hexagenia sp.*), des aselles (*Asellus aquaticus*) et surtout des tubificidés (*Branchioura sowerbyi*, *Tubifex tubifex* et *Limnodrilus hoffmeisteri*).

La répartition granulométrique verticale du sédiment peut être modifiée par l'activité de bioturbation. Certains macroinvertébrés benthiques altèrent la distribution granulométrique du sédiment en construisant des terriers au fond desquels les particules de surface peuvent glisser. D'autres organismes comme les convoyeurs sont à l'origine d'un granulo-reclassement des particules : ils ingèrent les particules les plus fines d'une tranche de sédiment profond et rejettent les pelotes fécales en surface, entraînant un appauvrissement en particules fines en profondeur et un enrichissement en surface. Tel est le cas des polychètes *Arenicola marina* [Rasmussen *et al.*, 1999] et *Naineris laevigata* [Giangrande *et al.*, 2001] en milieu marin ; des tubificidés en eau douce [McCall et Fisher, 1980] ; et des vers de terre en milieu terrestre. Les fécès produits par les organismes convoyeurs sont souvent agglomérées par du mucus, générant des particules de taille supérieure qui augmentent la porosité de cette couche de pelotes fécales et, conjointement, les flux à travers l'interface par simple diffusion. Il est important de souligner que ces pelotes fécales contiennent une proportion relativement élevée de matière organique de faible densité. De plus, les pelotes ne sont pas liées entre elles, réduisant ainsi la compacité et la cohésivité par rapport au sédiment non bioturbé, selon le type de fond (sableux ou vaseux) considéré. Cette couche de pelotes fécales est systématiquement plus riche en eau, ce qui va faciliter sa remise en suspension par les courants ou par d'autres organismes [McCall et Fisher, 1980 ; Rhoads, 1974].





Certaines espèces fouisseuses peuvent générer une remise en suspension des particules sédimentaires lors de la construction de leurs terriers : tel est le cas des larves d'*Hexagenia rigida* en eau douce [Saouter, 1990] ou de l'amphipode *Corophium volutator* en milieu estuarien [Ciarelli *et al.* 1999]. Les structures biogènes modifient les propriétés physiques du sédiment et plus particulièrement au niveau de l'interface "sédiment-colonne d'eau" [Gérino, 1992 ; Matisoff et Wang, 1998]. La présence des galeries et des terriers entraîne une augmentation de la surface de contact entre le sédiment et l'eau surnageante [Charbonneau et Hare, 1998] et donc une augmentation potentielle des échanges de matière entre ces deux compartiments. Le creusement des galeries augmente la porosité et la teneur en eau du sédiment. La compaction, la rugosité de la surface du fond, sa facilité d'érosion ou encore sa perméabilité sont aussi modifiées [McCall, 1979 ; McCall et Fisher, 1980 ; Sandnes *et al.*, 2000]. Les relations entre force de cisaillement et perméabilité et entre perméabilité et teneur en eau vont être affectées de façon différente selon les organismes [Meadows et Tait, 1989]. Notons que certaines espèces qui construisent des tubes cimentés par du mucus aggloméré à des particules, augmentent au contraire la compaction et la cohésion du sédiment [Rhoads, 1974].

L'activité biologique va donc entraîner à la fois un transport des particules et des molécules qui leur sont associées et un transport de l'eau interstitielle et des solutés. Ceci va profondément modifier la chimie des couches de sédiment bioturbées, particulièrement lorsque le mélange se fait entre des zones à potentiels rédox différents, ainsi que la chimie de l'interface, qui est la zone clef pour le contrôle des flux entre la colonne d'eau et les sédiments. La bioirrigation des terriers va augmenter les possibilités d'échanges de matière entre l'eau interstitielle et la colonne d'eau, se traduisant par exemple par un accroissement de la profondeur de l'oxycline [Wang, *et al.* 2001]. La bioadvection, quant à elle, va mettre en contact deux zones géochimiquement très différentes : une zone profonde réduite et la zone de surface oxydée [Fisher *et al.*, 1980]. Elle va également conduire à l'enfouissement de la couche d'interface et des composés qu'elle renferme [Lee et Swartz, 1980]. La bioturbation modifie les possibilités d'échanges entre le sédiment et la colonne d'eau, par simple diffusion moléculaire [Aller et Yingst, 1985 ; Matisoff, 1995 ; Matisoff et Wang, 1998, 2000].

Pour Rhoads (1974), les principaux processus et facteurs chimiques pouvant être significativement influencés par l'activité de la macrofaune à l'interface "eau-sédiment" sont :

- le taux d'échange des ions dissous ou adsorbés, des composés et des gaz à travers l'interface "eau-sédiment" ;



- la forme et l'amplitude des gradients de Eh, pH et PO<sub>2</sub> ;
- le transfert de composés réduits des couches profondes vers la surface oxygénée, ou, inversement, l'enfouissement rapide des composés oxydés de surface en profondeur ;
- les cycles du carbone, de l'azote, du soufre et du phosphore ;
- la distribution verticale des éléments dans les sédiments.

Kristensen (2000) a montré que la bioturbation est un des cinq plus importants facteurs de contrôle des processus diagénétiques à l'interface entre la zone oxic et la zone anoxique, avec la température, l'apport de matière organique, la lumière et la vitesse du courant. A titre d'exemple, en milieu marin, Hylleberg et Henriksen (1980) ont observé une augmentation des flux d'azote et de phosphore inorganique en présence de bioturbation. En eau douce, Fukuhara et Sakamoto (1987) ont mesuré une augmentation du relargage d'azote (surtout sous forme d'ammonium) et de phosphate par le sédiment, en présence de chironomes ou de tubificidés. Matisoff et Wang (1998) ont montré que deux espèces de chironomes (*Coelotanypus sp.* et *Chironomus plumosus*) ainsi que les larves d'*Hexagenia limbata* augmentent le flux de <sup>22</sup>Na dissous, de l'eau vers le sédiment. Mermillod-Blondin *et al.* (2002) ont mesuré une diminution de la concentration en O<sub>2</sub> dissous dans le sédiment, avec des tubificidés mais pas avec des chironomes ou des aselles. Matisoff *et al.* (1985) ont mis en évidence une augmentation des flux d'ammonium, de bicarbonates et de silice, du sédiment vers la colonne d'eau, en présence de tubificidés. En conditions anoxiques, ils diminuent le flux de fer et de phosphate. Des chironomes augmentent le relargage de nitrates, de bicarbonates et de silice, mais pas de phosphate. McCall et Fisher (1980) ont observé que la consommation d'oxygène d'un sédiment renfermant des tubificidés est deux fois plus élevée que la simple somme de la respiration des vers et de la demande en oxygène du sédiment seul. Environ 20 % de l'augmentation est due à la respiration des tubificidés, 50 à 70 % à l'oxydation des FeS transférés en surface par l'activité de bioadvection des vers, et 10 à 30 % à une augmentation de l'activité microbienne.

Un autre point important, souvent négligé dans la littérature, concerne l'influence de la bioturbation sur l'ensemble des communautés d'invertébrés benthiques et sur la microfaune animale et végétale. La bioturbation, en mélangeant les couches sédimentaires, va redistribuer spatialement cette microfaune (Giangrande *et al.*, 2001), ce qui peut perturber les dynamiques de populations. La bioturbation a aussi un effet indirect : en modifiant la géochimie du sédiment, et particulièrement la position de l'oxycline, les communautés végétales ou animales vont se retrouver dans un environnement différent, ce qui va entraîner des variations



qualitative et quantitative dans leur composition spécifique. Le broutage des bactéries du biofilm à la surface du sédiment ("grazing") par différentes espèces benthiques (larves d'insectes, mollusques, ...), provoque une diminution du nombre de ces bactéries. A l'inverse, la croissance de certaines communautés bactériennes peut être stimulée (activité de "gardening") par la bioturbation : la présence de galeries, souvent recouvertes de mucus, peut entraîner un développement des bactéries qui seront ensuite consommées par les invertébrés fouisseurs. Leff et Leff (2000) ont mesuré des altérations des populations microbiennes dans des microcosmes contenant différents macroinvertébrés d'eau douce. Pour Lee et Swartz (1980), la bioirrigation des terriers, la production de pelotes fécales et la construction de tubes, sont les trois activités de la macrofaune benthique qui augmentent la densité et le métabolisme de la faune microbienne intra-sédimentaire. En présence de tubificidés, Mermillod-Blondin *et al.* (2002) ont mesuré une diminution du nombre total de bactéries sous l'interface et une augmentation de ce nombre en profondeur. Goñi-Urriza *et al.* (1999) ont observé au laboratoire une augmentation du nombre total de bactéries dans des sédiments marins en présence de bioturbation, parallèlement à une diminution de la stratification de leurs densités. Les populations de micro-organismes à l'origine de la dégradation de la matière organique dans le sédiment vont avoir une zonation spatiale différente de celle de leurs homologues en milieu non bioturbé. Ceci est particulièrement important en ce qui concerne les bactéries sulfato-réductrices (BSR), qui vivent en milieu anoxique et produisent du soufre, cet élément pouvant former des complexes insolubles avec de nombreux métaux. Soulignons également les effets à l'égard de la méthylation du mercure inorganique (HgII), qui est principalement effectuée par les BSR [Rudd, 1995].

En conclusion, comme l'ont écrit McCall et Fisher (1980), la plupart des propriétés physiques, chimiques et biologiques des sédiments peuvent être perturbées par la bioturbation : la taille des particules, la force de cisaillement, la vitesse de déposition, la facilité d'érosion, la porosité, la perméabilité, les gradients verticaux de matériaux dissous ou particuliers, les flux à l'interface "eau/sédiment" et la demande en oxygène du sédiment. Chaque espèce et chaque organisme vont exercer une action spécifique sur ces différents paramètres.



### **I.B.3. L'INFLUENCE DE LA BIOTURBATION SUR LA REPARTITION DES METAUX-TRACES ET SUR LES FLUX ASSOCIES**

Par ses effets mécaniques, la bioturbation entraîne un mouvement des éléments associés aux particules sédimentaires ; ainsi, les concentrations des métaux-traces associés aux particules pourront être affectées, et ce à toutes les profondeurs de la couche bioturbée [Matisoff, 1995]. Les organismes convoyeurs, responsables de la bioadvection, enfouissent progressivement le sédiment de surface : si ce dernier a été enrichi en métaux, par exemple au contact de la colonne d'eau suite à une pollution, la contamination sera transférée en profondeur, jusqu'à la zone maximale d'ingestion des vers. A l'opposé, la bioadvection pourra être à l'origine d'un transfert de métaux préalablement enfouis dans les couches profondes du sédiment vers la surface et les organismes benthiques qui y vivent. Toutefois, dans les deux cas, un métal présent dans la zone d'ingestion des convoyeurs pourra être recyclé plusieurs fois avant son enfouissement ultime, en dessous de la zone d'ingestion, conduisant à plusieurs "passages" au contact de la colonne d'eau [Matisoff *et al.*, 1999]. Les dépositivores consomment de façon sélective certaines fractions du sédiment (en fonction de leur taille et/ou de leur richesse en matière organique) ainsi que des algues et des bactéries, qui ont un pouvoir élevé de fixation des métaux. Ils seront ainsi plus ou moins fortement exposés, selon l'efficacité des taux de transferts au travers de leur barrière digestive ; les fécès seront plus ou moins enrichis en polluants, par rapport au reste du sédiment. La construction et la bioirrigation des terriers peut entraîner des métaux à l'état dissous dans l'eau en profondeur dans le sédiment, avec ensuite une complexation avec les ligands présents à la surface des galeries ; à l'opposé, la bioirrigation peut conduire au relargage de métaux accumulés en profondeur [Lee et Swartz, 1980], sous forme dissoute, par diffusion depuis l'eau interstitielle, ou sous forme particulaire, adsorbés sur les MES [Hare *et al.*, 1991].

L'activité de bioturbation peut modifier le potentiel rédox du sédiment, ainsi que la composition de l'eau interstitielle en ions dissous, notamment en fer et manganèse. Ceci peut entraîner une perturbation des équilibres géochimiques dans l'environnement immédiat du métal et donc avoir des répercussions sur la distribution des métaux et sur leur biodisponibilité [Matisoff, 1995]. Les métaux en solution et/ou fixés sur des ligands (oxyhydroxydes de fer et de manganèse, matière organique, sulfures, ...) vont en effet pouvoir être oxydés ou réduits, adsorbés ou mis en solution. La répartition des métaux entre les différentes phases peut ainsi être modifiée, ce qui va conduire à une variation des flux métalliques entre l'eau et le sédiment (augmentation ou diminution du flux entrant ou sortant). Par exemple, la





relation entre bioturbation et oxydo-réduction des AVS apparaît fondamentale pour la connaissance des flux, de la répartition et de la toxicité des métaux dans les sédiments renfermant une macro-faune benthique, c'est-à-dire la très grande majorité des sédiments des systèmes aquatiques continentaux. Les résultats obtenus par Peterson *et al.* (1996) montrent qu'une population d'oligochètes tubificidés réduit significativement la concentration en AVS dans un sédiment, entraînant une augmentation de la concentration en Cd dans l'eau interstitielle et un accroissement de l'accumulation du métal par les vers.

Soulignons *in fine* que la bioturbation peut modifier indirectement la répartition des métaux en agissant sur les populations microbiennes, qui contrôlent certaines réactions d'oxydo-réduction dans le sédiment (par exemple, les bactéries sulfato-réductrices) [Warren et Haack, 2001].

Comme nous l'avons précisé précédemment, les données disponibles dans la littérature sur le rôle de la bioturbation à l'égard de la contamination des systèmes aquatiques continentaux par les métaux, sont assez limitées. Plusieurs études ont été basées sur l'analyse des effets de la bioturbation sur le relargage des métaux accumulés dans les sédiments et sur leur biodisponibilité pour des espèces benthiques et pélagiques. Les résultats montrent une augmentation significative des métaux transférés des sédiments vers les eaux surnageantes [Rasmussen *et al.*, 2000], surtout sous forme particulaire. Ce relargage n'entraîne pas toujours une augmentation de l'accumulation par les organismes (crustacés, bivalves, ...), puisque les métaux particuliers sont peu ou pas biodisponibles [Wall *et al.*, 1995]. Par contre, très peu d'études ont été consacrées aux effets de la bioturbation sur les transferts de métaux en sens inverse, i.e. de l'eau vers le sédiment. Soster *et al.* (1992) en eau douce, et Petersen *et al.* (1998) en milieu estuarien, ont montré que la bioturbation induite par différents organismes (*Nereis diversicolor*, *Arenicola marina*, *Corophium volutator* ou tubificidés) augmente les flux de métaux (Cd et Zn) de la colonne d'eau vers les sédiments. Mentionnons que nos recherches bibliographiques ont mis en évidence quelques études réalisées avec des polluants organiques. Par exemple, Karickhoff et Morris (1985) et Reible *et al.* (1996) ont montré que la bioturbation par des tubificidés induisait une redistribution de polluants organiques hydrophobes (hexachlorobenzène, pentachlorobenzène et trifluralin ; pyrène, dibenzofurane et phénanthrène) dans le sédiment ainsi que leur relargage vers la colonne d'eau. Ciarelli *et al.* (1999) ont mesuré en milieu estuarien un relargage de fluoranthène (composé liposoluble) par le sédiment en présence de populations d'amphipodes (*Corophium volutator*). Gunnarsson *et al.* (1999) ont observé que le polychète *Nereis diversicolor* augmentait le relargage de tetrachlorobiphényle à partir d'un sédiment marin, sans modifier la distribution intra-



sédimentaire de ce polluant. Citons également les études réalisées sur des sédiments marins côtiers et sur le comportement des hydrocarbures [Gilbert *et al.*, 1996, 1997, 2001].

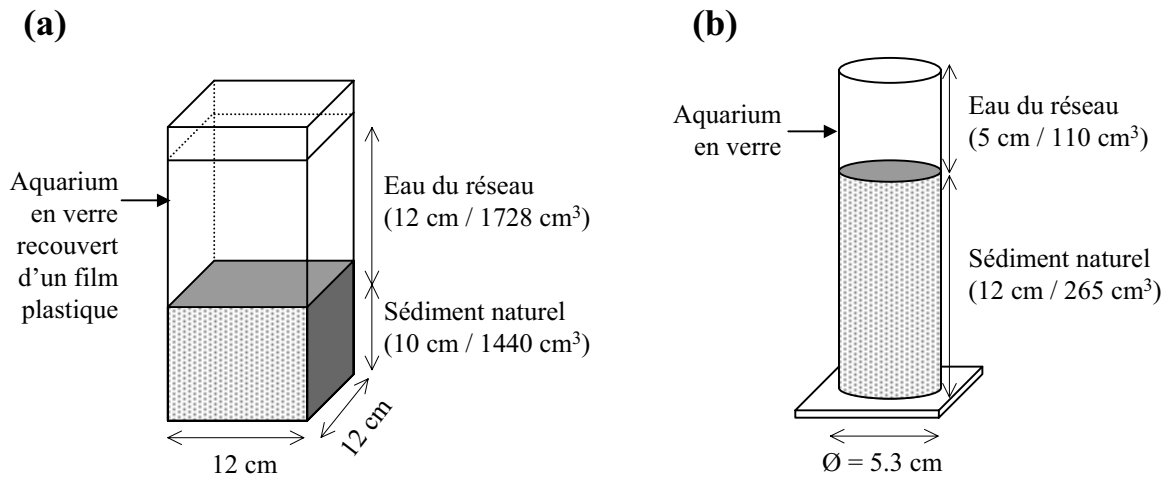
Pour terminer, signalons deux études récentes portant sur la modélisation du devenir des métaux stockés dans le sédiment et dont un des facteurs pris en compte dans le modèle est la bioturbation : Wood et Shelley (1999) arrivent à la conclusion que l'effet de la bioturbation est négligeable dans le contrôle de la biodisponibilité des métaux intra-sédimentaires alors que Park et Jaffé (1996) montrent que la bioturbation est un des processus majeurs contrôlant le flux d'électrons dans le sédiment et donc les conditions rédox.

Le bilan de notre étude bibliographique indique que la bioturbation exerce de nombreux effets sur la structure et sur les propriétés des sédiments, ces effets directs et indirects pouvant modifier le devenir des métaux accumulés dans les sédiments et les flux entre les différents compartiments abiotiques et biotiques au sein des écosystèmes aquatiques. Ces effets sont complexes et résultent des actions et surtout des interactions entre les nombreux facteurs biogéochimiques mis en jeu. Selon le type de métal étudié, l'éthologie de la macrofaune benthique ou encore les modalités de la contamination des compartiments sédimentaires, la bioturbation influencera de façon différente les flux métalliques, la distribution des éléments et leur biodisponibilité à l'égard des espèces benthiques et pélagiques.



## **PARTIE II**

# **BASES METHODOLOGIQUES**



Unité expérimentale (UE) de "type 1"

Unité expérimentale (UE) de "type 2"

**Figure II.1.** Les deux types d'unités expérimentales utilisées, renfermant un biotope mixte "colonne d'eau/sédiment".

Concentrations (mg.L <sup>-1</sup> )	
Calcium	16.20
Magnesium	8.30
Potassium	3.80
Sodium	39.65
Sulfates	6.55
Chlorures	43.70
Silicates	12.35
Ammonium	0.17
Nitrites	<0.01
Nitrates	<0.25
Orthophosphates	<0.05
Oxygène dissous	1.10
Carbone Organique Total	0.5
pH à 20 °C	8.15
Turbidité (FTU)	0.2
Conductivité à 20 °C (µS.cmr <sup>1</sup> )	310

**Tableau II.1.** Principales caractéristiques physico-chimiques de l'eau du réseau utilisée lors des expériences.

---

## II.A. LES SYSTEMES EXPERIMENTAUX

---

### II.A.1. L'UNITE EXPERIMENTALE (UE)

#### II.A.1.1. Structure

Nos supports d'étude ont reposé sur des systèmes expérimentaux de type "microcosmes", constitués d'un biotope mixte "colonne d'eau/sédiment" et d'une composante biologique mono ou plurispécifique, selon les objectifs de nos études en laboratoire. Deux types d'unités expérimentales (UEs) ont été utilisés au cours des différentes expériences (Figure II.1, a et b):

- des aquariums en verre collé (L = 12 cm ; l = 12 cm ; h = 30 cm) *type 1*
- des cylindres en verre ( $\varnothing$  = 5.3 cm ; h = 17 cm) *type 2*

Les unités de *type 2* ont été utilisées préférentiellement, car elles permettaient un prélèvement de l'ensemble du compartiment sédimentaire par un carottage direct. Toutefois, ces unités étaient trop petites pour renfermer trois ou quatre bivalves. C'est pourquoi les unités de *type 1*, plus grandes, ont été mises en place pour les expériences nécessitant la présence de *C. fluminea* dans les microcosmes. Le verre a été choisi pour la fabrication de toutes les UEs, compte-tenu de ses faibles capacités de fixation des métaux, de sa décontamination facile par un traitement à l'acide nitrique (65 % HNO<sub>3</sub> - Merck, Darmstadt, Allemagne – dilution à 10 %) et de son imperméabilité à l'oxygène dissous. Notons que les UEs de *type 1*, à cause de la présence de joints en silicone, ont été recouvertes sur leurs parois internes par un film plastique (Norme alimentaire, fabrication de poches sur mesure, Plastiluz, France) dont les capacités de fixation des métaux sont faibles, comparables à celles du verre.

#### II.A.1.2. La colonne d'eau

La colonne d'eau était constituée par de l'eau du réseau déchlorée, dont la composition chimique moyenne est indiquée dans le Tableau II.1. D'importants volumes ont été systématiquement "vieillis" avant leur utilisation, par une aération intense afin d'éliminer les traces de chlore, pendant au moins 48 h. Après introduction du sédiment dans chaque UE, un volume d'eau déterminé a été délicatement ajouté, en utilisant un morceau de polystyrène placé à la surface du sédiment, afin d'éviter la remise en suspension des particules. Le niveau de l'eau a été maintenu constant tout au long des expériences par des ajouts compensant les

Taille des particules (%)	
< 15 $\mu\text{m}$	46.4
15-30 $\mu\text{m}$	27.7
30-63 $\mu\text{m}$	20.0
63-125 $\mu\text{m}$	4.4
125-250 $\mu\text{m}$	1.4
250-500 $\mu\text{m}$	0.1
> 500 $\mu\text{m}$	0.0
Carbone Organique (%)	1.55
Porosité (%)	0.74

**Tableau II.2.** Principales caractéristiques du sédiment de Garonne, collecté au niveau des stations de l'île d'Arcins et de Cadaujac, en amont de Bordeaux.

Taille des particules (%)	
< 15 $\mu\text{m}$	28.2
15-30 $\mu\text{m}$	13.3
30-63 $\mu\text{m}$	16.8
63-125 $\mu\text{m}$	15.7
125-250 $\mu\text{m}$	13.6
250-500 $\mu\text{m}$	9.8
> 500 $\mu\text{m}$	2.6
Carbone Organique (%)	6.88
Porosité (%)	0.67

**Tableau II.3.** Principales caractéristiques du sédiment de Cajarc (rivière Lot, affluent de la Garonne, France).



pertes dues à l'évaporation ou aux prélèvements indispensables au suivi des conditions physico-chimiques et des transferts métalliques dans ce compartiment.

### **II.A.1.3. Le sédiment**

Les sédiments utilisés pour l'ensemble de nos expériences ont été collectés en milieu naturel, sur différents sites de la rivière Lot ou de la Garonne, plus en aval. Les sédiments avec un faible niveau d'enrichissement en Cd et Zn ont été prélevés sur les rives de la Garonne, juste en amont de Bordeaux, au niveau de l'Île d'Arcins et de Cadaujac. Il s'agissait de sédiments très fins et homogènes, appelés "crème de vase". Nous avons également utilisé les sédiments contaminés de la retenue de Cajarc, premier barrage hydroélectrique situé environ 50 km à l'aval de la confluence entre le Lot et le Riou-Mort (cf Figure I.1) ; des quantités importantes (> 100 kg, poids frais) ont été prélevées par carottage à partir d'un bateau, au niveau de la zone d'étude de ce site par le DGO et par le LEESA. Les principales caractéristiques de ces sédiments sont résumées dans les Tableaux II.2 et II.3.

Notons que des prélèvements ont été réalisés pour une expérience complémentaire, juste en amont de la confluence du Lot et du Riou-Mort (station de Boisse Penchot – cf Figure I.1), afin d'obtenir des échantillons de référence ("bruits de fond" pour les métaux étudiés) ayant des caractéristiques granulométriques et géochimiques comparables à celles du sédiment de Cajarc.

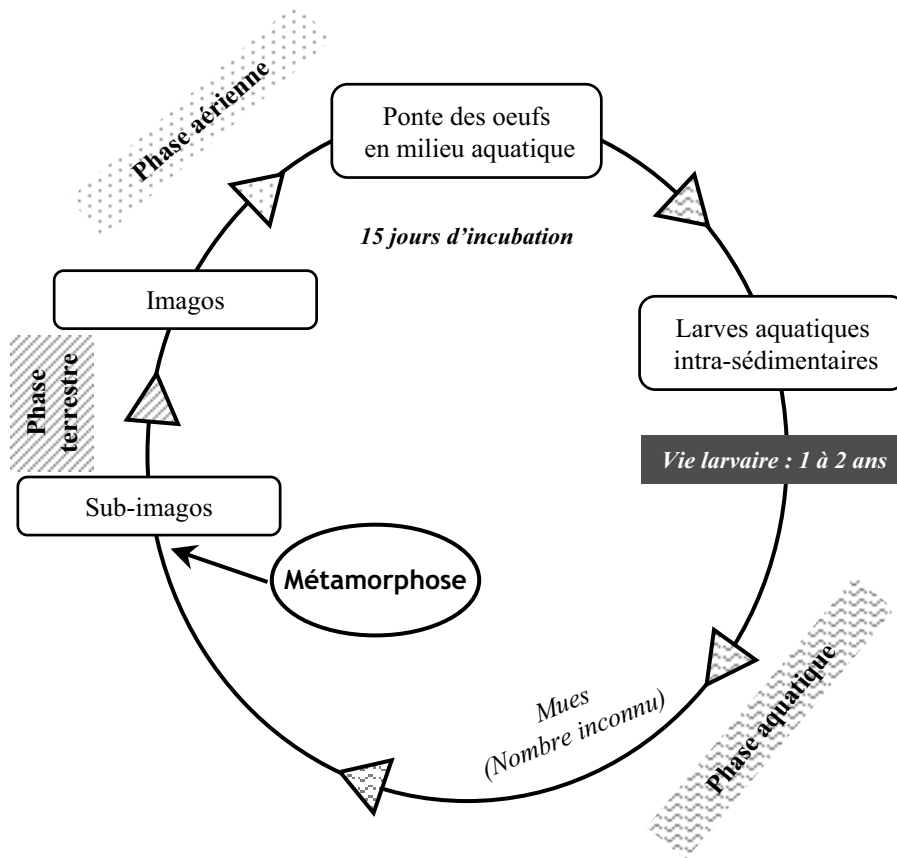
Après leur collecte sur le terrain, les sédiments ont été stockés à l'obscurité et à + 4°C. Avant introduction dans les UEs, ils ont été homogénéisés mécaniquement (brassage) et des échantillons ont été prélevés afin de déterminer les rapports "poids frais/poids sec" (pf/ps, ps : séchage à 60°C pendant 72 h) et les concentrations métalliques initiales (Cd, Zn). Dans la plupart des expériences, avant d'être homogénéisés, les sédiments ont été tamisés à 1 mm pour enlever les gros débris et ensuite congelés à – 20°C pour tuer la micro-faune. Un poids fixe de sédiment a été introduit dans chaque UE, permettant une homogénéisation des hauteurs au sein des différents microcosmes.

### **II.A.1.4. Les organismes**

Nous avons utilisé trois types d'organismes dans ces UEs : deux possédant une activité de bioturbation (larves d'*H. rigida* et tubificidés) et un bivalve filtreur (*C. fluminea*). Les organismes ont été introduits avec un délai minimum de 24 h après la mise en place du

Embranchement	Arthropodes
Classe	Insectes
Ordre	Ephéméroptères
Sous-Ordre	Ephéméroptéroïdes
Famille	Ephemeridae
Genre	<i>Hexagenia</i>
Espèce	<i>H. rigida</i>

**Tableau II.4.** Systématique de *Hexagenia rigida* (Mc Dunnough).



**Figure II.2.** Cycle biologique de l'espèce *Hexagenia rigida*.

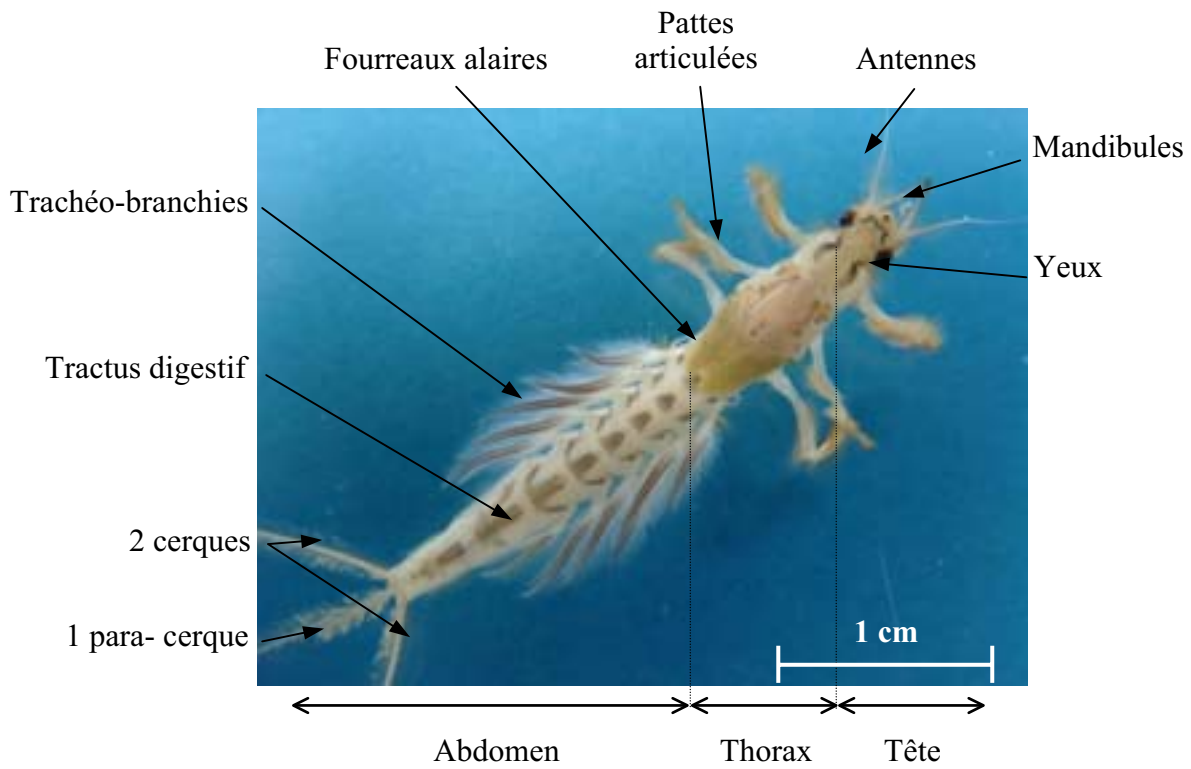
biotope mixte. Ce délai permet une relative stabilisation des paramètres physico-chimiques au sein de la colonne d'eau et du sédiment (mise en place et stabilisation de l'oxyclyne par exemple).

## ***Hexagenia rigida***

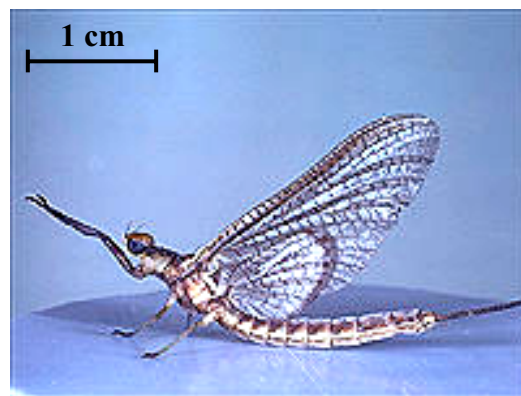
### **Biologie et écologie**

*Hexagenia rigida* (McDunnough) (Tableau II.4) est un éphéméroptère endémique du continent américain, du Rio Negro en Argentine jusqu'aux lacs du Nord-Ouest canadien [Cochran, 1992 ; Edsall *et al.*, 1991 ; Fremling, 1989 ; McCafferty, 1991, 1994]. Cette espèce colonise préférentiellement les milieux lenticules et constitue une composante importante des communautés benthiques des systèmes aquatiques continentaux. Les larves sont fouisseuses ; elles creusent des galeries dans les strates supérieures des sédiments fins. La densité de ces organismes en milieu naturel varie en fonction de certaines conditions environnementales telles que les saisons, la nature du substrat, la concentration en oxygène dissous ou encore l'abondance de la matière organique détritique (support trophique). Les densités estimées sont comprises entre 60 et 300 larves par m<sup>2</sup>, avec des maxima atteignant 2000 larves/m<sup>2</sup> [Flannagan, 1979].

Le cycle biologique d'*H. rigida* est schématisé sur la Figure II.2. Les éphéméroptères sont des insectes "hétérométaboles hémimétaboles" : l'éclosion libère un stade larvaire aquatique qui diffère de l'adulte à la fois par des caractères morphologiques et physiologiques (taille, absence de pièces génitales et d'ailes, ...) et par son habitat et son mode de vie. La mue imaginale entraîne des transformations importantes, notamment sur le plan respiratoire puisque les stades larvaires possèdent 6 paires de trachéo-branchies au niveau de l'abdomen (Figure II.3) alors que les adultes ont une vie aérienne et respirent grâce à des stigmates et des trachées (Figure II.4). La durée de la vie larvaire varie de un à deux ans, voire plus [Giberson et Rosenberg, 1992], selon les conditions environnementales, la température jouant un rôle prépondérant. Les larves vivent dans des galeries qu'elles creusent à l'intérieur du sédiment. Elles irriguent leurs terriers en créant un courant d'eau permanent avec leurs 6 paires de trachéo-branchies abdominales. Ce courant d'eau leur permet d'assurer leurs échanges respiratoires. Cette activité de bioturbation est de type "bioirrigation". Elle peut être influencée par de nombreux facteurs relatifs aux organismes eux-mêmes (taille, densité, ...), au sédiment (granulométrie, teneur en eau ou en matière organique, ...) ou aux conditions



**Figure II.3.** Vue dorsale d'une larve d'*Hexagenia rigida*.



**Figure II.4.** *Hexagenia rigida* adulte.

physico-chimiques du milieu (température, pH, oxygénation, ...) [Odin *et al.*, 1996 ; Andrès *et al.*, 1998 ; Saouter, 1990].

Le *preferendum* thermique des larves est de 24°C, mais leur marge de tolérance est très grande, allant de 4 à 30 °C [Saouter, 1990]. Les larves sont détritivores et absorbent le sédiment dont elles retiennent les particules organiques comme les algues unicellulaires, les bactéries, les protozoaires ou les débris. Certains auteurs ont observé un tri des sédiments entraînant l'absorption préférentielle des débris organiques [Zimmerman *et al.*, 1975]. Les larves n'auraient pas de zone d'absorption préférentielle du sédiment, ni de rejet. Les études expérimentales conduites par Charbonneau et Hare (1998) indiquent un enfouissement des larves jusqu'à une profondeur de 10 cm.

### **Anatomie**

Comme tous les insectes, les larves d'*H. rigida* sont formées de trois parties principales : la tête, le thorax et l'abdomen (Figure II.3) :

- la tête porte des antennes recouvertes de longues soies, 2 mandibules incurvées ainsi qu'une protubérance frontale arrondie caractéristique du genre *Hexagenia*.
- 3 paires de pattes thoraciques articulées sont situées sur le thorax, servant au déplacement des larves et au creusement des galeries dans le sédiment.
- l'abdomen est formé de 8 segments. Le système respiratoire se situe latéralement sur les segments 2 à 7 et se compose de 6 paires de trachéo-branchies frangées et effilées. Il se termine par 3 appendices filiformes et articulés, typiques des éphéméridés : 2 cerques et 1 para-cerque médian qui servent pour la nage.

### **Intérêts en Ecotoxicologie**

Les larves d'*H. rigida* ont une intense activité de creusement des galeries qui s'accompagne d'une bioirrigation des terriers pour la ventilation et les échanges respiratoires au niveau des trachéo-branchies. Cette bioirrigation couplée à l'ingestion des sédiments génère un important mélange couplé à une remise en suspension des particules sédimentaires, provoquant des modifications de la physico-chimie du sédiment et de la colonne d'eau et, conjointement, de la distribution et de la biodisponibilité des métaux présents au sein de ces deux compartiments.



Le mode de vie de ces stades larvaires permet une double contamination des organismes, à partir du sédiment ingéré (voie trophique) et/ou de la colonne d'eau, *via* la circulation de l'eau dans les galeries (voie directe). Cette deuxième voie peut également résulter de transferts de métaux à partir des sédiments, au niveau des parois des galeries, les transferts étant étroitement dépendants des perturbations physico-chimiques engendrées par les activités de fouissage.

Plusieurs caractéristiques biologiques et écologiques renforcent l'intérêt de cette espèce en Ecotoxicologie expérimentale :

- obtention relativement aisée et tout au long de l'année d'importantes populations de larves, grâce à un élevage au laboratoire à partir de lots d'œufs prélevés en milieu naturel et conservés pendant plusieurs mois, voire plusieurs années, à + 4°C ;
- long cycle de développement des stades larvaires, permettant la mise en place d'expériences sur des durées de plusieurs mois, selon la température ;
- grande tolérance à l'égard des facteurs environnementaux (température, pH, oxygène dissous, ...)
- taille suffisante des derniers stades larvaires pour analyser la distribution des métaux dans plusieurs organes (branchies, tractus digestif).

Mentionnons que les très importantes biomasses larvaires observées dans les lacs Nord-américains et canadiens servent de supports trophiques pour de nombreuses espèces aquatiques (poissons notamment), constituant ainsi une source de contamination pour les réseaux alimentaires benthiques et pélagiques.

### **Echantillonnage**

Les stades larvaires d'*H. rigida* ont été obtenus à l'aide d'un élevage mis en place au laboratoire, à partir d'importants lots d'œufs collectés en période estivale sur les rives du lac Winnipeg (Freshwater Institute, Winnipeg, Canada). La procédure d'élevage a été décrite dans plusieurs mémoires ou publications [Odin *et al.*, 1996 ; Saouter, 1990]. Rappelons que les œufs sont placés dans des enceintes contenant de l'eau à 4°C, saturée en oxygène. La température est progressivement amenée à 24°C (3 semaines environ), qui est la température d'éclosion. Les jeunes larves sont alors transférées dans des bacs contenant de l'eau aérée en permanence et du sédiment de Garonne, afin de permettre leur enfouissement. Des apports de nourriture sont effectués une fois par semaine (Baby fish food, Tetramin, Tetra Werke,





Allemagne). Les populations sont périodiquement transférées dans des enceintes de plus grande taille, selon la croissance des organismes.

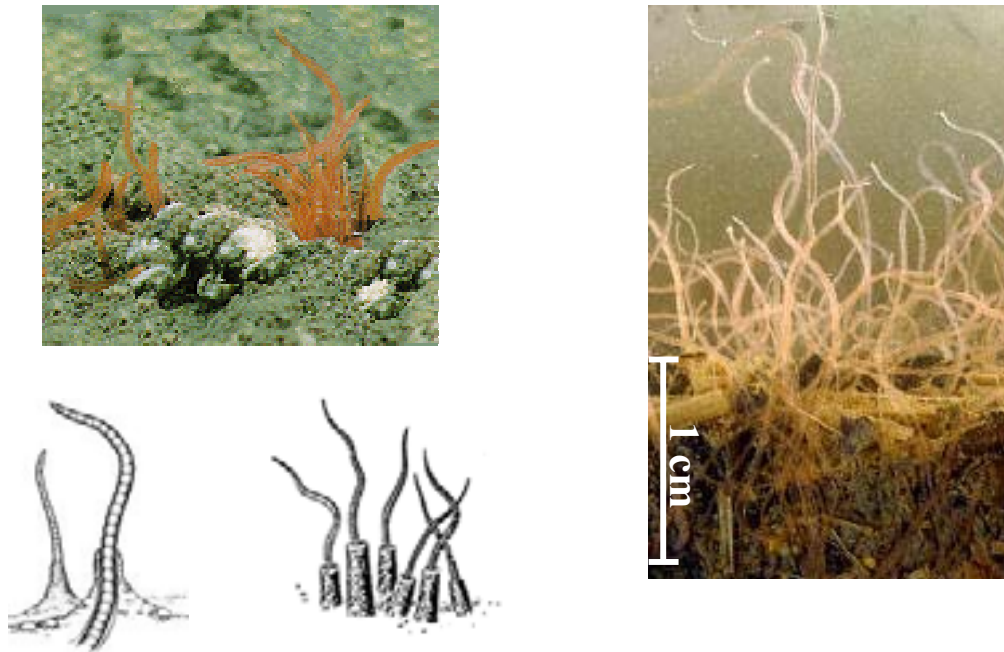
Avant les expériences, les larves ont été collectées en tamisant délicatement le sédiment des bacs d'élevage sous un courant d'eau. Elles ont été séchées sur du papier absorbant, puis pesées individuellement (poids frais) et déposées dans des récipients numérotés. Autant de classes de poids que de larves à introduire dans chaque UE ont été constituées, chaque classe renfermant un nombre d'individus égal au nombre total d'UEs. Un individu de chacune des classes a ensuite été introduit de façon aléatoire dans chacune des UEs. Cette étape fastidieuse, compte-tenu du nombre de larves nécessaires pour chaque expérience (plusieurs centaines), est incontournable, afin de contrôler les effectifs et les biomasses introduits dans chaque unité, ces deux critères conditionnant l'activité de bioturbation lorsque les caractéristiques des sédiments (origine, granulométrie, épaisseur, ...) sont similaires dans toutes les UEs.

Pour chaque temps d'échantillonnage prévu dans le plan d'expérience, les larves ont été prélevées en tamisant le sédiment de chaque UE sous un courant d'eau. Elles ont été séchées avant de déterminer leur poids frais, puis congelées à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les poids secs ont été mesurés lors de la phase de préparation des échantillons, avant l'étape de dosage de métaux, par séchage à l'étuve à  $60^{\circ}\text{C}$  pendant 72 h.

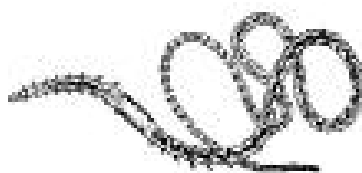
Le sédiment contenu dans le tractus digestif des larves d'*H. rigida* n'a pas été vidangé avant les dosages des métaux. Au regard d'une analyse stricte de la bioaccumulation à l'échelle de l'organisme, les quantités métalliques contenues dans le tractus ne sont pas réellement absorbées au travers de la barrière intestinale et elles ne doivent pas être prises en compte dans le calcul des concentrations et des teneurs métalliques. Par contre, si l'on considère les potentialités de transfert entre les larves et leurs prédateurs, l'ensemble des métaux contenus dans le sédiment ingéré et dans les organismes doit être pris en compte. Le sédiment accumulé dans le tractus peut être éliminé par une "dépuración", en plaçant les larves dans un sédiment non contaminé ou dans de l'eau ; néanmoins, cette procédure de vidange peut entraîner des biais importants par des pertes de métaux présents au niveau des barrières biologiques (décontamination partielle). Nous avons utilisé une méthode indirecte d'estimation des quantités métalliques contenues dans le sédiment ingéré : des microdissections ont montré que le sédiment à l'intérieur du tractus représente environ 10 % de la biomasse totale des organismes, sur la base des poids secs [Hare *et al.*, 1989 ; Saouter, 1990]. Le rapport "poids sec/poids frais" des larves est en moyenne de 0,23. A partir des teneurs métalliques totales mesurées dans les organismes non-vidangés et du calcul des

Embranchement	Annélides
Classe	Oligochètes
Ordre	Plesiopores plesiothèques
Famille	Tubificidae
Genres	<i>Tubifex</i> - <i>Limnodrilus</i>
Espèce	<i>T. tubifex</i> / <i>L. hoffmeisteri</i> et <i>L. claparedeianus</i>

**Tableau II.5.** Systématique des tubificidés.



**Figure II.5.** Photos et dessins de tubificidés dans le sédiment, la partie terminale du corps ondulant dans la colonne d'eau (fonction respiratoire).



**Figure II.6.** Dessin de *Tubifex tubifex*

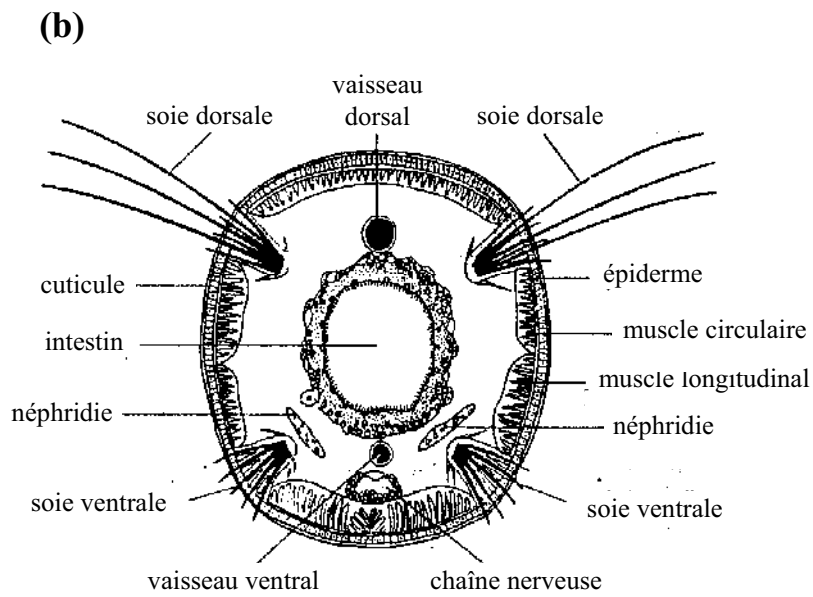
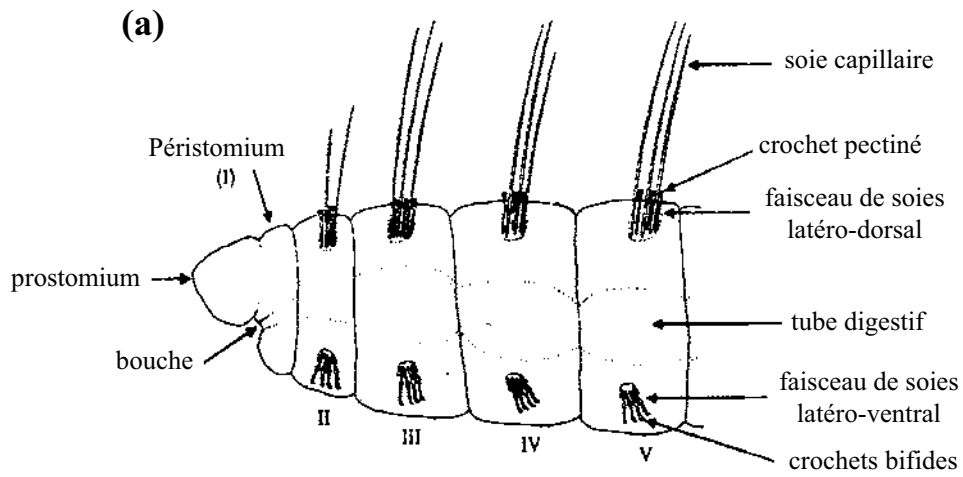
teneurs correspondantes dans le sédiment de leur tractus digestif, sur la base des concentrations des métaux mesurées dans le compartiment sédimentaire, il est possible d'estimer les quantités réellement bioaccumulées.

## Oligochètes tubificidés

### Biologie et écologie

Le deuxième modèle biologique retenu comme organisme générateur de bioturbation est une famille d'annélides oligochètes : les Tubificidae limicoles (Figure II.5). Les lots que nous avons utilisés étaient constitués par un mélange de trois espèces (Tableau II.5) : *Tubifex tubifex* (Müller) (Figure II.6), *Limnodrilus hoffmeisteri* (Claparède) et *Limnodrilus claparedeianus* (Ratzel). Ces vers, généralement rouges (leur sang contient un pigment proche de l'hémoglobine), de quelques centimètres de longueur, vivent dans des galeries, à l'intérieur du sédiment. Ils peuvent constituer une grande partie de la faune benthique des écosystèmes aquatiques continentaux et représentent l'un des principaux agents de bioturbation de ces systèmes [Fisher *et al.*, 1980]. Leurs densités peuvent atteindre jusqu'à plusieurs dizaines de milliers d'individus/m<sup>2</sup> [Avel, 1959]. Ils sont ubiquistes ; leur répartition est quasiment mondiale. Ils sont résistants aux fortes concentrations en matières organiques [Brinkhurst et Cook, 1974], à l'anoxie (métabolisme anaérobie transitoire possible), à la chaleur et à la déshydratation ; ils constituent un groupe dominant au sein des communautés d'invertébrés benthiques en milieux perturbés (pollutions chimiques). Leur durée de vie est de quelques années.

Les tubificidés ont en général une longueur supérieure à 2 cm. Ils ne possèdent pas d'yeux. La classification des tubificidés est basée principalement sur leurs soies et sur la forme du conduit génital mâle [Brinkhurst, 1970]. Le premier segment de ces vers, le prostomium, est dépourvu de soies, mais tous les autres segments portent 4 faisceaux de soies : 2 latéraux-frontaux et 2 latéraux-ventraux (Figure II.7.a et b). Chez les tubificidés, le nombre de soies par faisceau est toujours supérieur à deux. La reproduction est rarement asexuée. La maturité sexuelle est atteinte entre six mois et un an. La spermathèque se trouve dans le X<sup>ème</sup> segment et les orifices mâles dans le XI<sup>ème</sup> segment (parfois déplacés de 1 ou 2 segments). Le clitellum, qui renferme les organes reproducteurs, apparaît au niveau du XI<sup>ème</sup> segment, en période de reproduction (une par an, en milieu naturel). Les tubificidés sont des hermaphrodites protandriques : les spermatozoïdes arrivent à maturité avant les ovules. L'autofécondation est donc impossible. Les œufs sont déposés par groupes de 4 ou 5 dans des



**Figure II.7.** Dessins anatomiques de la région antérieure d'un tubificidé (a), et d'une coupe transversale dans la région médiane (b) (d'après Sambugar, 1994, modifié).

cocons. Leur développement est direct. Ils donnent naissance à de petits vers, complètement constitués.

Les différents genres de tubificidés se reconnaissent grâce à leurs trois types de soies :

- des soies capillaires, dorsales et allongées, présentes dans le genre *Tubifex*, absentes dans le genre *Limnodrilus* ;
- des crochets bifides, dorsaux et ventraux, dont la forme et la taille des dents sont utilisés pour les déterminations ;
- des soies pectinées, dorsales et antérieures, en forme de crochets bifides avec des dents intermédiaires.

Ils portent aussi des soies génitales associées à la spermathèque et aux pores mâles. Pour le genre *Limnodrilus*, c'est la taille relative de la spermathèque comparée à la largeur de l'animal qui permet d'identifier les différentes espèces.

La détermination des trois espèces présentes au sein des lots de tubificidés que nous avons utilisés a été effectuée par N. Giani (Université Toulouse III).

Leur position dans le sédiment est très caractéristique : le prostomium est orienté vers le bas et le pygidium vers le haut, qui dépasse du sédiment (Figures II.5). En effet, ils ingèrent des particules sédimentaires "réduites" au fond des galeries, et les rejettent en surface sous forme de pelotes fécales, après avoir extrait une partie de la matière organique assimilable. Ils induisent donc un recouvrement du sédiment oxydé de la surface par du sédiment réduit provenant d'horizons inférieurs. Les pelotes fécales contiennent du matériel à forte demande en oxygène (FeS par exemple), alors que le sédiment oxydé de l'interface est progressivement réduit au cours de son enfouissement [McCall and Fisher, 1980]. Ce type de bioturbation est de la bioadvection ; les tubificidés sont des organismes convoyeurs [Rhoads, 1974].

Les Oligochètes n'irriguent pas leur terriers [McCall and Fisher, 1980]. Leur résistance à de faibles concentrations en oxygène dissous est une adaptation liée à cette niche écologique [Brinkhurst et Cook, 1974]. Les échanges respiratoires se font par diffusion cutanée, à l'extrémité terminale du corps qui dépasse du sédiment. La partie terminale de l'épithélium intestinal participe aussi aux échanges respiratoires. La longueur du corps hors du tube et la fréquence des battements de cette région postérieure sont en relation directe avec la concentration en oxygène dissous dans l'eau : lorsque les concentrations en oxygène diminuent, les vers augmentent la surface du corps qui sert aux échanges respiratoires en laissant sortir une plus grande partie postérieure de leur corps, amplifiant et accélérant les ondulations antérogrades.



### Intérêts en Ecotoxicologie

Certaines de leurs caractéristiques physiologiques et écologiques rendent les oligochètes d'eau douce très intéressants pour les études écotoxicologiques, notamment celles relatives aux rôles des sédiments en tant que compartiments d'accumulation des produits toxiques [Chapman, 2000 et 2001]:

- ils représentent une composante écologique importante des systèmes aquatiques (densités jusqu'à plusieurs dizaines de milliers d'individus/m<sup>2</sup>) ;
- beaucoup d'espèces ont une répartition géographique très large ;
- leurs modes de vie (construction de galeries dans le sédiment) et de nutrition (ingestion de sédiment en zone réduite) les exposent directement aux polluants présents dans le milieu. Ils peuvent ainsi se contaminer à la fois par la colonne d'eau et par le sédiment (eau interstitielle et particules) [Warren *et al*, 1998 ; Sager et Pucsko, 1991 ; Bervoets *et al.*, 1997].
- ils ont une taille suffisante pour permettre des études de bioaccumulation à l'échelle individuelle ou sur des lots d'effectif limité ;
- beaucoup d'espèces sont faciles à élever au laboratoire ;
- la majorité de ces oligochètes tolèrent une large gamme de caractéristiques physico-chimiques du sédiment et de la colonne d'eau, et deviennent dominants dans les communautés soumises à des perturbations (pollution organique des cours d'eau ou des lacs par exemple) [Rosso *et al.*, 1993 ; Brinkhurst, 1970] ;

Plusieurs études ont été réalisées sur la bioaccumulation des métaux par les tubificidés, en laboratoire [Back, 1990 ; Bouché *et al.*, 2000 ; Dean, 1974] ou sur le terrain [Bervoets *et al.*, 1997 ; Sager et Pucsko, 1991 ; Warren *et al*, 1998 ;]. D'autres auteurs ont travaillé sur la toxicité des métaux à l'égard de ces organismes [Brkovic-Popovic and Popovic, 1977 ; Chapman *et al.*, 1982 ; Khangarot, 1991 ; Whitley, 1967 ; Wiederholm *et al.*, 1987] ainsi que sur les mécanismes de détoxification mis en œuvre pour expliquer les tolérances observées [Deeds et Klerks 1999 ; Klerks et Bartholomew, 1991 ; Wallace *et al.*, 1998]. La réponse immunitaire des Oligochètes aux polluants (métaux et pesticides) a également été étudiée [Dhainaut et Scaps, 2001 ; Fugère *et al.*, 1996]. Cependant, il existe peu de travaux portant sur la perturbation du comportement des vers suite à une contamination. Leynen *et al* (1999) ont développé une technique originale permettant de suivre en continu l'effet de polluants métalliques sur la rétraction de l'extrémité postérieure du corps d'une population de tubificidés.





Mentionnons également qu'il existe un indice biologique basé sur les Oligochètes benthiques, afin de déterminer la qualité des milieux aquatiques, au même titre que les indices utilisant les diatomées, les macro-invertébrés benthiques ou les poissons par exemple. Désigné "Indice Oligochètes de Bioindication des Sédiments" ou IOBS (NF T90-390, AFNOR 2001), il est décrit comme représentatif de la qualité biologique des sédiments fins ou sableux, permanents et stables, des cours d'eau ou des canaux ; ses variations traduisent des tendances fortes sur l'incidence écologique des rejets polluants (charge organique, micropolluants organiques et métalliques). Il est basé sur des taxons à développement strictement aquatique, en général peu mobiles, recensés dans toutes les eaux continentales et ne présentant ni zonation ni distribution régionale dans les réseaux hydrographiques européens.

### **Echantillonnage**

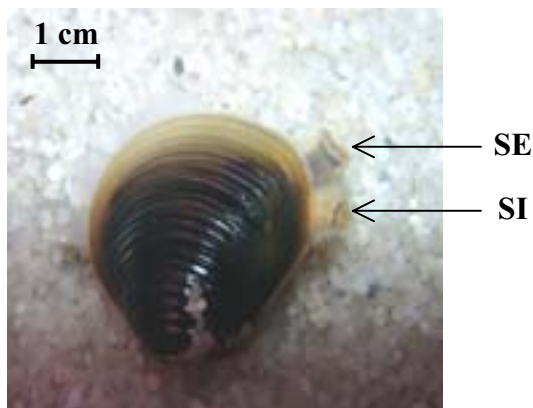
Les lots d'Oligochètes Tubificidae utilisés pour nos expériences ont été prélevés en milieu naturel par la Société Grebyl (Vers Tubifex – SARL GREBIL, ARRY, France). Ils sont constitués d'un mélange de trois espèces - *Tubifex tubifex*, *Limnodrilus hoffmeisteri* et *Limnodrilus claparedeianus* -, très proches d'un point de vue taxonomique, écologique et biologique. Les vers ont des tailles et donc des âges différents, ceci afin de respecter l'hétérogénéité au sein de ces communautés en milieu naturel. Les tubificidés ont été acclimatés au laboratoire pendant 15 jours, dans des bacs contenant du sédiment de Garonne. Des apports de nourriture ont été effectués 2 fois par semaine (Baby fish food, Tetramin, Tetra Werke, Allemagne).

Les vers ont été ensuite prélevés dans les bacs d'élevage par tamisage sous un courant d'eau à faible débit. Afin d'introduire une quantité constante d'organismes dans chaque UE, des lots de tubificidés de poids frais identique ont été confectionnés, puis introduits aléatoirement dans les UEs. La densité moyenne correspondant à cette biomasse et à la surface des sédiments dans les UEs est de 56 000 individus/m<sup>2</sup>. Elle est représentative de nombreux sites étudiés en milieu naturel [McCall et Fisher, 1980].

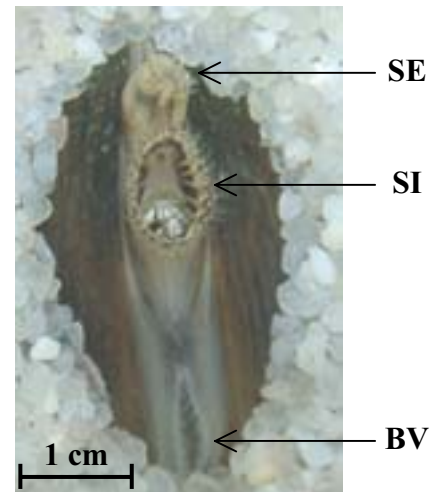
Pour chaque temps d'échantillonnage, les vers ont été prélevés en tamisant le sédiment de chaque UE sous un courant d'eau (maille de 500 µm) et en éliminant les matières sédimentaires adsorbées à la surface des organismes. Ils ont été ensuite pesés (poids frais, pf), puis séchés à l'étuve à 60°C pendant 72 h, afin de mesurer le poids sec (ps) correspondant. Quand le dosage des métaux n'était pas immédiat, ils ont été congelés à - 20°C.

Embranchement	Mollusques
Classe	Bivalves
Ordre	Eulamellibranches
Sous-Ordre	Hétérodontes
Super-Famille	Corbiculiacea
Famille	Corbiculidae
Genre	<i>Corbicula</i>
Espèce	<i>C. fluminea</i>

**Tableau II.6.** Systématique de *Corbicula fluminea* (Müller).



**Figure II.8.** *Corbicula fluminea*.



**Figure II.9.** Siphon inhalant (SI), siphon exhalant (SE) et boutonnière ventrale (BV) de *Corbicula fluminea*.

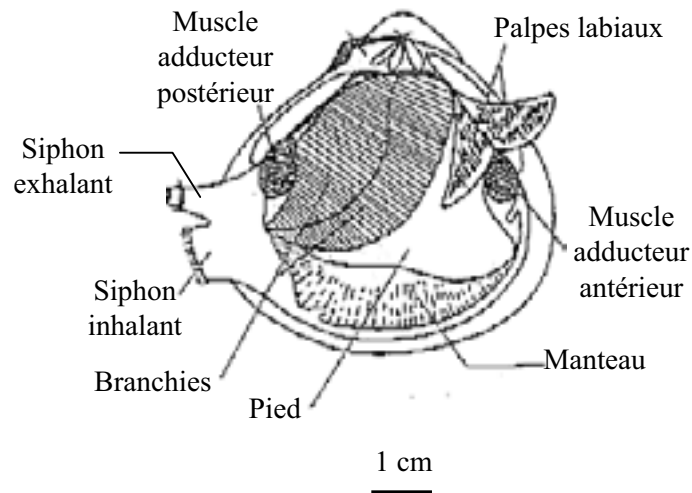
Comme nous l'avons mentionné précédemment pour les larves d'*H. rigida*, le sédiment contenu dans le tractus digestif des vers peut apporter un biais pour les mesures de bioaccumulation des métaux. Des procédures de dépuration ont été utilisées par plusieurs auteurs [Klerks et Bartholomew, 1991 ; Sager et Pucsko, 1991 ; Gillis *et al.*, 2002] mais elles représentent une voie potentielle de décontamination, difficilement quantifiable. Nous avons dosé les métaux sur des lots de vers sans élimination préalable du sédiment accumulé dans le tractus digestif, hormis pour l'expérience consacrée à l'étude des transferts des métaux à partir de la source "sédiment" (Partie III.C.2), au cours de laquelle les tubificidés provenant des unités contaminées ont été placés dans du sédiment très faiblement contaminé, la durée de la phase de vidange ayant été de 48 h.

### ***Corbicula fluminea***

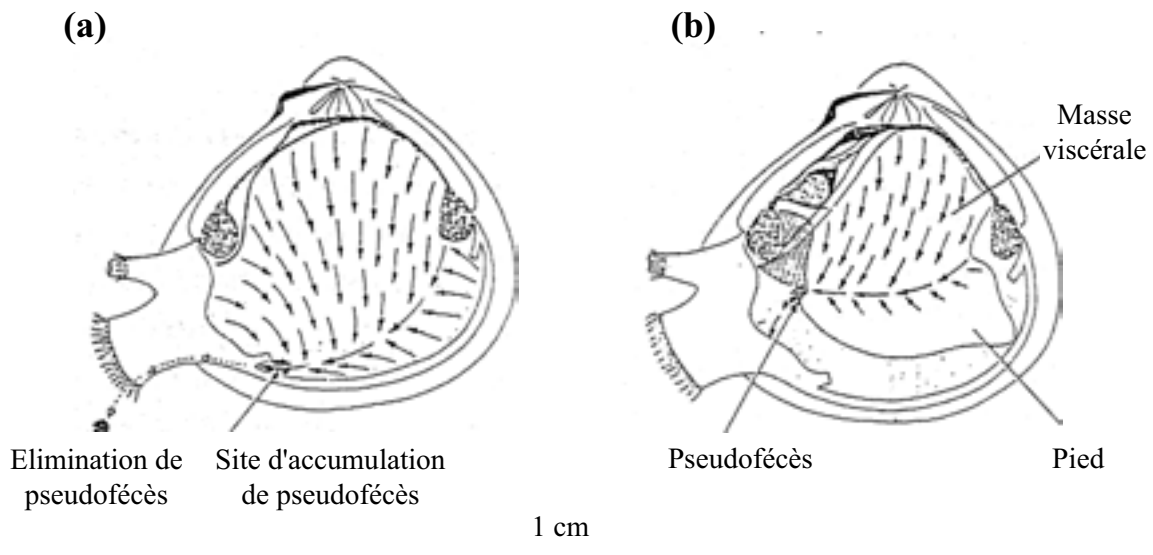
Afin d'étudier la biodisponibilité des métaux transférés dans la colonne d'eau des UEs à partir du sédiment, en présence ou en absence de bioturbation, nous avons utilisé le bivalve filtreur *Corbicula fluminea* ou "Asiatic clam" (palourde asiatique) (Figures II.8 et II.9). Sa systématique est présentée sur le Tableau II.6.

#### **Ecologie et répartition géographique**

Cette espèce est très étudiée en Ecotoxicologie, en tant que bioindicateur de la contamination des systèmes aquatiques continentaux : vivant enfoui dans les strates superficielles des sédiments, ce bivalve filtre d'importants volumes d'eau et peut ainsi accumuler de fortes quantités de produits toxiques présents à l'interface "colonne d'eau-sédiment". Il peut atteindre une taille de 5 cm et une longévité de 3 ans. C'est une espèce invasive, qui a d'abord colonisé les continents asiatique, africain et australien ainsi que la Nouvelle Guinée [McMahon, 1983 ; Zadhin, 1965], avant d'envahir le continent Nord-Américain. Elle est actuellement en phase d'expansion en Europe, dont elle a commencé la colonisation par la façade Ouest. Elle a été décrite pour la première fois dans la Dordogne (Sud-Ouest de la France) en 1978 et dans le Tage (Portugal) en 1980 [Mouthon, 1981]. Elle a été trouvée dans le Lac de Cazaux-Sanguinet, localisé au Sud du Bassin d'Arcachon, en 1988 [Roqueplo, communication personnelle]. C'est de ce lac non contaminé, au niveau de sa rive Est, que proviennent tous les lots d'organismes que nous avons utilisés au cours des différentes expériences.



**Figure II.10.** Anatomie des principaux organes de *C. fluminea* après ablation du lobe droit du manteau (d'après Britton et Morton, 1982, modifié).



**Figure II.11.** Trajet de l'eau inhalée par *C. fluminea*, et courants ciliaires au niveau du manteau (a) et de la masse viscérale (b) (d'après Britton et Morton, 1982, modifié).

*C. fluminea* possède une bonne capacité d'adaptation et peut subir de fortes variations des facteurs abiotiques. Elle peut vivre dans des milieux où la salinité atteint 8 ‰, supporte des températures allant de 2 à 35°C [Mc Mahon, 1983 ; Sickel 1986] et peut s'adapter dans des biotopes où la saturation en oxygène ne dépasse pas 10 % [Tran, 2001]. Elle colonise aussi bien les systèmes lotiques que lenticques. Elle semble préférer les substrats grossiers de gravier ou de sable, mais s'accommode des substrats fins et mous, comme les argiles et les limons des fonds vaseux. Les densités atteintes peuvent être considérables, supérieures à 100 000 individus par m<sup>2</sup> [Britton et Morton, 1982]. *C. fluminea* est un filtreur microphage, qui se nourrit préférentiellement d'algues unicellulaires, de débris organiques et de bactéries.

### **Anatomie et biologie**

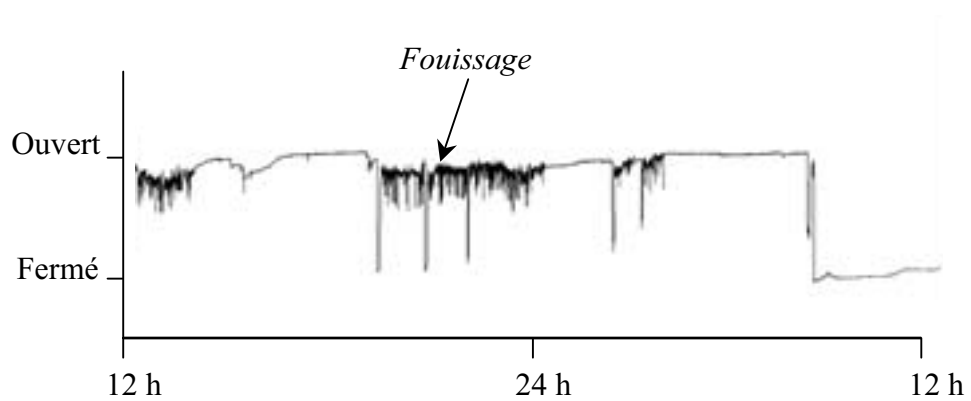
*C. fluminea* (Müller), comme tous les bivalves, est constitué de 2 parties distinctes: la coquille, formée de 2 valves, et le "corps mou". Le corps mou (Figure II.10) regroupe quatre ensembles tissulaires majeurs: le manteau, les branchies, la masse viscérale et le pied.

#### ***Le manteau***

C'est un épithélium très mince qui recouvre entièrement la face interne de la coquille et englobe l'ensemble des organes du corps mou. Les deux lobes du manteau fusionnent postéro-latéralement pour former les siphons inhalant et exhalant. Sur les bords externes des siphons se trouvent des cils sensoriels avec des mécano-récepteurs et des chémo-récepteurs sensibles à certaines variations du milieu environnant. La surface interne de l'épithélium est tapissée de cils qui transportent les particules non absorbées, engluées dans du mucus et qui sont éliminées sous forme de pseudo-fécès par le siphon inhalant.

#### ***Les branchies***

Chacune des deux branchies est formée de deux hémibranchies, la plus interne étant la plus grande. Ces hémibranchies sont constituées de filaments branchiaux sur lesquels se trouvent les cils, à l'origine de l'activité ventilatoire qui permet les échanges respiratoires (Figure II.11). Il existe trois types de cils : les cils latéraux, qui créent le courant d'eau à travers les branchies ; les cils latéraux-frontaux, qui retiennent les particules potentiellement nutritives et les conduisent vers les cils frontaux, qui les acheminent vers les palpes labiaux, puis vers la bouche. L'efficacité de rétention est de 100 % pour des particules comprises entre 4 et 20 µm [Way *et al.*, 1990].



**Figure II.12.** Enregistrement valvométrique montrant l'activité de fouissage de *Corbicula fluminea* le jour de son introduction dans l'unité expérimentale (d'après Tran et al., 2003, modifié).

La reproduction de *C. fluminea* est hermaphrodite protandre. Après fécondation, les œufs sont incubés dans la cavité suprabranchiale, au niveau du feuillet interne de la branchie. Les larves pédivéligères sont ensuite libérées dans le milieu : elles ont l'aspect d'un minuscule bivalve adulte [Mc Mahon, 1983 ; Tachet, 2000] avec un pied bien développé et une taille d'environ 0,20 mm [Mc Mahon, 1983].

### ***La masse viscérale***

Ce terme désigne un ensemble de plusieurs organes. L'appareil digestif est composé de la bouche et des 4 palpes labiaux qui l'entourent, de l'œsophage, de l'estomac équipé d'un stylet cristallin (condensé d'enzymes digestives), du tractus digestif, du rectum et de l'anus. En plus de ce système digestif, la masse viscérale est composée du système reproducteur femelle ou mâle et du système circulatoire, constitué du cœur formé d'un ventricule et de deux oreillettes dans la cavité péricardique, du système artériel et lacunaire. L'hémolymphe représente 50 à 60 % de la masse totale du corps mou [Booth et Mangum, 1978 ; Inza, 1996].

### ***Les muscles adducteurs et le pied***

*C. fluminea* possède deux muscles adducteurs: un postérieur et un antérieur. Ils sont à l'origine de l'activité valvaire. Le pied de *C. fluminea* sert à l'enfouissement dans le substrat. Il est très musculeux. Par des phénomènes de turgescence, il se gonfle d'hémolymphe et participe aux mouvements de fouissage, associés à des ouvertures et fermetures brusques des valves. Ce comportement est particulièrement visible lors des enregistrements valvométriques (cf Figure II.12). L'ensemble de ces mouvements est utilisé par l'animal pour se positionner à l'interface eau/sédiment. De plus, la surface du pied est ciliée, permettant une remontée des particules nutritives présentes dans le sédiment, de tailles relativement grandes, lorsque l'animal se trouve dans une eau très pauvre en matières en suspension (algues, bactéries, détritiques organiques) : c'est le "pedal feeding" [Reid *et al.*, 1992].

### **Intérêts en Ecotoxicologie**

Bien que benthique, *C. fluminea* ne possède pas d'activité de bioturbation significative. Son pied musculeux lui permet de s'enfouir dans le substrat, puis il ne bouge quasiment pas. Ceci a été vérifié au cours de nos expériences (cf Partie III.A.1,2). C'est un modèle biologique couramment utilisé en Ecotoxicologie pour des études *in-situ*, à partir de populations "sauvages" ou transplantées ("caging") – [Andres *et al.*, 1999 ; Baudrimont *et al.*, 1999,





2003], et au laboratoire [Inza, 1996]. Ceci se justifie par plusieurs de ses caractéristiques biologiques et écologiques :

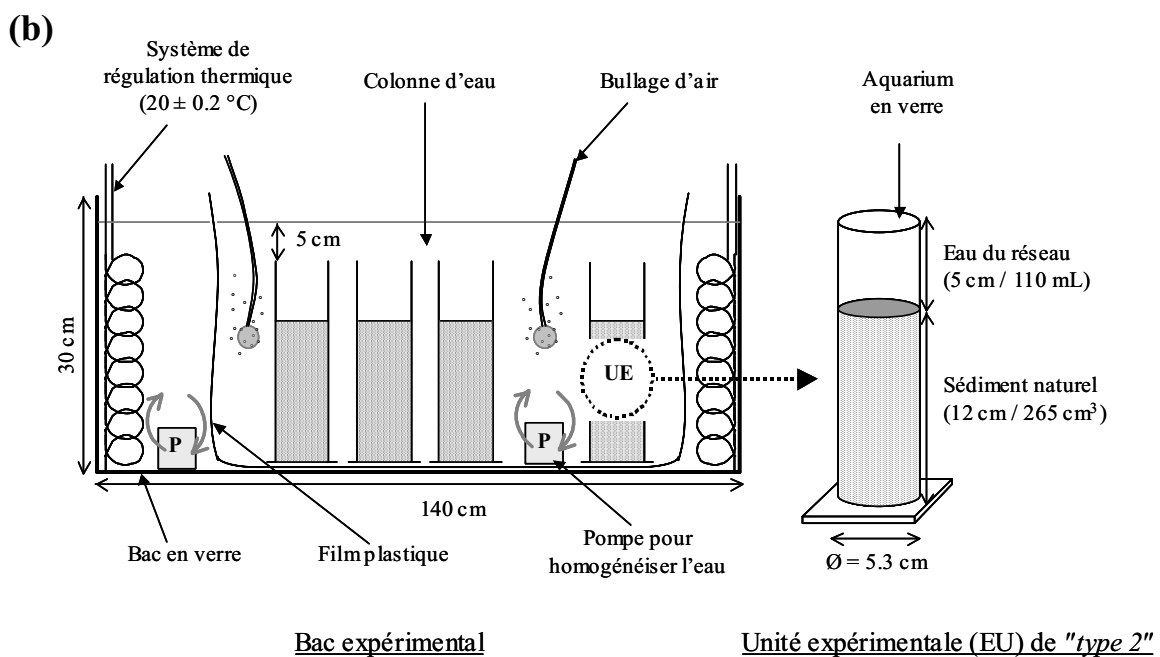
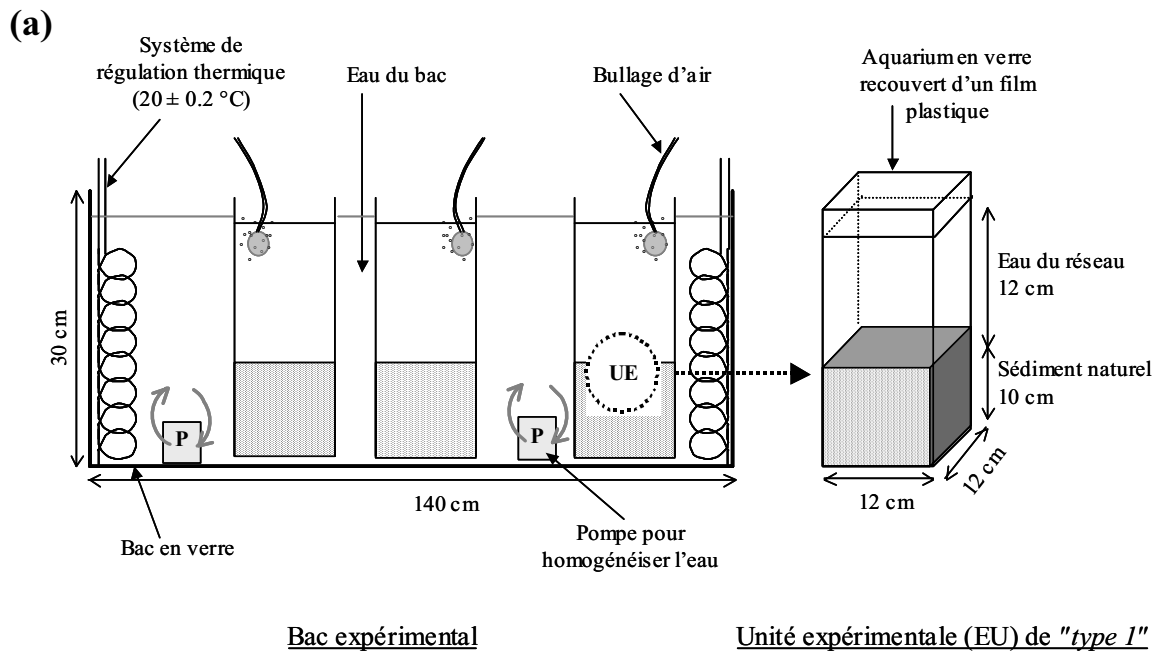
- abondance dans le milieu naturel, qui rend facile sa collecte en grandes quantités et la constitution de lots homogènes
- tolérance aux variations physico-chimiques de l'environnement
- taille suffisante pour permettre une dissection des principaux compartiments tissulaires du corps mou, et longévité élevée (plusieurs années)
- sédentarité et très large répartition géographique
- activité de filtration, qui le rend capable de bioaccumuler les polluants à l'état de traces dans la colonne d'eau, que se soit en phase dissoute (contamination par voie directe) ou bien adsorbés sur des particules potentiellement nutritives (contamination par voie trophique).

### **Echantillonnage**

Les *C. fluminea* utilisés provenaient tous du Lac de Cazaux-Sanguinet (Gironde, France), où la densité moyenne est proche de 500 individus/m<sup>2</sup>. Cette station, localisée sur la rive Est du Lac, est utilisée comme site d'approvisionnement pour l'ensemble des recherches menées sur ce bivalve au sein du LEESA, recherches en laboratoire et transplantations le long du gradient de pollution poly-métallique sur le fleuve Lot. Pour chaque expérience, plusieurs centaines de bivalves ont été collectés et triés sur le terrain, afin d'obtenir des lots homogènes en taille. Ils ont été ensuite acclimatés au laboratoire pendant 15 jours. Des apports d'algues (*Scenedesmus subspicatus*) ont été réalisés 3 fois par semaine dans les enceintes de stabulation.

Un deuxième tri des organismes a été effectué lors de la préparation des lots pour les expériences, afin de sélectionner les bivalves d'une longueur antéro-postérieure moyenne de 25 mm. Des travaux antérieurs ont montré une très bonne corrélation entre la longueur de la coquille et le poids frais du corps mou [Inza, 1996]. Les individus ont été introduits dans les UEs après randomisation.

A chaque temps d'échantillonnage, les bivalves ont été collectés manuellement à la surface du sédiment, rincés et congelés entiers à - 20°C. Les corps mous entiers ont été ensuite décongelés, pesés (pf) puis préparés pour les dosages métalliques (cf Partie II.B.2.2).



**Figure II.13.** Les dispositifs expérimentaux utilisés.

## II.A.2. LES DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX

### II.A.2.1. Montages expérimentaux

Les UEs de chacune des expériences ont été placées dans des grands bacs (140\*65\*30 cm), équipés d'un système automatisé de thermorégulation (chauffage et système de refroidissement). La température de l'eau des bacs a été fixée à 20 °C, pour la majorité des études. Deux types de montages expérimentaux ont été utilisés selon le type d'UEs. Les UEs de "type 1" ont été placées dans les bains-marie de façon à ce que les colonnes d'eau ne communiquent pas entre elles ni avec l'eau du bac (Figure II.13.a). Les UEs de "type 2" étaient recouvertes par 5 cm d'eau du bac de régulation (Figure II.13.b). Ceci a permis d'avoir une homogénéité des colonnes d'eau des différentes UEs présentes dans un même bac expérimental et correspondant à une même condition de contamination. Plusieurs pompes immergées ont assuré l'homogénéité de la colonne d'eau par un brassage permanent (Seltz S10 – Hydor, Bassano del Grappa, Italy).

Des bulleurs (Rena 301– Rena, Annecy, France) ont permis d'assurer un apport constant en O<sub>2</sub> ainsi qu'une homogénéisation de la colonne d'eau. Ces bulleurs étaient placés dans la couche supérieure de la colonne d'eau de chacune des UEs de "type 1", avec un faible débit pour éviter tout brassage à la surface des sédiments. Pour les UEs de "type 2", plusieurs bulleurs étaient disposés dans les bacs expérimentaux. Des contrôles fréquents en divers points des enceintes ont révélé une absence de gradient significatif pour les principaux paramètres physico-chimiques mesurés (température, pH, oxygène dissous).

Pour l'expérience III.3.A, les bacs étaient équipés de 2 tubes néons (Sylvania F36W/GRO) placés à 45 cm de la surface de l'eau et contrôlés par des minuteurs programmables. La photopériode était de 12h/24h. Pour toutes les autres expériences, nous avons utilisé l'éclairage et la photopériode naturels.

### II.A.2.2. Suivi des paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau

Différents paramètres physico-chimiques ont été mesurés régulièrement dans la colonne d'eau des UEs de "type 1" ou dans les bacs renfermant les UEs de "type 2". La température a été mesurée quotidiennement (Thermomètre EverSafe – Fisher-Bioblock Scientific, Illkirch, France). La turbidité a été suivie régulièrement par mesure avec un turbidimètre (HI 93703 Turbidity Meter – HANNA Instrument, France), ainsi que le pH et la concentration en



oxygène dissous (MO128 Dissolved Oxygen Meter et MP120 pH Meter – Mettler – Toledo GmbH Analytical, Schwerzenbach, Suisse). Les mesures néphéométriques sont exprimées en FTU ("Formazine Turbidity Unit"), unité équivalente au NTU ("Nephelometric Turbidity Unit").

### **II.A.3. SOURCES ET FACTEURS DE CONTAMINATION, CONTROLES DES CONDITIONS D'EXPOSITION**

Selon les expériences, la source de contamination a été la colonne d'eau ou le sédiment.

#### **II.A.3.1. Contamination par la colonne d'eau**

Pour l'expérience de la Partie III.B, la source de contamination en Cd a été la colonne d'eau. Les UEs utilisées étaient de *type 2* ; elles étaient donc regroupées dans des bacs expérimentaux et avaient une colonne d'eau commune (Figure II.13.b). Trois bacs ont été utilisés, un pour chacune des conditions expérimentales : deux avec une colonne d'eau contaminée en Cd à  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ , le troisième renfermant une colonne d'eau non contaminée. Afin de maintenir la pression de contamination constante tout au long des 56 jours de l'expérience, et de limiter les variations des concentrations en Cd entre les deux conditions contaminées, la colonne d'eau de chacun des bacs a été entièrement renouvelée chaque jour et remplacée par de l'eau préalablement contaminée à  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd. La colonne d'eau du bac correspondant à la condition "non contaminée" a été renouvelée simultanément, afin que toutes les UEs subissent les mêmes perturbations. Le sédiment utilisé dans cette expérience était non contaminé (sédiment de Cadaujac, Garonne aval).

#### **II.A.3.2. Contamination par le sédiment**

Pour les expériences de la Partie III.C, la source de contamination initiale a été le sédiment. Ces expériences ont reposé sur l'introduction dans les UEs d'un sédiment naturel contaminé en Cd, mais renfermant également plusieurs autres métaux (Zn, Cu, ...). Ce sédiment a été collecté dans la retenue du barrage hydroélectrique de Cajarc (fleuve Lot) (Figure I.1). Il a été prélevé, stocké et introduit dans les unités expérimentales comme décrit dans la partie II.A.1.3. Les UEs utilisées ont été de *type 1*. Elles ont été disposées dans les bains maries de façon aléatoire, sans que les colonnes d'eau ne communiquent (Figure II.13a).



### **II.A.3.3. Contrôle des conditions d'exposition**

Pour chacune des expériences dont la source de contamination était le sédiment, un suivi régulier des concentrations métalliques dissoutes (filtration à 0.2  $\mu\text{m}$ ) et totales (pas de filtration) dans la colonne d'eau a été effectué. 20 mL d'eau ont été prélevés à des temps pré-établis, dans la partie centrale de la colonne d'eau des UEs (*type 1*) : 10 mL ont été acidifiés directement avec 200  $\mu\text{L}$  d' $\text{HNO}_3$  (65 %  $\text{HNO}_3$  - Merck, Darmstadt, Allemagne), stockés à + 4°C puis dosés pour déterminer les concentrations métalliques en Cd et/ou Zn ; les 10 mL restants ont été filtrés à 0,2  $\mu\text{m}$  (filtres à Membrane SFCA, Nalge Nunc International Corporation, New York, USA) ou à 0,45  $\mu\text{m}$  (filtres en acétate de cellulose, Whatman, Royaume-Uni), acidifiés avec 200  $\mu\text{L}$  d' $\text{HNO}_3$  puis stockés à 4°C jusqu'au dosage (Partie II.B.2).

Dans le cas d'une source de contamination par la colonne d'eau, un contrôle rigoureux des conditions d'exposition a été réalisé. Les échantillons d'eau (échantillons non-filtrés – 10 mL) ont été prélevés dans la partie centrale des trois bacs expérimentaux, avant et après chaque renouvellement du milieu, afin de mesurer les décroissances des concentrations métalliques au cours de chacun des cycles, par rapport à la contamination consécutive à chaque renouvellement.

## **II.A.4. PLANS D'EXPERIENCE ET TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES**

### **II.A.4.1. Plans factoriels d'expérience**

En relation avec nos objectifs de recherche, des plans factoriels d'expérience ont été réalisés. Dans la mesure du possible et selon le nombre de conditions expérimentales prises en compte simultanément, nous avons mis en place des plans complets, renfermant une condition expérimentale "témoin" pour chaque condition de contamination étudiée. Nous avons prêté une attention particulière à la répétitivité de nos résultats, en mettant en place 3 ou 4 réplicats (UEs différentes) pour chacune des conditions expérimentales étudiées et pour chaque temps d'échantillonnage.

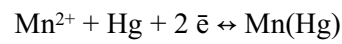
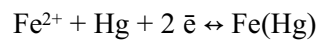
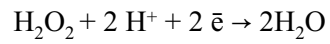
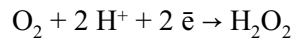
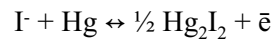
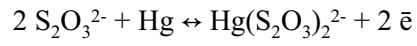




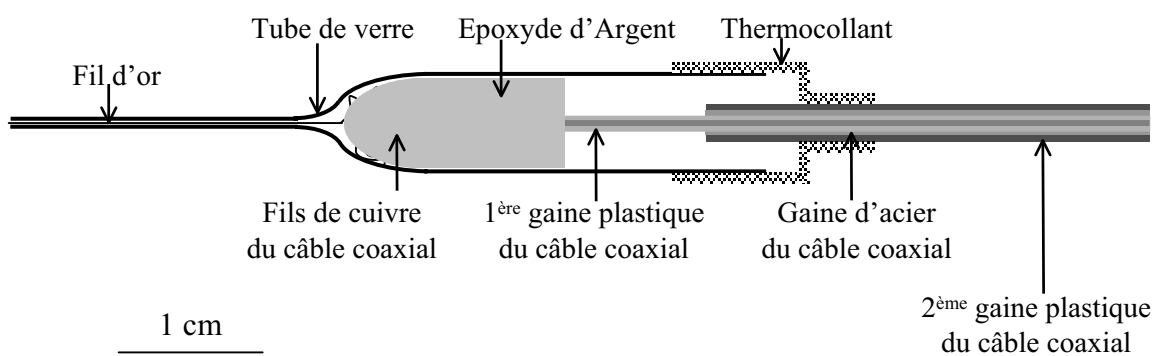
### II.A.4.2. Analyses statistiques

Les données brutes ont été saisies sous *EXCEL*, et transformées en variables utilisables (rapports pf/ps, concentrations, teneurs relatives, teneurs totales, flux, etc...). Nous avons ensuite calculé les moyennes, écart types et erreurs standards de ces différentes variables. Les moyennes accompagnées de leur écart types ou de leurs erreurs standards, ont été reportées sur des graphiques, sous *EXCEL* et/ou *SIGMAPLOT*.

Le traitement des données pour définir la significativité des différences en réponse aux différents facteurs pris en compte a reposé sur les analyses de variance. Avant de réaliser ces analyses, les hypothèses de base (normalité et homéoscédasticité du terme d'erreur) ont été vérifiées, à la fois graphiquement et en utilisant des tests ad-hoc (test d'ajustement de Kolmogorov-Smirnov et test de Levene). Quand ces hypothèses n'étaient pas vérifiées, nous avons effectué une transformation BOX-COX des données [Sparks, 2000]. Les analyses de variance (ANOVA) à un, deux ou trois facteurs (condition expérimentale, durée d'exposition, profondeur par exemple) ont été suivies par des tests post-hoc (Least Significant Difference test ou LSD), afin de préciser les différences significatives mises en évidence entre chaque modalité des facteurs. La significativité des effets observés a été fixée au risque  $p < 0.05$ . Le logiciel d'analyse statistique utilisé a été *STATISTICA* (Statistica 5.1 – Ed. 97 - StatSoft – Tulsa, USA). Le symbole " \* " a été ajouté sur les graphiques pour indiquer la significativité des différences entre les valeurs moyennes.



**Figure II.14.** Séquences de réactions sur l'électrode polarographique Au/Hg.



**Figure II.15.** Schéma d'une microélectrode polarographique avant polissage.

## II.B. LES OUTILS METHODOLOGIQUES

---

### II.B.1. ANALYSES GEOCHIMIQUES

#### II.B.1.1. Microélectrodes polarographiques

Les microélectrodes polarographiques sont de très fines électrodes ( $\varnothing < 1\text{mm}$ ) permettant de mesurer, dans l'eau interstitielle des sédiments, cinq des principales espèces rédox dissoutes impliquées dans la diagenèse précoce :  $\text{O}_2$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{I}^-$  et  $\text{HS}^-$ . Elles détectent les particules électro-réactives de taille inférieure à 50 angströms. Cette technique a été mise au point en 1995 par Brendel [Brendel, 1995 ; Brendel et Luther, 1995 ; Luther *et al.*, 1998]. Les microélectrodes ont été fabriquées et utilisées en collaboration étroite avec le Département de Géologie et Océanographie (P. Anschutz – DGO, UMR CNRS 5805, Université Bordeaux 1). Les réactions qui se produisent sur l'électrode Au/Hg, pour les espèces "rédox" étudiées dans ce mémoire, sont résumées sur la Figure II.14.

Trois électrodes différentes sont nécessaires pour les mesures :

- microélectrode voltamétrique, qui va pénétrer dans le sédiment. C'est l'électrode de travail, constituée d'or et de mercure (Au/Hg).
- électrode de référence en argent et chlorure d'argent (Ag/AgCl). Elle reste dans la colonne d'eau. C'est une électrode classique, constituée d'un fil d'argent trempant dans une solution de AgCl.
- électrode de comptage en platine (Pt), de 0,5 mm de diamètre. Elle reste aussi dans la colonne d'eau. Elle est constituée par un fil de platine connecté à un câble électrique.

#### Fabrication des microélectrodes polarographiques

La fabrication de l'électrode polarographique (Figure II.15) ainsi que les mesures, ont été réalisées en appliquant le protocole défini par Anschutz *et al.* (2000). Tout d'abord, des tubes de verre d'environ 7 mm de diamètre ont été chauffés sur une flamme et étirés, afin d'obtenir une extrémité très fine, de la taille d'un capillaire. Ces tubes étirés ont été ensuite rincés à l'acétone. Un fil d'or (Au = 99.98 %) très fin (100  $\mu\text{m}$ ), nettoyé à l'acétone, a été inséré à l'intérieur du capillaire et serti dans le verre par passage rapide dans la flamme. Le fil d'or a été connecté par sa partie supérieure aux fils de cuivre d'un câble coaxial (BNC). La partie inférieure du fil d'or dépassait légèrement du capillaire. La jonction électrique entre l'or et le



câble coaxial a été renforcée en injectant de l'époxyde d'argent dans le tube de verre, par sa partie la plus large. Un fil thermocollable a été glissé en haut de l'électrode pour maintenir le câble de cuivre et l'or à l'intérieur. L'époxyde d'argent a alors été séché 4 h à l'étuve à 65°C.

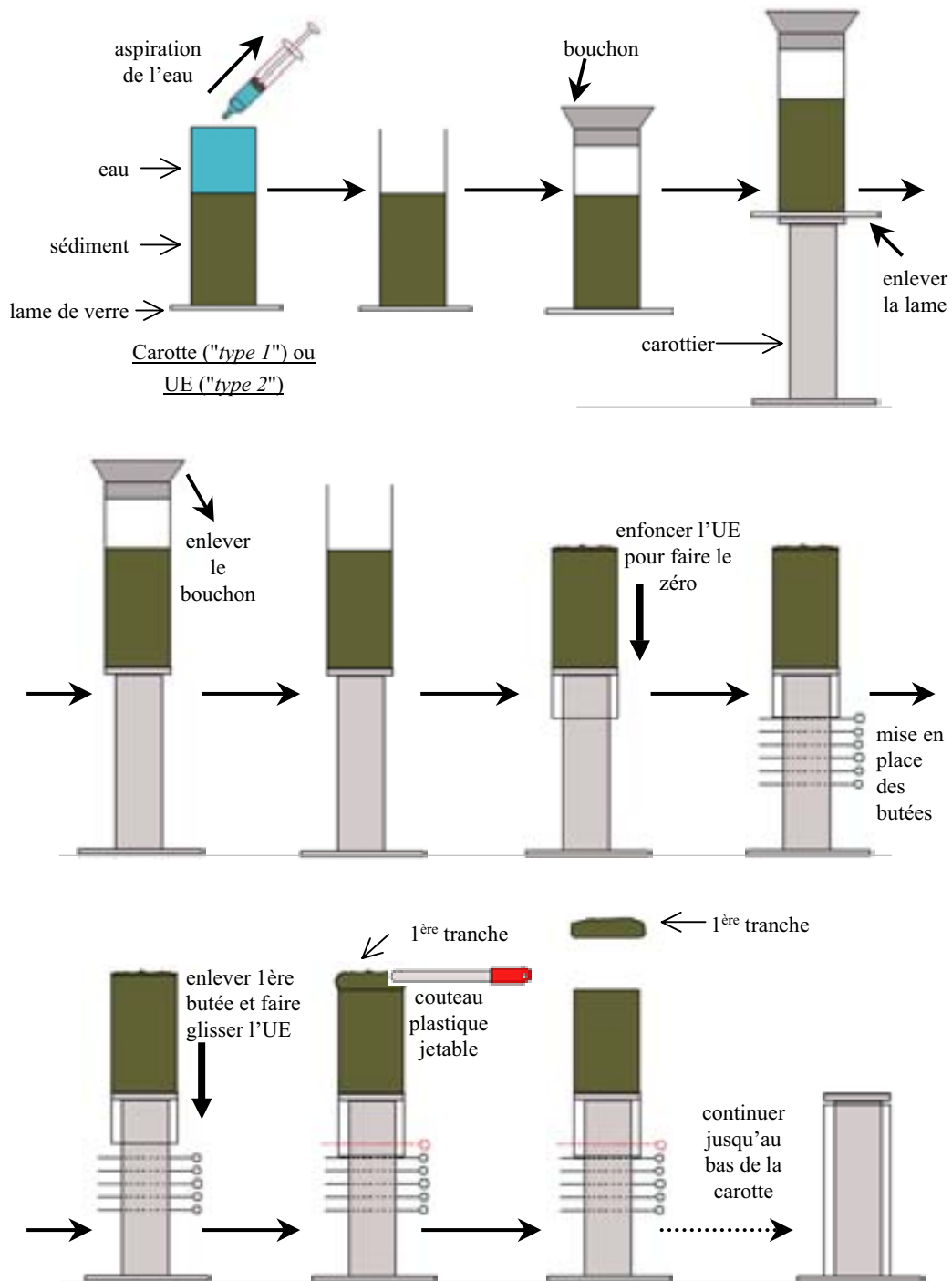
L'extrémité de l'électrode a ensuite été polie avant le placage au mercure, afin que le mercure se dépose uniformément sur la section du fil d'or. Pendant le polissage, l'électrode a été maintenue par un micromanipulateur au-dessus d'un disque rotatif motorisé, sur lequel a été collé la surface de polissage. Pendant le polissage, l'extrémité de l'électrode, très fragile, a été délicatement maintenu à la main. Le premier polissage a été effectué avec un papier émeri très fin. Ensuite, les polissages successifs ont été réalisés avec des pâtes diamantées de plus en plus fines (15 ; 6 ; 1 ; 0,1  $\mu\text{m}$ ). Entre chacune de ces étapes, l'électrode a été nettoyée dans un bain d'acétone, à l'intérieur d'une cuve à ultrasons. L'efficacité du polissage a été systématiquement vérifié sous microscope (x 30).

Le placage de mercure a été réalisé en utilisant le matériel d'acquisition des données : un générateur de courant continu, l'analyseur électrochimique DLK 100-A (Analytical Instrument Systems, Inc.) et un ordinateur. Pour le placage, les extrémités des trois électrodes (Au/Hg, Ag/AgCl et Pt) ont été placées dans une solution de mercure ( $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  à 0,1 M ; pH=1,5). Les trois électrodes ont été connectées au polarographe et le placage a été réalisé à -100 mV, pendant 5 min. Seule l'électrode de travail a amalgamé le mercure sur la surface d'or polie. L'efficacité et la régularité du placage ont été vérifiées sous microscope.

La dernière étape a été la polarisation de la nouvelle microélectrode, afin de renforcer l'amalgame "Au/Hg". La microélectrode et l'électrode de comptage en platine baignaient dans une solution de NaOH à 1 M. La microélectrode a été connectée à la borne négative d'une pile de 9 V, alors que l'électrode de référence était connectée à la borne positive, ceci pendant 2 min. Après cette phase finale de polarisation, l'électrode est prête à l'emploi. La durée moyenne d'utilisation est de 2 ou 3 jours ; ensuite, le mercure diffuse dans l'or et l'électrode ne fonctionne plus normalement.

### **Acquisition des données**

La première étape de l'utilisation des microélectrodes polarographiques a consisté à effectuer leur calibration pour les différents paramètres mesurés. Les relations entre les mesures du polarographe et les concentrations des éléments dissous sont linéaires. Un seul point de mesure suffit donc pour les calibrer. Les trois électrodes ont été connectées au polarographe, leur extrémité trempant dans de l'eau aérée. Une séquence de mesure a été lancée pour faire le 100 % d' $\text{O}_2$ .



**Figure II.16.** Procédure de découpage en tranches des carottes de sédiment.

Pour les mesures au sein des UEs avec l'analyseur électrochimique DLK 100-A, l'électrode de référence et la contre-électrode ont été fixées dans la colonne d'eau de l'unité. La microélectrode de mesure a été descendue lentement dans la colonne d'eau, puis dans le sédiment à l'aide d'un micromanipulateur. Deux points de mesure ont été réalisés tous les mm, un point par méthode d'analyse. Les mesures d'oxygène, dont la réduction sur le mercure est irréversible, ont été effectuées en mode voltamétrique "Linear Sweep", par balayage de  $-0,1$  à  $-1,7$  V, à  $200 \text{ mV s}^{-1}$ , après 10 s d'équilibration à  $0,1 \text{ V}^4$ .

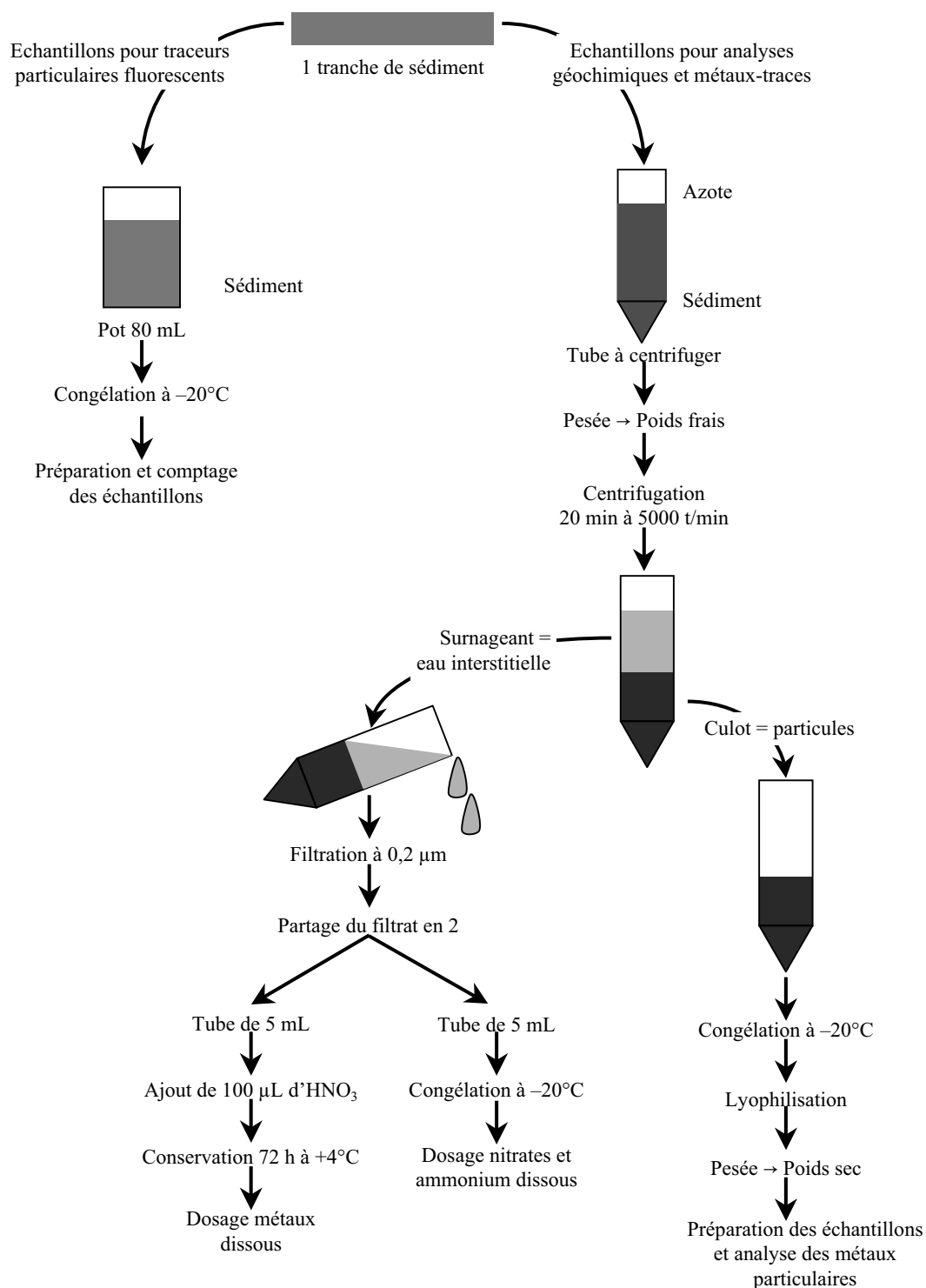
### **II.B.1.2. Carottage et échantillonnage des eaux interstitielles et des phases particulières**

Des carottages ont été effectués dans le sédiment des UEs lors de certaines expériences. Dans le cas des UEs de *type 1*, la colonne d'eau a été aspirée délicatement avec un tuyau (siphonage), puis avec une grosse seringue (Figure II.16). Un cylindre de plexiglas de 5,3 cm de diamètre a été enfoncé dans le sédiment, puis retiré avec la carotte de sédiment à l'intérieur. La carotte a été placée sur un carottier fabriqué au laboratoire (composé d'un piston sur lequel est placé le socle de l'unité), afin de découper des tranches de sédiment d'épaisseurs prédéterminées. Les UEs de *type 2* ont été sorties du bac expérimental et leur colonne d'eau a été enlevée avec une grosse seringue. Le joint en silicone à la base des UEs a été découpé au scalpel afin de retirer le socle de verre. Les unités ont été placées entières sur le carottier pour y être découpées. L'épaisseur des tranches de sédiment a été contrôlée par un système de butées, espacées de 0,5 cm. Les tranches de sédiment ont été découpées avec des couteaux de plastique jetables, qui ont été changés après chaque tranche pour éviter toute contamination d'une tranche de sédiment à l'autre. Les tranches destinées au comptage des traceurs particuliers fluorescents (luminophores et microsphères) ont été récupérées dans des pots en polypropylène (80 mL, Plastiques Gosselin, Hazebrouck, France) et conservées au congélateur à  $-20^\circ\text{C}$ . Le traitement de ces échantillons sera détaillé dans la Partie II.B.4.1.

Les tranches de sédiment destinées aux dosages du cadmium ont été recueillies dans des tubes à centrifuger en polypropylène bouchés (50 mL –Bibby Sterilin Ltd, Stone, Angleterre)

---

<sup>4</sup> Seuls les résultats des profils d'oxygène seront présentés dans ce mémoire, à partir des données acquises lors de l'expérience visant à étudier l'influence de la bioturbation sur les flux métalliques de la colonne d'eau vers le compartiment "sédiment" (Partie III.B.1). Les autres éléments mesurés à l'aide des micro-électrodes (Mn, Fe, ...) n'ont pas pu être utilisés, le temps imparti ne nous ayant pas permis de traiter les nombreuses données collectées.



**Figure II.17.** Méthode de séparation des compartiments "eau interstitielle" et "particules" pour les tranches de sédiment découpées sur les carottes.



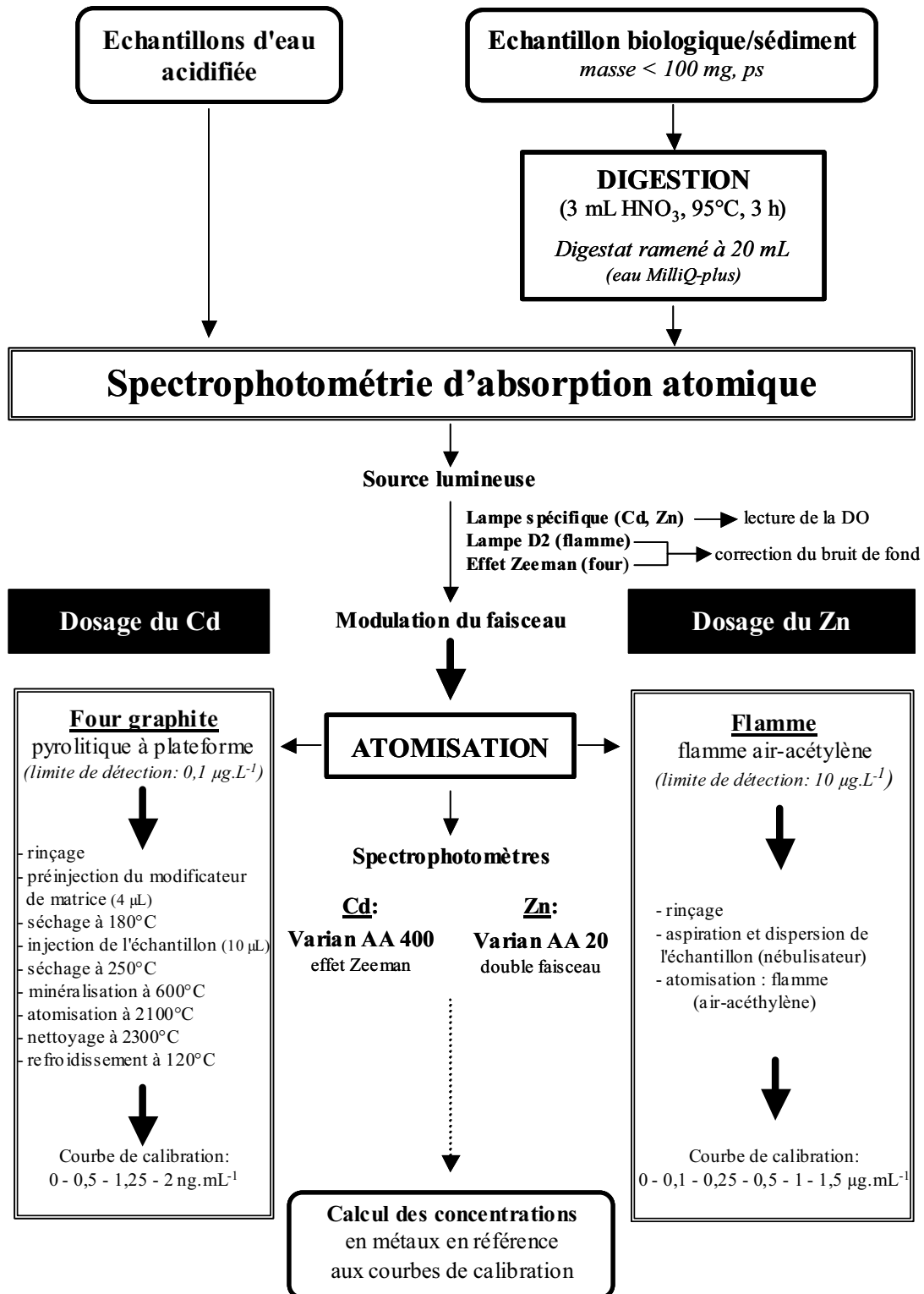
et sous atmosphère d'azote (Azote 4.5 – Linde Gas s.a., Toulouse, France) (Figure II.17). Les tubes ont été pesés (pf), centrifugés 20 min à 5000 t/min à 20°C (Sigma 3K12 – Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France). Le surnageant de chacune des tranches de sédiment, correspondant à l'eau interstitielle, a été filtré à 0,2 µm (Filtres seringues – Membrane SFCA – Nalge Nunc International Corporation, New York, USA) et réparti dans 2 tubes de 5 mL en polypropylène (Porex Bio Products Group – USA). Dans un de ces tubes, 100 µL d'HNO<sub>3</sub> (65 % HNO<sub>3</sub>, Merck, Darmstadt, Allemagne) ont été ajoutés ; cet échantillon, qui servira à l'analyse du Cd dissous dans l'eau interstitielle, a été conservé à + 4°C. Le deuxième tube a été congelé à – 20°C ; il est destiné au dosage ultérieur d'autres éléments (Mn, Fe, nitrates, ammonium). Le culot de chacun des tubes à centrifuger (phase particulaire du sédiment) a été congelé puis lyophilisé et pesé (ps). 60 à 80 mg de ces particules homogénéisées ont été prélevés pour le dosage du Cd (préparation des échantillons et dosages décrits au Parag. II.B.2.2).

### **II.B.1.3. Granulométrie**

La mesure de la granulométrie des particules sédimentaires a été réalisée avec un diffractomètre laser (MALVERN Master sizer). Cet appareil mesure la taille des particules par diffraction et diffusion laser, pour des dimensions allant de 0,05 à 600 µm. Les particules passant dans un faisceau laser vont provoquer une déviation d'une certaine quantité de lumière selon des angles inversement proportionnel à la taille des particules. La quantité de lumière déviée est proportionnelle à la taille des particules et à leur concentration. Nous avons utilisé la classification d'Inmam (1952) pour définir les différentes fractions granulométriques, passant des argiles aux sables grossiers. Les unités sédimentaires sont définies par les histogrammes de fréquences et par la moyenne granulométrique.

### **II.B.1.4. Carbone organique particulaire (COP)**

Les mesures du carbone organique total (COT) ou particulaire (COP) ont été réalisées sur des échantillons de sédiment lyophilisé, grâce aux équipements disponibles au DGO (H. Etcheber et coll.). L'appareil de mesure était un LECO Carbone-Soufre (modèle C-S 125). Pour la mesure du COP, les échantillons ont subi une décarbonatation avec une solution d'HCl-2N. L'erreur moyenne sur le dosage est estimée à ± 3 - 4 mmol.g<sup>-1</sup>.



**Figure II.18 :** Principales étapes de la procédure analytique pour le dosage du cadmium et du zinc par Spectrophotométrie d'Absorption Atomique (four graphite pyrolytique ou flamme) pour les échantillons biologiques, de sédiment et d'eau.

## **II.B.2. MESURES DES METAUX-TRACES**

### **II.B.2.1. Préparation des échantillons**

Les dosages métalliques dans l'eau ont été effectués directement sur les échantillons après acidification, pour les prélèvements d'eau filtrée (fraction dissoute) ou non filtrée (fraction totale) ou pour les échantillons d'eau interstitielle recueillis par centrifugation et après filtration.

Les dosages des métaux dans les échantillons biologiques (organismes entiers ou organes – frais ou séchés) ou les échantillons de sédiments (séchés) nécessitent une étape préalable de digestion dans d'acide nitrique (65 % HNO<sub>3</sub>, - Merck, Darmstadt, Allemagne), à 100°C, pendant 3 h, en milieu pressurisé. Cette digestion permet de détruire les matrices organiques et de libérer les métaux sous forme inorganique. Les digestats ont été ensuite dilués dans de l'eau ultra-pure (MilliQ plus - qsp 20 mL) et conservés à + 4°C jusqu'à l'étape de dosage.

### **II.B.2.2. Dosages des métaux-traces**

#### **Dosage du cadmium**

Le dosage du Cd (Figure II.18) a été réalisé en Spectrophotométrie d'Absorption Atomique (SAA) (Varian AA 400 avec correction Zeeman), après atomisation électrothermique à l'aide d'un four graphite pyrolytique (GTA 96). Afin de réduire l'effet de matrice, 4 µL d'un modificateur ont été injectés dans le four avant l'injection des 10 µL d'échantillon. Ce modificateur est constitué par un mélange de 50 % Pd (0,2 g.L<sup>-1</sup>) et 50% Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0,5 g.L<sup>-1</sup>). La limite de détection est de 0,1 µg.L<sup>-1</sup> (LD: 3 x écart-type du blanc).

#### **Dosage du zinc**

Le dosage du zinc (Figure II.18) a été effectué en Spectrophotométrie d'Absorption atomique (Varian AA 20 avec correction deutérium), après atomisation par flamme "air/acétylène". La limite de détection est de 10 µgZn.L<sup>-1</sup>.

#### **Echantillons certifiés**

La validité de toutes les techniques analytiques a été systématiquement contrôlée par le passage, dans chaque série de dosages, d'échantillons certifiés qui ont subi exactement les mêmes étapes de préparation que les échantillons à analyser. Quatre échantillons certifiés différents, provenant du Conseil National des Recherches du Canada (CNRC, Ottawa,



Canada) ont été utilisés : (i) TORT-2 (hépatopancréas de homard) et DOLT-2 (muscle et foie de requin) pour valider les analyses des tissus biologiques ; (ii) PACS-2 et MESS-3 (sédiments marins) pour les analyses de sédiments. Les valeurs obtenues ont toujours été comprises dans l'intervalle de confiance à la moyenne de ces échantillons certifiés.

A l'issu des dosages, quelle que soit la technique analytique utilisée, les résultats ont été exprimés en concentrations ( $\mu\text{g.L}^{-1}$  dans l'eau ou  $\text{ng.g}^{-1}$ , pf ou ps, dans les tissus biologiques ou les particules sédimentaires) ou en teneurs dans un organe ou dans l'organisme entier (ng ou  $\mu\text{g}$ ).

### **Dosages multi-élémentaires par ICP-MS**

#### ***Technique de dosage***

Lors de la dernière expérience présentée dans ce mémoire, afin d'élargir la gamme des métaux étudiés, une dizaine de d'éléments ont été dosés par couplage plasma inductif – spectrométrie de masse (ICP-MS Perkin-Elmer, Elan 5000). L'ensemble de ces analyses multi-élémentaires ont été réalisées par le DGO (J. Schäfer et G. Blanc). Les dosages ont été effectués sur des échantillons d'eau, sous forme dissoute ou particulaire, la séparation entre les deux ayant été effectuée par filtration sur pompe à vide avec des filtres téflon de  $0,2 \mu\text{m}$ . La solubilisation des métaux contenus dans les MES retenues par les filtres a été réalisée par la procédure d'attaque totale des MES (voir parag. suivant). Des analyses ont été également effectuées sur du sédiment et des corps mous de *C. fluminea* digérés par traitement acide ( $\text{HNO}_3$ ), selon la procédure décrite précédemment. Le spectromètre de masse couplé avec un plasma induit est une technique analytique qui exécute une analyse multi-élémentaire d'excellente sensibilité.

Les échantillons à analyser sont aspirés et nébulisés dans une torche maintenant un plasma d'argon qui ionise les éléments par transfert d'énergie (collision). Les ions traversent ensuite une interface en Nickel de 1 mm de diamètre. Cette interface sert à extraire les ions de la torche ( $T = 8000 \text{ K}$ ,  $P \text{ atm}$ ) vers le spectromètre de masse (MS) grâce à un vide permanent ( $P = 10^{-8} \text{ torr}$ ). Les ions traversent des lentilles polarisées (réglées ici pour l'analyse de cations), puis le spectromètre de masse quadripôle discrimine les isotopes par déviation de leur trajectoire dans un champ électro-magnétique, en fonction de leur rapport "masse sur charge". Le détecteur enregistre alors le nombre de fois où l'isotope a été détecté. L'ICP-MS est réglé en mode Peak-Hop : la mesure de chaque élément est la moyenne de 21 lectures sur 3 dosages successifs. Seuls les isotopes les plus abondants ont été dosés.

Éléments	<b>Cd</b>	<b>Cu</b>	<b>Cr</b>	<b>Ni</b>	<b>Pb</b>	<b>Zn</b>
LD dissous ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ )	0,01	0,09	0,15	0,10	0,05	0,40
LD particulaire ( $\text{mg.kg}^{-1}$ )	0,04	0,09	0,12	0,17	0,05	0,91

**Tableau II.7** : Limites de détection (LD) de l'analyse des métaux dissous et particulaires par ICP-MS.

La sensibilité de l'appareil a été réglée à l'aide d'une solution connue de  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  d'isotopes couvrant une large gamme de masse ( $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{103}\text{Rh}$  et  $^{197}\text{Au}$ ,  $^{207,208}\text{Pb}$ ), le bruit de fond étant mesuré sur la masse 220. Le taux d'oxyde des éléments de la gamme et le taux d'ions doublement chargés ont également été vérifiés : ils étaient inférieurs à 3 % lors de tous les dosages.

Une calibration interne et externe a été réalisée. Une solution mère a été préparée à partir de solutions de concentrations connues (AccuTrace™ Reference standard). Les droites de calibrations ainsi établies ont permis de déterminer la concentration des éléments métalliques avec un coefficient de régression supérieur à 0,99. De plus, un étalon a été mesuré tous les 5 échantillons afin de déterminer et de contrôler la dérive de l'appareil. Des blancs d'attaques ont été également mesurés ; ils ont été systématiquement soustraits de chacune des valeurs des concentrations mesurées.

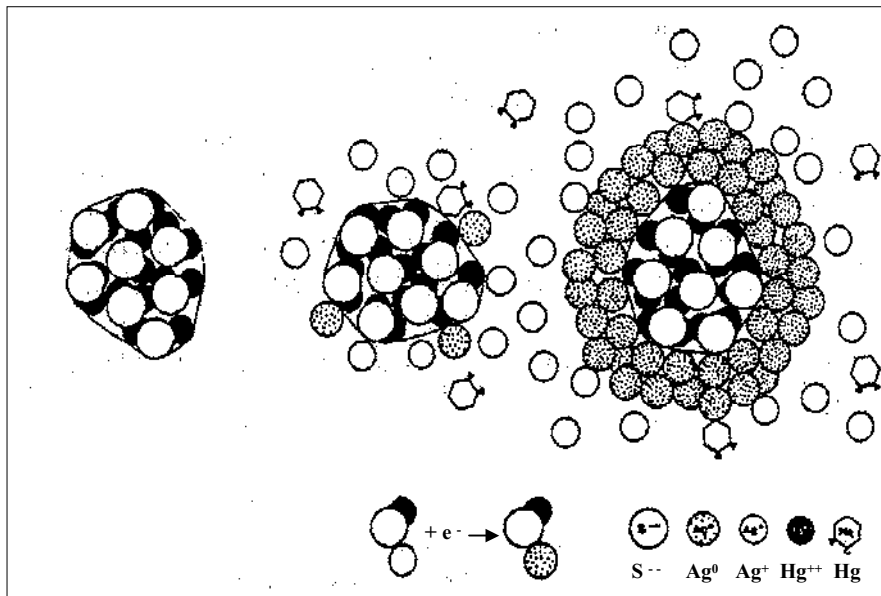
La justesse a été vérifiée régulièrement par dosage d'une eau certifiée (SLRS-4 ; éléments traces dans les rivières). Pour des concentrations supérieures à  $100 \text{ ng.L}^{-1}$ , l'erreur d'analyse a été inférieure à 5 %. Bien que les concentrations métalliques dans l'eau SLRS-4 soient proches ou légèrement inférieures aux limites de détection de l'appareil, la reproductibilité et l'erreur d'analyse étaient de l'ordre de 10 %. Les deux standards utilisés conjointement avec les échantillons de corps mous de *C. fluminea* (TORT-2 et DOLT-2) ou avec les échantillons de sédiment (PACS-2 MESS-3) ont été analysés à l'ICP-MS. Ceci nous a permis de connaître la justesse et la précision des mesures.

Les limites de détection de la technique de dosage pour les différents métaux lourds sont données dans le Tableau II.7 ( $3 \sigma$ , probabilité de 95 %). La reproductibilité est de l'ordre de 5 % (écart type) pour des concentrations  $>100 \text{ ng.L}^{-1}$  et inférieure à 10 % pour des concentrations  $< 100 \text{ ng.L}^{-1}$ .

#### ***Procédure pour l'attaque totale des MES : mise en solution des métaux***

Les attaques des MES retenues sur les filtres en téflon de  $0,2 \mu\text{m}$  ont également été réalisées par le DGO. Afin d'éviter toute contamination, le matériel utilisé (tubes, fioles jaugées, réacteurs en téflon ou savillex®) a été plongé dans un bain à 10 %  $\text{HNO}_3$  pendant 72 h. Les ustensiles ont ensuite été rincés 3 fois à l'eau déionisée, 3 fois à l'eau milli-Q, puis séchés sous hotte à flux laminaire. Un mélange de trois acides est nécessaire pour la mise en solution des métaux : l'acide fluorhydrique dissout les silicates et le mélange "eau régale" (acide nitrique + acide chlorhydrique) est utilisé pour ses propriétés oxydantes.

L'attaque se déroule en trois étapes, selon le protocole décrit par Schäfer et Blanc (2002)



**Figure II.19.** Principe de la réaction d'autométallographie (d'après Laporte et al., 2002, modifié).



1. Mettre les filtres avec les masses connues de MES dans les réacteurs en téflon - Ajouter 750  $\mu\text{l}$  HCl + 250  $\mu\text{l}$  HNO<sub>3</sub> + 2 ml HF (qualité Suprapur) - Fermer hermétiquement et chauffer les réacteurs sur la plaque pendant 2 h à 110°C - Laisser refroidir, puis ouvrir les réacteurs et récupérer les gouttelettes de condensation en rinçant plusieurs fois le couvercle avec de l'eau Milli-Q - Enlever le filtre en le rinçant soigneusement avec de l'eau MilliQ et une pipette en plastique afin d'éviter des contaminations - Remettre les réacteurs ouverts sur la plaque pour évaporer totalement la solution acidifiée, pendant 12 h à 100°C.

2. Reprendre le résidu d'attaque en ajoutant 250  $\mu\text{l}$  HNO<sub>3</sub> + 5 ml d'eau milli-Q - Fermer hermétiquement et chauffer sur la plaque pendant 10 min à 100 °C - Laisser refroidir .

3. Prélever 3500  $\mu\text{l}$  de surnageant à l'aide d'une pipette automatique et compléter à 10 ml avec de l'eau Milli-Q dans un tube en polypropylène préalablement décontaminé.

Les échantillons ont été conservés au réfrigérateur jusqu'à l'analyse quantitative. Lors de chaque série d'attaque de MES, des blancs et des matériaux de référence certifiés ont été traités dans les mêmes conditions. Un sédiment de rivière (BCR-CRM 320), un sédiment estuarien (NIST SRM 1646 a) et un sédiment marin (NRC-CNRC PACS-1) ont été utilisés.

## **II.B.3. LOCALISATION DES METAUX A L'ECHELLE TISSULAIRE PAR AUTOMETALLOGRAPHIE**

### **II.B.3.1. Présentation de la technique**

Cette technique permet de localiser les métaux lourds au sein des structures histologiques, en microscopie optique ou électronique. Ce n'est pas une méthode quantitative. Elle complète donc la mesure de la bioaccumulation métallique dans un organe ou un organisme entier, effectuée par dosage, en apportant une information sur la répartition des métaux. La réaction histochimique repose sur un processus de révélation de l'argent (Ag), analogue à celui utilisé en photographie. Les ions Ag<sup>+</sup> (bromure d'argent) introduits dans le milieu d'incubation, se fixent préférentiellement sur les métaux liés aux groupements thiols S-R des tissus. Ils sont ensuite réduits en atomes élémentaires Ag<sup>0</sup> par un donneur d'électrons, jouant le rôle de révélateur photographique (Figure II.19). Les atomes Ag<sup>0</sup> entretiennent et catalysent la réaction d'autométallographie jusqu'à épuisement des ions Ag<sup>+</sup> et/ou du donneur d'électrons. Cette auto-amplification de la réaction conduit à la superposition de plusieurs couches d'atomes élémentaires sur les sites thiols associés aux métaux. La présence de métaux est ainsi matérialisée sur les coupes de tissus par des granules denses. Il est important de souligner que



la réaction est non-spécifique entre les éléments thioloprives (Cd, Cu, Zn, Hg, ..). Ce point doit être pris en compte dans l'interprétation des résultats, surtout en cas de contamination polymétallique. Par contre, lorsque l'on dispose d'individus "témoins" et contaminés par un seul métal, l'apparition des précipités sombres sur les coupes histologiques peut être directement reliée à des dépôts métalliques absorbés et accumulés dans les tissus de l'organisme pendant la phase d'exposition.

La technique d'autométallographie a été mise au point et réalisée au LEESA (N. Mesmer-Dudons, Assistante-Ingénieur CNRS), en appliquant la procédure développée dans le laboratoire de Cytologie et d'Histologie de l'Université de Bilbao (Espagne). Cette méthode, initialement mise au point par Danscher (1984), permet d'améliorer la sensibilité de la réaction d'autométallographie et donc de visualiser de faibles concentrations en métaux accumulés dans les tissus [Marigomez *et al.*, 1998 ; Laporte *et al.*, 2002 ; Soto et Marigomez, 1997].

### **II.B.3.2. Application à la localisation du Cd chez les tubificidés**

L'accessibilité des ions  $Ag^+$  aux structures biologiques nécessite un traitement particulier des échantillons. Une fois rincés à l'eau, les vers tubificidés ont été fixés dans une solution composée de 5 mL de glutaraldéhyde (SIGMA) à 25 % et de 25 mL de tampon de cacodylate de sodium (Merck) à 0,05 M ( $P_o = 397$  mOsm, pH = 7.4), pendant 24 h, à 4 °C. Les vers ont ensuite été rincés dans une solution de cacodylate de sodium à 0,05 M et 2 % de NaCl pendant 3 fois 30 min. Ils ont été déshydratés dans des bains successifs d'alcool de degré croissant - 30, 50, 70, 95 et 100° (10 min chacun) -, puis dans un bain de toluène (2 fois 15 min). Pour l'inclusion, les échantillons ont été passés dans des bains de paraffine (15 min chacun, à l'étuve), puis inclus dans un bloc de paraffine pour être coupés au microtome ( $e = 10 \mu m$ ). Les coupes ont été disposées sur une lame de verre prétraitée avec de l'albumine (Prolabo). Après réhydratation dans les bains successifs de toluène (2 fois 10 min) puis d'alcool de degré décroissant (100, 96, 70, 50, 30°, 2 min chacun) puis d'eau (5 min), les lames ont été séchées à l'étuve à 35 °C pendant 24 h. Elles ont ensuite été recouvertes avec de l'émulsion Ilford L4 (Ilford Nuclear Emulsion, TAAB) pendant 30 min, à l'obscurité totale, puis immergées dans le révélateur Phénisol D 144 (Tetenal ultrathin, AGFA, dilution 1+4) pendant 15 min. Les lames ont été plongées dans le bain d'arrêt d'acide acétique à 1 % pendant 1 min, puis dans le fixateur (Ilford Hypam, B&W Fixer, AGE, AGFA, dilution 1+4) pendant 10 min. Après rinçage à l'eau distillée pendant 15 min, les coupes ont été colorées au



rouge nucléaire pendant 40 s, rincées à l'eau (2 fois 2 min), puis déshydratées dans de l'alcool (30, 50, 70, 95, 100°C, 2 min chacun), puis du toluène (2 fois 2 min) et séchées à l'étuve à 35 °C. Elles ont alors été montées dans l'Entellan, milieu de montage histologique. L'observation de ces préparations a été réalisée par microscopie optique reliée à une caméra numérique (Color video camera, 3CCD, Sony, Tokyo, Japan). L'acquisition des images a été effectuée par le logiciel Metaview (Ropper Scientifique, 2001). Les photographies incluses dans ce mémoire sont représentatives d'un grand nombre d'observations réalisées sur plusieurs répliquats.

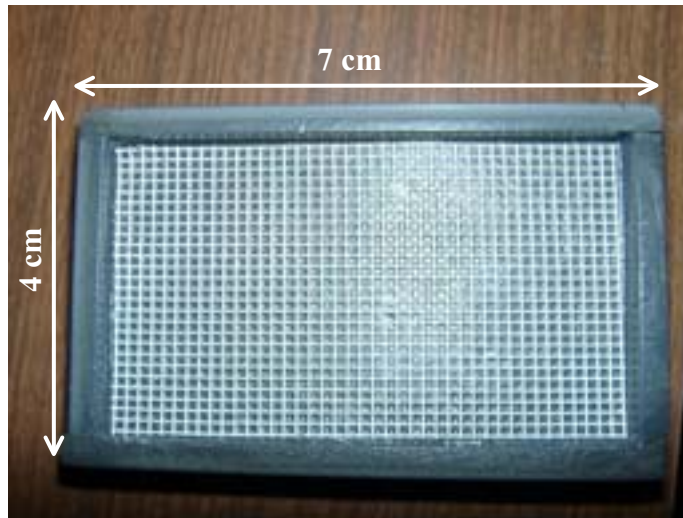
## II.B.4. ETUDE DE LA BIOTURBATION

### II.B.4.1. Les traceurs particuliers fluorescents

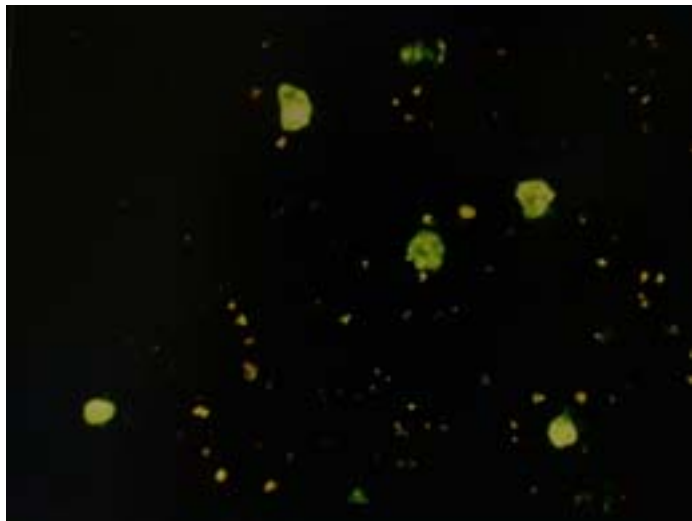
L'activité de bioturbation des organismes (tubificidés et larves d'*Hexagenia rigida*) dans le sédiment a été caractérisée et quantifiée en utilisant des traceurs particuliers fluorescents. Deux types de traceurs ont été retenus : des luminophores et des microsphères. Les luminophores sont des particules de sédiment naturel recouvertes de peinture fluorescente appartenant à deux spectres de taille :  $\varnothing=63-100\ \mu\text{m}$  et  $\varnothing=100-315\ \mu\text{m}$  [Gérino *et al.*, 1994 ; Mahaut et Graf, 1987]. Les microsphères sont des billes de latex fluorescentes ( $\varnothing=1\ \mu\text{m}$ ) vendues en phase liquide (Fluoresbrite YG Microspheres, Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Allemagne).

Ces traceurs ont été utilisés dans les UEs de *type 2*. Respectivement 0,45 g et 0,6 g des 2 tailles de luminophores et 0,3 mL de suspension de microsphères ont été mélangés à du sédiment (le même que le sédiment des UEs), afin de constituer des galettes de 3 mm d'épaisseur, qui ont été ensuite congelées. Une galette a été déposée à la surface de chacune des UEs, 24 h après l'introduction des organismes.

Pour chaque temps de prélèvement, le sédiment des UEs a été découpé en tranches qui ont été congelées (cf Partie II.B.1.2 et Figures II.16 et II.17). Chaque tranche a ensuite été décongelée, homogénéisée mécaniquement et un échantillon de 5 mL environ a été prélevé. Cet échantillon a été lyophilisé et 3 sous-échantillons de  $100 \pm 0.5\ \text{mg}$  ont été collectés. Le rapport poids frais/poids sec (pf/ps) de chacune des tranches a été mesuré en parallèle après passage des échantillons de sédiment à l'étuve à 60°C, pendant 72 h. Chacun des sous-échantillons de 100 mg a été analysé sous microscope UV à épifluorescence à 360 nm (BH2-



**Figure II.20.** Photographie de la cellule de comptage utilisée pour les luminophores.



**Figure II.21.** Photographie des luminophores sous lumière UV (grossissement x 4).

RFC Reflected Light Fluorescence Attachment – Olympus Optical Co., Hamburg, Germany<sup>5</sup>) pour le comptage des luminophores et des microsphères. La totalité des luminophores des 2 tailles ont été comptés au grossissement x 4, soit 3 comptages par tranche de sédiment (Figures II.20 et II.21). Les concentrations du sédiment en luminophores (somme des deux tailles), exprimées en g.g<sup>-1</sup> de sédiment sec, ont été transformées en g.cm<sup>-3</sup> de sédiment frais, grâce au rapport pf/ps, et normées pour une homogénéisation des échelles. Pour les microsphères, un sous-échantillonnage a été réalisé par application directe d'une bande adhésive sur le sédiment. Cette bande adhésive a ensuite été montée sur lamelle pour le comptage sous le microscope UV à épifluorescence. Le dénombrement des microsphères de chacun des sous-échantillons a été effectué en comptant 3 fois le nombre de microsphères contenues dans la grille du champ de l'oculaire au grossissement x20, soit 9 comptages par tranche de sédiment. Les concentrations obtenues ont également été normées. Les concentrations normées des luminophores et des microsphères en fonction de la profondeur du sédiment ont été reportées sur des graphes (profils verticaux).

#### II.B.4.2. Modélisation

Afin d'estimer les paramètres de bioturbation, les profils de traceurs obtenus ont été modélisés, en utilisant le modèle de bioadvection-biodiffusion en conditions non-stationnaires. Ce modèle classique de diffusion et d'advection [Officier et Lynch, 1982 ; Gérino *et al.*, 1994] a été appliqué aux concentrations en luminophores mesurées dans les différentes tranches de sédiment :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_b \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - V \frac{\partial C}{\partial z}$$

avec  $t$ =temps (an) ;  $z$ =profondeur (cm) ;  $C$ = concentration en traceurs (g.cm<sup>-3</sup>) ;

$D_b$ =coefficient de biodiffusion (cm<sup>2</sup>.an<sup>-1</sup>) ;  $V$ =coefficient de bioadvection (cm.an<sup>-1</sup>)

L'équation du modèle est résolue avec les conditions initiales :  $C(z, t=0) = 1$  pour  $z \in [0; 0,3]$  ;

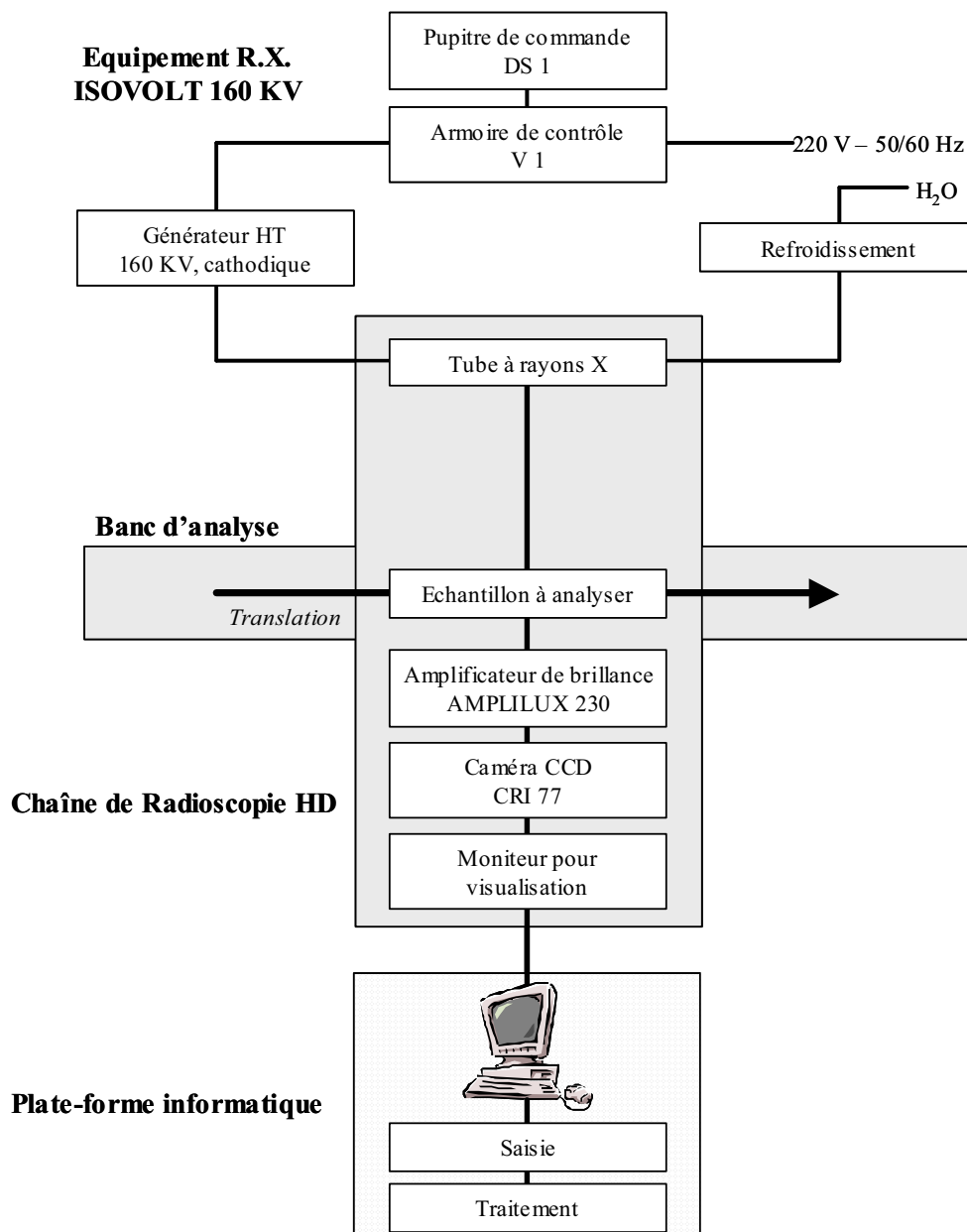
$C(z, t=0) = 0$  pour  $z > 0,3$

et les conditions limites:

$$C(z \rightarrow +\infty, t) = 0 \text{ à } z=0, \quad V C_{(z,t)} - D_b \frac{\partial C_{(z,t)}}{\partial z} = 0$$

La solution analytique est la suivante [Officier et Lynch, 1982] :

<sup>5</sup> Nous avons utilisé pour le comptage des traceurs particuliers le microscope UV à épifluorescence mis à notre disposition par le Laboratoire d'Océanographie biologique (LOB, Station marine d'Arcachon).



**Figure II.22.** SCOPIX : schéma de la chaîne d'acquisition installée au Département de Géologie et Océanographie (DGO - UMR CNRS 5805, Université Bordeaux 1, Talence).



$$C_{(z,t)} = \frac{1}{\sqrt{\pi D_b t}} \exp\left[-\frac{(z-Vt)^2}{4D_b t}\right] - \frac{V}{2D_b} \exp\left[\frac{Vz}{D_b}\right] \operatorname{erfc}\left[\frac{z+Vt}{\sqrt{4D_b t}}\right]$$

Ce modèle permet de calculer les concentrations théoriques en traceurs, et estime les valeurs des deux paramètres de bioturbation  $V$  et  $D_b$ .  $V$  est le coefficient de bioadvection, qui représente la vitesse de déplacement dans le sens vertical et vers le bas des traceurs.  $D_b$  est le coefficient de biodiffusion, qui traduit la vitesse de dispersion des traceurs (déplacement omnidirectionnel). Ces deux paramètres sont obtenus en cherchant le meilleur ajustement du modèle entre les profils de concentrations théoriques et le profil déterminé avec les valeurs mesurées, par la méthode des moindres carrés.

Il est important de souligner que ce modèle ne prend pas en compte la remontée des traceurs, qui peut se produire suite à leur ingestion par les organismes. Il n'a donc pas pu être appliqué aux profils de microsphères, ni à certains profils de luminophores mesurés à des temps expérimentaux pour lesquels la zone inférieure d'ingestion du sédiment a été atteinte.

### II.B.4.3. La Radioscopie RX

Cette analyse des perturbations physiques du sédiment induites par les organismes a été réalisée en étroite collaboration avec le Département de Géologie et Océanographie (O. Weber - DGO, UMR CNRS 5805, Université Bordeaux 1). La technique de radioscopie est basée sur l'absorption d'un rayonnement X pour observer la structure interne d'un objet (Figure II.22). C'est une méthode non destructive, qui n'altère pas la matrice sédimentaire mais dont le rayonnement peut détruire les organismes. Cette technique a déjà été utilisée par Charbonneau et Hare (1998) et par Charbonneau *et al.* (1997) pour visualiser les galeries d'invertébrés intra-sédimentaires. Les analyses ont été effectuées sur l'appareillage de radioscopie SCOPIX, conçu par la société CEGELEC pour l'étude des carottes sédimentaires [Migeon *et al.*, 1999].

Dans une enceinte de protection plombée, un rayonnement X issu d'un tube dont la tension (quantité de rayons) et l'intensité (contraste de l'image) sont modulables. Pour cette expérience, elles ont été fixées à 63 kV et 10 mA. Le rayonnement est ensuite récupéré par un ensemble de radioscopie (amplificateur de brillance, caméra numérique, moniteur). L'image est améliorée en scopie en temps réel, puis saisie et traitée grâce à des logiciels spécialisés, conçus par la Société "Alliance Vision", dans l'environnement Lab View. Outre la visualisation du contenu des UEs, l'analyse des variations de l'atténuation du rayonnement X après son passage au travers du sédiment est présentée sur une échelle relative, exprimée en



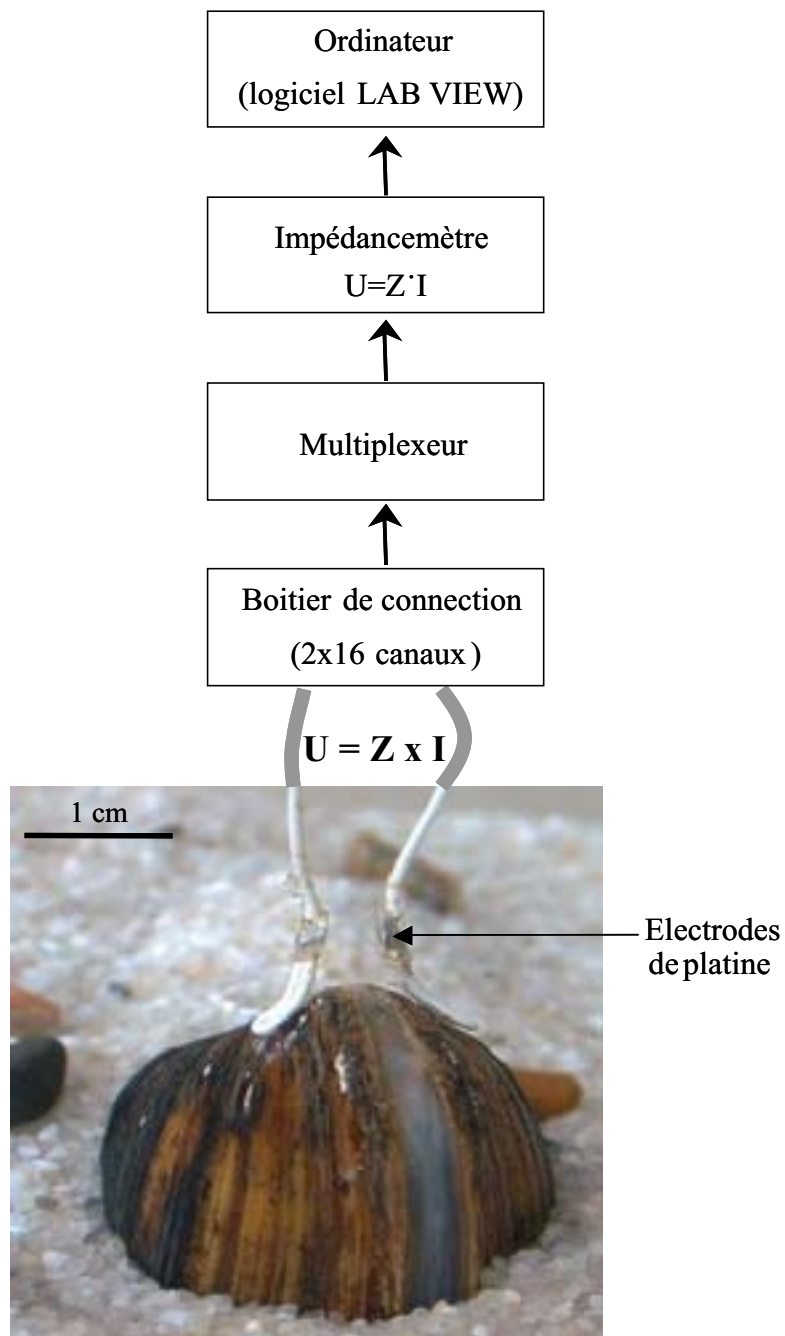
milliers de niveaux de gris, qui permet de préciser les limites des différentes couches sédimentaires.

Cette technique étant destinée à l'analyse de carottes sédimentaires, il a été nécessaire d'adapter nos supports expérimentaux aux différentes contraintes imposées. Ceci a nécessité une phase de mise au point méthodologique. Dans le cas de l'étude des terriers d'*Hexagenia rigida* (Partie III.A.1.3), le faible contraste de densité entre l'eau contenue dans les terriers et le sédiment a été amélioré par l'ajout systématique d'un agent contrastant : le carbure de molybdène ( $\text{Mo}_2\text{C} - 16 \text{ g.L}^{-1}$ ). Cet agent contrastant n'est pas toxique pour les organismes [Charbonneau *et al.*, 1997 ; Charbonneau et Hare, 1998]. L'expérience s'est déroulée dans des unités expérimentales de type 1 au fond desquelles ont été placées des barquettes en plastique (12x12x5 cm) renfermant le sédiment. Une larve d'*H. rigida* a été ajoutée dans chaque UE. Lors de l'échantillonnage, les barquettes ont été prélevées puis analysées sous SCOPIX (62 KV – 9 mA). Après les prises de vues, les barquettes de sédiment ont été coulées dans de la résine, puis découpées en six tranches et observées en radioscopie.

Pour l'étude du remaniement sédimentaire induit par les Tubificidés (Partie III.A.2.3), il n'a pas été nécessaire d'ajouter du carbure de molybdène au sédiment car ce ne sont pas les terriers qui devaient être visualisés mais les perturbations structurales du sédiment induites par les vers. La petite taille des terriers les rendait de toute façon impossibles à observer avec la technique de radioscopie. Afin de faciliter le passage du rayonnement X, des unités expérimentales en plastique et de faible épaisseur (L=19,5 cm ; l=8 cm ; p=2,6 cm) ont été utilisées. Ces UEs ont été placées entières sous la source RX (63 KV – 10 mA).

## **II.B.5. MESURE DE L'ACTIVITE VALVAIRE DE *CORBICULA FLUMINEA* PAR VALVOMETRIE**

L'étude du comportement valvaire fournit un indice qui traduit en temps réel l'état d'ouverture ou de fermeture des valves, cet état étant lié à l'activité de ventilation des organismes, mais également à la détection de stress physiques et/ou chimiques qui conduisent à la fermeture de la coquille. En effet, pour ventiler et assurer les échanges respiratoires au niveau des branchies mais également les apports de nutriments, le bivalve a besoin d'ouvrir ses valves. Le courant d'eau est créé par le tapis ciliaire des branchies, les mouvements des valves n'ayant aucun effet à ce niveau. Mentionnons qu'il n'y a pas systématiquement une relation directe entre l'activité ventilatoire et l'activité valvaire.



**Figure II.23.** Principe de la valvométrie par impédance, équipement mis en place au LEESA (d'après Tran et al., 2003, modifié).

Le principe de la technique de valvométrie (Figure II.23) [Tran *et al.*, 2003] est basé sur un enregistrement en continu des modifications de l'écartement entre les deux valves. Les animaux, libres dans le substrat, sont équipés de deux électrodes de platine (50 mg chacune) fixées sur les deux valves<sup>6</sup>. Le platine est soudé à du fil de cuivre gainé. La soudure et la face externe des électrodes sont recouvertes de résine, pour qu'il y ait une différence de potentiel exclusivement entre les 2 faces en vis-à-vis des électrodes. Les équipements mis en place au sein du LEESA permettent d'étudier simultanément 16 *Corbicula*. Les électrodes sont reliées *via* un fil conducteur (fil multibrins en cuivre) à un boîtier de connexion, qui regroupe l'ensemble des 32 voies (2 x 16 canaux). Ce boîtier est relié à un multiplexeur, qui permet d'utiliser les 16 animaux simultanément. Ensuite, le multiplexeur est connecté à un impédancemètre qui effectue les mesures. Le principe de la mesure suit la loi d'Ohm " $U = RI$ " : R est la résistance en courant alternatif, appelée impédance (Z). L'impédancemètre crée entre les électrodes de platine une différence de potentiel. Quand l'organisme écarte ses valves, la distance entre les électrodes augmente, entraînant un accroissement de la résistance/impédance qui se traduit par une variation de courant mesurée par l'appareil. Le dispositif est piloté par ordinateur, *via* une carte d'acquisition des données et géré par le logiciel LABVIEW, qui permet d'enregistrer l'activité valvaire en continu pour chaque animal et d'effectuer ensuite un traitement du signal, afin de quantifier les différentes phases d'ouverture et de fermeture des valves. Il est important de mentionner que lors des enregistrements valvométriques, des précautions sont prises afin de limiter toutes vibrations externes susceptibles de perturber le comportement des organismes : pièce isolée, tables anti-vibratoires, accès limité de la pièce au seul expérimentateur, ...

---

<sup>6</sup> Le montage permettant les études valvométriques a été mis en place par P. Ciret, Ingénieur CNRS au LEESA.



## **PARTIE III**

# **RESULTATS ET DISCUSSIONS**





*Pour cette troisième partie de notre mémoire, présentant et discutant les résultats obtenus au cours de l'ensemble des expériences réalisées, nous avons retenu un plan basé sur une progression dans l'étude des mécanismes biologiques et géochimiques influençant les flux métalliques à l'interface "eau-sédiment".*

*Le premier chapitre est consacré à l'étude de l'activité de bioturbation générée par nos deux modèles biologiques, la larve de l'éphémère *Hexagenia rigida* et les vers oligochètes tubificidés. De nombreuses données bibliographiques existent sur ce sujet pour ces deux organismes, mais nous avons souhaité analyser et caractériser leurs activités de bioturbation dans nos conditions expérimentales, c'est-à-dire en fonction des types d'unités utilisées, des facteurs biotiques (origine des lots d'organismes, taille des individus, densités, ...), des sédiments, des conditions physico-chimiques des milieux (température, oxygénation, ...). Nous avons également cherché à mieux définir certains aspects de ces activités qui pouvaient avoir des conséquences directes ou indirectes sur la physico-chimie des milieux et donc sur la biodisponibilité des métaux.*

*Le deuxième chapitre aborde l'étude de l'influence de la bioturbation sur la géochimie des sédiments et sur les flux métalliques, la source initiale de contamination étant la colonne d'eau. Ce cas de figure correspond à ce qui peut arriver dans le milieu naturel, lorsqu'un écosystème aquatique subit une pollution métallique, via des rejets dans la colonne d'eau. L'impact des deux organismes, *H. rigida* et tubificidés, aux modes de bioturbation très différents, sera présenté successivement.*

*Le troisième chapitre, complémentaire du précédent, est consacré à l'étude de l'impact de la bioturbation sur les transferts métalliques à partir du compartiment sédimentaire. Comme nous l'avons souligné dans la première partie de ce mémoire, cette situation est souvent rencontrée en milieu naturel, les sédiments jouant un rôle prépondérant à l'égard du stockage des métaux à l'échelle des écosystèmes aquatiques et pouvant se comporter comme des sources endogènes de contamination, via les processus de relargage. La bioturbation peut accroître les flux métalliques vers la colonne d'eau, en modifiant la géochimie des sédiments et en provoquant une remise en suspension des particules, modifiant ainsi la biodisponibilité des métaux. Dans ce chapitre, nous avons adopté une présentation similaire à celle retenue pour le chapitre précédent, les deux modèles biologiques utilisés étant présentés successivement.*



### III.A. ETUDE DE LA BIOTURBATION INDUITE PAR LES STADES LARVAIRES D' *HEXAGENIA RIGIDA* OU PAR LES TUBIFICIDES

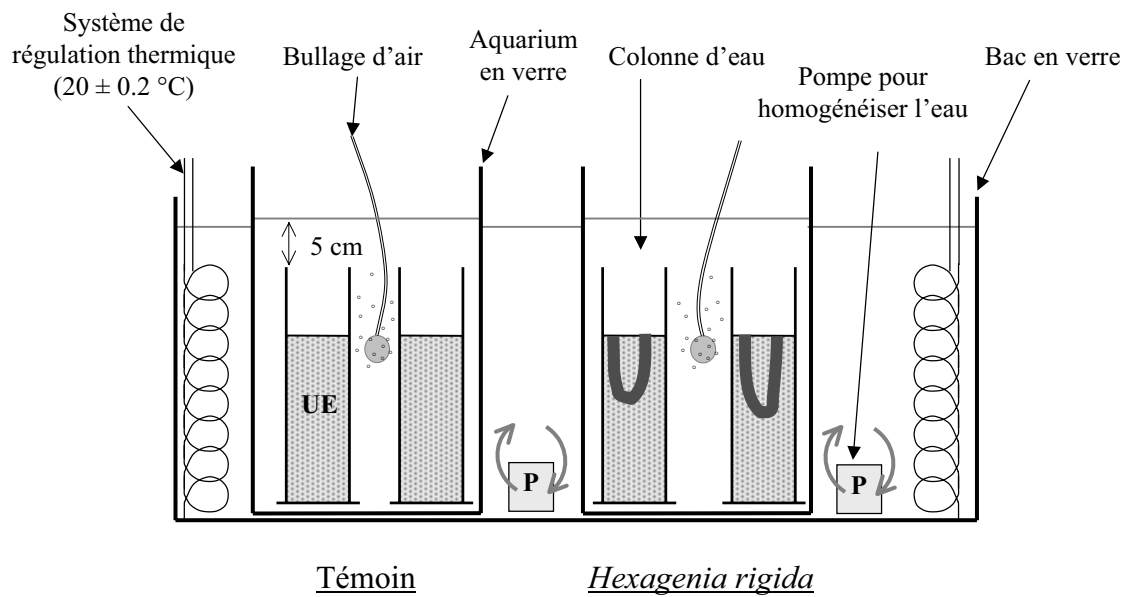
---

Les deux modèles biologiques retenus comme source de bioturbation au sein de nos systèmes expérimentaux présentent une écologie et un mode de vie différents (cf Partie II.A.1.4). Rappelons que les larves de l'éphémère *H. rigida* creusent des galeries dans les strates superficielles des sédiments, qui sont irriguées en permanence par un courant d'eau généré par les mouvements des trachéo-branchies ; elles se nourrissent à partir de la composante détritique et leur activité intra-sédimentaire est à l'origine d'une importante remise en suspension des particules au sein de la colonne d'eau. Les tubificidés renouvellent beaucoup moins vite leurs terriers et ne les irriguent pas ; ils ingèrent du sédiment en profondeur et le rejettent à l'interface avec la colonne d'eau sous forme de pelotes fécales. Ces deux modes de bioturbation - biodiffusion et bioirrigation pour la larve d'éphémère et bioadvection pour les vers oligochètes - vont avoir des impacts différents sur la physico-chimie des sédiments et indirectement sur les flux de métaux entre les différents compartiments abiotiques et biotiques.

Afin de caractériser et de quantifier les modes de bioturbation de ces deux modèles biologiques dans nos conditions expérimentales, nous avons utilisé plusieurs techniques complémentaires :

(i) le mode de remaniement sédimentaire a été analysé à l'aide de traceurs particuliers fluorescents (luminophores et microsphères), déposés à la surface des sédiments, en début d'expérience. Au terme de chaque durée d'exposition, le sédiment a été découpé en tranches afin de définir la distribution verticale des traceurs, qui dépend directement de l'activité des organismes présents dans le sédiment. Cette distribution a ensuite été modélisée, afin d'estimer les coefficients de bioadvection ( $V$ ) et de biodiffusion ( $D_b$ ), qui permettent d'identifier le type de bioturbation et d'estimer son intensité.

(ii) la remise en suspension des particules au sein de la colonne d'eau, provoquée par le brassage des sédiments, lui-même généré par l'activité motrice des organismes, a été mesurée par la turbidité. La turbidité d'une solution est fonction de la concentration, de la taille, de la forme et des coefficients de réflexion ou de réfraction des particules en suspension ; il n'y a donc pas de relation pré-établie entre la turbidité et la concentration en



**Figure III.1.** Dispositif expérimental utilisé pour étudier la bioturbation générée par les larves de l'éphémère *Hexagenia rigida* à l'aide de traceurs particulaires fluorescents déposés à la surface des sédiments.

UE : unité expérimentale de "type 2" (cf parties II.A.1).

matières en suspension (MES) [Aminot et Chaussepied, 1983]. Dans le cas d'*H. rigida*, cette turbidité peut être utilisée comme un indicateur indirect mais fiable de l'activité des larves [Odin *et al.*, 1996 ; Saouter, 1990].

(iii) l'activité intra-sédimentaire des organismes et les modifications structurales engendrées au cours du temps ont été analysées par la technique de radioscopie RX. Pour les larves d'*H. rigida*, qui creusent des terriers de taille importante, nous avons pu étudier et quantifier l'évolution de leurs structures biogènes. Dans le cas des tubificidés, dont la taille ne permet pas une visualisation directe des galeries, cette technique d'imagerie a été couplée à des mesures granulométriques, afin d'étudier le reclassement des particules sédimentaires sous l'effet de la bioadvection.

### **III.A.1. LARVES D'*HEXAGENIA RIGIDA***

#### **III.A.1.1. Caractérisation et quantification de l'activité de bioturbation des larves d'*Hexagenia rigida***

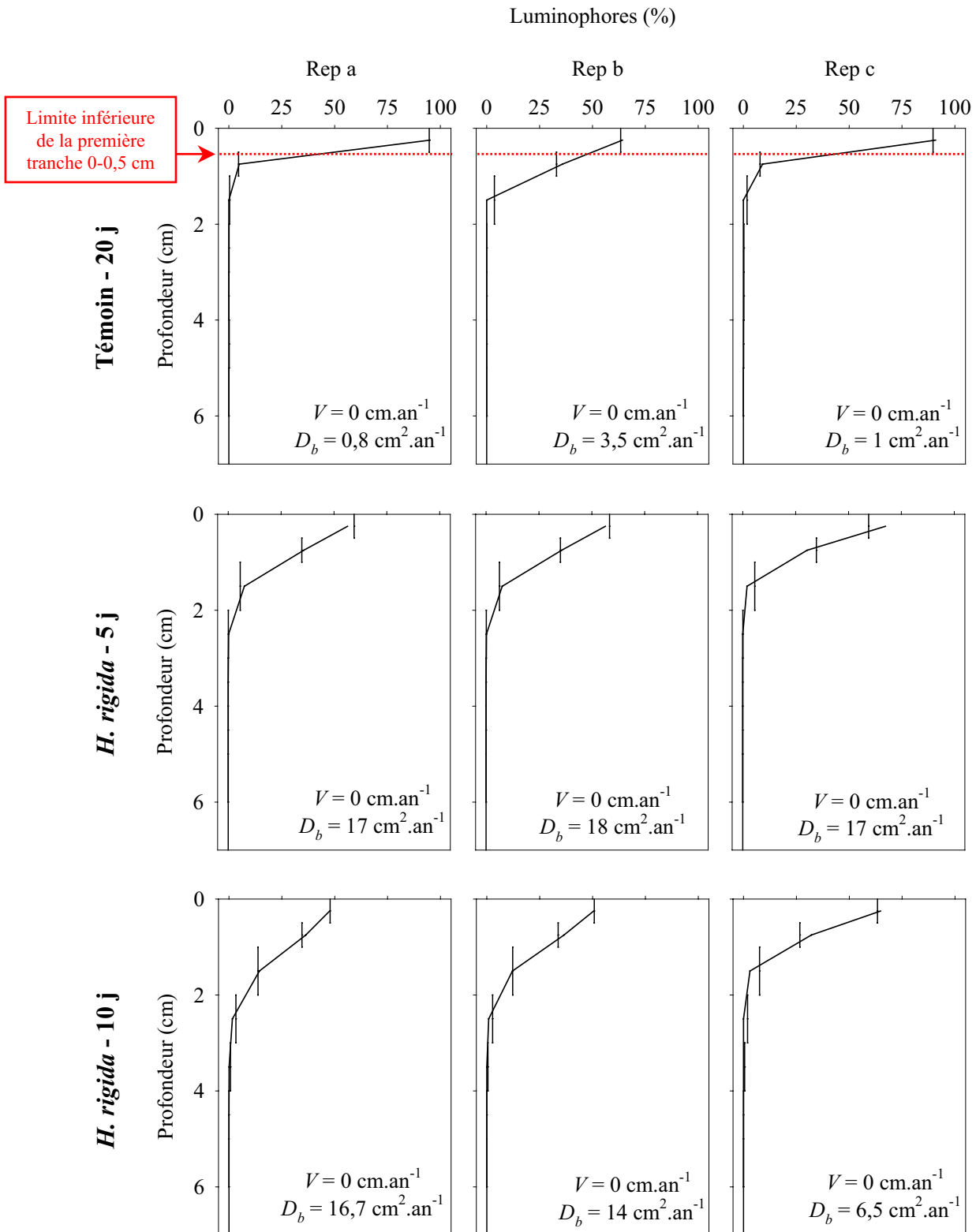
L'analyse du remaniement sédimentaire généré par l'activité des larves d'*H. rigida* a été réalisée au sein de microcosmes renfermant un compartiment sédimentaire prélevé *in situ* au niveau de la retenue de Cajarc, sur la rivière Lot (cf Partie. II).

#### **Protocole expérimental**

Les détails sur les matériels et méthodes utilisés dans cette expérience sont conformes à ceux décrits dans la Partie II de ce mémoire. Nous ne précisons donc ici que le protocole mis en place et certains points particuliers.

Deux conditions expérimentales ont été étudiées : (i) condition "témoin" {Tém}, reposant sur des UEs renfermant uniquement un biotope mixte "colonne d'eau/sédiment", sans organismes ; (ii) condition {Hr}, les unités étant similaires aux précédentes mais avec des larves d'*H. rigida*.

Les UEs étaient de "type 2" : épaisseur de sédiment de 12 cm (soit 430 g, pf) et 5 cm d'eau (soit 110 mL) ; aération en permanence par un bullage d'air. Les unités correspondant aux deux conditions {Tém} et {Hr} ont été placées dans deux enceintes identiques, à l'intérieur d'un bac en verre de grand volume assurant la thermorégulation à  $20 \pm 0,2^\circ\text{C}$  (Figure III.1). L'expérience s'est déroulée avec une photopériode naturelle. Après une pesée



**Figure III.2.** Profils verticaux des luminophores dans le sédiment, mesurés pour la condition témoin {Tém}, au temps 20 jours, et en présence des larves d'*H. rigida* (condition {Hr}), aux temps 5 et 10 jours.

$V$  = coefficient de bioadvection ;  $D_b$  = coefficient de biodiffusion ;

Rep : réplicats (unités expérimentales différentes pour une même condition).

| concentrations mesurées  
 — modèle bioadvectif/biodiffusif

individuelle et un tri des larves d'*H. rigida*, cinq individus ont été introduits dans chaque UE (classes pondérales allant de 18 à 54 mg, pf/individu). La biomasse moyenne par UE était au temps zéro de  $191,7 \pm 0,2$  mg, pf. Notons que les larves ont été introduites dans les UEs 24 heures après la mise en place du sédiment et de la colonne d'eau. Les traceurs particuliers fluorescents (microsphères : 1  $\mu\text{m}$  de diamètre ; luminophores : 63-100  $\mu\text{m}$ ) ont été déposés à la surface des sédiments, à l'aide de galettes de 3 mm d'épaisseur (mélange traceurs/sédiment congelé), 24h après l'introduction des larves.

Trois temps de prélèvement ont été définis pour la condition {Hr}: 2, 5 et 10 jours ; deux temps pour la condition {Tém} : 10 et 20 jours. Trois UEs ont été constituées pour chaque condition et chaque temps de prélèvement (réplicats), soit un total de 15 UEs.

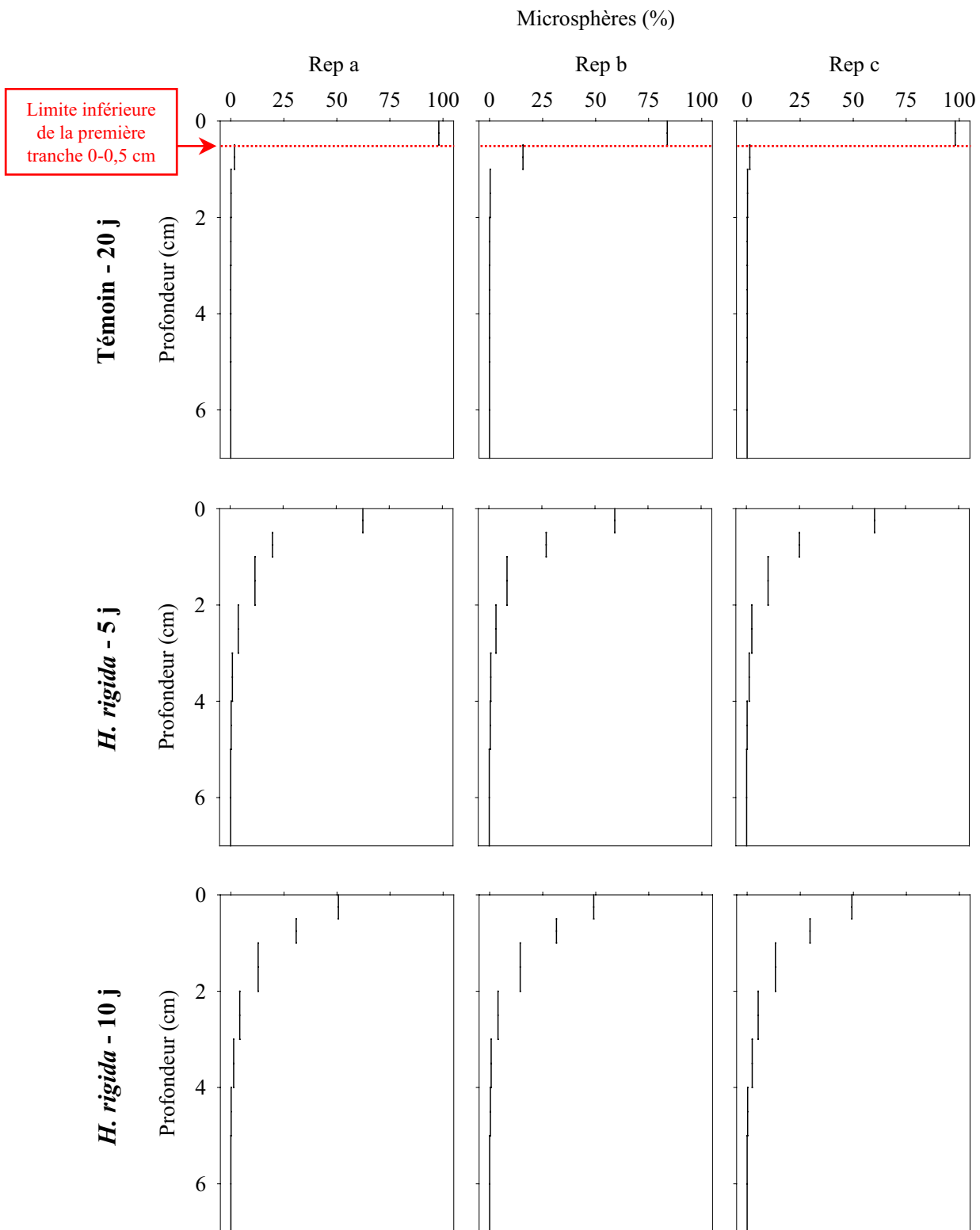
Pour chaque temps d'échantillonnage, le sédiment contenu dans les UEs a été découpé en 9 tranches (0-0,5 ; 0,5-1 ; 1-2 ; 2-3 ; 3-4 ; 4-5 ; 5-7 ; 7-9 et 9-12 cm), au niveau desquelles ont été comptés les luminophores et les microsphères. Le modèle de bioadvection/biodiffusion décrit dans la Partie II.B.4 du mémoire a été ensuite appliqué aux profils verticaux des luminophores.

## Résultats et discussion

Le taux moyen de saturation en oxygène dans l'eau de l'ensemble des UEs a été de  $86 \pm 0,6$  % durant toute l'expérience, sans différence significative entre les deux conditions étudiées. Le pH moyen a été de  $8,23 \pm 0,01$  pour la condition {Tém} et de  $8,26 \pm 0,01$  pour la condition {Hr} ; la différence observée entre les deux conditions n'est pas significative. Les turbidités moyennes ont été de  $0,5 \pm 0,1$  FTU pour la condition {Tém} et de  $71,6 \pm 5,8$  FTU pour la condition {Hr}, la différence entre ces deux conditions étant significative.

Les Figures III.2 et III.3 montrent les profils verticaux de distribution des traceurs fluorescents dans les strates sédimentaires. D'une façon générale, une bonne reproductibilité des comptages a été observée entre les 3 répliquats.

Dans les UEs témoins, au temps 20 jours, les graphes de répartition verticale des luminophores montrent que les traceurs se retrouvent uniquement dans les deux premières tranches de surface du sédiment, c'est-à-dire dans le premier centimètre, avec une localisation majoritairement dans la couche superficielle (90, 60 et 90 %). Les profils des microsphères sont très semblables à ceux des luminophores (98, 84, 98 % dans la tranche 0-0,5 cm). Les coefficients de bioturbation moyens déterminés à partir du modèle bioadvectif/biodiffusif sont :  $V = 0 \text{ cm.an}^{-1}$  et  $D_b = 1,7 \text{ cm}^2.\text{an}^{-1}$ . Dans cette condition sans source de bioturbation, la



**Figure III.3.** Profils verticaux des microsphères dans le sédiment, mesurés pour la condition témoin {Tém}, au temps 20 jours, et en présence des larves d'*H. rigida* (condition {Hr}), aux temps 5 et 10 jours.

Rep : réplicats (unités expérimentales différentes pour une même condition).

| concentrations mesurées



distribution attendue des traceurs devrait correspondre à 100 % de la quantité déposée au temps zéro dans la première tranche (0-0,5 cm). Les faibles écarts observés entre la distribution attendue et la distribution mesurée sont liés à des imprécisions d'échantillonnage. Tout d'abord, il est assez difficile de localiser très précisément l'interface "eau/sédiment" lors de la découpe des carottes et cette interface n'est pas toujours parfaitement plane. Il peut ainsi arriver que le zéro de profondeur choisi ne corresponde pas exactement à l'interface, mais soit décalé de quelques millimètres. De plus, l'épaisseur de la galette de traceurs ajoutée à la surface du sédiment en début d'expérience (0,3 cm), était proche de celle de la première tranche découpée (0,5 cm). Notons enfin que les perturbations mécaniques engendrées lors du découpage des carottes sédimentaires ont pu contribuer à de faibles apports de traceurs dans la deuxième strate (0,5–1 cm). Ces différents éléments peuvent expliquer les imprécisions ou décalages entre les deux tranches superficielles du sédiment. Néanmoins, les trois UEs de la condition {Tém} constituent bien des systèmes de référence au regard de la répartition verticale des luminophores et des microsphères en absence de bioturbation, au terme des 20 jours de l'expérience. Les deux coefficients  $V$  et  $D_b$  sont très faibles : ils montrent qu'après 20 jours et en absence d'invertébrés benthiques, les traceurs fluorescents (luminophores et microsphères) restent en surface et ne subissent aucun brassage dans le sédiment.

Les résultats de répartition des luminophores pour la condition {Hr}, montrent qu'après 5 jours, pour les trois réplicats, seulement 55 % des traceurs sont retrouvés dans la tranche de surface (0-0,5 cm), avec 20 à 30 % dans la strate inférieure (0,5-1 cm), et 6 à 10 % dans la couche "1-2 cm". Les profils de microsphères sont très similaires : 60 %, 25 % et 10 % en moyenne, respectivement. Au temps 10 jours, les profils ont globalement la même allure, avec un léger accroissement des pourcentages pour les couches inférieures. Le coefficient de bioadvection moyen ( $V$ ), estimé après 5 et 10 jours, est de 0 cm.an<sup>-1</sup> (Tableau III.1). Le coefficient moyen de biodiffusion ( $D_b$ ) après 5 jours est de 13,9 cm<sup>2</sup>.an<sup>-1</sup> ; après 10 jours, il est de 12,4 cm<sup>2</sup>.an<sup>-1</sup>, la différence entre les deux valeurs n'étant pas significative.

En présence des larves d'*H. rigida*, le maximum des traceurs est mesuré en surface, après 5 et 10 jours d'expérience. Le coefficient  $V$  est nul : l'activité de bioturbation des larves ne génère donc pas de bioadvection, c'est-à-dire d'enfouissement du sédiment de surface sous du sédiment plus profond. Par contre, les coefficients de biodiffusion sont élevés et significativement différents de ceux relatifs aux UEs témoins. Les larves d'*H. rigida* sont donc à l'origine d'une intense activité de biodiffusion. Cette biodiffusion, qui est étroitement liée à leur mode de vie, semble constante avec le temps. Les larves vivent dans des terriers qu'elles creusent en permanence dans le sédiment. Elles irriguent ces terriers pour

Coefficient	Condition	rep a	rep b	rep c	Moyenne
$V$ (cm.an <sup>-1</sup> )	{Tém} – 20 jours	0	0	0	0
	{Hr} – 5 jours	0	0	0	0
	{Hr} – 10 jours	0	0	0	0
$D_b$ (cm <sup>2</sup> .an <sup>-1</sup> )	{Tém} – 20 jours	0,8	3,5	1	1,7
	{Hr} – 5 jours	17	18	17	17,3
	{Hr} – 10 jours	16,7	14	6,5	12,4

**Tableau III.1.** Coefficients de bioadvection ( $V$ ) et de biodiffusion ( $D_b$ ) obtenus en appliquant le modèle bioadvectif/biodiffusif sur les profils verticaux des luminophores dans les compartiments sédimentaires.

{Tém} : sans organisme

{Hr} : présence des larves d'*H. rigida*

Rep : réplicats (unités expérimentales différentes pour une même condition).

leurs besoins respiratoires, les courants d'eau étant créés par les mouvements des trachéo-branchies sur la partie abdominale. Lors du creusement des galeries, les traceurs fluorescents sont entraînés en profondeur et mélangés dans le sédiment, ce qui conduit à la biodiffusion. De plus, les larves vont ingérer le sédiment pour se nourrir, absorber une partie de la matière organique détritique et rejeter les particules inorganiques. Il n'y a pas de zones préférentielles pour l'ingestion et le rejet des sédiments. Nos résultats ne mettent pas en évidence de différences entre la distribution des luminophores et des microsphères : le creusement des terriers est à l'origine de la biodiffusion, sans qu'il y ait de sélection des traceurs lors de l'ingestion du sédiment par les larves.

### **III.A.1.2. La turbidité, un indice indirect de l'activité de bioturbation des larves d'*Hexagenia rigida***

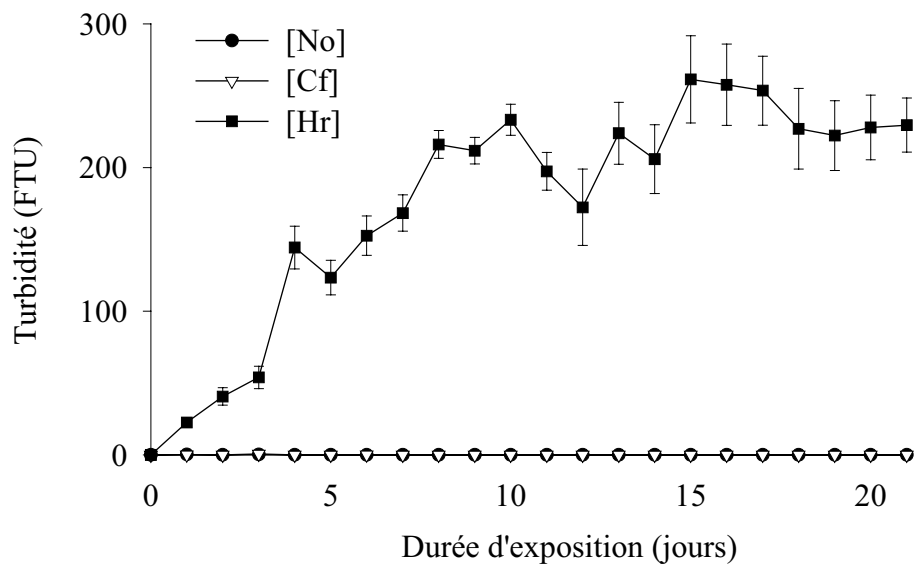
Pour ventiler, les larves génèrent un courant d'eau dans leurs terriers par agitation de leurs trachéo-branchies. Associée au creusement des galeries, cette bioirrigation entraîne une importante remise en suspension des particules sédimentaires dans la colonne d'eau. Ces particules (MES) sont à l'origine des fortes turbidités observées en présence des larves d'éphémères. Ainsi, comme nous l'avons mentionné précédemment, la mesure de la turbidité constitue un indicateur indirect de l'activité de bioturbation. Pour chacune des expériences présentées dans ce mémoire, des mesures de turbidité ont été systématiquement effectuées dans la colonne d'eau des UEs, quel que soit l'organisme (ou les organismes) qu'elles renfermaient. Nous allons présenter et analyser ici les résultats du suivi de la turbidité qui a été réalisé lors d'une expérience de 21 jours, destinée à étudier les flux métalliques du sédiment contaminé vers la colonne d'eau, en présence ou en absence de bioturbation<sup>7</sup>.

L'expérience a été réalisée dans des UEs de "type I", renfermant 10 cm d'épaisseur de sédiment (soit 1,5 kg, pf), prélevé au niveau de la retenue de Cajarc (rivière Lot) et 2,5 L d'eau (soit 12 cm d'épaisseur). Trois conditions expérimentales ont été analysées comparativement, associant un biotope mixte "colonne d'eau-sédiment" avec différentes composantes biologiques : (i) aucun organisme introduit dans les UEs (condition {No}) ; (ii) ajout de 15 larves d'*H. rigida* (condition {Hr}) ; (iii) ajout de 3 bivalves (condition {Cf})<sup>8</sup>.

---

<sup>7</sup> Les résultats de cette expérience ont été publiés dans la revue "*Environmental Toxicology and Chemistry*". Ils seront présentés plus en détail dans la Partie III.C.1 de ce mémoire.

<sup>8</sup> Cette condition (présence uniquement de bivalves) a permis de mesurer l'activité de bioturbation de *C. fluminea*.



**Figure III.4.** Evolution de la turbidité de la colonne d'eau en fonction du temps et des trois conditions expérimentales étudiées : [No], aucun organisme ; [Cf], présence des bivalves *Corbicula fluminea* ; [Hr], présence des larves de l'éphémère *Hexagenia rigida*. Moyennes  $\pm$  erreurs standards (N = 4).

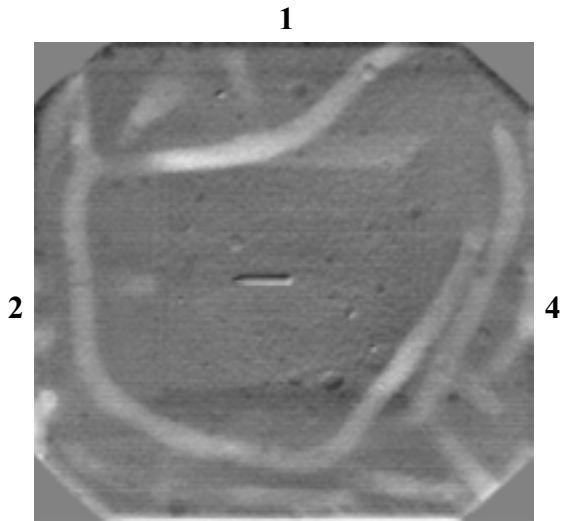
L'expérience s'est déroulée à 24 °C. Nous n'avons retenu ici que les résultats relatifs à l'évolution de la turbidité au sein de la colonne d'eau des unités. La Figure III.4 présente les résultats des mesures réalisées quotidiennement dans les UEs.

Des différences importantes apparaissent entre les conditions expérimentales étudiées. Pour les UEs dépourvues d'organisme, {No}, ou renfermant uniquement des bivalves, {Cf}, aucun accroissement significatif de la turbidité n'a été révélé par les mesures néphéométriques, par rapport à celles effectuées au temps zéro : mentionnons que la limite de détection de l'appareil de mesure utilisé était de 0,5 FTU. *C. fluminea* ne provoque donc pas de remise en suspension de particules sédimentaires, malgré son enfouissement dans les strates superficielles des sédiments. Une fois enfoui dans le sédiment, ce bivalve se déplace très peu, n'engendrant pas de bioturbation et d'augmentation de la turbidité de la colonne d'eau. Par contre, dans le proche environnement de la coquille et du pied, des courants d'eau liés à l'activité de ventilation et aux mouvements valvaires peuvent entraîner des modifications non négligeables d'un point de vue géochimique.

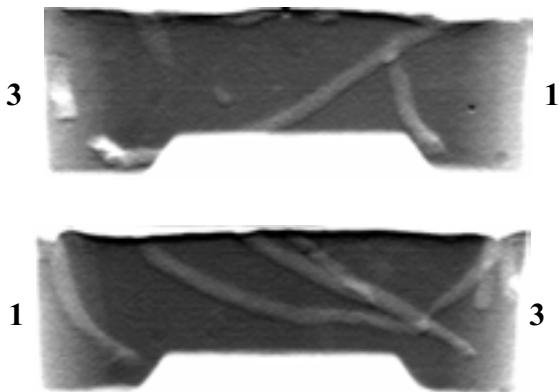
A l'opposé, pour les UEs de la condition {Hr}, caractérisées par la présence des larves d'*H. rigida*, l'évolution de la turbidité met en évidence une tendance proche de la linéarité pendant les 10 premiers jours, suivie d'une phase en plateau (modèle de régression linéaire multiple : Turbidité = 13 + 29,5 x Temps – 0,95 x Temps<sup>2</sup>, R<sup>2</sup> = 0.86). En fin d'expérience, la turbidité est très élevée : environ 250 FTU ou 190 mg.L<sup>-1</sup> de MES (ps). Une analyse de variance (ANOVA à deux facteurs : conditions expérimentales et temps) montre que la condition {Hr} est significativement différente des deux autres conditions {No} et {Cf}, avec un effet significatif du facteur "temps". Quelques auteurs ont utilisé le niveau de turbidité généré par les larves d'*Hexagenia* comme indicateur de leur activité de bioturbation. Bartsch *et al.* (1999) se sont servis de cette relation pour mesurer l'effet de concentrations croissantes de Cd sur l'activité d'*Hexagenia limbata*. Des études antérieures réalisées dans notre laboratoire d'accueil avaient montré que plusieurs facteurs influencent significativement la turbidité provoquée par les larves d'*H. rigida* : nature du sédiment, température, pH [Andrès *et al.*, 1998, 1999 ; Odin *et al.*, 1995 et 1996 ; Saouter, 1990].

Ces résultats confirment l'intérêt des larves d'*H. rigida* en tant que modèle pour l'étude de la bioturbation et des potentialités de remise en suspension des sédiments. En irriguant leurs terriers, les larves entraînent un intense relargage de particules sédimentaires vers la colonne d'eau. Cette activité ne décroît pas avec le temps. Le plateau observé à partir du 10<sup>ème</sup> jour, dans nos conditions expérimentales, peut résulter d'un équilibre dynamique entre la remise en suspension et la sédimentation des particules. Néanmoins, d'autres processus

*48 heures*



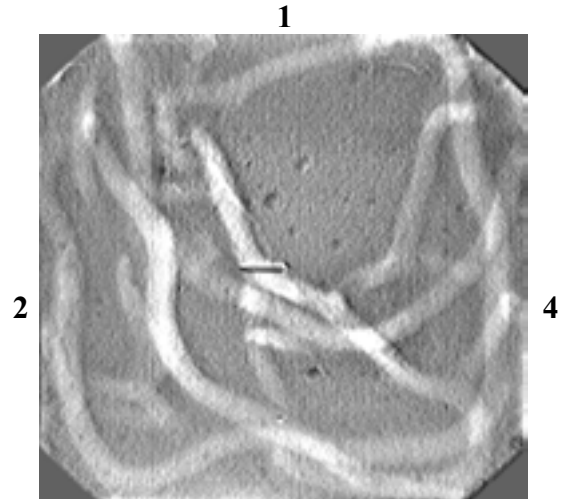
Vue du dessus



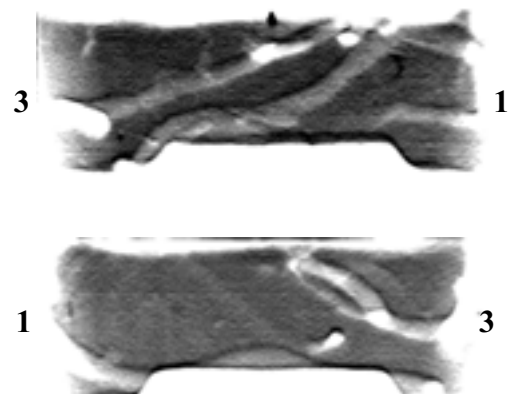
Vues latérales

**Figure III.5.** Images en radioscopie RX des terriers des larves d'*H. rigida* de la barquette B1 (une larve/UE), après 48 heures.

*96 heures*



Vue du dessus



Vues latérales

**Figure III.6.** Images en radioscopie RX des terriers des larves d'*H. rigida* de la barquette B2 (une larve/UE), après 96 heures.

peuvent être à l'origine de cette tendance, notamment une modification des activités de fouissage en fonction du temps. Les études que nous avons réalisées en collaboration avec le Département de Géologie et Océanographie (UMR CNRS 5805 – O. Weber et coll.), basées sur l'utilisation de la technique de radioscopie des sédiments, vont nous permettre de renforcer l'analyse interprétative des résultats relatifs à l'évolution de la turbidité de la colonne d'eau dans les unités de la condition {Hr}.

### **III.A.1.3. Analyse radioscopique des galeries d'*Hexagenia rigida***

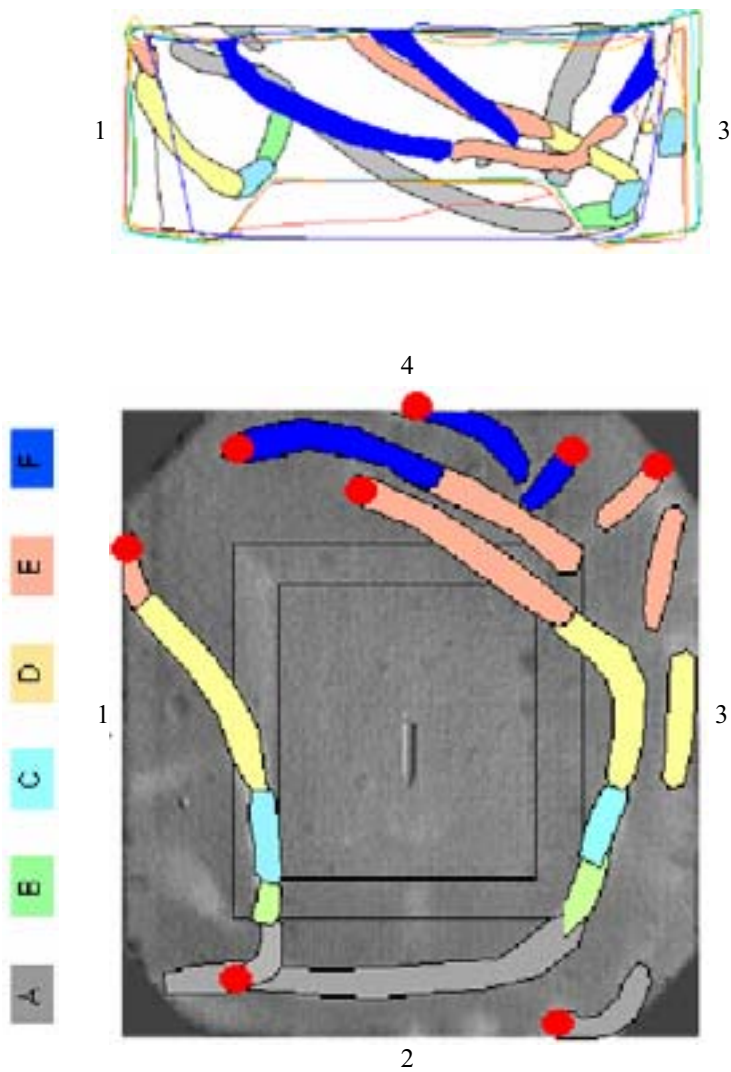
Afin d'appréhender la forme et la longueur des galeries creusées par les larves d'*H. rigida*, et donc de préciser leur activité à l'intérieur du sédiment, nous avons utilisé la technique de radioscopie RX pour obtenir des analyses structurales au sein des compartiments sédimentaires dans lesquels elles avaient séjourné pendant des durées déterminées.

#### **Protocole expérimental**

La technique d'analyse des terriers par radioscopie X a déjà été décrite dans la Partie II.B.4.3 de ce mémoire. Rappelons que les unités utilisées étaient des unités de "type I", qui renfermaient une barquette de plastique contenant le sédiment (5 cm d'épaisseur) ; ce dernier provenait du site de collecte sur les rives de la Garonne, en amont de Bordeaux. Une seule larve de grande taille (20 mm – 95 mg, pf) a été introduite dans chacune des UEs. Toutes les larves se sont enfouies très rapidement dans le sédiment. Après 48 et 96 h, les barquettes ont été prélevées et analysées en radioscopie RX. Leur sédiment a ensuite été coulé dans de la résine, afin de maintenir les structures des galeries intra-sédimentaires, puis découpé en six tranches qui ont été analysées une nouvelle fois en radioscopie.

#### **Résultats et discussion**

Les prises de vue des barquettes de sédiment aux temps 48 h (B1) et 96 h (B2), après soustraction des bruits de fond et traitement des images, montrent les empreintes des terriers, en gris clair (Figures III.5 et III.6). Après induration dans la résine et reconstitution des images obtenues sur les coupes (une couleur différente a été attribuée à chaque plan de coupe), l'ensemble des terriers creusés par la larve de la barquette B1, correspondant au temps 48 h, peut être visualisé (Figure III.7). Il n'a pas été possible de réaliser la même étude sur la barquette B2, car après 96 h, les terriers étaient trop nombreux et enchevêtrés pour effectuer




---

Somme des longueurs des terriers	50,4 cm
Somme des volumes des terriers	7,8 cm <sup>3</sup>
Volume total des terriers/volume barquette	2,26 %

---

### Mesure des terriers après 48 heures

**Figure III.7.** Reconstitution des terriers d'*Hexagenia rigida* à partir des images radioscopiques réalisées sur les tranches coulées dans la résine de la barquette B1, après 48 h.

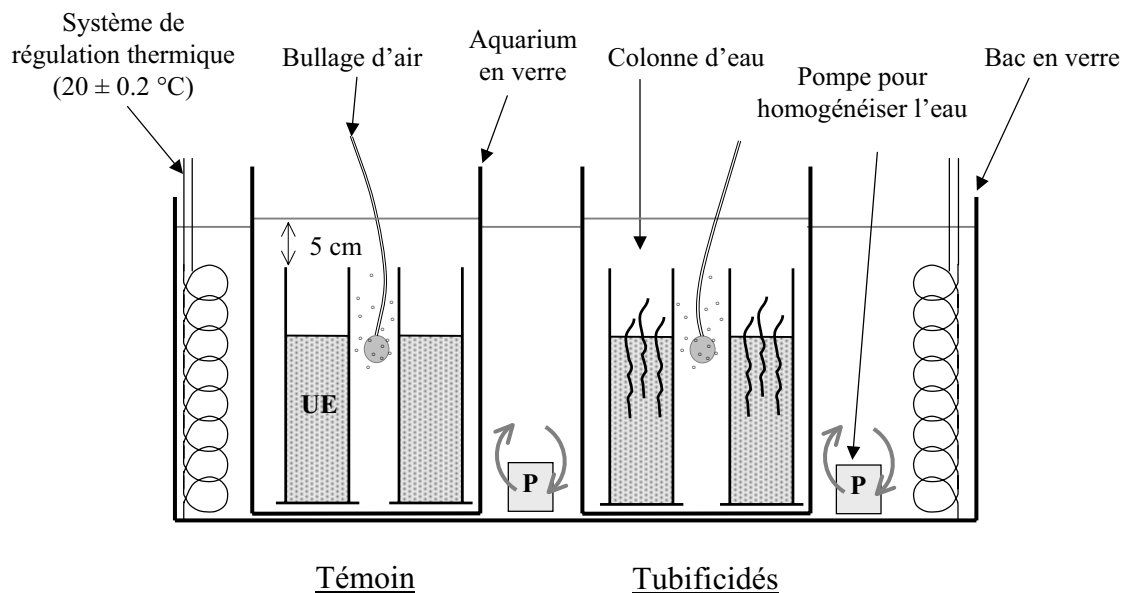


une reconstitution intégrale du réseau de galeries. L'analyse des images montre que les larves d'*H. rigida* explorent toutes les zones à l'intérieur de la barquette, les parois exerçant un rôle d'obstacle au regard du déplacement vertical ou latéral des organismes. Les terriers ont une forme tubulaire, sans embranchements secondaires, et non-anastomosés, contrairement à ce qui avait été mis en évidence par les travaux réalisés par Charbonneau *et al.* (1997) et Charbonneau et Hare (1998) sur cette même espèce. En fait, ces auteurs avaient limité l'espace sédimentaire disponible, pour des raisons techniques (épaisseur de l'UE : 2,5 cm), contraignant ainsi les organismes à recouper leurs propres terriers. Dans nos conditions expérimentales, les dimensions des barquettes sont également limitantes, mais à un degré moindre.

A partir des images reconstituant l'ensemble des réseaux de galeries (Figure III.7), nous avons estimé la longueur et le volume des terriers. Ces données ne peuvent être prises qu'à titre indicatif, compte-tenu du nombre limité d'échantillons (1 UE/condition – 1 larve/UE). La distance parcourue par une larve en 96h serait de 90 cm (vitesse de déplacement d'environ 1 cm.h<sup>-1</sup>). Le volume des galeries représente 2,3 et 4,1 % du volume total du sédiment dans les barquettes après 48 et 96 h, soit une activité moyenne de fouissage de 0,9 cm<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup>.

Si ces données sont extrapolées aux conditions de l'expérience précédente, au cours de laquelle ont été réalisées les mesures de turbidité (Figure III.4), sur la base de 15 larves par UE et d'une stricte proportionnalité en fonction de la densité des organismes et de la durée d'exposition, la totalité du sédiment contenu dans les barquettes serait remaniée après seulement six jours. Ceci pourrait constituer un facteur limitant au regard de la poursuite de l'activité de fouissage, expliquant ainsi la tendance en plateau observée après 8 jours sur la courbe d'évolution de la turbidité.

Cette technique d'imagerie nous a permis d'observer très précisément la forme des terriers des larves d'*H. rigida* dans le sédiment et d'en estimer la longueur et le volume. Les résultats montrent que ces organismes sont très actifs ; leur vitesse de creusement des galeries est élevée et probablement continue, eu égard à l'évolution de la densité des terriers au cours du temps. Globalement, l'impact de cette activité est une biodiffusion couplée à une bioirrigation, qui entraîne des turbidités élevées au sein de la colonne d'eau.



**Figure III.8.** Dispositif expérimental utilisé pour étudier la bioturbation générée par les vers oligochètes tubificidés à l'aide de traceurs particuliers fluorescents déposés à la surface des sédiments.

UE : unité expérimentale de "type 2" (cf partie II.A.1).

## III.A.2 TUBIFICIDES

Après avoir étudié l'activité de bioturbation des larves d'*Hexagenia rigida* au sein de nos systèmes expérimentaux, nous allons de la même façon nous attacher à caractériser celle de notre deuxième modèle biologique intra-sédimentaire : les vers oligochètes tubificidés. Ces invertébrés ont été présentés dans la Partie II de notre mémoire. Rappelons seulement que les lots utilisés lors de nos expériences sont commercialisés par la Société Grébyl, qui assure la collecte des organismes en milieu naturel. Ces lots sont constitués d'un mélange de trois espèces, qui sont très proches d'un point de vue taxonomique, écologique et biologique : *Tubifex tubifex*, *Limnodrilus hoffmeisteri* et *Limnodrilus claparedeianus*.

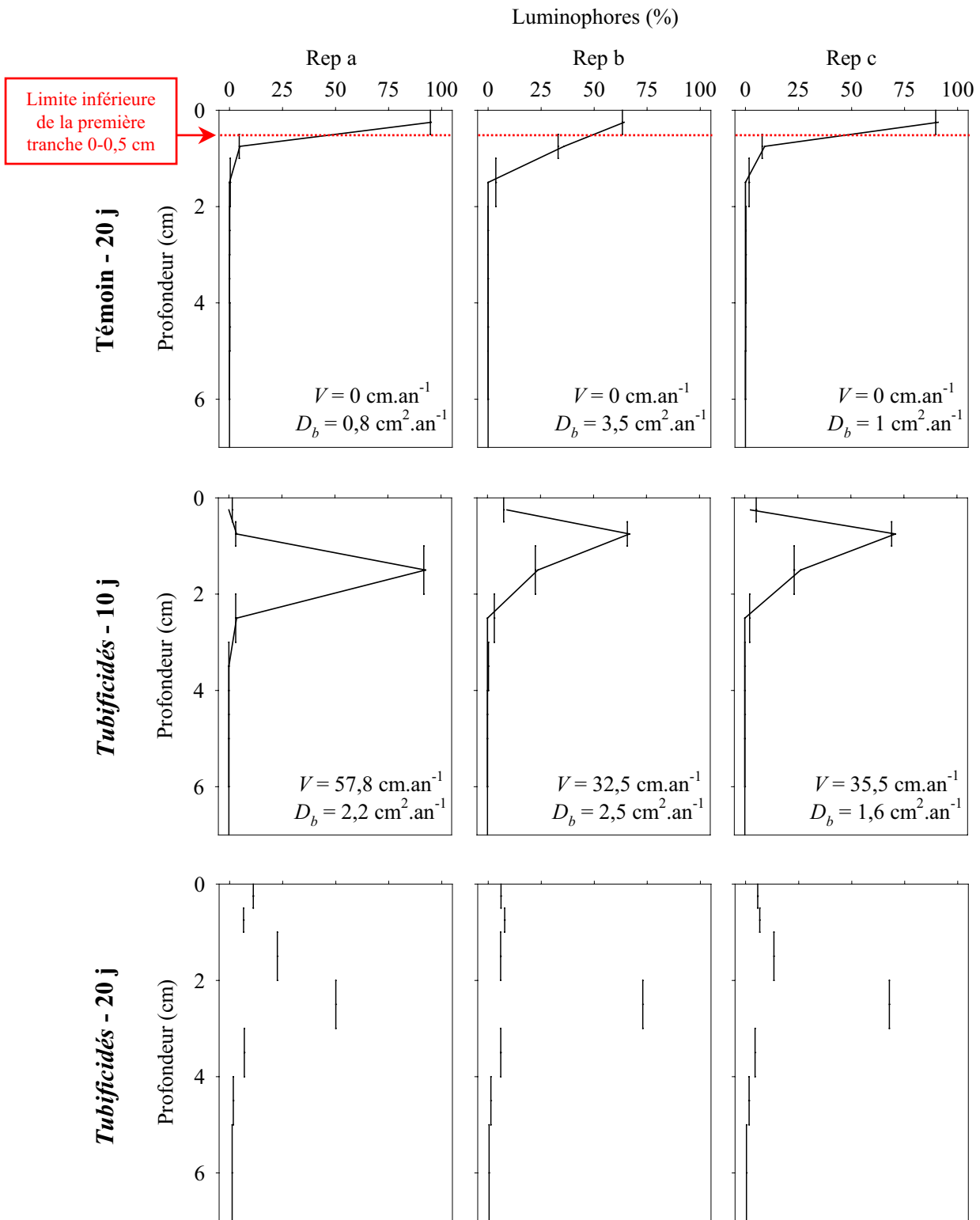
### III.A.2.1. Caractérisation et quantification de l'activité de bioturbation d'une population de tubificidés

Comme pour *H. rigida*, nous avons tout d'abord quantifié et caractérisé l'activité de bioturbation des tubificidés dans un sédiment naturel (sédiment de Cajarc). Lors de l'expérience concernant les larves d'*H. rigida*, présentée dans le paragraphe précédent (III.A.1), une troisième condition expérimentale, reposant sur l'introduction de tubificidés dans les UEs (condition {Tub}), avait été mise en place conjointement aux conditions {Tém}, sans organismes, et {Hr}, en présence de larves d'*H. rigida*.

#### Protocole expérimental

Le protocole expérimental (Figure III.8) est identique à celui présenté pour l'étude de la bioturbation induite par *H. rigida* (Figure III.1). Pour la condition {Tub}, une biomasse de vers de  $250 \pm 5$  mg, pf (soit  $130 \pm 7$  individus) a été introduite dans chacune des UEs, 24 h après la mise en place du biotope mixte. Comme pour les autres conditions, les traceurs particuliers fluorescents (microsphères et luminophores) ont été déposés à la surface des UEs 24 h après l'introduction des vers.

Deux temps de prélèvement ont été définis pour cette condition {Tub} : 10 et 20 jours. Pour chaque temps, trois UEs ont été constituées, soit un total de 12 unités. Après 10 et 20 jours, les sédiments ont été collectés et découpés en 9 tranches (0-0,5 ; 0,5-1 ; 1-2 ; 2-3 ; 3-4 ; 4-5 ; 5-7 ; 7-9 et 9-12 cm), dans lesquelles ont été déterminées les quantités de luminophores



**Figure III.9.** Profils verticaux des luminophores dans le sédiment, mesurés pour la condition témoin {Tém}, au temps 20 jours, et en présence des oligochètes tubificidés (condition {Tub}), aux temps 10 et 20 jours.

$V$  = coefficient de bioadvection ;  $D_b$  = coefficient de biodiffusion.

Rep : réplicats (unités expérimentales différentes pour une même condition).

| concentrations mesurées  
 — modèle bioadvectif/biodiffusif

et de microsphères. Le modèle de bioadvection/biodiffusion a été ensuite appliqué aux profils de distribution verticale des luminophores dans le sédiment.

## Résultats et discussion

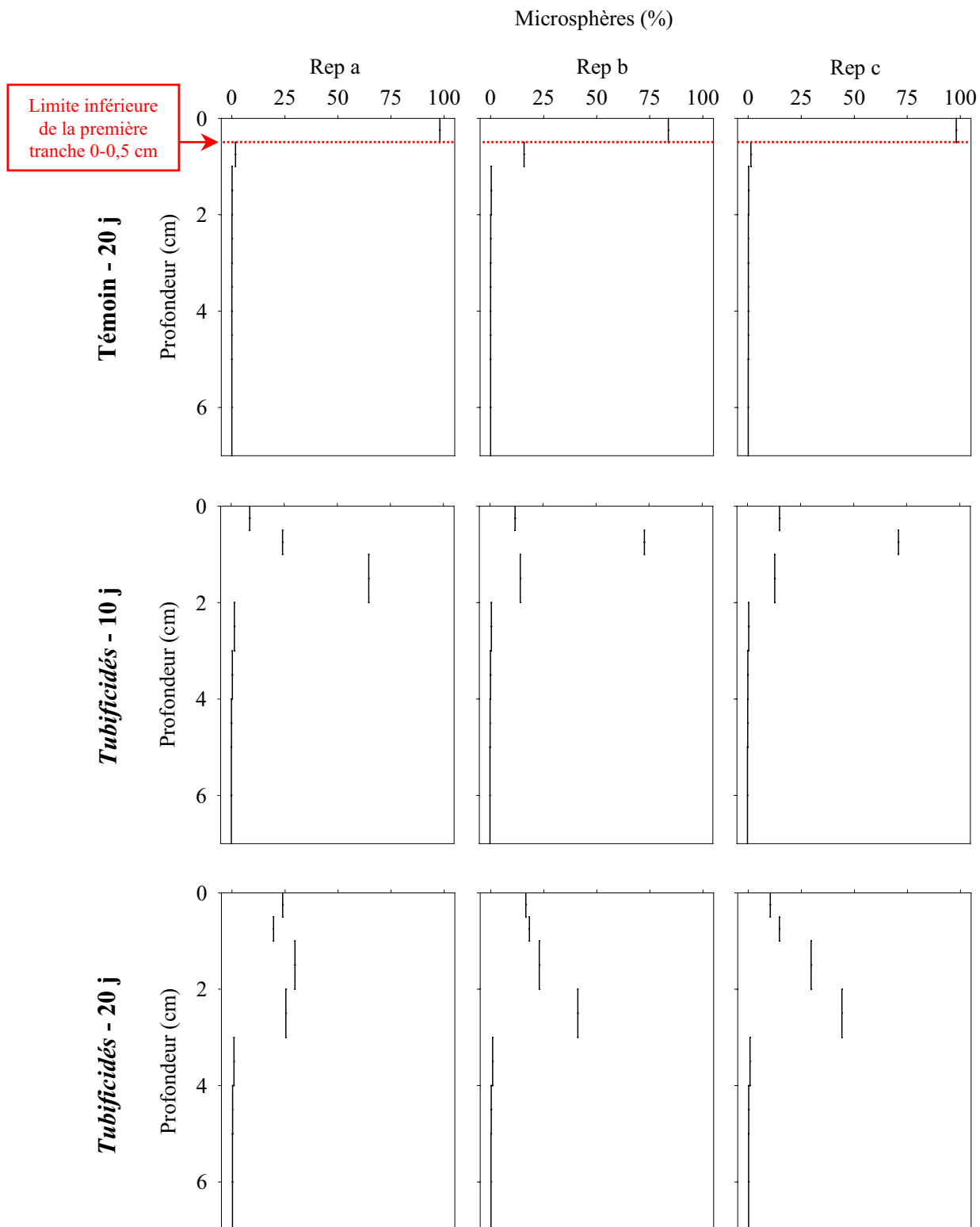
La comparaison des paramètres abiotiques mesurés dans l'ensemble des UEs montre une absence de différences significatives entre les températures et les taux de saturation en oxygène. Par contre, le pH a été significativement différent entre les conditions {Tub} et {Tém}: les valeurs moyennes résultant des mesures effectuées pendant les 20 jours de l'expérience ont été respectivement de  $8,27 \pm 0,01$  et  $8,23 \pm 0,01$ . Il existe aussi une différence significative entre les turbidités moyennes :  $2,0 \pm 0,3$  FTU pour la condition {Tub} et  $0,5 \pm 0,1$  FTU pour la condition {Tém}.

Les profils verticaux de luminophores et de microsphères sont présentés sur les Figures III.9 et III.10. Les résultats de la condition "témoin", après 20 jours, ont été reportés sur les graphes, afin de permettre des comparaisons. D'une façon générale, une bonne reproductibilité des comptages des traceurs entre les 3 réplicats a été observée.

Au bout de 10 jours, pour la condition {Tub}, la concentration en luminophores dans la tranche de surface 0-0,5 cm est très faible, les pourcentages par rapport à la quantité initiale de traceurs déposée à la surface des sédiments étant compris entre 2 et 8 %. Le pic de densité maximale se situe dans la tranche 0,5-2 cm (95, 70 et 75 %). Les concentrations diminuent ensuite rapidement, avec une non-détection des traceurs dans la tranche 3-4 cm, pour les 3 réplicats. La répartition des microsphères est très semblable à celles des luminophores, avec toutefois une concentration supérieure dans la tranche de surface (9 à 15 %).

Au temps 20 jours, la concentration maximale des luminophores est plus en profondeur, dans la tranche 2-3 cm pour les 3 réplicats. La quantité de luminophores dans les tranches supérieures est comprise entre 10 et 20 %. Il y a donc eu une légère remontée en surface des luminophores. A partir de la tranche 5-6 cm, on ne trouve plus de traceurs. Pour les microsphères, le pic de densité au temps 20 jours est beaucoup plus étalé (Rep. b et c), ou a même complètement disparu (Rep. a). Quasiment toutes les microsphères sont retrouvées dans les trois premiers cm du sédiment.

Les valeurs des coefficients de bioturbation ( $V$  et  $D_b$ ) obtenus en appliquant le modèle bioadvectif/biodiffusif sur les profils de luminophores sont présentés dans le Tableau III.2, uniquement pour le temps 10 jours. En effet, comme nous l'avons mentionné lors de la présentation du modèle et de ses conditions d'application (Partie II), la faible remontée des



**Figure III.10.** Profils verticaux des microsphères dans le sédiment, mesurés pour la condition témoin {Tém}, au temps 20 jours, et en présence des oligochètes tubificidés (condition {Hr}), aux temps 10 et 20 jours.

Rep : réplicats (unités expérimentales différentes pour une même condition).

┆ concentrations mesurées

traceurs à la surface des sédiments après 20 jours ne permet pas son utilisation. Les valeurs moyennes des deux coefficients pour le temps 10 jours sont les suivantes :  $V = 41,9 \text{ cm.an}^{-1}$  et  $D_b = 2,1 \text{ cm}^2.\text{an}^{-1}$ . Elles sont significativement supérieures à celle des témoins, estimées après 20 jours ( $V = 0 \text{ cm.an}^{-1}$  et  $D_b = 1,7 \text{ cm}^2.\text{an}^{-1}$ ).

La comparaison des profils verticaux des luminophores et des microsphères montre que les tubificidés provoquent un enfoncement progressif des traceurs dans le sédiment. Ce type de remaniement sédimentaire est de la bioadvection. Une dispersion des traceurs autour du maximum de concentration est également observée et résulte des processus de biodiffusion. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés dans la littérature, qui indiquent que les tubificidés entraînent, par leur mode de nutrition, une bioadvection du sédiment [McCall et Fisher, 1980]. En effet, ils se nourrissent en profondeur et rejettent leurs pelotes fécales en surface. Il y a donc sans arrêt un recouvrement de la couche de sédiment de surface, dans laquelle se trouvent les traceurs, par du sédiment profond qui a transité à l'intérieur du tractus digestif des vers. Les traceurs vont s'enfoncer dans le sédiment jusqu'à la zone d'ingestion maximale des tubificidés. Une fois cette zone atteinte, deux cas peuvent se produire selon la taille des particules considérées : les profils des luminophores et des microsphères sont identiques à 10 jours, mais ils présentent certaines différences à 20 jours, une partie des microsphères atteignant la zone d'ingestion étant remontée à la surface du sédiment. Un décalage entre les deux types de traceurs est observé : les pics de densité maximale des microsphères sont plus aplatis, traduisant une homogénéisation plus rapide dans le sédiment. Rappelons que la taille des deux types de traceurs que nous avons utilisés (microsphères :  $\emptyset = 1 \mu\text{m}$  ; luminophores :  $63 < \emptyset < 100 \mu\text{m}$ ) a été choisie en fonction du spectre de taille des particules sédimentaires ingérables par les vers. D'après les données disponibles dans la littérature, les trois espèces de tubificidés présentes dans les lots provenant du milieu naturel peuvent ingérer des particules dont la taille peut aller jusqu'à  $130 \mu\text{m}$  [Juget, 1978], mais se nourrissent préférentiellement de particules inférieures à  $63 \mu\text{m}$  [Rodriguez *et al.*, 2001]. Les observations que nous avons effectuées en Radioscopie X, couplées aux mesures granulométriques, apporteront des données complémentaires (cf Partie III.A.2.3). Ainsi, les luminophores ne pourront être absorbés que par les plus grands vers, au contraire des microsphères dont la petite taille permet une ingestion par toutes les catégories de vers et un transfert à la surface des sédiments, *via* les pelotes fécales. Ceci est à l'origine de l'augmentation de la concentration en microsphères dans les couches de surface, qui est observée à 20 jours. Comme aucune tri n'a été effectuée parmi la population de vers, des organismes de toutes les tailles sont présents dans les UEs. Ils se nourrissent donc à

Coefficient	Condition	rep a	rep b	rep c	Moyenne
$V$ (cm.an <sup>-1</sup> )	{Tém} – 20 jours	0	0	0	0
	{Tub} – 10 jours	57,8	32,5	35,5	41,9
$D_b$ (cm <sup>2</sup> .an <sup>-1</sup> )	{Tém} – 20 jours	0,8	3,5	1	1,7
	{Tub} – 10 jours	2,2	2,5	1,6	2,1

**Tableau III.2.** Coefficients de bioadvection ( $V$ ) et de biodiffusion ( $D_b$ ) obtenus en appliquant le modèle bioadvectif/biodiffusif sur les profils verticaux des luminophores dans les compartiments sédimentaires.

{Tém} : sans organisme

{Tub} : présence des tubificidés

Rep : répliquats (unités expérimentales différentes pour une même condition).



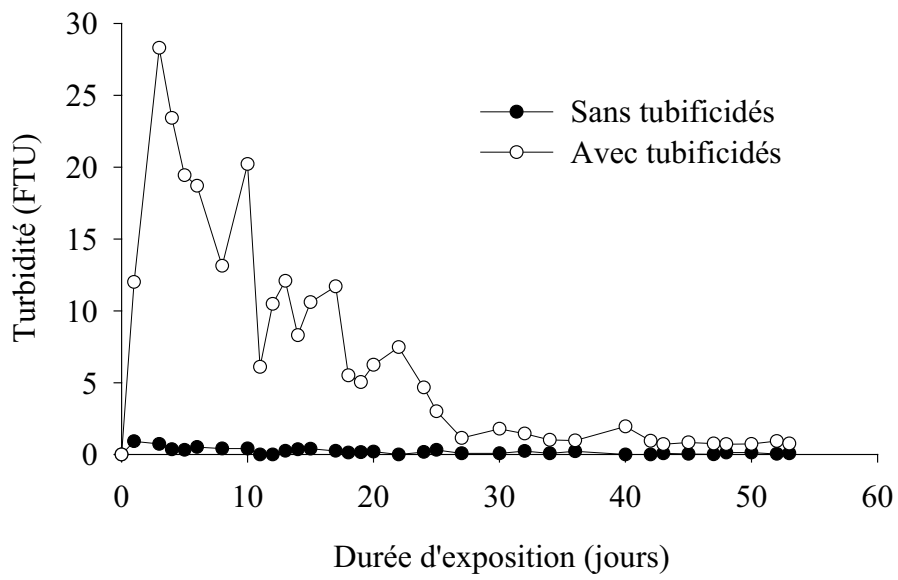
différentes profondeurs dans le sédiment : un vers plus petit s'alimentera dans une zone moins profonde qu'un grand et de ce fait ingèrera plus tôt les microsphères et les remontera plus précocement en surface. Dès 10 jours, une légère remontée des microsphères est observée. Pendant ce temps, les vers de plus grande taille ingèrent puis rejettent du sédiment dépourvu de traceurs fluorescents : ceci entraîne un phénomène de "dilution" des traceurs, mis en évidence par les coefficients de biodiffusion plus élevés. A long terme, ce phénomène conduirait à une homogénéisation de la répartition des microsphères dans l'intégralité de la zone sédimentaire où les oligochètes se nourrissent. La grande majorité des vers ne pouvant ingérer les luminophores, ces derniers se stabilisent au niveau de la zone maximale d'ingestion : ceci conduit au décalage observé après 20 jours entre les profils de luminophores et de microsphères. Certains gros vers peuvent cependant ingérer les plus petits luminophores (63  $\mu\text{m}$ ) et les remonter en surface. Ceci conduit à la légère augmentation des concentrations observées dans les tranches superficielles au temps 20 jours, tout particulièrement pour la répétition (a) (Figure III.9).

Il est important de souligner que selon la taille des particules sédimentaires, l'impact de ce type de bioturbation diffèrera notablement vis-à-vis des transferts des métaux à partir de la colonne d'eau. En effet, les particules de faible taille, facilement ingérables par les vers, pourront être recyclées plusieurs fois à travers la zone d'ingestion et seront donc plusieurs fois en contact avec la colonne d'eau. Si cette dernière est contaminée par du cadmium (source "eau"), la fixation du métal sur les particules, à l'interface, pourra accroître les transferts métalliques vers le compartiment sédimentaire (cf Partie III.B.1).

### III.A.2.2. La Turbidité générée par l'activité des tubificidés

*A priori*, les oligochètes tubificidés n'irriguent pas leurs terriers et ne vont donc pas remettre en suspension des particules sédimentaires au sein de la colonne d'eau. Par contre, le dépôt des pelotes fécales à la surface des sédiments peut conduire à un transfert de particules vers la colonne d'eau. Nous avons suivi, pour l'ensemble des études menées avec ce modèle biologique, l'évolution de la turbidité dans les UEs, critère très important pour l'analyse interprétative des transferts métalliques lorsque les sédiments représentent la source initiale de contamination des systèmes expérimentaux.

La Figure III.11 présente les résultats du suivi quotidien de la turbidité réalisé lors d'une expérience basée sur des UEs de *type 2*, renfermant du sédiment de la Garonne, substrat naturel homogène au regard de la granulométrie, et des tubificidés (densité : 57 000



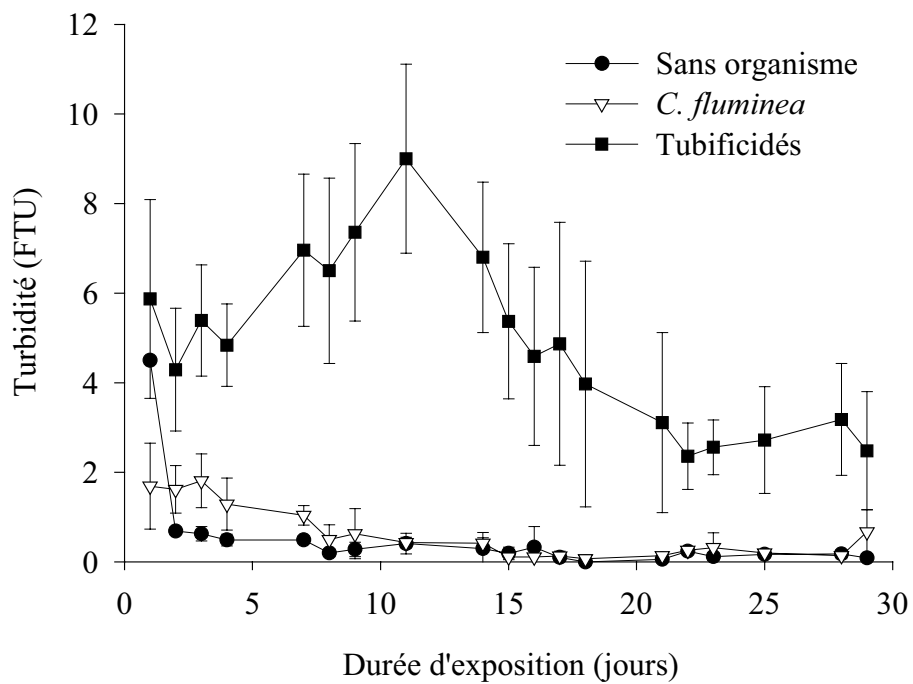
**Figure III.11.** Evolution de la turbidité de la colonne d'eau en fonction du temps et des deux conditions expérimentales étudiées : sans tubificidés et avec tubificidés.

individus.m<sup>-2</sup>). A titre de comparaison, les mesures réalisées sur les unités "témoins", sans organismes, ont été reportées sur le graphe. La température était fixée à 20 °C et la totalité de la colonne d'eau des UEs et du bac les contenant a été renouvelée chaque jour, afin de contrôler la pression de contamination *via* ce compartiment. Cette procédure exerce nécessairement un effet important sur l'évolution des MES dans la colonne d'eau des UEs. Notons que cette expérience, dont la durée maximale a été de 56 jours, sera détaillée dans la Partie III.B.

En absence de vers, la turbidité reste constante pendant les 56 jours, les valeurs étant très basses, proches ou inférieures à la limite de détection de l'appareil de mesure (0,5 FTU). Pour les UEs contenant les tubificidés, la turbidité augmente pendant les trois premiers jours, jusqu'à une valeur maximale de 28 FTU. Elle diminue ensuite régulièrement jusqu'à 27 jours puis reste constante avec des valeurs faibles, comprises entre 0,7 et 1,9 FTU. Les tubificidés entraînent donc, dans nos conditions expérimentales, une remise en suspension des particules sédimentaires, qui est loin d'être négligeable puisqu'elle atteint 28 FTU, et ce malgré les renouvellements journaliers de la colonne d'eau. La turbidité est beaucoup plus élevée en début qu'en fin d'expérience, en relation avec l'introduction des vers dans les UEs, leur enfouissement et la construction des galeries. Ces activités entraînent une remise en suspension des particules, qui explique le pic de turbidité observé à trois jours. Ensuite, une fois installés, les vers ont une activité beaucoup moins intense, avec des phases d'enfouissement et de remontée pour respirer en surface, par l'intermédiaire de la partie terminale du corps, ou pour se nourrir plus en profondeur.

La remise en suspension des particules sédimentaires sous l'action des tubificidés est-elle identique lorsque le sédiment présente des caractéristiques granulométriques et géochimiques différentes ? Une étude similaire a été menée avec du sédiment collecté au niveau de la retenue de Cajarc, sur la rivière Lot.

La Figure III.12 montre l'évolution de la turbidité mesurée dans des UEs de *type 1* renfermant 1,5 kg de sédiment, deux litres d'eau du réseau et différents organismes, en fonction de la condition expérimentale étudiée : présence de bivalves (4 *C. fluminea*/UE) ; de tubificidés (densité : 57 000 individus.m<sup>-2</sup>) ; aucun organisme. L'expérience s'est déroulée à 20 °C et a duré 30 jours. Soulignons que la colonne d'eau des UEs n'a pas été renouvelée comme lors de l'expérience précédente, la source initiale de contamination métallique étant le compartiment sédimentaire. Les détails du protocole ainsi que la totalité des résultats obtenus seront présentés dans la Partie III.C.2.



**Figure III.12.** Evolution de la turbidité de la colonne d'eau en fonction du temps et des trois conditions expérimentales étudiées : sans organisme ; présence des bivalves *Corbicula fluminea* ; présence des tubificidés.

Pour les deux conditions "sans organisme" et "présence de *C. fluminea*", la turbidité reste très faible pendant toute la durée de l'expérience, à des valeurs inférieures à 2 FTU ; elle est un peu plus élevée au début, à cause de la mise en eau des UEs, qui entraîne toujours une légère remise en suspension des particules sédimentaires, et ce même si le maximum de précautions ont été prises pour éviter un brassage à la surface des sédiments. La présence des bivalves se traduit par un faible accroissement de la turbidité de la colonne d'eau, par rapport à la condition "sans organisme", pendant la première semaine. Très rapidement après leur introduction dans les UEs, les bivalves s'enfouissent dans le sédiment et se positionnent quasi-définitivement, générant ainsi une faible et transitoire remise en suspension des particules.

En présence de tubificidés, la turbidité augmente jusqu'à 9 FTU pendant les 10 premiers jours, puis diminue pour atteindre une valeur moyenne de 2,5 FTU à la fin de l'expérience. Comme précédemment avec le sédiment de la Garonne, les vers entraînent une augmentation temporaire de la turbidité de la colonne d'eau, qui diminue ensuite. Soulignons toutefois que les mesures de turbidité sont très nettement inférieures à celles observées en présence des larves d'éphémère (facteur proche de 25 entre les valeurs maximales, pour un même sédiment et un même type d'UE – cf Figure III.4).

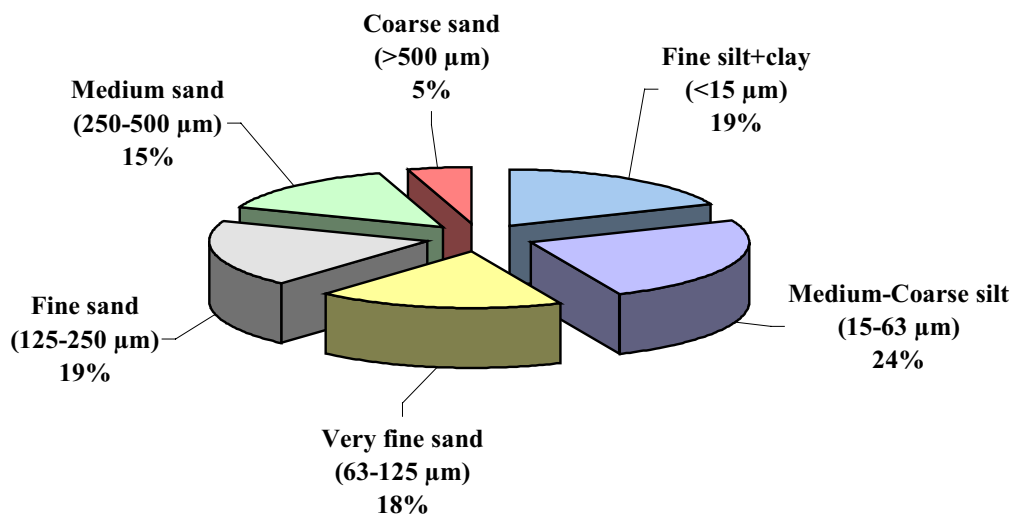
### **III.A.2.3. Analyses radioscopique et granulométrique du reclassement du sédiment réalisé par les tubificides sur le sédiment de Cajarc, et evolution de la teneur en eau**

Nous avons vu dans les deux parties précédentes que les tubificidés généraient une forte bioadvection. Ce type de bioturbation entraîne une faible remise en suspension des particules dans la colonne d'eau, mais il se traduit par un fort remaniement du sédiment, des couches profondes étant ramenées en surface. L'objectif de cette expérience est de mieux connaître l'impact direct de la bioadvection générée par une population d'oligochètes sur la structure du sédiment.

Nous avons mis en place une approche faciologique et sédimentologique, afin d'analyser les effets des tubificidés sur la distribution granulométrique verticale d'un sédiment naturel homogénéisé et de percevoir comment et à quelle vitesse le dépôt initial est réorganisé. Deux techniques complémentaires ont été utilisées : (i) l'analyse radioscopique, qui permet de visualiser la structure des colonnes sédimentaires sans les détruire ; (ii) l'analyse microgranulométrique par diffractométrie laser, après découpage du sédiment en tranches de

	(-Tub)	(+Tub1)	(+Tub2)	(+Tub3)	(+Tub4)
Radioscopie	0, 10, 24, 38 et 93 j	0 et 10 j	0 et 24 j	0 et 38 j	0 et 93 j
Teneur en eau / Granulometrie	93 j	10 j	24 j	38 j	93 j

**Tableau III.3.** Analyses réalisées pour chacun des temps d'échantillonnage dans les cinq unités expérimentales.



**Figure III.13.** Distribution granulométrique du sédiment de Cajarc homogénéisé, au temps zéro de l'expérience.

1 cm d'épaisseur. Les données provenant de cette approche expérimentale permettront de définir des zones de granulométrie et de teneur en eau différentes dans le sédiment colonisé par les tubificidés, de mesurer leurs variations d'épaisseur au cours du temps et ainsi de quantifier les modifications générées par la bioadvection sur la structure du sédiment et les limites verticales de ces modifications. Elles conduiront également à déterminer le spectre de taille des particules ingérées par les trois espèces de tubificidés.

## Matériels et méthodes

### *Protocole expérimental et structure des microcosmes*

Deux conditions expérimentales ont été choisies pour cette expérience. La première, notée (-Tub), ne renfermait aucun organisme : c'est la condition "témoin" qui a permis de suivre, en absence de bioturbation, d'éventuelles modifications de l'état initial du sédiment. La deuxième condition, notée (+Tub), renfermait une population de vers oligochètes tubificidés, similaire à celles utilisées lors des expériences antérieures. Cette condition a servi à étudier l'effet de la bioturbation sur la distribution verticale de la granulométrie des particules sédimentaires. L'expérience a duré 93 jours, avec 5 temps d'échantillonnage : 0, 10, 24, 38 et 93 jours. Une unité expérimentale (UE) a été constituée pour la condition (-Tub) et quatre UEs pour la condition (+Tub). Le Tableau III.3 précise le codage des UEs en fonction de la condition expérimentale et du temps d'échantillonnage.

La structure de base était constituée par une boîte en plastique de 19,5 cm de hauteur, 7,5 cm de largeur et 2,3 cm d'épaisseur. Les deux côtés de la boîte ont été collés par un joint de silicone. L'intérêt d'utiliser ce nouveau type d'UE était de pouvoir enlever le joint de silicone et d'ouvrir la boîte pour échantillonner les différentes tranches de sédiment. Chaque UE contenait un biotope mixte constitué de la colonne d'eau et de sédiment collecté au niveau de la retenue de Cajarc, sur la rivière Lot. Rappelons que le sédiment a été tamisé à 1 mm pour enlever la macrofaune et les débris les plus grossiers, puis congelé à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour tuer tous les organismes. Avant l'expérience, le sédiment a été décongelé et homogénéisé mécaniquement. Dix échantillons ont été prélevés pour analyser la granulométrie et les teneurs en carbone organique et en eau (poids sec après dessiccation à l'étuve à  $60^{\circ}\text{C}$  pendant 72 h). La distribution granulométrique initiale du sédiment est présentée sur la Figure III.13. La teneur en eau était de 62 %, avec 6,9 % de carbone organique. Cette forte teneur en carbone organique a permis de maintenir les vers dans les UEs pendant plus de 3 mois, sans apports exogènes de nourriture. Ce sédiment est caractérisé par un large spectre granulométrique, qui





autorisait un éventuel reclassement par les vers, en fonction de la taille des particules. Les cinq UEs ont été remplies avec 480 g (pf) de sédiment, soit une épaisseur de 17 cm ; 2,5 cm d'eau du réseau déchlorée, soit 40 mL, ont ensuite été ajoutés délicatement, afin d'éviter de remettre en suspension des particules sédimentaires.

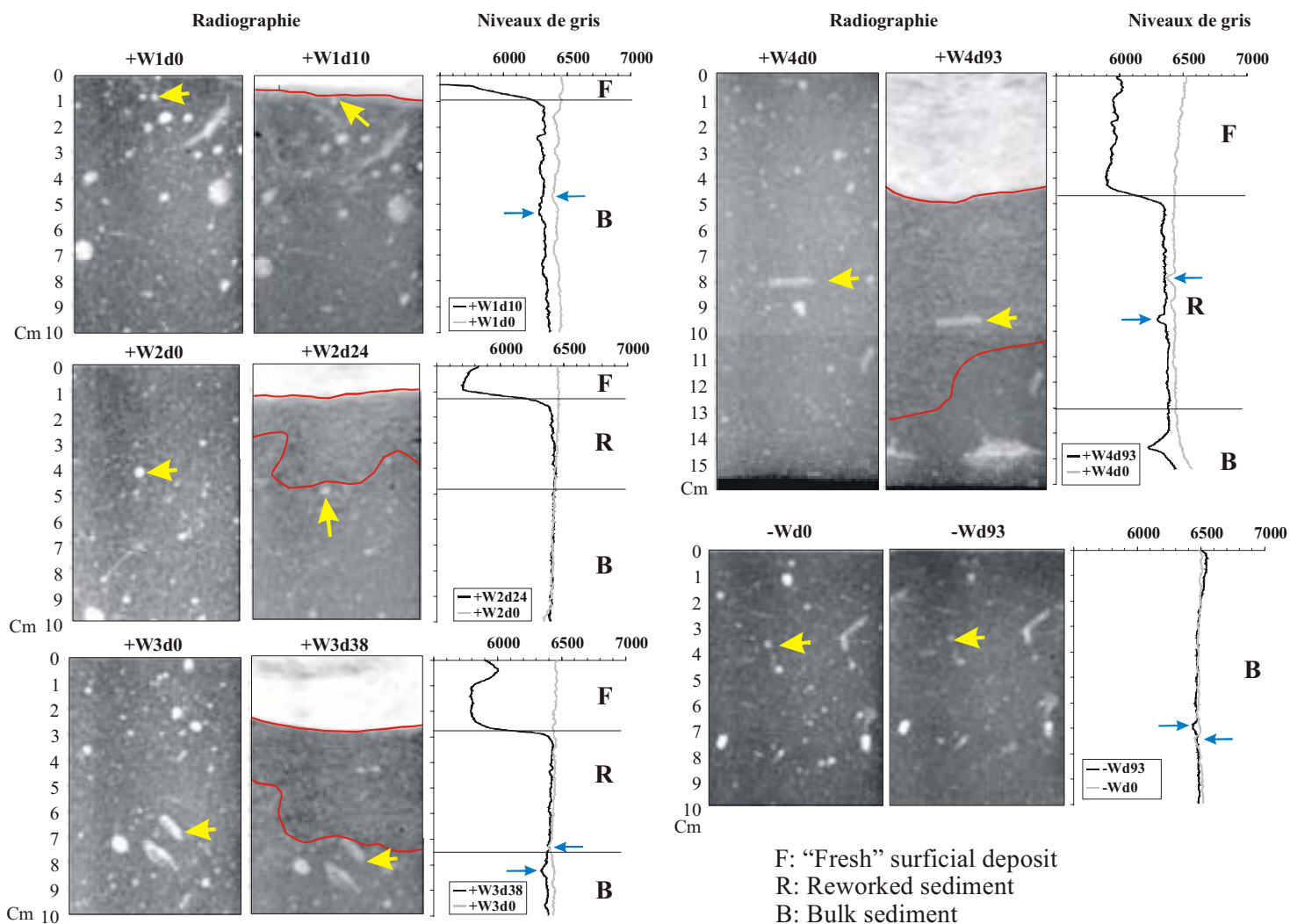
La source de bioturbation était constituée d'une population de vers tubificidés prélevés en milieu naturel (Société Grébyl, Arry, France) et acclimatés pendant 15 jours au laboratoire, à 20°C. Quatre lots de poids égaux ( $203 \pm 0,7$  mg, pf) ont été constitués, sans tri préalable afin de conserver l'hétérogénéité des tailles des vers, caractéristique des populations naturelles. Chaque lot correspondant à  $108 \pm 7$  individus a été introduit dans une UE, ce qui a conduit à une densité de 62 000 individus.m<sup>-2</sup>.

Les UEs ont été placées dans un aquarium commun, lui même installé dans un bac équipé d'un système de thermorégulation fixée à 20°C. L'éclairage et la photopériode étaient naturels. La colonne d'eau des cinq UEs était commune. La partie supérieure de l'unité sans organismes (-Tub) a été recouverte d'un filet de maille très fine, afin d'éviter une éventuelle colonisation de cette enceinte témoin par des vers venant des autres UEs.

#### ***Procédure d'échantillonnage, analyse granulométrique et technique de radioscopie***

La planification de l'échantillonnage est résumée dans le Tableau III.3. Une analyse radioscopique a été réalisée sur les cinq UEs au temps zéro, avant l'introduction des organismes. Ensuite, après 10, 24, 38 et 93 jours, une UE contenant des vers a été prélevée pour subir une étude complète : analyse en radioscopie ; enlèvement du joint de silicone et découpage du sédiment en 17 tranches de 1 cm d'épaisseur. Chacune des tranches a été homogénéisée et distribuée dans 2 piluliers : un pour la détermination de la teneur en eau (72 h à 60°C) et l'autre pour l'analyse de la distribution granulométrique. En parallèle, pour les temps 10, 24 et 38 jours, l'UE correspondant à la condition (-Tub) a elle aussi été analysée en radioscopie, puis replacée dans l'aquarium commun. Au dernier temps (93 j), cette unité a été analysée en radioscopie, puis découpée en tranches pour l'examen de la teneur en eau et de la distribution granulométrique.

Rappelons que la technique de radioscopie permet de visualiser la structure interne d'un objet par l'absorption d'un rayonnement X. C'est une méthode non destructrice, qui n'altère pas la matrice sédimentaire mais dont le rayonnement peut détruire les organismes. Les analyses ont été effectuées sur l'appareillage de radioscopie SCOPIX, conçu par la société CEGELEC pour l'étude des carottes sédimentaires (cf Partie II.B.4.3). Outre la visualisation



**Figure III.14.** Photos obtenues en radioscopie RX pour les cinq UE étudiées. Les images de gauche ont été prises au temps zéro de l'expérience (d0). Les images de droite ont été prises aux différents temps expérimentaux : à 10 jours pour (+W<sub>1</sub>) ; à 24 jours (+W<sub>2</sub>) ; à 38 jours (+W<sub>3</sub>) ; à 93 jours pour (+W<sub>4</sub>) et pour (-W). Le graphe présenté à côté des photos montre la moyenne des niveaux de gris mesurés pour les deux photos de chaque UE : en gris clair, l'image au temps zéro et en noir, l'image au temps d'échantillonnage correspondant. Pour les trois premiers temps et le témoin, seuls les 10 premiers cm de sédiment ont été présentés car ce sont les seuls pour lesquels un impact de la présence des vers a été mesuré. Pour la condition (+W<sub>4</sub>), l'ensemble de la hauteur du sédiment a été représenté car l'impact des vers a été sensible au-delà du dixième centimètre. Les flèches jaunes permettent de suivre un même défaut sur les deux images prises aux deux temps d'échantillonnage. Les flèches bleues indiquent ce même défaut sur le graphe des niveaux de gris, quand l'identification a été possible sans ambiguïté. Les lignes rouges indiquent les limites entre les trois zones du sédiment. Ces zones ont été reportées sur le graphe des niveaux de gris et notées F ("Fresh surficial deposit"), R ("reworked sediment") et B ("bulk sediment").

-W : aucun organisme ; +W : présence de tubificidés

du contenu des UEs, l'analyse des variations de l'atténuation du rayonnement X après son passage au travers du sédiment est présentée sur une échelle relative, exprimée en milliers de niveaux de gris, qui permet de préciser les limites des différentes couches sédimentaires.

La mesure de la granulométrie des particules sédimentaires a été réalisée avec un diffractomètre laser (cf Partie II.B.1.3). Nous avons utilisé la classification d'Inmam (1952) pour définir les différentes fractions granulométriques passant des argiles aux sables grossiers. Les unités sédimentaires sont déterminées par les histogrammes de fréquences et par la moyenne granulométrique.

## Résultats

La Figure III.14 présente les images obtenues en radioscopie RX pour les 5 UEs au temps zéro, puis aux différents temps d'échantillonnage. Celles correspondant au temps zéro montrent que, malgré le brassage mécanique, le sédiment n'est pas parfaitement homogène mais présente de nombreuses irrégularités, de taille variable. Ces irrégularités apparaissent en blanc ou gris clair sur les photographies. Leur densité est donc inférieure à celle du reste du sédiment : il s'agit certainement de bulles d'eau ou d'air piégées dans le sédiment lors de la constitution des UEs. Ces anomalies de densité vont cependant être utiles car, en comparant leur présence ou absence ainsi que leur position entre les images de gauche (temps zéro) et de droite (10, 24, 38 ou 93 jours), elles indiquent si la zone du sédiment dans laquelle elles se trouvent a, ou non, été remaniée par les vers. Etant donné que le diamètre des terriers des tubificidés se situe entre 0,2 et 0,8 mm de diamètre [Rogaar, 1980] et compte-tenu de l'épaisseur et de la nature hétérométrique du sédiment, il n'a pas été possible de visualiser ces structures biogènes. Rogaar avait étudié les terriers de tubificidés par stéréo-radiographie aux rayons X, mais il avait déshydraté le sédiment, découpé en plusieurs tranches verticales et horizontales, avant de les observer.

L'analyse des quatre images de la condition (+Tub), correspondant aux différents temps d'échantillonnage, permet de définir trois zones de densité variable dans le sédiment en fonction de la profondeur : (i) zone de surface, notée "F" pour "fresh surficial deposit", qui est entièrement constituée de pelotes fécales rejetées par les vers ; (ii) zone intermédiaire, notée "R" pour "reworked sediment", qui correspond à la couche dans laquelle les vers ont ingéré des particules pour se nourrir ; (iii) zone profonde, notée "B" pour "bulk sediment", qui désigne la zone non perturbée et correspond au sédiment initial. La zone F est facile à définir : sur les photos, elle apparaît en gris très clair, presque blanc, à la surface du compartiment sédimentaire. Sur les graphes des niveaux de gris, elle se distingue très nettement, puisque la

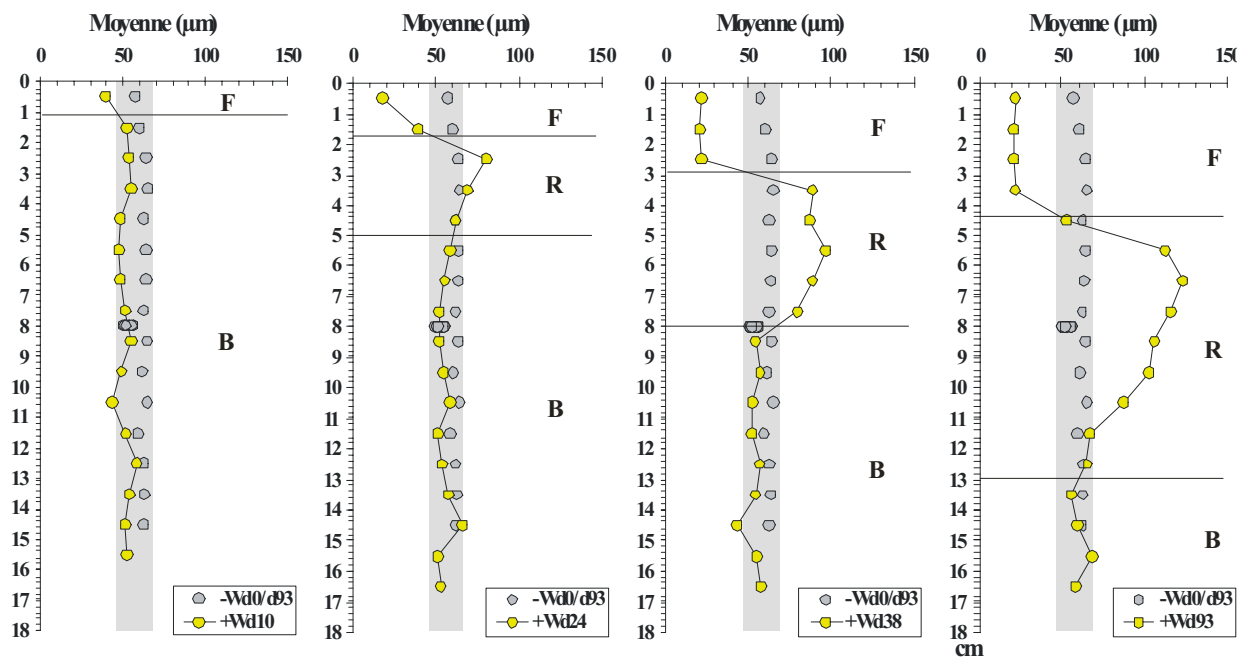


moyenne des niveaux de gris est inférieure à celle du sédiment au temps zéro, qui est d'environ 6500. Sa densité, beaucoup plus faible que celle du reste de sédiment, résulte d'un enrichissement en eau et/ou en particules de petite taille. L'épaisseur de cette zone F augmente avec le temps, sa limite avec la zone R, qui lui est directement inférieure, est toujours très nette. Notons que cette zone F est plus difficile à délimiter au temps 10 jours que pour les temps suivants, à cause de la présence d'une fine couche d'eau surnageante : la limite entre l'eau et la zone F est alors difficile à préciser, leurs densités respectives étant très proches.

La zone R est plus difficile à délimiter, car la surface de contact entre les zones R et B n'est pas horizontale. Ceci peut être attribué au comportement des tubificidés : en descendant dans le sédiment pour se nourrir, les vers ne s'arrêtent pas à un endroit précis. La difficulté est augmentée par le fait que les deux zones R et B ont des niveaux de gris voisins, et donc des densités proches, qui ne se différencient pas sur les images radio ni sur les graphes des niveaux de gris. Toutefois, la disparition de certaines anomalies de densité présentes sur les images prises au temps zéro permet de repérer les endroits où le sédiment a été remanié et donc les zones d'ingestion des particules par les vers. De cette façon, la limite entre les zones F et R peut être localisée sur les UEs des conditions (+Tub2) et (+Tub3) : elle se situe à environ 2 cm de profondeur à 24 jours et à 3 cm après 38 jours. Dans l'UE (+Tub1), il n'a pas été possible de placer la limite R/B : au temps 10 jours, les vers n'ont pas encore ingéré assez de particules pour que la zone R se différencie de la zone B. Cette limite se situe à 7 cm à 24 jours et 8 cm à 38 jours. De même, dans l'UE analysée au temps 93 jours (+Tub4), la limite entre ces deux zones n'a pas pu être déterminée avec précision, car le sédiment est assez perturbé au bas de la photo : elle se situe entre 10 et 16 cm, le sédiment étant parfaitement homogène au-dessus. Mentionnons que l'analyse granulométrique apportera des indications supplémentaires. Comme pour la zone F, l'épaisseur de la zone R augmente avec le temps.

Pour l'UE témoin (-Tub), la seule différence vraiment visible entre le temps zéro et 93 jours est un léger brouillage du signal, qui atténue les irrégularités du sédiment en fin d'expérience. Ceci permet de conclure que, en absence d'organismes et de bioturbation, la densité du sédiment n'est pas modifiée avec le temps et que les effets observés sur les 4 UEs de la condition (+Tub) sont bien le résultat de l'activité biologique.

L'observation de la position des anomalies de densité les mieux visibles, au temps zéro et au cours des différents temps de prélèvement, montre qu'il se produit un décalage vers le bas de la hauteur de sédiment, visualisé sur la Figure III.14 par les flèches jaunes et bleues. Ce décalage est lié à un tassement du sédiment. Dans le cas des "défauts" présents dans la zone



**Figure III.15.** Evolution de la moyenne granulométrique du sédiment, en fonction de la profondeur et du temps, pour les quatre UEs de la condition (+Tub) (points jaunes). La moyenne granulométrique de l'UE de la condition sans vers (-Tub), à 93 jours, a été reportée sur ces graphes (points gris). Les 10 moyennes granulométriques du sédiment homogénéisé au temps zéro, avant son introduction dans les UEs, ont été également représentées sur le graphe à 8 cm de profondeur (points gris). La bande grise verticale prend en compte les valeurs du temps zéro et de l'UE (-Tub) au temps 93, pour définir la zone de variabilité granulométrique du sédiment utilisé. Les limites des couches F, R et B ont été reportées (lignes horizontales).

-W : aucun organisme ; +W : présence de tubificidés

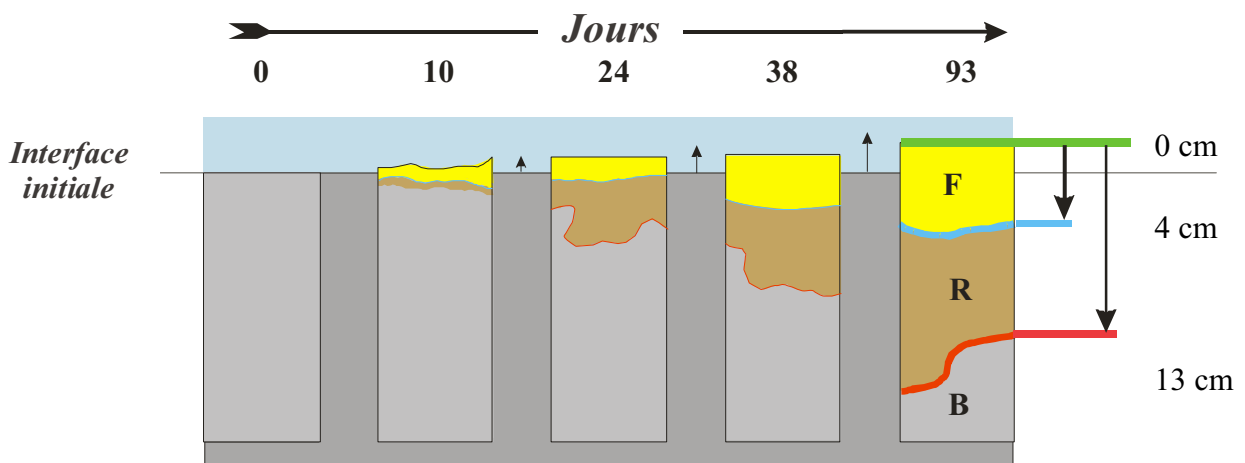
R, le décalage vers le bas est aussi lié au fait que les vers, en consommant les particules fines dans cette zone, entraînent son amincissement. Comme ils rejettent en surface les pelotes fécales, entièrement constituées de particules fines de la zone R, cette zone va s'enfoncer. Ceci augmente le décalage lié à la seule compression du sédiment : ce phénomène est particulièrement marqué pour le défaut signalé par les flèches au temps 93 jours.

L'évolution de la distribution verticale de la moyenne granulométrique du sédiment pour les différents temps d'échantillonnage (Figure III.15), permet de confirmer la définition des trois zones dans le sédiment bioturbé. D'une façon générale, une très bonne adéquation est observée entre les données de radioscopie et les mesures granulométriques. Au temps 10 jours - UE (+Tub1) -, la moyenne granulométrique de la tranche 0-1 cm est inférieure à celles de toutes les autres tranches, qui sont homogènes entre elles. Ceci confirme la présence de la zone F dans le premier centimètre et l'absence de zone R bien définie (différenciation uniquement entre F et B). Au temps 24 jours - UE (+Tub2) -, la zone F se retrouve dans les deux premiers centimètres, avec une moyenne granulométrique minimale d'environ 20  $\mu\text{m}$  dans le premier centimètre. En dessous apparaît la zone R, caractérisée par une augmentation de la moyenne granulométrique jusqu'à 80  $\mu\text{m}$  environ. La zone B est plus profonde ( $> 5$  cm); sa moyenne granulométrique est identique à celle du sédiment au temps zéro. Aux temps 38 et 93 jours - UEs (+Tub3) et (+Tub4) -, l'épaisseur de la zone F augmente, passant de 3 à 4,5 cm, mais sa moyenne granulométrique reste très stable, proche de 20  $\mu\text{m}$ . L'épaisseur de la zone R augmente également avec le temps bien que la limite supérieure, au contact de la zone F, soit de plus en plus profonde. La granulométrie de la zone R n'est pas constante : elle varie avec la profondeur et aussi avec le temps, puisque le pourcentage maximum des tailles est de 100  $\mu\text{m}$  à 38 jours et de 125  $\mu\text{m}$  à 93 jours (Tableau III.4). La zone B est de plus en plus fine au cours du temps. Ces résultats des mesures granulométriques réalisées tous les centimètres dans le sédiment confirment donc ceux obtenus en radioscopie. Ils permettent également de préciser la limite entre les zones R et B en fin d'expérience, qui se situe à 13 cm de profondeur.

Les mesures de teneurs en eau, non représentées, montrent un net accroissement dans la zone F, et ceci à tous les temps. La teneur en eau des zones R et B ne varie pas, ni celle de l'ensemble du sédiment de l'unité de référence (-Tub).

## Discussion

Bien que l'activité biologique des tubificidés ne soit pas observable directement en visualisant les terriers, les résultats que nous avons obtenus grâce au couplage entre les



**Figure III.16.** Schéma présentant la mise en place des différentes zones sédimentaires au cours du temps.

Temps (jours)	Pourcentage des particules des différentes classes de tailles (%)							Moyenne ( $\mu\text{m}$ )
	< 15 $\mu\text{m}$	15-30 $\mu\text{m}$	30-63 $\mu\text{m}$	63-125 $\mu\text{m}$	125-250 $\mu\text{m}$	250-500 $\mu\text{m}$	> 500 $\mu\text{m}$	
0	18,7	9,4	15,1	18,3	19,1	14,5	4,8	62,6
10	15,2	10,9	16,2	17,0	17,6	16,6	6,4	71,9
24	13,8	7,6	14,3	19,5	21,0	17,2	6,5	80,7
38	11,7	6,3	12,3	18,6	23,0	20,7	7,3	96,1
93	7,3	4,4	10,3	19,4	27,2	23,7	7,7	122,8

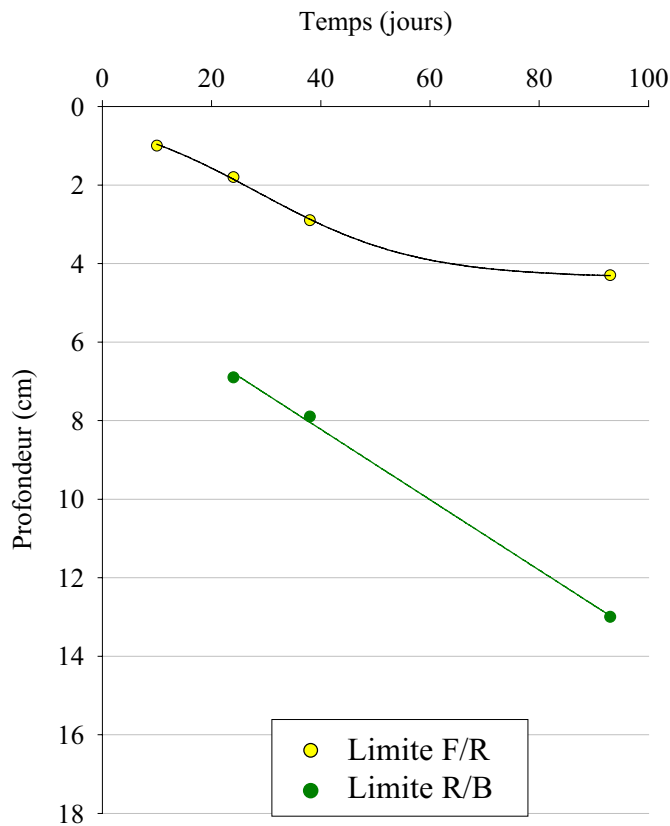
**Tableau III.4.** Evolution des fractions granulométriques de la zone R au cours du temps.



images en radioscopie et les mesures granulométriques, montrent que cette activité entraîne une redéfinition de la structure verticale du sédiment. En absence d'organismes, le sédiment est homogène sur toute sa hauteur. La présence des tubificidés provoque une modification complète du faciès, qui passe d'une vase silto-sableuse initiale – zone B -, à deux zones bien définies : une couche de vase silto-argileuse en surface – zone F - et une couche de sable fin intermédiaire – zone R - (Figure III.16). La strate supérieure silto-argileuse se développe en partie au-dessus de l'interface initiale, avec une augmentation de la teneur en eau. Le contact entre ces deux zones est horizontal et parfaitement net, à la fois sur les images RX et à partir des mesures granulométriques. Les organismes de type "convoyeur", qui prélèvent des particules en profondeur et les rejettent en surface, sont donc capables de modifier le signal sédimentaire, voire de l'inverser selon les cas. Nos résultats indiquent que ce phénomène est rapide : dans nos conditions expérimentales, 93 jours suffisent à la création d'une couche de surface riche en eau et composée de particules fines (20  $\mu\text{m}$ ), dont l'épaisseur est supérieure à 4 cm. McCall et Fisher (1980) avaient défini 4 couches différentes dans un sédiment colonisé par des tubificidés pendant 56 jours : une couche de surface de 3-4 mm d'épaisseur, constituée de pelotes fécales ; une deuxième couche de 5 mm, formée de pelotes fécales compactées ; une troisième couche de 4-5 cm d'épaisseur, correspondant à la zone d'ingestion des vers et enfin, la couche la plus profonde, constituée du sédiment initial. Nous avons observé ici seulement trois zones, la zone F correspondant aux deux premières couches distinguées par ces auteurs. Ceci est peut-être lié à une différence de densité ou de granulométrie entre les sédiments. De plus, la distinction qu'ils établissent entre les deux couches constituées de pelotes fécales s'appuie uniquement sur des données visuelles. Soulignons également que les épaisseurs des différentes couches distinguées par McCall et Fisher sont beaucoup plus fines que celles que nous avons mesurées, certainement en raison d'une densité de tubificidés plus faible.

#### *Evolution des hauteurs/épaisseurs des zones en fonction du temps*

L'évolution de la position des limites entre les zones F et R et entre les zones R et B, en fonction du temps, est présentée sur les Figures III.16 et III.17. La limite entre les zones F et R est de plus en plus profonde, mais la relation n'est pas linéaire : le meilleur modèle applicable aux données expérimentales est une sigmoïde ( $R^2 = 0,99$ ). Ceci signifie qu'il y a un ralentissement dans l'augmentation de l'épaisseur de la zone F avec le temps. Ce ralentissement est toutefois faible, puisque le coefficient de corrélation d'un modèle linéaire



**Figure III.17.** Evolution de la profondeur des limites entre les zones F/R et R/B en fonction du temps. Ces limites ont été définies par l'analyse radioscopique et confirmées par les mesures granulométriques.

Modèles de régression reportés sur le graphe : Limite F/R= $4,64+0,09*\text{Temps}$  avec  $R^2=0,99$  et Limite R/B= $4,36/(1+\exp(-(\text{Temps}-28,39)/14,60))$  avec  $R^2=0,99$ .

est assez élevé :  $R^2 = 0.91$ . Entre 38 et 93 jours, la vitesse de rejet des pelotes fécales par les vers est inférieure à celle déterminée entre 0 et 38 jours. Ce ralentissement est certainement dû à un tassement différentiel de la zone F au cours du temps. La deuxième hypothèse serait qu'à partir de 38 jours, des particules sont consommées dans cette zone F. Il est probable que les vers de plus petite taille, compte-tenu de l'hétérogénéité des lots d'organismes introduits au temps zéro dans les unités, dont la taille est proche de l'épaisseur de la zone F, ingèrent à des fins nutritives des particules dans cette zone, ne pouvant le faire plus en profondeur. Il semblerait donc qu'il existe une limite dans l'épaisseur de la couche de pelotes fécales, résultant d'un équilibre entre production et consommation. Si le modèle présenté précédemment est extrapolé dans le temps, la limite d'épaisseur de F serait atteinte après environ 130 jours et aurait une épaisseur maximale de 4,4 cm, dans nos conditions expérimentales.

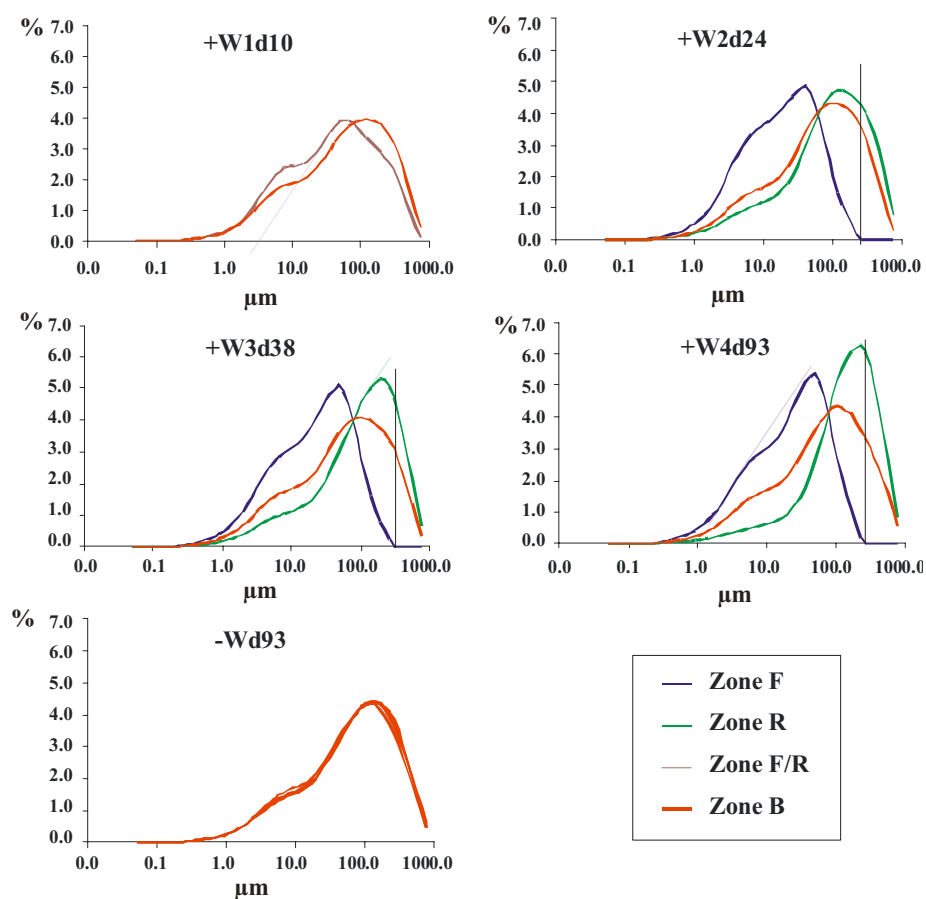
Le meilleur modèle traduisant la relation entre la position de la limite entre les zones R et B et la durée (Figure III.17) est un modèle linéaire ( $R^2 = 0.99$ ). La limite R/B s'enfonce donc progressivement, sans ralentissement et ceci malgré le fait que, avec le temps, la zone R s'appauvrit à cause des particules ingérées par les vers. Ceci signifie que les tubificidés descendent de plus en plus en profondeur pour ingérer les particules sédimentaires dont ils vont retenir la matière organique, associée aux bactéries. Cependant, les vers ne vont pas descendre indéfiniment dans le sédiment : arrivés à une certaine profondeur, ils vont s'arrêter compte-tenu de leurs critères biométriques. Il faut toutefois rappeler leur capacité d'étirement, qui peut sensiblement abaisser la zone d'ingestion. Dans nos conditions expérimentales et après 93 jours, la zone maximale d'ingestion des populations hétérogènes de vers introduites au temps zéro dans les UEs ne serait pas atteinte. Cette limite se situerait au-delà du 13<sup>ème</sup> centimètre. Cette profondeur est en accord avec les observations réalisées par Davis (1974), dans des conditions expérimentales différentes (zone maximale d'ingestion à 16 cm de profondeur).

Il est généralement décrit dans la littérature que les tubificidés se nourrissent à une profondeur constante. Au contraire, notre étude a montré une évolution de la zone d'ingestion en fonction du temps, qui s'enfonce progressivement. Il est intéressant de souligner que ce résultat est en accord avec les données obtenues lors des expériences que nous avons effectuées avec des traceurs particuliers fluorescents. Par exemple, l'utilisation de microsphères (1  $\mu\text{m}$  de diamètre) pour modéliser l'activité de bioturbation des vers avait permis de mettre en évidence l'ingestion de ces particules dès 7 jours, à la profondeur de 0,5-2 cm. Pour Davis (1974), la prise de nourriture des tubificidés intervient principalement entre 3



et 6 cm de profondeur. Poddubnaia et Sorokin (1961) ont noté que les tubificidés ne se nourrissent jamais en dessous de 20 cm de profondeur, et rarement en dessous de 6 cm. Fisher *et al.* (1980) ont mesuré une perturbation du sédiment par les tubificidés jusqu'à 6-9 cm de profondeur. Nos résultats montrent que les vers prélèvent des particules sédimentaires dans une gamme de profondeur plus étendue, allant de 2 jusqu'à 13 cm. A la fin de notre expérience (93j), le maximum granulométrique a été mesuré dans la tranche 6-7 cm, ce qui montre que les vers ont prélevé plus de particules fines dans cette zone que dans les autres.

Dans une expérience basée sur l'utilisation de couches de sédiment ayant des moyennes granulométriques différentes, Giangrande *et al.* (2002) ont montré que le polychète *Naineris laevigata* (polychète convoyeur marin) ramenait en surface une couche de vase située à 4 cm de profondeur dans le sédiment. Cette couche rejetée en surface mesurait plus de 1 cm d'épaisseur au bout de 30 jours. Dans nos conditions expérimentales, la vitesse de remaniement du sédiment par les vers est très rapide : en 93 jours, ils ont modifié la structure sédimentaire sur 13 cm d'épaisseur, entraînant le passage d'un sédiment homogène à un sédiment hétérogène, constitué de 3 zones de granulométrie et de teneur en eau différentes. La vitesse de bioadvection des vers, c'est-à-dire la vitesse d'augmentation de l'épaisseur de la zone F, est rapide en début d'expérience : 1 cm en 10 jours, soit environ  $36,5 \text{ cm.an}^{-1}$  ; au bout de 24 jours, cette vitesse est de  $27,4 \text{ cm.an}^{-1}$ . Nous retiendrons la première de ces valeurs pour la vitesse de bioadvection, car à 10 jours, le tassement de la couche de pelotes fécales est encore limité, n'induisant pas une sous-estimation de ce paramètre. La vitesse de bioadvection que nous avons précédemment estimée à l'aide du modèle de bioadvection/biodiffusion appliqué sur les profils des traceurs particuliers fluorescents (cf Partie III.A.2.1), pour des conditions expérimentales similaires, était de  $42 \text{ cm.an}^{-1}$ , sur la base des données recueillies au bout de 20 jours. Les valeurs obtenues avec ces deux méthodologies différentes sont du même ordre de grandeur. Notons que les analyses radioscopiques et granulométriques donnent directement accès aux limites physiques entre les différentes couches sédimentaires reclassées par les vers ; elles sont de ce fait probablement plus sûres et plus précises. Si l'on compare la vitesse de bioadvection obtenue lors de cette expérience ( $36,5 \text{ cm.an}^{-1}$  ou  $0,16 \text{ cm.j}^{-1}$  pour une densité moyenne de  $62\,000 \text{ vers.m}^{-2}$ ) avec celles publiées dans la littérature, pour une densité de  $100\,000 \text{ vers.m}^{-2}$  ( $0,23$  et  $0,68 \text{ cm.j}^{-1}$  pour *Limnodrilus hoffmeisteri* ;  $0,10$  et  $0,64 \text{ cm.j}^{-1}$  pour *Tubifex tubifex* [Davis 1974 ; Fisher *et al.* 1980 ; McCall and Fisher 1980 ; Matisoff *et al.*, 1999]), les ordres de grandeur sont une nouvelle fois comparables. La vitesse estimée dans nos conditions expérimentales se situe dans la partie inférieure de cette gamme. Plusieurs arguments peuvent être avancés, notamment le fait que le sédiment de Cajarc que



**Figure III.18.** Distribution granulométrique caractéristique des trois zones F (“fresh surficial deposit”), R (“reworked sediment”) et B (“bulk sediment”), après 10, 24, 38 et 93 jours pour la condition (+Tub), présence de tubificidés et à 93 jours pour la condition (-Tub), aucun organisme. Pour l'UE (+Tub1), à 10 jours, les zones F et R n'ont pas pu être distinguées l'une de l'autre. Pour l'UE (-Tub), à 93 jours, quatre profondeurs de la zone B ont été reportées sur le graphe.

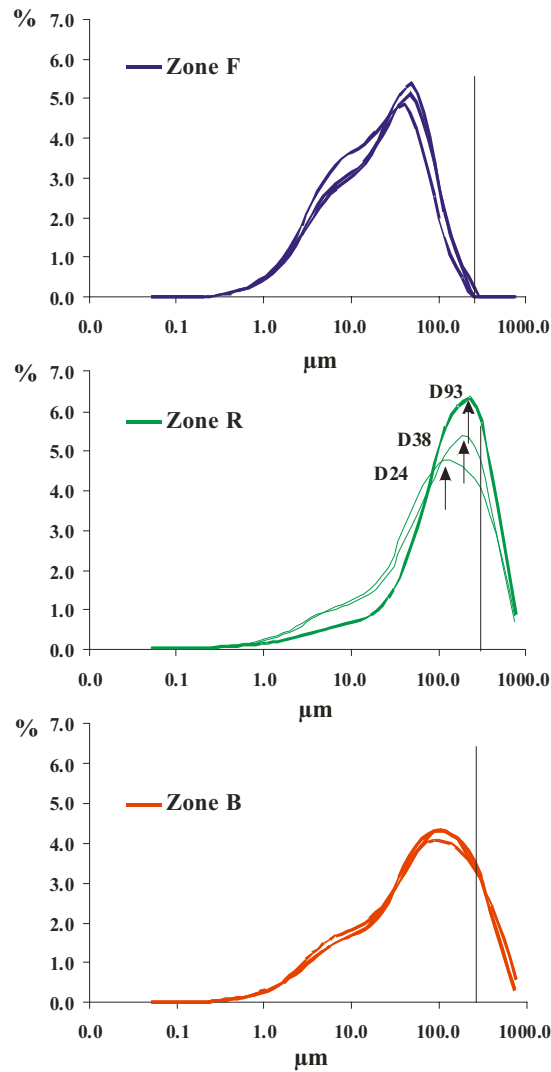
-W : aucun organisme ; +W : présence de tubificidés

nous avons utilisé renferme des concentrations élevées en cadmium et en zinc ( $86 \pm 5 \mu\text{gCd.g}^{-1}$  et  $3622 \pm 177 \mu\text{gZn.g}^{-1}$ , ps, respectivement), qui peuvent exercer un effet d'inhibition sur l'activité des vers.

### ***Caractéristiques granulométriques des trois zones sédimentaires et conséquences pour la compréhension du mode d'ingestion des vers***

Les spectres de distribution granulométrique des trois zones F, R et B, présentés sur les Figures III.18 et III.19, permettent de mieux préciser le mode de sélection des particules par les vers. Sur la Figure III.18, au temps 10 jours, il n'a pas été possible de caractériser séparément les zones F et R, qui correspondent à un mélange différent de la zone B, résultant d'une transformation précoce de la structure du sédiment. A partir de 24 jours, les distributions granulométriques des trois zones du sédiment sont bien différenciées.

La zone F possède la granulométrie la plus fine (Figure III.18) et son spectre de distribution est peu modifié avec le temps (Figure III.19). La distribution granulométrique présente un maximum entre 40 et 50  $\mu\text{m}$  de diamètre. Les vers ingèrent en moyenne 38 % de particules inférieures à 17  $\mu\text{m}$ , 78 % de particules inférieures à 63  $\mu\text{m}$  et 95 % de particules inférieures à 125  $\mu\text{m}$ . Rodriguez *et al.* (2001) ont montré que *Tubifex tubifex* ingère préférentiellement des particules inférieures à 63  $\mu\text{m}$  de diamètre, avec 75 % des particules inférieures à 25  $\mu\text{m}$ . Etant donné que nous avons travaillé sur un mélange d'espèces de tubificidés, et avec un sédiment différent de celui de ces auteurs, les résultats de ces deux études sont en accord. Pour les trois temps d'échantillonnage, aucune particule de diamètre supérieur à 259  $\mu\text{m}$  n'est retrouvée dans la zone F. Il existe donc une taille limite d'ingestion par les vers qui est au maximum de 259  $\mu\text{m}$  de diamètre, dans nos conditions expérimentales. En 1978, Juget indiquait une taille limite de 261  $\mu\text{m}$  pour *Limnodrilus hoffmeisteri*, de 130  $\mu\text{m}$  pour *Tubifex tubifex* et de 94  $\mu\text{m}$  pour *Limnodrilus claparedeianus*. Cependant, cet auteur ne précisait pas la taille des particules à disposition des vers. Nos résultats mettent en évidence que la sélection des particules sédimentaires par les tubificidés n'évolue pas avec le temps ; les vers consomment toujours le même pourcentage de chacune des tailles de particules. Davis a montré en 1974 que les grains de pollen de diamètre inférieur à 40  $\mu\text{m}$  étaient ingérés préférentiellement. McCall et Fisher (1980) ont observé qu'une population naturelle composée de plusieurs espèces de tubificidés enrichissait le premier centimètre de surface du sédiment en particules fines (argiles et silts).



**Figure III.19.** Comparaison des distributions granulométriques de chacune des zones de la condition (+Tub), présence de tubificidés, après 24, 38 et 93 jours et de la condition (-Tub), sans organisme, après 93 jours.



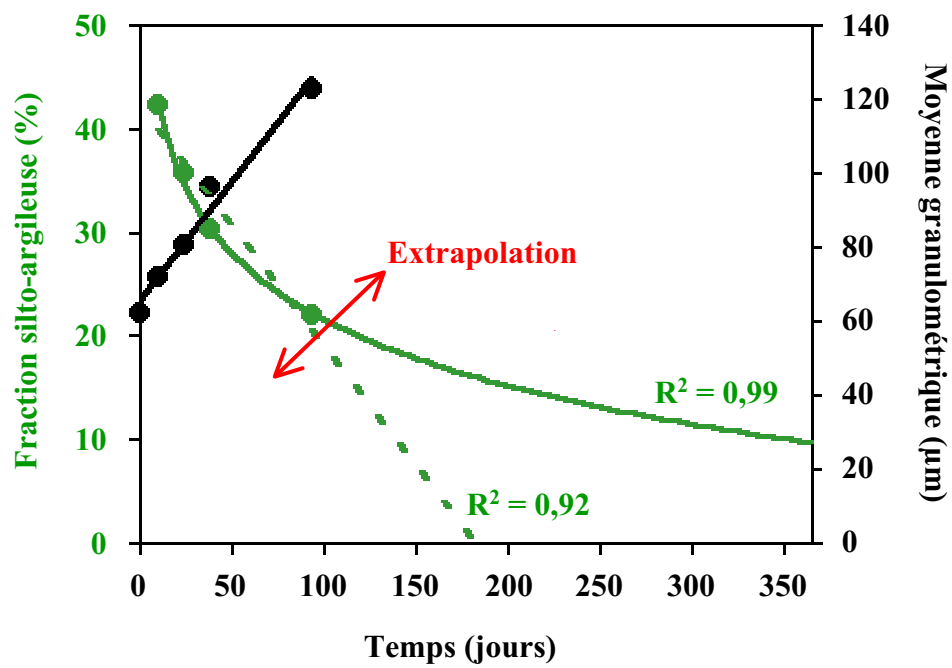
C'est la zone R qui possède la granulométrie la plus élevée (Figure III.18), avec environ 75 % de sables (diamètre supérieur à 63  $\mu\text{m}$ ) en fin d'expérience (Tableau III.4). Au contraire des zones F et B, dont la répartition granulométrique ne varie pas, celle de R évolue avec le temps (Figure III.19). Le pic correspondant au pourcentage maximal de particules d'une taille donnée augmente avec la durée et se déplace vers les tailles plus élevées (respectivement 121, 191 et 222  $\mu\text{m}$  après 24, 38 et 93 jours). En fin d'expérience, l'épaulement situé à gauche du pic a disparu. Le pourcentage de particules inférieures à 63  $\mu\text{m}$  diminue, celui des particules comprises entre 63 et 125  $\mu\text{m}$  ne varie pas et celui des particules supérieures à 125  $\mu\text{m}$  augmente (Tableau III.4). La Figure III.20 illustre les modifications de la moyenne granulométrique et de la fraction silto-argileuse : avec le temps, la moyenne granulométrique augmente alors que le pourcentage de particules silto-argileuses diminue.

Le spectre de taille des particules qui composent la zone B est identique, quel que soit le temps et la condition expérimentale (Figure III.18), avec un pourcentage maximal à 104  $\mu\text{m}$  de diamètre. Ceci confirme que cette zone n'a pas été modifiée par les vers et que, en absence de bioturbation, la granulométrie du sédiment ne se modifie pas avec le temps.

Cette étude expérimentale montre que l'activité des tubificidés est à l'origine d'un granulo-classement en appauvrissant progressivement la zone R en particules fines ; le pourcentage de particules grossières, non ingérées par les vers, augmente conjointement dans cette zone. Ces résultats ont permis de mettre en évidence une descente progressive de la limite inférieure de la zone d'ingestion avec un maximum d'ingestion localisé entre 6 et 7 cm et identifié par un appauvrissement supérieur en particules fines, argiles et silts. Néanmoins, cet appauvrissement ne conduit pas à une augmentation de la taille des particules qu'ils sélectionnent, du moins pendant les 93 jours de notre expérience.

## Conclusion

Les résultats issus de cette approche expérimentale montrent qu'en trois mois, une population de vers tubificidés de densité comparable à celles rencontrées en milieu naturel, modifie la structure du sédiment sur au moins 13 cm d'épaisseur. A partir d'un sédiment argilo-silto-sableux homogène, la bioadvection générée par ces oligochètes reclasse le sédiment en deux zones superposées, ayant des caractéristiques granulométriques complémentaires : une zone de surface constituée d'argiles et de silts, formée par les pelotes fécales ; une zone intermédiaire sableuse, dans laquelle les vers ont ingéré les particules fines.



**Figure III.20.** Evolution de la fraction silto-argileuse (<63 µm) et de la moyenne granulométrique de la zone R au cours du temps.

L'épaisseur de la couche de pelotes fécales augmente pendant les 93 jours, mais l'accroissement de son épaisseur tend vers un plateau en fin d'expérience. Elle présente un spectre granulométrique unimodal quasi-constant, ne dépassant pas 250  $\mu\text{m}$ . La couche intermédiaire sableuse évolue progressivement, perdant sa fraction silto-argileuse (cette perte pourrait s'effectuer en totalité au bout de 6 mois) qui se retrouve dans la strate supérieure. Les vers ingèrent des particules fines entre 2,5 et 13 cm de profondeur, la profondeur d'ingestion augmentant avec le temps. Ils ingèrent préférentiellement les argiles et les silts : 78 % des particules retrouvées dans les pelotes fécales sont inférieures à 63  $\mu\text{m}$  de diamètre. La vitesse de formation de ces couches est rapide, de l'ordre de 1,5 cm / mois.

Ces modifications du sédiment par la bioadvection des tubificidés sont profondes et importantes d'un point de vue sédimentologique. La lecture d'un faciès sédimentaire et son interprétation, en l'absence de manifestation claire d'une activité biologique sous la forme de terriers ou de structures caractéristiques, tend à privilégier l'analyse interprétative de la sédimentation à l'aide de processus physiques. Nos résultats, dans un contexte où l'organisation des dépôts ne traduit pas une activité de bioturbation, amènent à considérer que l'étude des variations granulométriques au sein d'une colonne sédimentaire pourrait dans certains cas, servir de clé de lecture : ainsi, à partir d'une succession de trois unités sédimentaires, si le spectre granulométrique de l'unité inférieure (ou supérieure) est égal à la somme des deux autres, la mise en place de cette sédimentation relève principalement d'une intense activité biologique. Au niveau écologique, une telle stratification du sédiment doit certainement influencer la colonisation par d'autres espèces benthiques. Enfin, sur les plans géochimique et écotoxicologique, un tel remaniement vertical du sédiment peut influencer les flux des éléments, dissous et particulaires, entre le sédiment et la colonne d'eau. Un polluant présent dans la couche de surface va pouvoir être recyclé plusieurs fois à travers la zone d'ingestion des vers et être éventuellement remis en suspension et redistribué dans la colonne d'eau et/ou accumulé dans les organismes. De plus, la taille inférieure des particules dans le sédiment de surface doit favoriser les capacités d'absorption des contaminants dans cette zone.



### **III.B. INFLUENCE DE LA BIOTURBATION SUR LES FLUX METALLIQUES DE LA COLONNE D'EAU VERS LE COMPARTIMENT SEDIMENTAIRE – BIODISPONIBILITE DES METAUX**

---

*Afin d'analyser l'influence de la bioturbation sur les transferts métalliques à partir de la colonne d'eau, nous avons utilisé les tubificidés en tant qu'agents de bioturbation au sein du sédiment (sédiment de Garonne).*

*Notre approche expérimentale a permis d'analyser conjointement : (i) les cinétiques de transfert du cadmium vers les strates sédimentaires, les profils verticaux étant établis au niveau de la fraction particulaire et de l'eau interstitielle, en présence et en absence de bioturbation ; (ii) les liens avec les processus de bioadvection, via l'utilisation des traceurs fluorescents (microsphères et luminophores), et l'impact de la pollution métallique sur l'activité de bioturbation, appréhendée en tant que critère fonctionnel ; (iii) la bioaccumulation du métal dans les tubificidés, à partir de la détermination des concentrations du cadmium à l'échelle des organismes entiers et de sa localisation au niveau tissulaire/cellulaire par autométallographie.*

*Les bases méthodologiques de cette étude expérimentale et les principaux résultats obtenus sont présentés sous forme de deux publications, que nous avons reproduites sous leur forme de soumission, en anglais (Parties III.C.1 et 2).*



### III.B.1. EFFETS DES TUBIFICIDES SUR LES TRANSFERTS ET LA DISTRIBUTION DU CADMIUM DANS LES SEDIMENTS, A PARTIR DE LA SOURCE DE CONTAMINATION "COLONNE D'EAU"<sup>9</sup>

#### Abstract

*In order to investigate bioturbation effects on cadmium fluxes from overlying water to sediments, indoor microcosms were set up with a mixed biotope: water column and natural sediment. The bioturbation source was freshwater Tubificid worms. Three experimental conditions were studied: contaminated water column (mean [Cd]: 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) with or without worms in the sediment and uncontaminated water column with worms. The experiment lasted 56 days, with 5 sampling times (7, 14, 21, 28 and 56 days). Cd vertical profiles in the pore-water and in the particulate fraction of sediment were determined, based on 6 layers (0-0.5; 0.5-1; 1-2; 2-3; 3-5; 5-12 cm). Bioturbation was analysed using two conservative fluorescent particulate tracers: luminophores and microspheres. After the 56 days' experiment, results show that bioturbation significantly increases Cd flux into the sediments close to a factor two compared with the experimental units with no added worms. Tubificids also increased the thickness of the cadmium-enriched layer: metal adsorbed by sediment particles was distributed throughout the biologically mixed layer by bioadvection, which predominated among the mixing processes. This experiment brings evidence that heavy metal loads in sediment are not representative of the contamination levels of the overlying water, since bioturbation processes accelerate their trapping in the sediment.*

#### 1. Introduction

The sediments constitute the most important storage reservoir for anthropogenic metal inputs in freshwater ecosystems, partly via direct diffusion from the water column but mainly from the deposit of suspended particles, which are characterized by a strong metal binding capacity (Tessier and Campbell, 1988; Luoma, 1989). Metal distribution in sediments,

---

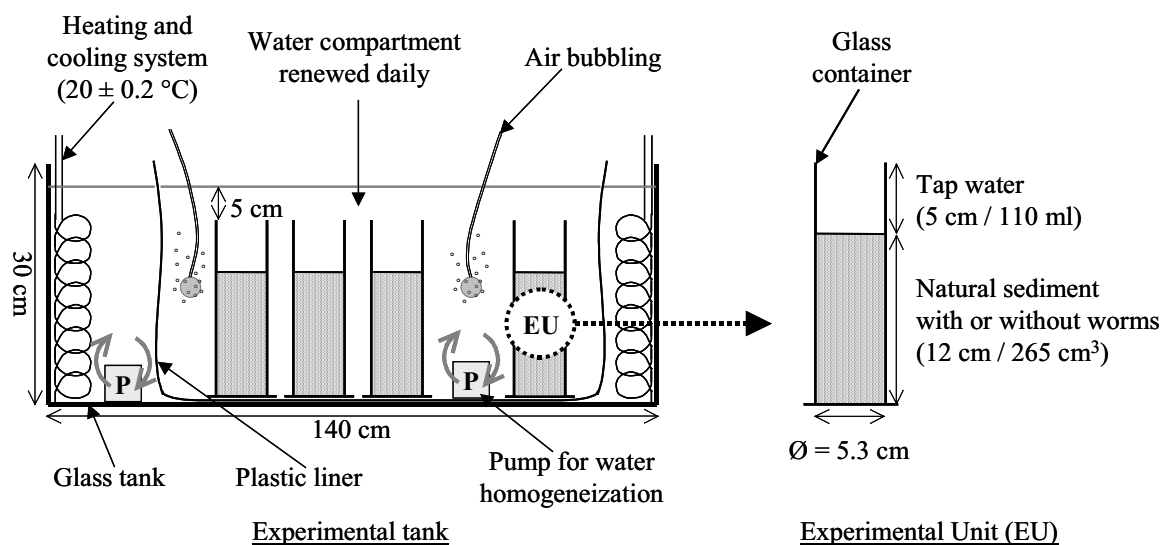
<sup>9</sup> Les résultats de cette étude ont été soumis pour publication à *Geochimica et Cosmochimica Acta* (avril 2003) : "Bioturbation effects by Tubificid oligochaetes on cadmium transfer and distribution into freshwater sediments", Aurélie Ciutat, Magali Gérino, Pierre Anschutz and Alain Boudou.





chemical speciation reactions and exchange capacities are the result of a complex set of physical, chemical and biological processes which are not fully understood. Although nearly all freshwater benthic environments are inhabited by abundant and diverse communities of macro- and micro-invertebrates, only a limited number of studies has been devoted to the direct and indirect effects of bioturbation on metal storage and release processes. Bioturbation could be defined as the result of burrowing, feeding, irrigating, breathing, and defecating activities of animal species living at the surface and/or within the sediment superficial layers (Matisoff and Wang, 1998; Rhoads, 1974). Most studies in this field have been based on the effects of bioturbation on the release of metals into the water column and on their bioavailability to benthic or pelagic species. The results reveal a significant increase in metal transfers from the sediment to the overlying waters, mostly in the particulate form. This transfer does not systematically produce an increase in metal accumulation in the living organisms (crustaceans, bivalves, ...), because particulate metals are bioavailable only to a small extent or not at all (Wall *et al.*, 1996; Rasmussen *et al.*, 2000; Ciutat and Boudou, in press). Few studies have been devoted to bioturbation effects on metal transfers in the opposite direction, i.e. from the water column to the sediment. Soster *et al.* (1992) and Petersen *et al.* (1998) have shown that bioturbation by different organisms (*Nereis diversicolor*, *Arenicola marina*, *Corophium volutator* or Tubificid oligochaetes) increases the flux of metals (Cd and Zn) from overlying water to uncontaminated estuarine or freshwater sediments.

The purpose of this work was to investigate at the laboratory scale the role of bioturbation on cadmium accumulation and distribution in sediment, the metal being initially present in the water column. An experimental approach was set up using indoor microcosms made up of a mixed biotope "water/natural sediment"; the bioturbation source was Tubificid worms. They are one of the major agents of bioturbation in perturbed freshwater environments (Fisher *et al.*, 1980), since they develop high population densities in most soft bottom habitats submitted to heavy metal contaminations (Soster *et al.*, 1992). Several species from this Oligochaetes group are used for acute and chronic toxicity testing and for bioaccumulation studies under standardized conditions; they are also used as benthic indicators of freshwater pollution within early warning systems (Warren *et al.*, 1998; Leynen *et al.*, 1999; Chapman, 2001). These worms feed head down in muddy sediments, consume sediments at depth, and deposit undigested material at the sediment-water interface. Tubificids are, in the lexicon of Rhoads (1974), "conveyor-belt" deposit feeders.



**Figure III.21.** Experimental systems used for the quantification of Cd transfers from the water column to the sediment compartment. For both {+Cd+Tub} and {-Cd+Tub} conditions, each experimental tank held at the beginning of the experiment 45 EUs with 60 L of water. For {+Cd-Tub} condition, the experimental tank held 18 EUs and 24 L of water.

Grain size fractions (%)	
< 15 $\mu\text{m}$	46.4
15-30 $\mu\text{m}$	27.7
30-63 $\mu\text{m}$	20.0
63-125 $\mu\text{m}$	4.4
125-250 $\mu\text{m}$	1.4
250-500 $\mu\text{m}$	0.1
> 500 $\mu\text{m}$	0.0
Organic carbon (%)	1.55
Porosity (%)	0.74

**Table III.5.** Main characteristics of the sediment from the Garonne river.

Concentrations (mg.L <sup>-1</sup> )	
Calcium	16.20
Magnesium	8.30
Potassium	3.80
Sodium	39.65
Sulfates	6.55
Chlorures	43.70
Silicates	12.35
Ammonium	0.17
Nitrites	<0.01
Nitrates	<0.25
Orthophosphates	<0.05
Dissolved oxygen	1.10
Total Organic Carbon	0.50
pH at 20 °C	8.15
Turbidity (FTU)	0.2
Conductivity at 20 °C ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ )	310

**Table III.6.** Main physico-chemical characteristics of the tap water used in the experiment.

In order to quantify bioturbation effects on cadmium transfers from the water column, three experimental conditions were studied: contaminated water column with or without worms in the sediment and uncontaminated water column with worms. In this paper we present and discuss results from the comparative study of cadmium vertical distributions in the pore-water and the particulate fraction of sediment during a 56-day experiment. These results allow examination of the effect of the worms on metal fluxes between the water column and sediment compartments. The redox state of the sediment was estimated by measuring vertical profiles of dissolved oxygen. Bioturbation activity was analysed using particulate tracers of different sizes (luminophores and microspheres), in order to establish links between bioturbation and cadmium transfer and distribution in the sediment.

## 2. Material and methods

The experimental design was based on three complementary conditions: (i) in the first, defined as the control condition, Tubificid worms were added to the sediment and the water column was not contaminated ( $\{-Cd+Tub\}$  condition); (ii) in the second condition, the water column was contaminated with cadmium but no worms were added to the sediment ( $\{+Cd-Tub\}$  condition), in order to study Cd transfers based on diffusion processes and to define Cd vertical distribution in sediment without bioturbation; (iii) in the last condition, bioturbation effects were analysed in contaminated systems ( $\{+Cd+Tub\}$  condition).

### 2.1. Microcosm structure and experimental design

The basic structure, called "Experimental Unit" (EU), consisted of two compartments, sediment and water column, enclosed in a glass container (Fig. III.21). The sediment was sampled from the Garonne river bank, upstream from Bordeaux (Gironde, SW France). Its main characteristics are reported in Table III.5. Approximately 50 kg of sediment were collected and stored at 4°C in the dark. The sediment was then sieved through a 1 mm mesh to remove macrofauna and frozen at -20°C to kill organisms. When needed, the sediment was defrosted and homogenized by mechanical mixing; 10 samples were collected in order to determine the "fresh weight/dry weight" ratio ( $fw/dw = 2.05 \pm 0.01$  after 72 h desiccation at 60°C) and the background cadmium concentration ( $0.75 \pm 0.02 \mu\text{g Cd g}^{-1}$ , dw). 425 g (fw) of this homogenized sediment were introduced into each EU. Dechlorinated tap water (Tab. III.6) was then carefully added (110 ml/EU) in order to avoid disturbances at the sediment surface.



The bioturbation source was based on Tubificid worms, and consisted of a mixture of three species which are closely related taxonomically and are similar in size: *Tubifex tubifex*, *Limnodrilus hoffmeisteri* and *Limnodrilus claparedeianus*. They were collected in a natural environment (GREBIL, Arry, France) and were acclimatized for 15 days in the laboratory, at 20°C in large tanks with the same Garonne river sediment. Before the experiment, the sediment from the breeding tanks was carefully sieved under running water to collect a large quantity of worms. Batches of  $250 \pm 0.5$  mg (fw) of worms were made, with no prior sorting in order to respect the heterogeneous size distribution of natural communities. Each batch corresponded to  $133 \pm 5$  worms/EU, or about  $60,000$  worms.m<sup>-2</sup>, which was close to densities found in the natural environment (McCall and Fisher, 1980). Additional batches were prepared in order to determine the fw/dw ratio ( $5.6 \pm 0.1$ , dw after 72h at 60°C) and the background Cd concentration in organisms ([Cd] =  $1.0 \pm 0.1$  µg.g<sup>-1</sup>, dw). No food was added during the 56 days of the experiment, to avoid any non-monitored changes in Cd complexation by the food particles. Preliminary experiments demonstrated that the organic carbon content of the sediment is sufficient for worms to feed for 56 days.

The bioturbation activity of Tubificids within the sediment compartments was analyzed using conservative fluorescent particulate tracers. These tracers consisted of two types of particles: luminophores and microspheres. Luminophores are natural sand particles coated with fluorescent paint. They are present in 2 different sizes: Ø=63-100 µm and Ø=100-315 µm (Mahaut and Graf, 1987; Gérino *et al.*, 1994). Microspheres are fluorescent balls of latex (Ø=1 µm) within a liquid phase (Fluoresbrite YG Microspheres, Polysciences Europe GmbH, Eppenheim, Germany). In each EU, a mixture of 10.6 g of Garonne sediment with 0.45 g and 0.6 g of the two types of luminophores and 0.3 ml of microspheres suspension, in 3-mm thick frozen mud cakes, was deposited at the sediment surface, 24 hours after the introduction of the worms.

The EUs were distributed into three experimental tanks, one for each experimental condition (Fig. III.21). For the two contaminated tanks ({+Cd-Tub} and {+Cd+Tub} conditions), the nominal Cd contamination level in the water was fixed at 20 µg.L<sup>-1</sup>. In order to maintain the contamination pressure throughout the whole experiment and to limit variations between the two contaminated conditions, the water in each tank was totally renewed daily. The water in the uncontaminated tank ({-Cd+Tub} condition) was also renewed daily, so that all the EUs underwent identical disturbances. Time zero for the contamination was just after the depositing of the mud cake with tracers in the EUs.



The experiment lasted 56 days, with five sampling times: 7, 14, 21, 28 and 56 days. For the two conditions {-Cd+Tub} and {+Cd+Tub} and for each exposure duration, 6 EUs were set up: 3 replicates for the bioturbation study and 3 for the analysis of Cd distribution in the sediment. For the {+Cd-Tub} condition, 3 EUs were set up for each duration in order to quantify Cd transfers in the sediment, with 3 supplementary EUs for the last sampling period after 56 days, to be used for the bioturbation study. The complete experimental design was based on 78 EUs set up simultaneously.

## ***2.2. Physico-chemical measurements, sampling procedure and cadmium determination***

Temperature (Thermometer EverSafe, Fisher-Bioblock Scientific, Illkirch, France), turbidity (HI 93703 Turbidity Meter, HANNA Instrument, France), pH and dissolved oxygen concentrations (MO128 Dissolved Oxygen Meter and MP120 pH Meter, Mettler, Toledo GmbH Analytical, Schwerzenbach, Switzerland) were measured daily in the central part of the three experimental tanks, before renewing the water column. The two conditions with the Cd-contaminated water column were controlled rigorously at the beginning and end of each renewal cycle: 10 ml of water (unfiltered and filtered samples) were collected from each experimental tank, then acidified with 200 µl of nitric acid (65 % HNO<sub>3</sub> - Merck, Darmstadt, Germany), stored at 4°C and analyzed within a maximum delay of 3 days.

Vertical distribution of Cd in the sediment was analysed for the three experimental conditions after the 5 exposure durations. The water column was delicately removed with a syringe and the sediment was cut into six layers: 0-0.5, 0.5-1, 1-2, 2-3, 3-5 and 5-12 cm. Each layer was weighed (fresh weight), centrifuged (Sigma 3K12, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France) in a nitrogen atmosphere (Azote 4.5, Linde Gas, Toulouse, France) for 20 min at 5,000 rpm (20°C). The supernatant was collected and filtered over a 0.2 µm filter (Membrane SFCA, Nalge Nunc International Corporation, New York, USA). 100 µl of HNO<sub>3</sub> were added to the filtrate, which was stored at +4°C until Cd determination. The pellet was lyophilised and weighed to determine the fw/dw ratio for each sediment layer. A sub-sample of 60-80 mg of lyophilized sediment was taken and digested by nitric acid attack (65 % HNO<sub>3</sub>, Merck, Darmstadt, Germany – 3 ml) at 100°C for 3h under pressurized conditions. The digest was diluted up to 20 ml with ultra-pure water (MilliQ plus) before Cd determination.

Cadmium was determined by atomic absorption spectrophotometry using a Varian AA 400 spectrophotometer equipped with a GTA 96 graphite tube atomizer, autosampler and Zeeman correction. Samples of 10 µl of water or sediment digestates were taken and mixed

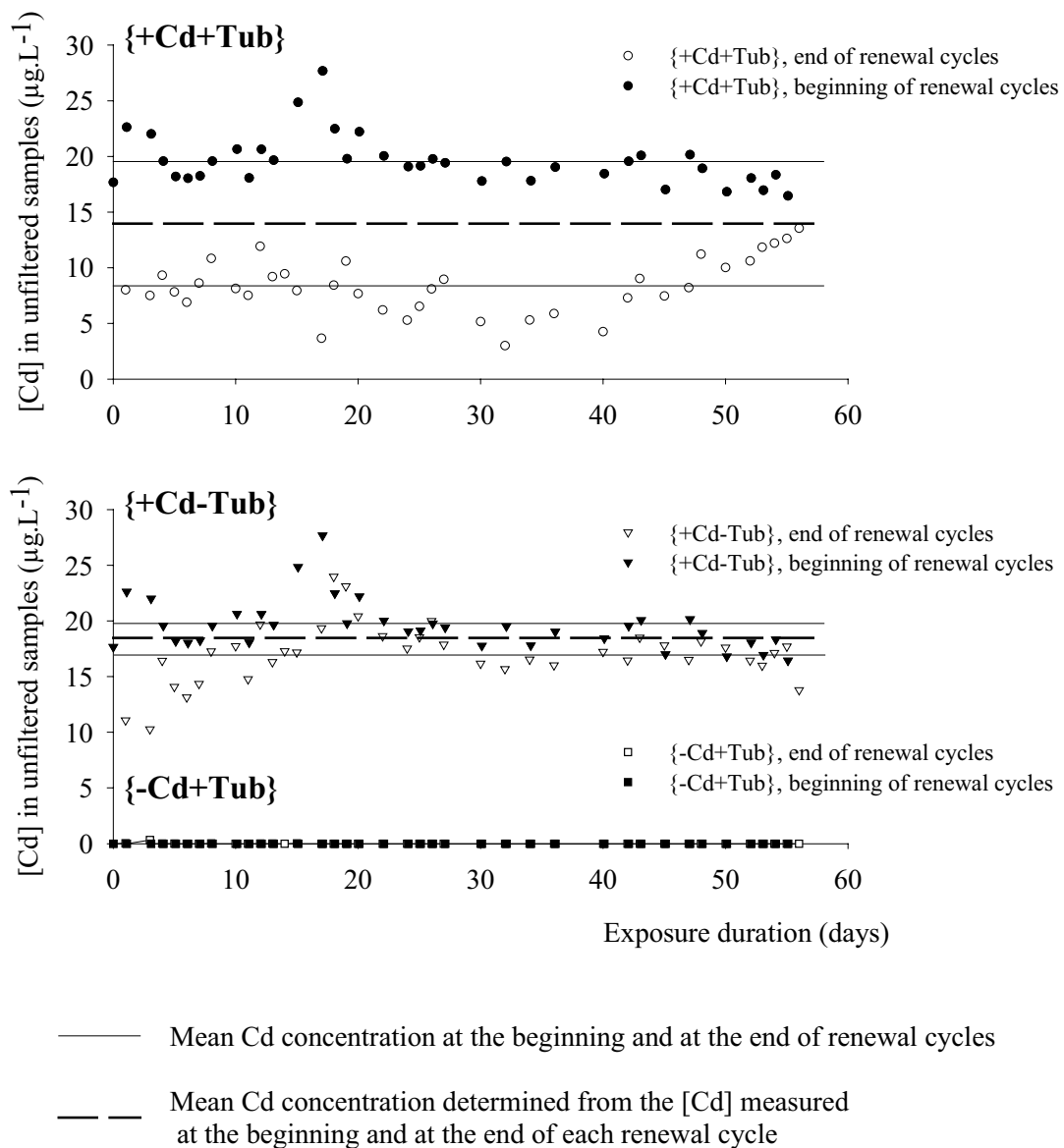




before atomization with 4  $\mu\text{l}$  of a 50 % Pd (0.2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and 50%  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  (0.5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) mixture, to facilitate removal of the matrix. The detection limit was 0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (DL: 3x SD of the reagent blanks). The accuracy of the analytical procedure was monitored by analysis of standard reference materials together with the samples series (PACS-2: marine sediment,  $2.11 \pm 0.15 \mu\text{gCd}\cdot\text{g}^{-1}$ ; MESS-3: marine sediment,  $0.24 \pm 0.01 \mu\text{gCd}\cdot\text{g}^{-1}$  from NRC-CNRC, Ottawa, Canada). Values were consistently within the certified ranges (data not shown).

A voltammetric gold amalgam mini-electrode (Brendel and Luther, 1995; Luther *et al.*, 1998) was used to measure the dissolved oxygen profiles. This electrode also enabled us to obtain vertical profiles of some dissolved reduced species such as  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , and  $\text{HS}^-$ . The construction of the voltammetric electrode and the measurements were carried out as described by Anschutz *et al.* (2000). Briefly, a standard three electrode voltammetric cell was used for all electrochemical measurements with the mini-electrode as working electrode, a 0.5 mm-diameter platinum wire as counter electrode, and a Ag/AgCl as reference electrode. An Analytical Instrument Systems, Inc. (AIS) model DLK-100 electrochemical analyser was used for all measurements. Oxygen was determined with linear sweep voltammetry (LSV), scanning from -0.1 V to -1.7 V at a rate of 200  $\text{mV s}^{-1}$  after 10 s equilibration at -0.1V.  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , and  $\text{HS}^-$  were determined with square wave voltammetry (SWV). Before each scan, the electrode was conditioned for 30 seconds at -0.1 V to restore the electrode surface. This step removes any previously deposited reduced elements from the amalgam. Conditioning was followed by a scan from -0.1 V to -1.7 V in the square wave mode. Profiling was carried out just before the cores were sliced at each sampling time, in at least two experimental units for each experimental condition.

To analyse vertical distribution of luminophores and microspheres in the sediment compartments, the water column was delicately removed with a syringe and the sediment was cut into six layers: 0-0.5, 0.5-1, 1-2, 2-3, 3-5 and 5-12 cm. Each layer was mechanically mixed and 5 ml were collected and lyophilized. Three samples of  $100 \pm 0.5 \text{ mg}$  of each lyophilized sediment layer were analysed using an epifluorescence UV-microscope at 360 nm (Olympus Optical Co., BH2-RFC Reflected Light Fluorescence Attachment, Hamburg, Germany). All the luminophores of both sizes were counted at x4 magnification. Luminophore concentrations in the sediment were expressed in  $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  of sediment (fw). Microsphere analysis was carried out by counting 3 times the number of microspheres in the ocular grid at x20 magnification, for each of the three samples. All tracer concentrations were standardized for homogenizing graph scales.



**Figure III.22.** Cadmium concentrations measured in the unfiltered water samples during the 56 days' experiment for the 3 experimental conditions studied: {-Cd+Tub}, no Cd added to the water column and Tubificidae in the sediment; {+Cd-Tub}, water column contaminated with Cd and no Tubificidae added to the sediment; {+Cd+Tub}, water column contaminated with Cd and Tubificidae added to the sediment.

### 2.3. Data treatment

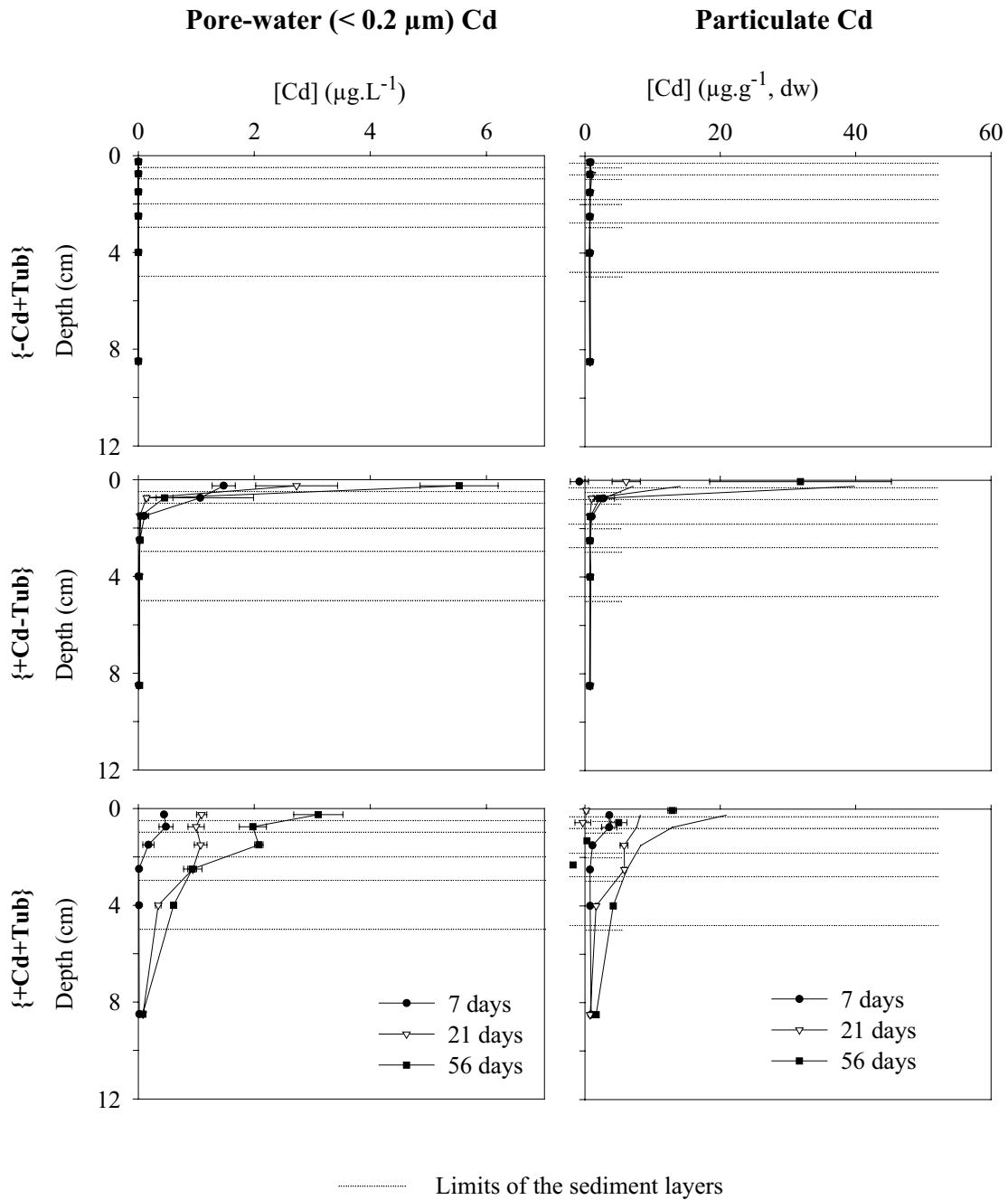
Statistical computations were performed with STATISTICA (Statistica 5.1 – Ed. 97 - StatSoft – Tulsa, USA), using two or three-way ANOVA followed by a post hoc test (Least Significant Difference test (LSD)). The check of assumption (normality and homoscedasticity of the error term), based on residue analysis, was done both graphically and using ad-hoc tests (Kolmogorov-Smirnov goodness of fit test and Levene test). When the assumptions were not checked, we used a BOX-COX data transformation. Significance of the observed effects was assessed at the  $p < 0.05$  level.

## 3. Results

Physico-chemical measurements in the water column during the 56 days' experiment showed an absence of significant differences between the 3 experimental conditions for temperature ( $19.8 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ), pH ( $8.4 \pm 0.2$ ) and dissolved oxygen concentration ( $8.1 \pm 0.3 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Significant differences were observed, however, in turbidity measured at the end of the renewal cycles: the mean values for all measurements during the 56 days were  $10.3 \pm 1.3$  FTU for the {+Cd+Tub} and {-Cd+Tub} conditions and  $0.2 \pm 0.1$  FTU for the {+Cd-Tub} condition.

Cd concentrations measured in the water column (unfiltered water samples) during the 56 days of experiment are shown in Figure III.22, at the beginning and at the end of each renewal cycle. For the {+Cd+Tub} and {+Cd-Tub} conditions, the mean Cd concentrations resulting from the whole set of data were  $13.9$  and  $18.3 \mu\text{g.L}^{-1}$ , respectively. The decrease in metal concentrations in the water column during the renewal cycles was on average 57 and 13 %, respectively (significant difference). Mean dissolved Cd concentrations during the entire experiment represent 86 % of total Cd concentrations for {+Cd+Tub} and 98.4 % for {+Cd-Tub}. For the {-Cd+Tub} condition, all the cadmium measurements were below the detection limit ( $0.1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ).

Evolution of vertical Cd distribution in the dissolved pore-water ( $<0.2 \mu\text{m}$ ) and in the particulate fractions of the six sediment layers is shown in Figure III.23. For more clarity, only the profiles determined after 7, 21, and 56 days are shown on the graphs. In the absence of Cd contamination ({-Cd+Tub} condition), the dissolved Cd concentrations in the pore-water were systematically below the detection limit ( $0.1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Corresponding Cd concentrations in the particulate fraction did not differ significantly from the background level ( $[\text{Cd}] = 0.75 \pm 0.12 \mu\text{g.g}^{-1}$ , dw). For the contaminated EUs without worms ({+Cd-Tub}



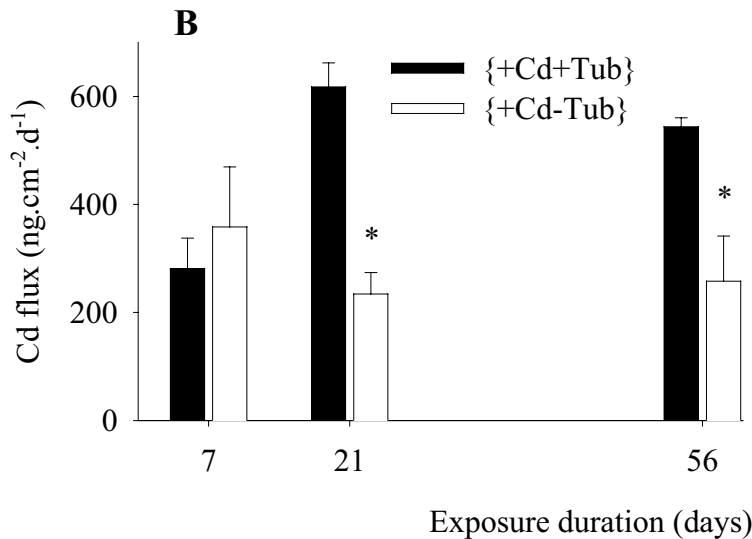
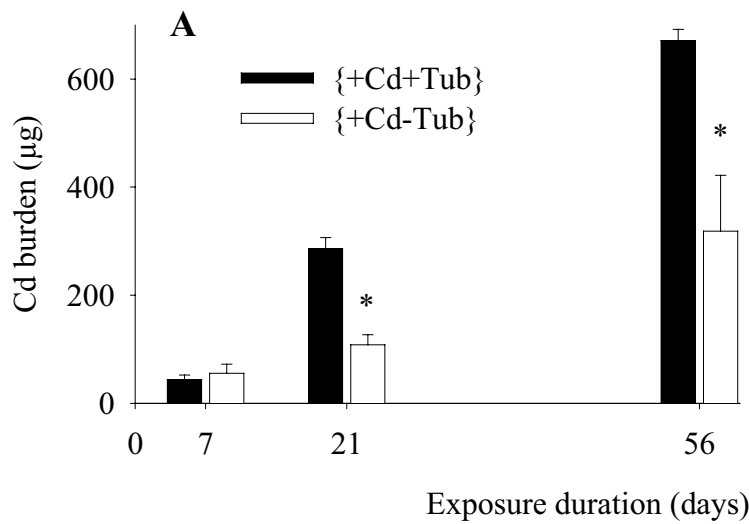
**Figure III.23.** Vertical profiles of pore-water (<0.2  $\mu m$ ) and particulate cadmium concentrations in the sediment after 7, 21 and 56 days, for the 3 experimental conditions studied: {-Cd+Tub}, no Cd added to the water column and Tubificidae in the sediment; {+Cd-Tub}, water column contaminated with Cd and no Tubificidae in the sediment; {+Cd+Tub}, water column contaminated with Cd and Tubificidae in the sediment. Mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

condition), a significant peak in Cd concentration was observed in the top cm of the sediment, which increases from the first time period (7 days) to the end of the experiment. Maximal levels were observed in the 0-0.5 cm layer after 56 days' exposure:  $5.5 \pm 0.7 \mu\text{g.L}^{-1}$  in the dissolved pore-water and  $39.8 \pm 13.4 \mu\text{g.g}^{-1}$ , dw in the particulate fraction. When the worms were added to the sediment ( $\{+\text{Cd}+\text{Tub}\}$  condition), a marked increase in Cd concentrations was observed deeper in the sediment than in the condition without worms, and this affected the 3-5 cm layer, but the maximal contamination levels in the superficial layer were significantly lower than those measured for the  $\{+\text{Cd}-\text{Tub}\}$  condition:  $3.1 \pm 0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$  and  $20.9 \pm 0.6 \mu\text{g.g}^{-1}$ , dw respectively, after 56 days.

The amounts of Cd transferred from the water column to the entire sediment compartment were determined from the average concentrations measured in the different sediment layers, after deduction of the background level (Fig. III.24.A). After 7 days, no significant difference was observed whether or not the worms were present. After 56 days, Cd burdens in the sediment compartment increased notably, and significant differences were observed between the  $\{+\text{Cd}-\text{Tub}\}$  and  $\{+\text{Cd}+\text{Tub}\}$  conditions, with  $318 \pm 103 \mu\text{g}$  and  $671 \pm 21 \mu\text{g}$ , respectively. The corresponding global Cd fluxes (Fig. III.24.B) showed similar values for the three exposure durations in the EUs without worms, close to  $300 \text{ ng.cm}^{-2}.\text{d}^{-1}$ . The flux was about the same after 7 days when Tubificids were added to the sediment, but became twice higher at times 21 and 56 days.

The concentration of dissolved oxygen decreased as depth increased, close to saturation in the water column and just above the sediment-water interface and zero at about 5 mm below the interface. The penetration depth of  $\text{O}_2$  remained within this range throughout the whole experiment for the units without worms. When worms were present, the penetration depth of  $\text{O}_2$  decreased: the oxic-anoxic boundary remained at a depth close to 3 mm in all the worm-bearing units. We never observed dissolved oxygen deep in the sediment due to bioirrigation. However, we did measure dissolved  $\text{Mn}^{2+}$  below the oxygen penetration depth in all the units, indicating that the majority of the sediment was anoxic. Dissolved sulfides were not detected at any depth in the sediment column with the polarographic electrode (detection limit,  $0.1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ).

Vertical distribution of luminophores and microspheres in the sediment after 7, 21 and 56 days is illustrated in Figure III.25. Each graph corresponds to one EU, which is representative of the three replicates analysed for each time. Without worms ( $\{+\text{Cd}-\text{Tub}\}$  condition) and after 56 days experiment, the distribution of luminophores and microspheres remained confined to the upper sediment layers. About 75% were recovered in the 0-0.5 cm samples,



**Figure III.24. A.** Cadmium burden in the sediment compartment at the experimental unit level for the 2 experimental conditions: {+Cd-Tub}, water column contaminated with Cd and no Tubificidae in the sediment; {+Cd+Tub}, water column contaminated with Cd and Tubificidae in the sediment, at time zero, 7, 21 and 56 days. The background level (mean Cd burden in sediment of the {-Cd+Tub} condition:  $0.75 \pm 0.02 \mu\text{g Cd.g}^{-1}$ , dw) was deducted. Mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

**B.** Estimated mean cadmium fluxes from the water column to the sediment compartment of EUs for the two experimental conditions: {+Cd-Tub}, water column contaminated with Cd and no Tubificidae in the sediment; {+Cd+Tub}, water column contaminated with Cd and Tubificidae in the sediment, over a period of time equal to 7, 21 and 56 days. Mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

and 25% just below, in the 0.5-1.0 cm samples. With worms ({+Cd+Tub} condition), the distribution of tracers changed with time. The maximum luminophore content deepened progressively from the 0.5-1 cm layer after 7 days (60%) to the 3-5 cm layer after 21 days (90%), and below 5 cm at the end of the experiment (90%). Microsphere distribution was different. The microspheres were also buried at depth during the experiment, but they were still also observed at the top of the sediment at the different times, whereas luminophores disappeared rapidly from the top layer. After 56 days, the highest concentration of microspheres was observed in the bottom sample (5-12 cm), but this maximum did not represent a marked peak. The vertical distribution of microspheres became more or less homogeneous throughout the sediment column with time.

In order to estimate bioturbation parameters, the profiles were simulated using the bioadvection-biodiffusion model in non-steady state conditions. This regular diffusion advection model (Officier and Lynch, 1982; Gérino *et al.*, 1994) was applied to the luminophore concentrations measured within the different sediment layers:

$$\frac{\delta C_{(z,t)}}{\delta t} = D_b \frac{\delta^2 C_{(z,t)}}{\delta z^2} - V \frac{\delta C_{(z,t)}}{\delta z}$$

where  $t$ =time;  $z$ =depth;  $C$ = tracer concentration.

The model equation was solved with initial conditions:

$$C(z, t=0) = 1 \text{ for } z \in [0; 0.3]$$

$$C(z, t=0) = 0 \text{ for } z > 0.3$$

and boundary conditions:

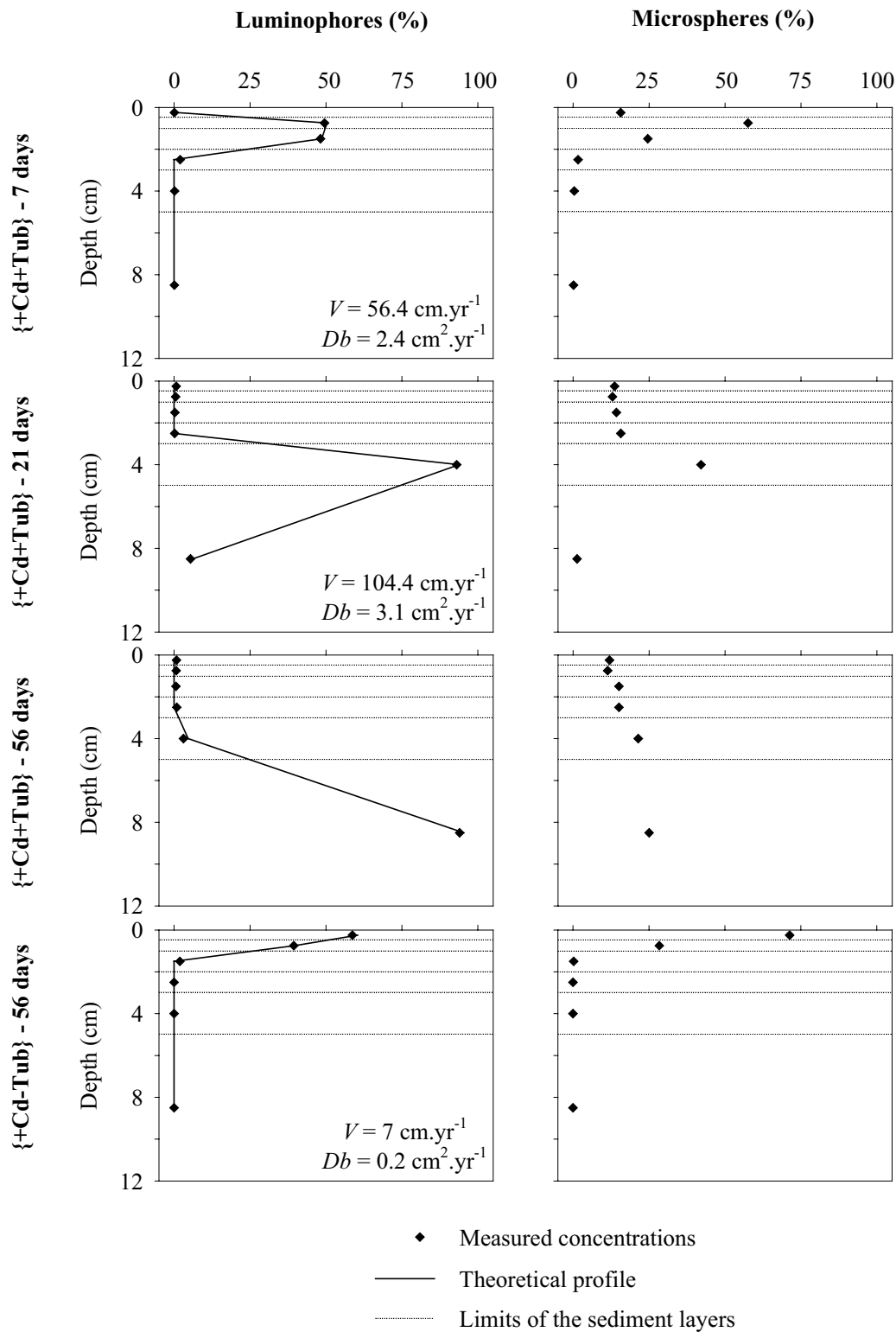
$$C(z \rightarrow +\infty, t) = 0$$

$$\text{at } z=0, VC_{(z,t)} - D_b \frac{\delta C_{(z,t)}}{\delta z} = 0$$

The analytical solution of the equation model provided by Officier and Lynch (1982) was applied to calculate theoretical concentrations in our experimental conditions:

$$C_{(z,t)} = \frac{1}{\sqrt{\pi D_b t}} \exp\left[-\frac{(z-Vt)^2}{4D_b t}\right] - \frac{V}{2D_b} \exp\left[\frac{Vz}{D_b}\right] \operatorname{erfc}\left[\frac{z+Vt}{\sqrt{4D_b t}}\right]$$

Using this model it is possible to calculate the theoretical tracer concentrations, given suitable values of the parameters  $V$  (the bioadvective rate, which represents the velocity of the tracer burial), and  $D_b$  (the biodiffusive rate, which represents the biologically mediated dispersion of tracers). These parameters are obtained through the best fit of the experimental profiles with theoretical profiles using the least square method.



**Figure III.25.** Vertical profiles of fluorescent particles: measured concentrations after 56 days for the control {+Cd-Tub} (no worms), and after 7, 21 and 56 days for the {+Cd+Tub} condition (water column contaminated with Cd and Tubificidae in the sediment). Only one tracer profile per condition is plotted. Luminophores (63-315  $\mu\text{m}$ ) and microspheres (1  $\mu\text{m}$ ) graphs values are mean of 3 replicates tracers counting.



Values of these two bioturbation coefficients are shown in Table III.7. At 56 days, since the experimental period is long enough to reach the ingestion zone, it is not appropriate to apply this model because reingestion is not taken into account in the present model formulation. For the same reason, the model does not describe microsphere distribution at any time because these small tracers are supposed to undergo reingestion before the first sampling period (7 days). Without worms ( $\{+Cd-Tub\}$  condition), the bioadvective rate,  $V$ , was equal to  $7 \text{ cm.yr}^{-1}$  and the biodiffusive rate,  $D_b$ , was  $0.2 \text{ cm}^2.\text{yr}^{-1}$ . These values are very low compared with the  $\{+Cd+Tub\}$  condition, where average values were between 55 and 105  $\text{cm.yr}^{-1}$  for  $V$  and close to  $2.7 \text{ cm}^2.\text{yr}^{-1}$  for  $D_b$ .

#### 4. Discussion

Results from this experimental approach to the effects of bioturbation on cadmium transfers from the water column to the sediment compartments have shown that Tubificid worms are able to induce a significant increase in metal loads into the sediment, close to a factor 2 compared with the experimental units with no added worms. Marked and significant differences were also observed for vertical metal distribution within the sediment. Bioturbation significantly increased the thickness of the cadmium-enriched layer. Our data set allows us first to discuss Cd distribution in the non-bioturbated units, and then to explain the differences observed in the worm-enriched units.

From the tracer distribution in the Cd-contaminated EUs without worms ( $\{+Cd-Tub\}$  condition) we have calculated a bioadvection coefficient of  $7 \text{ cm.yr}^{-1}$ , and a biodiffusion coefficient of  $0.2 \text{ cm}^2.\text{yr}^{-1}$  after 56 days, values which are very low. In the absence of bioturbation, luminophores should, in theory, have been recovered at the top of the sediment pile, i.e. only in the 0-0.5 cm sample. Some of the luminophores and also some microspheres were recovered in the second layer (0.5-1.0 cm) (Fig. III.25), probably because the sediment surface was not exactly horizontal, and also because the added cakes of sediment containing the two particulate tracers were almost as large as the first layer of the sediment slice.

By monitoring Cd concentrations in the water column at the beginning and end of each renewal cycle and the corresponding volume of water in the tanks, we are able to estimate the loss of Cd in the water column, during the 56 days of the experiment. For the  $\{+Cd-Tub\}$  condition, the estimated loss was 2,300  $\mu\text{g}$  of Cd. An identical mass balance was obtained for Cd accumulated during the 56 days' exposure, in all the sediment compartments present in the units within the  $\{+Cd-Tub\}$  tank. Therefore, all the Cd that disappeared from the water

Condition	Time (days)	V (cm.yr <sup>1</sup> )		Db (cm <sup>2</sup> .yr <sup>1</sup> )	
{+Cd+Tub}	7	54–56	(55)	2.4–2.5	(2.5)
	14	76–81	(78)	2.7–2.7	(2.7)
	21	104–105	(105)	3.1–3.1	(3.1)
	28	48–79	(63)	2.6–2.8	(2.7)
{+Cd-Tub}	56	5.8–7.9	(7)	0.2–0.2	(0.2)

**Table III.7.**  $V$  and  $D_b$  coefficients obtained by applying the bioadvective-biodiffusive model after 7, 14, 21 and 28 days for the {+Cd+Tub} condition (water column contaminated with Cd and Tubificidae in the sediment) and after 56 days for the control, {+Cd-Tub} condition (no worms). Two replicates and mean in brackets.

column during each renewal cycle was trapped in the sediment compartments of the experimental units.

Dissolved and particulate Cd were detected only in the first centimetre below the sediment-water interface in the non-bioturbated units. Maximum concentrations were measured in the top layer (0-0.5 cm). Cadmium can be trapped from the water column as different phases, depending on the location of the precipitation relative to the oxicline. In the oxic layer, Cd can be scavenged on organic matter particles, and on Mn- and Fe-oxides (Fu and Allen, 1992; Warren and Haack, 2001). In the anoxic sediment, Cd can precipitate as CdS in the presence of sulfide. We did not detect HS<sup>-</sup> in the studied sediments, but this does not imply that HS<sup>-</sup> was not produced by sulphate reduction. HS<sup>-</sup> can be trapped immediately after production as AVS (acid volatile sulfides). The precipitation of most of the trapped Cd as sulfide mineral in the experimental units implies that most of the dissolved Cd was transported by molecular diffusion from the contaminated water column to the anoxic sediment through the oxic layer.

We can estimate the role of molecular diffusive flux of dissolved Cd from the water column to the sediment on the enrichment of particulate Cd from the concentration gradients according to Fick's first law:

$$F = \varphi D_s \frac{\Delta C}{\Delta z}$$

with  $D_s = \frac{D_0}{1 - \ln(\varphi^2)}$ ;  $D_0 = 6.5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (or  $205 \text{ cm}^2 \cdot \text{yr}^{-1}$ );  $\varphi = 0.798$  and  $\frac{\Delta C}{\Delta z} = 36 \text{ ngCd} \cdot \text{cm}^{-4}$

where  $F$  is the flux,  $\varphi$  the porosity,  $\Delta C/\Delta z$  the concentration gradient, and  $D_s$  the bulk sediment diffusion coefficient corrected for tortuosity, i.e.  $D_s = D_o/\theta^2$  where  $\theta$  is the tortuosity and  $D_o$  is the diffusion coefficient in water (Berner, 1980).  $D_o$  value was obtained from Li and Gregory (1974) and the value of  $\theta^2$  is assumed to equal to  $1 - \ln(\varphi^2)$  (Boudreau, 1996). The concentration gradient of dissolved Cd occurs within the first centimetre. At this depth, the measured porosity was 0.798, and the calculated  $D_s$  of Cd was  $4.48 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (or  $141.3 \text{ cm}^2 \cdot \text{yr}^{-1}$ ). The concentration gradient is difficult to estimate accurately, because it occurs within two successive 0.5 cm-thick layers and the concentration in the water column, which changed slightly with time, probably began to decrease a few millimetres above the sediment-water interface. The mean measured concentration of dissolved Cd was  $18 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  in the water column, for the {+Cd-Tub} condition. The shallowest location of the zero value probably corresponded to the oxicline, the maximal depth of which was measured by polarographic electrode at 0.5 cm. Therefore, the decrease of  $18 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  occurred within 0.5



cm at least, and probably more. The calculated gradient was then a maximum  $36 \text{ nmol.cm}^{-4}$ . The diffusive flux calculated with this maximum value is  $11.1 \text{ ngCd.cm}^{-2}.\text{d}^{-1}$ , which corresponds to a maximum input of Cd by molecular diffusion to the anoxic sediment of  $13.7 \text{ }\mu\text{g}$  for each EU ( $22 \text{ cm}^2$ ) during the 56 days' experiment. The average Cd load measured in the whole sediment compartment for the {+Cd-Tub} condition was  $318 \text{ }\mu\text{g}$ , which is more than 20 times higher. The above calculation shows that the diffusive flux of Cd to the anoxic sediment represents less than 5% of the total flux of Cd. This implies that Cd is mostly scavenged on metal oxides and organic matter in the oxic layer at the sediment-water interface and just below. Our results show an increase in particulate Cd concentrations within the superficial sediment layers throughout the entire 56 days of the experiment, which indicates that the scavenging sites did not become saturated during the experimental period.

The Einstein-Smoluchowski equation enables us to calculate the propagation depth  $d$  of Cd that diffuses in the sediment as a function of time:  $d = \sqrt{2D_s t}$  (where  $t$ =time and  $D_s = 4.48 \times 10^{-6} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$  is the diffusion coefficient of Cd in the experimental units (Boudreau, 1997). This equation indicates that the pore-water should be contaminated in dissolved Cd down to 6.6 cm after 56 days, whereas we observed an anomaly of Cd concentration in only the first centimetre relative to the background concentration. This indicates that the oxic/anoxic boundary probably represents a barrier for dissolved Cd. A small part of Cd which is not scavenged in the oxic layer is most likely to be trapped as CdS just below the oxic front (DiToro *et al.*, 1990). Since the particles were not advected in the absence of worms, authigenic CdS did not accumulate deeper in the anoxic sediment.

Results from the contaminated EUs with worms ({+Cd+Tub} condition) show marked differences. Tracer distribution with rapid burial of the surface inputs gives evidence of a biological effect on the particulate fraction of the sediment dominated by bioadvection and biodiffusion processes. The occurrence of biodiffusion is not the major impact of these worms' bioturbation but it does still exist since luminophores were also dispersed around the maximum concentration depths. Tubificids are known to ingest anoxic sediment at depth and reject it at the sediment surface, at the origin of conveyor belt effects at high densities. This bioturbation mode is called bioadvection since it generates the rapid burial of surface sediment by accumulation of fecal pellets at the sediment surface. Luminophores, which are coarse enough in size not to be ingested by Tubificids (Juget, 1978; Rodriguez *et al.*, 2001) migrate vertically in the sediment as far as the ingestion zone, where they remain in the



absence of pure physical accumulation. In our experimental conditions, the average bioadvection coefficient ( $V$ ) estimated from different experimental time durations with a Tubificidae density of 60,000 worms.m<sup>-2</sup> is  $69 \pm 10$  cm.yr<sup>-1</sup> that is 0.33 cm.d<sup>-1</sup>.100,000 worms.m<sup>-2</sup>. This rate is similar to previous bioadvection rates estimated in the literature: between 0.23 and 0.68 cm.d<sup>-1</sup>.100,000 worms.m<sup>-2</sup> for *Limnodrilus hoffmeisteri* at temperatures between 20 and 22°C and between 0.12 and 0.64 cm.d<sup>-1</sup>.100,000 worms.m<sup>-2</sup> for *Tubifex tubifex* (Davis, 1974; Fisher *et al.*, 1980; McCall and Fisher, 1980).

The simultaneous inputs of microspheres ( $\emptyset = 1 \mu\text{m}$ ) provide further insights into the ongoing bioturbation processes that can be linked to Cd transfers in the sediment. These smaller tracers are easily ingested by the 3 species of Tubificidae introduced into our EUs that preferentially feed on particles smaller than 63  $\mu\text{m}$  (Rodriguez *et al.*, 2001). The arrival of microspheres in the top layer as early as 7 days after the beginning of the experiment is explained by this possible ingestion that does not exist with the luminophores, which completely disappeared from this level at the same time (Fig. III.25). This result gives evidence of sediment ingestion by worms at a shallow depth of between 0.5 and 2 cm. The heterogeneity of the worm lengths may lead to a progressive homogenization of microsphere distribution in the zone, the depth of which is limited by the maximal ingestion depth. The occurrence of luminophores in the 5-12 cm layer at 28 days indicates that the maximum depth is located in this layer.

The mass balance of Cd for the {+Cd+Tub} condition estimated by monitoring Cd concentrations in the water column at the beginning and the end of each renewal cycle indicates a loss of 16,000  $\mu\text{g}$  of Cd during the 56 days' experiment. The uptake of Cd in all the sediment compartments within the units present in the {+Cd+Tub} tank was 14,000  $\mu\text{g}$ , which is of the same order of magnitude. In this condition again, all the Cd that disappeared from the water column between each contaminated water renewal was trapped in the sediment units. Cd accumulation measured in the worms after 56 days' exposure (data not shown) and the corresponding Cd burdens at EU level indicate that the proportion of Cd that accumulated in the worms themselves represented only 0.4% of the total Cd present in the sediments after 56 days.

The evolution with time of the profiles of Cd concentration in the sediment compartment was similar for both particulate and dissolved Cd in the {+Cd+Tub} condition. The concentration increased over 56 days, and showed a migration of the Cd anomaly down to 5 cm. This strongly differs from Cd distribution in the {+Cd-Tub} condition. Our results are in agreement with those of Soster *et al.* (1992), who measured an increase in particulate and





pore-water Zn concentrations to a depth of 3 cm after 139 days in experimental units with Tubificidae, while in unbioturbated units the increase in Zn concentration was limited to the first cm of sediment. Petersen *et al.* (1998) showed also that bioturbation stimulated the transport of Cd into uncontaminated estuarine sediments. Their experiments with *Arenicola marina* as the bioturbating organism indicated an increase in pore-water and particulate Cd concentrations at depth in the sediment.

In non-bioturbated units, the diffusive flux of Cd to the anoxic sediment represented less than 5% of the total flux of Cd, which implied that Cd was mostly scavenged on particles at the sediment-water interface. In the presence of worms, the gradient of dissolved Cd in pore-waters was smoother. Therefore, the diffusive flux of Cd from the water column to the sediment was probably lower in the {+Cd+Tub} condition than in the {+Cd-Tub} condition. However, the overall flux of Cd was higher when worms were present. Therefore, the contribution of the diffusive flux of dissolved Cd to the anoxic sediment was probably very small and does not explain the enrichment in particulate Cd. The Cd probably accumulated on particles through a mechanism of adsorption at the sediment-water interface. The particles were then buried in the sediment pile through bioturbation. Soster *et al.* (1992) also concluded that the higher level of Zn found in the upper 3 cm of tubificid-inhabited sediments was probably caused by adsorption and bioadvective particle movement, rather than by solute diffusion. Petersen *et al.* (1998) also suggest that the higher transport of Cd from the water-column into sediments with infaunal burrows is driven in part by adsorption to metal oxides (iron and manganese).

The distribution of luminophores and microspheres indicates that from the beginning of the experiment to the end, the bioadvective transport by tubificids corresponded to the continuous raising to the surface of small particles ingested at different depths. Therefore, the residence time of non- or low-contaminated particles at the sediment surface, and the contact of particles with contaminated water were low. The low residence time explains why the concentration of solid Cd in the top sample (0-0.5 cm) was always lower in the {+Cd+Tub} condition than in the {+Cd-Tub}. Our results show that the renewal of particles at the surface promoted a greater flux of Cd to the sediment than stagnant particles.

In the presence of worms, Cd enrichment must reach the deepest layer of sediment ingestion, which occurred in the 5-12 sediment layer, as shown in the luminophore profile after 56 days (Fig. 5). We did not observe a great increase in particulate Cd concentration in this layer, relative to the background, probably because few particles that contained Cd reached this level. Most of them may have been re-ingested during their burial.



Dissolved Cd increased with time in the oxic sediment in both experimental conditions, but concentrations also exceeded the background level in the anoxic sediment of bioturbated sediment. The first hypothesis that can explain our observation is that the Cd measured in the filtered pore-water samples came from a colloid fraction ( $< 0.2 \mu\text{m}$ ) and not from a true dissolved fraction. If our measurements really represent the dissolved fraction, then Cd did not quantitatively precipitate in the anoxic sediment. For the {+Cd-Tub} condition, we suggest that dissolved Cd was absent from the anoxic sediment because it precipitated as CdS just below the oxic/anoxic interface. This implies that sulfide was produced from sulphate reduction in the experimental units. The precipitation of Cd-sulfide can occur in the presence of very low  $\text{H}_2\text{S}$  concentrations, as observed by Lapp and Balzer (1993) or Chaillou *et al.* (2002). This observation suggests that the production of dissolved sulfide was lower than the flux of Cd in the anoxic zone or the release of dissolved Cd in the bioturbated units. Peterson *et al.* (1996) also observed that bioturbation by the oligochaete *L. variegatus* significantly reduced AVS concentrations in surficial sediments, resulting in high pore-water cadmium concentrations. Sulphate reduction is an anaerobic process of organic matter oxidation. It is favoured when other oxidants, which are thermodynamically more favourable, such as oxygen, nitrates, Mn-oxides, or reactive Fe-oxides, have been consumed (Froelich *et al.*, 1979). The lesser amount of sulphate reduction in the {+Cd+Tub} units could result from the bioadvection at depth of reactive oxides, which could have been preferentially used as electron acceptors for the bacterially mediated degradation of organic matter as sulphate. The dissolved Cd that we detected at depth in the bioturbated sediment may originate from (i) the release of adsorbed Cd on bioadvective sediment when particulate Fe- and Mn-oxides are reduced at depth; (ii) the desorption of Cd, according to a desorption/adsorption equilibrium; (iii) diffusion from the overlying water column. The Einstein-Smoluchowski equation indeed indicates that the pore-waters should be contaminated with dissolved Cd down to 6.6 cm after 56 days. If this was the case, the activity of the worms would permit molecular diffusion by decreasing sulfato-reduction at depth in the sediment. This phenomenon should be related to bioadvective conditions that drive new oxides at depth.

## 5. Conclusion

The present experiment indicates that Tubificidae-induced bioturbation significantly increases the transport of cadmium from the water-column into uncontaminated sediments. Metal adsorbed to sediment particles was distributed throughout the biologically mixed layer by



bioadvection, which dominated the mixing processes. This mechanism leads to higher metal concentrations at depth in inhabited sediments than in free fauna sediments. Even though our experimental design did not attempt to perfectly simulate field conditions, the investigation provided valuable information on transport patterns and distributions of Cd in sediment under the direct and indirect effects of bioturbating infauna. Results from this experiment demonstrate that mere analyses of potential sediment contamination from the water column in the presence of infauna can be largely underestimated if only single physical processes are considered. Considering the present demonstration that bioadvective processes increase metal fluxes from overlying water into sediment with a factor close to 2, bioturbation processes should be taken into account in realistic biogeochemical models, in order to describe contaminant fluxes through the sediment/water interface. It also brings evidence that heavy metal loads in sediment are not representative of the contamination level of the overlying water, since bioadvection accelerates metal trapping in sediment. Further experiments are currently under way in our laboratories, in order to investigate, using similar indoor models, the effect of bioturbation on metal release from contaminated sediment to the uncontaminated overlying water.

*Acknowledgements.* We would like to thank Gilles Durrieu for help in data treatment. This work was carried out with the financial support of the GIS ECOBAG (MATE, AEAG, Aquitaine Region, CNRS/PEVS). Aurélie Ciutat was supported by a grant from the French Ministry of Research and Education (MESR).



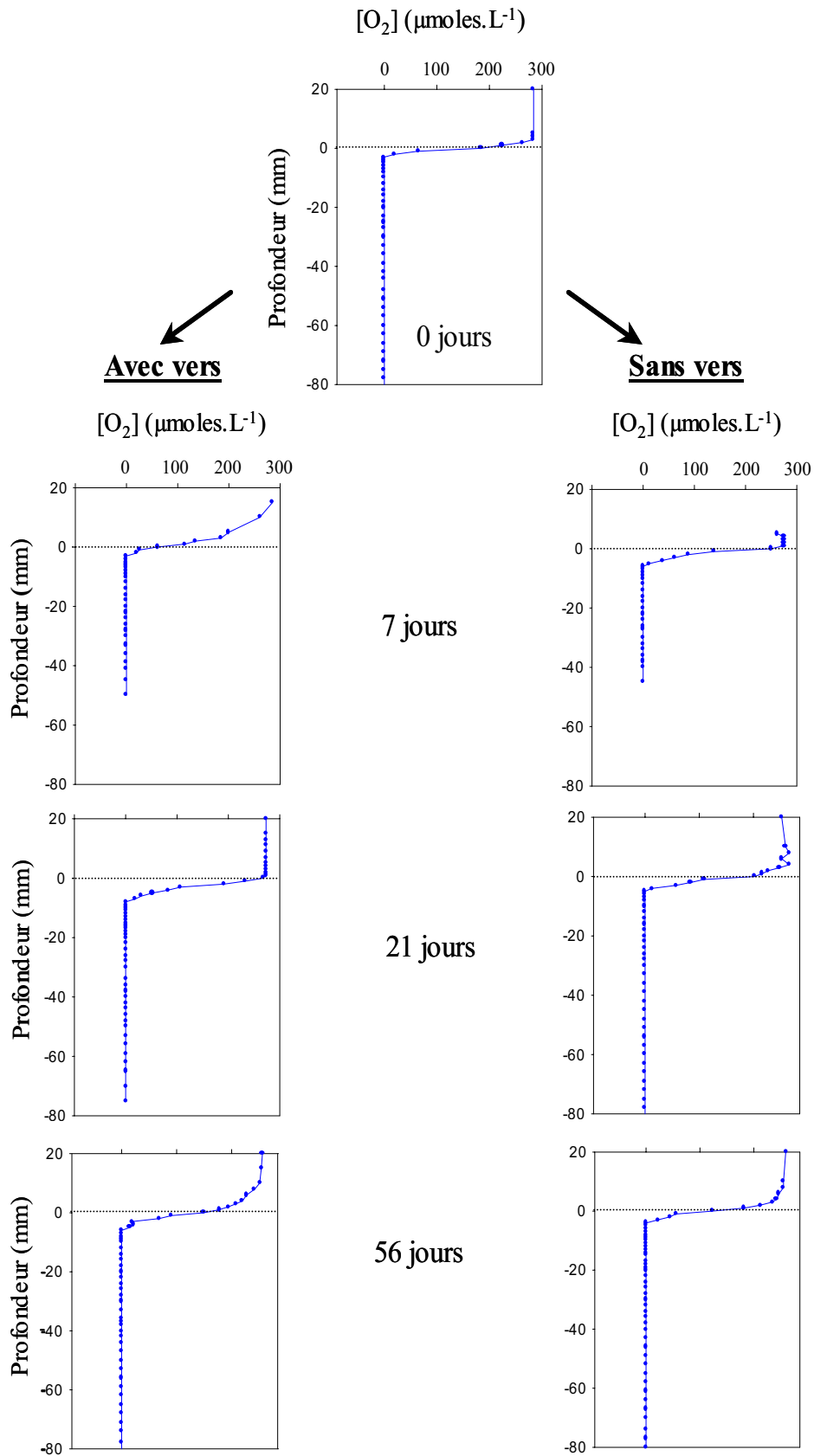
## References

- Anschutz P., Sundby B., Lefrançois L., Luther III G. W. and Mucci A. (2000) Interactions between metal oxides and species of nitrogen and iodine bioturbated marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **64**, 2751-2763.
- Berner R. A. (1980) *Early diagenesis: a theoretical approach*. Princeton University Press. New Jersey, USA.
- Boudreau B. P. (1996) The diffusive tortuosity of fine-grained unlithified sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **60**, 3139-3142.
- Boudreau B. P. (1997) *Diagenetic models and their implementation*. Springer-Verlag, Berlin.
- Brendel P. J. and Luther III G. W. (1995) Development of a gold amalgam voltammetric microelectrode for the determination of dissolved Fe, Mn, O<sub>2</sub> and S(-II) in porewaters of marine and freshwater sediments. *Environ. Sci. Technol.* **29**, 751-761.
- Chaillou G., Anschutz P., Lavaux G., Schaeffer J. and Blanc G. (2002) The distribution of U, Mo, and Cd in modern marine sediments. *Mar. Chem.* **80**, 41-59.
- Chapman P. M. (2001) Utility and relevance of aquatic oligochaetes in ecological risk assessment. *Hydrobiologia* **463**, 149-169.
- Ciutat A. and Boudou A. (in press) Bioturbation effects on cadmium and zinc transfers from a contaminated sediment and on metal bioavailability to benthic bivalves. *Environ. Toxicol. Chem.*
- Davis R. B. (1974) Stratigraphic effects of tubificids in profundal lake sediments. *Limnol. Oceanogr.* **19**, 466-488.
- DiToro D. M., Mahony J. D., Hansen D. J., Scott K. J., Hicks V., Mayr S. M. and Redmond M. S. (1990) Toxicity of Cd in sediments: the role of acid volatile sulfide. *Environ. Toxic. Chem.* **9**, 1487-1502.
- Fisher J. B., Lick W. J., McCall P. L. and Robbins J. A. (1980) Vertical mixing of lake sediments by tubificid oligochaetes. *J. Geophys. Res.* **85**, 3997-4006.
- Froelich P. N. and others (1979) Early oxidation of organic matter in pelagic sediments of the Eastern Equatorial Atlantic : suboxic diagenesis. *Geochim. Cosmochim. Acta* **43**, 1075-1090.
- Fu G. and Allen H. E. (1992) Cadmium adsorption by oxic sediment. *Wat. Res.* **26**, 225-233.
- Gérino M., Stora G. and Durbec J.-P. (1994) Quantitative estimation of bioturbative and bioadvective sediment mixing: in situ experimental approach. *Oceanol. Acta* **17**, 547-554.
- Juget J. (1978). La texture granulométrique des sédiments et le régime alimentaire des oligochètes limniques. *Hydrobiologia* **65**, 145-154.
- Lapp B. and Balzer W. (1993) Early diagenesis of trace metals used as an indicator of past productivity changes in coastal sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **57**, 4639-4652.
- Leynen M., Van den Berck T., Aerts J. M., Castelein B., Berckmans D. and Ollevier F. (1999) The use of Tubificidae in a biological early warning system. *Environ. Pollut.* **105**, 151-154.
- Li Y. H. and Gregory S. (1974) Diffusion of ions in seawater and in deep-sea sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **38**, 703-714.





- Luoma S. N. (1989) Can we determine the biological availability of sediment-bound trace elements? *Hydrobiologia* **176/177**, 379-396.
- Luther III G. W., Brendel P. J., Lewis B. L., Sundby B., Lefrançois L., Silverberg N. and Nuzzio D. B. (1998) Simultaneous measurements of O<sub>2</sub>, Mn, Fe, I-, and S(-II) in marine pore waters with a solid-state voltammetric microelectrode. *Limnol. Oceanogr.* **43**, 325-333.
- Mahaut M.-L. and Graf G. (1987) A luminophore tracer technique for bioturbation studies. *Oceanol. Acta* **10**, 323-328.
- Matisoff G. and Wang X. (1998) Solute transport in sediments by freshwater infaunal bioirrigators. *Limnol. Oceanogr.* **43**, 1487-1499.
- McCall P. L. and Fisher J. B. (1980) Effects of tubificid oligochaetes on physical and chemical properties of Lake Erie sediments. In *Aquatic Oligochaete Biology* (eds. R. O. Brinkhurst and D. G. Cook). Plenum Press, New York. pp. 253-317.
- Officier C. B. and Lynch D. R. (1982) Interpretation procedures for the determination of sediment parameters from time-dependent flux inputs. *Earth Planet. Sc. Lett.* **61**, 55-62.
- Petersen K., Kristensen E. and Bjerregaard P. (1998) Influence of bioturbating animals on flux of cadmium into estuarine sediment. *Mar. Environ. Res.* **45**, 403-415.
- Peterson G. S., Ankley G. T. and Leonard E. N. (1996) Effect of bioturbation on metal-sulfide oxidation in surficial freshwater sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**, 2147-2155.
- Rasmussen A. D., Banta G. T. and Andersen O. (2000) Cadmium dynamics in estuarine sediments: effects of salinity and lugworm bioturbation. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**, 380-386.
- Rhoads D. C. (1974) Organism-sediment relations on the muddy sea floor. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* **12**, 263-300.
- Rodriguez P., Martinez-Madrid M., Arrate J. A. and Navarro E. (2001) Selective feeding by the oligochaete *Tubifex tubifex* (Tubificidae, Clitellata). *Hydrobiologia* **463**, 133-140.
- Soster F. M., Harvey D. T., Troksa M. R. and Grooms T. (1992) The effect of tubificid oligochaetes on the uptake of zinc by Lake Erie sediment. *Hydrobiologia* **248**, 249-358.
- Tessier A. and Campbell P. G. C. (1988) Partitioning of trace metals in sediments. In *Metal speciation: theory, analysis and application* (eds. R. Kramer and H. E. Allen). Lewis, Chelsea. pp.183-199.
- Wall S. B., Isely J. J. and La Point T. W. (1996) Fish bioturbation of cadmium-contaminated sediments: factors affecting Cd availability to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**, 294-298.



**Figure III.26.** Profils verticaux de l'oxygène dissous dans l'eau interstitielle du sédiment pour les deux conditions expérimentales sans organismes, {+Cd-Tub}, et avec tubificidés, {+Cd+Tub}, après 0, 7, 21 et 56 jours.

## **Complément à cette étude : détails sur les profils d'oxygène déterminés à l'aide des micro-électrodes**

Dans le manuscrit précédent, relatif à l'étude des effets des tubificidés sur les transferts et la distribution du cadmium dans les sédiments, à partir de la source "colonne d'eau", quelques indications ont été fournies sur les analyses de l'oxygène à l'aide des micro-électrodes voltamétriques (cf Partie II.B.1.1 pour la description de la méthode utilisée). En fait, des profils d'oxygène ont été déterminés au temps zéro, avant l'introduction des vers, et après 7, 14, 21, 28 et 56 jours. La Figure III.26 présente 7 profils, obtenus pour les conditions "avec vers" et "sans vers". Notons que la reproductibilité entre les réplicats (3 en moyenne) a été très satisfaisante : les exemples présentés sur la Figure III.26 reflètent parfaitement les différentes conditions étudiées.

L'information la plus importante concerne la position de l'oxycline en présence de bioturbation. En effet, les tubificidés n'entraînent pas une augmentation de l'épaisseur de la couche oxydée, qui reste limitée aux premiers millimètres à la surface des sédiments, voire qui diminue légèrement par rapport aux unités "sans vers", et ceci pendant les 56 jours de l'expérience. La bioadvection générée par les tubificidés n'est pas couplée à une bioirrigation des galeries, cette dernière étant à l'origine d'apports d'oxygène en provenance de la colonne d'eau. La couche de pelotes fécales en surface, plus riche en eau que le sédiment sous-jacent, pourrait favoriser la diffusion de l'oxygène et donc abaisser le niveau de l'oxycline : en fait, comme nous l'avons souligné précédemment, elle correspond à des apports quasi-permanents de matériel anoxique, riche en matière organique, avec probablement d'abondantes communautés bactériennes qui consomment l'oxygène provenant de la colonne d'eau à l'interface.

Nous analyserons, à titre comparatif, l'impact des deux modèles de bioturbation étudiés – larves d'*H. rigida* et tubificidés – sur la distribution de l'oxygène dans les compartiments sédimentaires, dans la Partie "Synthèse générale et Perspectives".



### III.B.2. BIOACCUMULATION DU CADMIUM DANS LES TUBIFICIDES A PARTIR DE LA SOURCE DE CONTAMINATION "COLONNE D'EAU" ET EFFETS SUR L'ACTIVITE DE BIOTURBATION"<sup>10</sup>

#### Abstract

*Bioturbation is known to create severe structural and functional perturbations in sediments. From an experimental study of bioturbation effects induced by tubificids on cadmium (Cd) transfers from the water column as the initial contamination source, we present results on metal bioaccumulation in worms in relation to Cd vertical distribution in sediment (dissolved pore-water and particulate fractions) and on bioturbation activity analyzed as a functional parameter. The approach was based on indoor microcosms including a two compartment biotope "water/natural sediment" and a mixture of three tubificid species as the bioturbation agents. Three experimental conditions were analysed: (i) no Cd in the water and tubificids in the sediment ; (ii) Cd in the water and no tubificids in the sediment ; (iii) Cd in the water and tubificids in the sediment. Cadmium bioaccumulation in worms was studied using two complementary approaches: kinetics of metal concentrations at the whole organism level during a 56 days' exposure period; metal localization in the worm bodies using the autometallographic histochemical technique. In parallel, bioturbation activity was analysed using fluorescent particulate tracers (luminophores and microspheres). The results show no significant effects of cadmium exposure on the bioadvection and biodiffusion coefficients, despite high bioaccumulation levels in worms, of approximately 50  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (dw). They suggest the existence of detoxification processes in worms: for example, autometallographical black silver deposits were observed in chloragogen cells and circular cells in the coelome, and these types of cell are known to perform detoxification and excretion in annelids. The present demonstration of intensive tubificid activity under Cd contamination pressure, despite high Cd accumulation in worms, leading to important metal transfers within the biologically mixed layers, indicates that bioturbation induced by tubificids is able to play*

---

<sup>10</sup> Les résultats de cette étude ont été soumis pour publication à Aquatic Toxicology (juillet 2003) : "Cadmium bioaccumulation in Tubificidae from the water column source and effects on bioturbation activity", Aurélie Ciutat, Magali Gérino, Nathalie Mesmer-Dudons, Pierre Anschutz et Alain Boudou.

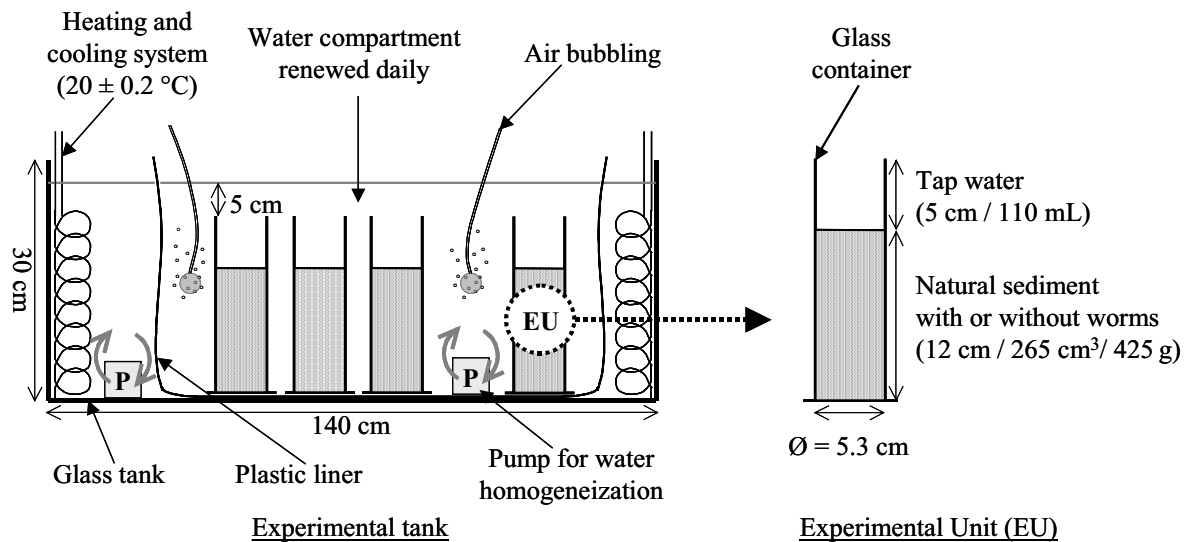


*a significant role within the biogeochemical cycle of the metal in contaminated aquatic systems.*

## **1. Introduction**

Aquatic ecosystems are the final receptacles of potentially all toxic metal inputs in the environment, via transfers from natural and/or anthropogenic sources. Measurements of metal distribution in the different abiotic compartments, including water, suspended particulate matter and sediment, have been widely developed, associated with bioaccumulation analyses in the main trophic levels. Data from these field studies point out that the prediction of ecotoxicological effects requires an understanding of both the physical and biogeochemical pathways controlling metal chemical fate and bioavailability. Among the major processes involved, metal exchanges at the "water column/sediment" interface play a fundamental role along with the storage and release capacities. They are strongly influenced by the physico-chemical characteristics of the biotopes but also by biotic factors, such as bioturbation. Bioturbation can be defined as the result of burrowing, feeding, irrigating, respiring and defecating activities from animal species living at the surface and/or within the sediment superficial layers (Rhoads, 1974). Accurate models enable us to quantify the various benthic bioturbation activities (Robbins et al., 1979; Gérino et al., 1994) and they may provide useful tools to investigate direct and indirect effects of bioturbation on metal accumulation in sediment compartments and toxic effects on benthic communities. In the task to measure influence of contaminants on benthic organisms, quantification of bioturbation may be a relevant parameter since this type of activity integrates by itself the most important biological functions of the organisms such as respiration, feeding and defecating.

Within a multidisciplinary research programme based on an experimental study of bioturbation effects on cadmium (Cd) transfers between sediment and water column, with these two compartments acting as initial contamination sources or storage compartments, we selected tubificids as bioturbation models. These oligochaete worms are very widely distributed and frequently dominant in freshwater benthic communities; they have a high level of resistance to unfavourable conditions, especially organic pollution associated with severe hypoxic conditions. Tubificids are closely associated with superficial sediments: their anterior part burrows into the substrate and the posterior part undulates in the overlying water. Data published in the literature from field or indoor studies show a marked controversy over metal accumulation in tubificids, relating to the predominance of exposure routes from overlying



**Figure III.27.** Experimental units (EUs) and equipment for the regulation of abiotic factors.

Grain size fractions (%)	
< 15 $\mu\text{m}$	46.4
15-30 $\mu\text{m}$	27.7
30-63 $\mu\text{m}$	20.0
63-125 $\mu\text{m}$	4.4
125-250 $\mu\text{m}$	1.4
250-500 $\mu\text{m}$	0.1
> 500 $\mu\text{m}$	0.0
Organic carbon (%)	1.55
Porosity (%)	0.74

**Table III.8.** Sediment particles sizes distribution, particulate organic carbon (POC, expressed as percentage of dry weight), and porosity. The sediment was collected on the banks of the Garonne river, upstream from Bordeaux (South-West France).

Concentrations ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	
Calcium	16.20
Magnesium	8.30
Potassium	3.80
Sodium	39.65
Sulfates	6.55
Chlorures	43.70
Silicates	12.35
Ammonium	0.17
Nitrites	<0.01
Nitrates	<0.25
Orthophosphates	<0.05
Dissolved oxygen	1.10
Total Organic Carbon	0.50
pH at 20 °C	8.15
Turbidity (FTU)	0.2
Conductivity at 20 °C ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ )	310

**Table III.9.** Main physico-chemical characteristics of the tap water used in the experiment.



water, sediment pore-water or/and ingested sediment particles (Whitley, 1967; Dean, 1974; Back, 1990; Sager and Pucsko, 1991; Bervoets et al., 1997; Warren et al., 1998 ; Bouché et al., 2000), and relationships between exposure conditions and toxic effects (Khangarot, 1991; Klerks and Bartholomew, 1991; Wallace et al., 1998; Deeds and Klerks, 1999; Chapman, 2001; Gillis et al., 2002).

Our experimental approach was based on indoor microcosms, including a two-compartment biotope "water-column/natural sediment" and a mixture of three tubificid species as the bioturbation agents. Metal transfers from the water column as the initial contamination source were analyzed using three experimental conditions: (1) tubificid worms were added to the sediment and the water column was not contaminated ( $\{-Cd+Tub\}$  condition); (2) Cd was added to the water and no tubificids were present in the sediment ( $\{+Cd-Tub\}$  condition); (3) tubificids were added to the sediment and the water column was contaminated with cadmium ( $\{+Cd+Tub\}$  condition).

In this paper, we focus on Cd bioaccumulation in worms, using two complementary approaches based on the kinetics of metal concentrations at the whole organism level during a 56 days' exposure period and on Cd localization in the worm bodies using the autometallographic histochemical technique. Direct and indirect relationships were determined with Cd vertical distribution in the pore-water and particulate sediment phases. In parallel, Cd impacts on bioturbation activity were analyzed using fluorescent particulate tracers (luminophores and microspheres).

## 2. Material and methods

### 2.1. Microcosm structure and experimental design

The basic structure, called "Experimental Unit" (EU), was based on two compartments, sediment and water column, enclosed in a glass container (Figure III.27). The sediment was sampled from the Garonne river banks, upstream from Bordeaux (Gironde, SW France). Its main characteristics are reported in Table III.8. The background cadmium concentration was  $0.75 \pm 0.02 \mu\text{gCd g}^{-1}$ , dry weight (dw after 72 h at 60 °C). The sediment was sieved through a 1 mm mesh to remove macrofauna and then frozen at -20 °C to kill any organisms. It was introduced into each EU and then dechlorinated tap water (Table III.9) was carefully added in the upper part of the EUs in order to avoid disturbances at the sediment surface.

The tubificid worms (Annelida, Oligochaeta) consisted of a mixture of three species which are closely related taxonomically and are similar in size: *Tubifex tubifex*, *Limnodrilus*



*hoffmeisteri* and *Limnodrilus claparedeianus*. They were collected in a natural environment (GREBIL, Arry, France) and were acclimatized for 15 days in the laboratory, at 20 °C in large tanks with the same Garonne river sediment. Batches of  $250 \pm 0.5$  mg (fresh weight, fw) of worms were made, with no prior sorting in order to respect the heterogeneous size distribution of natural communities. Each batch corresponded to  $133 \pm 5$  worms/EU, or about  $60,000$  worms.m<sup>-2</sup>, which was close to maximal densities found in the natural environment (Avel, 1959; McCall and Fisher, 1980). Additional batches were prepared in order to determine the fw/dw ratio ( $5.6 \pm 0.1$ , dw after 72h at 60 °C) and the background Cd concentration in organisms ( $[Cd] = 1.0 \pm 0.1$  µg.g<sup>-1</sup>, dw).

The bioturbation activity of tubificids within the sediment was analyzed using fluorescent particulate tracers: luminophores and microspheres. Luminophores are natural sand particles coated with fluorescent paint. Two different sizes were used:  $\text{Ø}=63\text{-}100$  µm and  $\text{Ø}=100\text{-}315$  µm (Geologisch-paleontologisches Institut and Museum of Kiel University, Germany). Microspheres are fluorescent balls of latex ( $\text{Ø}=1$  µm) within a liquid phase (Fluoresbrite YG Microspheres, Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Germany). In each EU, a mixture of 10 g (fw) of Garonne sediment with 0.45 g and 0.6 g of the two types of luminophores and 0.3 ml of microsphere suspension, was deposited at the sediment surface, in the form of 3-mm thick frozen mud cakes, 24 hours after the introduction of the worms.

The EUs corresponding to the three studied experimental conditions - {-Cd+Tub}, {+Cd-Tub}, {+Cd+Tub} - were distributed into three different experimental tanks (Figure III.27). Time zero for contamination began just after the mud cakes with tracers were deposited in the EUs. The nominal Cd contamination level in the water of the two contaminated tanks ({+Cd+Tub} and {+Cd-Tub} conditions) was fixed at  $20$  µg.L<sup>-1</sup>. In order to maintain the contamination pressure throughout the experiment, all the water in each tank was renewed daily; a similar procedure was applied to the uncontaminated tank, so that all the EUs underwent identical disturbances.

The experiment lasted 56 days, with five sampling times: 7, 14, 21, 28 and 56 days. For each condition and each exposure duration, 8 EUs were set up: 2 replicates for the bioturbation study, 3 for the measurement of Cd concentrations in worms and 3 for sediment analyses.



## **2.2. Physico-chemical measurements, sampling procedure and cadmium determination**

Temperature, turbidity, pH, dissolved oxygen concentrations and Cd concentrations in the water column were measured daily in each experimental tank, before the renewal. Unfiltered or filtered (0.2  $\mu\text{m}$ ) water samples (10 ml) collected for Cd determination were acidified with 200  $\mu\text{l}$  of nitric acid (65 %  $\text{HNO}_3$ , Merck, Darmstadt, Germany), stored at +4  $^\circ\text{C}$  and analyzed within 3 days.

Worms were collected at the five time exposures by sieving sediment through a 500  $\mu\text{m}$  mesh. They were dried carefully, weighed (fw) and kept for 72 h at 60  $^\circ\text{C}$  to determine the "fw/dw" ratio, without depuration of the intra-gut sediment. They were then digested by nitric acid attack (65 %  $\text{HNO}_3$ ) at 100  $^\circ\text{C}$  for 3h under pressure conditions. The digests were diluted with ultra-pure water.

Vertical distribution of Cd in sediment pore-water and particulate fractions was analyzed for the three experimental conditions, after the five exposure durations. The water column was carefully removed from the EUs and the sediment was cut into six layers: 0-0.5, 0.5-1, 1-2, 2-3, 3-5 and 5-12 cm. Each layer was weighed (fw), centrifuged under nitrogen atmosphere for 20 min at 5,000 rpm (20  $^\circ\text{C}$ ). The supernatants were collected and filtered through 0.2  $\mu\text{m}$  filters (Membrane SFCA, Nalge Nunc International Corporation, New York, USA). The filtrates were acidified with  $\text{HNO}_3$  and stored at +4  $^\circ\text{C}$  until Cd determination for dissolved metal quantification in sediment pore-water was carried out. The pellets were lyophilized and weighed to determine the fw/dw ratio for each sediment layer. For particulate metal quantification, samples of 60-80 mg of lyophilized sediment were taken and digested by nitric acid attack (65 %  $\text{HNO}_3$ ). The digests were diluted with ultra-pure water before Cd determination.

Cd was determined in worms, water and sediment samples by atomic absorption spectrophotometry using a Varian AA 400 spectrophotometer equipped with a GTA 96 graphite tube atomizer, autosampler and Zeeman correction. Water samples or sediment digestates (10  $\mu\text{L}$ ) were mixed before atomization with 4  $\mu\text{L}$  of a mixture of 50 % Pd (0.2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and 50 %  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  (0.5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), to facilitate removal of the matrix. The detection limit was 0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (DL: 3xSD of the reagent blanks). The accuracy of the analytical procedure was monitored by analysis of standard reference materials together with the samples series (PACS-2: marine sediment,  $2.11 \pm 0.15 \mu\text{gCd}\cdot\text{g}^{-1}$ ; MESS-3: marine sediment,  $0.24 \pm 0.01 \mu\text{gCd}\cdot\text{g}^{-1}$ ; TORT-2: lobster hepatopancreas,  $26.7 \pm 0.6 \mu\text{gCd}\cdot\text{g}^{-1}$  from NRC-CNRC, Ottawa, Canada). Values were consistently within the certified ranges (data not shown).

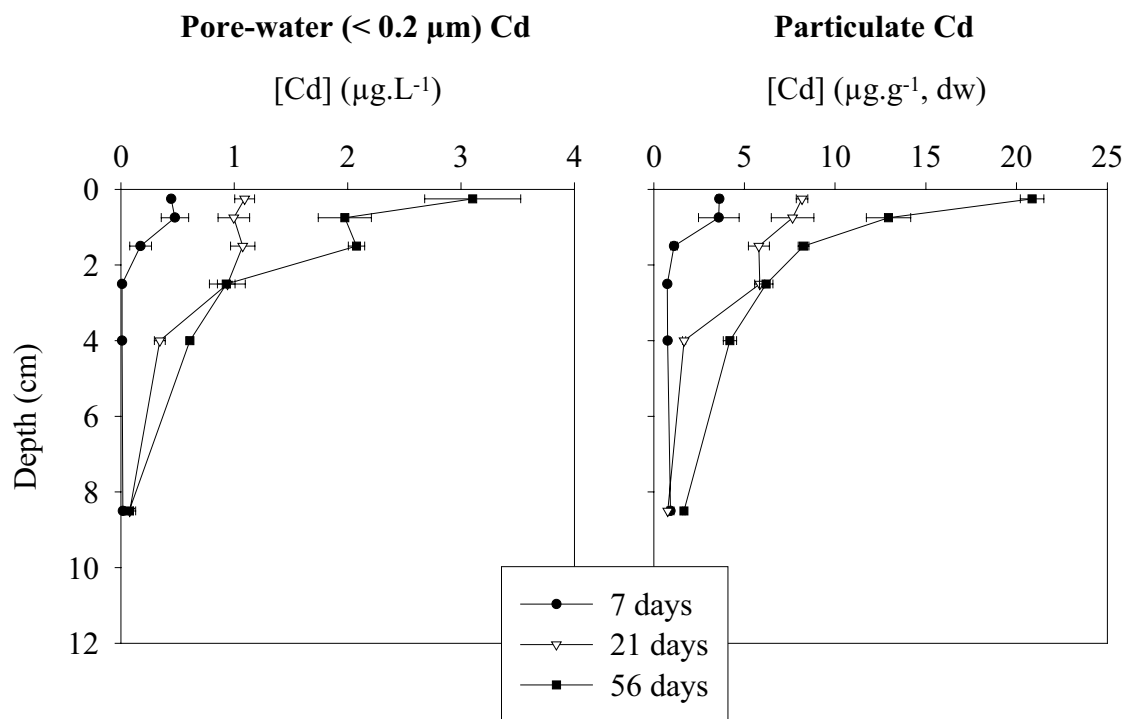


To analyze vertical distribution of luminophores and microspheres in the sediment compartments, the water column was carefully removed with a syringe and the sediment was cut into six layers: 0-0.5, 0.5-1, 1-2, 2-3, 3-5 and 5-12 cm. Each layer was mechanically mixed and 5 ml were collected and lyophilized. Three samples of  $100 \pm 0.5$  mg of each lyophilized sediment layer were analyzed using an epifluorescence UV-microscope at 360 nm (Olympus Optical Co., BH2-RFC Reflected Light Fluorescence Attachment, Hamburg, Germany). All the luminophores of both sizes were counted at x4 magnification. Luminophore concentrations in the sediment were expressed in  $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Microsphere quantification consisted of counting three times the number of microspheres in the ocular grid at x20 magnification, for each of the three samples. All tracer concentrations were standardized for homogenizing graph scales.

### ***2.3. Preparation of tubificids for microscopy and autometallography***

In order to identify Cd localization in the main tissue and cell compartments of the body of tubificids, autometallography was carried out on longitudinal and transversal sections from control and contaminated worms. This histochemical technique enables a semi-quantitative detection of metals. Metals, such as Cd, act as catalysts in the reduction of silver cations to atoms, which themselves aggregate, allowing further catalysis, amplification of the reaction and formation of black silver deposits. The routine of the method used in this work was based on that of Danscher (1984) with further improvements (Soto et al., 1998; Laporte et al., 2002; Marigomez et al., 2002).

After being rinsed in water, the worms were fixed by immersion for one night, at  $+4$  °C, using a solution containing 5 mL of glutaraldehyde (Grade I, SIGMA) at 25 % and 25 ml of sodium cacodylate buffer (Merck) at 0.05 M ( $P_o = 397$  mOsm, pH = 7.4). The worms were rinsed in a sodium cacodylate solution at 0.05 M with 2 % of NaCl for 3 x 30 min. Samples for light microscopy were dehydrated in alcohol and toluene, and embedded in paraffin. Sections cut at 10  $\mu\text{m}$  were placed on glass slides covered with albumin (Prolabo). After rehydration using successive baths of toluene, alcohol and water, they were incubated for exactly 30 min at 26 °C in complete darkness in an Ilford L4 emulsion (Ilford Nuclear Emulsion L4, TAAB), then immersed for 15 min in the Phenisol D 144 developer (Tetenal ultrathin, AGFA, dilution 1+4). The reaction was stopped by dipping the slides into an acetic acid solution (1 %) for 1 min and then into the fixing solution (Ilford Hypam, B&W Fixer, AGE, AGFA, dilution 1+4) for 10 min. This procedure was strictly followed for all samples



**Figure III.28.** Vertical profiles of cadmium concentrations measured in the pore-water (<0.2 μm) and particulate fractions of the sediment, after 7, 21 and 56 days, for the condition {+Cd+Tub}: water column contaminated with Cd and Tubificid worms added to the sediment. Mean ± SD ( $n = 3$ ).



in order to accurately standardize reaction times and arrive at the best comparable results. The sections were coloured with nuclear red. Observations were made using a BX50 Olympus optical linked to a digital camera (Color video camera 3CCD, Sony, Tokyo, Japan). Images were obtained using Metaview software (Ropper Scientifique, 2001). The photographs included in this article are representative of a large number of observations carried out on worms sampled after 56 days' exposure.

#### **2.4. Data treatment**

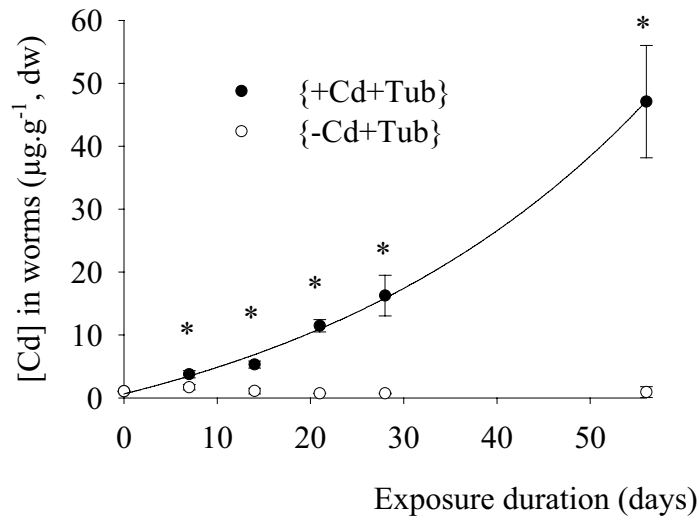
Statistical computations were performed with STATISTICA (Statistica 5.1 – Ed. 97 - StatSoft – Tulsa, USA), using two-way ANOVA additive models, followed by a post hoc test (Least Significant Difference test, LSD). The assumption check (normality and homoscedasticity of the error terms), based on residue analysis, was done both graphically and using ad-hoc tests (Kolmogorov-Smirnov goodness of fit test and Levene test). When assumptions were not checked, we used a BOX-COX data transformation. Significance of the observed effects was assessed at the  $p < 0.05$  level.

### **3. Results**

Physico-chemical measurements in the water column during the 56 days' experiment showed an absence of significant differences between the three experimental conditions for temperature ( $19.8 \pm 0.1$  °C), pH ( $8.4 \pm 0.2$ ) and dissolved oxygen concentration ( $8.1 \pm 0.3$  mg.L<sup>-1</sup>). Significant differences were observed in turbidity measured at the end of the renewal cycles: the mean values for all measurements during the 56 days were  $10.3 \pm 1.3$  FTU for the {+Cd+Tub} and {-Cd+Tub} conditions and  $0.2 \pm 0.1$  FTU for the {+Cd-Tub} condition.

Average Cd concentrations determined from the whole set of data measured in the unfiltered water samples collected at the beginning and at the end of each renewal cycle, during the 56 days of the experiment were  $13.9$  and  $18.3$  µg.L<sup>-1</sup> for the two contaminated conditions {+Cd+Tub} and {+Cd-Tub}, respectively. Mean dissolved Cd concentrations represented 86 % of total Cd concentrations for the {+Cd+Tub} condition and 98.4 % for the {+Cd-Tub} condition. When no Cd was added to the EUs ({-Cd+Tub} condition), all the measurements in the water samples were below the detection limit ( $0.1$  µg.L<sup>-1</sup>).

For the {+Cd+Tub} condition, the evolution of vertical Cd distribution in the dissolved pore-water ( $<0.2$  µm) and in the particulate fractions of the six sediment layers is shown in Figure III.28, after 7, 21 and 56 days. A marked increase in Cd accumulation was observed in



**Figure III.29.** Evolution of cadmium concentrations in worms during the 56 days' exposure with the two experimental conditions: {-Cd+Tub}, no cadmium in the water column and Tubificid worms added to the sediment; {+Cd+Tub}, water column contaminated with cadmium and Tubificid worms added to the sediment. Mean values  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

Regression model for {+Cd+Tub} condition:

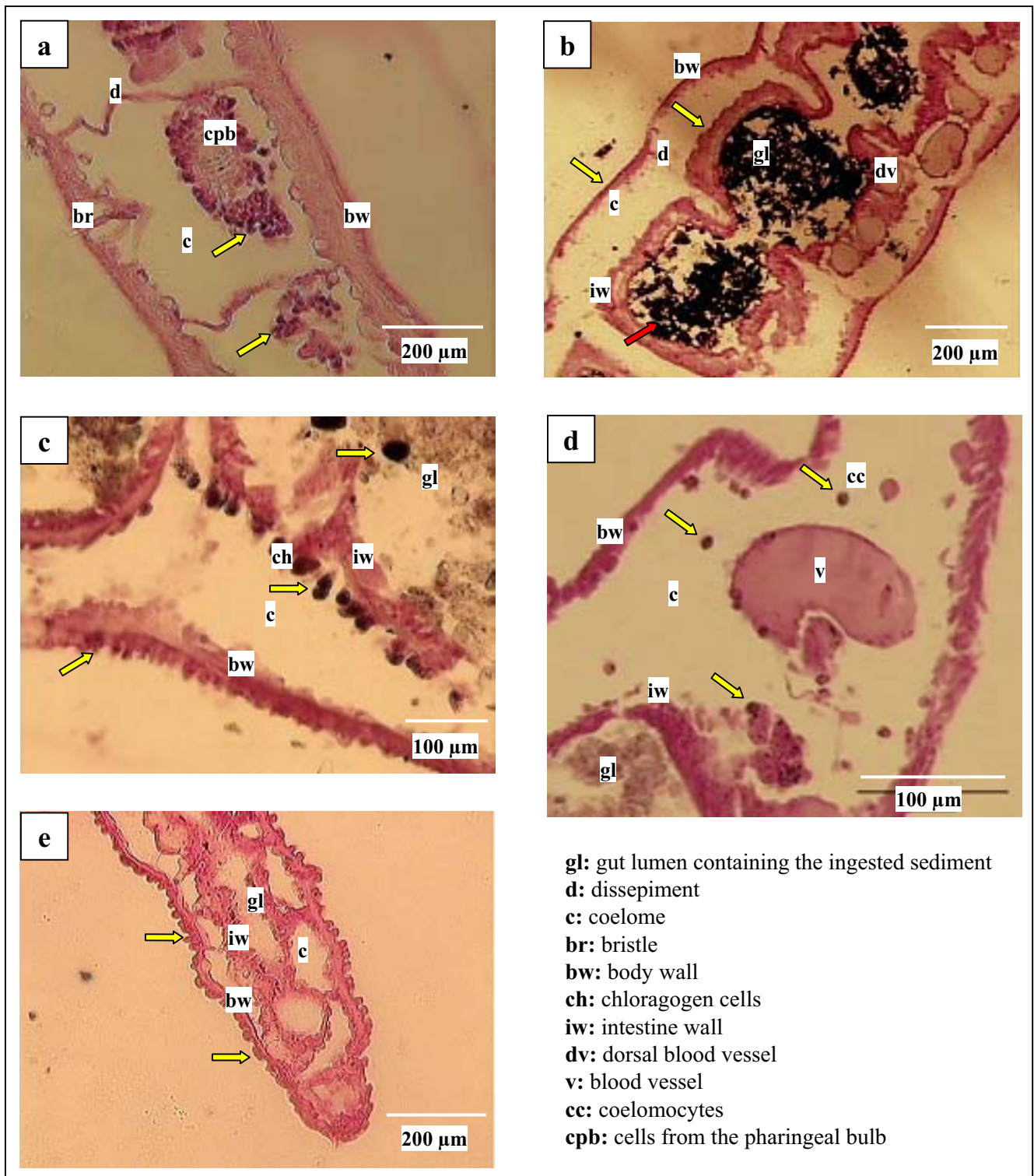
$$[\text{Cd}] = -13.74 + 14.38 \cdot \exp(0.026 \cdot \text{time}), R^2 = 0.998, p = 0.0001.$$

the different layers up to 3-5 cm, with a strong correlation with the exposure duration. After 56 days, Cd concentrations in the first layer (0-0.5 cm) reached  $3.1 \pm 0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$  for dissolved Cd and  $20.9 \pm 0.6 \mu\text{g.g}^{-1}$  (dw) for particulate Cd. In the contaminated units without worms ( $\{+Cd\text{-Tub}\}$  condition), a significant increase in Cd concentrations was observed only in the sediment top layer; maximal values were  $5.5 \pm 0.7 \mu\text{g.L}^{-1}$  in the dissolved pore-water and  $39.8 \pm 13.4 \mu\text{g.g}^{-1}$  (dw) in the particulate fraction. Note that in the absence of Cd contamination ( $\{-Cd\text{+Tub}\}$  condition), Cd concentrations in the pore-water were systematically below the detection limit ( $0.1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ); corresponding measurements in the particulate fraction did not differ significantly from the background level ( $[Cd] = 0.75 \pm 0.12 \mu\text{g.g}^{-1}$ , dw).

Results relating to Cd bioaccumulation in tubificid worms are presented in Figure III.29. In the uncontaminated EUs ( $\{-Cd\text{+Tub}\}$  condition), average Cd concentrations did not significantly differ from the background level measured at time zero:  $1.0 \pm 0.1 \mu\text{gCd.g}^{-1}$ , dw. When Cd was added to the water column ( $\{+Cd\text{+Tub}\}$  condition), bioaccumulation in worms increased exponentially during the 56 days' experiment, with a maximal value of  $47.1 \pm 8.9 \mu\text{gCd.g}^{-1}$  (dw), which is about 50 times higher than the background level. Data treatment based on a two-way ANOVA followed by an LSD test shows significant differences between the two experimental conditions from seven days .

Figure III.30 shows microscopic pictures obtained after autometallography on worm bodies exposed to Cd for 56 days. For the anterior part of the body (Figure III.30.a), metal was essentially detected in the cells of the pharyngeal bulb. In the medium part (Figure III.30.b), a longitudinal section shows marked black silver deposits (BSD) in the gut lumen where contaminated ingested sediment was accumulated; less marked precipitates are present in chloragogen cells and epidermal cells of the body wall. Two magnifications of this section in the central part of the body indicate marked BSD in the chloragogen cells and, to a lesser degree, in the intestine wall and also in the body wall (Figure III.30.c); high metal accumulation was detected in circular cells spread throughout the coelome (Figure III.30.d). In the posterior part of the worms, Cd was detected in the epidermal cells only (Figure III.30.e).

Luminophore and microsphere vertical profiles from uncontaminated and contaminated units where tubificids were added ( $\{-Cd\text{+Tub}\}$  and  $\{+Cd\text{+Tub}\}$  conditions) are shown in Figures III.31.A-B (2 replicates/condition), after 7, 14 and 21 days. Luminophore profiles show an increase in the depth location of the maximal concentration. This tracer subduction gives evidence of sediment bioadvective processes induced by conveyor feeding types with sediment ingestion at depth and fecal pellet accumulation at the sediment surface. As early as



**Figure III.30.** Light microscopic sections of Tubificid worms collected in experimental units contaminated with cadmium ( $\{+Cd+Tub\}$  condition), after 56 days' exposure, treated by autometallography. Cadmium accumulation corresponds to dense silver deposits (arrows on the sections).

**a** - longitudinal section in the beginning of the worm body; **b, c, d** - longitudinal sections in the middle part of the worm body; **e** - longitudinal section in the terminal part of the worm body.

7 days after the tracers were added, no luminophores were detected in the surface layer (0-0.5 cm); after 21 days, more than 80 % of the tracer load initially deposited at the sediment surface were present in the 3-5 cm layer. Microspheres undergo similar bioadvection but approximately 25 % of tracer load reappears in the surface layer after 7 days. In units without bioturbation ( $\{+Cd-Tub\}$ ), all the particulate tracers were found in the top sediment layer (0-0,5 cm), at the end of the experiment.

Tracer profiles were simulated using the bioadvection-biodiffusion model (Officier and Lynch, 1982; Gérino et al., 1994). This model was applied under non-steady state conditions after a pulse input of tracers at the sediment surface at the beginning of the experiment:

$$\frac{\delta C}{\delta t} = D_b \frac{\delta^2 C}{\delta z^2} - V \frac{\delta C}{\delta z}$$

where  $t$ =time;  $z$ =depth;  $C$ = tracer concentration

This model allows the estimation of suitable values for the two parameters  $V$  (the bioadvective rate that quantifies the burial velocity of tracers) and  $D_b$  (the biodiffusive rate that quantifies omnidirectional dispersion).

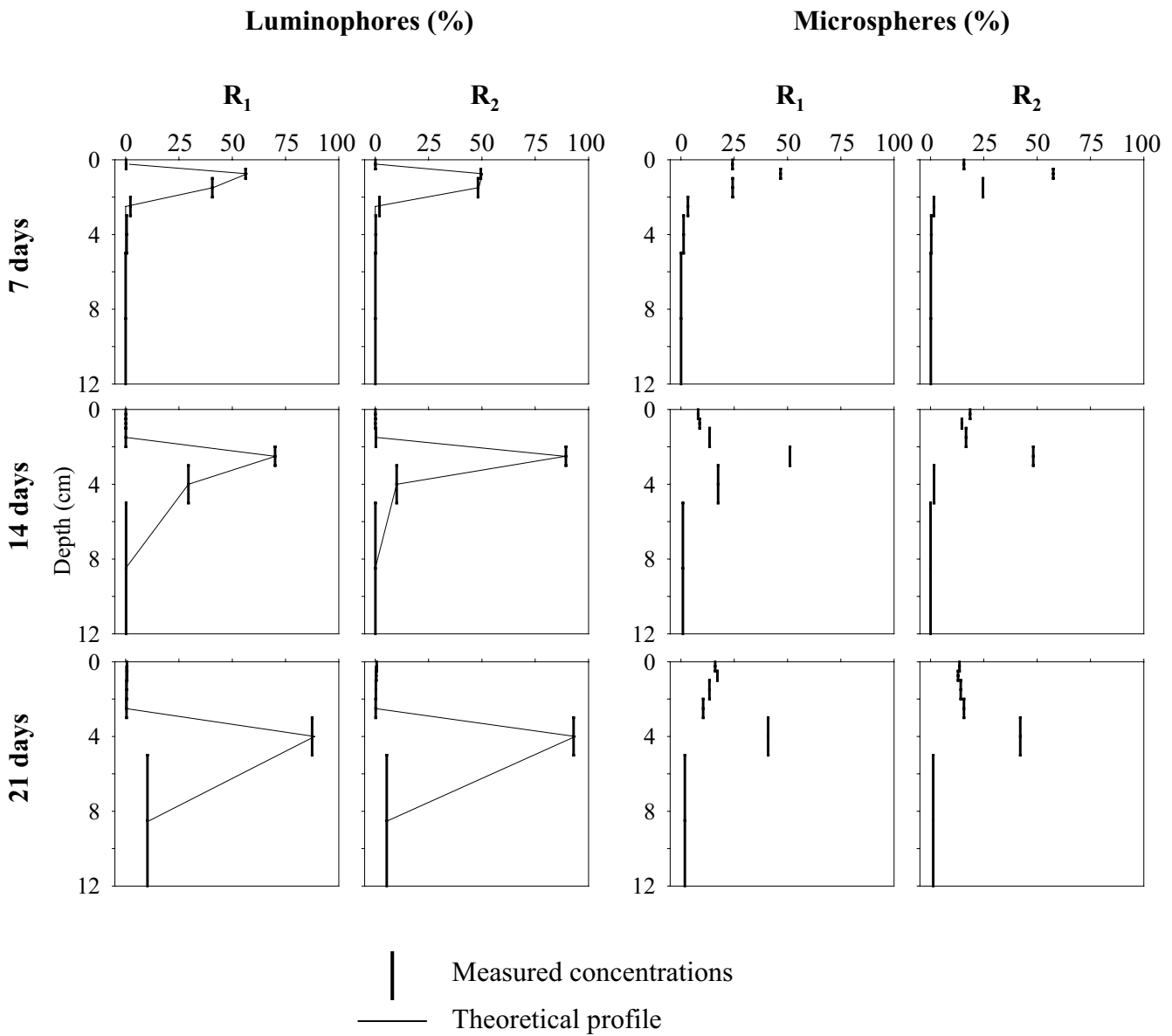
The model equation was solved with initial conditions  $C(z, t=0) = 1$  for  $z \in [0; 0.3]$ ;  $C(z, t=0) = 0$  for  $z > 0.3$  cm; and boundary conditions  $C(z \rightarrow +\infty, t) = 0$  and  $V C_{(z,t)} - D_b \frac{\delta C_{(z,t)}}{\delta z} = 0$  at  $z=0$

The analytical solution was provided by Officier and Lynch (1982):

$$C_{(z,t)} = \frac{1}{\sqrt{\pi D_b t}} \exp\left[-\frac{(z-Vt)^2}{4D_b t}\right] - \frac{V}{2D_b} \exp\left[\frac{Vz}{D_b}\right] \operatorname{erfc}\left[\frac{z+Vt}{\sqrt{4D_b t}}\right]$$

Estimation of bioadvection and biodiffusion coefficients in our experiment was performed by fitting the theoretical concentrations to the measured luminophore concentrations in the different sediment layers, with a least square procedure. Two replicates and mean values of the two coefficients are shown in Table III.10 for the  $\{+Cd+Tub\}$  and  $\{-Cd+Tub\}$  conditions. Since the present model is not suitable for simulating reingestion when tracers reach the ingestion zone by advection processes, data obtained with microsphere distributions were not used for bioturbation coefficient determination. After 21 days it is assumed that the luminophores have reached the lower limit of the ingestion zone, so estimation of advection rate with a longer experimental duration may be underestimated. The mean bioadvective rate,  $V$ , varies between 74 and 87  $\text{cm} \cdot \text{y}^{-1}$  for the uncontaminated condition, and between 55 and 105  $\text{cm} \cdot \text{y}^{-1}$  when Cd was added to the water column. The corresponding mean biodiffusive rates,  $D_b$ , vary between 3.0 and 3.1  $\text{cm}^2 \cdot \text{y}^{-1}$  for the  $\{-Cd+Tub\}$  condition;

**Condition {-Cd+Tb}**



**Figure III.31.A.** Vertical profiles of particulate fluorescent tracers in the sediment – luminophores (63-315  $\mu\text{m}$ ) and microspheres (1  $\mu\text{m}$ ) – after 7, 14 and 21 days for the condition {-Cd+Tub}, no cadmium in the water column and Tubificid worms added to the sediment.

R: replicates.

2.5 and 3.1  $\text{cm}^2\cdot\text{y}^{-1}$  for the {+Cd+Tub} condition. Data treatment based on a two-way ANOVA revealed no significant effect of the exposure condition (+Cd or -Cd) or of the exposure duration (7, 14 and 21 days) on the two bioturbation coefficients (Table III.11). Note that for the bioturbation rate, the probability calculated for the effect of exposure condition equals 0.05, significance limit with a threshold of 5 %.

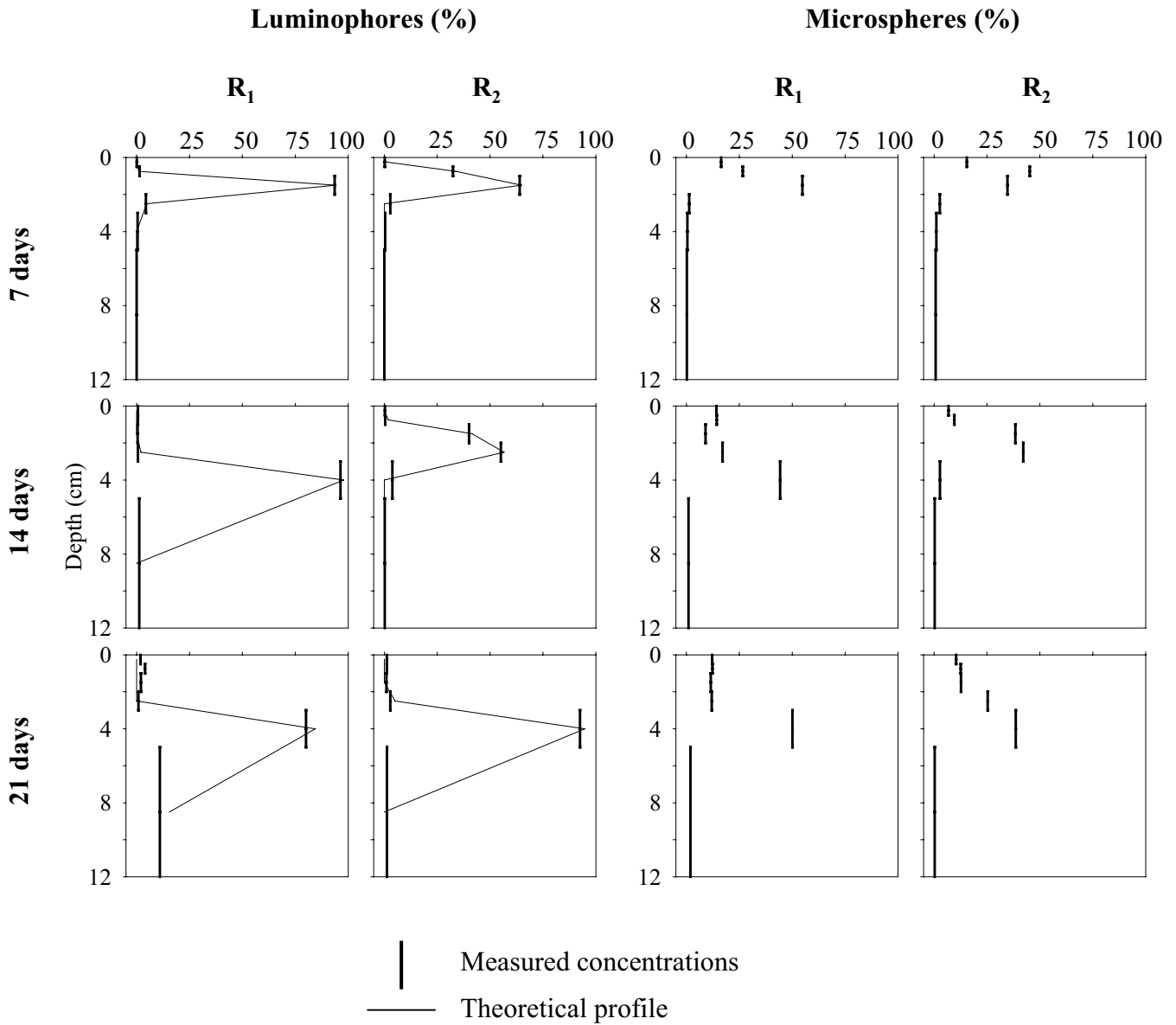
#### 4. Discussion

This experimental approach to cadmium transfers from the water column to the sediment compartment under the effects of bioturbation via tubificid worms shows a marked and significant metal accumulation within the inhabited sediment zone. This accumulation occurs both in the particulate and pore-water fractions. Therefore, as previously shown by Soster et al. (1992) with zinc, tubificids produce significant sediment contamination at depth (Ciutat et al., 2003, in revision).

Cd accumulation in tubificids during the 56 days' exposure reveals high metal concentrations, with maximal values close to 50  $\mu\text{gCd}\cdot\text{g}^{-1}$  (dw) at the end of the experiment. Since worms were not depurated before the metal was measured, part of the Cd accumulated at the whole organism level may derive from metal present in the sediment within the digestive tract. After the 56 days' exposure period, the maximal Cd concentration measured in the sediment from the {+Cd+Tub} condition was 20.9  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , dw, in the superficial layer (0-0.5 cm). The average metal concentration up to 5 cm, estimated from the measured Cd concentrations in the different sediment layers at the end of the experiment and taking into account differences in thickness and hence in weight, is about 8  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , dw. In both cases, exposure conditions, based on Cd concentrations measured in sediment at the end of the experiment, are overestimated for the worms. So, accumulation levels in the sediment are evidently less than the Cd concentrations measured in the organisms at the end of the experiment. A large proportion of metal is therefore bioaccumulated in the worms, with this bioaccumulation including adsorption sites at the "organism/surrounding environment" interfaces and sequestration within the tissue and cell compartments. We must stress that no significant amount of bioaccumulation was observed in the worms collected after 56 days in the control EUs ({-Cd+Tub} condition).

Under our experimental conditions, the tubificids can become contaminated via the direct exposure route, from the Cd present in the water column and/or in the pore-water, and, at the same time, via ingested sediment (trophic route). The posterior part of these burrowing

**Condition {+Cd+Tub}**



**Figure III.31.B.** Vertical profiles of particulate fluorescent tracers in the sediment – luminophores (63-315  $\mu\text{m}$ ) and microspheres (1  $\mu\text{m}$ ) – after 7, 14 and 21 days for the condition {+Cd+Tub}, water column contaminated with cadmium and Tubificid worms added to the sediment.

R: replicates.



organisms is in more or less permanent contact with the water column, mainly for breathing purposes. Indeed, respiration is based on absorption by diffusion of the oxygen present in the water through the epiderm covering the abdomen, with transfers facilitated by the undulations of the hind part of the body (Avel, 1959). The procedure we adopted for contamination of the EUs during the 56 days' exposure period, via renewal of the water column on a daily basis, enabled us to maintain a Cd concentration of between 20 and 13.9  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , 86 % of the metal present being in the dissolved form ( $< 0.2 \mu\text{m}$ ). In these conditions, the posterior part of the worms, in direct contact with the water column, represents a significant exposure route, given the relatively high Cd concentration in the water in a bioavailable form. Several studies have shown that metals, especially cadmium, can accumulate in oligochaete worms via epidermal uptake: results from Back (1990) showed that tubificids in stabulation in contaminated water accumulate Cd in the tegument of the posterior part of the body; Bouché et al. (2000) also revealed a high level of Cd accumulation in the epiderm of *Tubifex tubifex* worms maintained in contaminated water; Dean (1974) measured a direct uptake of dissolved radionuclides, water being considered as the only significant accumulation route. However, in these experimental studies, organisms were maintained in water only, in conditions that were very different from their normal lifestyle. Our autometallographic approach on worms collected from the {+Cd+Tub} condition, at the end of the experiment, revealed Cd localization in the epidermal cells of the posterior part of the body (Figure III.30.c). However, the histochemical localization did not give rise to a high rate of metal accumulation in this interface structure. It can be postulated that a metal transfer occurs through this barrier, thus giving access to the coelomic compartment, followed by accumulation in the internal compartments of the worms.

The tubificids can also become contaminated from the Cd present in the pore-water via the part of the body buried in the sediment. Cd vertical profiles in the dissolved phase of the pore-water suggest a significant increase in metal concentrations over time, as far as the 3-5 cm layer, but the average values measured for the different sampling periods are much lower than those that are maintained in the water column: 0.5  $\mu\text{g.L}^{-1}$  after 7 days to 3  $\mu\text{g.L}^{-1}$  after 21 days, compared with 17  $\mu\text{g.L}^{-1}$  on average, respectively. The galleries that are burrowed out by the worms are not irrigated by water currents from the overlying water column (Mc Call and Fisher, 1980), as is observed with burrowing mayfly nymphs, for example (Matisoff, 1995). Therefore exposure conditions are very closely dependent on the depth in the sediment compartment. Autometallographic studies carried out on the mid part of the worms reveals the presence of silver deposits on the external face of the body wall (Figure III.30.c,d), but once again, the histochemical reaction was not very pronounced.

Condition	Time (days)	$V$ (cm.yr <sup>-1</sup> )			$D_b$ (cm <sup>2</sup> .yr <sup>-1</sup> )		
		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	mean	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	mean
{+Cd+Tub}	7	54	56	55	2.5	2.4	2.5
	14	81	76	78	2.7	2.7	2.7
	21	105	104	105	3.1	3.1	3.1
{-Cd+Tub}	7	87	62	74	2.7	3.3	3.0
	14	98	53	75	2.8	3.3	3.0
	21	106	68	87	3.2	3.1	3.1

**Table III.10.** Bioadvective rates ( $V$ ) and biodiffusive rates ( $D_b$ ) estimated from the bioadvective-biodiffusive model after 7, 14 and 21 days for the two experimental conditions: {+Cd+Tub}, Cd in the water column and worms in the sediment and {-Cd+Tub}, no Cd in the water column and worms in the sediment.

R: replicates.

Another interpretation could be based on the role of mucous: the mucous layer around polychaete or oligochaete external cuticles is known as an efficient ligand site for several metals present as cationic species in the dissolved water phase (Whitley, 1967; Fleming and Richards, 1981; Dhainaut-Courtois et al., 1988; Back, 1990; Bouché et al., 2000). However, this layer was not retained after the histological and histochemical treatments undergone by the samples before autometallographic observations. On the contrary, the mucous layer was not eliminated when the worms were collected and then frozen and stored before Cd dosage, and so it could contribute a significant proportion of the metal accumulated at the whole organism level.

Cd vertical profiles in pore-water and sediment particles exhibit the same evolution with time (Figure III.28). The sediment ingested by the worms in the surface layers, to a depth of about 5 cm, is therefore a potential source of contamination via the trophic route. Cd concentrations in worms are very much higher than those measured in the sediment particulate phase, ranging from 2 to 20  $\mu\text{g.g}^{-1}$  (dw). Bervoets et al. (1997) analyzed Cd accumulation in tubificids collected in the field from contaminated sites: their results showed that metal levels in worms were mainly correlated with the easily reducible cadmium concentration in sediment (Cd associated with Mn oxides), without significant correlations with Cd concentrations in pore-water samples. Sager and Pucsko (1991), on the contrary, found no significant relationships between Cd accumulated in tubificids and Cd concentrations either from pore-water or total sediment. Warren et al. (1998) showed from an in situ experiment that tubificids exposed to Cd in both sediment and overlying water accumulated most of the metal from the sediment. These results are in agreement with experimental studies on other benthic species, such as oligochaetes and insect larvae (Hare, 1992; Hare et al. 2001) or marine annelids (Luoma, 1983).

Tubificid batches added to the EUs at the beginning of our experiment consisted of three species with organisms of different ages and sizes, which could feed at various depths. The evolution in the vertical distribution of microspheres in the sediment revealed that these tracers rose to the surface very rapidly, via the fecal pellets, before 7 days (Figures III.31.A-B). The occurrence of microspheres at the sediment surface after 7 days is interpreted as ingestion in the tracer accumulation zone over the same time period, and indicates that the upper limit of the ingestion zone is in the top 3 cm of sediment. The heterogeneity in the sizes of tubificids used for this experiment could explain the progressive homogenization of microsphere vertical distribution between the sediment surface and the maximal ingestion zone. These results are in agreement with those published by Robbins et al. (1979): when a

	$p(V)$	$p(D_b)$
Exposure duration	0.97	0.12
Exposure condition	0.12	0.05

**Table III.11.** Comparison of  $V$  and  $D_b$  bioturbation coefficients with variation of experimental time duration, 7, 14 and 21 days and conditions  $\{-Cd+Tub\}$  and  $\{+Cd+Tub\}$  with a two way ANOVA.  $V$  and  $D_b$  were estimated by the bioadvective-biodiffusive model applied on luminophores distribution.

Probabilities ( $p$ ) superior to 0.05 indicate that difference are not significant.

thin layer of clay particles labeled with  $^{137}\text{Cs}$  entered the feeding zone of the tubificid populations, the radiotracer reappeared at the sediment surface; with time increasing, the  $^{137}\text{Cs}$  activity tended towards a uniform distribution in sediment over the upper 6 cm and decreased exponentially below to undetectable levels under 9 cm. Our autometallographic studies show that several parts of the digestive tract of the worms were associated with Cd accumulation: the pharyngeal bulb, the intestinal wall and the chloragogen cells on the external part of this wall. This metal localization after 56 days may be associated with exposure via the ingested sediment. The marked exponential trend for Cd bioaccumulation in the tubificids as a function of exposure period (Figure III.29) can be associated with the increase in metal concentrations in the sediment layers, both in the pore-water and the particulate phase (Figure III.28). Cd burdens in the different sediment layers ( $[\text{Cd}] \times \text{sediment weight}$ ), for each of the 5 exposure periods studied, are in very close correlation with the corresponding concentrations in the organisms ( $R^2 = 0.95$  for the particulate fraction and 0.87 for the dissolved pore-water fraction), whereas Cd concentrations in the water column remained practically constant during the entire exposure period. In these conditions, we can hypothesise that a significant amount of Cd bioaccumulation in the organisms derives from transfers from the sediment surface layers, Cd-enriched as a result of bioturbation to a depth of about 5 cm. Note that when there are no worms present ( $\{+\text{Cd-Tub}\}$  condition), only the first few millimetres at the sediment surface are enriched in metal.

Cd bioaccumulation in tubificids leads to an average concentration of  $47.1 \pm 8.9 \mu\text{gCd.g}^{-1}$  (dw) after 56 days, which was about 50 times higher than the background level. Such concentrations may have toxic effects on worms. Some biological parameters, based on various biological functions, were used to reveal and to estimate impacts on tubificids: for example, the retraction of the posterior end in the sediment in response to metallic contaminants (Leynen et al., 1999). In our study, we selected bioturbation as a functional parameter to investigate the toxic effects of Cd. All tracer movements recorded in presence of worms within the experimental units ( $\{-\text{Cd}+\text{Tub}\}$  and  $\{+\text{Cd}+\text{Tub}\}$  conditions) were directly linked to worm's activity, since tracer distribution in fauna-free units ( $\{+\text{Cd-Tub}\}$  condition) indicates no perturbation. Statistical comparison (two-way ANOVA) between bioadvection ( $V$ ) and biodiffusion ( $D_b$ ) rates indicates no significant differences between the contaminated and uncontaminated conditions nor between the three exposure durations (7, 14 and 21 days). Because advection velocity is controlled by the sediment ingestion rate, the constant vertical velocities over time reveal homogeneity of the feeding rates during these periods. Luminophore particle sizes are coarse enough not to be ingested by the majority of tubificids



used in this experiment (Juget, 1978); so, the tracer input should stop its vertical migration once it reaches the bottom of the ingestion zone. Under our experimental conditions, worms are able to ingest almost the totality of particles from the Garonne river sediment, which consists of 94 % of particles smaller than 63  $\mu\text{m}$  (Table III.8). Microspheres were small enough ( $\text{Ø} = 1 \mu\text{m}$ ) to be ingested with sediment particles by all worm species and sizes, even the smallest (Juget, 1978; Rodriguez et al., 2001). No differences were observed between the microsphere profiles for the two conditions {-Cd+Tub} and {+Cd+Tub}. The non significant effects of Cd exposure on bioturbation parameters (Table III.11) also provide evidence that worm activities, like feeding and defecating, are not affected by the exposure conditions used for this experiment nor by the metal accumulation levels observed in the organisms. It should however be stressed that the  $p$  value of the effect of Cd on the  $D_b$  coefficient was equal to the  $\alpha$  risk (0.05). So Cd could have a significant effect on sediment homogenization by worm activity if the exposure conditions via the contaminated water column were a little stronger or/and after a longer exposure period. Such effects would be in agreement with reduced sediment-reworking rates observed for several marine polychaetes (*Arenicola marina*, *Arenicola cristata*) in polluted sites (Lee and Swartz, 1980).

This absence of any significant effects of metal exposure on the bioturbation activity of tubificids in our experimental conditions, despite the bioaccumulation levels observed, may be linked with the existence of detoxification processes in worms. Our autometallographic study reveals high BSD in chloragogen cells. These cells, whose physiological function is equivalent to the vertebrate liver, are known to perform xenobiotic detoxification and excretion (Jamieson, 1981). In *Lumbricus* (Lumbricidae), they disconnect from the peritoneum and differentiate into eleocytes, which remain free in the coelomic fluid, and constitute a part of the coelomocytes (Avel, 1959; Dhainaut and Scaps, 2001). Eleocytes could be the circular cells observed in the coelomic fluid (Figure III.30), with high Cd accumulation; they could thus contribute to a sequestration of the metal with elimination over a longer time scale via the nephridia. These cells would also be another type of coelomic cells, like phagocytic amoebocytes which are known in polychaetes for example, to contribute to metal detoxification via metallothionein sequestration and storage/excretion in lysosomes (Chapman, personal communication). Several authors have described resistance to high metal accumulation levels for other oligochaete species, based on efficient detoxification mechanisms, such as intracellular compartmentalization, involving lysosomes, spherocrystals, and/or metal-containing granules (Brown, 1982; Dhainaut-Courtois et al., 1991); metal inactivation by binding to metalloproteins (Dallinger, 1994) or metallothionein-like proteins





(Wallace et al., 1998; Gillis et al., 2002); sequestration in sulfur-rich granules mainly located in chloragocytes, body wall and gut wall cells (Klerks and Bartholomew, 1991).

## 5. Conclusion

This experimental approach to bioturbation effects on Cd transfers from the water column compartment and impact on tubificid activity, shows that the bioturbation was not significantly affected despite high levels of Cd accumulation in worms, after 56 days' exposure. Among the different detoxification processes able to explain this metal tolerance, Cd storage was observed in chloragogen cells and isolated circular cells in the coelomic fluid; several hypotheses remain to be tested on the origin of these cells and on Cd sequestration/excretion mechanisms. However, if the worms are protected against the toxic effects of the metal, they represent an important potential contamination source towards their predators (insect larvae, fish, ...). On the other hand, tubificids significantly increase Cd accumulation in the sediment compartment; they also markedly increase the thickness of the Cd-enriched layers, within the biologically mixed zone. The present demonstration of intensive worm activity under Cd contamination pressure indicates that bioturbation is able to play a significant role within the biogeochemical cycle of the metal in contaminated aquatic systems.

*Acknowledgements.* The authors thank Narcisse Giani for his help in the interpretation of microscopic worms sections and Peter Chapman for the identification of cadmium localization in tubificids. This work was carried out with the financial support of the GIS ECOBAG (MATE, AEAG, Aquitaine Region, CNRS/PEVS). Aurélie Ciutat was supported by a grant from the French Ministry of Research and Education (MESR).



## References

- Avel, M., 1959. Classe des Annélides Oligochètes. In : Grassé, P.P. (Ed.), Précis de zoologie V. Masson, Paris, pp 224-470.
- Back, H., 1990. Epidermal uptake of Pb, Cd, and Zn in tubificid worms. *Oecologia* 85, 226-232.
- Bervoets, L., Blust, R., de Wit M., Verheyen, R., 1997. Relationships between river sediment characteristics and trace metal concentrations in Tubificid worms and Chironomid larvae. *Environ. Pollut.* 95, 345-356.
- Bouché, M.-L., Habets, F., Biagianti-Risbourg, S., Vernet, G., 2000. Toxic effects and bioaccumulation of cadmium in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex*. *Ecotox. Environ. Safe.* 46, 246-251.
- Brown, B.E., 1982. The form and function of metal-containing 'granules' in invertebrate tissues. *Biol. Rev.* 57, 621-667.
- Chapman, P.M., 2001. Utility and relevance of aquatic oligochaetes in ecological risk assessment. *Hydrobiologia* 463, 149-169.
- Ciutat, A., Gérino, M., Anschutz, P., Boudou, A., 2003. Effects of Tubificid oligochaetes on cadmium transfer and distribution into freshwater sediment. *Geochim. Cosmochim. Acta* (in revision).
- Dallinger, R., 1994. Invertebrates organisms as biological indicators of heavy metal pollution. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 48, 27-31
- Danscher, G., 1984. Autometallography: A new technique for light and electron microscopic visualization of metals in biological tissues (gold, silver, metal sulphides and metal selenides). *Histochem.* 81, 331-335.
- Dean, J.M., 1974. The accumulation of <sup>65</sup>Zn and other Radionuclides by Tubificid worms. *Hydrobiologia* 45, 33-38.
- Deeds, J.R., Klerks, P.L., 1999. Metallothionein-like proteins in the freshwater oligochaete *Limnodrilus udekemianus* and their role as a homeostatic mechanism against cadmium toxicity. *Environ. Pollut.* 106, 381-389.
- Dhainaut, A., Scaps, P., 2001. Immune defense and biological responses induced by toxics in Annelida. *Can. J. Zool.* 79, 233-253.
- Dhainaut-Courtois, N., Arrouijal, F.Z., Demuynck, S., 1988. Effets biologiques de trois métaux lourds (chrome, nickel et plomb) sur *Nereis diversicolor* (Annélide polychète) *Océanis* 14, 423-433.
- Dhainaut-Courtois, N., Demuynck, S., Salzet-Raveillon, B., 1991. Mécanismes de détoxification chez les poissons et invertébrés marins. *Océanis* 17, 403-419.
- Fleming, T.P., Richards K.S., 1981. A technique to quantify surface adsorption of heavy metals by soft-bodied invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 69, 391-394.
- Gérino, M., Stora, G., Durbec, J.-P., 1994. Quantitative estimation of biodiffusive and bioadvective sediment mixing: In situ experimental approach. *Oceanol. Acta.* 17, 547-554.
- Gillis, P.L., Diener, L.C., Reynoldson, T.B., Dixon, D.G., 2002. Cadmium-induced production of a metallothioneinlike protein in *Tubifex tubifex* (Oligochaeta) and



- Chironomus riparius* (Diptera). Correlation with reproduction and growth. *Env. Toxicol. Chem.* 21, 1836-1844.
- Hare, L., 1992. Aquatic insects and trace metals: bioavailability, bioaccumulation and toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 22, 327-369.
- Hare, L., Tessier, A., Warren, L., 2001. Cadmium accumulation by invertebrates living at the sediment-water interface. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 880-889.
- Jamieson, B.G.M., 1981. The ultrastructure of the Oligochaeta. Chapter 3: Coelomocytes. Academic Press, London and New York.
- Juget, J., 1978. La texture granulométrique des sédiments et le régime alimentaire des oligochètes limniques. *Hydrobiologia* 65, 145-154.
- Khangarot, B.S., 1991. Toxicity of metals to a freshwater tubificid worm, *Tubifex tubifex* (Muller). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 906-912.
- Klerks, P.L., Bartholomew, P.R., 1991. Cadmium accumulation and detoxification in a Cd-resistant population of the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri*. *Aquat. Toxicol.* 19, 97-112.
- Laporte, J.-M., Truchot, J.-P., Mesmer-Dudons, N., Boudou, A., 2002. Bioaccumulation of inorganic and methylated mercury by the gills of the shore crab *Carcinus maenas*: transepithelial fluxes and histochemical localization. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 231, 215-228.
- Lee II, H., Swartz, R.C., 1980. Biological processes affecting the distribution of pollutants in marine sediments. Part II. Biodeposition and Bioturbation. In: Baker, R.A. (Ed), Contaminants and sediments. Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, pp 555-606.
- Leynen, M., Van den Berckt, T., Aerts, J. M., Castelein, B., Berckmans, D., Ollevier, F., 1999. The use of Tubificidae in a biological early warning system. *Environ. Poll.* 105, 151-154.
- Luoma, S.N., 1983. Bioavailability of trace metals to aquatic organisms – A review. *Sci. Total Environ.* 28, 1-22.
- Marigomez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Giamberini, L., 2002. Cellular and sub-cellular distribution of metals in molluscs. *Microscop. Res. Tech.* 56, 358-392.
- Matisoff, G., 1995. Effects of bioturbation on solute and particle transport in sediments. In: Allen, H.E. (Ed.), Metal contaminated sediments. Ann Arbor Press, Chelsea, pp. 201-272.
- McCall, P.L., Fisher, J. B., 1980. Effects of tubificid oligochaetes on physical and chemical properties of Lake Erie sediments. In: Brinkhurst, R.O., Cook, D.G. (Eds.), Aquatic Oligochaete Biology. Plenum Press, New York, pp 253-317.
- Officier, C.B., Lynch, D.R., 1982. Interpretation procedures for the determination of sediment parameters from time-dependent flux inputs. *Earth Planet. Sc. Lett.* 61, 55-62.
- Rhoads, D.C., 1974. Organism-sediment relations on the muddy sea floor. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 12, 263-300.
- Robbins, J.A., McCall, P.L., Fisher, J.B., Krezoski, J.R., 1979. Effects of deposit feeders on migration of <sup>137</sup>Cs in lake sediments. *Earth Planet. Sc. Lett.* 42, 277-287.
- Rodriguez, P., Martinez-Madrid, M., Arrate, J.A., Navarro, E., 2001. Selective feeding by the oligochaete *Tubifex tubifex* (Tubificidae, Clitellata). *Hydrobiologia* 463, 133-140.



- Sager, M, Pucsko, R., 1991. Trace element concentrations of oligochaetes and relations to sediment characteristics in the reservoir at Altenwörth / Austria. *Hydrobiologia* 226, 39-49.
- Soster, F.M., Harvey, D.T., Troksa, M.R., Grooms, T., 1992. The effect of tubificid oligochaetes on the uptake of zinc by Lake Erie sediment. *Hydrobiologia* 248, 249-358.
- Soto, M., Quincoces, I., Marigomez, I., 1998. Autometallographical procedure for the localization of metal tracers in molluscan tissues by light microscopy. *J. Histotech.* 21, 123-127.
- Wallace, W.G., Lopez, G.R., Levinton, J.S., 1998. Cadmium resistance in an oligochaetes and its effect on cadmium trophic transfer to an omnivorous shrimp. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 172, 225-237.
- Warren, L.A., Teissier, A., Hare, L., 1998. Modelling cadmium accumulation by benthic invertebrates in situ: The relative contributions of sediment and overlying water reservoirs to organism cadmium concentrations. *Limnol. Oceanogr.* 43, 1442-1454.
- Whitley, L.S., 1967. The resistance of Tubificid worms to three common pollutants. *Hydrobiologia* 32, 193-205.





### III.C. INFLUENCE DE LA BIOTURBATION SUR LES FLUX METALLIQUES D'UN SEDIMENT CONTAMINE VERS LA COLONNE D'EAU – BIODISPONIBILITE DES METAUX

---

#### III.C.1. LARVES D'*HEXAGENIA RIGIDA* EN TANT QUE SOURCE DE BIOTURBATION : EFFETS SUR LES TRANSFERTS DE CADMIUM ET DE ZINC A PARTIR DE LA SOURCE "SEDIMENT" ET SUR LA BIODISPONIBILITE DES METAUX A L'EGARD DE BIVALVES BENTHIQUES (*CORBICULA FLUMINEA*)<sup>11</sup>

##### Abstract

*The two main objectives of this study were to compare cadmium and zinc fluxes from a contaminated sediment to the water column in bioturbated and unbioturbated systems, and jointly to analyse accumulation kinetics of these released metals by benthic filter-feeder bivalves. The experimental approach was based on indoor microcosms containing a two compartment biotope: natural contaminated sediment ( $45 \pm 5 \mu\text{g Cd/g, dw}$  and  $1938 \pm 56 \mu\text{g Zn/g, dw}$ ) and water column. Four experimental conditions were studied: (i) no organism added to the "sediment/water" biotope; (ii) presence of bivalves *C. fluminea*; (iii) presence of *H. rigida* nymphs (bioturbation source); (iv) presence of *C. fluminea* and *H. rigida* simultaneously. Results reveal that bioturbation produces a significant metal release into the water column, via the resuspended sediment particles. The use of *C. fluminea* as an indicator of transferred metals in the water column shows that the metal bioavailability is very limited, quantities of cadmium and zinc bioaccumulated in the soft bodies being less than those measured in unbioturbated systems. This experimental study demonstrates that only the dissolved fraction resulting from diffusive metal fluxes across the sediment-water interface is bioavailable for this bivalve species.*

---

<sup>11</sup> Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue "Environmental Toxicology and Chemistry" : "Bioturbation effects on cadmium and zinc transfers from a contaminated sediment and on metal bioavailability to benthic bivalves", A. Ciutat and A. Boudou, (2003), Vol. 22(7): 1574-1581.



## Introduction

A large number of field studies have revealed the key role of sediments in the biogeochemical cycles of metals in aquatic systems. They constitute very important storage reservoirs, with metals deriving mainly from the deposit of particles in suspension in the water column, which have a very strong metal complexation capacity. In lacustrine systems, for example, metals accumulated in the superficial layers of the sediment can account for more than 90 % of the global burden estimated for the whole ecosystem [1,2]. While sediments represent the primary repository, they may also act as endogenous contamination sources for aquatic systems, and several authors use the "chemical bomb" concept in order to underline the scale of potential transfers and the ecotoxicological risks for aquatic biota and indirectly for human populations [3]. Given this scenario, the key question relates to the fate of such metals stored in the sediments, and in particular their release into the water column and the risks of benthic and pelagic species contamination. One of the processes that can give rise to direct or indirect metal transfers from the sediments is bioturbation, the term given to the mixing activity produced by species living at the surface or buried in the sediments. Macroinvertebrate activity in sediments, such as burrowing, feeding, irrigating, breathing and defecating, alters the physical properties of the sediment [4-6] and the sediment-water chemical exchanges [7-10]. Information at present available in the literature on the role of bioturbation related to the contamination of aquatic systems by metals is fairly limited, [11-15] although there have been several recent studies dealing with organic pollutants [16-19].

To quantify the direct and indirect effects of bioturbation on cadmium (Cd) and zinc (Zn) transfers from a natural contaminated sediment to the water column, and to investigate metal bioavailability for benthic species, we set up an experimental approach based on indoor microcosms. The biological model selected as the bioturbation source was the larval stage of the ephemeridae *Hexagenia rigida*: burrowing nymphs of this mayfly species live permanently within the sediment superficial layers, generating a high level of turbidity in the water column, due to resuspension of sediment particles. Metal transfers in the water column were quantified together with metal accumulation in the soft bodies of the benthic bivalve *Corbicula fluminea*, used as an indicator of Cd and Zn bioavailability. These asiatic clams live buried in the first few centimeters of sediment, filtering large volumes of water for respiration and nutrition, but not moving around and hence not disturbing sediment particles [20]. Four experimental conditions were set up simultaneously – without organisms; with

Granulometry (%)	> 60 $\mu\text{m}$	[60 $\mu\text{m}$ -30 $\mu\text{m}$ ]	[30 $\mu\text{m}$ -15 $\mu\text{m}$ ]	< 15 $\mu\text{m}$	Calcite (%)	Organic carbon (%)						
	80	7.2	9.5	3.3	1.3	6.7						
Clays (%)	Smectite	Illite	Kaolinite	Chlorite	Chlorite -Smectite							
	23	40	13	16	7							
Major elements (%)	SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	MnO	MgO	CaO	TiO <sub>2</sub>	K <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> O	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Loss by ignition	Total
	52.7	16.4	7.5	0.1	1.9	1.7	1.0	3.2	1.1	0.3	13.4	99.1

**Table III.12.** Principal geochemical characteristics of the natural sediment collected from the Cajarc station, on the Lot river (South West of France).

clams; with mayfly nymphs; with the two species added simultaneously -, in order to analyze separately the main transfer processes from the sediment source.

In this paper, we present results of the comparative analysis of these four experimental conditions over 21 days, using complementary criteria: water column turbidity, Cd and Zn concentrations in the dissolved and particulate phases, and metal bioaccumulation in the clam soft bodies. The results clearly demonstrate the significant role of bioturbation as a process of releasing metals into the water column, but they also indicate the importance of the chemical speciation in relation to the bioaccumulation capacities of the benthic bivalves: cadmium and zinc transferred to the water column are mainly bound to sediment particles and thus not bioavailable in the experimental conditions studied. The discussion of the results will take into account complementary data relating to the geochemistry of the two metals in the sediment and compare different experimental conditions, especially those based on the artificial sediment enrichment by cadmium, which led to greater metal release in the dissolved form and hence an increased bioavailability of the metal for the benthic bivalves.

## **Materials and methods**

### *Microcosm structure and experimental design*

The basic structure of the experimental systems consisted of a glass tank (12\*12\*30 cm), lined with a plastic bag (Plastiluz, alimentary standard), and a two-compartment biotope: water column (2.5 L - 17 cm depth) and natural sediment (900 g, wet weight - 5 cm depth). The sediment was collected from the Cajarc station, in the reservoir of an hydroelectric low-head dam on the Lot River (France), 50 km downstream from the industrial site of Vieille Montagne. This metallurgical site has discharged considerable quantities of heavy metals, notably Zn and Cd, for more than 100 years [21]. This sediment consists essentially of silty and sandy mud, with a relatively high organic carbon content (Table III.12). Approximately 100 kg of sediment were collected by drilling cores and stored at 4°C in the dark. Before being added to the experimental units, the sediment was homogenized by mechanical mixing and 10 samples were collected in order to measure the "wet weight/dry weight" ratio ( $ww/dw = 2.3 \pm 0.2$  after 72 h desiccation at 60°C) and the metal concentrations ( $45 \pm 5 \mu\text{g Cd/g, dw}$  and  $1938 \pm 56 \mu\text{g Zn/g, dw}$ ). The homogenized sediment was then introduced into each experimental unit and dechlorinated tap water was carefully added, in order to avoid disturbances at the sediment surface.



The experimental systems were placed in larger tanks (140\*65\*30 cm), which were themselves in enclosed containers, with thermoregulation equipment (heating and cooling systems). Artificial light was produced from 2 neon tubes (Sylvania F36W/GRO) in each tank positioned 45 cm above the water surface and operated by timer switches. In this experiment, temperature was fixed at 24 °C and the daily period of light at 12h/24 h. Air was continuously bubbled into each unit from a diffuser in the upper layer of the water column and supplied with an air pump (Rena 301– Rena, Annecy, France). Water depth was kept constant during the 21 days' experiment by water additions, which compensated losses due to evaporation and sampling; water additions were identical for the 4 experimental conditions.

As defined in the introduction, 4 experimental conditions were studied: [No], no organisms added to the "sediment/water" biotope; [Cf], presence of bivalves *C. fluminea*; [Hr], presence of *H. rigida* nymphs; [Cf+Hr], presence of *C. fluminea* and *H. rigida* simultaneously. Asiatic clams *Corbicula fluminea* were collected at a reference site, on the banks of the Cazaux-Sanguinet lake (Aquitaine, France), where average clam density was close to 500 organisms per square metre. They were acclimatized in the laboratory for two weeks and fed with algae culture (*Scenedesmus subspicatus*). An homogeneous batch was obtained by individual selection based on the antero-posterior length of the shell:  $2.5 \pm 0.1$  cm ( $n = 72$ ), which corresponds to an average soft body weight of  $386 \pm 15$  mg, fw or  $63 \pm 2.4$  mg, dw (fw/dw = 6.1; dw after 72 h at 60 °C). After randomization, 3 organisms were added to each microcosm, 3 days after setting up the "sediment/water" biotope. No food was added to these microcosms during the 21 days of the experiment, in order to avoid any non-monitored changes in metal complexation by the phytoplanktonic algae. Several experiments were carried out under these conditions with no significant effect on clam growth [22]. The mayfly *Hexagenia rigida* (McDunnough) is endemic to North America and the nymphs live in burrows within lake sediments. The nymphs used in this experiment derived from a mass culture initiated in the laboratory from eggs collected during summer emergence periods from Lake Winnipeg (Canada). Detailed culture conditions have already been described [23]. In order to obtain a similar biomass in each experimental system, nymphs were individually weighed and distributed into 15 weight classes, from 12-16 to 54-73 mg, fw. After randomization, one organism from each class was introduced in each microcosm, the average total biomass per experimental unit being  $339 \pm 3$  mg, fw or  $79 \pm 0.7$  mg dw (fw/dw = 4.3; dw after 72 h at 60 °C) ( $n = 24$ ). *H. rigida* nymphs were added three days after the mixed biotope was set up and just after the clams were introduced.





The experiment lasted 21 days, with 3 sampling times for the clams and mayfly nymphs: 0, 7 and 21 days. At these times, the microcosms had to be destroyed as the sediment was sieved to collect the organisms. A complete experimental design was set up, with 4 replicates per experimental condition, giving 32 experimental units at time zero (4 conditions x 2 exposure durations x 4 replicates).

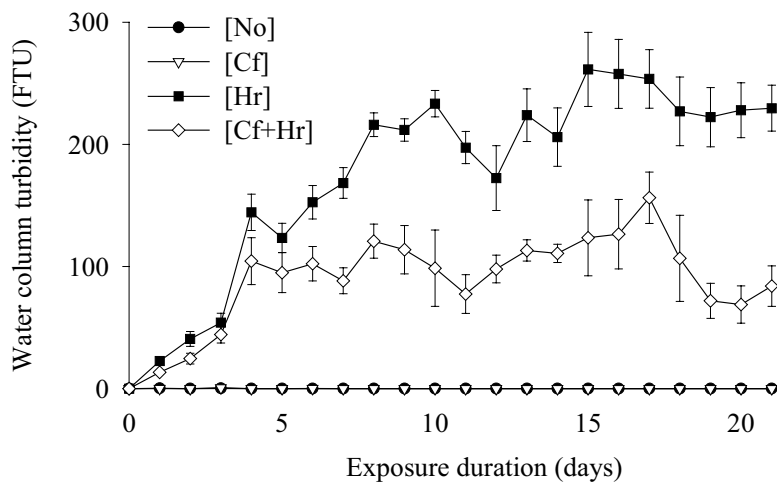
#### ***Physico-chemical measurements, sampling procedure, and metal determination***

Temperature, pH, and dissolved oxygen concentrations were measured daily in the central part of the water column in each experimental unit (MultiLine F/SET-3 – WTW GmbH, Weilheim, Germany). Turbidity was measured daily on water samples (5 ml) also collected from the central part of the water column (HI 93703 – HANNA Instrument, Ronchi di Villafranca, Italy); results were expressed in Formazine Turbidity Units (FTU), which are equivalent to Nephelometric Turbidity Units (NTU). They were well correlated with the corresponding concentrations of suspended particles: in our conditions, 1 FTU corresponds to 0.75 mg/L, dw of suspended matter (> 0.45 µm - cellulose acetate filters, Whatman, UK – dw after 72 h at 60 °C).

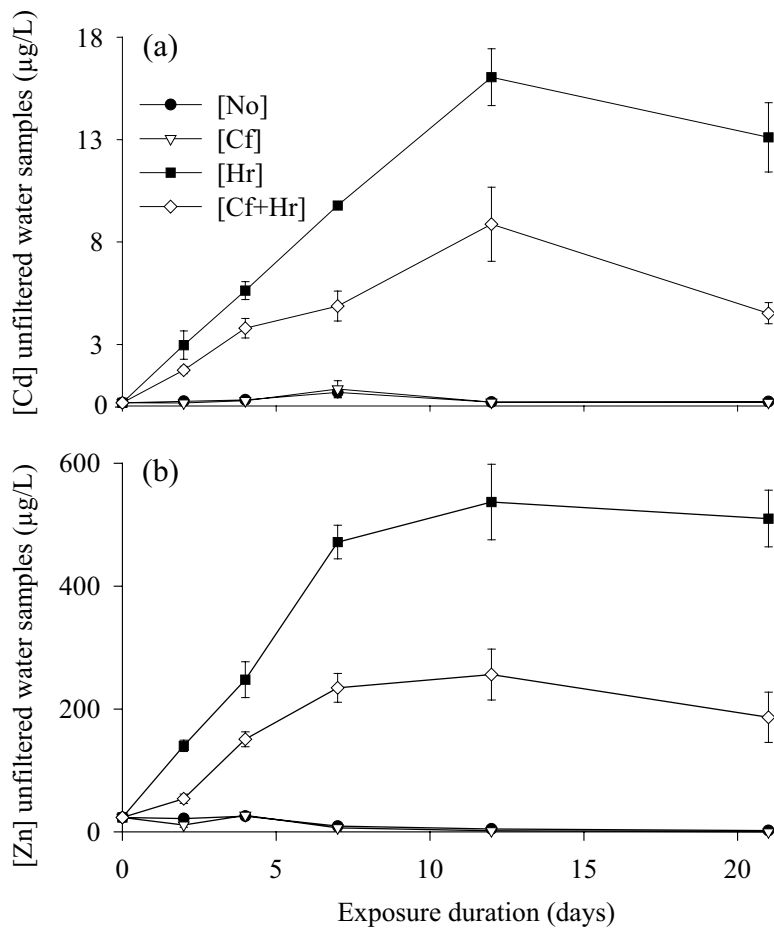
Cadmium and zinc determinations were made on water samples at time 0, 2, 4, 7, 12 and 21 days. Twenty milliliters were collected from each experimental unit corresponding to the "21 days' exposure" condition (16 units). Ten milliliters were directly acidified with 1 ml of nitric acid (65 % HNO<sub>3</sub> - Merck, Darmstadt, Germany) for metal determination on unfiltered samples; the other 10 ml were filtered at 0.45 µm (polycarbonate Whatman Autotop filters – Whatman, UK) and then acidified with 1 ml of nitric acid for metal quantification in the dissolved phase.

After 7 and 21 days' exposure, the organisms were collected from the experimental systems. The clams were rinsed with tap water and frozen at -20 °C. For each exposure duration and each experimental condition, 4 metal determinations were made on pools of 2 soft bodies from the 4 replicates. *H. rigida* nymphs were collected by sieving the sediment under running water; the nymphs were dried carefully on absorbent paper sheets, weighed (individual fresh weight) then frozen at -20 °C.

For cadmium and zinc determinations, biological and sediment samples were first digested by nitric acid (65 % HNO<sub>3</sub> - Merck, Darmstadt, Germany – 3 ml), at 100°C for 3 h under pressure condition. The digests were diluted up to 20 ml with ultra-pure water (MilliQ plus). Cd was measured with a Varian AA 400 spectrophotometer (Varian, Walnut Creek,



**Figure III.32.** Comparative study of water column turbidity during the 21 days' experiment for the 4 experimental conditions studied : [No], no organism added to the "sediment/water" biotope; [Cf], presence of bivalves *C. fluminea*; [Hr], presence of *H. rigida* nymphs; [Cf+Hr], presence of *C. fluminea* and *H. rigida* simultaneously. Mean values  $\pm$  standard deviations ( $n = 8$  between 0 and 7 days –  $n = 4$  between 7 and 21 days). FTU: formazine turbidity units.



**Figure III.33.** Evolution of cadmium (Cd), (a), and zinc (Zn), (b), concentrations in the unfiltered water samples during the 21 days' experiment for the 4 experimental conditions studied : [No], no organism added to the "sediment/water" biotope; [Cf], presence of bivalves *C. fluminea*; [Hr], presence of *H. rigida* nymphs; [Cf+Hr], presence of *C. fluminea* and *H. rigida* simultaneously. Mean values  $\pm$  standard deviations ( $n = 4$ ).

CA, USA) equipped with a GTA 96 graphite tube atomizer, autosampler, and Zeeman correction. Samples of 10 µl were taken and mixed before atomization with 4 µl of a mixture 50 % Pd (0.2 g/L) and 50% Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0.5 g/L), to facilitate removal of the matrix. The detection limit was 0.05 µg/L (DL: 3x SD of the reagent blanks). Zn measurements were made with a Varian AA 20 spectrophotometer, with flame atomization and deuterium correction. The detection limit was 10 µg/L. The accuracy of the analytical procedures was monitored by analyses of standard reference materials together with the samples series (TORT-2: Lobster hepatopancreas – 26.7 ± 0.6 µg Cd/g and 180 ± 6 µg Zn/g - NRC-CNRC, Ottawa, Canada). Values were consistently within the certified ranges (data not shown).

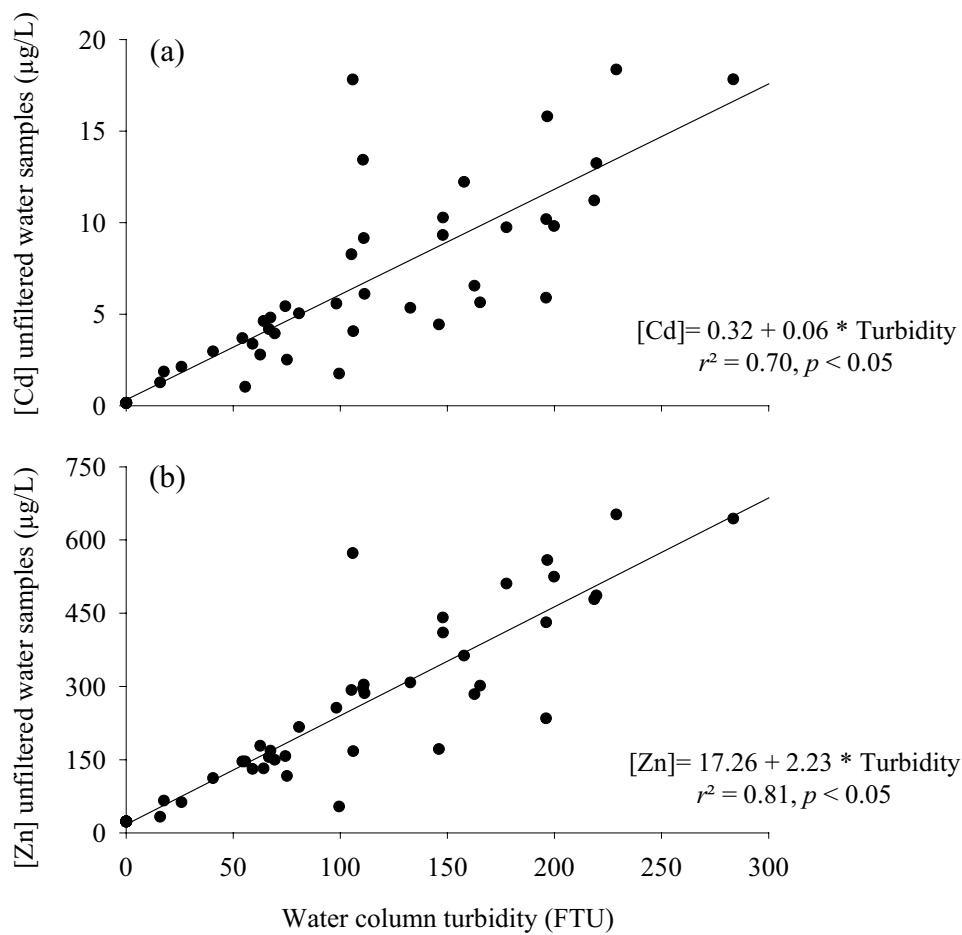
### ***Data treatment***

Statistical computations were performed with STATISTICA (Statistica 5.1 – Ed. 97 - StatSoft – Tulsa, USA), using one or two-way ANOVA followed by a post hoc test (Scheffé test and Least Significant Difference test (LSD)). The check of assumption (normality and homoscedasticity of the error term), based on analysis of residues, was done both graphically and using ad-hoc tests (Kolmogorov-Smirnov goodness of fit test and Levene test). Significance of the observed effects was assessed at the  $p < 0.05$  level.

## **Results**

Temperature was maintained at 24 ± 0.2 °C throughout the entire experiment. The continuous air bubbling in the superficial layers of the water column produced an oxygen-saturated environment (8.4 ± 0.3 mg/L). A significant difference in pH was observed in the microcosms with and without mayfly nymphs: at the end of the experiment, average values were 8.78 ± 0.01 and 8.72 ± 0.03 for [No] and [Cf] conditions respectively, and 7.98 ± 0.13 and 8.07 ± 0.09 for [Hr] and [Cf+Hr] conditions respectively.

Figure III.32 shows the turbidity data during the 21 days for the 4 experimental conditions studied. For the [No] and [Cf] conditions, water column turbidity was below the detection limit throughout the experiment: the presence of bivalves in the superficial sediment layers did not induced resuspension of sediment particles into the water column. In the presence of the burrowing nymphs ([Hr] condition), on the other hand, turbidity increased for the first 10 days, then stabilised between 200 and 250 FTU, or 150 and 190 mg/L of suspended particles (dw). When the bivalves were added with the burrowing mayflies ([Cf+Hr] condition), the turbidity averages were much less than for [Hr] condition, though



**Figure III.34.** Linear regressions between cadmium (Cd), (a), and zinc (Zn), (b), concentrations in the unfiltered water column samples and the corresponding water column turbidity for the two experimental conditions: [Hr], presence of *H. rigida* nymphs; [Cf+Hr], presence of *C. fluminea* and *H. rigida* simultaneously. FTU: formazine turbidity units.

	Experimental conditions			
	[No]	[Cf]	[Hr]	[Cf+Hr]
[Cd] <sub>d</sub> (µg/L)	0.23 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.07 ± 0.02	0.11 ± 0.02
[Cd] <sub>d</sub> / [Cd] <sub>t</sub> (%)	100.5 ± 19.8	77.7 ± 18.9	0.9 ± 0.2	2.6 ± 0.6

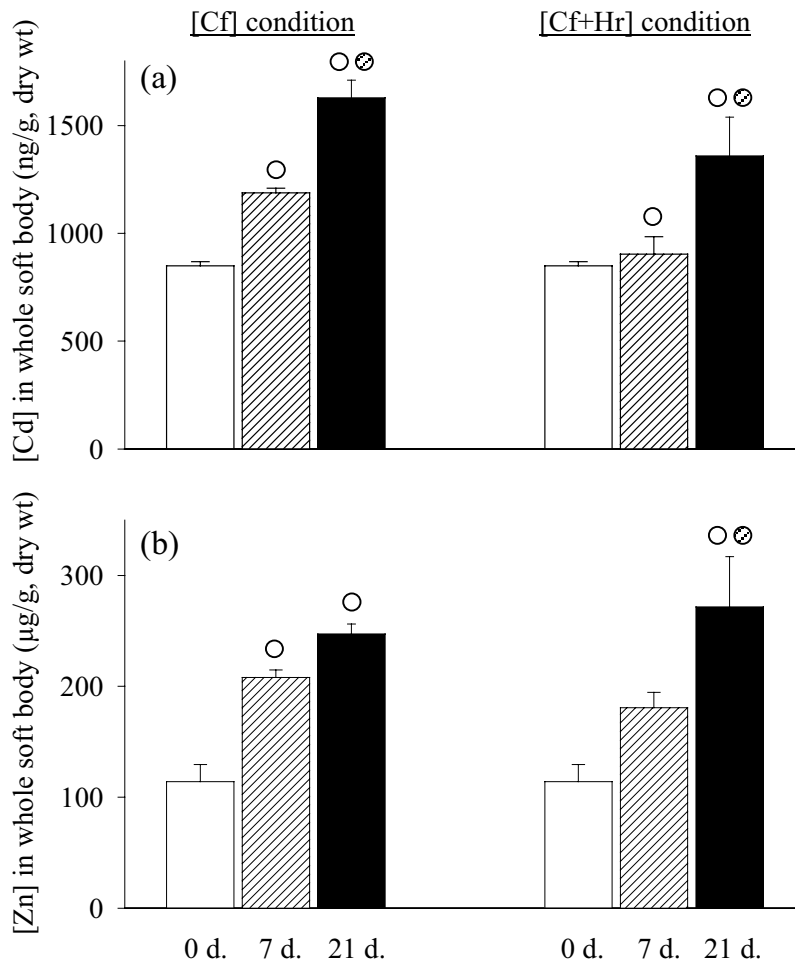
**Table III.13.** Average dissolved cadmium concentrations ([Cd]<sub>d</sub>) in the filtered water column samples (<0.45µm) collected after 2, 4, 7, 12, and 21 days for the 4 experimental conditions studied and the corresponding average ratios between dissolved cadmium and total cadmium concentrations ([Cd]<sub>t</sub>; Cd concentrations in the unfiltered water samples).

[No], no organism added to the "sediment/water" biotope; [Cf], presence of bivalves *C. fluminea*; [Hr], presence of *H. rigida* nymphs; [Cf+Hr], presence of *C. fluminea* and *H. rigida* simultaneously. Mean values ± standard deviation ( $n = 20$ ).

with a similar pattern overall; however, the plateau trend was observed after only 4 days, with an average turbidity of approximately 100 FTU, or about 45 % of the [Hr] condition. The data treatment based on a two-way ANOVA reveals that the "duration" and "experimental condition" variables had a significant effect; post hoc tests indicate significant differences between [Hr], [Cf+Hr] and [Cf]/[No] conditions. The marked decrease in turbidity observed after the 17<sup>th</sup> day for the [Cf+Hr] condition was linked to the emergence of a small number of *Hexagenia rigida* nymphs observed in some units (3 emergences/15 nymphs), as the bioturbation activity is closely linked to the number of nymphs.

The evolution of metal concentrations in the water column, measured on unfiltered water samples for the 4 experimental conditions studied, is shown in Figure III.33. For cadmium (Fig. III.33.a), average concentrations for the [No] and [Cf] conditions were very low, with no significant differences between the two conditions: many determinations were close to the detection limit (0.05 µg/L), the maximal values being observed after 7 days: [No],  $0.65 \pm 0.3$  µg/L and [Cf],  $0.8 \pm 0.4$  µg/L. In contrast, a marked increase in Cd concentrations was observed for the [Hr] condition, with a linear increase during the first 12 days, giving a maximal average value of  $16 \pm 1.4$  µg/L. For the [Cf+Hr] condition, a similar trend was observed but maximal values were significantly lower:  $8.9 \pm 1.8$  µg/L after 12 days, or 56 % of the maximal Cd concentration observed for the [Hr] condition. At the end of the experiment, Cd concentrations for the 2 conditions [Hr] and [Cd+Hr] were lower than those at 12 days, in relation with the turbidity decrease described before. For zinc (Fig. III.33.b), similar trends were observed in the unfiltered water samples, although with major differences in the level of the values measured, directly related to the initial contamination levels in the sediment ( $[Zn]/[Cd] = 43$ ): for the [No] and [Cf] conditions, low concentrations were measured in the water column, with no significant difference between the two conditions and the maximal value being observed after 4 days ([No],  $25.4 \pm 1.1$  µg/L and [Cf],  $26.9 \pm 0.6$  µg/L). For the [Hr] condition, maximal Zn concentration was observed after 12 days ( $537 \pm 62$  µg/L), with a plateau between 7 and 21 days. For the [Cf+Hr] condition, a similar trend was observed, but average values were markedly lower, close to 50 %. As can be seen in Figure III.34, there were significant positive linear regressions between turbidity and the corresponding Cd or Zn concentrations in the unfiltered water samples.

Metal determinations on filtered water samples (<0.45 µm) reveal low Cd concentrations for the 4 conditions studied. Table III.13 shows the average values measured in the dissolved phase during the 21 days' experiment and the ratios " $[Cd]_{\text{dissolved}}/[Cd]_{\text{total}}$ ". No significant differences were observed between the 5 sampling periods. For the two conditions without



**Figure III.35.** Cadmium, (a), and Zinc, (b), average concentrations at time zero (0 d., background level) and after 7 and 21 days' exposure in the whole soft body of *Corbicula fluminea* from the two experimental conditions: [Cf], presence of bivalves *C. fluminea*, and [Cf+Hr], presence of *C. fluminea* and *H. rigida* nymphs simultaneously. Mean values  $\pm$  standard deviations ( $n = 4$ ).

○ ⊗ Significant differences between the corresponding exposure duration ( $p < 0.05$ ).

bioturbation ([No] and [Cf]), Cd concentrations were  $0.23 \pm 0.02$  and  $0.15 \pm 0.03$   $\mu\text{g/L}$ , respectively; there was a majority of metal within the dissolved phase ([Cd]<sub>d</sub>/[Cd]: 100 % and 78 %, respectively). For the two conditions with bioturbation ([Hr] and [Cf+Hr]), average Cd concentrations in the dissolved phase were lower (0.07 and 0.11  $\mu\text{g/L}$ ) and represent only 0.9 and 2.6 % of the Cd concentrations measured in the unfiltered water samples. For Zn, the majority of the dosages were below the detection limit (10  $\mu\text{g/L}$ ).

Results of metal bioaccumulation in the soft body of *C. fluminea*, at time zero (background level, BL) and after 7 and 21 days, are shown in Figure III.35 for the two conditions [Cf] and [Cf+Hr]. As weight data showed no significant change in the mass of the batches of organisms as a function of time and of the two experimental conditions studied, only the "concentration" criterion is shown. For the [Cf] condition, Cd concentrations increased significantly after 7 and 21 days' exposure, maximal value being observed at the end of the experiment:  $1629 \pm 82$  ng/g, dw, or 1.9 times higher than the background level. For the [Cf+Hr] condition, Cd bioaccumulation was significantly lower, with the average concentration measured at the end of the experiment ( $1360 \pm 180$  ng/g, dw) being 1.6 times higher than the control value. For zinc (Fig. III.35.b), the effects of the "exposure duration" factor were fairly similar to those observed for Cd: maximal Zn bioaccumulation appeared after 21 days for the two conditions [Cf] and [Cf+Hr]:  $247 \pm 9$   $\mu\text{g/g}$ , dw (x 2.2/BL) and  $271 \pm 45$   $\mu\text{g/g}$ , dw (x 2.4/BL), respectively. The difference between these two average concentrations is not significant.

Although this study does not deal directly with the bioaccumulation of the two metals by *H. rigida*, Cd and Zn concentrations were measured on nymphs collected at the end of the experiment, after deduction of the estimated metal burdens in the gut sediment [24,25]. Average values were not statistically different between the two [Hr] and [Cf+Hr] conditions; they were  $15.6 \pm 0.4$  ng/g (dw) for Cd (x 3.6/BL) and  $717 \pm 12$   $\mu\text{g/g}$  (dw) for Zn (x 3.3/BL).

## Discussion

Results from this experimental approach to the effects of bioturbation on cadmium and zinc transfers from a natural contaminated sediment show that metal bioaccumulation in the soft bodies of the benthic bivalve *C. fluminea*, used as an indicator of metal bioavailability in the water column, was no different, and was even less, in the presence of burrowing nymphs, despite a marked increase in turbidity and also in Cd and Zn concentrations in the particulate phase of the water column.





When *H. rigida* nymphs were present ([Hr] condition), the increased turbidity in the water column was the result of a combination of two phenomena, which undergo simultaneously: firstly, the resuspension of sediment particles as a result of burrowing activity and, secondly, the sedimentation of these particles. Over the first ten days, turbidity increased, an indication of the high rate of bioturbation, higher than the redeposition rate. Next, the observed plateau trend represents a dynamic equilibrium between release and sedimentation. Several hypotheses can be put forward to account for this plateau trend, in particular a relationship between bioturbation activity and the size and number of galleries burrowed into the sediment compartment. Radioscopic studies [26] carried out in similar conditions to this experiment were able to reconstitute the networks of galleries (shape, length, diameter) and to estimate the average volume of sediment displaced by a single nymph and per unit of time: this was 0.9 cm<sup>3</sup>/h for a large nymph, corresponding to the highest of our weight classes defined for individual selection (54-73 mg, fw). In our experimental conditions and taking account of the differences in size of the individuals (weight classes), the 15 nymphs introduced into each unit should have turned over all the sediment in 8-10 days, which could then lead to a decrease in the resuspension of sediment particles in the water column.

Bioturbation leads to a significant release of cadmium and zinc, mainly in particulate form: only 0.9 % of the Cd transferred to the water column is in dissolved form. The concentration of dissolved zinc is less than the detection limit, which represents a maximum of 2 % of the Zn concentration measured in the unfiltered water samples. Could these transfers of metal from the sediment derive only from resuspension of sediment particles? Using metal concentrations measured in the sediment samples after the mechanical mixing stage, but before they were introduced into the microcosms, and water column turbidities, the theoretical concentrations of Cd and Zn transferred in the water column can be estimated from the suspended matter concentrations measured in each microcosm, considering that the metals came exclusively from the homogeneous sediment particles ([Cd]<sub>sediment</sub>: 45 ± 5 µg/g; [Zn]<sub>sediment</sub>: 1938 ± 56 µg/g). For the [Hr] condition, and after 21 days' exposure, these concentrations would be 7.7 µg/L for Cd and 333 µg/L for Zn. However, the concentrations measured on unfiltered water samples were 13.1 ± 1.7 µg/L and 510 ± 46 µg/L, respectively. The theoretical concentrations were therefore significantly lower than the concentrations measured for the two metals. Three hypotheses can be advanced to explain these differences: (i) a selective resuspension of the sediment particles as a result of the mechanical action of the *H. rigida* nymphs, metal concentrations in this fraction being higher than average for the sediment, according to the size and/or nature of the particles; (ii) sedimentation of the densest



particles, which would be less contaminated by Cd and Zn; (iii) an increase in metal diffusion from the sediment porewater, the molecular diffusion observed in the absence of bioturbation ([No] condition) being added to diffusion through *H. rigida* burrow walls, coupled with a very rapid metal complexation by the suspended particulate matter. In fact, in a reduced environment, the majority of Cd and Zn were in the form of insoluble complexes with acid-volatile sulfides (AVS) [27,28]. As a result of bioturbation, oxygen penetrates deep into the sediment, especially when *H. rigida* nymphs are present as they dig burrows where the bioirrigation activity created a permanent water flow for their breathing requirements [4]. In our experimental conditions, this sediment oxidation may play an important part in removing metals fixed on the AVS [12,29]. They can thus pass into the dissolved phase, diffuse across the sediment-water interface, and bind onto the suspended particles. Studies on a sediment of the same origin as that used in our experiment have shown that sediment particles transferred to the water column as a result of bioturbation by *H. rigida* were rich in clays, coated with iron and manganese oxy-hydroxides. These oxy-hydroxides represent efficient sites for cadmium and zinc complexation, thus emphasizing the proportion of metals present in the particulate fraction of the water column [30]. The significant drop in pH observed in the water column when *H. rigida* was present (pH=8.8 for [No] and pH=8.0 for [Hr]) can be attributed to the oxygenation of the sediment and an increase in the mineralization of detritic organic matter by bacteria, resulting in the production of carbon dioxide, which tends to bring down pH levels. However, this decrease in pH is not great enough to produce significant effects on the chemical speciation of Cd and Zn in the water column [31].

When the bivalves were present in the microcosms at the same time as the *H. rigida* nymphs ([Cf+Hr] condition), turbidity decreased by more than 50 % compared with the [Hr] condition. This large and significant decrease can be directly attributed to the filtration activity of *C. fluminea*. Indeed, this bivalve filters several hundreds of milliliters of water per individual and per day, in order to breathe and feed on micro-algae, bacteria and organic debris [32]. The different types of suspended particles in the water penetrate into the pallial cavity via the inhaling siphon and the gills act as a filter for the accessibility of nutrients to the labial palps and ingestion via the mouth. However, given the scale of this filtering activity, Cd and Zn concentrations measured in the soft bodies remain low, being identical to, or even lower than those measured in bivalves from the units with no bioturbation ([Cf] condition). In view of the high metal concentrations measured in the suspended particles (Cd: 80 µg/g and Zn: 2670 µg/g) and the fact that the digestive tract of the clams was not depurated before dosages, the amounts of metal bioaccumulated after 7 and 21 days should be higher. Several



arguments can be put forward to account for these results, in particular relating to the selection of particles for ingestion by *C. fluminea*. There is currently no consensus on the selection criterion for particles filtered in the gills of bivalves: according to different authors, size, density and the nature of the particles would seem to play a significant role to favour the ingestion of algae, bacteria and small organic debris (< 20 µm) as nutrients. Griscom *et al.* [33] show that the organic carbon content of a sediment generally has little effect on metal assimilation efficiency in bivalve species (clams and mussels). Similarly, results from Tessier *et al.* [34] after modelling Cd partitioning in oxic lake sediments, and Cd burdens in *Anodonta grandis*, suggest that complexation by organic matter does not influence Cd uptake by this freshwater bivalve. There are several indications in the literature that iron and manganese oxyhydroxides are important components for adsorbing Cd in freshwater oxic sediments [1,2,34]. So, in our experimental conditions, the ingestion of detritic organic matter would provide only a small amount of Cd *via* the trophic route for *C. fluminea*. The suspended matter that reach the inside of the pallial cavity, but which is not ingested, is coated with mucous and then ejected in the form of pseudo-faeces, via the inhaling siphon. These pseudo-faeces are small and very dense, and are deposited on the sediment surface; the metals they contain are therefore not bioaccumulated in the soft body of the bivalves, nor are they in the particulate fraction in suspension in the water column of the experimental units.

In our experimental conditions, it is possible to hypothesise that the decrease in turbidity in the water column when the bivalves are present results from an inhibition in the bioturbation activity of *H. rigida* nymphs, because of a purely mechanical disruption and/or a stress effect caused by the clams. This hypothesis is unlikely, however, given the large volume of sediment in the units and the small amount of space taken up by the three bivalves, which live buried in the superficial sediment layers and which represent about 3 % of the volume of the sediment compartment.

The simple presence of the three bivalves in the microcosms ([Cf] condition) does not lead to resuspension of sediment particles in the water column, as all turbidity readings taken during the 21 days of the experiment were lower than the detection limit (0.5 FTU) for the equipment used. Cd and Zn concentrations measured in the water column did not differ significantly from those of the reference condition ([No] condition). These results show that *C. fluminea* produces only a negligible amount of disturbance in the sediment compartment and to metal release processes, which corresponds with the habits of this bivalve: indeed, after quickly settling into the substrate using its foot, it did not move at all, either vertically or horizontally, but restricted its activity to opening its valves and filtering water. The decrease



in the concentration of dissolved cadmium observed between conditions [No] and [Cf] (Table 2) can be attributed in part to metal accumulation by the bivalves, as the average Cd burden accumulated in the 3 soft bodies was about 150 ng after 21 days (BL deducted). This burden, according to the volume of the water compartment, is in agreement with the decrease in Cd concentration in the dissolved fraction. With no bioturbation, the majority of metals are present in the dissolved fraction of the water column, the fraction traditionally considered to be the most bioavailable [1,34]. In our experimental conditions, bivalves from the [Cf] units accumulated as much zinc and significantly more cadmium than those from the condition with bioturbation [Cf+Hr], whereas metal concentrations in the water column were markedly higher when burrowing nymphs were present. Thus, only metals present in the dissolved fraction ( $<0.45 \mu\text{m}$ ) would appear to be able to reach the biological barriers that separate the bivalves' soft bodies from their surrounding environment. If we consider accumulation factors (AF: [Cd or Zn] in the clam soft bodies / [Cd or Zn] in water (unfiltered or filtered samples); unit of ml water/g, fw), which express the affinity of an aquatic animal for a metal in terms of the equivalent quantity of water holding the same quantity of metal [35], the comparison between the two experimental conditions is very revealing in this respect: for [Cf+Hr] condition, AF determined after 21 days (BL deducted) from the average Cd concentrations measured in unfiltered and filtered water samples are 21 and 754 respectively; for [Cf] condition, these ratios are respectively 444 and 847. Our results are in agreement with those obtained from an experimental approach to fish bioturbation of Cd-spiked sediment and metal bioaccumulation in *Daphnia magna*. Koi carps (*Cyprinus carpio*) convert contaminated sediment into a source of metal but remobilized Cd did not increase accumulation into *D. magna*. The absence of a significant increase in daphnid body burdens was attributed to an increase in suspended solid ligand concentrations and jointly to a lack of available free  $\text{Cd}^{2+}$  ion in the "with-fish" condition [36].

The key role played by these two metals present in the dissolved fraction of the water column is confirmed by results from a complementary experiment that we have carried out in similar conditions to those used for this study, with an uncontaminated sediment of the same type, taken from the same river upstream from the industrial discharge area, but "artificially" enriched with cadmium in the laboratory [37]. Under these conditions, the Cd concentration in the sediment porewater was markedly higher and, when the burrowing mayfly nymphs were present, bioturbation produced a significant increase in metal concentrations in the dissolved fraction of the water column (x 2). For the [Cf+Hr] condition, turbidity was still considerably less than in the [Hr] condition but the amounts of Cd that were bioaccumulated





in the soft body of the bivalves were significantly higher, with the increase in bioaccumulation being almost proportional to the difference between cadmium concentrations in the dissolved fraction between the two conditions ( $[Cf+Hr]>[Cf]$ ).

## Conclusion

This experimental study shows that the bioturbation of a sediment naturally contaminated by cadmium and zinc, when this bioturbation is generated by the burrowing activity of mayfly nymphs (*H. rigida*), produces a marked and significant metal release into the water column, but metal transfers are mainly in particulate form. Thus, from a strictly geochemical point of view, bioturbation represents an important process in respect of metal transfer capacities from contaminated sediments. On the other hand, the use of a benthic bivalve *C. fluminea* as an indicator of the bioavailability of transferred metals in the water column, shows that this bioavailability is very limited, and that even the quantities of Cd and Zn bioaccumulated in the soft body of these filtering organisms are less than those measured when there is no bioturbation. Under these experimental conditions, only the dissolved fraction resulting from diffusive metal fluxes across the sediment-water interface, is bioavailable. Complementary studies are currently under way to test different types of bioturbation, especially bioadvection caused by freshwater oligochaetes, for a comparative analysis of the bioturbation impacts on the fate of the metals within the sediment compartments and their bioavailability to benthic species.

*Acknowledgement* – The authors thank G. Durrieu for help in data treatment and P. Anshutz, M. Baudrimont and M. Gérino for comments on the manuscript. This work was carried out with the financial support of the GIS ECOBAG (MATE, AEAG, Aquitaine Region, CNRS/PEVS). A. Ciutat was supported by a grant from the French Ministry of Research and Education (MESR).



## References

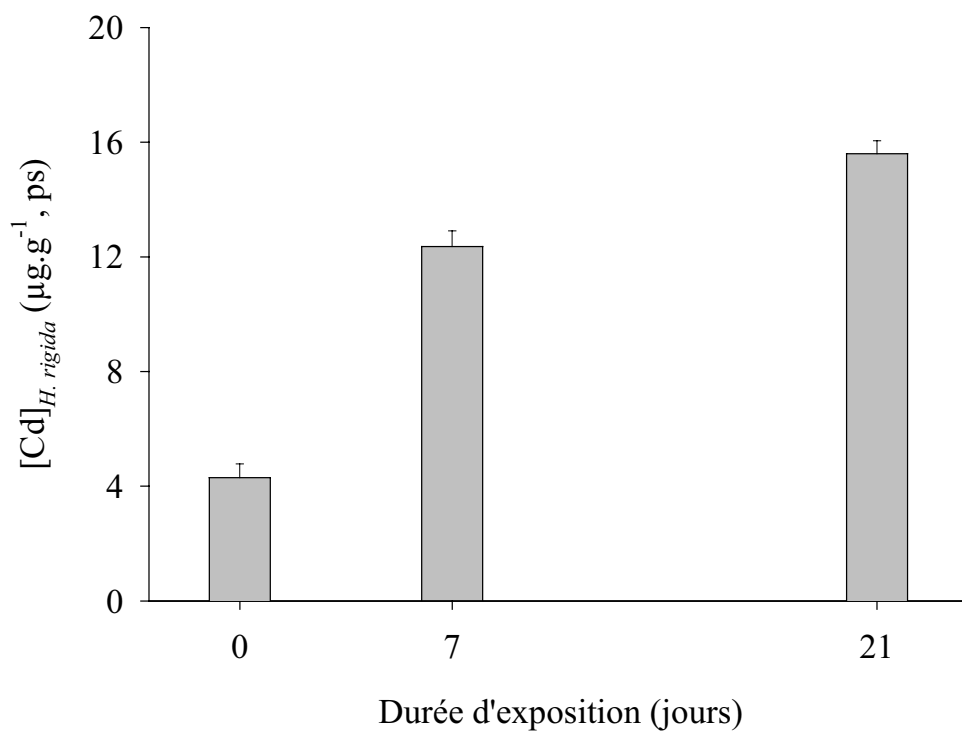
1. Luoma SN. 1989. Can we determine the biological availability of sediment-bound trace elements? *Hydrobiologia* 176/177:379-396.
2. Tessier A, Campbell PGC. 1988. Partitioning of trace metals in sediments. In Kramer R and Allen HE, eds, *Metal speciation: Theory, Analysis and Application*. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp183-199.
3. De Lacerda LD, Salomons W. 1998. *Mercury from gold and silver mining: a chemical time bomb?* Springer-Verlag, Berlin, Germany.
4. Wang F, Tessier A, Hare L. 2001. Oxygen measurements in the burrows of the freshwater insects. *Freshw Biol* 46:317-327.
5. Meadows PS, Tait J. 1989. Modification of sediment permeability and shear strength by two burrowing invertebrates. *Mar Biol* 101:75-82.
6. Sandnes J, Forbes T, Hansen R, Sandnes B, Rygg B. Bioturbation and irrigation in natural sediments, described by animal-community parameters. *Mar Ecol Prog Ser* 197:169-179.
7. Aller RC, Yingst JY. 1985. Effects of the marine deposit-feeders *Heteromastus filiformis* (Polychaeta), *Macoma balthica* (Bivalvia), and *Tellina texana* (Bivalvia) on averaged sedimentary solute transport, reaction rates, and microbial distributions. *J Mar Res* 43:615-645.
8. Matisoff G. 1995. Effects of bioturbation on solute and particle transport in sediments. In Allen, H.E., ed, *Metal contaminated aquatic sediments*, Ann Arbor Press, Chelsea, MI, USA, pp 201-272.
9. Matisoff G, Wang X. 1998. Solute transport in sediments by freshwater infaunal bioirrigators. *Limnol Oceanogr* 43:1487-1499.
10. Matisoff G, Wang X. 2000. Particle mixing by freshwater infaunal bioirrigators: midges (Chironomidae: Diptera) and mayflies (Ephemeroidea: Ephemeroptera). *J Gt Lakes Res* 26:174-182.
11. Soster FM, Harvey DT, Troksa MR, Grooms T. 1992. The effect of tubificid oligochaetes on the uptake of zinc by Lake Erie sediments. *Hydrobiologia* 248:249-258.
12. Peterson GS, Ankley GT, Leonard EN. 1996. Effect of bioturbation on metal-sulfide oxidation in surficial freshwater sediments. *Environ Toxicol Chem* 15:2147-2155.
13. Petersen K, Kristensen E, Bjerregaard P. 1998. Influence of bioturbating animals on flux of cadmium into estuarine sediment. *Mar Environ Res* 45:403-415.
14. Rasmussen AD, Banta GT, Andersen O. 2000. Cadmium dynamics in estuarine sediments: effects of salinity and lugworm bioturbation. *Environ Toxicol Chem* 19:380-386.
15. Park SS, Jaffé PR. 1996. Development of a sediment redox potential model for the assessment of a postdepositional metal mobility. *Ecol Model* 91:169-181.
16. Ciarelli S, Van Straalen NM, Klap VA, Van Wezel AP. 1999. Effects of sediment bioturbation by the estuarine amphipod *Corophium volutator* on fluoranthene resuspension and transfer into the mussel (*Mytilus edulis*). *Environ Toxicol Chem* 18:318-328.



17. Gunnarsson JS, Hollertz K, Rosenberg R. 1999. Effects on organic enrichment and burrowing activity of the polychaete *Nereis diversicolor* on the fate of tetrachlorobiphenyl in marine sediments. *Environ Toxicol Chem* 18:1149-1156.
18. Karickhoff SW, Morris KR. 1985. Impact of Tubificid oligochaetes on pollutant transport in bottom sediments. *Environ Sci Technol* 19:51-56.
19. Reible DD, Popov V, Valsaraj KT, Thibodeaux LJ, Lin F, Dikshit M, Todaro MA, Fleeger JW. 1996. Contaminant fluxes from sediment due to Tubificid oligochaete bioturbation. *Water Res* 30:704-714.
20. Villar C, Stripeikis J, D'Huicque L, Tudino M, Troccoli O, Bonetto C. 1999. Cd, Cu and Zn concentrations in sediments and the invasive bivalves *Limnoperna fortunei* and *Corbicula fluminea* at the Rio de la Plata basin, Argentina. *Hydrobiologia* 416:41-49.
21. Blanc G, Lapaquellerie Y, Maillet N, Anschutz P. 1999. A cadmium budget for the Lot-Garonne fluvial system (France). *Hydrobiologia* 410:331-341.
22. Inza B. 1996. Etude en écotoxicologie expérimentale de la bioaccumulation du cadmium et des dérivés du mercure par un mollusque filtreur d'eau douce (*Corbicula fluminea*). PhD thesis, n° 1630. University Bordeaux 1, Bordeaux, France.
23. Odin M, Ribeyre F, Boudou A. 1996. Temperature and pH effects on cadmium and methylmercury bioaccumulation by nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia rigida* from water column and sediment source. *Arch Environ Contam Toxicol* 31:339-349.
24. Hare L, Saouter E, Campbell PGC, Tessier A, Ribeyre F, Boudou A. 1991. Dynamics of cadmium, lead and zinc exchange between nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia rigida* (Ephemeroptera) and the environment. *Can J Fish Aquat Sci* 48: 39-47.
25. Hare L, Campbell PGC, Tessier A, Belzile N. 1989. Gut sediments in a burrowing mayfly (Ephemeroptera, *Hexagenia limbata*): their contribution to animal trace element burdens, their removal, and the efficacy of a correction for their presence. *Can J Fish Aquat Sci* 46:451-456.
26. Migeon S, Weber O, Faugeres JC, Saint-Paul J. 1999. SCOPIX: A new X-ray imaging system for core analysis. *Geo-Marine Letters* 18:251-255.
27. Hare L, Carignan R, Huerta-Diaz MA. 1994. A field study of metal toxicity and accumulation by benthic invertebrates; implications for the acid-volatile sulfide (AVS) model. *Limnol Oceanogr* 39:1653-1668.
28. Huerta-Diaz MA, Tessier A, Carignan R. 1998. Geochemistry of trace metals associated with reduced sulfur in freshwater sediments. *Appl Geochem* 13:213-233.
29. Di Toro DM, Mahony JD, Gonzalez AM. 1996. Particle oxidation model of synthetic FeS and sediment acid-volatile sulfide. *Environ Toxicol Chem* 15:2156-2167.
30. Andres S. 1997. Etude écotoxicologique des transferts de cadmium et de zinc entre la colonne d'eau et les sédiments du Lot (France) et les organismes aquatiques: approches *in situ* et expérimentale. PhD thesis, n° 2852. University of Toulouse III, Toulouse, France.
31. Schercher WD, McAvoy D. 1994. MINEQL<sup>+</sup>: a chemical equilibrium program for personal computers, Version 3.01. Environmental Research Software, Hallowell, ME, USA.
32. Tran D, Boudou A, Massabau JC. 2002. Relationship between feeding-induced ventilatory activity and bioaccumulation of dissolved and algal-bound cadmium in the asiatic clam *Corbicula fluminea*. *Environ Toxicol Chem* 21:327-333.



33. Griscom SB, Fisher NS, Luoma SN. 2000. Geochemical influences on assimilation of sediment-bound metals in clams and mussels. *Environ Sci Technol* 34:91-99.
34. Tessier A, Couillard Y, Campbell PGC, Auclair JC. 1993. Modeling Cd partitioning in oxic lake sediments and Cd concentrations in the freshwater bivalve *Anodonta grandis*. *Limnol Oceanogr* 38:1-17.
35. Barron MG, Stehly GR, Hayton WL. 1990. Pharmacokinetic modelling in aquatic animals. I. Models and concepts. *Aquat Toxicol* 18:61-86.
36. Wall SB, Isely JJ, La Point TW. 1996. Fish bioturbation of cadmium-contaminated sediments: factors affecting Cd availability to *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 15:294-298.
37. Ciutat A. 1999. Etude expérimentale des effets de la bioturbation sur le relargage des métaux intra-sédimentaires (cadmium-zinc) et leur bioaccumulation par un bivalve filtreur *Corbicula fluminea*. Rapport de DEA. Université Bordeaux 1, Bordeaux, France.



**Figure III.36.** Concentration en cadmium dans les larves d'*Hexagenia rigida*, après déduction de la teneur métallique dans le sédiment contenu dans le tractus digestif (teneur estimée). Moyennes  $\pm$  erreur-standards ( $n = 8$ ).



## **Complément à cette étude : bioaccumulation du cadmium dans les larves d'*Hexagenia rigida* à partir de la source sédiment**

Lors de cette expérience, les larves d'*H. rigida* ont été collectées dans les UEs aux temps 7 et 21 jours, afin de déterminer la bioaccumulation du cadmium à l'échelle de l'organisme entier. Comme nous l'avons souligné dans la Partie II, les individus n'ont pas été vidangés mais la teneur en Cd contenue dans le tractus digestif a été déduite à partir de l'estimation de la masse du sédiment (10 % de la biomasse totale, exprimée en poids sec) et de la concentration moyenne du métal dans ce compartiment. La Figure III.36 présente les concentrations moyennes du métal, avec à titre de comparaison le niveau de base en Cd mesuré au temps zéro. L'accumulation augmente significativement avec le temps, mais l'accroissement est nettement moins marqué au cours de la deuxième période d'exposition : 4,3  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (ps) au temps zéro ; 12,2  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (ps) au temps 7 j ; 15,7  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (ps) après 3 semaines. Le traitement des données (ANOVA et test LSD) met en évidence la significativité des différences entre ces trois concentrations. Cette tendance d'évolution de la bioaccumulation du Cd est étroitement dépendante de la croissance pondérale des larves au cours de l'expérience. En effet, l'augmentation des biomasses n'est pas significative après 7 jours ; par contre, elle est importante après 21 jours, proche de 50 % par rapport au poids moyen initial. De ce fait, un phénomène de dilution pondérale s'exerce sur les données de bioaccumulation. Le calcul des teneurs moyennes en Cd (concentration x poids) indique un accroissement quasi-linéaire de la bioaccumulation avec le temps : 0,16  $\mu\text{gCd}/\text{individu}$  au temps zéro ; 0,31  $\mu\text{gCd}$  au temps 7 j ; 0,5  $\mu\text{gCd}$  au temps 21 j.

Il est important de mentionner que la quantité de Cd accumulée dans les larves en fin d'expérience est négligeable par rapport à la teneur totale du métal présente initialement dans le compartiment sédiment : elle ne représente que 0,003 %. Nous reviendrons sur ces bilans de masse et sur la comparaison en fonction des modèles biologiques et de la source initiale de contamination, dans la Partie IV de ce mémoire "Synthèse générale et Perspectives".

	- sédiment	+ sédiment	
	- <i>C. fluminea</i>	- <i>C. fluminea</i>	+ <i>C. fluminea</i>
- tubificidés	{eau}	{Sdt}	{Cf}
+ tubificidés	-	{Tub}	{Cf+Tub}

**Tableau III.14.** Protocole de l'expérience relative à l'étude des transferts du cadmium à partir de la source "sédiment".

+ : présence / - : absence

### **III.C.2. TUBIFICIDES EN TANT QUE SOURCE DE BIOTURBATION : EFFETS SUR LES TRANSFERTS DES METAUX A PARTIR DE LA SOURCE "SEDIMENT" ET SUR LEUR BIODISPONIBILITE A L'EGARD DE BIVALVES BENTHIQUES (*CORBICULA FLUMINEA*)**

Après avoir étudié l'influence des larves d'*Hexagenia rigida* sur le relargage du cadmium entre un sédiment contaminé (sédiment de Cajarc) et la colonne d'eau et sur les processus de bioaccumulation par le bivalve benthique *Corbicula fluminea*, nous avons analysé, à titre comparatif, l'influence des vers oligochètes tubificidés sur les flux et la biodisponibilité des métaux présents dans ce sédiment. Nous avons été amené à réaliser plusieurs expériences complémentaires, afin de caractériser et quantifier les transferts du cadmium et ensuite ceux d'une dizaine d'éléments, la majorité d'entre eux provenant des apports d'origine industrielle au niveau du site de Vieille Montagne (cf Partie I.A.1).

#### **II.C.2.1. Impacts de la bioturbation sur les transferts du cadmium**

##### **III.C.2.1.1. Effets des tubificidés sur le relargage du cadmium présent dans le sédiment de Cajarc et sur sa bioaccumulation par le bivalve benthique *Corbicula fluminea***

Pour cette étude expérimentale, cinq conditions ont été mises en place ; elles sont présentées dans le Tableau III.14. Pour la condition {eau}, les UEs ont été remplies uniquement d'eau du réseau déchlorée, sans sédiment ni organismes, afin de mettre en évidence une éventuelle contamination de ces microcosmes témoins<sup>12</sup>. Pour les quatre autres conditions, un biotope mixte a été reconstitué : colonne d'eau et sédiment naturel contaminé, provenant de la retenue du barrage de Cajarc, sur la rivière Lot. Dans ce biotope mixte ont été ajoutés :

- aucun organisme - condition {Sdt} -, l'objectif de cette condition de référence étant de suivre les flux de cadmium du compartiment sédimentaire vers la colonne d'eau, en absence de bioturbation ;

---

<sup>12</sup> La mise en place de cette condition a été surtout justifiée par l'étude multi-élémentaire (Partie III.C.2.2), qui nécessitait de déterminer les niveaux des éléments dans la colonne d'eau des unités, l'eau du réseau pouvant représenter une source non négligeable pour certains d'entre eux (Cu par exemple).

Temps	Condition expérimentale				
	{eau}	{Sdt}	{Cf}	{Tub}	{Cf+Tub}
10 jours	-	2 UEs	2 UEs	3 UEs	3 UEs
20 jours	-	2 UEs	2 UEs	3 UEs	3 UEs
30 jours	5 UEs	2 UEs	3 UEs	3 UEs	3 UEs

**Tableau III.15.** Réplicats constitués pour chacun des temps et chacune des conditions expérimentales.

- quatre bivalves *C. fluminea* - condition {Cf} -, afin de quantifier la biodisponibilité du métal relargué dans la colonne d'eau des unités, à partir du sédiment et en absence de bioturbation ;
- des vers tubificidés - condition {Tub} -, afin de suivre les flux de Cd en présence de bioturbation ;
- 4 *C. fluminea* et des tubificidés - condition {Cf+Tub} -, la présence des deux espèces permettant d'analyser la bioaccumulation du métal dans les bivalves en présence de bioturbation.

## Matériels et méthodes

Les microcosmes utilisés dans cette expérience étaient des unités de "type I", dans lesquelles ont été introduits le sédiment de Cajarc (8 cm d'épaisseur, au lieu de 5 cm, compte-tenu de la procédure de carottage utilisée - caractéristiques géochimiques indiquées dans le Tableau II.3 ; pf/ps =  $1,87 \pm 0,03$  ; [Cd] =  $85,5 \pm 1,9 \mu\text{g.g}^{-1}$ , ps) et 2 L d'eau du réseau préalablement déchlorée. Le dispositif expérimental est similaire à celui indiqué sur la Figure II.13.A. Des ajouts réguliers d'eau ont été effectués afin de maintenir constant les volumes dans chacune des UEs et de compenser les pertes dues à l'évaporation et aux divers prélèvements. La température a été fixée à 20°C. Les conditions d'éclairage et la photopériode étaient naturelles. Un bullage d'air a été assuré en permanence dans chaque UE grâce à un diffuseur placé dans la zone supérieure de la colonne d'eau.

Quatre *C. fluminea* de  $22,5 \pm 0,1$  cm de longueur antéro-postérieure et provenant du lac de Cazaux-Sanguinet (Gironde, France) ont été introduits dans les UEs des conditions {Cf} et {Cf+Tub}. Les lots de tubificidés ont été confectionnés sur une base pondérale de  $1,5 \pm 0,03$  g, pf/UE, à partir d'importantes biomasses fournies par la Société GREBYL (Arry, France) ; ainsi, dans chaque UE des conditions {Tub} et {Cf+Tub}, une moyenne de 780 vers a été introduits au temps zéro, correspondant à une densité de  $54\ 000$  individus.m<sup>-2</sup>.

Cette expérience a duré 30 jours, avec quatre temps d'échantillonnage : 0, 10, 20 et 30 jours. Le nombre de répétitions pour chacun des temps d'échantillonnage et chacune des conditions expérimentales est présenté sur le Tableau III.15. Au total, 36 UEs ont été mises en place simultanément. Aux temps 10, 20 et 30 jours, les UEs des quatre conditions {Sdt}, {Cf}, {Tub} et {Cf+Tub} ont été détruites, afin de prélever les organismes et/ou d'effectuer un carottage dans le compartiment sédimentaire (conditions {Sdt} et {Tub}).



Pendant toute la durée de l'expérience, la température, le pH, la concentration en oxygène dissous et la turbidité ont été mesurés régulièrement, dans la colonne d'eau des 11 UEs des conditions {Sdt}, {Cf}, {Tub} et {Cf+Tub} correspondant au dernier temps d'échantillonnage (30 jours). Un suivi des concentrations du Cd total (échantillons non filtrés) a été effectué trois fois par semaine, dans ces mêmes 11 UEs, ainsi que dans une unité de la condition {eau}. Pour cela, 10 mL ont été prélevés et directement acidifiés avec 1 mL d'acide nitrique (65 % HNO<sub>3</sub> - Merck, Darmstadt, Allemagne), puis analysés afin de déterminer la concentration en Cd. Trois fois par semaine, dans une UE de chacune des cinq conditions expérimentales, 10 mL supplémentaires ont été collectés, filtrés à 0,2 µm (Filtres seringue – Membrane SFCA – Nalgen Nunc International Corporation, New York, USA) et acidifiés avec 1 mL d'acide nitrique (65 % HNO<sub>3</sub>), afin de mesurer les concentrations en Cd dissous. Tous les échantillons ont été stockés en chambre froide à 4°C, pendant 48 h au maximum, avant d'être analysés.

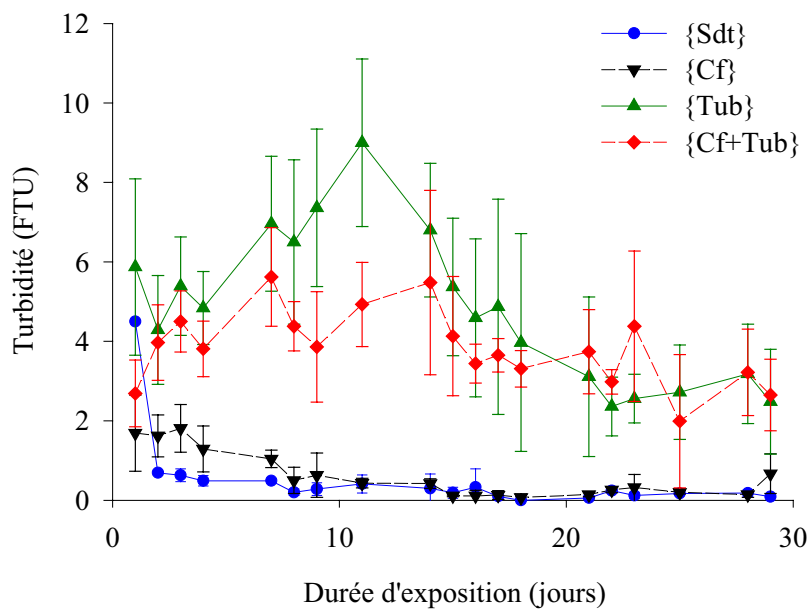
Pour les trois temps d'échantillonnage des organismes et du sédiment (10, 20 et 30 j), les colonnes d'eau des UEs correspondantes ont été prélevées à l'aide de grosses seringues et filtrées à l'aide d'une pompe à vide à travers des filtres en téflon de 0,2 µm. Deux tubes de 10 mL d'eau filtrée ont été acidifiés avec 4 gouttes d'acide nitrique (65 % HNO<sub>3</sub>), puis stockés à 4 °C. Ces filtrats ainsi que les filtres correspondants ont été analysés en ICP-MS par l'équipe de G. Blanc (DGO – cf Partie II.B.2.2). Le cadmium a été dosé parallèlement avec les équipements analytiques du LEESA, afin de comparer les valeurs des concentrations (intercalibration entre deux procédures différentes de dosage pour le même élément)<sup>13</sup>.

Après avoir retiré l'eau des UEs, les bivalves ont été prélevés délicatement, rincés à l'eau courante et congelés entiers à - 20°C. Avant l'analyse du Cd, le corps mou a été séparé de la coquille puis pesé (pf). Les échantillons ont ensuite été digérés à l'acide nitrique puis dosés ; comme pour les échantillons d'eau filtrée et de MES, des dosages du Cd ont été effectués par les deux laboratoires.

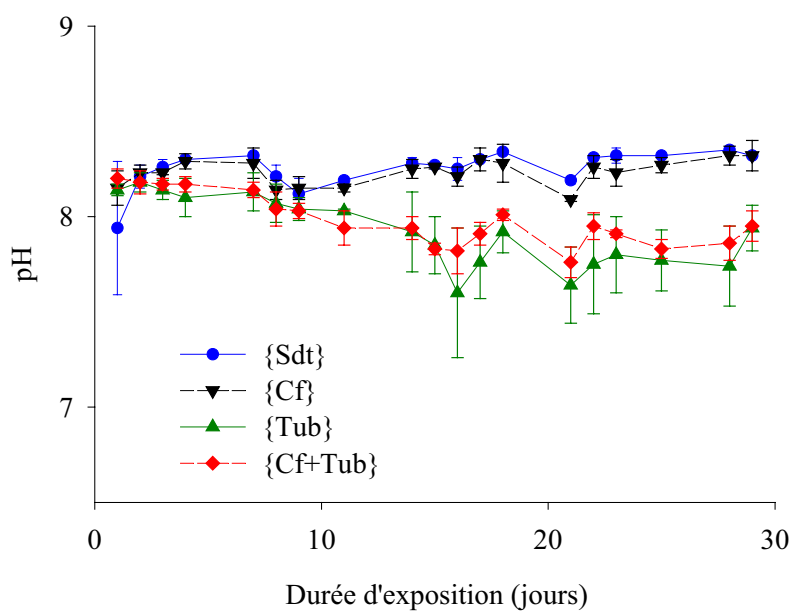
Des carottes de sédiment ont été prélevées dans les UEs des conditions {Sdt} et {Tub}. Ces carottes ont été découpées en 6 tranches : 0-1 cm, 1-2 cm, 2-3 cm, 3-5 cm, 5-7 cm et 5-8 cm. Chacune des tranches a subi une centrifugation pour isoler l'eau interstitielle des particules (cf Partie II.B.1.2). Le Cd a ensuite été dosé dans les particules et dans l'eau interstitielle après filtration à 0,2 µm.

---

<sup>13</sup> L'ICP-MS a également permis d'analyser les concentrations sous forme dissoute et particulaire d'une dizaine d'éléments (résultats présentés dans la Partie III.C.2.2).



**Figure III.37.** Evolution de la turbidité en fonction du temps, pour les quatre conditions expérimentales étudiées : {Sdt}, colonne d'eau et sédiment sans organisme ; {Cf}, présence de *C. fluminea* ; {Tub}, présence de tubificidés ; {Cf+Tub}, présence simultanée de *C. fluminea* et de tubificidés. Moyennes  $\pm$  écart-types (N = 3).



**Figure III.38.** Evolution du pH en fonction du temps, pour les quatre conditions expérimentales étudiées : {Sdt}, colonne d'eau et sédiment sans organisme ; {Cf}, présence de *C. fluminea* ; {Tub}, présence de tubificidés ; {Cf+Tub}, présence simultanée de *C. fluminea* et de tubificidés. Moyennes  $\pm$  écart-types (N = 3).



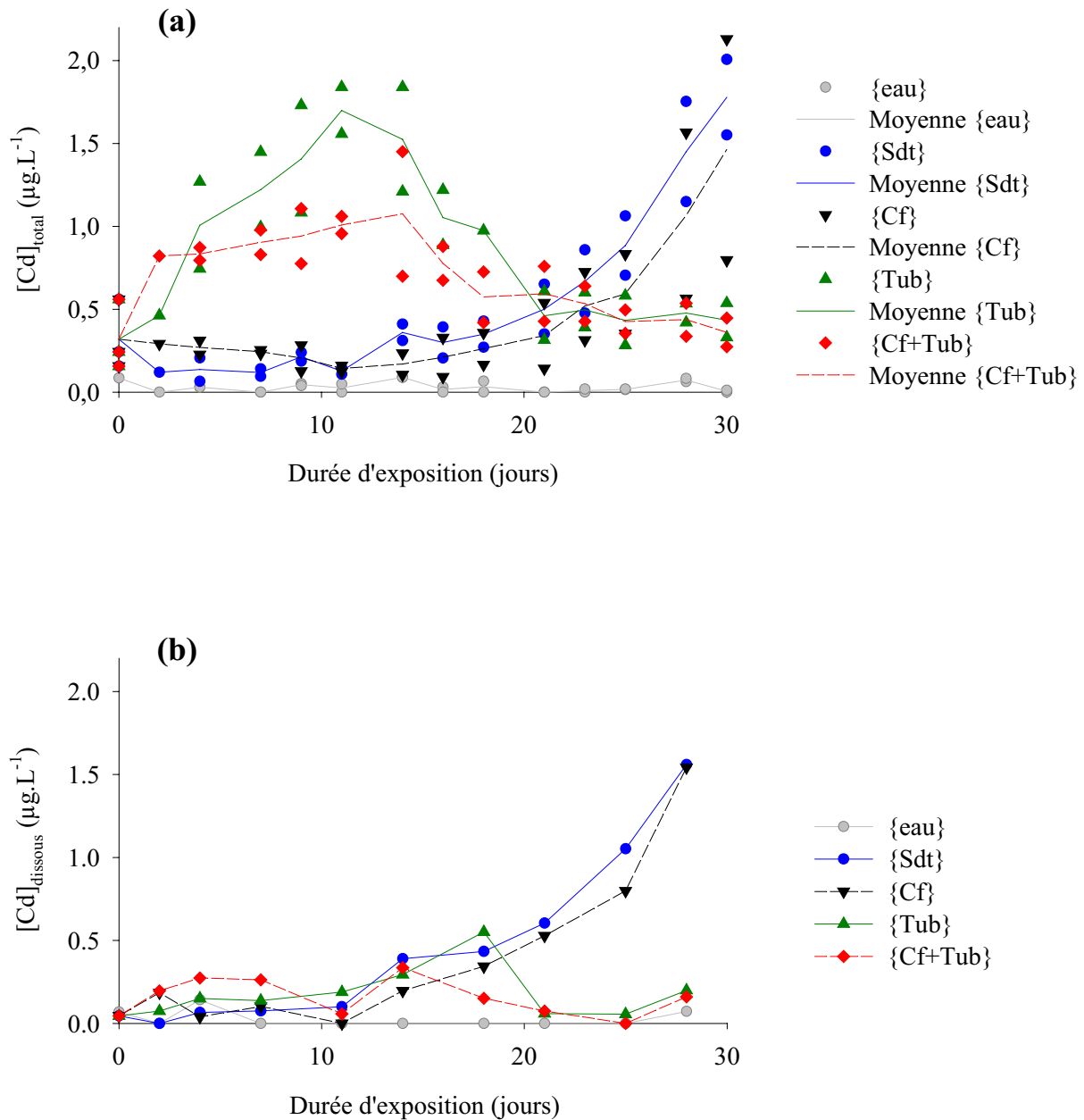
Enfin, le sédiment des UEs des conditions {Tub} et {Cf+Tub} a été délicatement tamisé sous un courant d'eau afin de récupérer les oligochètes. La moitié des lots de vers collectés a été pesée (pf), séchée 72h à 60 °C et repesée (ps), puis digérée à l'acide nitrique et dosée pour déterminer les concentrations du Cd (pas de vidange du tractus digestif). L'autre moitié a été introduite dans des UEs renfermant du sédiment de Garonne (cf Tableau II.2), dont la concentration en Cd est très faible, afin de "vidanger" le contenu de leur intestin. Au bout de 48 h, période suffisamment longue pour assurer le remplacement de la totalité du sédiment contaminé dans le tractus, ils ont été prélevés et ont subi la même préparation que précédemment.

## Résultats et discussion

### *Suivi des paramètres physico-chimiques dans la colonne d'eau*

Aucune différence significative entre les concentrations en oxygène dissous n'a été détectée entre les conditions expérimentales étudiées. Après 30 jours, le pourcentage de saturation, déterminé à partir de l'ensemble des valeurs mesurées, était de  $65,6 \pm 0,8$  %.

La Figure III.37 illustre l'évolution de la turbidité moyenne de la colonne d'eau pour les quatre conditions renfermant le biotope mixte "colonne d'eau/sédiment". En absence de bioturbation (conditions {Sdt} et {Cf}), les valeurs mesurées sont très faibles dès le deuxième point d'échantillonnage. Comme nous l'avons souligné à plusieurs reprises, la mise en place du biotope mixte dans les unités et l'introduction des bivalves se traduisent par une très légère remise en suspension des particules. Les valeurs moyennes déterminées à partir de l'ensemble des mesures réalisées au cours des 30 jours de l'expérience sont de  $0,5 \pm 0,2$  FTU pour la condition {Sdt} et  $0,6 \pm 0,1$  FTU pour la condition {Cf} (différence non significative). La turbidité des deux conditions en présence de vers - {Tub} et {Cf+Tub} - augmente jusqu'à 11 jours, où elle atteint la valeur moyenne de  $9,0 \pm 2,1$  FTU pour la condition {Tub} et de  $4,9 \pm 1,1$  FTU pour la condition {Cf+Tub}. Elle diminue ensuite jusqu'à la fin de l'expérience :  $2,5 \pm 1,3$  FTU et  $2,6 \pm 0,9$  FTU au temps 29 jours, respectivement. L'analyse de variance (ANOVA à deux facteurs) indique un effet significatif des facteurs "temps" et "condition expérimentale", les deux conditions "avec vers" étant significativement différentes entre elles et avec les deux conditions "sans vers". Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors des expériences précédentes : absence de bioturbation et de remise en suspension des particules sous l'action des bivalves ; accroissement significatif de la turbidité en présence des tubificidés, pendant les 12 premiers jours, avec ensuite une diminution progressive ;



**Figure III.39.** Concentrations en cadmium dans la colonne d'eau sous forme totale (Cd total : échantillons non filtrés) (a), et dissoute (Cd dissous : filtration à  $0,2 \mu m$ ) (b), en fonction du temps et de la condition expérimentale : {eau}, colonne d'eau sans sédiment ; {Sdt}, colonne d'eau et sédiment sans organisme ; {Cf}, présence de *C. fluminea* ; {Tub}, présence de tubificidés ; {Cf+Tub}, présence simultanée de *C. fluminea* et de tubificidés. Moyennes  $\pm$  écart-types (N = 3).

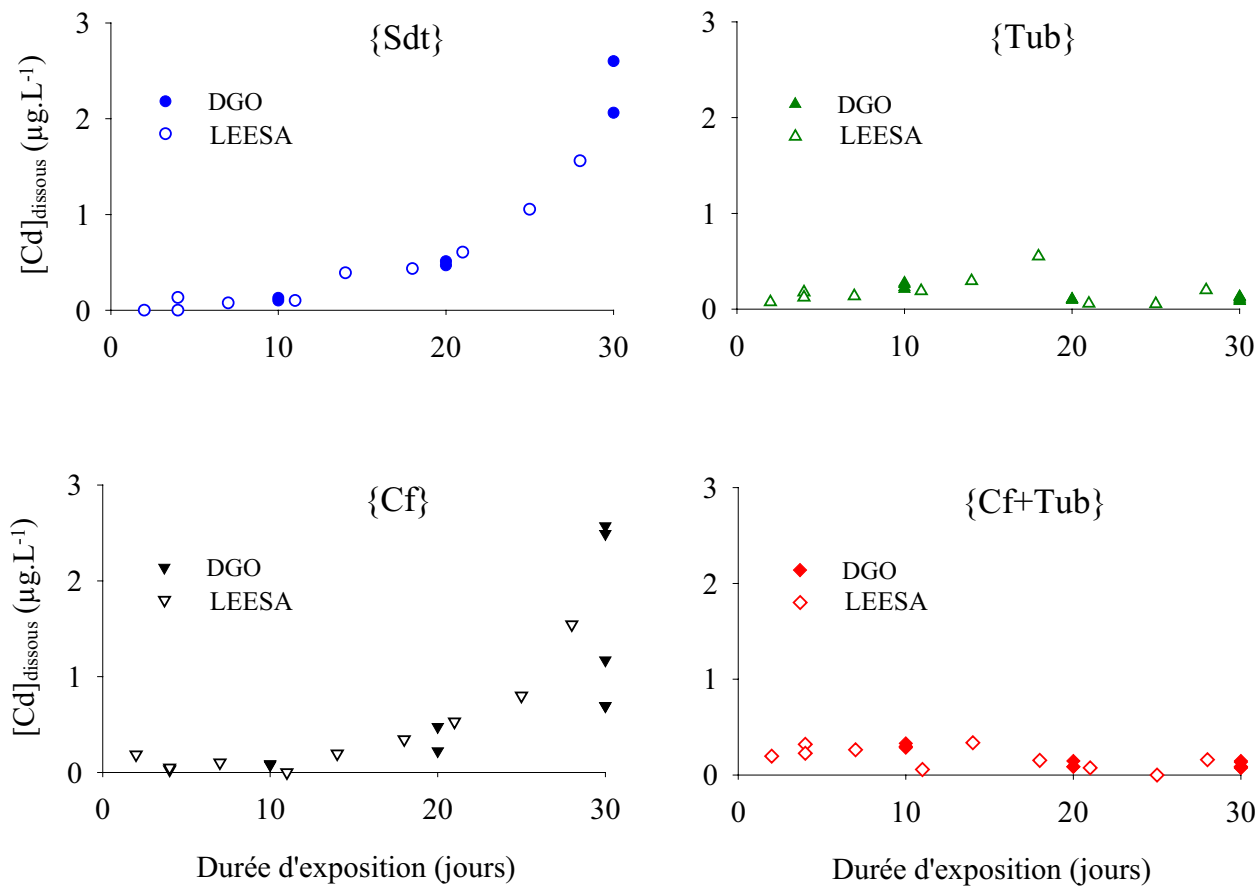
différence significative dans les UEs renfermant les vers, lorsque les bivalves sont introduits simultanément. Une nouvelle fois, cette différence peut être attribuée à l'activité de filtration de *C. fluminea*.

Les résultats des mesures de pH sont présentés sur la Figure III.38. Jusqu'au 11<sup>ème</sup> jour, le pH n'est pas significativement différent entre les quatre conditions expérimentales ; au-delà et jusqu'à la fin de l'expérience, les UEs se répartissent en deux groupes : (i) le pH des conditions ne renfermant pas de tubificidés ( $\{Sdt\}$  et  $\{Cf\}$ ) est significativement supérieur à celui des UEs renfermant des vers (conditions  $\{Tub\}$  et  $\{Cf+Tub\}$ ). A la fin de l'expérience (28 jours), les pH moyens mesurés sont de  $8,35 \pm 0,01$  pour la condition  $\{Sdt\}$ ,  $8,32 \pm 0,05$  pour  $\{Cf\}$ ,  $7,74 \pm 0,21$  pour  $\{Tub\}$  et  $7,86 \pm 0,09$  pour  $\{Cf+Tub\}$ . Ces résultats traduisent une légère diminution du pH de la colonne d'eau directement ou indirectement liée à la bioturbation par les tubificidés. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées, notamment une production accrue de gaz carbonique par les bactéries assurant la biodégradation de la matière organique et/ou par la respiration des vers. L'absence de différence significative entre les conditions  $\{Sdt\}$  et  $\{Cf\}$  montre que, dans nos conditions expérimentales, les bivalves n'ont pas d'impact sur le pH de la colonne d'eau.

#### ***Relargage du cadmium de la source sédiment vers la colonne d'eau***

La Figure III.39 présente l'évolution des concentrations en cadmium dans la colonne d'eau des UEs correspondant aux cinq conditions expérimentales étudiées : (a), Cd total (échantillons d'eau non filtrés) ; (b), Cd dissous (échantillons filtrés à  $0,2 \mu m$ ). Pour la condition  $\{eau\}$ , les concentrations en Cd total et en Cd dissous ont été systématiquement inférieures à la limite de détection de la procédure analytique adoptée ( $LD = 0,1 \mu g.L^{-1}$ ), pendant les 30 jours de l'expérience. Les deux conditions  $\{Sdt\}$  et  $\{Cf\}$  présentent une évolution similaire des concentrations en Cd total et en Cd dissous : entre les temps zéro et 11 jours, les concentrations se maintiennent à des valeurs faibles, inférieures à  $0,2 \mu g.L^{-1}$  pour la condition  $\{Sdt\}$  et à  $0,3 \mu g.L^{-1}$  pour la condition  $\{Cf\}$  ; au delà, les concentrations augmentent régulièrement jusqu'à la fin de l'expérience où elles atteignent  $1,8 \mu g.L^{-1}$  en Cd total et  $1,6 \mu g.L^{-1}$  en Cd dissous pour la condition  $\{Sdt\}$  et  $1,5 \mu g.L^{-1}$  pour la condition  $\{Cf\}$ . Ces deux conditions ne sont pas significativement différentes entre elles, mais elles sont significativement différentes des deux conditions  $\{Tub\}$  et  $\{Cf+Tub\}$ .

En présence des vers, les concentrations en Cd dissous et en Cd total suivent des évolutions dissemblables. Le Cd dissous se maintient à des valeurs faibles pendant toute



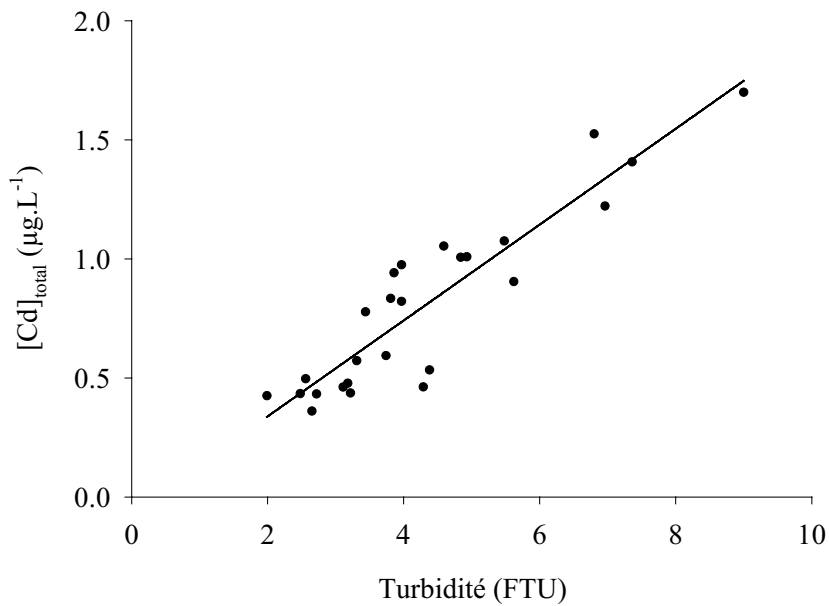
**Figure III.40.** Concentrations en cadmium dissous (filtration à  $0,2 \mu m$ ) dans la colonne d'eau en fonction du temps et du laboratoire d'analyse (DGO : Département de Géologie et Océanographie ; LEESA : Laboratoire d'Ecophysiologie et Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques), pour quatre conditions expérimentales : {Sdt}, colonne d'eau et sédiment sans organisme ; {Cf}, présence de *C. fluminea* ; {Tub}, présence de tubificidés ; {Cf+Tub}, présence simultanée de *C. fluminea* et de tubificidés.

l'expérience : inférieures à  $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour la condition {Tub} et à  $0,4 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour la condition {Cf+Tub}. Le Cd total présente une évolution différente : la concentration augmente pour la condition {Tub} jusqu'à  $1,7 \mu\text{g.L}^{-1}$  à 11 jours, puis elle diminue avec une tendance en plateau proche de  $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  à partir de 21 jours ; en présence des bivalves, la concentration en Cd total augmente aussi au début de l'expérience mais cette augmentation est plus limitée, la valeur moyenne maximale atteignant  $1,1 \mu\text{g.L}^{-1}$  au temps 14 jours ; ensuite, la concentration diminue jusqu'à un plateau proche de  $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ , entre 21 et 30 jours.

Les graphes présentés sur la Figure III.40 montrent que, pour les quatre conditions expérimentales étudiées, il existe une très bonne adéquation entre les concentrations en Cd dissous mesurées après filtration en utilisant les deux procédures de dosage mentionnées précédemment : spectrophotométrie d'absorption atomique (LEESA) et ICP-MS (DGO). Comme les analyses effectuées au LEESA concernent les concentrations en Cd total (échantillons non filtrés) alors que celles réalisées par ICP-MS ont été effectuées sur les fractions particulières (filtres), nous n'avons pas pu comparer directement les résultats à ce niveau. Néanmoins, les concentrations en Cd particulaire mesurées par le DGO sont en adéquation avec les concentrations en Cd total auxquelles ont été soustraites les concentrations en Cd dissous.

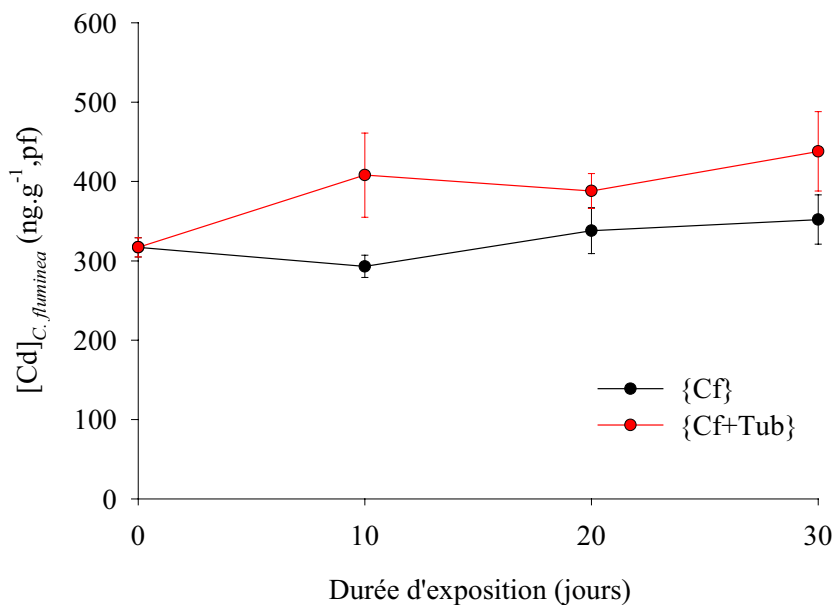
Le suivi du métal dans les fractions particulaire et dissoute des UEs de la condition {eau} a montré que les concentrations restaient systématiquement inférieures à la limite de détection. Ce résultat montre que, pendant toute l'expérience, il n'y a pas eu de contamination de la colonne d'eau, lors de la mesure des paramètres abiotiques, des prélèvements d'eau ou de la destruction des UEs pour l'échantillonnage.

Le Cd mesuré dans la colonne d'eau des quatre autres conditions provient donc du transfert depuis le réservoir sédimentaire. Dans la condition sans organisme {Sdt}, les concentrations croissantes en Cd total et en Cd dissous résultent du relargage du métal, par diffusion simple entre l'eau interstitielle et la colonne d'eau. L'augmentation des concentrations est lente et progressive, eu égard au volume d'eau et à la dilution qu'il génère, mais elle conduit à des concentrations maximales de  $1,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ , quasi-exclusivement sous forme dissoute (à 30 jours, 100 % du métal est du Cd dissous). L'évolution des concentrations en Cd total et en Cd dissous de la condition {Cf} sont identiques, avec là-aussi 100 % du métal sous forme dissoute à 30 jours. A la fin de l'expérience, les concentrations mesurées sont un peu inférieures à celles de la condition "sans organisme", mais cette différence n'est pas significative. Ceci montre que, dans cette condition également, le transfert du Cd depuis le sédiment se fait par diffusion simple ; l'impact du bivalve sur les concentrations métalliques



**Figure III.41.** Corrélation entre la turbidité et la concentration en Cd total (échantillons d'eau non filtrés) mesurées dans les UEs renfermant des tubificidés (conditions {Tub}, présence de tubificidés, et {Cf+Tub}, présence simultanée de *C. fluminea* et de tubificidés).

Modèle :  $[Cd]_{total} = -0,064 + 0,201 \times \text{Turbidité}$  ;  $R^2 = 0,84$ .



**Figure III.42.** Concentrations en cadmium dans les corps mous du bivalve *Corbicula fluminea* en fonction du temps et de la condition expérimentale : {Cf}, présence de *C. fluminea* ; {Cf+Tub}, présence simultanée de *C. fluminea* et de tubificidés. Moyennes  $\pm$  erreur-standards (N = 6).

dans l'eau est faible ou inexistant. Ce résultat est en accord avec les données de turbidité, qui avaient montré une absence de remise en suspension des particules sédimentaires en présence de *C. fluminea*. Il confirme également les données acquises lors des études précédentes, notamment celles réalisées avec les larves d'*H. rigida* en tant que source de bioturbation (cf Partie III.C.1).

L'évolution des concentrations en Cd dans les UEs renfermant les tubificidés est tout à fait différente. La Figure III.41 montre une corrélation positive et significative ( $R^2 = 0,84$ ) entre la turbidité et les concentrations en Cd total mesurées dans la colonne d'eau des UEs {Tub} et {Cf+Tub}. Lorsque les vers sont présents, le Cd total est majoritairement sous forme particulaire. Ceci est confirmé par la Figure III.39.b, qui montre que les concentrations en Cd dissous restent faibles dans les deux conditions avec les vers. En remettant en suspension des particules sédimentaires dans la colonne d'eau, les vers relarguent conjointement du Cd adsorbé : ce processus est toutefois nettement moins marqué, en terme de bilan de masse, que les résultats obtenus avec les larves d'*H. rigida*, pour le même sédiment provenant de la retenue de Cajarc (cf Partie III.C.1). Comme dans les conditions {Sdt} et {Cf}, il doit exister aussi dans les UEs avec bioturbation un phénomène de diffusion passive du Cd sous forme dissoute mais, une fois dans la colonne d'eau, le métal peut rapidement se complexer avec les MES, passant ainsi dans la fraction particulaire. En présence de *C. fluminea* - condition {Cf+Tub} -, la turbidité et les concentrations en Cd total sont plus faibles. Comme pour les écarts de turbidité observés précédemment, cette différence est attribuable à l'activité de filtration des bivalves.

### ***Bioaccumulation du cadmium par Corbicula fluminea***

Les cinétiques de bioaccumulation du Cd dans le corps mou de *C. fluminea* sont présentées sur la Figure III.42, pour les deux conditions expérimentales {Cf} et {Cf+Tub}. Globalement, les concentrations mesurées après 10, 20 et 30 jours sont très proches du niveau de base caractérisant le temps zéro : ainsi, une nouvelle fois, la bioaccumulation du Cd dans les bivalves est extrêmement limitée, malgré des transferts significatifs du métal entre le sédiment et la colonne d'eau, notamment en présence de bioturbation. L'analyse statistique des données (ANOVA à 2 facteurs) met en évidence un effet significatif du facteur "condition expérimentale" et une absence d'effet pour le facteur "temps". Il n'y a donc pas d'évolution significative des concentrations dans les bivalves avec le temps d'exposition, et ce malgré une très légère et significative influence de la bioturbation, qui se traduit par des valeurs

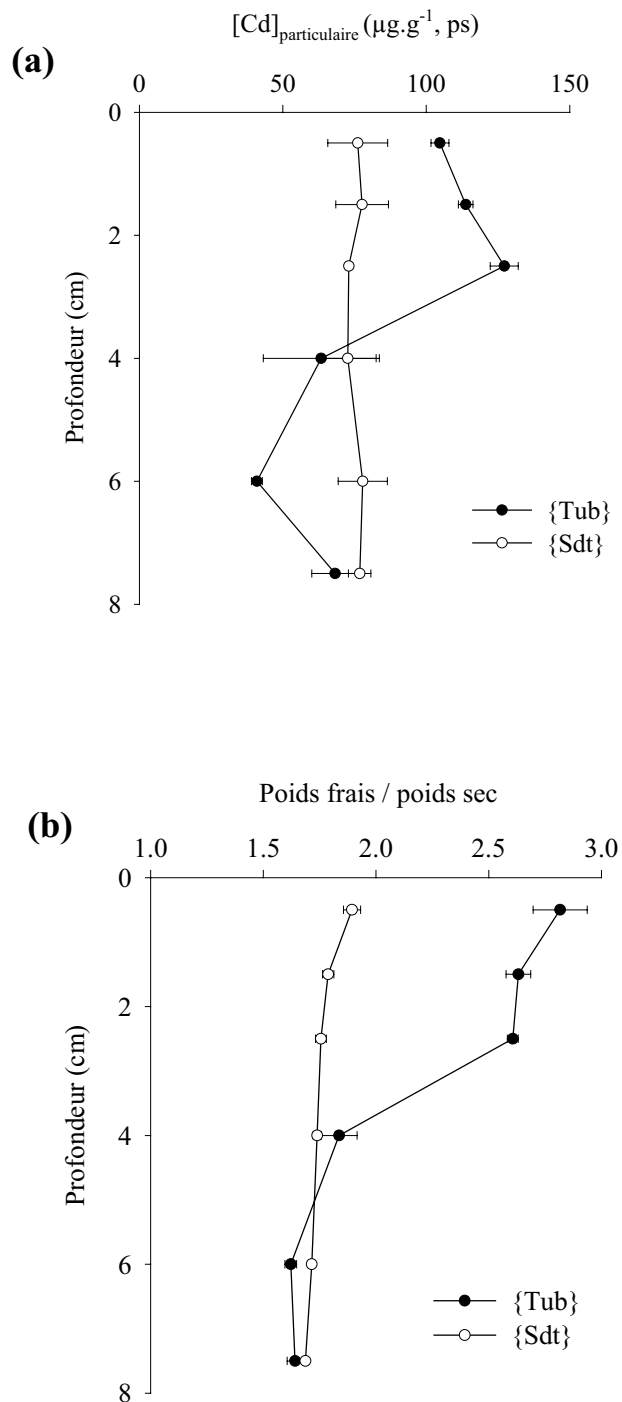




moyennes supérieures pour les 3 temps d'échantillonnage. Compte-tenu des résultats que nous avons acquis précédemment avec le deuxième modèle de bioturbation, les larves d'*H. rigida* (cf Partie III.C.1), il est possible d'appliquer les mêmes analyses interprétatives, basées sur la non-biodisponibilité du Cd présent sous forme particulaire dans la colonne d'eau. Toutefois, les cinétiques d'évolution du Cd dissous, plus précisément l'augmentation nette des concentrations entre 20 et 30 jours, en absence de bioturbation (Figure III.39.b), auraient dû conduire à un accroissement de la bioaccumulation du métal dans les corps mous en fin d'expérience. Rappelons que les concentrations du Cd dissous passent de  $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  au temps 21 jours à  $1,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  en fin d'expérience, alors que celles correspondant à la condition {Cf+Tub} sont inférieures à  $0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Dans nos conditions expérimentales, les bivalves de la condition {Cf} n'accumulent pas de Cd pendant cette période, les valeurs moyennes mesurées étant légèrement supérieures en présence des tubificidés. Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ce résultat :

(i) le Cd dissous a été mesuré après filtration des échantillons d'eau à  $0,2 \mu\text{m}$  ; cette fraction doit nécessairement contenir des formes colloïdales, eu égard à l'origine et à la nature du sédiment utilisé, capables de fixer le Cd, et qui ne seraient pas biodisponibles pour les bivalves (accessibilité et/ou traversée des barrières biologiques, notamment l'épithélium branchial) ;

(ii) les bivalves de la condition {Cf} diminueraient leur activité de filtration au cours de la deuxième phase de l'expérience, en relation avec l'absence d'apports trophiques dans les UEs. Cette diminution, qui se traduirait par des temps de fermeture des valves plus importants et donc par des échanges plus limités avec le milieu environnant, ne permettrait pas d'accumuler significativement le Cd présent dans la colonne d'eau sous forme dissoute entre les temps 20 et 30 jours. Cette deuxième hypothèse s'appuie sur des travaux récents menés au LEESA, en utilisant la technique de valvométrie et en prenant en compte les quantités de nutriments disponibles pour les bivalves, sous forme d'algues phytoplanctoniques apportées dans la colonne d'eau [Tran, 2001]. Une eau non enrichie en algues tend à stimuler la ventilation pendant les premiers jours, comportement qui peut être associé à une recherche active de nourriture par une amplification des échanges avec le milieu environnant ; ensuite, le bivalve diminue son activité ventilatoire, avec de longues périodes de fermeture interrompues par de courtes périodes d'ouverture des valves et de filtration, à des fins principalement respiratoires. Afin de tester cette deuxième hypothèse, nous avons mis en place une approche prenant en compte, dans nos conditions expérimentales, les apports trophiques tout en analysant conjointement les capacités de bioaccumulation dans le corps



**Figure III.43.** Concentrations en cadmium particulaire (a) et rapport "poids frais/poids sec" (b) des échantillons de sédiment, après 30 jours d'exposition, en fonction de la profondeur et de la condition expérimentale étudiée : {Sdt}, colonne d'eau et sédiment sans organisme ; {Tub}, présence de tubificidés. Moyennes ± erreurs standards (N = 3).

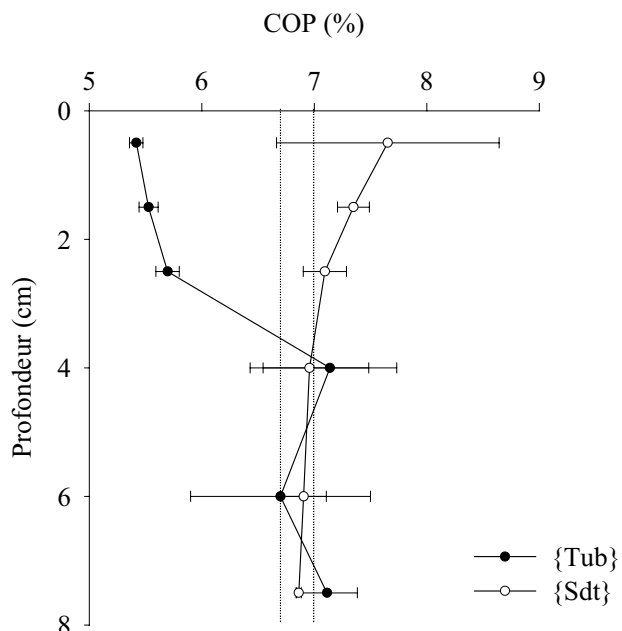
mou. Cette expérience et les principaux résultats obtenus seront présentés dans la Partie III.C.2.1.2.

### ***Effets des tubificidés sur le sédiment***

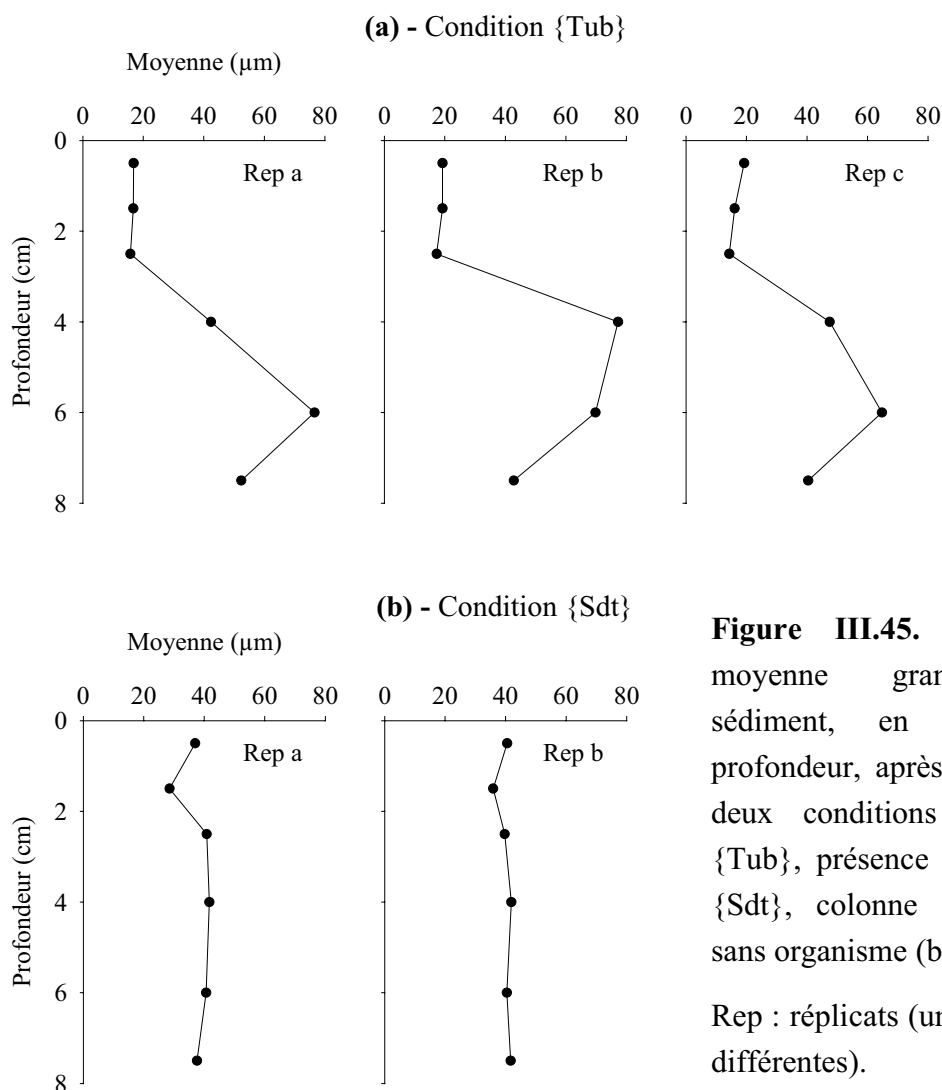
La Figure III.43 présente la distribution verticale des concentrations en Cd particulaire dans le sédiment, au temps 30 jours (a), ainsi que le rapport "poids frais/poids sec" (pf/ps) pour les différentes strates sédimentaires (b). Notons que ce rapport traduit l'importance de la richesse en eau du sédiment. En absence d'organismes dans les unités - condition {Sdt} -, la concentration en Cd est constante avec la profondeur, la valeur moyenne étant de  $75,7 \pm 1,0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , ps. Le rapport "pf/ps" ne varie pas non plus significativement avec la profondeur :  $1,76 \pm 0,03$ <sup>14</sup>. Lorsque les tubificidés sont présents dans le sédiment, les profils sont complètement différents. L'analyse statistique met en évidence un effet significatif de la profondeur sur la concentration en Cd particulaire et sur le rapport "pf/ps". Les concentrations en Cd particulaire sont significativement plus élevées en présence des vers dans les trois premières tranches ( $104,8 \pm 3,1$  ;  $113,8 \pm 2,5$  ;  $127,2 \pm 4,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , ps dans les tranches 0-1, 1-2 et 2-3 cm, respectivement), puis elles sont plus faibles en-dessous ( $41,0 \pm 1,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , ps dans la tranche 5-7 cm). Le rapport "pf/ps" est également plus élevé dans les trois premières tranches de la condition {Tub} ( $2,81 \pm 0,12$  ;  $2,63 \pm 0,05$  ;  $2,60 \pm 0,02$ ), puis il est identique à celui de la condition {Sdt} dans les trois dernières tranches (3-5, 5-7 et 7-8 cm).

Les pelotes fécales rejetées par les tubificidés sont constituées de particules fines agglomérées par du mucus. La taille de ces pelotes est assez élevée par rapport au reste du sédiment. Ainsi, au temps 30 jours, la porosité de la tranche supérieure constituée majoritairement de pelotes fécales est augmentée, ce qui se traduit par un rapport "pf/ps" plus élevé que celui des strates sédimentaires inférieures ou de celles correspondant aux unités ne renfermant pas de vers (condition {Sdt}). Au bout de 30 jours, la couche de pelotes fécales mesure environ 3 cm d'épaisseur. Dans la Partie III.A.2.1 de ce mémoire, l'utilisation de traceurs particuliers fluorescents nous avait permis de montrer qu'après environ 20 jours, une population de vers de même densité avait rejeté 3 cm de pelotes fécales à la surface du sédiment. Lors de l'étude que nous avons menée en appliquant la technique de radioscopie RX, pour mesurer le remaniement sédimentaire sous l'action des tubificidés (Partie III.A.2.3), la hauteur mesurée de la couche de pelotes fécales était de 1,8 cm après 24 jours et de 2,9 cm

<sup>14</sup> Le profil vertical traduit néanmoins un léger enrichissement en eau dans les couches de surface, *via* les transferts à partir de la colonne d'eau.



**Figure III.44.** Pourcentages du carbone organique particulaire (COP) dans le sédiment, au temps 30 jours, en fonction de la profondeur et de la condition expérimentale : {Sdt}, colonne d'eau et sédiment sans organisme ; {Tub}, présence de tubificidés. Les deux traits en pointillés indiquent la variabilité des mesures au temps zéro. Moyennes  $\pm$  erreur-standards (N = 3).



**Figure III.45.** Evolution de la moyenne granulométrique du sédiment, en fonction de la profondeur, après 30 jours, pour les deux conditions expérimentales : {Tub}, présence de tubificidés (a) ; {Sdt}, colonne d'eau et sédiment sans organisme (b).

Rep : répliqués (unités expérimentales différentes).

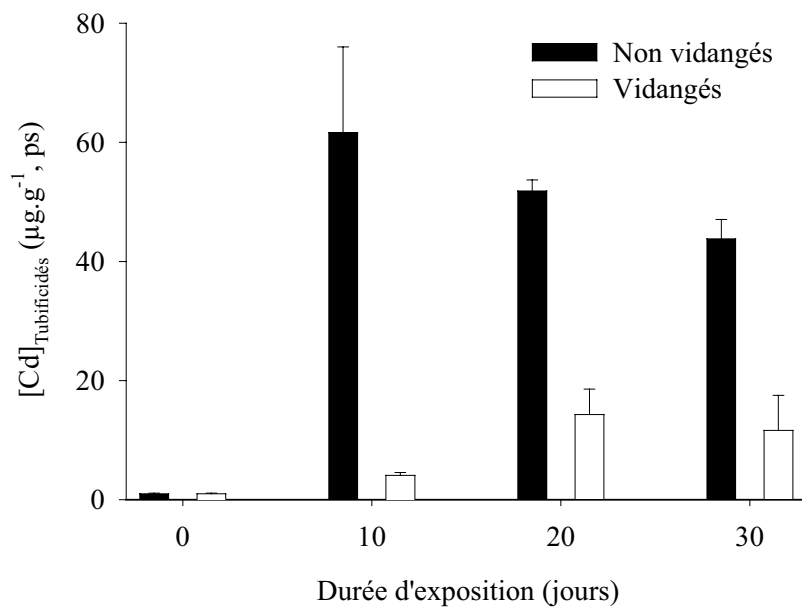
après 38 jours. Ces différentes valeurs, mesurées sur le même sédiment de Cajarc et avec une densité comparable d'oligochètes, sont du même ordre de grandeur que celles estimées à partir du rapport "pf/ps" au cours de cette expérience.

Les résultats de la distribution verticale du Cd particulaire dans le sédiment sont assez remarquables, puisqu'ils soulignent un impact très important des vers sur la distribution du Cd. En absence de bioturbation, le métal se distribue de façon homogène avec la profondeur, eu égard à l'homogénéisation du sédiment (brassage mécanique) avant l'introduction dans les UEs. Avec les vers, cette distribution n'est plus du tout homogène : nos résultats montrent une forte augmentation de la concentration en Cd en surface et un appauvrissement en profondeur. Le bilan de masse du Cd contenu dans les différentes tranches sédimentaires montre que les trois premières strates de la condition {Tub} s'enrichissent de 12 g de Cd par rapport à la condition {Sdt}, alors que les trois dernières tranches "perdent" environ 10 g de Cd. Comment les vers peuvent-ils modifier aussi fortement le profil de Cd particulaire ? La zone enrichie en Cd correspond strictement à la couche de pelotes fécales. L'hypothèse la plus probable est que les particules qui sont ingérées par les vers, c'est-à-dire, comme nous l'avons vu dans la Partie III.A.2 de ce mémoire, les particules fines, sont celles qui sont les plus riches en Cd. La zone d'ingestion s'appauvrit en particules fines et donc en métal, pendant que la couche supérieure de pelotes fécales, qui est, rappelons-le, exclusivement formée des particules fines ingérées par les vers, est enrichie en Cd. A ce stade de l'analyse des résultats, la part du Cd accumulée dans les vers, provenant des transferts métalliques à partir du sédiment ingéré, doit être quantitativement peu importante, à l'échelle de l'unité expérimentale.

Le graphe de distribution verticale du carbone organique particulaire (COP) dans le sédiment des UEs des conditions {Sdt} et {Tub} (Figure III.44) montre un léger enrichissement en COP en surface en absence de vers, après 30 jours ( $7,6 \pm 1$  %), par rapport au pourcentage mesuré au temps zéro ( $6,9 \pm 0,2$  %), la variabilité des mesures étant toutefois très grande pour la couche superficielle<sup>15</sup>. En présence de tubificidés - condition {Tub} -, un net appauvrissement en COP est observé dans les trois premiers centimètres de sédiment ( $5,5 \pm 0,1$  %) ; plus en profondeur, les valeurs ne sont pas significativement différentes du temps zéro ni de la condition {Sdt}. Les pelotes fécales rejetées par les vers ont donc une teneur en COP inférieure à celle du sédiment initial. L'hypothèse la plus probable repose sur

---

<sup>15</sup> Cette variabilité a été soulignée à plusieurs reprises, pour différents paramètres (traceurs fluorescents, [Cd], ...). Elle est attribuable à l'hétérogénéité de la strate superficielle de la colonne sédimentaire et aux difficultés lors de la découpe.



**Figure III.46.** Concentrations en cadmium dans les tubificidés en fonction du temps, avant et après vidange du tractus digestif pendant 48h (dans du sédiment de Garonne). Moyennes ± erreur-standards (N = 6).

l'assimilation d'une partie de la matière organique par les vers, à des fins nutritionnelles : après passage dans l'intestin, les particules ingérées sont appauvries en matière organique.

Les graphes traduisant les profils verticaux des moyennes granulométriques du sédiment, pour les conditions {Sdt} et {Tub} et après 30 jours, sont présentés sur la Figure III.45. En absence de vers - condition {Sdt} -, la moyenne granulométrique est constante avec la profondeur :  $38,9 \pm 3,8 \mu\text{m}$  (2 réplicats analysés). En présence des vers - condition {Tub} -, la moyenne granulométrique est nettement plus faible que celle de la condition {Sdt} dans les trois premiers centimètres ( $17,2 \pm 1,7 \mu\text{m}$ ) ; elle est à l'opposé nettement supérieure dans la tranche 5-7 cm ( $70,4 \pm 5,9 \mu\text{m}$ ). Ces résultats illustrent parfaitement les commentaires formulés précédemment : les vers ingèrent puis rejettent en surface les particules fines, créant une couche supérieure de pelotes fécales ayant une plus faible granulométrie et une zone inférieure, correspondant à leur zone d'ingestion, avec une granulométrie plus élevée. Ces résultats sont en accord avec ceux de l'expérience présentée dans la Partie III.A.2.3, qui montrait que les vers tubificidés, pour une même densité et sur le même sédiment, remontait en surface des particules d'environ  $20 \mu\text{m}$  de moyenne granulométrique et augmentait la taille des particules au niveau de la zone d'ingestion, jusqu'à  $80 \mu\text{m}$  à 24 jours et  $100 \mu\text{m}$  après 38 jours.

#### ***Bioaccumulation du cadmium par les tubificidés***

La cinétique de bioaccumulation du Cd par les vers est présentée sur la Figure III.46, pour les organismes vidangés et non vidangés. Les résultats sont exprimés en concentration et non en teneur, à cause de l'impossibilité technique de récupérer la totalité des vers lors de l'échantillonnage. Les tubificidés des deux conditions expérimentales {Tub} et {Cf+Tub} ayant les mêmes concentrations en Cd, nous avons regroupé les valeurs pour déterminer les moyennes pour chaque temps d'échantillonnage. L'analyse statistique (ANOVA à deux facteurs) met en évidence un effet significatif des facteurs "temps" et "vidange", sur les concentrations en Cd. La bioaccumulation dans les vers non vidangés augmente rapidement et significativement entre les temps zéro et 10 jours (respectivement  $0,99 \pm 0,08 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , ps et  $61,65 \pm 14,35 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , ps) puis diminue légèrement jusqu'au temps 30 jours (diminution non significative). Pour les vers vidangés, la concentration augmente significativement après 10 et 20 jours.

La première remarque qui peut être faite à propos de ces résultats est que, après vidange, la quantité de Cd bioaccumulée par les vers est nettement diminuée. Cette forte diminution est





due à la perte du Cd fixé sur les particules sédimentaires contenues dans l'intestin, et peut-être aussi à un début de décontamination. La quantité de métal réellement bioaccumulée par les vers est donc faible, avec une tendance en plateau à partir de 20 jours. Étant donné la concentration en Cd élevée dans le sédiment ( $85 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , ps), il paraît assez surprenant d'atteindre un plateau aussi rapidement. Ceci est peut-être dû : (i) à une croissance des organismes, eu égard à la richesse en matière organique du sédiment, qui conduirait à une dilution pondérale du métal, similaire à celle décrite pour *H. rigida* (Figure III.36) ; (ii) à des mécanismes de détoxification, qui limiteraient l'accumulation du Cd ; (iii) à une moindre biodisponibilité du Cd. La concentration moyenne mesurée au temps 10 jours dans les vers non vidangés ( $61,65 \pm 14,35 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , ps) a été probablement atteinte beaucoup plus tôt, dès que le tube digestif a été entièrement rempli de sédiment contaminé, ce qui se produit en moins d'une journée.

La concentration du métal mesurée dans les vers sans vidange diminue après le temps 10 jours, bien que cette tendance ne soit pas significative. Logiquement, elle devrait augmenter, si l'on tient compte de l'accroissement significatif de la bioaccumulation après vidange du tractus digestif. Cette tendance semble donc liée aux quantités de Cd accumulées dans le tractus : soit la concentration du métal dans le sédiment ingéré diminue avec le temps ; soit la quantité de sédiment présente dans l'intestin des vers diminue. Il n'y a pas de raison pour que les vers ingèrent proportionnellement moins de sédiment avec le temps. C'est plutôt le contraire, puisqu'en appauvrissant le sédiment en matière organique, ils sont amenés à en ingérer davantage pour maintenir, voire accentuer, leurs apports nutritionnels. La concentration en Cd dans le sédiment ingéré diminuerait donc avec la durée d'exposition. En admettant que les concentrations en Cd dans les pelotes fécales sont représentatives des concentrations en Cd des particules sédimentaires ingérées, le graphe de la distribution verticale du Cd dans le sédiment (Figure III.43.a) montre que les déjections les plus récentes (ce sont celles qui sont les plus en surface), sont moins contaminées en Cd que celles rejetées au début de l'expérience (ce sont celles qui sont les plus en profondeur, c'est à dire dans la tranche 2-3 cm) :  $104,8 \pm 3,1 \mu\text{g Cd}\cdot\text{g}^{-1}$  dans la tranche 0-1 cm et  $127,2 \pm 4,9 \mu\text{g Cd}\cdot\text{g}^{-1}$  dans la tranche 2-3 cm. Avec le temps, la concentration en particules riches en Cd, qui sont celles que les vers consommeraient préférentiellement, parce que se sont les plus fines et/ou les plus riches en carbone organique, diminuerait dans la zone d'ingestion des vers, provoquant la décroissance progressive des concentrations en Cd dans les vers non vidangés.

Ces résultats attribuent un rôle important au sédiment intra-digestif par rapport à la quantité de métal réellement bioaccumulée dans les vers. Ils diffèrent notablement des



estimations obtenues lors de l'étude des transferts à partir de la colonne d'eau (cf Partie III.B). Nous aborderons l'analyse comparative entre les différentes conditions de contamination dans la synthèse générale (Partie IV).

### III.C.2.1.2. Effet de la présence des tubificidés sur le transfert du cadmium entre le sédiment de Cajarc et la colonne d'eau : étude de la relation "activité ventilatoire/bioaccumulation" chez le bivalve *C. fluminea*

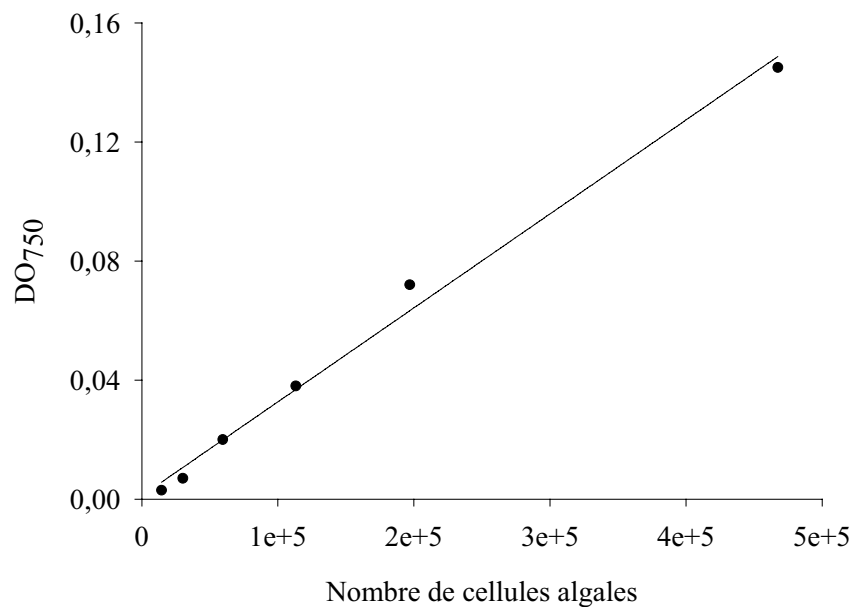
Lors de l'analyse des résultats de l'expérience précédente, nous avons émis l'hypothèse que les bivalves, non nourris, réduiraient notablement leur activité de ventilation au bout d'une dizaine de jours, cette diminution des échanges avec le milieu environnant pouvant se traduire par une absence de bioaccumulation significative du Cd dans le corps mou, alors que la concentration du métal présent sous forme dissoute, et donc biodisponible, augmentait très significativement au cours de la dernière phase d'exposition (20-30 jours). Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé une expérience complémentaire, basée sur des conditions similaires mais comportant des unités dans lesquelles les bivalves ont été nourris afin de stimuler leur ventilation. Nous avons choisi un apport d'algues phytoplanctoniques minimal pour permettre à *C. fluminea* de maintenir sa ventilation pendant toute la durée de l'expérience, sans introduire dans la colonne d'eau trop de sites potentiels de fixation du Cd (ad- et absorption du Cd par les algues).

Six conditions expérimentales ont été retenues : trois renfermaient uniquement des *C. fluminea*, et dans les trois autres ont été introduits des bivalves et des vers tubificidés. Dans les deux cas, avec et sans vers, une première condition expérimentale a consisté à ne pas effectuer d'apports d'algues ; une deuxième condition a reposé sur des apports d'algues pendant toute la durée d'exposition ; une troisième a été basée sur des apports d'algues effectués uniquement à partir du 25<sup>ème</sup> jour, pendant 11 jours. Ces conditions et leur codage sont décrits dans le Tableau III.16. Pour chacune des six conditions, trois répétitions ont été mises en place. Le plan d'expérience a donc reposé sur 18 UEs (6 conditions x 3 répétitions). Deux durées d'exposition ont été retenues : 25 jours pour les conditions {+Cf-Tub-A}, {+Cf-Tub+A}, {+Cf+Tub-A} et {+Cf+Tub+A} et 36 jours pour les conditions {+Cf-Tub-A→ +A} et {+Cf+Tub-A→ +A}.

		Sans algues de 0 à 25 jours	Avec algues de 0 à 25 jours	Sans algues de 0 à 25 jours puis avec algues de 25 à 36 jours
<i>C. fluminea</i>	- tubificidés	{-Tub-A}	{-Tub+A}	{-Tub-A/ +A}
	+ tubificidés	{+Tub-A}	{+Tub+A}	{+Tub-A/ +A}

**Tableau III.16.** Protocole de l'expérience relative à l'étude des transferts du cadmium à partir de la source "sédiment", avec et sans apports d'algues.

+ : présence / - : absence



**Figure III.47.** Droite d'étalonnage de la densité optique (DO), mesurée à  $\lambda = 750$  nm, avec la quantité de cellules algales déterminée par comptage sous microscope.

Modèle :  $DO_{750} = 1,12 \cdot 10^{-3} + 3,16 \cdot 10^{-7} \times \text{Nb cellules algales}$  ;  $R^2 = 0,99$ .

## Matériels et méthodes

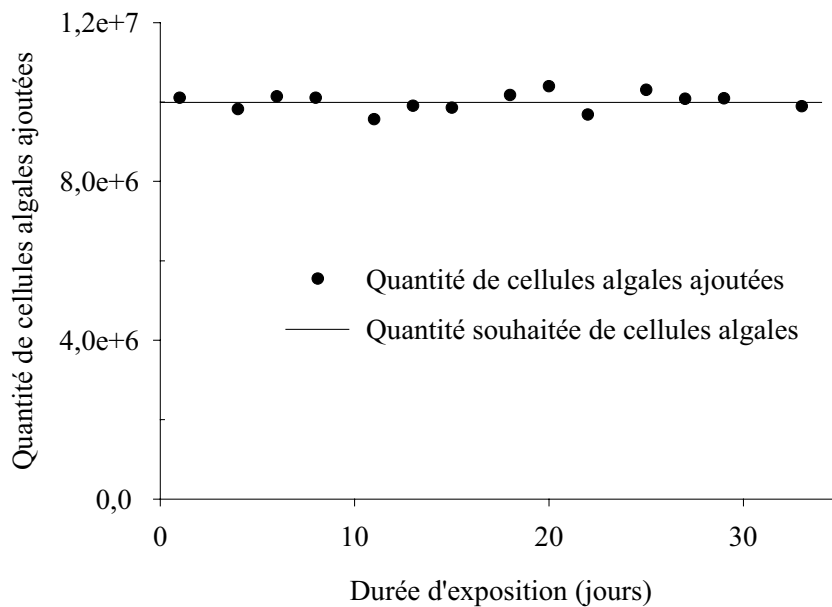
Pour cette expérience, nous avons utilisé des UEs de "type I", renfermant du sédiment de Cajarc (10 cm d'épaisseur -  $1500 \pm 5$  g, pf -  $85,5 \pm 4,7$   $\mu\text{g Cd.g}^{-1}$ , ps), et deux litres d'eau du réseau déchlorée. La température a été fixée à 20°C et la photopériode était naturelle. Un bullage d'air a été assuré en permanence dans chaque UE, grâce à un diffuseur placé dans la zone supérieure de la colonne d'eau.

Les organismes ont été introduits dans les UEs 24 h après la mise en place du biotope mixte "sédiment/colonne d'eau". Quatre *C. fluminea* de  $25,3 \pm 0,1$  mm de longueur antéro-postérieure ont été introduits dans chacune des UEs. Après l'introduction des bivalves,  $1,5 \pm 0,03$  g (pf) de tubificidés, soit 780 individus en moyenne (densité = 54 400 individus.m<sup>-2</sup>) ont été déposés dans les UEs des conditions {+Tub-A}, {+Tub+A} et {+Tub-A→ +A}.

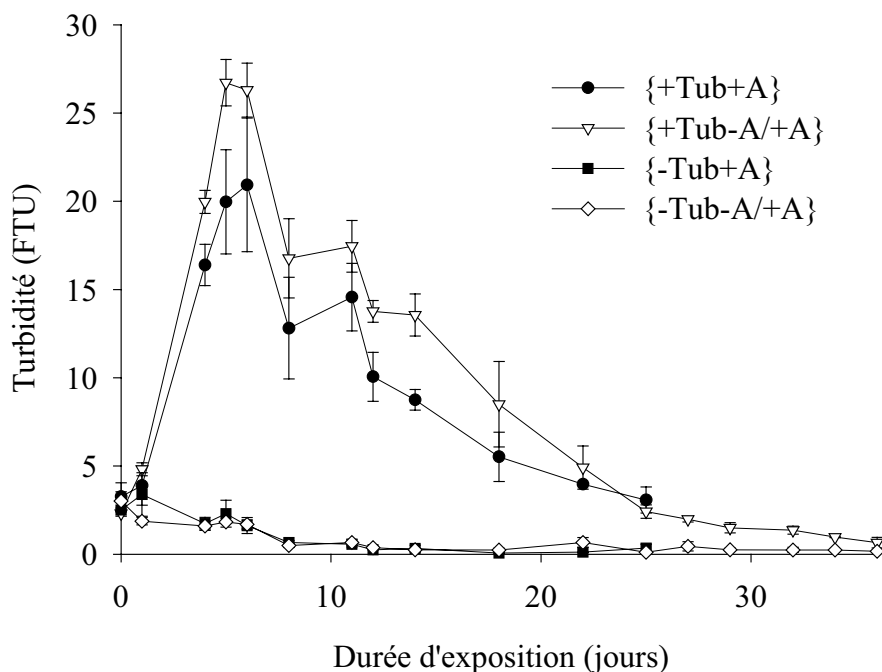
Les bivalves ont été nourris avec une suspension d'algues vertes unicellulaires *Scenedesmus subspicatus*. Cette algue est couramment cultivée au laboratoire sur du milieu Dauta modifié (sans EDTA, car c'est un chélateur des cations divalents, comme le Cd). La quantité des apports trophiques devant être régulière et maîtrisée, nous avons établi au préalable une corrélation entre la densité optique de la solution algale à 750 nm et le nombre de cellules comptées sur cellule de Nageotte (Figure III.47). Les bivalves ont été nourris trois fois par semaine, avec des apports de  $10 \cdot 10^6$  cellules algales par UE, ce qui correspond aux quantités minimales nécessaires au maintien de l'activité ventilatoire de *C. fluminea* [Inza, 1996 ; Tran, 2001]. Les apports d'algues ont été effectués dans la colonne d'eau des UEs des deux conditions {-Tub+A} et {+Tub+A} au cours de la période "0-25 jours", puis dans les UEs des deux conditions {-Tub-A→ +A} et {+Tub-A→ +A} entre 25 et 36 jours.

Pendant toute la durée de l'expérience, un suivi des paramètres abiotiques a été réalisé trois fois par semaine. La température, le pH, la concentration en oxygène dissous et la turbidité ont été mesurés dans la colonne d'eau des trois UEs correspondant aux conditions {+Tub+A}, {-Tub+A}, {+Tub-A→ +A} et {-Tub-A→ +A}, soit 12 UEs au total. Nous n'avons pas réalisé ces suivis dans les UEs des conditions {+Tub-A} et {-Tub-A}, car elles sont strictement identiques aux conditions {+Tub-A→ +A} et {-Tub-A→ +A} durant les 25 premiers jours de l'expérience.

Trois fois par semaine, 20 mL ont été prélevés dans la colonne d'eau au sein de ces 12 UEs, pour analyser les concentrations en Cd total et en Cd dissous (<0,20  $\mu\text{m}$ ), ceci afin d'estimer les transferts du métal entre le sédiment et la colonne d'eau et, conjointement, la pression de contamination subie par les *C. fluminea*. 10 mL ont été filtrés à 0,2  $\mu\text{m}$  (Filtres



**Figure III.48.** Suivi de la quantité de cellules algales ajoutées dans les unités expérimentales en fonction du temps et valeur théorique des ajouts.



**Figure III.49.** Evolution de la turbidité de la colonne d'eau en fonction du temps et des quatre conditions expérimentales étudiées : {+Tub+A}, présence de tubificidés et ajouts d'algues ; {-Tub+A}, absence de tubificidés et ajouts d'algues ; {+Tub-A→+A}, présence de tubificidés sans ajout d'algues de 0 à 25 jours puis ajouts d'algues de 25 à 36 jours ; {-Tub-A→+A}, absence de tubificidés sans ajout d'algues de 0 à 25 jours puis ajouts d'algues de 25 à 36 jours. Moyennes ± erreur-standards (N = 3).

seringue – Membrane SFCA – Nalgen Nunc International Corporation, New York, USA) et acidifiés avec 1 mL d'acide nitrique (65 % HNO<sub>3</sub> - Merck, Darmstadt, Allemagne), afin de mesurer les concentrations en Cd dissous. Les 10 mL restants ont été directement acidifiés avec 1 mL d'acide nitrique (65 % HNO<sub>3</sub>), puis analysés afin de déterminer la concentration en Cd total. Tous les échantillons ont été stockés en chambre froide à +4°C, avant d'être analysés. Le temps de stockage a été de 48 h au maximum.

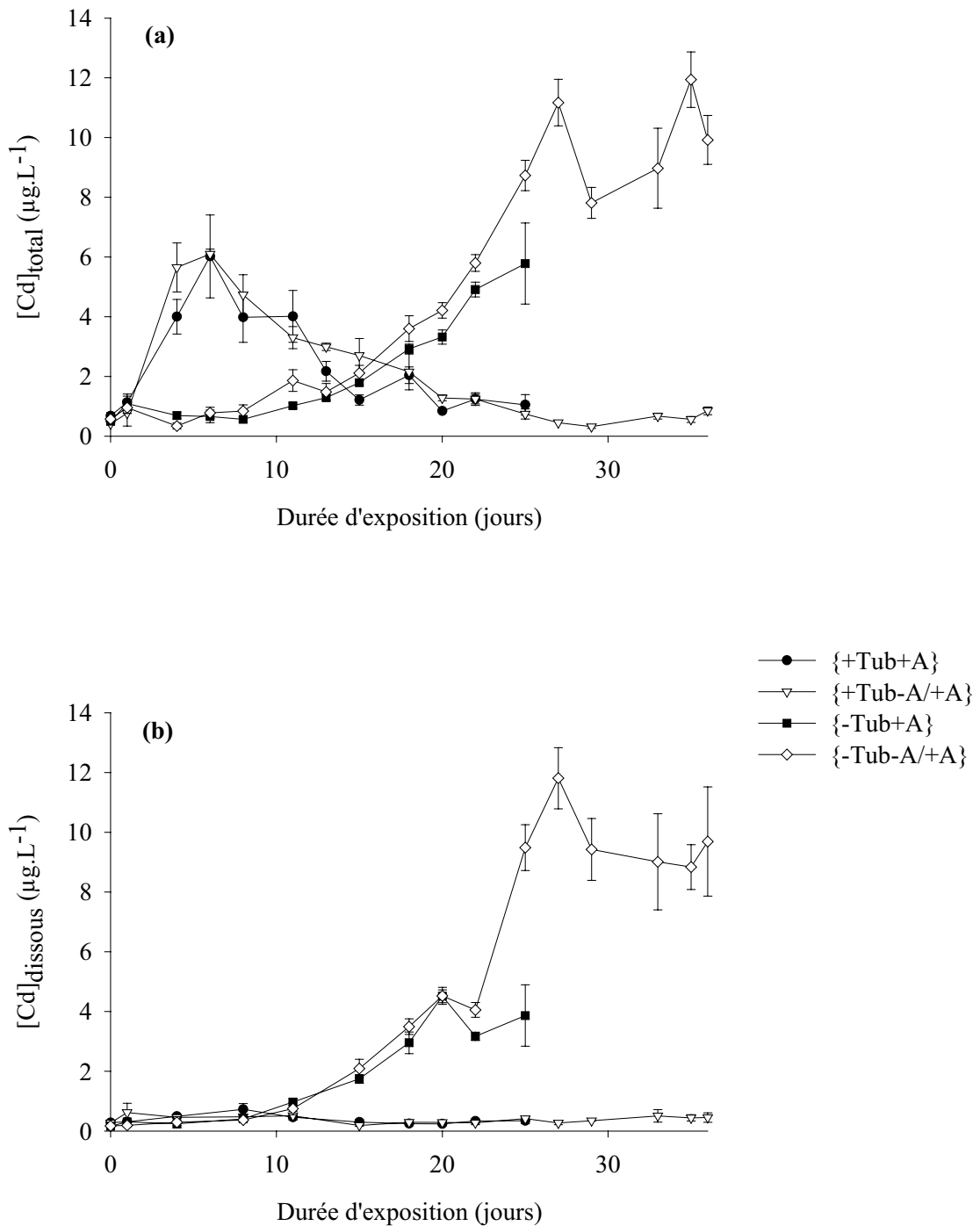
Aux deux temps de prélèvement 25 et 36 jours, les *C. fluminea* ont été sortis des UEs, rincés à l'eau courante et congelés à - 20°C. Afin de mesurer leurs concentrations métalliques, les corps mous entiers ont été séparés de la coquille, puis pesés (pf). Les échantillons ont ensuite été digérés à l'acide nitrique et dosés, selon les procédures décrites dans la Partie II.B.2 de ce mémoire. Six à neuf bivalves ont été analysés pour chacune des conditions expérimentales, soit deux ou trois bivalves par UE (réplicats).

## Résultats et discussion

La Figure III.48 présente le suivi de la quantité de cellules algales introduites dans les UEs, en fonction du temps. Les apports d'algues ont été constants sur toute la durée de l'expérience, avec un ajout moyen de  $10.10^6 \pm 0,6.10^6$  cellules dans chacune des UEs.

Le pH, la température et la concentration en oxygène dissous ont été constants pendant toute la durée de l'expérience et n'ont pas été significativement différents entre les six conditions expérimentales étudiées : pH =  $8,06 \pm 0,07$  ; taux de saturation en O<sub>2</sub> =  $69,8 \pm 1,0$  % et T° =  $19,5 \pm 0,05$  °C.

La Figure III.49 présente les valeurs de turbidité mesurées tout au long de l'expérience. Deux tendances d'évolution se dégagent de l'analyse de ce graphe, selon que les UEs renferment ou non des vers. Au début de l'expérience, les valeurs de turbidité de toutes les UEs sont d'environ 3 FTU. Rappelons que cette turbidité, différente de zéro, est la conséquence directe de la mise en eau des UEs et de l'introduction des organismes. La turbidité des unités ne renfermant pas de vers - conditions {-Tub-A→ +A} et {-Tub+A} -, diminue entre 0 et 8 jours, puis se maintient constante jusqu'à la fin de l'expérience à une valeur très basse ( $0,30 \pm 0,03$  FTU). La turbidité n'est pas significativement différente entre ces deux conditions. La comparaison entre ces deux conditions, entre 0 et 25 jours, montre que les apports d'algues effectués trois fois par semaine ne sont pas mis en évidence au niveau des mesures de turbidité.



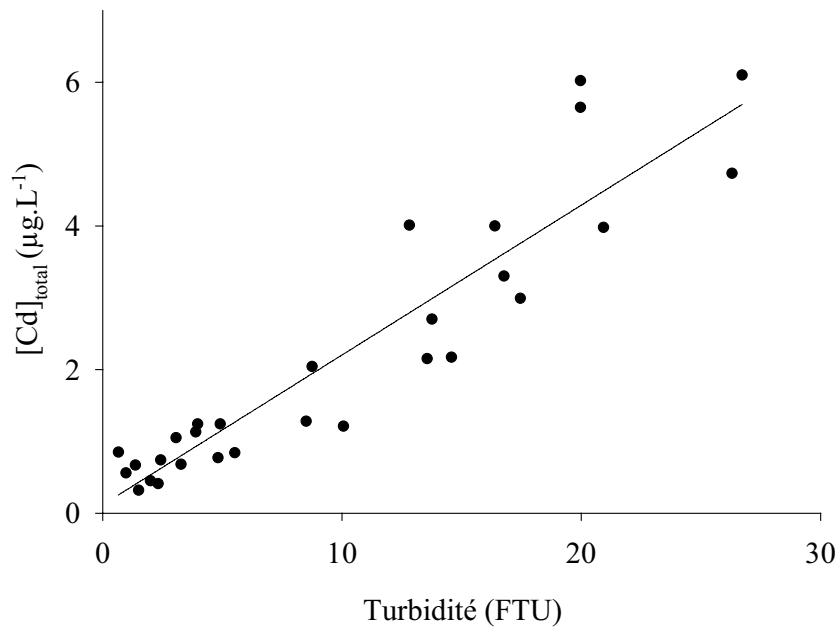
**Figure III.50.** Evolution en fonction du temps des concentrations en Cd total (a) et en Cd dissous (b) dans la colonne d'eau des quatre conditions expérimentales : {+Tub+A}, présence de tubificidés et ajouts d'algues ; {-Tub+A}, absence de tubificidés et ajouts d'algues ; {+Tub-A→ +A}, présence de tubificidés sans ajout d'algues de 0 à 25 jours puis ajouts d'algues de 25 à 36 jours ; {-Tub-A→ +A}, absence de tubificidés sans ajout d'algues de 0 à 25 jours puis ajouts d'algues de 25 à 36 jours. Moyennes  $\pm$  erreur-standards (N = 3).



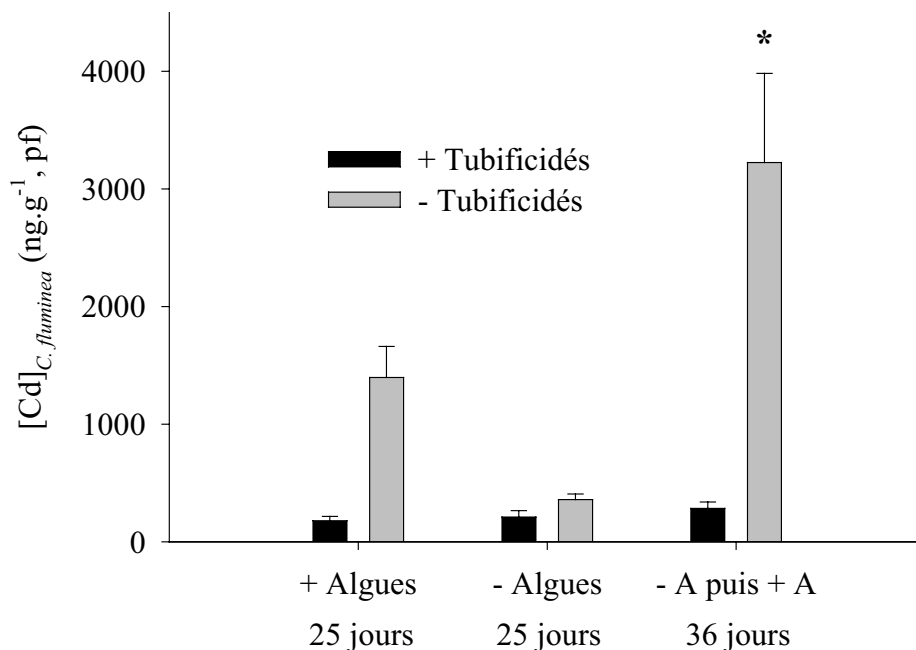
Dans les unités renfermant des tubificidés, une rapide augmentation de la turbidité est observée durant les 8 premiers jours, conduisant à une valeur moyenne maximale de  $20,9 \pm 3,8$  FTU pour la condition  $\{+Tub+A\}$  et  $26,3 \pm 1,5$  FTU pour la condition  $\{+Tub-A \rightarrow +A\}$ . La turbidité diminue ensuite régulièrement jusqu'à la fin de l'expérience, où les valeurs mesurées sont respectivement de  $3,1 \pm 0,7$  FTU et  $2,4 \pm 0,4$  FTU au temps 25 jours, puis de  $0,66 \pm 0,30$  FTU pour la condition  $\{+Tub-A \rightarrow +A\}$  à 36 jours. Les turbidités des deux conditions avec vers ( $\{+Tub+A\}$  et  $\{+Tub-A \rightarrow +A\}$ ) ne sont pas significativement différentes entre elles, mais sont significativement supérieures à celles des conditions sans vers ( $\{-Tub-A \rightarrow +A\}$  et  $\{-Tub+A\}$ ). Ces résultats montrent une nouvelle fois que les tubificidés entraînent une augmentation significative de la turbidité de la colonne d'eau, cette augmentation étant beaucoup plus importante en début d'expérience.

Les résultats relatifs à l'évolution des concentrations en Cd total (échantillons non filtrés) dans la colonne d'eau des UEs des quatre conditions expérimentales étudiées sont présentés sur la Figure III.50.a. Rappelons que les conditions  $\{+Tub +A\}$  et  $\{-Tub+A\}$  ont été arrêtées à 25 jours et que les conditions  $\{+Tub-A \rightarrow +A\}$  et  $\{-Tub-A \rightarrow +A\}$  ont été arrêtées après 36 jours. Deux types d'évolution apparaissent en fonction de la condition expérimentale. Pendant les 8 premiers jours, la concentration en Cd total dans les unités sans vers, conditions  $\{-Tub+A\}$  et  $\{-Tub-A \rightarrow +A\}$ , est faible, proche de la limite de détection ( $LD = 0,1 \mu\text{g Cd} \cdot \text{L}^{-1}$ ). A partir du 10<sup>ème</sup> jour, les concentrations augmentent régulièrement jusqu'à  $5,8 \pm 1,4 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  pour la condition  $\{-Tub+A\}$  au temps 25 jours, et  $9,9 \pm 0,6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  pour la condition  $\{-Tub-A \rightarrow +A\}$  après 36 jours. Il n'y a pas de différence significative entre ces deux conditions pendant les 25 premiers jours mais l'analyse statistique (ANOVA à 2 facteurs) met en évidence un effet significatif du facteur "temps". L'évolution de la concentration en Cd total dans les UEs renfermant des vers, conditions  $\{+Tub+A\}$  et  $\{+Tub-A \rightarrow +A\}$ , est très différente : elle augmente rapidement pendant les six premiers jours, atteignant une valeur moyenne maximale de  $6,0 \pm 1,4$  et de  $6,1 \pm 0,2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectivement ; ensuite, ces concentrations diminuent jusqu'à la fin de l'expérience :  $1,0 \pm 0,3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  pour la condition  $\{+Tub+A\}$  au temps 25 jours et  $0,8 \pm 0,1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  pour la condition  $\{+Tub-A \rightarrow +A\}$  après 36 jours. Ces deux conditions renfermant des vers ne sont pas significativement différentes entre elles, mais sont significativement différentes des conditions "sans vers" (-Tub).

La Figure III.50.b présente l'évolution des concentrations en Cd dissous (échantillons filtrés à  $0,2 \mu\text{m}$ ), mesurées dans les UEs des quatre conditions expérimentales. Pendant les dix premiers jours, aucune différence significative n'est mise en évidence entre les quatre conditions, toutes les valeurs mesurées étant proches de la limite de détection ( $0,1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Au



**Figure III.51.** Corrélation entre la turbidité et la concentration en Cd total mesurées dans les UEs renfermant des tubificidés (conditions {+Tub+A}, présence de tubificidés et ajouts d’algues, et {+Tub-A→ +A}, présence de tubificidés sans ajout d’algues de 0 à 25 jours puis ajouts d’algues de 25 à 36 jours ). Modèle :  $[Cd]_{total} = 0,116 + 0,2096 \times \text{Turbidité}$  ;  $R^2 = 0,86$ .



**Figure III.52.** Concentrations en cadmium dans le corps mou de *Corbicula fluminea*, après 25 jours d’exposition pour les conditions {+Tub+A}, présence de tubificidés et ajouts d’algues ; {-Tub+A}, absence de tubificidés et ajouts d’algues ; {+Tub-A}, présence de tubificidés sans ajout d’algues ; {-Tub-A}, absence de tubificidés sans ajout d’algues, et après 36 jours d’exposition pour les conditions {+Tub-A→ +A}, présence de tubificidés sans ajout d’algues de 0 à 25 jours puis ajouts d’algues de 25 à 36 jours ; {-Tub-A→ +A}, absence de tubificidés sans ajout d’algues de 0 à 25 jours puis ajouts d’algues de 25 à 36 jours. La concentration en Cd mesurée au temps zéro a été soustraite de toutes les valeurs reportées sur ce graphe. Moyennes ± erreur-standards (N = 6).

delà de 10 jours, deux tendances d'évolution se dégagent, en accord avec les résultats obtenus lors des études antérieures : les concentrations en Cd dissous des UEs ne renfermant pas de vers - conditions {-Tub+A} et {-Tub-A→ +A} -, augmentent régulièrement avec le temps, les valeurs moyennes maximales étant de  $3,9 \pm 1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$  à 25 jours pour la condition {-Tub+A} et  $9,7 \pm 1,8 \mu\text{g.L}^{-1}$  après 36 jours pour la condition {-Tub-A→ +A}. Il n'y a pas de différence significative entre ces deux conditions. Pour les UEs renfermant des tubificidés, les concentrations en Cd dissous ne varient pas et restent proches de la limite de détection pendant toute la durée d'exposition :  $0,3 \pm 0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour la condition {+Tub+A} à 25 jours et  $0,4 \pm 0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour la condition {+Tub-A→ +A} à 36 jours. Il n'y a pas de différence significative entre ces deux conditions. Par contre, comme pour les concentrations en Cd total, les analyses de variance révèlent un effet significatif du facteur "condition" ({-Tub}>{+Tub}).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment, pour des conditions expérimentales similaires. La remise en suspension des particules sédimentaires sous l'effet de la bioturbation générée par les tubificidés provoque un transfert de Cd vers la colonne d'eau sous forme particulaire ; la corrélation positive ( $R^2 = 0,86$ ) entre la concentration de Cd total et les mesures de turbidité correspondantes est particulièrement démonstrative (Figure III.51). A l'opposé, en absence de bioturbation, le métal est quasi-exclusivement présent sous forme dissoute. Par exemple, après 18 jours, le rapport entre [Cd dissous] et [Cd total] est de  $96 \pm 6 \%$  et  $98 \pm 8 \%$  pour les conditions {-Tub+A} et {-Tub-A→ +A}, respectivement.

La Figure III.52 présente les concentrations en Cd dans le corps mou entier de *Corbicula fluminea*, pour les six conditions expérimentales étudiées. Le niveau de base mesuré au temps zéro ( $130 \pm 18 \text{ ng Cd.g}^{-1}$ , pf) a été déduit de toutes les valeurs présentées. Dans les trois conditions renfermant des tubificidés, les concentrations en Cd restent faibles et du même ordre de grandeur pour les trois conditions :  $179 \pm 38 \text{ ng.g}^{-1}$  pour la condition {+Tub+A} à 25 jours ;  $209 \pm 56 \text{ ng.g}^{-1}$  pour la condition {+Tub-A} à 25 jours ;  $284 \pm 56 \text{ ng.g}^{-1}$  pour la condition {+Tub-A→ +A} après 36 jours. L'analyse statistique (ANOVA) montre qu'il n'y a pas de différences significatives entre ces trois conditions. Par contre, en absence de vers et après 25 jours d'exposition, les bivalves accumulent nettement plus de Cd lorsqu'il y a des ajouts d'algues dans les UEs : les concentrations moyennes du métal sont de  $1397 \pm 263 \text{ ng.g}^{-1}$  pour la condition {-Tub+A} et de  $358 \pm 47 \text{ ng.g}^{-1}$  pour la condition {-Tub-A}. Il est important de souligner que la concentration mesurée au bout de 36 jours pour la condition {-Tub-A→ +A}, c'est-à-dire lorsque des apports d'algues ont été effectués uniquement à partir



du 25<sup>ème</sup> jour, est la plus élevée :  $3223 \pm 759 \text{ ng.g}^{-1}$  (différence significative avec toutes autres valeurs moyennes).

Rappelons que le but de cette expérience était d'étudier la bioaccumulation du cadmium par les bivalves filtreurs en présence ou en absence de bioturbation (tubificidés) et/ou d'apports d'algues, ces derniers étant censés moduler les activités de ventilation/filtration. En présence de vers, l'accumulation du Cd par *C. fluminea* est faible et indépendante du facteur "algues". Par contre, lorsqu'il n'y a pas de vers dans les UEs, les apports d'algues entraînent une augmentation significative et importante de l'accumulation du Cd par *C. fluminea*, les écarts étant proches d'un facteur 3 après 25 jours.

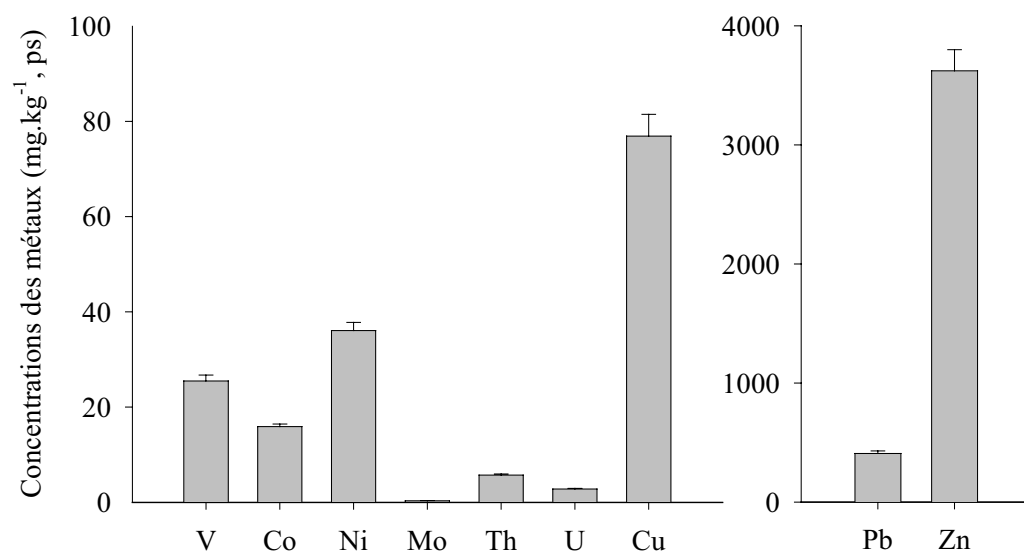
En présence de tubificidés et donc de bioturbation, les apports d'algues ne modifient pas l'accumulation du Cd. Comme nous l'avons observé précédemment, les données acquises sur la colonne d'eau montrent que le Cd transféré depuis la source "sédiment" est essentiellement sous forme particulaire, complexé avec les MES. Dans ces conditions, le métal est très faiblement biodisponible. La voie trophique d'accumulation est dans ce cas très minoritaire, à partir des MES et/ou des algues ingérées, ces dernières ayant pu complexer du Cd à la surface des cellules, avant l'étape d'ingestion. Les résultats de cette expérience sont donc en accord avec ceux obtenus lors de l'étude impliquant les larves d'éphémères *Hexagenia rigida* comme source de bioturbation (cf Partie III.C.1). Rappelons qu'ils sont similaires à ceux publiés par Wall *et al.* (1995), la bioturbation des sédiments engendrée par des carpes Koï (*Cyprinus carpio*) augmentant très significativement la concentration du Cd dans la colonne d'eau mais le métal, transféré sous forme particulaire, n'était pas accumulé par les daphnies (*Daphnia magna*) présentes au sein de la colonne d'eau.

Dans les UEs sans vers mais en présence de bivalves, conditions {-Tub-A}, {-Tub+A} et {-Tub-A → +A}, le cadmium est majoritairement présent sous forme dissoute dans la colonne d'eau, forme classiquement considérée comme biodisponible pour les organismes filtreurs. La comparaison des deux conditions au temps 25 jours a montré que *C. fluminea* accumule environ 3 fois plus de Cd lorsque les algues sont apportées cycliquement, alors que les concentrations en Cd dissous et total dans ces deux conditions sont strictement identiques. La différence d'accumulation peut donc être attribuée à un effet indirect des apports d'algues, qui stimuleraient l'activité de ventilation pendant toute la durée d'exposition, contribuant ainsi aux transferts du métal à partir de la fraction dissoute de la colonne d'eau. Dans la condition sans ajout d'algues, {-Tub-A}, la ventilation n'est pas stimulée, réduisant ainsi l'exposition au Cd dissous au cours de la deuxième phase de l'expérience, au delà de 10 jours environ. Ces résultats sont en accord avec la deuxième hypothèse que nous avons précédemment émise.



Les ajouts d'algues effectués uniquement en fin d'expérience, pendant la période "25-36 jours", renforcent cette interprétation. En effet, pendant les 25 premiers jours de l'expérience, les bivalves de la condition {-Tub-A→ +A} sont dans la même situation que ceux de la condition {-Tub-A} : ils accumulent peu de Cd pendant cette période. Ensuite, lorsque les algues sont apportées tous les 3 jours, la ventilation est stimulée et les organismes se trouvent dans un milieu où les concentrations de Cd dissous dans la colonne d'eau sont les plus élevées et pratiquement constantes (8 à 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  - Figure III.50.b). Ainsi, les bivalves, malgré une durée d'exposition nettement plus courte (11 jours au lieu de 25 pour ceux de la condition {-Tub+A}), présentent une concentration moyenne en Cd dans leur corps mou environ deux fois supérieure (Figure III.52). La question de l'éventualité d'une contamination par voie trophique peut toutefois être posée. En effet, les algues phytoplanctoniques possèdent une vaste surface d'échange avec le milieu environnant, avec de nombreux sites de fixation pour les métaux. Lors des ajouts de *Scenedesmus* dans les UEs, une part du Cd présent sous forme dissoute peut se fixer rapidement sur les cellules algales et contribuer à la bioaccumulation du métal dans le corps mou des bivalves, *via* la voie trophique de contamination. Cependant, cette contamination, si elle est présente, est forcément limitée puisque la concentration d'algues dans le milieu est faible et que les apports ont été effectués tous les 3 jours. Les mesures que nous avons réalisées sur les échantillons d'eau filtrés et non filtrés montrent que plus de 95 % du Cd, pour les conditions {-Tub+A} et {-Tub-A→ +A}, est sous forme dissoute.

Cette expérience complémentaire apporte des données intéressantes au regard de l'analyse interprétative de la bioaccumulation du Cd par *C. fluminea*, dans nos conditions d'exposition. Les résultats indiquent que la bioaccumulation n'est pas uniquement et directement liée à la concentration du métal dans l'eau et au concept de biodisponibilité, souvent évoqué dans la littérature. Elle résulterait en fait de la superposition de mécanismes impliquant d'une part, la prépondérance du Cd dans la fraction dissoute (fraction "biodisponible") et, d'autre part, les activités de ventilation des organismes, influencées par la présence des nutriments au sein de la colonne d'eau et conditionnant les capacités de transfert à partir du milieu environnant. Dans tous les cas, la bioturbation des sédiments riches en Cd par les tubificidés, en augmentant la concentration en MES dans la colonne d'eau (turbidité), génère un relargage important du métal mais ce dernier, quasi-exclusivement sous forme particulaire, n'est pas biodisponible pour les bivalves, quelle que soit leur activité de ventilation.



**Figure III.53.** Concentrations moyennes des 9 métaux étudiés dans le sédiment de Cajarc. Moyennes  $\pm$  erreur-standards (N = 3).



Mentionnons que des études sont en cours pour étudier, dans nos conditions expérimentales, les mouvements d'ouverture et de fermeture des valves de *C. fluminea*, en présence et en absence de bioturbation et également avec ou sans apports cycliques d'algues dans les UEs.

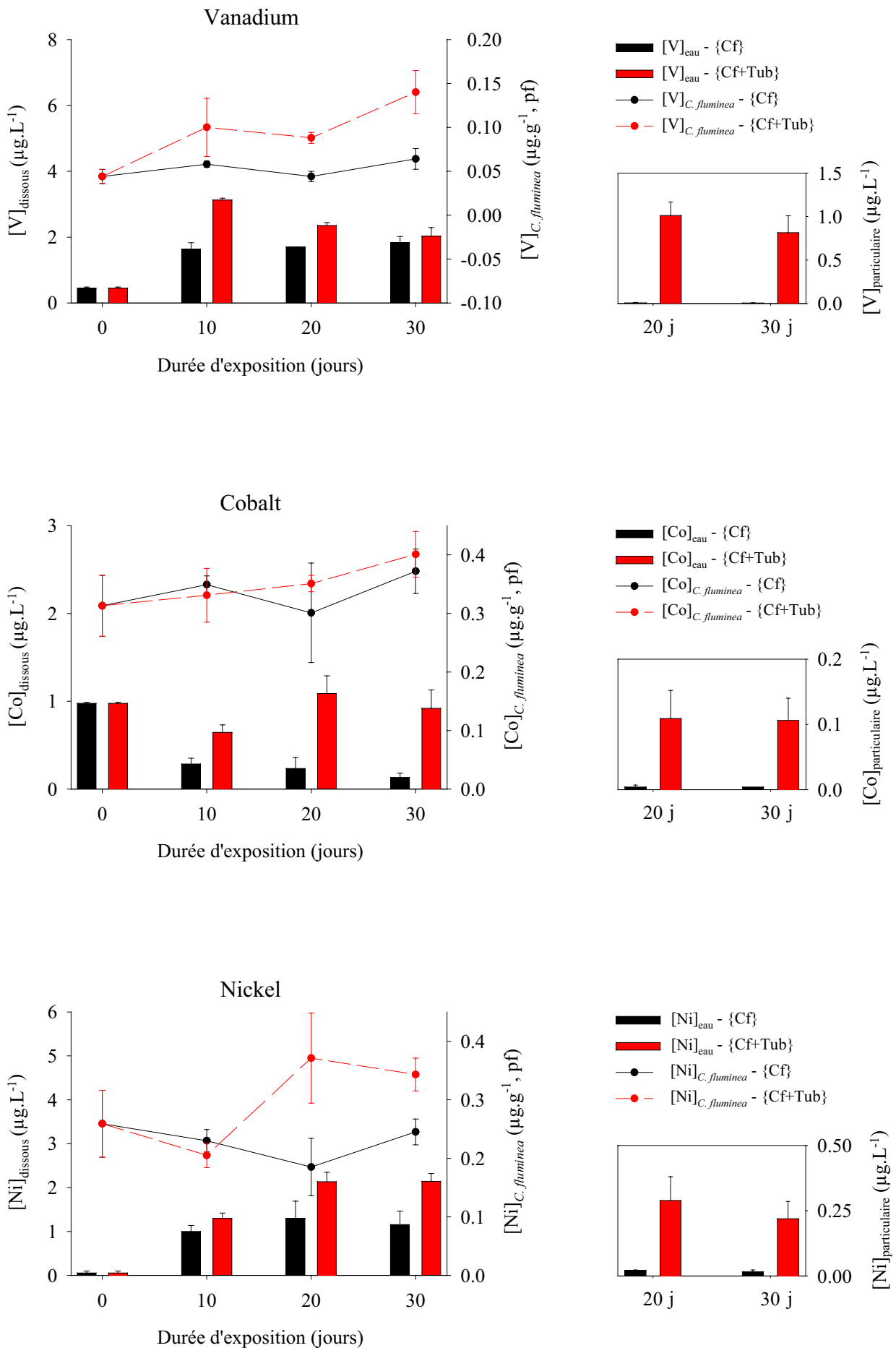
### III.C.2.2. Transferts de neuf autres métaux présents dans le sédiment : approche exploratoire

Dans l'expérience présentée dans la Partie III.3.C.2.1.1, des échantillons d'eau (filtrés à 0,2  $\mu\text{m}$  et non filtrés) et des bivalves ont été dosés à l'aide d'une technique multi-élémentaire (ICP MS), afin d'analyser les transferts d'une dizaine de métaux, autres que le cadmium, présents dans le sédiment de Cajarc. Rappelons que ces métaux, stockés en amont de la retenue du barrage hydro-électrique sur la rivière Lot, ont une origine naturelle mais proviennent principalement des rejets d'origine industrielle en amont, *via* le Riou-Mort (cf Figure I.1). Les métaux analysés ont été : le cobalt (Co), le cuivre (Cu), le molybdène (Mo), le nickel (Ni), le plomb (Pb), le thorium (Th), l'uranium (U), le vanadium (V) et le zinc (Zn).

Précisons dès à présent que le temps imparti ne nous a pas permis d'approfondir les données bibliographiques relatives au comportement de ces éléments dans les écosystèmes aquatiques, en particulier leurs transferts entre le sédiment et la colonne d'eau et leur biodisponibilité à l'égard des organismes benthiques. Notre objectif dans le cadre de ce mémoire repose donc sur une présentation synthétique de l'ensemble des résultats obtenus, cette présentation revêtant un caractère descriptif et exploratoire ; elle devra être complétée et approfondie ultérieurement.

Les concentrations des différents métaux présents dans le sédiment de Cajarc au temps zéro de l'expérience sont présentées sur la Figure III.53. Les deux éléments les plus abondants sont le zinc ( $3622 \pm 177 \text{ mg.kg}^{-1}$ , ps) et le plomb ( $406 \pm 23 \text{ mg.kg}^{-1}$ , ps). Il y a ensuite le cuivre ( $76,9 \pm 4,6 \text{ mg.kg}^{-1}$ , ps), puis le nickel ( $36,1 \pm 1,7 \text{ mg.kg}^{-1}$ , ps), le vanadium ( $25,5 \pm 1,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ , ps) et le cobalt ( $15,9 \pm 0,6 \text{ mg.kg}^{-1}$ , ps). Enfin, le thorium ( $5,7 \pm 0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ , ps), l'uranium ( $2,8 \pm 0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ , ps) et le molybdène ( $0,3 \pm 0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ , ps) possèdent les concentrations les plus faibles.

Pour les 4 conditions expérimentales, {Sdt}, {Cf}, {Tub} et {Cf+Tub}, les concentrations métalliques, sous formes dissoute et particulaire, ont été mesurées dans la



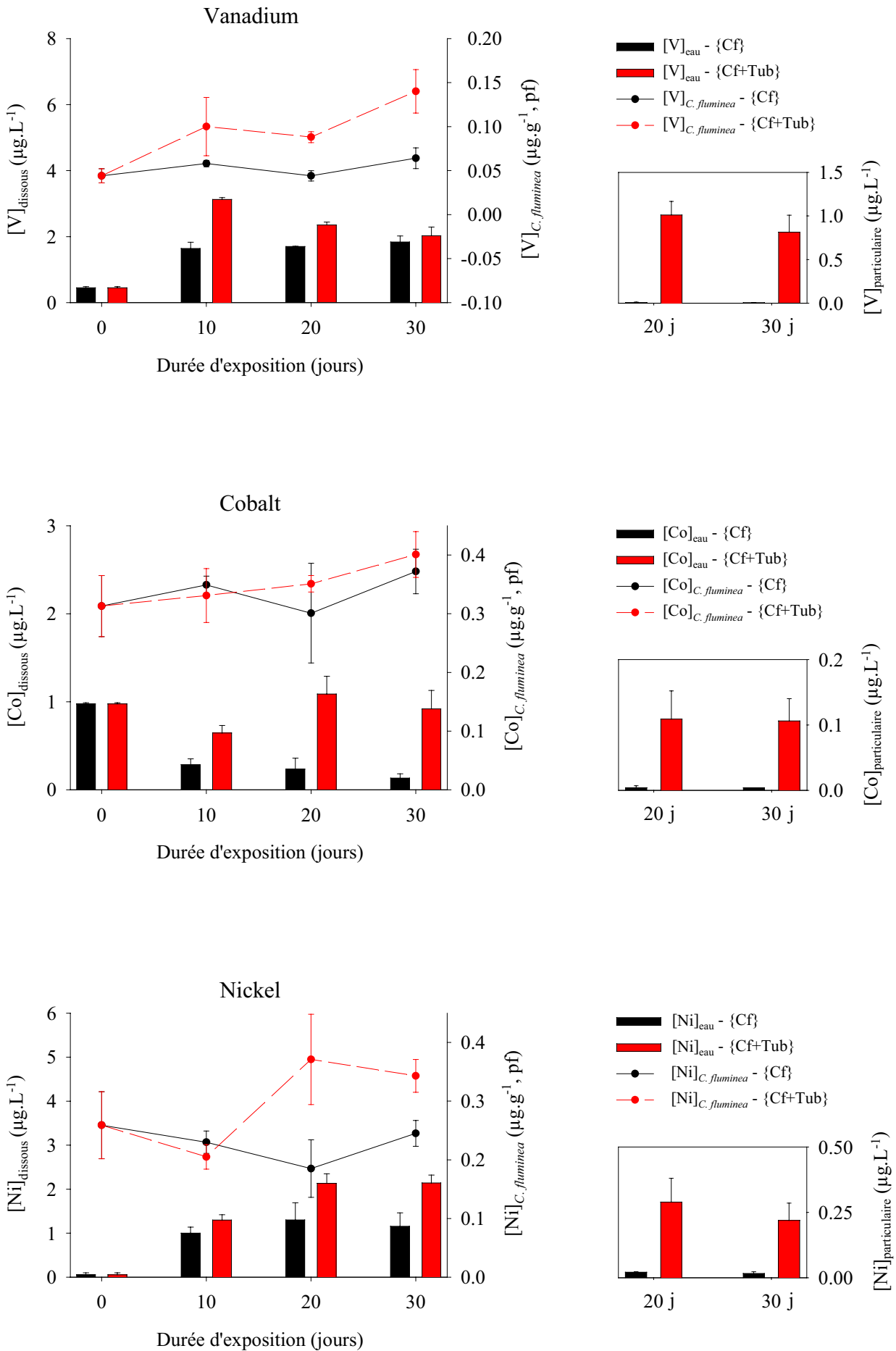
**Figure III.54.(1)** Concentrations des 9 métaux étudiés dans *C. fluminea* et dans la colonne d'eau, sous forme dissoute et particulaire (filtration à 0,2  $\mu\text{m}$ ), en fonction du temps et de la condition expérimentale : {Cf}, *C. fluminea* et {Cf+Tub}, *C. fluminea* et tubificidés.

colonne d'eau, mais nous avons choisi de ne montrer que celles correspondant aux 2 conditions {Cf} et {Cf+Tub}, qui contiennent des bivalves filtreurs, afin de centrer cette étude sur la biodisponibilité à l'égard des bivalves et de préciser l'impact de la bioturbation sur les transferts métalliques. La Figure III.54 présente l'évolution des concentrations des 9 métaux dans la colonne d'eau, sous forme dissoute et particulaire, et dans les bivalves *Corbicula fluminea*.

Les concentrations dans la phase particulaire ont été mesurées aux temps 20 et 30 jours, pour les deux conditions {Cf} et {Cf+Tub} ; elles sont représentées sur les deux graphes relatifs à chaque élément par les batonnets noirs et rouges. Pour tous les métaux analysés et en absence de bioturbation, condition {Cf}, les concentrations sous forme particulaire restent très faibles, entre 0,001  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le thorium et 2,1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le zinc, après 30 jours. Dans les UEs renfermant des tubificidés, condition {Cf+Tub}, les concentrations en métaux particuliers sont très nettement supérieures, pour tous les métaux : les valeurs moyennes minimales et maximales vont de 0,01  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le molybdène et 28,2  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le zinc, en fin d'expérience. Une nouvelle fois, les concentrations métalliques mesurées dans la fraction particulaire de la colonne d'eau sont dépendantes de la bioturbation. Les mesures de turbidité (cf Figure III.37) indiquaient précédemment que les concentrations de MES dans l'eau sont très proches aux temps 20 et 30 jours pour la condition {Cf+Tub}, en accord globalement avec les mesures des concentrations métalliques. Rappelons toutefois que la turbidité en présence des tubificidés était plus importante en début d'expérience (valeurs maximales après 10 jours environ).

L'évolution des concentrations au sein de la phase dissoute présente des différences importantes selon le métal étudié, avec dans tous les cas, un effet significatif des facteurs "temps" et "condition expérimentale" (ANOVA à 2 facteurs). Pour la condition renfermant uniquement les bivalves {Cf} et en fin d'expérience (30j), les concentrations métalliques dissoutes oscillent entre 0,13  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le cobalt et 130  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le zinc. En présence des tubificidés, condition {Cf+Tub}, elles sont comprises entre 0,12  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour l'uranium et 61  $\mu\text{g.L}^{-1}$  pour le zinc. Deux ensembles de métaux se différencient très nettement en fonction des écarts entre les concentrations mesurées dans la fraction dissoute, en présence et en absence de bioturbation :

- (i) les concentrations en métal dissous sont significativement plus élevées lorsqu'il n'y a pas de bioturbation (condition {Cf} en noir sur les graphes). C'est le cas du cadmium mais aussi du cuivre, du zinc et de l'uranium ;



**Figure III.54.(1)** Concentrations des 9 métaux étudiés dans *C. fluminea* et dans la colonne d'eau, sous forme dissoute et particulaire (filtration à 0,2  $\mu\text{m}$ ), en fonction du temps et de la condition expérimentale : {Cf}, *C. fluminea* et {Cf+Tub}, *C. fluminea* et tubificidés.

- (ii) les concentrations en métal dissous sont significativement plus élevées dans les unités bioturbées (condition {Cf+Tub} en rouge). C'est le cas du vanadium, du cobalt, du nickel, du molybdène et du plomb, les écarts étant très marqués pour Co (x 5 en moyenne), Mo (x 3,5 en moyenne) et Pb (x 8 en moyenne).

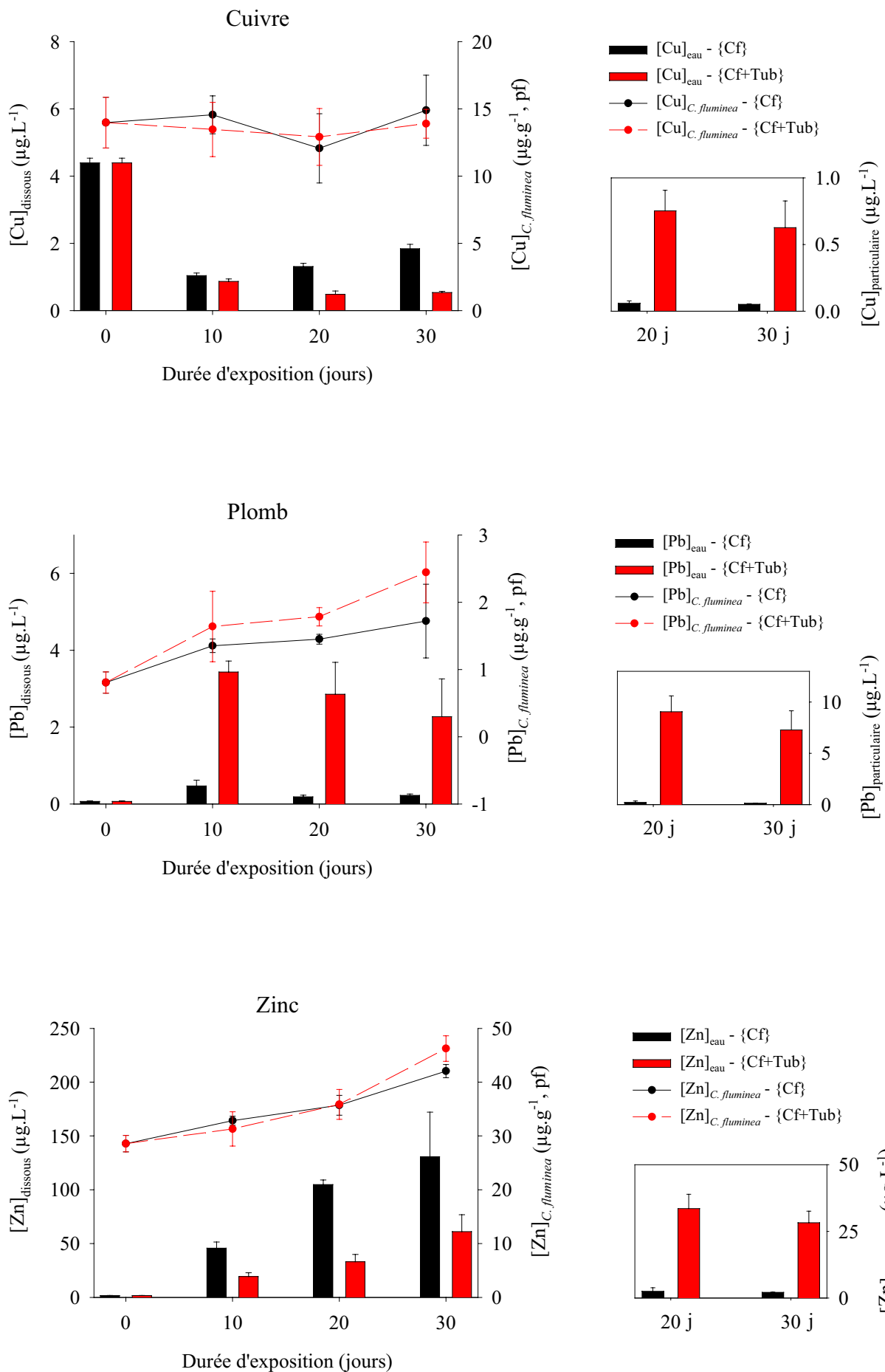
Il est important de souligner les différences entre les concentrations moyennes mesurées pour les deux fractions métalliques "dissoute" et "particulaire" : en effet, en présence de bioturbation, les valeurs dans la fraction dissoute sont comparativement beaucoup plus élevées. Par exemple, pour le molybdène, le rapport  $[Mo_{dis}]/[Mo_{part}]$  est proche de 250 au temps 30 jours. Seul le plomb et le zinc sont caractérisés par une distribution inverse ( $[M_{dis}]/[M_{part}] = 0,25$  et  $0,45$  respectivement, au temps 30j).

En absence de vers, les transferts métalliques vers la colonne d'eau sont générés par des processus de diffusion à l'interface avec le sédiment et se traduisent par la très forte dominance de la fraction dissoute. En présence de bioturbation, le rôle prépondérant joué par la fraction dissoute pour certains métaux (V, Co, Ni, Mo, U, Cu) peut être lié à deux processus, agissant isolément ou conjointement : (i) les métaux peuvent être relargués dans la colonne d'eau sous forme particulaire, complexés avec les MES, et une fois dans l'eau, ils peuvent passer en phase dissoute ; les métaux peuvent être relargués directement sous forme dissoute dans la colonne d'eau, l'activité de bioturbation des vers amplifiant les processus de diffusion du sédiment vers la colonne d'eau, en augmentant par exemple la concentration en métaux dissous dans l'eau interstitielle des sédiments.

Une analyse comparative des bilans de masse des métaux en fin d'expérience (Tableau III.17), reposant sur les teneurs métalliques moyennes dans le compartiment sédimentaire au temps zéro ( $[M] \times 800$  g, ps) et sur celles mesurées dans la colonne d'eau en fin d'expérience, avec ou sans tubificidés ( $[M_{dis+part}] \times 2$  L), met en évidence les très faibles quantités transférées, au regard de celles contenues dans le sédiment ; si la bioturbation par les tubificidés accroît les transferts globaux pour la majorité des éléments étudiés, ceux-ci demeurent néanmoins quantitativement très faibles, dans nos conditions expérimentales.

Quels sont les liens entre les transferts métalliques au sein de la colonne d'eau et les cinétiques d'accumulation dans le corps mou des bivalves ?

Les concentrations moyennes des neuf métaux mesurées au temps zéro et après 10, 20 et 30 jours d'exposition sont reportées sous forme de lignes brisées sur les graphes de la Figure III.54. Un point commun entre tous les métaux concerne la faible, voire très faible, capacité de bioaccumulation, dans nos conditions expérimentales : en effet, les rapports entre les



**Figure III.54.(3)** Concentrations des 9 métaux étudiés dans *C. fluminea* et dans la colonne d'eau, sous forme dissoute et particulaire (filtration à 0,2  $\mu\text{m}$ ), en fonction du temps et de la condition expérimentale : {Cf}, *C. fluminea* et {Cf+Tub}, *C. fluminea* et tubificidés.

concentrations moyennes mesurées au temps 30j et celles caractérisant les niveaux de base au temps zéro vont de 1 (pas d'accumulation significative) pour Mo, U et V (condition "sans vers") et Cu, jusqu'à 3,5 pour Th. De même, si la présence des tubificidés accroît significativement les concentrations métalliques dans le corps mou des bivalves pour la majorité des éléments étudiés (V, Ni, U, Cd, Zn), au temps 30 jours, les écarts observés sont relativement faibles.

Une analyse métal par métal met en évidence :

- pour le vanadium, il n'y a pas de bioaccumulation significative dans les bivalves en absence de bioturbation, alors que les concentrations mesurées dans la fraction dissoute sont proches de  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  aux temps 10, 20 et 30 jours. Par contre, en présence des tubificidés, les concentrations mesurées en fin d'expérience sont en moyenne 1,6 fois supérieures à celles du temps zéro, et ce pour des pressions de contamination *via* la fraction dissoute dans la colonne d'eau peu différentes. Dans ces conditions, un rôle important peut être attribué à la fraction particulaire et à la voie trophique de contamination.

- pour le cobalt, nos résultats ne mettent pas en évidence une bioaccumulation significative, en présence et en absence de bioturbation. La concentration en Co dissous dans l'eau au temps zéro est relativement élevée ( $1\mu\text{g.L}^{-1}$ ) et elle diminue très nettement dès le temps 10 jours, en absence de bioturbation : le sédiment ne représente pas, dans nos conditions expérimentales, une source de contamination à l'égard de la colonne d'eau. En présence de tubificidés, les concentrations dans la fraction dissoute ne diminuent pas au cours du temps, avec une fraction particulaire dont la concentration moyenne est environ 10 fois plus faible que celle de la fraction dissoute, aux temps 20 et 30 jours. Malgré cette différence entre les deux conditions d'exposition, la bioaccumulation dans le corps mou des bivalves ne diffère pas significativement (légère tendance linéaire d'augmentation pour la courbe rouge, en présence des vers). Un lien avec le caractère essentiel de cet élément peut être établi à ce niveau.

- pour le nickel, la bioaccumulation diffère selon les conditions expérimentales : en absence de bioturbation (courbe noire sur le graphe), les concentrations moyennes mesurées dans le corps mou ne sont pas significativement différentes en fonction des 4 temps d'exposition ; par contre, en présence des tubificidés, la bioaccumulation est significativement augmentée après 20 et 30 jours ( $\times 1,3$  à 30 jours). Les concentrations du métal dans les fractions dissoute et particulaire pourraient expliquer ces différences ; elles sont significativement différentes en faveur des unités bioturbées, mais une nouvelle fois, les concentrations mesurées dans la fraction dissoute sont environ 10 fois supérieures.

Métal	Teneur en métal dans le sédiment au temps zéro (µg)	Teneur en métal dans la colonne d'eau (30 j) sans organisme (µg)	Teneur en métal dans la colonne d'eau (30 j) avec tubificidés (µg)
Vanadium	20 000	4	6
Cobalt	13 000	0,4	2,5
Nickel	29 000	2,4	4,5
Molybdène	240	2	10
Uranium	2 200	3	0,4
Cuivre	62 000	4	3
Plomb	325 000	0,4	18
Zinc	2 900 000	260	200
Cadmium	68 000	3	1

**Tableau III.17.** Teneurs métalliques estimées dans le compartiment sédimentaire au temps zéro (0,8 kg, ps par unité expérimentale) et dans la colonne d'eau au temps 30 jours, sans organismes et avec tubificidés.



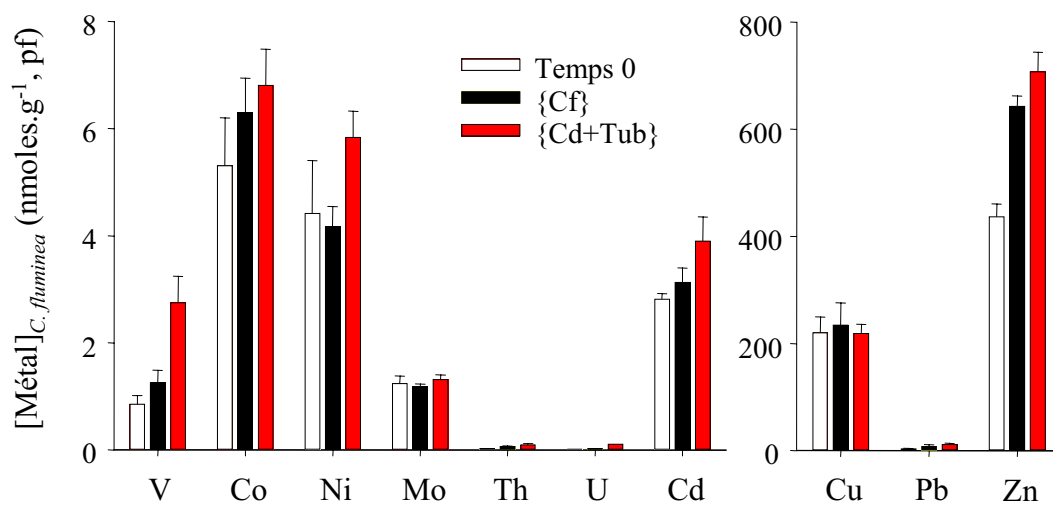
- pour le cuivre, aucune bioaccumulation significative n'est observée, quelles que soient la durée d'exposition et la condition expérimentale ( $14,9 \pm 2,6 \mu\text{g.g}^{-1}$ , pf pour {Cf} et  $13,9 \pm 1,1 \mu\text{g.g}^{-1}$ , pf pour {Cf+Tub}, au temps 30j). Le cuivre est un métal essentiel. Il existe de nombreux mécanismes de régulation de sa concentration au niveau tissulaire et cellulaire (processus homéostasiques). De plus, les concentrations métalliques dans la fraction dissoute sont beaucoup plus faibles à 10, 20 et 30 jours qu'au début de l'expérience, à cause d'un niveau relativement élevé dans l'eau du réseau, et également à cause des très faibles capacités de transfert de ce métal à partir du sédiment .

- pour le plomb, les concentrations dans les bivalves des deux conditions augmentent avec le temps jusqu'à  $1,7 \pm 0,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ , pf pour {Cf} et  $2,4 \pm 0,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ , pf pour {Cf+Tub} à 30 jours. L'absence de différence entre les conditions est surprenante étant donné les concentrations nettement plus élevées du plomb en phase dissoute et en phase particulaire en présence des vers. En fait, l'observation des graphes met en évidence des écarts systématiques entre les concentrations moyennes en faveur de la condition "avec vers" ; la variabilité des mesures et les effectifs analysés ne permettent pas de conclure à la significativité des différences.

- pour le zinc, l'effet "temps" est significatif, sans différence entre les deux conditions. Au temps 30 jours, les concentrations moyennes sont de  $42,1 \pm 1,2 \mu\text{g.g}^{-1}$ , pf pour {Cf} et  $46,2 \pm 2,4 \mu\text{g.g}^{-1}$ , pf pour {Cf+Tub}. Les concentrations métalliques mesurées dans l'eau de ces deux conditions ne sont pourtant pas identiques. Sous forme dissoute, elles sont plus élevées en absence de vers, alors que sous forme particulaire, c'est en présence des vers qu'elles sont les plus grandes. Puisque les cinétiques d'accumulation du zinc sont identiques avec et sans vers, il est logique de penser que les bivalves peuvent accumuler le zinc à la fois sous forme dissoute et particulaire. Notons que ce métal est aussi un élément essentiel.

- pour le molybdène, les concentrations dans le corps mou de *C. fluminea* ne varient pas significativement avec le temps, ni avec la condition expérimentale. La concentration mesurée après 30 jours est de  $0,11 \pm 0,01 \mu\text{g.g}^{-1}$ , pf pour {Cf} et  $0,13 \pm 0,01 \mu\text{g.g}^{-1}$ , pf pour {Cf+Tub}. Les concentrations en molybdène dissous et particulaire sont faibles pour la condition {Cf} pendant toute l'expérience, et peuvent expliquer l'absence d'accumulation chez les bivalves. Par contre, pour la condition {Cf+Tub}, les concentrations dans l'eau sont assez élevées, en particulier pour le molybdène dissous qui ne serait pas biodisponible ou qui serait une nouvelle fois régulé, eu égard à son rôle d'élément essentiel.

- pour le thorium, tous les dosages effectués sur les échantillons dissous ont été inférieurs à la limite de détection et n'ont donc pas été reportés sur le graphe. Il existe un effet



**Figure III.55.** Concentrations des 10 métaux étudiés dans *C. fluminea* à 30 jours, en fonction de la condition expérimentale : {Cf}, *C. fluminea* et {Cf+Tub}, *C. fluminea* et tubificidés. Moyennes  $\pm$  erreur-standards (N = 3).

significatif du facteur temps sur l'accumulation par les bivalves, mais il n'y a pas d'effet significatif de la condition expérimentale, malgré des concentrations en phase particulaire nettement plus élevées pour la condition {Cf+Tub}.

- pour l'uranium, l'analyse statistique met en évidence un effet significatif du temps et de la condition expérimentale sur l'accumulation par *C. fluminea*. Il n'y a pas d'accumulation significative de l'uranium pour la condition {Cf}, et ce malgré des concentrations proches de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  dans la fraction dissoute. Pour la condition {Cf+Tub}, la bioaccumulation significativement supérieure aux temps 20 et 30 jours peut être attribuée à la fraction particulaire, avec toutefois des concentrations qui sont très faibles par rapport à la fraction dissoute.

Afin de visualiser simultanément les différents niveaux de bioaccumulation des 10 métaux étudiés, nous avons reporté graphiquement les concentrations moyennes mesurées au temps zéro (référentiel) et celles caractérisant les deux conditions expérimentales, {Cf} et {Cf+Tub}, en exprimant les niveaux d'accumulation sur la base des concentrations molaires, afin de tenir compte des différences importantes entre les éléments (Figure III.55). Cette représentation normalise les données et permet une comparaison directe sur la base du nombre d'atomes métalliques par unité de poids. Les écarts entre les dix éléments étudiés sont très marqués, un facteur proche de 1800 séparant les concentrations du zinc, élément essentiel, de celles de l'uranium, en présence de bioturbation. Comme nous l'avons mentionné précédemment, les effets des deux conditions d'expositions étudiées ({Cf} et {Cf+Tub}) sur la bioaccumulation par *C. fluminea* diffèrent très nettement selon l'élément considéré. Par exemple, pour les deux éléments essentiels majeurs, les concentrations mesurées après 30 jours sont significativement augmentées pour le zinc alors qu'aucune différence significative n'est observée pour le cuivre.



**PARTIE IV**

**SYNTHESE GENERALE  
ET PERSPECTIVES**



*Nous avons souhaité terminer ce mémoire en dégagant les principaux résultats de nos recherches et leurs implications dans l'étude de l'impact des organismes benthiques, via la bioturbation des sédiments, sur leur environnement et sur le devenir des métaux dans les écosystèmes aquatiques continentaux.*

*Le plan que nous avons adopté pour la présentation et la discussion de nos résultats a été basé sur une progression dans l'étude des mécanismes de bioturbation et de leurs effets sur les flux métalliques, en analysant séparément les sources initiales de contamination – sédiment et colonne d'eau – et les modèles biologiques utilisés en tant qu'agents de bioturbation – larves d'*Hexagenia rigida* et tubificidés.*

*Dans cette synthèse, nous avons suivi comme fil directeur la comparaison des deux agents de bioturbation, notre objectif étant de dégager les principaux acquis résultants de nos recherches et leur originalité par rapport à l'état actuel des connaissances. Ce bilan comparatif a nécessité un choix parmi les résultats obtenus, afin de confronter les données acquises dans des conditions expérimentales similaires, au regard du type d'unité utilisé, de l'origine et de la nature du sédiment, de la durée d'exposition, ... Notons que pour ce dernier facteur, nous avons sélectionné les résultats correspondant à une durée allant de 0 à 20-30 jours.*

*Nous allons dans un premier temps comparer les activités de bioturbation des larves d'*H. rigida* et des tubificidés, en terme de structures biogènes, de transport du sédiment et de conséquences sur le granoclassement, sur les profils d'oxygène et sur la turbidité au sein de la colonne d'eau.*

*Les conséquences de l'activité de bioturbation générée par ces deux organismes sur le devenir du cadmium présent initialement dans le compartiment sédimentaire des unités expérimentales (source "sédiment") seront ensuite développées. En particulier, nous aborderons les principaux résultats relatifs aux transferts du métal vers la colonne d'eau ; la biodisponibilité du cadmium transféré vis-à-vis du bivalve benthique *Corbicula fluminea* ; la bioaccumulation par les deux agents de bioturbation (*H. rigida* et tubificidés).*

*Nous terminerons cette synthèse par l'impact de la bioturbation sur les transferts métalliques depuis la colonne d'eau vers le sédiment (source "eau") et ses conséquences, en terme de bioaccumulation par les organismes et de perturbation des activités de bioturbation.*



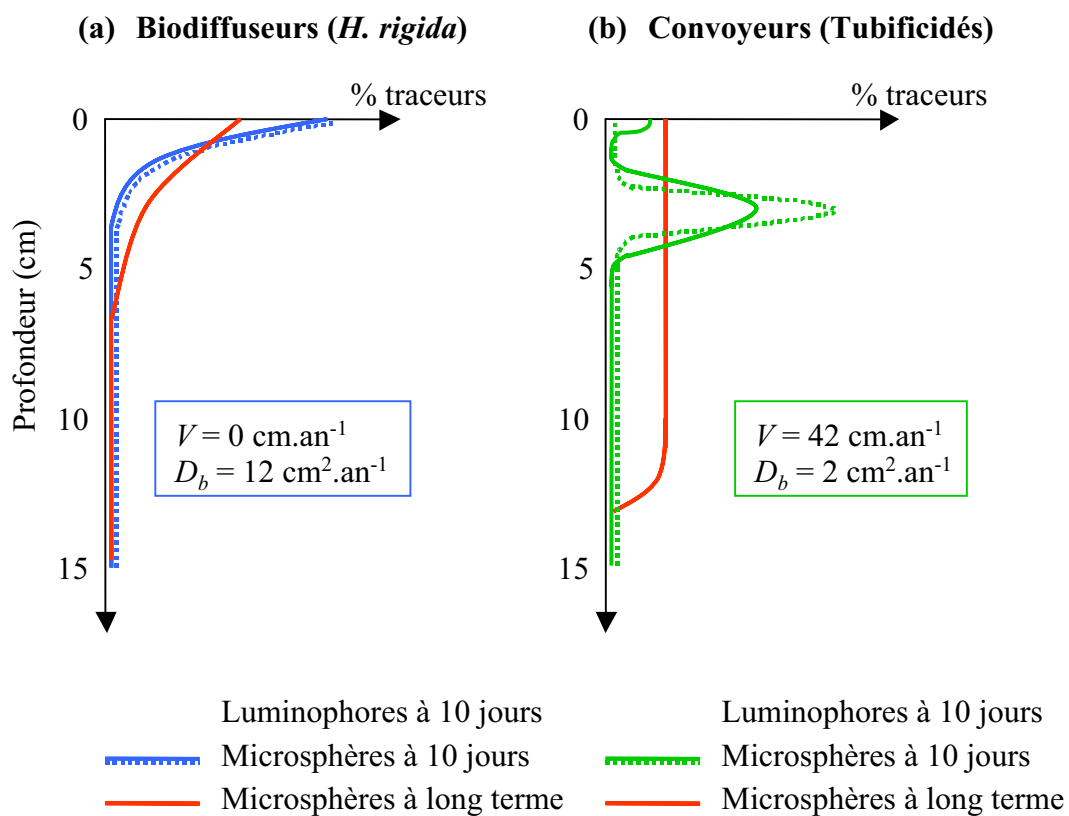


## Etude de la bioturbation

### *Structures biogènes*

L'étude de l'activité des stades larvaires d'*H. rigida* à l'intérieur du sédiment par radioscopie RX a montré que ces organismes sont à l'origine d'un important réseau de structures biogènes. Les galeries ont une forme tubulaire, avec une entrée et une sortie permettant l'irrigation du terrier et l'apport d'oxygène pour la respiration des larves. Elles n'ont pas une forme en "U" parfaitement symétrique, comme cela est souvent décrit dans la littérature, et possèdent peu de ramifications secondaires. En utilisant la même technique d'analyse, Charbonneau *et al.* (1997) et Charbonneau et Hare (1998) avaient observé des terriers anastomosés, mais dans des conditions contraignantes pour ces organismes, compte-tenu du volume limité du sédiment, conduisant à un recoupement fréquent des terriers. Dans nos conditions expérimentales, ces galeries descendent jusqu'au fond du compartiment sédimentaire, c'est-à-dire à 5 cm, avec, sur les images RX, un effet d'obstacle du fond des enceintes, indiquant des potentialités de creusement plus en profondeur. Nos estimations de l'accroissement du volume des galeries par unité de temps, à partir de conditions réductionnistes (1 larve/unité – durée maximale : 96 h), indiquent une valeur moyenne élevée, proche de  $1 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ . Ces résultats mettent en évidence une intense activité de bioturbation/biodiffusion, qui doit être quasi-permanente en absence de facteurs limitants (volume de sédiment par exemple) ; comme nous le verrons plus loin, les mesures de turbidité au sein de la colonne d'eau, reflétant la remise en suspension des particules sédimentaires, sont en accord avec cette hypothèse.

Dans nos conditions expérimentales, les structures biogènes construites par les vers tubificidés n'ont pas pu être visualisées en radioscopie RX. Leur diamètre est en effet beaucoup trop petit par rapport à l'épaisseur du compartiment sédimentaire au sein des unités, pour entraîner une modification suffisante de la densité. Pour observer les galeries, il aurait fallu se placer dans des conditions plus adaptées, avec une très faible épaisseur de sédiment. Nos études radioscopiques, couplées à des analyses granulométriques, ont cependant révélé une profondeur croissante de la zone d'ingestion allant de 2,5 à 13 cm de profondeur. Cette information nous renseigne de façon indirecte sur l'étendue verticale des terriers construits par les tubificidés. Concernant la morphologie des galeries, rappelons à ce niveau un point important : les tubificidés construisent des galeries avec une seule entrée pouvant présenter



**Figure IV.1.** Profils théoriques de luminophores et de microsphères après un apport ponctuel de ces traceurs à la surface du sédiment, pour les larves de l'éphémère *Hexagenia rigida* (a), et pour les tubificidés (b).

$V$  : coefficient de bioadvection  
 $D_b$  : coefficient de biodiffusion

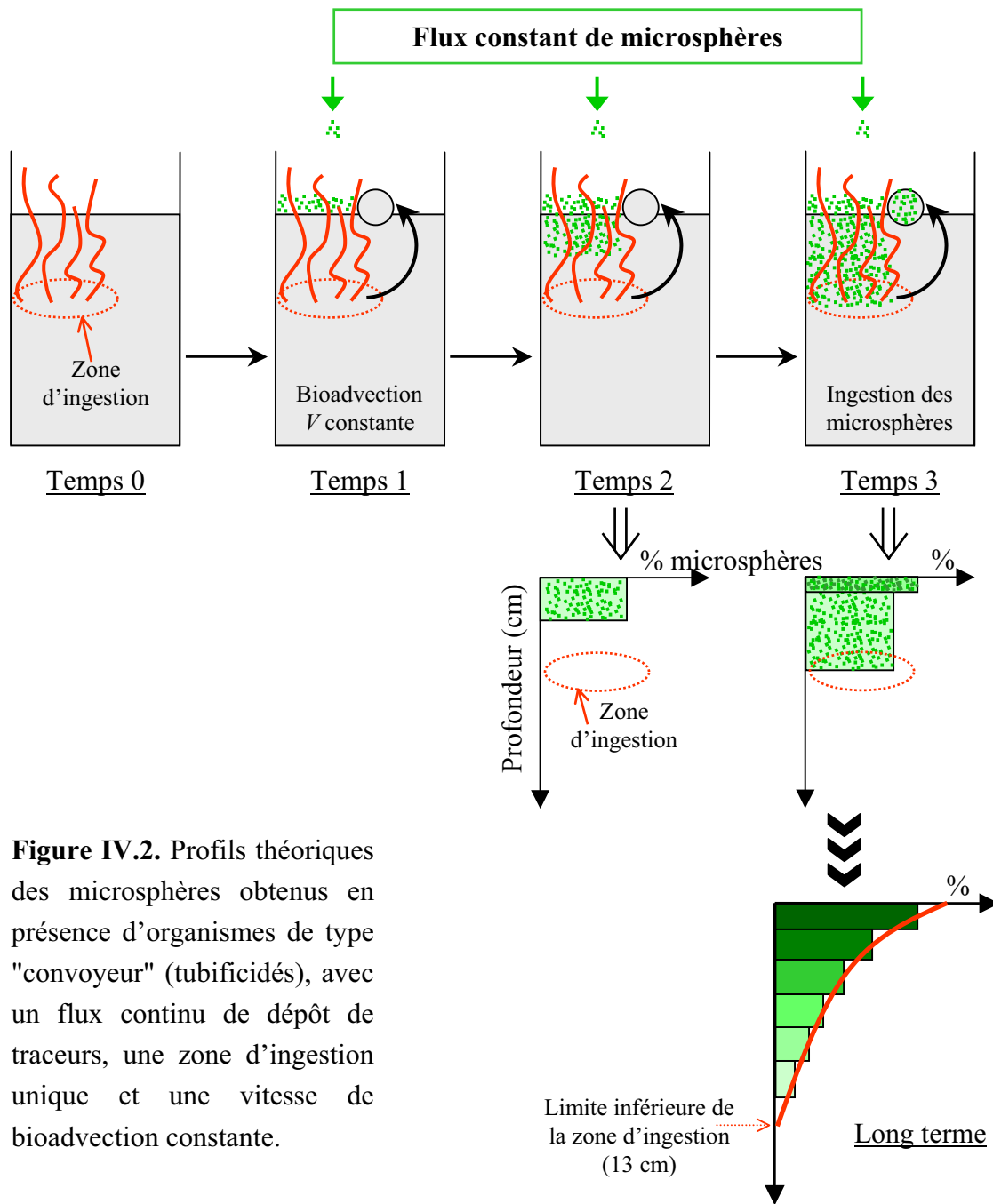
des ramifications (Roggar, 1980); il n'y a donc pas d'irrigation possible, au contraire des terriers d'*H. rigida*.

Bien que les deux types d'organismes utilisés soient à l'origine de la construction de galeries, l'étude de la géométrie de ces structures et de leur évolution dans le temps atteste de deux types de bioturbation différents, dont les effets sur la structure du sédiment doivent être distincts.

### ***Bioturbation et transport du sédiment***

Les traceurs particuliers fluorescents apportés ponctuellement à la surface du sédiment au temps zéro des expériences, ont confirmé que le mode de bioturbation des larves d'*H. rigida* est de type biodiffusif. Nous avons schématisé sur la Figure IV.1.(a) le devenir des traceurs sur un profil vertical "théorique", ceci afin de dégager les processus fondamentaux. L'intensité de la biodiffusion estimée à partir des données obtenues au temps 10 jours est de  $12,4 \text{ cm}^2.\text{an}^{-1}$ ; la vitesse de bioadvection est nulle. Dans nos conditions, la profondeur maximale de bioturbation dans le sédiment est comprise entre 3 et 5 cm. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Matisoff et Wang (2000). L'utilisation simultanée de deux tailles de traceurs particuliers (microsphères et luminophores : 1 et 63-100  $\mu\text{m}$ ) constitue une approche originale, qui nous a permis de montrer qu'avec le temps, les larves d'*H. rigida* n'induisent aucun granoclassement des particules sédimentaires (la distribution des deux types de traceurs a évolué de façon identique). La similarité des résultats obtenus avec les deux types de traceurs indique également que les coefficients de bioturbation mesurés sont directement applicables pour la majorité des particules constituant le spectre granulométrique du sédiment.

Les études similaires conduites avec les tubificidés ont confirmé leur mode de bioturbation de type bioadvectif (Figure IV.1.b). La vitesse de bioadvection est proche de  $40 \text{ cm}.\text{an}^{-1}$ , avec un coefficient de biodiffusion de  $2 \text{ cm}^2.\text{an}^{-1}$ . Ces résultats ont été confortés par l'étude radioscopique des sédiments, qui a permis de déterminer la profondeur maximale soumise à la bioadvection : 13 cm. Cette zone de perturbation est beaucoup plus profonde que celle des larves d'*H. rigida*. Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature, tant du point de vue du type et que de la vitesse de bioturbation des vers [Rhoads, 1974 ; Robbins *et al.*, 1979 ; Fisher *et al.*, 1980 ; Matisoff *et al.*, 1999; McCall et Fisher, 1980] et de leur profondeur maximale d'action [Davis, 1974]. En présence de tubificidés, la distribution verticale des microsphères diffère de celle des luminophores. Aucune donnée n'a été publiée,



**Figure IV.2.** Profils théoriques des microsphères obtenus en présence d'organismes de type "convoyeur" (tubificidés), avec un flux continu de dépôt de traceurs, une zone d'ingestion unique et une vitesse de bioadvection constante.

à notre connaissance, avec ce type de micro-particules. L'utilisation simultanée de traceurs de tailles différentes a démontré tout son intérêt dans cette étude, en mettant en évidence un type de remaniement distinct pour les particules les plus fines. Du fait de leur ingestion possible par les vers et de la localisation de la limite supérieure de la zone d'ingestion dans les premiers centimètres du sédiment, ces particules suivent plusieurs cycles de "bioadvection-ingestion". Ce mode de mélange, après un apport ponctuel en surface, conduira théoriquement à une homogénéisation des concentrations de microsphères sur toute la hauteur de la zone d'ingestion des vers. Toutefois, en présence de sédiment à large spectre granulométrique, l'accumulation des luminophores dans la limite inférieure de la zone d'ingestion révélera l'existence d'un granuloclassement, dont les caractéristiques seront approfondies plus loin.

Nous avons représenté sur la Figure IV.1 les profils de distribution verticale des microsphères dans le cadre d'une extrapolation des données dans une perspective à long terme (courbes théoriques en rouge sur les graphes). En présence des larves d'*H. rigida*, le profil vertical caractéristique du mélange biodiffusif (Guinasso et Schink, 1975) montre un décalage vers les couches un peu plus profondes avec une diminution de la concentration en surface. Il tend vers une homogénéisation des concentrations dans la couche de sédiment bioturbée. Dans le cas des tubificidés, la distribution des traceurs devient homogène et constante dans la zone d'ingestion des vers.

Au cours de nos expériences, nous avons toujours introduit simultanément les lots d'organismes dans les unités, au temps zéro, avec un apport ponctuel des traceurs fluorescents à la surface du sédiment le jour suivant. Ceci nous a permis de caractériser le mode de bioturbation et de quantifier l'intensité du remaniement sédimentaire. Les résultats montrent que les processus mis en jeu et leurs conséquences sur la distribution verticale des traceurs et sur leur évolution au cours du temps sont radicalement différents entre les deux modèles biologiques étudiés. Nous pouvons utiliser ces résultats pour simuler le devenir de traceurs particuliers s'ils sont apportés de manière constante au cours du temps, à la surface du sédiment (conditions stationnaires). En présence d'une activité de biodiffusion comme celle induite par *H. rigida*, les traceurs suivent une répartition exponentielle des concentrations avec la profondeur, dans toute la hauteur du sédiment bioturbé [Smith *et al.*, 1986/1987]. Par contre, une activité de bioadvection constante, comme celle générée par une population de vers tubificidés, couplée à une reprise des microsphères lorsqu'elles atteignent la zone d'ingestion, doit entraîner une distribution différente dont les mécanismes sont explicités sur la Figure IV.2. La superposition en surface des flux apportés par la colonne d'eau et par les organismes crée un profil avec un maximum de concentration en surface, diminuant avec la



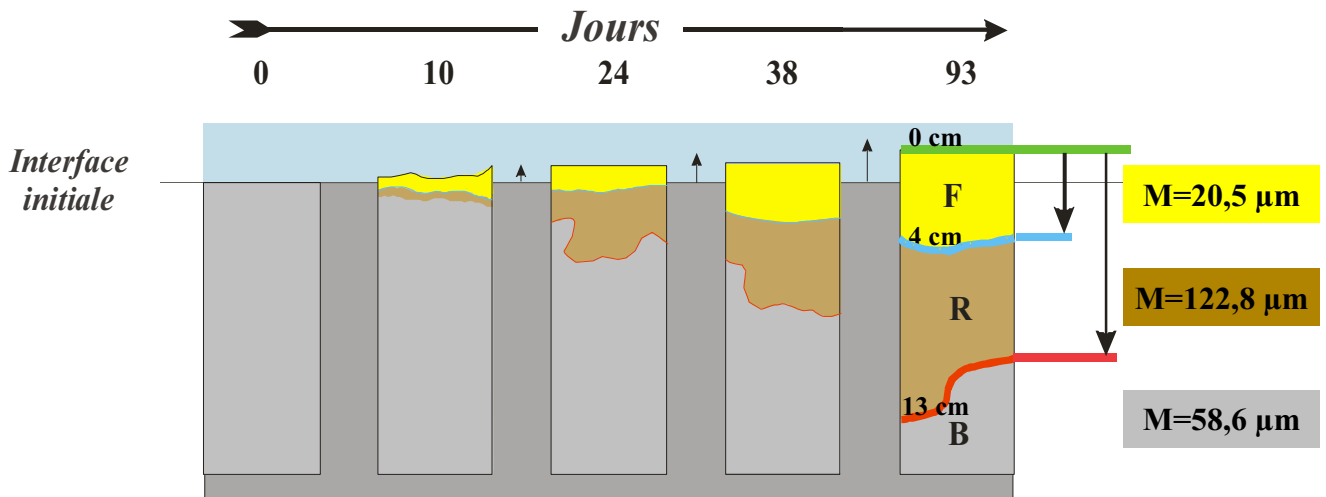
profondeur et dont les caractéristiques sont directement dépendantes d'une part, de l'intensité relative des apports externes et, d'autre part, de la vitesse de bioadvection et de la présence d'un granoclassement (Rice, 1986 ; Robbins, 1986). L'extrapolation de ces deux modes de bioturbation en conditions stationnaires d'apport externe, permettra d'interpréter les effets des organismes sur les flux de métaux, dans nos conditions expérimentales. En effet, la distribution des microsphères pourra être rapprochée des conditions de contamination par la source "colonne d'eau" et des transferts du cadmium, ou d'autres éléments, en présence de tubificidés.

Dans un objectif d'utilisation des intensités de remaniement sédimentaires mesurées dans cette étude sur des profils obtenus en milieu naturel, il est bon de rappeler que ces intensités sont, bien entendu, fortement influencées par de nombreux paramètres écologiques comme la densité des organismes, la diversité des espèces, la teneur en matière organique du sédiment et sa granulométrie, la température, etc...

### ***Conséquences en terme de granoclassement, de profils verticaux de l'oxygène dissous et de turbidité au sein de la colonne d'eau***

Nous avons étudié les conséquences des activités de bioturbation des larves d'*H. rigida* et des tubificidés sur certaines des caractéristiques physico-chimiques de la colonne d'eau et du sédiment : le granoclassement des particules sédimentaires, la pénétration de l'oxygène dissous dans le sédiment et la turbidité de la colonne d'eau. Nous n'avons pas étudié de façon exhaustive toutes les conséquences, très nombreuses comme nous l'avons souligné dans la synthèse bibliographique (Partie I.B.2 de ce mémoire), notamment à une micro-échelle. Mentionnons que lors de nos expériences, la perturbation des profils de plusieurs éléments dissous (nitrates, ammonium, fer et manganèse) et particulaires (fer et manganèse), sous l'influence de la bioturbation, a été étudiée par les techniques de microélectrodes ou par des dosages après séparation de l'eau interstitielle dans les différentes strates sédimentaires ; les contraintes matérielles ne nous ont pas permis d'analyser et donc de présenter dans ce mémoire les nombreuses données collectées.

Les traceurs fluorescents ayant montré qu'*H. rigida* n'induisait pas de granoclassement pour les particules dont la taille est comprise entre 1 et 100  $\mu\text{m}$  (microsphères et luminophores), c'est-à-dire la grande majorité du spectre de taille des particules du sédiment utilisé (sédiment de Cajarc), il n'a pas été nécessaire de poursuivre plus loin l'étude granulométrique. Les données bibliographiques relatives aux organismes convoyeurs, comme



**Figure IV. 3.** Mise en place des différentes zones au cours du temps, dans un sédiment habité par une population de tubificidés et moyenne granulométrique (M) des trois zones à 93 jours.

Zone F : dépôts à la surface des pelotes fécales (fresh superficial deposit)

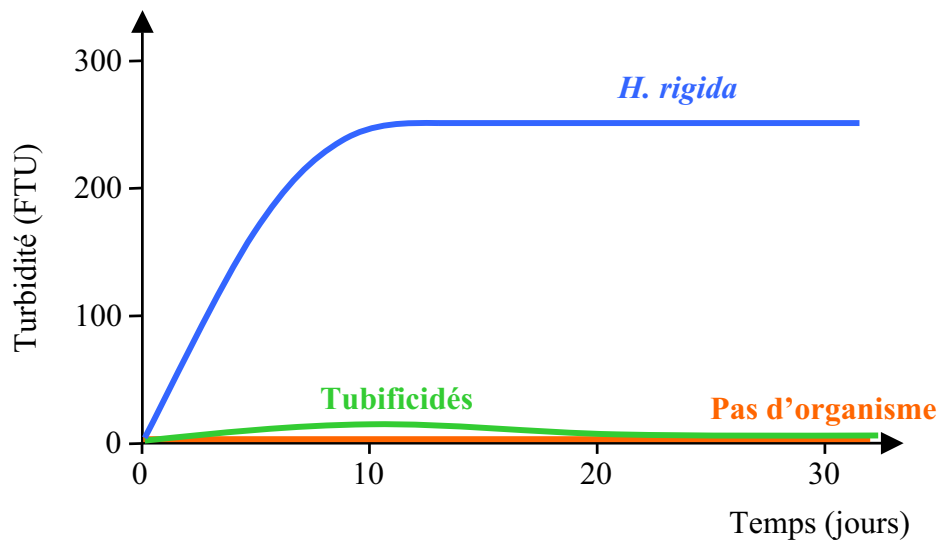
Zone R : couche d'ingestion des vers (reworked sediment)

Zone B : couche sédimentaire non perturbée (bulk sediment)



les vers tubificidés, indiquent un reclassement granulométrique des particules sédimentaires, en relation directe avec le spectre de taille des particules ingérées [Davis, 1974 ; Giangrande *et al.*, 2002 ; McCall et Fisher, 1980]. Nos résultats à partir des traceurs fluorescents ont clairement confirmé ces effets. Notre étude radioscopique et granulométrique a permis une mesure précise des tailles des particules ingérées par les tubificidés, les lots utilisés étant composés de trois espèces (*T. tubifex*, *L. hoffmeisteri* et *L. claparedeianus*), avec des longueurs différentes. Nous avons mis en évidence une ingestion préférentielle des argiles et des silts : 78 % des particules retrouvées dans les pelotes fécales sont inférieures à 63  $\mu\text{m}$  de diamètre. Nous avons également montré que la présence des tubificidés entraîne une modification complète du faciès du sédiment (Figure IV.3). Ainsi, la composante silto-sableuse initiale est re-distribuée en deux zones bien définies : une zone supérieure de vase silto-argileuse (zone F) et une zone sous-jacente de sable fin (zone R). Le sédiment initial non modifié apparaît plus en profondeur. Une stratification similaire avait été décrite par McCall et Fisher (1979) dans un sédiment colonisé par des tubificidés, mais ces auteurs n'avaient pas analysé l'évolution spatiale des différentes zones, ni l'évolution de leur granulométrie. La zone supérieure fine correspond à la couche de pelotes fécales rejetées en surface par les vers. Sa granulométrie est constante, avec une moyenne comprise entre 40 et 50  $\mu\text{m}$ , la taille maximale des particules ne dépassant pas 250  $\mu\text{m}$ . Sa teneur en eau est significativement plus élevée que le reste du sédiment. La zone intermédiaire sableuse correspond à la zone d'ingestion des vers. Cette zone perd progressivement sa fraction silto-argileuse, ingérée par les tubificidés, et s'enrichit en particules grossières. L'épaisseur des deux zones augmente avec le temps : 4 cm pour la couche de pelotes fécales et 9 cm pour la zone d'ingestion, après 93 jours. Un point fondamental et nouveau doit être souligné : les approches en imagerie et celles basées sur les analyses granulométriques indiquent un enfoncement progressif de la zone d'ingestion (zone R sur la Figure IV.3) : d'un point de vue fonctionnel, ce résultat est important, car il indique que malgré l'hétérogénéité de la taille des vers, la majorité des organismes ingèrent au cours des 10 premiers jours du sédiment de surface, avec ensuite un enfoncement progressif de la zone d'ingestion, la limite entre les couches F (pelotes fécales) et R n'étant pas horizontale et ne traduisant pas un effet "paroi".

Comme les pelotes fécales produites par les tubificidés sont constituées de particules fines agglomérées par du mucus, la porosité de la couche de surface, et donc sa teneur en eau, sont augmentées. Les possibilités de diffusion de l'oxygène dissous dans le sédiment, à partir de la colonne d'eau, sont donc accrues. Les mesures réalisées avec les microélectrodes

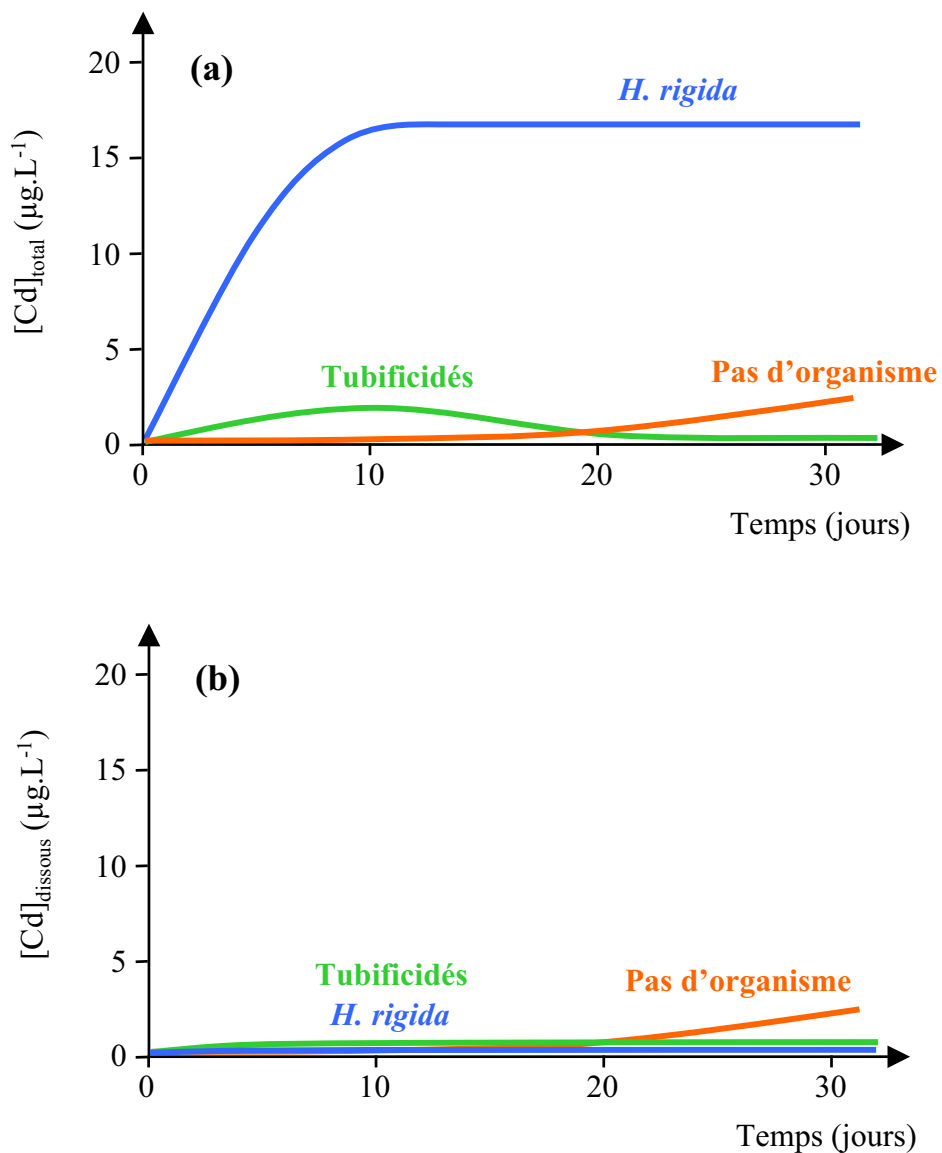


**Figure IV.4.** Représentation schématique de l'évolution de la turbidité en fonction du temps, dans des unités expérimentales renfermant aucun organisme, des larves d'*Hexagenia rigida* ou des tubificidés.

montrent que les profils d'oxygène ne sont pas modifiés en présence des tubificidés, par rapport à un sédiment sans organismes : la profondeur de l'oxycline reste globalement la même. Par leur bioadvection, les vers ramènent constamment à la surface du sédiment des composés réduits et de la matière organique (sulfures,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ , mucus produit par les vers eux-mêmes, matière organique détritique, bactéries, ...). Dans ces conditions, l'oxygène qui diffuse dans la couche de pelotes fécales doit être très rapidement consommé pour réoxyder les composés réduits et oxyder/minéraliser la matière organique. Ceci est amplifié par le fait que, au contraire d'*H. rigida*, les tubificidés n'irriguent pas leurs terriers et n'entraînent donc pas d'oxygène en profondeur dans le sédiment. Rappelons que McCall et Fisher (1980) ont mesuré une augmentation de la demande en oxygène du sédiment d'un facteur 2 en présence de tubificidés. En favorisant les processus anaérobies et la consommation d'oxygène à l'interface "eau-sédiment", la bioadvection par ce type d'organismes empêche la diffusion de l'oxygène favorisée par l'augmentation de la porosité de l'interface.

Nous n'avons pas pu disposer des microélectrodes lors des expériences réalisées avec *H. rigida* (phase I de nos recherches), mais, compte-tenu du mode de bioturbation de cette espèce, la bioirrigation des terriers doit entraîner un enrichissement hétérogène en oxygène des différentes couches sédimentaires. Les galeries creusées par ces larves d'insecte augmentent fortement la surface d'échange entre le sédiment et la colonne d'eau ; l'oxygène diffuse dans les terriers, créant une zone oxydée en halo, tout autour de leurs parois. A la vue de ces résultats, nous pouvons nous attendre à l'absence de stratification homogène de l'oxygène dans le sédiment [Wang *et al.*, 2001]. L'intensité des flux de cet élément à travers les parois des galeries et donc l'épaisseur du halo de diffusion, seront fonction de la concentration en oxygène dans les galeries, directement dépendante de l'activité de bioirrigation et de la perméabilité des parois [Aller, 1983]. Mentionnons à ce niveau que les moyens analytiques actuellement disponibles au sein de l'UMR 5805, notamment un couplage entre l'utilisation des micro-électrodes et une visualisation des larves au sein des terriers par imagerie vidéo infra-rouge (enceintes adaptées pour contraindre la fabrication des terriers contre une paroi de verre), devraient permettre l'acquisition d'informations complémentaires sur ces processus et sur leur évolution au cours du temps.

La bioturbation a des conséquences importantes sur les caractéristiques du sédiment mais elle modifie aussi indirectement les paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau. Les tubificidés et les stades larvaires d'*H. rigida* ont un impact sur la turbidité de l'eau, avec une intensité et une cinétique d'évolution différentes (Figure IV.4). Dans nos conditions, les larves d'*H. rigida* augmentent la turbidité jusqu'à des valeurs élevées, proches de 250 FTU. Cette



**Figure IV.5.** Evolution des concentrations en cadmium total (a) et en cadmium dissous (b) en fonction du temps, dans la colonne d'eau des unités expérimentales renfermant aucun organisme, des larves d'*Hexagenia rigida* ou des tubificidés.

Cd total : échantillons d'eau non filtrés

Cd dissous : échantillons d'eau filtrés à 0,2 µm

turbidité se maintient ensuite pendant toute la durée de l'expérience, soit 21 jours. Les tubificidés génèrent eux aussi un relargage de matières en suspension, mais il est transitoire et nettement plus limité : la turbidité passe par un maximum d'environ 10 FTU au bout d'une dizaine de jours. Il est intéressant de mentionner que l'effet observé en présence des vers est probablement maximisé par nos conditions expérimentales, reposant sur l'apport ponctuel, au temps zéro, des lots d'organismes dans les unités.

## **Impact de la bioturbation sur le devenir des métaux présents dans le compartiment sédimentaire**

*Ce bilan comparatif des résultats que nous avons obtenus avec les deux modèles de bioturbation s'appuie sur des conditions expérimentales similaires, au regard du type de sédiment étudié (sédiment de Cajarc), de la structure des unités (UEs de " type 1") et des conditions d'exposition (température, durée, ...). Seuls les niveaux de contamination du sédiment diffèrent, à cause de la procédure d'échantillonnage sur le terrain qui a conduit, lors de la collecte du sédiment pour les expériences avec les tubificidés, à prélever un peu plus en profondeur, conduisant à une concentration en cadmium supérieure après l'étape d'homogénéisation par brassage mécanique ( $85 \mu\text{g.g}^{-1}$ , ps contre  $45 \mu\text{g.g}^{-1}$ , ps, pour l'expérience avec *H. rigida*).*

### ***Transfert du cadmium du sédiment vers la colonne d'eau***

Les deux organismes entraînent un transfert de cadmium depuis le sédiment vers la colonne d'eau : les schémas de synthèse présentés sur la Figure IV.5.a-b résument l'importance de ces transferts et leur évolution au cours de la période 0-30 jours. Nous avons également reporté les transferts en absence de bioturbation.

Sans organismes, le relargage du cadmium est progressif : il faut attendre une dizaine de jours pour mesurer dans la colonne d'eau des concentrations significativement supérieures à la limite de détection de notre méthode de dosage ( $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) ; ensuite, l'accroissement suit une tendance exponentielle, les valeurs moyennes mesurées étant de  $0,5 \mu\text{gCd.L}^{-1}$  à 20 jours et de  $1,8 \mu\text{gCd.L}^{-1}$  à 30 jours, pour un sédiment renfermant au temps zéro une concentration moyenne de  $85 \mu\text{g.g}^{-1}$  (ps). Le métal transféré dans la colonne d'eau est uniquement sous forme dissoute ( $< 0,2 \mu\text{m}$ ), *via* les processus de diffusion à l'interface.



En présence de tubificidés et de larves d'*H. rigida*, les concentrations en Cd total (échantillons non filtrés) sont très fortement corrélées avec la turbidité ; les concentrations en Cd dissous sont très faibles, proches (pour *H. rigida*) ou à peine supérieures (pour les tubificidés) à la limite de détection ( $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Le cadmium est donc quasi-exclusivement transféré sous forme particulaire. Par contre, les concentrations totales mesurées dans l'eau et les cinétiques d'évolution sont très différentes entre ces deux organismes. En présence d'*H. rigida*, la concentration en Cd total augmente jusqu'à une valeur stable de  $16 \mu\text{g.L}^{-1}$  après environ 10 jours. Au contraire, en présence de tubificidés, la concentration en Cd total atteint un maximum de  $1,7 \mu\text{g.L}^{-1}$  au temps 10 jours, diminue ensuite jusqu'à 21 jours puis se maintient à des valeurs faibles, autour de  $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Il existe donc un facteur proche de 10 entre les concentrations maximales mesurées dans la colonne d'eau des unités renfermant les deux agents de bioturbation. Cet écart est d'autant plus important que le niveau de contamination du sédiment en Cd était deux fois plus faible en présence des larves d'*H. rigida*. Notons enfin que le relargage du Cd total sous l'influence des tubificidés n'est pas quantitativement plus élevé que celui mesuré pour la condition "sans organismes", si la comparaison repose sur les concentrations maximales mesurées dans la colonne d'eau. Les transferts sont effectués en présence de bioturbation quasi-exclusivement sous forme particulaire et, en absence de bioturbation, sous forme dissoute.

L'estimation des bilans de masse du cadmium dans la colonne d'eau<sup>16</sup>, à l'échelle de l'unité expérimentale, montre qu'en présence des larves d'*H. rigida*, 0,2 % du Cd contenu dans le sédiment serait transféré dans la colonne d'eau. En présence des tubificidés, le transfert est nettement plus limité, représentant seulement 0,005 % du Cd contenu dans le sédiment au temps zéro. Eu égard aux commentaires formulés précédemment, le taux de transfert est aussi de 0,005 % en absence d'organismes. Ainsi, à titre comparatif et compte-tenu de nos conditions expérimentales, les larves d'*H. rigida* conduisent à un transfert de cadmium environ 40 fois supérieur à celui généré par les tubificidés ou par la diffusion simple à partir du sédiment non bioturbé.

Parmi les nombreuses questions soulevées, celle relative au très faible transfert en présence des tubificidés peut trouver des réponses à partir des résultats que nous avons obtenus grâce aux analyses complémentaires sur les profils verticaux d'oxygène. La porosité

---

<sup>16</sup> Le poids de sédiment et sa concentration en Cd permettent de calculer la teneur du métal dans le compartiment sédimentaire. Le volume de la colonne d'eau et la concentration maximale en Cd sont aussi connues et permettent de calculer la quantité de Cd dans ce compartiment. Le rapport entre les deux donne le pourcentage transféré, sans prendre en compte le caractère cumulatif des transferts. Il n'a pas été possible de calculer des flux métalliques, car on ne connaît pas le devenir des MES qui ont fixé le Cd.

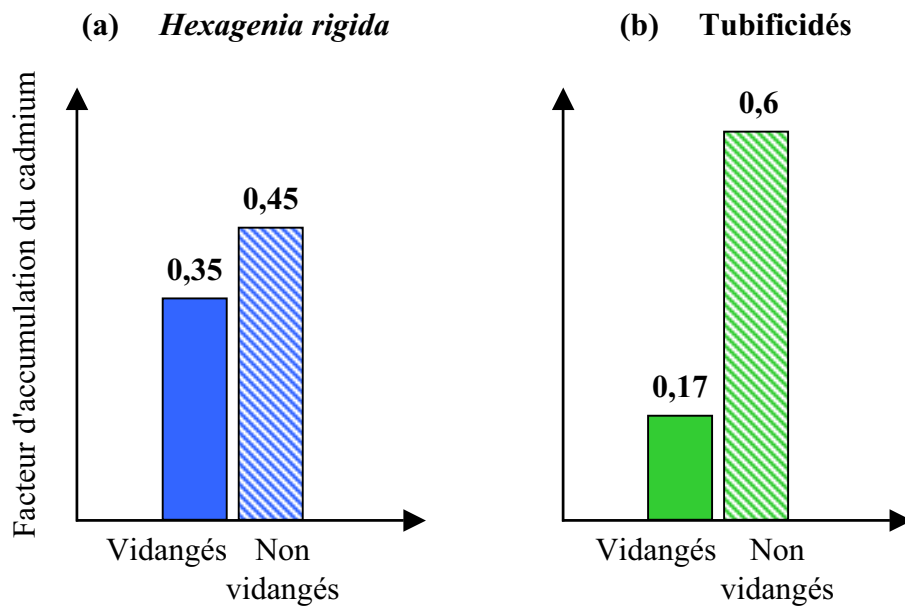




de l'interface est accrue à cause des pelotes fécales et la concentration en Cd mesurée dans les couches superficielles est plus élevée que celle du sédiment non bioturbé ( $115/85\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , ps). Ces deux caractéristiques devraient conduire à un flux diffusif plus important vers la colonne d'eau dans les unités renfermant les tubificidés. En fait, comme nous l'avons indiqué dans la synthèse bibliographique (Partie I), le cadmium est un métal de classe "B", qui est soluble en milieu oxygène et précipite en milieu anoxique, principalement avec les sulfures, ou s'associe avec les ligands organiques. Le cadmium déposé en surface avec les pelotes fécales provient de la zone réduite du sédiment. Comme l'indiquent les profils d'oxygène, seuls les premiers millimètres renferment de l'oxygène dans l'eau interstitielle et ils sont continuellement recouverts par le dépôt de nouvelles pelotes fécales. Ainsi, l'activité de bioturbation par bioadvection générée par les tubificidés, ne créant pas d'oxygénation des strates de surface des sédiments et contribuant à un apport quasi-permanent de matières provenant des zones anoxiques en profondeur et riches en matière organique (tri des particules), réduit les capacités de transfert du cadmium sous forme dissoute vers la colonne d'eau.

### ***Biodisponibilité du cadmium transféré vers la colonne d'eau à l'égard du bivalve benthique *Corbicula fluminea****

Au bout de 21 jours, les bivalves présents dans les mêmes unités qu'*H. rigida* accumulent faiblement le cadmium : par rapport au temps zéro, les concentrations moyennes mesurées dans le corps mou sont significativement supérieures ( $\times 1,7$ ) ; par contre, elles ne sont pas significativement différentes de la condition non bioturbée. Lorsqu'ils sont introduits avec les tubificidés, les différences sont également peu marquées mais significatives entre les conditions avec et sans bioturbation :  $\times 1,2$  environ après 30 jours. Nos résultats illustrent parfaitement l'importance de la biodisponibilité des métaux, le Cd particulaire présent dans la colonne d'eau et résultant des activités de bioturbation étant peu, voire pas, biodisponible pour ces bivalves filtreurs. Lorsqu'il n'y a pas de source de bioturbation dans les systèmes expérimentaux, les transferts métalliques à partir du sédiment se font uniquement sous forme dissoute, potentiellement biodisponible. Toutefois, par rapport à ces conditions d'exposition "favorables", les facteurs biotiques peuvent jouer un rôle très important. Nous avons en effet montré qu'un deuxième facteur, l'activité ventilatoire, peut limiter la bioaccumulation en présence de Cd dissous dans l'eau. Les bivalves filtrent d'importants volumes d'eau à des fins nutritionnelle et respiratoire ; toutefois, lorsque l'environnement est limitant en terme d'apports trophiques (cas des unités sans bioturbation), les études écophysiological menées



**Figure IV.6.** Facteurs d'accumulation du cadmium à 21 jours pour les larves d'*Hexagenia rigida* (a) (organismes vidangés et non vidangés), et pour les tubificidés (b) (organismes vidangés et non vidangés).

Vidange : non prise en compte du Cd contenu dans le sédiment présent au sein du tractus digestif.

Facteur d'accumulation :  $[\text{Cd}]_{\text{organisme}}/[\text{Cd}]_{\text{sédiment}}$

au sein du LEESA [Tran, 2001] ont montré que la ventilation tend à diminuer fortement au bout d'une dizaine de jours, réduisant alors les capacités de bioaccumulation par la voie directe d'exposition (à partir de l'eau accédant à l'intérieur de la cavité palléale). Nous avons montré qu'en absence de bioturbation, si la ventilation des bivalves est stimulée par des apports d'algues, l'accumulation du métal est nettement amplifiée (facteur supérieur à 10 par rapport aux concentrations mesurées au temps zéro). Par contre, les apports d'algues ne modifient pas significativement la bioaccumulation, en présence de tubificidés, car les transferts sont effectués principalement sous forme particulaire, et donc non biodisponible. Notons également que les matières en suspension dans la colonne d'eau en présence de bioturbation apportent suffisamment d'éléments nutritifs (matière organique détritique, bactéries) pour stimuler l'activité ventilatoire des bivalves, comme en témoigne les différences de turbidité en présence et en absence d'organismes filtreurs.

Si la biodisponibilité du cadmium relargué par les tubificidés ou par les larves d'*H. rigida* dans la colonne d'eau est faible, voire négligeable, pour le bivalve filtreur *C. fluminea*, il est important de souligner que d'autres espèces benthiques peuvent par contre subir une exposition accrue sous l'action de la bioturbation. Par exemple, des espèces détritivores ou des brouteurs de biofilm à la surface des sédiments ingéreront, *via* les pelotes fécales émises par les tubificidés, des nutriments plus riches en Cd que le sédiment "normal". De même, en terme de devenir des métaux dans les hydrosystèmes, les propriétés de la couche de pelotes fécales, notamment sa moindre cohésivité et donc ses plus fortes potentialités à l'égard des facteurs d'érosion, peuvent favoriser les processus de transport vers les zones situées à l'aval (importance du concept de *continuum* à l'aval des sources de pollution métallique – cf Partie I.A).

### ***Bioaccumulation du cadmium par les larves d'*Hexagenia rigida* et par les tubificidés***

Pour des raisons pratiques, afin de s'affranchir de l'écart entre les deux niveaux de contamination du sédiment de Cajarc, nous avons calculé les facteurs d'accumulation du Cd par les organismes à partir du sédiment<sup>17</sup>. Ces facteurs sont présentés sur la Figure IV.6. A 21 jours, ils sont de 0,45 et 0,35 pour *H. rigida*, selon les valeurs moyennes correspondant aux larves non vidangées et vidangées (estimation de la masse du sédiment à l'intérieur du tractus

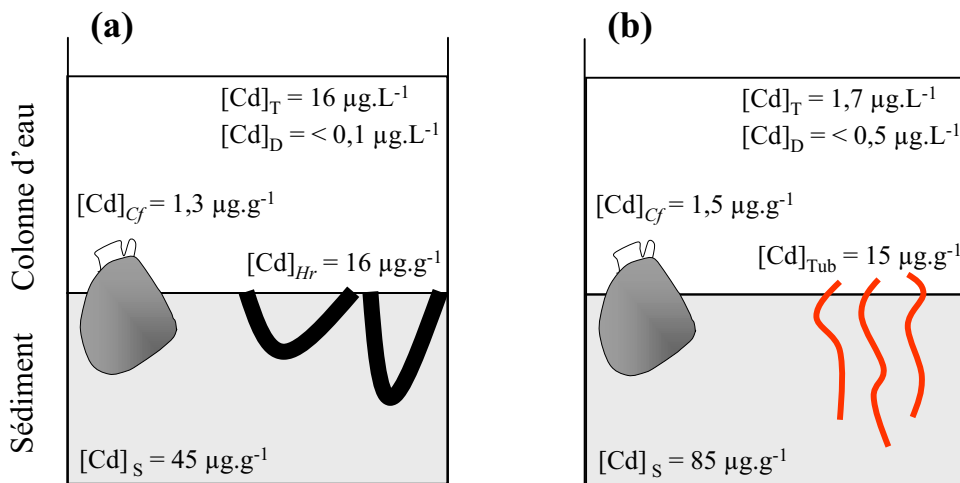
---

<sup>17</sup> Facteur d'accumulation : rapport entre la concentration en Cd mesurée dans les organismes et celle mesurée dans le sédiment.



digestif - Hare *et al.*, 1989 ; Saouter, 1990). Ils sont respectivement de 0,6 et 0,17 pour les tubificidés, après 20 jours (vidange par transfert des organismes dans un sédiment non contaminé). Sur la base des facteurs d'accumulation calculés après vidange, *H. rigida* accumule deux fois plus de cadmium dans ses tissus que les oligochètes tubificidés. En fait, l'écart entre les facteurs d'accumulation doit être encore plus élevé, puisque la répartition du Cd dans le sédiment a montré que les particules ingérées par les vers et présentes dans leur tractus digestif sont plus contaminées que le reste du sédiment, eu égard au tri des particules. Cette différence d'accumulation entre les larves d'*H. rigida* et les tubificidés peut être liée à de nombreux facteurs, contrôlant la biodisponibilité des métaux, les mécanismes d'ad- et d'absorption au travers des barrières biologiques (différences structurales et fonctionnelles au niveau de la paroi du tractus digestif par exemple), l'accessibilité aux différents compartiments tissulaires, les processus de stockage, .... Chez les tubificidés, nos études de localisation du Cd par autométallographie ont permis d'aborder les mécanismes de détoxification et d'élimination du métal, par le biais des cellules chloragogènes et des cellules présentes au sein du coelome, qui fixent des quantités importantes de Cd, conjointement avec les autres processus décrits dans la littérature pour les annélides : séquestration par les métallothionéines, précipitations sous forme de granules riches en soufre ou de sphérocristaux, stockage dans les lysosomes, ... [Dhainaut-courtois *et al.*, 1991 ; Brown, 1982 ; Dallinger, 1994 ; Gillis *et al.*, 2002 ; Wallace *et al.*, 1998 ; Klerks and Bartholomew, 1991]. Ces réactions de protection/détoxification sont peut-être plus efficaces que chez les larves d'*H.rigida*, expliquant par exemple la forte résistance des tubificidés aux perturbations chimiques des milieux aquatiques.

Les larves d'*H. rigida* accumuleraient le cadmium principalement au travers de la paroi du tube digestif et de celle de l'exosquelette chitineux ; la voie branchiale serait minoritaire [Inza *et al.*, 2001 ; Hare *et al.*, 1991]. Plusieurs études expérimentales indiquent que le sédiment ingéré constitue la source prépondérante de Cd pour ces organismes [Hare *et al.*, 1991 ; Odin *et al.*, 1996], bien que la colonne d'eau puisse, selon Warren *et al.* (1998), jouer un rôle non négligeable. Pour les tubificidés, la voie majeure d'accumulation du Cd en conditions naturelles n'est pas très claire. Le sédiment serait également la voie majeure d'accumulation du Cd [Warren *et al.*, 1998], mais les différentes études réalisées ne permettent pas de dire si la contamination intervient par l'eau interstitielle, à travers la paroi du corps [Back, 1990 ; Bouché *et al.*, 2000], ou par voie trophique, *via* le sédiment contenu dans le tractus digestif [Bervoets *et al.*, 1997]. Soulignons que pour ces deux organismes fouisseurs, les concentrations en Cd bioaccumulé dans nos conditions expérimentales, restent toujours



**Figure IV.7.** Concentrations moyennes du cadmium (Cd) dans les différents compartiments abiotiques et biotiques au sein des unités expérimentales contaminées par la source "sédiment", après une vingtaine de jours d'exposition, en présence de tubificidés (a) et de larves d'*Hexagenia rigida* (b).

T : Cd total dans l'eau (échantillons non filtrés)

D : Cd dissous dans l'eau ( $< 0,2 \mu\text{m}$ )

S : Cd dans le sédiment

*Cf* : Cd dans le corps mou de *C. fluminea*, exprimé en poids sec

*Hr* : Cd dans *H. rigida* vidangé, exprimé en poids sec

Tub : Cd dans les tubificidés vidangés, exprimé en poids sec

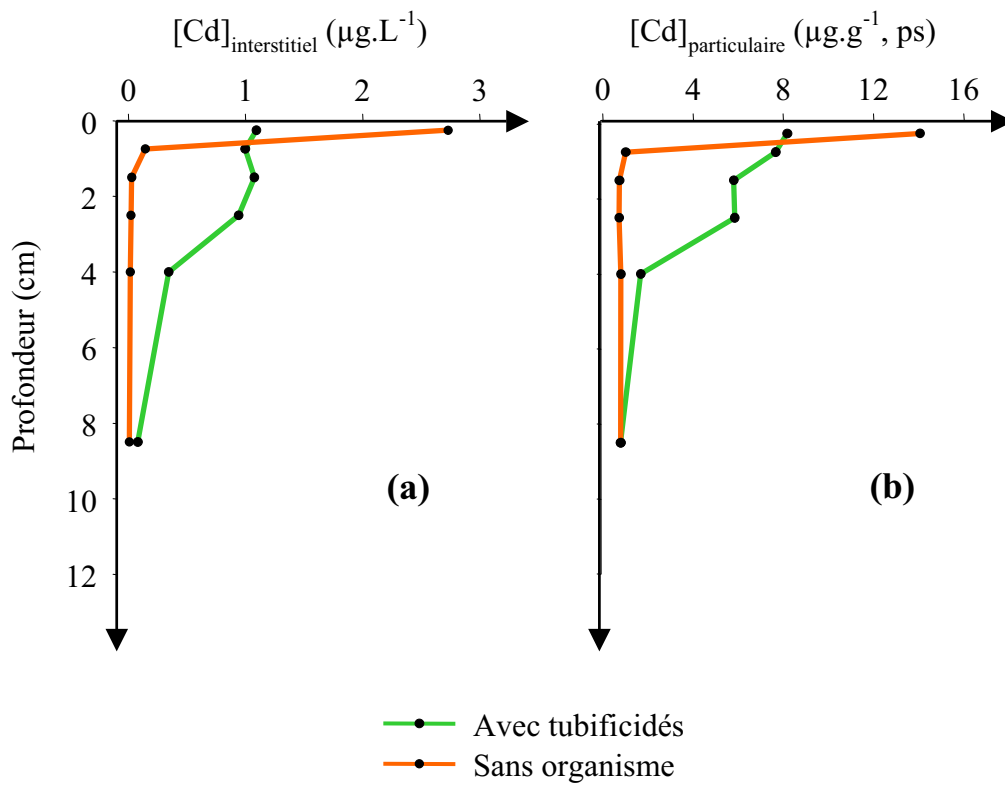
inférieures à celles mesurées dans le sédiment environnant (les facteurs d'accumulation calculés pour ces deux espèces sont inférieurs à 1). *H. rigida* et les tubificidés ne bioconcentrent donc pas le Cd à partir de la source "sédiment". Ils peuvent cependant constituer un vecteur de contamination non négligeable pour leurs prédateurs, puisqu'ils se situent à la base des réseaux trophiques benthique et pélagique (prédation par les poissons notamment). Soulignons enfin que malgré les faibles taux d'accumulation dans ces deux espèces, lorsque les concentrations sont comparées à celles présentes dans le sédiment, les différences sont très marquées par rapport aux niveaux de contamination mesurés dans le corps mou du bivalve benthique *C. fluminea*, après une même durée d'exposition au sein des mêmes unités. Nous avons synthétisé sur la Figure IV.7 les concentrations moyennes dans les différents compartiments abiotiques et biotiques des systèmes expérimentaux utilisés : un facteur proche de 20 sépare les concentrations exprimées en poids sec, en faveur des tubificidés ; pour les larves d'*H. rigida*, ce facteur est proche de 15, alors que *C. fluminea* vit enfoui dans les strates superficielles du sédiment et filtre d'importants volumes d'eau dans la zone d'interface.

## **Impact de la bioturbation sur les transferts métalliques à partir de la colonne d'eau**

*Après avoir étudié les transferts métalliques du sédiment vers la colonne d'eau et analysé l'influence de la bioturbation sur ces transferts, nous nous plaçons dans la situation inverse où la source de contamination est la colonne d'eau, le niveau de contamination étudié étant proche de 15  $\mu\text{gCd.L}^{-1}$ . L'agent de bioturbation retenu pour ces études est la population de vers oligochètes tubificidés.*

### ***Transfert du cadmium de l'eau vers le sédiment***

Dans nos conditions expérimentales, en absence d'organismes dans le sédiment (sédiment de Garonne), ce compartiment accumule une grande quantité de cadmium (108  $\mu\text{g}$  et 318  $\mu\text{g}$  à 21 et 56 jours, respectivement), essentiellement dans les 5 premiers millimètres de surface (Figure IV.8). En présence des tubificidés, les teneurs en Cd sont multipliées par un facteur proche de 2 (286  $\mu\text{g}$  à 21 jours et 671  $\mu\text{g}$  à 56 jours) et le sédiment s'enrichit en Cd en profondeur, jusqu'à la couche 5-12 cm, c'est-à-dire la zone maximale d'ingestion des vers. Soulignons que les unités de concentration du Cd total mesurées dans le sédiment, exprimées en  $\mu\text{g.g}^{-1}$ , sont 1000 fois supérieures à celles caractérisant les niveaux de contamination de la



**Figure IV.8.** Concentrations en cadmium dissous dans l'eau interstitielle des sédiments (a), et dans la phase particulaire (b), au temps 21 jours, en présence et en absence de tubificidés. La source initiale de contamination est la colonne d'eau ([Cd] proche de 15 µg.L<sup>-1</sup>).



colonne d'eau ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Ces résultats confirment le rôle de stockage du compartiment sédimentaire à l'égard des métaux. Ils montrent aussi que la bioturbation amplifie ce stockage et que les distributions verticales du Cd diffèrent notablement en présence de bioturbation. Les tubificidés, en provoquant une accumulation du Cd en profondeur, créent un découplage entre les concentrations métalliques dans l'eau et dans le sédiment.

Avec ou sans vers, les concentrations du Cd dans l'eau interstitielle des sédiments n'atteignent pas celle maintenue quasi-constante dans la colonne d'eau, après 56 jours. La diffusion n'atteint donc pas l'équilibre entre les deux compartiments : une part importante du Cd est piégée par les particules sédimentaires, près de l'interface. En absence de vers, les données géochimiques permettent de considérer que le Cd est principalement fixé sur les oxydes de fer et de Mn et sur la matière organique, dans la zone d'interface. En présence de bioturbation, le métal est majoritairement piégé par les sulfures (AVS) et/ou les oxydes issus de l'oxydation des AVS, et la matière organique qui sont contenus dans les pelotes fécales. En ramenant en surface des produits réduits, la bioadvection favorise le piégeage du Cd à l'interface "eau-sédiment" mais elle entraîne aussi le métal en profondeur, par enfoncement progressif des couches de surface jusqu'à la zone d'ingestion maximale des vers, estimée à 13 cm. Soster *et al.*, en 1992, avaient obtenu des résultats similaires avec le zinc. Les profils verticaux du Cd particulaire que nous avons déterminés dans le sédiment des unités expérimentales (Fig. IV.8) montrent une décroissance des concentrations avec la profondeur. Ils peuvent être directement rapprochés du profil théorique des microsphères que nous avons présenté précédemment, lorsque celles-ci sont apportées en continu à la surface du sédiment. Comme les microsphères, une partie des particules de sédiment sont ingérées plusieurs fois par les tubificidés. Elles sont donc re-déposées plusieurs fois à la surface du sédiment et peuvent ainsi fixer le métal présent dans la colonne d'eau. Dans ces conditions, comme le montre les différentes étapes du schéma de la Figure IV.2, les particules proches de l'interface sont plus souvent en contact avec le Cd de la colonne d'eau et sont donc plus contaminées.

### ***Bioaccumulation du cadmium et atteintes fonctionnelles sur les organismes***

Dans nos conditions expérimentales, les tubificidés accumulent le cadmium de façon exponentielle à partir de la source de contamination "colonne d'eau" : les concentrations moyennes mesurées après 21 et 56 jours sont de 11,5 et 47  $\mu\text{g.g}^{-1}$ , ps (sans vidange). Cette tendance peut être reliée à l'enrichissement progressif en Cd du sédiment. Nos données



montrent une bonne corrélation entre les concentrations en Cd dans les vers et dans le sédiment, indiquant que les tubificidés se contaminent à partir du sédiment, sans qu'il soit possible de préciser si l'accumulation du métal est réalisée à partir de l'eau interstitielle, à travers la paroi du corps, ou par voie trophique, *via* les particules ingérées (fixation et absorption au travers de la paroi intestinale). Nous avons estimé, à partir de la vitesse de bioadvection moyenne, les coefficients de rétention du Cd par les tubificidés non vidangés<sup>18</sup>. Ils sont de 1,9 % après 21 jours et 1,6 % en fin d'expérience (56 jours). Les vers retiendraient donc environ 1 à 2 % du Cd qui est passé dans leur tractus digestif. Ce bilan est faible, mais si l'on se place au niveau d'un prédateur qui consomme les tubificidés, ce dernier sera exposé à des concentrations dans sa nourriture de l'ordre de 50  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , ce qui est élevé, voire très élevé, en terme de source de contamination potentielle.

De nombreux paramètres physico-chimiques peuvent influencer l'activité de bioturbation d'un organisme : température, pH, nature du sédiment, ... Le niveau de contamination du milieu peut être un facteur supplémentaire de perturbation. Lee et Swartz (1980) ont montré que le taux de remaniement des sédiments par des polychètes marins diminue dans des sédiments contaminés. Nous avons utilisé nos données pour mettre en évidence un impact du Cd sur l'activité de bioturbation des tubificidés, quantifiée à l'aide des profils verticaux de luminophores et appréhendée en tant que critère fonctionnel. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas mesuré d'impact significatif du métal sur l'intensité de bioturbation, les différences entre les coefficients de biodiffusion étant proches de la significativité. Ceci montre que le Cd n'a pas, ou très peu, modifié les activités d'ingestion et de défécation des tubificidés. Par contre, pour des concentrations supérieures ou pour des durées d'exposition plus longues, compte-tenu des cinétiques de bioaccumulation, un effet du cadmium sur la bioturbation pourrait être mis en évidence. Comme nous allons le mentionner dans la partie "Perspectives", ce point mériterait d'être approfondi dans des études futures.

Les objectifs de cette thèse et sa réalisation ont reposé sur une démarche résolument pluridisciplinaire. Malgré les difficultés inhérentes à un travail impliquant plusieurs équipes de recherche, avec des "cultures" et des "outils" différents, la complémentarité des approches

---

<sup>18</sup> La vitesse de bioadvection permet de calculer la quantité de sédiment qui a transité dans les tubificidés pendant l'intervalle de temps choisi. Parallèlement, les concentrations en Cd dans les vers ont été mesurées et permettent de calculer les teneurs en Cd correspondantes ( $[\text{Cd}] \times \text{biomasse}$ ). En faisant le rapport de ces deux quantités, on obtient un coefficient (%) qui estime la part de Cd bioaccumulée par rapport à la quantité de métal qui a transité dans les organismes, *via* le sédiment ingéré.



expérimentales et le bilan des résultats obtenus sont, de notre point de vue, très positifs. Au stade de nos recherches et du bilan que nous avons pu tirer des très nombreuses données collectées, plusieurs perspectives se dégagent, dans le prolongement direct de nos travaux et dans un contexte plus large mais toujours relié à notre thématique, à savoir l'impact de la bioturbation des sédiments sur le devenir des métaux-traces.

## Perspectives de recherches

Les principales perspectives qui découlent de notre travail de recherche s'inscrivent dans une double démarche : à court terme, afin de traiter les données collectées lors de plusieurs expériences et qui n'ont pu être analysées, eu égard aux contraintes matérielles ; à plus long terme, l'objectif étant d'approfondir et de diversifier certaines approches, pour renforcer l'analyse interprétative de nos résultats.

### *Perspectives à court terme :*

Comme nous l'avons mentionné dans notre mémoire, un nombre important de données, essentiellement géochimiques, ont été acquises et n'ont pu être traitées ni interprétées. Il s'agit de trois types de mesures :

- des profils verticaux de fer et de manganèse dans l'eau interstitielle des sédiments, obtenus avec les microélectrodes polarographiques dans les unités contaminées par la source "colonne d'eau" (Partie III.B) et "sédiment" (Partie III.C.2) ;

- des dosages réalisés sur l'eau interstitielle (nitrates, ammonium, fer et manganèse) et sur la phase particulaire (fer et manganèse), au niveau des strates découpées lors de la collecte des sédiments, dans les mêmes unités que celles citées précédemment. Les données disponibles devraient permettre de mieux interpréter les mécanismes contrôlant les flux métalliques, en présence et en absence de bioturbation ;

- au cours de la dernière expérience présentée dans ce mémoire, basée sur l'étude des transferts de métaux à partir de la source sédiment (sédiment de Cajarc – Partie III.C.2), nous avons analysé par ICP-MS une dizaine d'éléments transférés dans la colonne d'eau et, conjointement, accumulé dans le corps mou du bivalve *C. fluminea*. Les résultats ont été présentés sous une forme strictement descriptive ; ils devront être analysés plus en profondeur, en intégrant les données de la littérature, ceci afin de rechercher les liens entre les propriétés physico-chimiques des éléments, leur spéciation chimique et leur biodisponibilité,



dans les conditions de nos systèmes expérimentaux, en présence et en absence de bioturbation.

***Perspectives à moyen terme :***

Plusieurs questions importantes, par rapport à nos objectifs initiaux de recherche, n'ont pas trouvé de réponses précises ou/et complètes, suite aux différentes approches expérimentales que nous avons mis en œuvre et aux techniques que nous avons utilisées.

Ainsi, la détermination des rôles respectifs joués par la colonne d'eau et par le compartiment sédimentaire, à l'égard de la bioaccumulation du cadmium par les tubificidés. Si nos résultats ont permis d'émettre plusieurs hypothèses, nous n'avons pas été en mesure de quantifier les voies de transfert à partir des deux sources de contamination. Différentes techniques devraient permettre d'aborder cette question, notamment l'enrichissement, à partir d'isotopes stables ou radioactifs, de la colonne d'eau et du sédiment. Dans ces conditions, les analyses isotopiques réalisées sur les organismes devraient permettre de préciser l'origine du métal bioaccumulé.

Nos études expérimentales ont clairement montré le rôle joué par la biodisponibilité du cadmium, vis-à-vis des capacités de transfert entre la colonne d'eau et le bivalve filtreur *C. fluminea*. La distinction entre la distribution du métal au sein des phases particulaire et dissoute devra être complétée par des analyses géochimiques plus fines, afin de déterminer la spéciation chimique sur les différentes fractions (colloïdes par exemple) et d'analyser les modifications engendrées par la bioturbation, *via* les transferts entre le compartiment sédimentaire et la colonne d'eau.

Enfin, pour aller plus loin dans l'étude des effets toxiques des métaux sur la bioturbation exercée par les tubificidés, appréhendée en tant que critère fonctionnel, des expériences prenant en compte des gammes de concentrations, dans la colonne d'eau et/ou dans le sédiment, devront être menées. Les effets sur la bioturbation seront mesurés à l'aide des traceurs particuliers fluorescents (luminophores et microphères), des mesures de turbidité au sein de la colonne d'eau ; d'autres paramètres pourraient être pris en compte, comme par exemple le comportement des organismes (rétraction de la partie terminale du corps des tubificidés au-dessus de l'interface "eau/sédiment – approche développée par Leynen et al., 1999), par des images vidéo prises séquentiellement au cours des périodes d'exposition.





**PARTIE V**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



# A

- Ader W. H. and Loveland K.** 1991. Dynamic aquaria: building living ecosystems. Academic Press, INC, San Diego. 643 p.
- Aldridge W. N.** 1996. Mechanisms and concepts in toxicology. *Taylor and Francis Books Ltd, London, UK, 254 p.*
- Allen H. E., Fu G. and Deng B.** 1993. Analysis of acid-volatile sulfide (AVS) and simultaneously extracted metals (SEM) for the estimation of potential toxicity in aquatic sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 12: 1441-1456.
- Aller R. C. and Yingst J. Y.** 1985. Effects of the marine deposit-feeders *Heteromastus filiformis* (Polychaeta), *Macoma balthica* (Bivalvia), and *Tellina texana* (Bivalvia) on averaged sedimentary solute transport, reaction rates, and microbial distributions. *J. Mar. Res.* 43: 615-645.
- Aller R.C.** 1983. The importance of the diffusive permeability of the animal burrow lining in determining marine sediment chemistry. *J. Mar. Res.* 41: 299-322.
- Aminot A. and Chaussepied M.** 1983 Manuel des analyses chimiques en milieu marin. Cnexo, Brest, 395 p.
- Andres S., Baudrimont M., Lapaquellerie Y., Ribeyre F., Maillet N., Latouche C. and Boudou A.** 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France). Part I: geochemical characteristics of the sampling sites and Cd and Zn bioaccumulation kinetics. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 2462-2471.
- Andrès S., Ribeyre F. and Boudou A.** 1998. Effects of temperature and exposure duration on transfer of cadmium between naturally contaminated sediments and burrowing mayfly nymphs (*Hexagenia rigida*). *Arch. Environ. Contm. Toxicol.* 35: 295-301.
- Andrews N. C.** 1999. The iron transporter DMT1. *Int. J. Biochem. Cell B.* 31: 991-994.
- Anschutz P., Sundby B., Lefrançois L., Luther III G. W. and Mucci A.** 2000. Interactions between metal oxides and species of nitrogen and iodine bioturbated marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 64: 2751-2763.



**Audry S., Blanc G. and Schäfer J.** 2003. Cadmium fluxes in the Lot-Garonne system (France) – Temporal variability and empiric model. *Sci. Tot. Environ.* (sous-presse).

**Avel M.** 1959. Classe des Annélides Oligochètes. In *Précis de Zoologie V*, P.P. Grassé (Ed), Masson, Paris: 224-470.

## B

**Back H.** 1990. Epidermal uptake of Pb, Cd, and Zn in tubificid worms. *Oecologia* 85: 226-232.

**Bartsch M. R., Cope W. G. and Rada R. G.** 1999. Effects of cadmium-spiked sediment on cadmium accumulation and bioturbation by nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia bilineata*. *Water Air Soil Poll.* 109: 277-292.

**Baudrimont M., Andres S., Durrieu G. and Boudou A.** 2003. The key role of metallothioneins in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase after in situ exposure to Cd and Zn. *Aquatic Toxicol.* 63: 89-102.

**Baudrimont M., Andres S., Metivaud J., Lapaquellerie Y., Ribeyre F., Maillet N., Latouche C. and Boudou A.** 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France). Part II: metallothionein response to metal exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 2472-2477.

**Berner R. A.** 1980. Early diagenesis: a theoretical approach. Princeton University Press, USA, 241 p.

**Bervoets L., Blust R., de Wit M. and Verheyen R.** 1997. Relationships between river sediment characteristics and trace metal concentrations in Tubificid worms and Chironomid larvae. *Environ. Pollut.* 95: 345-356.

**Blanc G., Audry S., Bossy C., Lavaux G. and Lissalde J.-P.** 2003. The cadmium in the Lot and Garonne rivers: sources and transport. *Hydroécologie appliquée* (sous-presse).

**Blanc G., Lapaquellerie Y. and Maillet N.** 1999. La pollution polymétallique du Lot et de la Garonne aval. Rap. GIS ECOBAG/Agence de l'Eau Adour-Garonne, 32 p.

**Booth C. E. and Mangum C. P.** 1978. Oxygen uptake and transport in the lamellibranch mollusc *Modiolus demissus*. *Physiol. Zool.* 51: 17-32.



- Bouché M.-L., Habets F., Biagianti-Risbourg S. and Vernet G.** 2000. Toxic effects and bioaccumulation of cadmium in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex*. *Ecotox. Environ. Safe.* 46: 246-251.
- Bourg A.**1992. Le cadmium : une pollution générale. Adour-Garonne n°53, p.p. 16-19.
- Brendel P. J.** 1995. Development of a mercury thin film voltammetric microelectrode for the determination of biogeochemically important redox species in porewaters of marine and freshwater sediments. Doctor of Philosophy and chemistry, Dissertation, University of Delaware. 141p.
- Brendel P. J. and Luther III G. W.** 1995. Development of a gold amalgam voltammetric microelectrode for the determination of dissolved Fe, Mn, O<sub>2</sub> and S(-II) in porewaters of marine and freshwater sediments. *Environ. Sci. Technol.* 29: 751-761.
- Brinkhurst R. O.** 1970 Distribution and abundance of tubificid (oligochaeta) species in Toronto Harbour, Lake Ontario. *J. Fish. Res. Bd. Canada* 27 : 1961-1969.
- Brinkhurst R. O. and Cook D. G.** 1974. Aquatic Earthworms (Annelida: Oligochaeta). In : Pollution ecology of freshwater invertebrates, Hart C. W. and S. L. Fuller (eds.) Academic Press: 143-156.
- Brinkhurst R.O.** 1971. A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. In: Aquatic Oligochaeta of the world. Brinkhurst R. O. and Jamieson B. G. (Eds) Oliver & Boyd, Edinburgh, 860 p.
- Britton J. C. and Morton B.** 1982. A dissection guide, field and laboratory manual for the introduced bivalve *Corbicula fluminea*. *Malacol. Rev. Suppl.* 3: 1-82.
- Brkovic-Popovic I. and Popovic M.** 1977. Effects of heavy metals on survival and respiration rate of tubificid worms: Part I-Effects on survival. *Environ. Pollut.* 13: 65-72.

C

- Campbell P. G. C., Lewis A. G., Chapman P. M., Crowder A. A., Fletcher W. K., Imber B., Luoma S. N., Stokes P. M. and Winfrey M.** 1988. Biologically available metals in sediments. *National Research Council Canada*, Publication number NRCC n° 27694. Ottawa, 298 p.





- Chapman P. M.** 2000. Aquatic Oligochaetes are useful for (but underutilized in) Ecological Risk Assessment. (ERA). SETAC Globe 1: 31-33.
- Chapman P. M.** 2001. Utility and relevance of aquatic oligochaetes in ecological risk assessment. *Hydrobiologia* 463: 149-169.
- Chapman P. M., Farrel, M. A. and Brinkhurst R. O.** 1982. Relative tolerance of selected oligochaetes to industrial pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicol.* 2: 47-67.
- Charbonneau P. and Hare L.** 1998. Burrowing behaviour and biogenic structures of mud-dwelling insects. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 17: 239-249.
- Charbonneau P., Hare L. and Carignan R.** 1997. Use of X-Ray images and a contrasting agent to study the behavior of animals in soft sediments. *Limnol. Oceanogr.* 42: 1823-1828.
- Ciarelli S., Van Straalen N. M., Klap V. A. et Van Wezel A. P.** 1999. Effects of sediment bioturbation by the estuarine amphipod *Corophium volutator* on fluoranthene resuspension and transfer into the mussel (*Mytilus edulis*). *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 318-328.
- Ciutat A. and Boudou A.** 2003. Bioturbation effects on cadmium and zinc transfers from a contaminated sediment and on metal bioavailability to benthic bivalves. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 1574-1581.
- Ciutat A., Gérino M., Anschutz P. and Boudou A.** 2003. Effects of Tubificid oligochaetes on cadmium transfer and distribution into freshwater sediment. *Geochim. Cosmochim. Acta (Submitted)*.
- Ciutat A., Gérino M., Mesmer-Dudons N., Anschutz P. and Boudou A.** 2003. Cadmium bioaccumulation in Tubificidae from the water column source and effects on bioturbation activity. *Aquatic Toxicol. (Submitted)*.
- Cochran P. A.** 1992. The return of *Hexagenia* (Ephemeroptera: Ephemeridae) to the lower Fox river, Wisconsin. *Great Lakes Entomol.* 25(2): 79-81.
- Cossa D. and Lassus P.** 1989. Le cadmium en milieu marin. Biogéochimie et écotoxicologie. *Rapports scientifiques et techniques de l'IFREMER.* 16, 111 p.



## D

- Danscher G.** 1984. Autometallography: A new technique for light and electron microscopic visualization of metals in biological tissues (gold, silver, metal sulphides and metal selenides). *Histochem.* 81: 331-335.
- Davis, R. B.** 1974. Stratigraphic effects of tubificids in profundal lake sediments. *Limnol. Oceanogr.* 19: 466-488.
- Dean J. M.** 1974. The accumulation of  $^{65}\text{Zn}$  and other Radionuclides by Tubificid worms. *Hydrobiologia* 45: 33-38.
- Deeds J. R. and Klerks P. L.** 1999. Metallothionein-like proteins in the freshwater oligochaete *Limnodrilus udekemianus* and their role as a homeostatic mechanism against cadmium toxicity. *Enviro. Pollut.* 106: 381-389.
- Dhainaut A. and Scaps P.** 2001. Immune defense and biological responses induced by toxics in Annelida. *Can. J. Zool.* 79: 233-253.
- Di Toro D. M., Mahony J. D. and Hansen D. J.** 1996. A model for the oxidation of iron and cadmium sulfides in sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 2168-2186.
- Di Toro D. M., Mahony J. D., Hansen D. J., Scott K. J., Carlson A. R. and Ankley G. T.** 1992. Acide volatile sulfide predicts the acute toxicity of cadmium and nickel in sediments. *Environ. Sci. Technol.* 26: 96-101.
- Di Toro D. M., Mahony J. D., Hansen D. J., Scott K. J., Hicks M. B., Mays S. M. and Redmond M. S.** 1990. Toxicity of cadmium in sediments: The role of acid volatile sulfides. *Environ. Toxicol. Chem.* 9: 1487-1502.

## E

- Edsall T. A., Manny B. A., Schloesser D. W., Nichols S. J. and Frank A. M.** 1991. Production of *Hexagenia limbata* nymphs in contaminated sediment in the Upper Great Lakes connecting channels. *Hydrobiologia* 219: 353-361.



J

- Fisher J. B., Lick W. J., McCall P. L. and Robbins J. A.** 1980. Vertical mixing of lake sediments by tubificid oligochaetes. *J. Geophys. Res.* 85, C7: 3997-4006.
- Flannagan J. F.** 1979. The burrowing mayflies of lake Winnipeg, Manitoba, Canada. *In: Proceeding of the second International Conference on Ephemeroptera.* K. Pasternak and P.P. Sowa (Eds) : 103-113.
- Fleming M. D., Romano M. A., Su M. A., Garrick L. M., Garrick M. D. and Andrews N. C.** 1998. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) ret: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proceedings of National Academic Sciences USA* 95: 1148-1153.
- Forstner U. and Wittmann G. T. W.** 1981. Metal pollution in the aquatic environment. 2<sup>nd</sup> edition. Springer-Verlag, New-York, 468 p.
- Foster P.L. and Morel F. M. M.** 1982. Reversal of cadmium toxicity in a diatom: an interaction between cadmium activity and iron. *Limnol. Oceanogr.* 27: 745-752.
- Fremling C. R.** 1989. *Hexagenia* mayflies: biological monitors of water quality in the Upper Mississippi River. *Journal of Minnesota Academic Sciences* 55: 139-143.
- Froelich P. N., Klinkhammer G. P., Bender M. L., Luedke N. A., Heath G. R., Cullen D., Dauphin P., Hammond D., Hartman B. and Maynard V.** 1979. Early oxidation of organic matter in pelagic sediments of the Eastern Equatorial Atlantic: suboxic diagenesis. *Geochim. Cosmochim. Acta* 43: 1075-1090.
- Fu G. and Allen H. E.** 1992. Cadmium adsorption by oxic sediment. *Wat. Res.* 26: 225-233.
- Fugère N., Brousseau P., Krzystyniak K., Coderre D. and Fournier M.** 1996. Heavy metal-specific inhibition of phagocytosis and different in vitro sensitivity of heterogeneous coelomocytes from *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Toxicology* 109: 157-166.
- Fukuhara H. and Sakamoto M.** 1987. Enhancement of inorganic nitrogen and phosphate release from lake sediment by tubificid worms and chironomid larvae. *Oikos* 48: 312-320.



# G

- Geret F., Serafim A., Barreira L. and Bebianno M. J.** 2002. Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Biomarkers* 7: 242-256.
- Gerino M.** 1992. Etude expérimentale de la bioturbation en milieux littoral et profond : Quantification des structures de bioturbation et modélisation du remaniement biologique du sédiment. Thèse de Doctorat de l'Université d'Aix-Marseille II, 208 p.
- Gérino M., Stora G. and Durbec J.-P.** 1994. Quantitative estimation of bioturbation and bioadvective sediment mixing: *In situ* experimental approach. *Oceanol. Acta* 17:547-554.
- Giangrande A., Montresor M., Cavallo A. and Licciano M.** 2002. Influence of *Naineris laevigata* (Polychaeta: Orbiniidae) on vertical grain size distribution, and dinoflagellate resting stages in the sediment. *J. Sea Res.* 47: 97-108.
- Giberson D. J. and Rosenberg D. M.** 1992. Egg development in *Hexagenia limbata* (Ephemeroptera: Ephemeridae) from Southern Indian Lake, Manitoba: temperature effects and diapause. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 11: 194-203.
- Gilbert F., Stora G. and Bertrand J.-C.** 1996. In situ bioturbation and hydrocarbon fate in an experimental contaminated Mediterranean coastal ecosystem. *Chemosphere* 33: 1449-1458.
- Gilbert F., Stora G., Bonin P., LeDréau Y., Mille G. and Bertrand J.-C.** 1997. Hydrocarbon influence on denitrification in bioturbated Mediterranean coastal sediments. *Hydrobiologia* 345: 67-77.
- Gilbert F., Stora G., Desrosiers G., Deflandre B., Bertrand J.-C., Poggiale J.-C. and Gagné J.-P.** 2001. Alteration of aliphatic compounds by the polychaete *Nereis virens* (Sars) experimentally fed with hydrocarbons. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 256-199-213.
- Gillis P. L., Diener, L. C., Reynoldson T. B. and Dixon D. G.** 2002. Cadmium-induced production of a metallothionein-like protein in *Tubifex tubifex* (Oligochaeta) and *Chironomus riparius* (Diptera). Correlation with reproduction and growth. *Env. Toxicol. Chem.* 21: 1836-1844.





- Goñi-Urriza M., de Montaudoin X., Guyoneaud R., Bachelet G. and De Wit R.** 1999. Effect of macrofaunal bioturbation on bacterial distribution in marine sandy sediments, with special reference to sulphur-oxidising bacteria. *J. Sea Res.* 41: 269-279.
- Gonzalez J. L.** 1992. Comportement du cadmium et du mercure lors de la diagenèse précoce et flux à l'interface eau-sédiments en zone littorale. Thèse de Doctorat, Université Bordeaux 1, n° 773, 247 p.
- Guinasso N. L. and Schink D. R.** 1975. Quantitative estimates of biological mixing rates in abyssal sediments. *J. Geophys. Res.* 80: 3032-3043.
- Gunnarsson J. S., Hollertz K. and Rosenberg R.** 1999. Effects on organic enrichment and burrowing activity of the polychaete *Nereis diversicolor* on the fate of tetrachlorobiphenyl in marine sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 1149-1156.

## A

- Hansen D. J., Berry W. J., Mahony J. D., Boothman D. M., Di Toro D. M., Robson D. L., Ankley G. T., Ma D., Yan Q. and Pesch C. E.** 1996. Predicting the toxicity of metal-contaminated field sediments using acid-volatiles sulfide normalizations. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 2080-2094.
- Hare L., Campbell P. G. C., Tessier A. and Belzile N.** 1989. Gut sediments in burrowing mayfly (Ephemeroptera, *Hexagenia limbata*): their contribution to animal trace element burdens, their removal and the efficacy of a correction for their presence. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 451-456.
- Hare L., Carignan R. and Huerta-Diaz M. A.** 1994. A field study of metal toxicity and accumulation by benthic invertebrates; implication for the acid-volatile sulfide (AVS) model. *Limnol. Oceanogr.* 39: 1653-1668.
- Hare L., Saouter E., Campbell P. G. C., Tessier A., Ribeyre F. and Boudou A.** 1991. Dynamics of cadmium, lead and zinc exchange between nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia rigida* (Ephemeroptera) and the environment. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 39-47.
- Hylleberg J. and Henriksen K.** 1980. The central role of bioturbation in sediment mineralization and element re-cycling. *Ophelia Suppl.* 1: 1-16.



*I*

- Indice Oligochètes de Bioindication des Sédiments (IOBS).** Guide méthodologique. Etude sur l'eau en France. N° 88. Ministère de l'Ecologie et du Développement durable.
- Inman D. L.** 1952 . Measures for describing the size distributions of sediments. *Journal of Sedimentary Petrology*, Tulsa, 22: 211-226.
- Inza B.** 1996. Etude en Ecotoxicologie expérimentale de la bioaccumulation du cadmium et des dérivés du mercure par un mollusque filtreur d'eau douce (*Corbicula fluminea*). Thèse de Doctorat. Université Bordeaux 1, n° 1630, 187 p.

*J*

- Jacobs L. and Emerson S.** 1982. Trace metal solubility in an anoxic fjord. *Earth Planet. Sci. Lett.* 60: 237-252.
- Jouanneau J. M., Boutier B., Chiffolleau J. F., Latouche C. and Philips I.** 1990. Cadmium in the Gironde fluvioestuarine system: behaviour and flow. *Sci. Tot. Environ.* 98: 465-479.
- Jozereau C.** 1997. La production de zinc dans la vallée du Lot depuis le XIXème siècle. Conséquences sur l'environnement. Rapport de Maîtrise de Sciences de l'Environnement, Option Océanologie, Université Bordeaux 1, 22 p.
- Juget, J.** 1979. La texture granulométrique des sédiments et le régime alimentaire des oligochètes limniques. *Hydrobiologia* 65: 145-154.

*K*

- Karickhoff S. W. and Morris K. R.** 1985. Impact of tubificid oligochaetes on pollutant transport in bottom sediments. *Environ. Sci. Technol.* 19: 51-56.
- Khargarot B. S.** 1991. Toxicity of metals to a freshwater tubificid worm, *Tubifex tubifex* (Muller). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46: 906-912.
- Klerks P. L. and Bartholomew P. R.** 1991. Cadmium accumulation and detoxification in a Cd-resistant population of the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri*. *Aquat. Toxicol.* 19: 97-112.



- Krantzberg G.** 1985. The influence of bioturbation on physical, chemical and biological parameters in aquatic environments: a review. *Environ. Toxicol.* 39: 99-122.
- Krapiel A. M. L., Chiffolleau J., Martin J. M. and Morel F. M.** 1997. Geochemistry of trace metals in the Gironde estuary. *Geochim. Cosmochim. Acta* 61: 1421-1436.
- Kristensen E.** 2000. Organic matter diagenesis at the oxic/anoxic interface in coastal marine sediments, with emphasis on the role of burrowing animals. *Hydrobiologia* 426: 1-24.

## L

- Lacerda L. D. and Salomons W.** 1998. Mercury from gold and silver mining: a chemical time bomb? Springer-Verlag, Berlin, Germany. 78 p.
- Lapaquellerie Y., Jouanneau J. M., Maillet N. and Latouche C.** 1995. Cadmium pollution in sediments of the Lot River France, estimate of the mass of cadmium. *Environ. Technol.* 16: 1145-1154.
- Laporte J.-M., Truchot J.-P., Mesmer-Dudons N., Boudou A.** 2002. Bioaccumulation of inorganic and methylated mercury by the gills of the shore crab *Carcinus maenas*: transepithelial fluxes and histochemical localization. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 231: 215-228.
- Lee II H. and Swartz R. C.** 1980. Biological processes affecting the distribution of pollutants in marine sediments, part II. Biodeposition and Bioturbation. *In* : Contaminants and sediments. Baker R.A. (Eds.) A. Arbor. Sciences Publ. : 555-606.
- Leff L. G. and Leff A. A.** 2000. The effet of macroinvertebrates on bacterial distributions in freshwater microcosms. *Arch. Hydrobiol.* 147: 225-240.
- Leynen M., Van den Berckt T., Aerts J. M., Castelein B., Berckmans D. and Ollevier F.** 1999. The use of Tubificidae in a biological early warning system. *Environ. Pollut.* 105: 151-154.
- Luoma S. N.** 1989. Can we determine the biological availability of sediment-bound trace elements ? *Hydrobiologia.* 176/177: 379-396.
- Luther III G. W., Brendel P. J., Lewis B. L., Sundby B., Lefrançois L., Silverberg N. and Nuzzio D. B.** 1998. Simultaneous measurements of O<sub>2</sub>, Mn, Fe, I, and S(-II) in marine pore waters with a solid-state voltammetric microelectrode. *Limnol. Oceanogr.* 43: 325-333.



# M

- Mahaut M.-L. and Graf G.** 1987. A Luminophore tracer technique for bioturbation studies. *Oceanol. Acta* 10: 323-328.
- Mahony J. D., Di Toro D. M., Gonzalez A., Curto M., Dilg M., De Rosa L. D. and Sparrow L. A.** 1996. Partitionning of metals to sediment organic carbon. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 2187-2197.
- Marigomez I., Kortabitarte M. and Dussart G. B. J.** 1998. Tissue-level biomarkers in sentinel slugs as cost-effective tools to assess metal pollution in soils. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34: 167-176.
- Matisoff G.** 1995. Effects of bioturbation on solute and particle transport in sediments. In : Metal contaminated aquatic sediments. Allen, H.E. (Ed.) Ann Arbor Press, Chelsea, MI, USA, pp 201-272.
- Matisoff G. and Wang X.** 1998. Solute transport in sediments by freshwater infaunal bioirrigators. *Limnol. Oceanogr.* 43: 1487-1499.
- Matisoff G. and Wang X.** 2000. Particle mixing by freshwater infaunal bioirrigators: midges (Chironomidae: Diptera) and mayflies (Ephemeroidea: Ephemeroptera). *J. Great Lakes Res.* 26: 174-182.
- Matisoff G., Fisher J. B. and Matis S.** 1985. Effects of benthic macroinvertebrates on the exchange of solutes between sediments and freshwater. *Hydrobiologia* 122: 19-33.
- Matisoff G., Wang X. and McCall P. L.** 1999. Biological redistribution of Lake Sediments by Tubificid Oligochaetes: *Branchiura sowerbyi* and *Limnodrilus hoffmeisteri/Tubifex tubifex*. *J. Great Lakes Res.* 25: 205-219.
- McCafferty W. P.** 1991. Towards a phylogenetic classification of the Ephemeroptera (Insecta): a commentary on systematics. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 84: 343-360.
- McCafferty W. P.** 1994. Distributional and classificatory supplement to the burrowing mayflies (Ephemeroptera: Ephemeroidea) of the United States. *Entomol. News* 105: 1-13.
- McCall P. L.** 1979. The effects of deposit feeding oligochaetes on particle size and settling velocity of lake Erié sediments. *J. Sediment. Petrol.* 49: 813-818.





- McCall P. L. and Fisher J. B.** 1980. Effects of tubificid oligochaetes on physical and chemical properties of Lake Erie sediments. *In* : Aquatic Oligochaete Biology, R.O. Brinkhurst and D.G. Cook (Eds) New York, Plenum Press : 253-317
- McMahon R. F.** 1983. Ecology of an invasive pest bivalve, *In* : Corbicula. The Mollusca, vol.6 Russell-Hunter W.D. (eds) Ecology Academic press San Diego: 505-561.
- Meadows P. S. and Tait J.** 1989. Modification of sediment permeability and shear strength by two burrowing invertebrates. *Mar. Biol.* 101: 75-82.
- Mermillod-Blondin F., Gérino M., Creuzé des Châtelliers M. and Degrange V.** 2002. Functional diversity among 3 detritivorous hyporheic invertebrates: an experimental study in microcosms. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 21: 132-149.
- Migeon S., Weber O., Faugeres J.-C. and Saint-Paul J.** 1999. SCOPIX: A new X-ray imaging system for core analysis. *Geo-Marine Letters* 18: 251-255.
- Morel F. M. M. and Hering J. G.** 1993. Principles and applications of aquatic chemistry. Wiley-Interscience (New York), 588 p.
- Morel F. M. M. Kraepiel A. M. L. and Amiot M.** 1998. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 29: 543-566.
- Mouthon J.** 1981. Sur la présence en France et au Portugal de *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae) originaire d'Asie. *Basteria* 45: 109-116.

## O

- Odin M., Fuerttet-Mazel A., Ribeyre F. and Boudou A.** 1995. Inorganic mercury and methylmercury bioaccumulation by nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia rigida* from the water column as the initial contamination source – Quantification of the actions and interactions with temperature, pH and photoperiod. *Toxicol. Environ. Chem.* 48: 213-244.
- Odin M., Ribeyre F. and Boudou A.** 1996. Temperature and pH effects on cadmium and methylmercury bioaccumulation by nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia rigida*, from water column or sediment source. *Arch. Environ. Conta. Toxicol.* 31: 339-349.
- Officier C. B. and Lynch D. R.** 1982. Interpretation procedures for the determination of sediment parameters from time-dependent flux inputs. *Earth Planet. Sc. Lett.* 61: 55-62.



P

- Park S. S. and Jaffé P. R.** 1996. Development of a sediment redox potential model for the assessment of a postdepositional metal mobility. *Ecol. Model.* 91:169-181.
- Petersen K., Kristensen E. and Bjerregaard P.** 1998. Influence of bioturbating animals on flux of cadmium into estuarine sediment. *Mar. Environ. Res.* 45 : 403-415.
- Peterson G. S., Ankley G. T. and Leonard E. N.** 1996. Effect of bioturbation on metal-sulfide oxidation in surficial freshwater sediments. *Environ. Toxicol Chem.* 15: 2147-2155.
- Poddubnaia T. L. and Sorokin Yu. I.** 1961. The depth of the layer of optimal feeding of tubificids in connection with their movements in the sediment [in Russian]. *Izv. Inst. Biol. Vodokhran. Akad. Nauk. SSSR* 10: 14-17.

R

- Rasmussen A. D., Banta G. T. and Andersen O.** 2000. Cadmium dynamics in estuarine sediments: effects of salinity and lugworm bioturbation. *Environ. Toxicol Chem.* 19: 380-386.
- Reible D. D., Popov V., Valsaraj K. T., Thibodeaux L. J., Lin F., Dikshit M., Todaro M. A. and Fleeger J. W.** 1996. Contaminant fluxes from sediment due to tubificid oligochaete bioturbation. *Wat. Res.* 30: 704-714.
- Reid R. G. B., McMahon R. F., Foighil D. O. and Finnigan R.** 1992. Anterior inhalant currents and pedal feeding in bivalves. *The Veliger* 35(2): 93-104.
- Rhoads D. C.** 1974. Organism-sediment relations on the muddy sea floor. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 12: 263-300.
- Rhoads D. C. and Boyer L. F.** 1982. The effect of marine benthos on physical properties of sediments : A successional perspective. *In* : Animal-sediment relations. McCall P. L. and Tevest M. J. S. (Eds.) Plenum N.Y. Press: 3-52.
- Rice D.L.** 1986. Early diagenesis in bioadvective sediments : Relationships between the diagenesis of beryllium-7, sediment reworking rates, and the abundance of conveyor-belt deposit-feeders. *J. Mar. Res.* 44: 149-184.



- Robbins J. A., McCall P. L., Fisher J. B. and Krezoski J. R.** 1979. Effects of deposit feeders on migration of  $^{137}\text{Cs}$  in lake sediments. *Earth. Planet. Sc. Lett.* 42: 277-287.
- Robbins J.A.** 1986. A model for particle-selective transport of tracers in sediments with conveyor belt deposit feeders. *J. Geophys. Res.* 91: 8542-8558.
- Robert S., Blanc G., Abril G., Lavaux G. and Schäfer J.** 2003. Metal mobilization in the fluid and mud of the Gironde estuary (France) in low discharge regime. *Mar. Chem.* (sous-  
presse).
- Rodriguez, P., Martinez-Madrid M., Arrate J. A. and Navarro E.** 2001. Selective feeding by the oligochaete *Tubifex tubifex* (Tubificidae, Clitellata). *Hydrobiologia* 463: 133-140.
- Roesijadi G. and Robinson W. E.** 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation, and release. *In: Aquatic toxicology: molecular, biochemical, and cellular perspectives.* Malins D. C. and Ostrander G. K. (Eds). CRC Press, Inc., Boca Raton, p 387-420.
- Rogaar, H.** 1980. The morphology of burrow structures made by tubificids. *Hydrobiologia* 71: 107-124.
- Roméo M., Bennani N., Gnassia-Barelli M., Lafaurie M. and Girard J.-P.** 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicol.* 48: 185-194.
- Rosso A., Lafont M. and Exinger A.** 1993 Effets des métaux lourds sur les peuplements d'oligochètes de l'Ill et de ses affluents (Haut-Rhin, France). *Annls Limnol.* 29 (3-4) : 295-305.
- Rudd J.W.M.** (1995). Sources of methylmercury to freshwater ecosystems: a review. *Water Air Soil Poll.* 80: 697-713.

## S

- Sager M. and Pucsko R.** 1991. Trace element concentrations of oligochaetes and relations to sediment characteristics in the reservoir at Altenwörth, Austria. *Hydrobiologia* 226: 39-49.
- Sambugar B.** 1994. Oligocheti. *In: Manuale per il riconoscimento dei macroinvertebrati delle acque dolci italiane.* Vol. 1. Campaioli S., Guetti P.F., A. Minelli, and Ruffo S. (Eds) APR & B Trento : 109-136.



- Sandnes J., Forbes T., Hansen R., Sandnes B. and Rygg B.** 2000. Bioturbation and irrigation in natural sediments, described by animal-community parameters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 197: 169-179.
- Sauter E.** 1990. Etude expérimentale de la bioaccumulation des dérivés du mercure chez une larve d'insecte intrasédimentaire - *Hexagenia rigida* - Incidence de différents facteurs écotoxicologiques. Thèse de Doctorat n° 544. Université Bordeaux 1, 344 p.
- Schäfer J. and Blanc G.** 2002. Relationship between ore deposits in river catchments and geochemistry of suspended particulate matter from six rivers in southwest France. *Sci. Tot. Environ.* 298: 103-118.
- Sickel J. B.** 1986. *Corbicula* population mortalities: factors influencing population control. *Am. Malacol. Bull. Spec. Ed.* 2: 89-94.
- Smith J.N., Boudreau B.P. and Noshkin V.** 1986/87. Plutonium and 210 Pb distributions in northeast Atlantic sediments : subsurface anomalies caused by non-local mixing. *Earth Planet. Sc. Lett.* 81: 15-28.
- Soster F. M., Harvey D. T., Troksa M. R. and Grooms T.** 1992. The effect of tubificid oligochaetes on the uptake of zinc by Lake Erié sediment. *Hydrobiologia* 248: 249-358.
- Soto M. and Marigomez I.** 1997. BSD extent, an index for metal pollution screening based on the metal content within digestive cell lysosomes of mussels as determined by autometallography. *Ecotox. Environ. Safe.* 37: 141-151.
- Sparks T.** 2000. Statistics in écotoxicologie. Wiley and sons, UK. 320 p.
- Sundby B. and Silverberg N.** 1985. Manganese fluxes in the benthic boundary layer. *Limnol. Oceanogr.* 30: 372-381.

## J

- Tachet H., Richoux P., Bournaud M. and Usseglio-Polatera P.** 2000. Invertébrés d'eau douce, systématique, biologie, écologie. CNRS Editions. 155 p.
- Tessier A. and Campbell P. G. C.** 1987. Partitioning of trace metals in sediments: Relationships with bioavailability. *Hydrobiologia* 149: 43-52.





- Tessier A. and Campbell P. G. C.** 1988. Partitioning of trace metals in sediments. *In* : Metal speciation: Theory, Analysis and Application. Kramer R and Allen HE, (Eds) Lewis Publishers Inc., MI, USA : 183-199.
- Tessier A., Couillard Y., Campbell P. G. C. and Auclair J. C.** 1993. Modelling Cd partitioning in oxic lake sediments and Cd concentrations in the freshwater bivalve *Anodonta grandis*. *Limnol. Oceanogr.* 38: 1-17.
- Tran D., Boudou A. and Massbauau J.-C.** 2000. Mechanism for maintaining oxygen consumption under varying oxygenation levels in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Can. J. Zool.* 78: 2027-2036.
- Tran D., Ciret P., Ciutat A., Durrieu G. and Massabuau J.-C.** 2003. Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: application to cadmium. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 914-920.
- Tran, D.** 2001. Etude des mécanismes de régulation de la ventilation chez le bivalve *Corbicula fluminea*. Influence de l'oxygène et de l'apport trophique. Application aux problèmes de bioaccumulation et de biodétection du cadmium. Thèse de doctorat N° 2320, Université Bordeaux 1, 141 p.
- Vale C. and Sundby B.** 1998. The interactions between living organisms and metals in intertidal and subtidal sediments. *In*: Metal metabolism in aquatic environments. W. J. Langston and M. J. Bebianno (Eds) : 19-29. London.

## W

- Wall S. B., Isely J. J. and La Point T. W.** 1995. Fish bioturbation of cadmium-contaminated sediments: factors affecting Cd availability to *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 15: 294-298.
- Wallace W. G., Lopez G. R. and Levinton J. S.** 1998. Cadmium resistance in an oligochaetes and its effect on cadmium trophic transfer to an omnivorous shrimp. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 172: 225-237.
- Wang F., Tessier A. and Hare L.** 2001. Oxygen measurements in the burrows of the freshwater insects. *Freshw. Biol.* 46: 317-327.



- Warren L. A. and Haack E. A.** 2001. Biogeochemical controls on metal behaviour in freshwater environments. *Earth-Sc. Rev.* 54: 261-320.
- Warren L. A., Tessier A. and Hare L.** 1998. Modelling cadmium accumulation by benthic invertebrates in situ: The relative contributions of sediment and overlying water reservoirs to organism cadmium concentrations. *Limnol. Oceanogr.* 43: 1442-1454.
- Way C. M., Hornbach D. J., Miller-Way C. A., Payne B. S. and Miller A. C.** 1990. Dynamics of filter feeding in *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae). *Can. J. Zool.* 68: 115-120.
- Westerlund S. F. G., Anderson L. G., Hall P. O. J., Iverfeldt A., Rutgers van der Loeff M. M. and Sundby B.** 1986. Benthic fluxes of cadmium, copper, nickel and lead in the coastal environment. *Geochim. Cosmochim. Acta* 50: 1289-1296.
- Whitley L. S.** 1967. The resistance of Tubificid worms to three common pollutants. *Hydrobiologia* 32: 193-205.
- Wiederholm T., Wiederholm A. M. and Milbrink G.** 1987. Bulk sediment bioassays with five species of fresh-water oligochaetes. *Water Air Soil Poll.* 36: 131-154.
- Wood T. S. and Shelley M. L.** 1999. A dynamic model of bioavailability of metals in constructed wetland sediments. *Ecol. Eng.* 12: 231-252.
- Wright D. A. and Welbourn P. M.** 1994. Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological effects on biota. *Environ. Rev.* 2: 187-214.

## Z

- Zadhin V. I.** 1965. Mollusks of fresh and brackish waters of the USSR [Translated from Russian]. Academy of Sciences of the USSR. 368 p.
- Zimmerman M. C., Wissing T. E. and Rutter R. P.** 1975. Bioenergetics of the burrowing mayfly *Hexagenia limbata* in a pond ecosystem. *Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. Versh.* 9: 3030-3049.



# **ANNEXE**



ESTIMATION OF POTENTIAL AND LIMITS OF BIVALVE CLOSURE RESPONSE TO  
DETECT CONTAMINANTS: APPLICATION TO CADMIUMDAMIEN TRAN, PIERRE CIRET, AURÉLIE CIUTAT, GILLES DURRIEU, and JEAN-CHARLES MASSABUAU\*  
Unité Mixte de Recherche 5805, Laboratoire d'Ecophysiologie et Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques, University Bordeaux 1, and  
CNRS, Place du Dr Peyneau 33120, Arcachon, France

(Received 10 December 2001; Accepted 1 October 2002)

**Abstract**—Bivalve closure responses to detect contaminants have often been studied in ecotoxicology as an aquatic pollution biosensor. We present a new laboratory procedure to estimate its potential and limits for various contaminants and animal susceptible to stress. The study was performed in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* and applied to cadmium. To take into account the rate of spontaneous closures, we integrated stress problems associated with fixation by a valve in common apparatus and the spontaneous rhythm associated with circadian activity to focus on conditions with the lowest probability of spontaneous closing. Moreover, we developed an original system by impedance valvometry, using light-weight impedance electrodes, to study free-ranging animals in low-stress conditions and a new analytical approach to describe valve closure behavior as a function of response time and concentration of contaminant. In *C. fluminea*, we show that cadmium concentrations above 50  $\mu\text{g/L}$  can be detected within less than 1 h, concentrations down to 16  $\mu\text{g/L}$  require 5 h of integration time, and values lower than 16  $\mu\text{g/L}$  cannot be distinguished from background noise. Our procedure improved by a factor of six the cadmium sensitivity threshold reported in the literature. Problems of field applications are discussed.

**Keywords**—Biosensor    Valve closure    Cadmium    *Corbicula fluminea*

## INTRODUCTION

Valvometry techniques have been studied in ecotoxicology for over 20 years now as an aquatic pollution biosensor. These techniques use a bivalve's ability to close its shell when exposed to a contaminant as an alarm signal, and several models have been suggested [1–5]. Some are available on the market, such as the Ifremer–Micrel valvometer [6], the Mossel Monitor [7], or the Dreissena Monitor [8]. However, research has been mainly concerned with perfecting technical solutions, most using animals fixed by their valve, but there has been little published development on signal analysis. In addition, the possibility of working with animals susceptible to stress [9,10] has rarely been illustrated in works devoted to biodetection limits.

In this study, we have developed a plural approach associating a noninvasive valvometric technique coupled to a new analytical approach integrating some aspects of the bivalve physiology. We applied it to the nonsessile freshwater bivalve *Corbicula fluminea* exposed to cadmium. Three original features have been introduced. A system of impedance valvometry has been developed by using light-weight impedance electrodes; this allows the bivalve, which is free to move around, to position itself in the sediment with minimal experimental constraint. Variations in the probability of spontaneous closing over the circadian rhythm were taken into account by working during the period when the probability of spontaneous closing events was lowest. Both points were taken as a prerequisite to enhance animal sensitivity. A new analytical process was applied to reveal the relationship between detection limit and response time. We suggest that this multifactorial approach could improve significantly the way of

testing the potential and the limitations of using bivalves as a rapid response and/or sensitive biosensor for different contaminants.

## MATERIALS AND METHODS

Experiments were carried out on 139 bivalves weighing  $0.76 \pm 0.03$  g fresh weight without the shell (FW; mean  $\pm$  1 SE) from February to March (from 1998 to 2000) at  $15 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ; pH was 7.8 to 8.0; the water was air equilibrated by bubbling, with a natural photoperiod (natural daylight). Natural water ionic composition was (in meq/L)  $\text{NH}_4^+$ , 0.001;  $\text{Na}^+$ , 1.350;  $\text{K}^+$ , 0.092;  $\text{Mg}^{2+}$ , 0.327;  $\text{Ca}^{2+}$ , 0.470;  $\text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^-$ , 1.910;  $\text{Cl}^-$ , 1.030;  $\text{NO}_2^-$ , below limits;  $\text{NO}_3^-$ , 0.002;  $\text{SO}_4^-$ , 0.073. Animals were sampled in Lake Sanguinet (southwest France). They were acclimated in the laboratory for at least three weeks before any experiments to settle their behavior. They could be kept in our laboratory facilities up to two to three years without noticeable mortality.

*Free-living animals versus valve fixation and wearing light-weight electrodes*

*Visual index of valve opening and siphon extension.* Two visual indexes—developed to avoid mechanical contact—were calculated to evaluate the impact of any mechanical recording apparatus. The first index was based on the state of valve openness (open or closed); the second index was based on the state of siphon extension (in or out) determined at four specific times during the day, namely, 10 AM, 12 AM, 2 PM, and 4 PM. Regarding the valve openness, 0 corresponds with valve closed and 1 with an animal that was open. Regarding siphon extension, 0 corresponds with siphons in and 1 with siphons out. Values were determined only once at each sampling time.

In these experiments, 68 *Corbicula* were studied. The bivalves were fed three times a week with a unicellular alga,

\* To whom correspondence may be addressed  
(massabuau@epoc.u-bordeaux.fr).





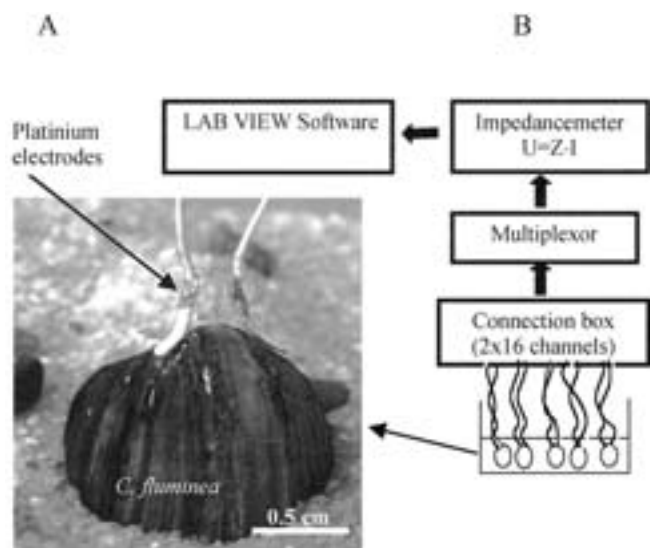


Fig. 1. Impedance valvometry apparatus. (A) Free-ranging *Corbicula fluminea* equipped with two light impedance electrodes. (B) Schematic principle of the recording set-up allowing the simultaneous record of 15 animals.

*Scenedesmus subspicatus*, in a plastic tank (35 × 25 × 15 cm) containing 9 L water, with a substrate of sand (Silaq, Mios, France).

**Effect of attaching bivalves.** To test the effect of a mechanical constraint associated with valve fixation in *Corbicula*, we compared free-behaving bivalves in comparison with fixed individuals. The experiment was carried out on 40 bivalves over 28 d. Twenty *Corbicula* were taken at random and stuck vertically onto plastic plates in a single plastic tank with cyanoacrylate glue (Loctite 401; Manutan, Gonesse, France); the siphons were uppermost, as is their natural position. These animals were monitored for 22 d. Twenty more *Corbicula* were placed in the substrate, with total freedom of movement. After 16 d, five of these individuals were selected at random and glued in the same way as the others. These five animals were monitored for 7 d, and then they were removed and put back into the substrate for the next 5 d.

**Effect of impedance electrodes on valve opening activity.** The experiment was carried out on 28 *Corbicula* over 18 d. Impedance electrodes, used for impedance valvometry, were attached to 14 bivalves (see Fig. 1A and *Light-weight Impedance Electrodes Set-Up* below). These animals were free to move around in the substrate. A group of 14 more *Corbicula*, not equipped with electrodes but in the same experimental tank, was studied simultaneously.

#### Light-weight impedance electrodes set-up

**Impedance electrodes (Fig. 1A).** The electrodes were made of platinum (diam: 3 mm, wt: 20 mg). One electrode was fixed to each valve with cyanoacrylate glue (Loctite 431). The platinum disk was welded to a covered multistrand copper wire (diam: 0.98 mm, length: 60 cm). The platinum-copper wire weld and the external face of the electrodes were coated with resin (Altufix P10; Altulor, Paris, France). After electrode implantations, animals were kept under dim light conditions in isolated tanks equipped with a simulated natural environment where they could move freely and burrow. The animals with electrodes had at least a week to recover in the experimental apparatus before the study began. During the experiment itself,

the animals were isolated from external vibrations in the laboratory using an antivibrating bench.

**Experimental set-up (Fig. 1B).** A total of 15 *Corbicula* were recorded continuously and simultaneously. The free ends of the electrodes were connected to a laboratory-constructed multiplexer that switched the current every second to the different pairs of electrodes and then to a laboratory-constructed impedance meter. This equipment was controlled by computer via a data acquisition card (LAB PC 1200; National Instrument, Austin, TX, USA), using LabView (National Instrument) software. With this equipment, the bivalves' valve activities were recorded and the signals processed. Note that, throughout the text, the word *valvometer* indicates any device using bivalves as a bioindicator.

**Measurements.** Measurements were based on the application of Ohm's Law,  $V = RI$  (with the slight difference that resistance,  $R$ , is an impedance in alternating current), where  $V$  = voltage and  $I$  = current. The impedance meter, the measuring apparatus, applies an alternating potential difference at a frequency of 40 kHz with a constant potential of 500 mV between the two electrodes. This apparatus measures current, which varies according to the distance between the electrodes.

#### Experiments on the daily opening/closing rhythm

This experiment was designed to determine at what time the probability of observing spontaneous valve closures was the minimum in order to minimize the effect of unspecific Cd closures. It was carried out using 71 *Corbicula* over a period of 50 d. The bivalves were placed in tanks containing 2 L water in an open circuit, with a substrate of sand (Silaq). The animals ( $n = 5$  per tank) were fed continuously with *Scenedesmus subspicatus* using a pump (Gilson, Villiers-le-Bel, France). Air was bubbled through the water to mix the water column. The amounts of food continuously provided were adjusted in the range 4 to 6 × 10<sup>5</sup> algae/ml. Within this concentration range, the ventilatory activity is independent of alga concentration in normoxic *C. fluminea* [7].

#### Threshold of sensitivity to cadmium

The experiment was carried out on 60 *C. fluminea*. Three nominal cadmium doses were tested (total dissolved Cd concentrations in the water of 50, 500, and 1,250 µg/L) and compared with the reference (0 µg/L) status defined above. These concentrations were obtained from a stock solution of Cd at 1,000 mg/L (CdCl<sub>2</sub>; Merck, Whitehouse Station, NJ, USA). There were four replicates for each concentration studied, with five animals per replicate. The experimental procedure consisted of recording valve activity for each animal over a period of 29 h, 24 h before contamination to obtain a reference state at 0 µg/L (10 AM–10 AM). Next, the experimental units containing the same animals were contaminated with a single nominal addition of contaminant. Responses were recorded during the following 5 h, i.e., during the period 10 AM to 4 PM to focus on the period when the probability of spontaneous closing was lowest (see *Results* section). Thus, the 0-µg/L response (reference) refers to the response of the tested group as recorded from 10 AM to 4 PM the day prior the test experiment, before dosing began. Figure 2 illustrates, for two different groups of *Corbicula* studied in parallel, the stability and reproducibility of this reference status over 15- to 18-d periods (compare Fig. 2C and D; see also Fig. 2A).

**Calculating the sensitivity threshold.** For each replicate of five bivalves, the number of responses was counted at 1, 15,



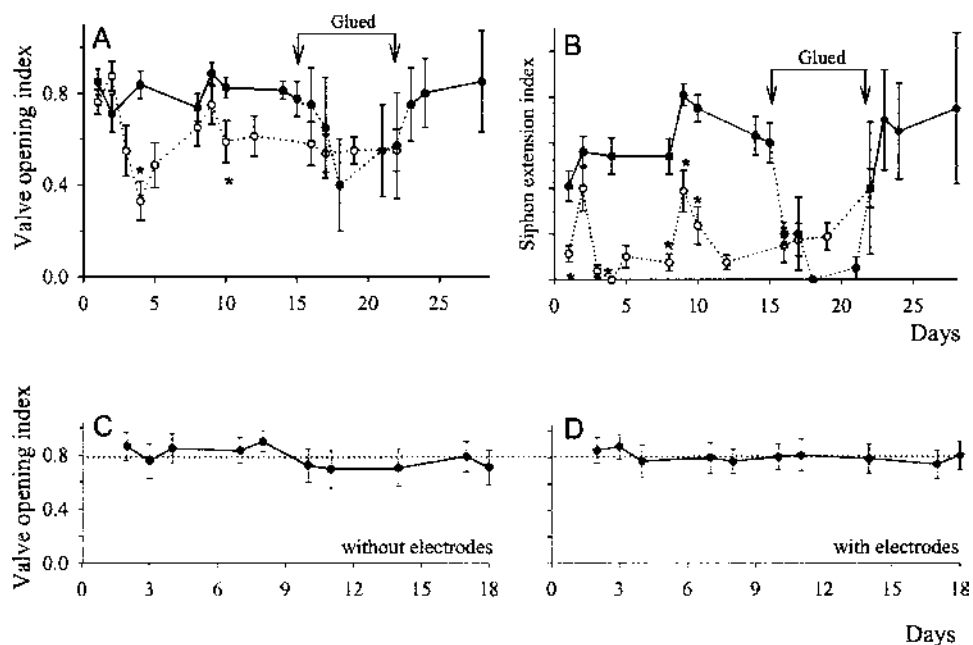


Fig. 2. Effect of being glued by a valve on valve activity in *Corbicula*. (A) Visual index of valve opening. (B) Visual index of siphon extension. Dotted lines, animals glued to a support; solid lines, animals free in the substrate. \* Index statistically different ( $p < 0.05$ ) between free bivalves and those glued on the same day;  $n = 20$  in each experimental series. Index of valve opening in animals without (C) or with (D) impedance electrodes;  $n = 14$  per experimental series.

30, 45, 60, 120, 210, and 300 min (called integration times). They were either the beginning of a closing behavior or, for already closed animals, a series of brief opening and closing reactions (called taste water reactions). As the sensitivity threshold, we selected the mean effective concentration (EC50), which corresponds with the dose of contaminant that induced 50% of animal closures for a given integration time.

#### Statistical analysis

**Free-living animal experiments.** Results are given as mean  $\pm 1$  SE ( $n$ , the number of clams). To study the factor effects, we performed the analysis of variance method after checking assumptions (normality and homoscedasticity of the error term). When the assumptions were not met (graphically and using ad hoc tests), we used a Box-Cox data transformation or a nonparametric Kruskal-Wallis test. If the null hypothesis was rejected, we used the least square deviation test to detect significant differences between groups. For all statistical results, a probability of  $p < 0.05$  was considered significant.

**Daily rhythm.** A density estimator makes it possible to describe the structures of a data set, such as skewness and multimodality, that may be associated with different behaviors (mixture of several distributions and clusters). A histogram-type estimator is the most frequently used estimator, but it is strongly affected by choice and number of classes. So we used a nonparametric kernel estimator [11] because it behaves much better statistically (consistency, asymptotic normality, and numerical behavior). For instance, this class of estimators is often used in mode hunting. A kernel estimator is defined by

$$\hat{f}_h(x) = \frac{1}{nh} \sum_{i=1}^n K\left(\frac{x - X_i}{h}\right),$$

where  $n$  is the sample size,  $h$  is the bandwidth (the smoothing parameter) to be estimated, and  $K$  is the continuous fixed kernel function with finite variance generally satisfying  $K > 0$ ,  $K(-x) = K(x)$ , and  $\int K(x)dx = 1$ . This raises the question of deter-

mining how many of these modes are real features of the underlying density of probability  $f$ . This heavily depends on the bandwidth;  $\hat{f}_h(x)$  is wiggly when  $h$  is small and very flat when  $h$  is large. To optimize  $h$ , we used a second-generation method (plug-in method [12]), and a Gaussian kernel was used to construct the estimates. All these computations were performed with SPLUS software, version 5.1, Release 1, for the Linux system [13].

**Sensitivity threshold.** The response threshold to Cd, EC50, was obtained using Mitscherlich's model [14]. It can be written  $Y = a + b(1 - \exp(-cX))$ , where  $Y$  is the percentage of response and  $X$  is the cadmium concentration (in  $\mu\text{g/L}$ ). Parameters  $a$ ,  $b$ , and  $c$  were estimated using the quasi-Newton method.

**Dose-response curves.** A model to describe the relationship between EC50 and the response integration time ( $T$ ) was developed as

$$\text{EC50} = (a_1T + b_1)I(T \leq c) + (a_2T + b_2)I(T > c)$$

where the function  $I(\Pi)$  takes the value 1 or 0 according to whether the condition  $\Pi$  is satisfied or not. Parameters  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $b_1$ ,  $b_2$ , and  $c$  were estimated using the combined Hooke-Jeeves and quasi-Newton algorithms. Here, the  $c$  parameter corresponds to the unknown breakdown point to be estimated, revealing different response mechanisms to cadmium.

## RESULTS

#### Effect of attaching bivalves

Figure 2A shows the evolution of the visual index, determined during the period 10 AM to 4 PM, for the opening of the valve over time in *Corbicula* kept in the same experimental tank but either glued by a valve ( $n = 20$ ) or free to move about on the surface of a sandy substrate ( $n = 20$ ). Monitoring the activity of the animals that had been glued was different



in two basic ways from monitoring the freely moving animals. First, over an initial period of about 10 d, the index for valve opening was highly unstable compared with that of the free animals. Second, for glued valves, the index stabilized around 0.6, whereas with the free animals, it was 0.8 from the time of being placed in the tank ( $p < 0.05$ ).

To ascertain that behavior difference was indeed associated with their being glued, we then glued five animals selected at random from the substrate surface. This transfer was carried out on the 16th day of the experiment. A preliminary experiment showed that such a handling process, without being glued, disturbed free animals for at most 1 to 3 h. It was clear that valve index dropped significantly to the level of the individuals already fixed for over two weeks. Moreover, after being unglued for 6 d, animals rapidly returned to the state of reference. To confirm this phenomenon, we also studied the behavior of siphons in the same animals (Fig. 2B). The effect of gluing was just as impressive here because the calculated index fell between 0.4 to 0.8 in the free animals and 0 to 0.4 in the animals that were fixed. Once again, the transition from free to glued resulted in a rapid and reversible change of state.

The fact that attaching *Corbicula* by a valve produced a modification in the opening/closing state and hence potentially in the probability of closure when confronted with the arrival of a contaminant led us to look for an alternative recording method. We therefore examined the possibility of using light-weight impedance electrodes, which would allow the animal to be unrestrained and to move freely.

#### Effect of impedance electrodes

We used the visual index to look for possible disturbances associated with this technique. Two groups of animals ( $n = 14$  per treatment) were kept in the same tank for a period of 18 d. One group was the control group and the other was equipped with light-weight electrodes glued onto the valves above the siphons. Results are shown in Figure 2C, 2D. This experiment confirmed that animals without the electrodes had a visual index of 0.8 for the period 10 AM to 16 PM, which illustrates the replicability of our experimental conditions (compare Fig. 2C and A). Also, their behavior was stable throughout the entire experiment. The second point to note is that, in the animals equipped with the devices, there was no significant difference in their opening state compared with the control condition (free animals, Fig. 2D).

Because wearing these electrodes did not influence the free behavior of *Corbicula* and did not increase the probability of spontaneous closing, we used this technique to study the sensitivity of the valve-closure response following an addition of contaminant.

#### Daily opening/closing rhythm

Figure 3 shows a series of typical recordings of the evolution in behavior in an animal studied over a period of 30 d in air-equilibrated water. This animal belongs to a group of 15 specimens, and its compartment was typical of the entire group, which was equipped ( $n = 15$ ) and put in place at  $t_0$  on the first day (Day 1). At this time, the recording systematically consisted of a percentage of daily opening time of  $90.3 \pm 10.2\%$  and bursts of opening/closing (frequency of movements in each burst  $0.5 \pm 0.1/\text{min}$ ) characteristic of burrowing behavior and positioning in the sediment confirmed by visual observation. This behavior then changed; burrowing behavior became less and less frequent and more and more brief. By

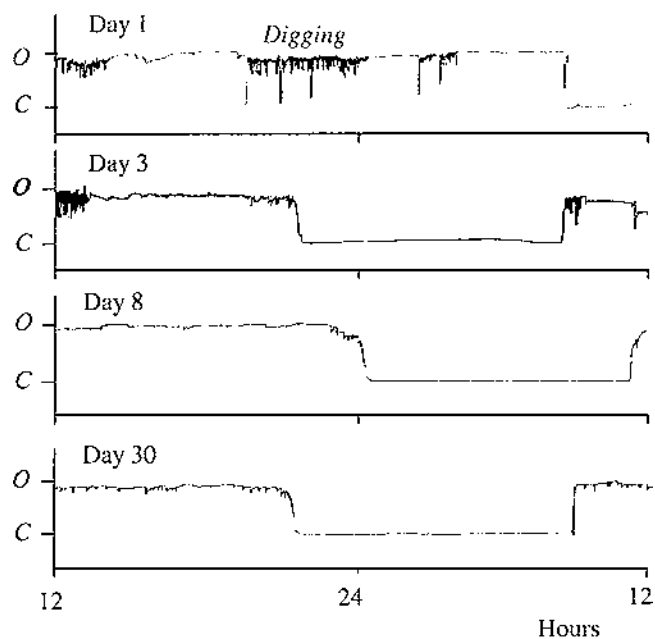


Fig. 3. Recording of typical daily valve activity of *Corbicula fluminea* at rest, fed continuously with a unicellular algae, *Scenedesmus subspicatus*.

day 8, burrowing was exceptional and the daily percentage of time spent in the open position was  $47.7 \pm 8.1\%$ . This average percentage remained significantly constant. It was  $42.9 \pm 9.6\%$  at day 20 and  $44.3 \pm 8.5\%$  at day 30. Interestingly, note that, at days 3, 8, and 30, the measured valve open time for the period 10 AM to 4 PM recorded in this specimen appears quite close to the mean visual opening frequency of 0.8 (80%) reported in Figure 2A and C in different experimental groups (reference conditions). This again illustrates the replicability of the present experimental conditions with and without electrodes.

As this technique does not modify the activity of *Corbicula* (Fig. 2C), it does allow a particularly detailed analysis of behavior because it enables us to reveal, first, burrowing activity, which is inaccessible using traditional techniques where animals are fixed; second, a period of adaptation to the experimental tank, which went unnoticed with the visual analysis index that was only based on spot analysis; and third, the occurrence of a daily rhythm. One striking phenomenon is the timing of the opening and closing periods and transition from one state to another (Fig. 3), which confirms the existence of a daily rhythm, already described by Ham and Peterson [2].

When using bivalves to detect the arrival of a contaminant in the environment, it is clear that the sensitivity of the equipment will depend on daily valve rhythm, as suggested by Sluyts et al. [15]. In any group of animals, the greater the number of animals in a closed state in the uncontaminated condition, the lower the probability of closure will be. To integrate this phenomenon, we studied the probability of spontaneous opening and closing throughout the daytime in this first group of 15 animals after an acclimation period of one week (135 d of recordings). Figure 4A shows experimental measures of, respectively, closing (Fig. 4A) and opening (Fig. 4B) variables in a 24-h period. Figure 4C demonstrates the existence of a bimodal distribution of the valve closing variable (Gaussian kernel and bandwidth parameter = 1.10). Comparing Figure 4A and C shows that these two modes are clearly associated



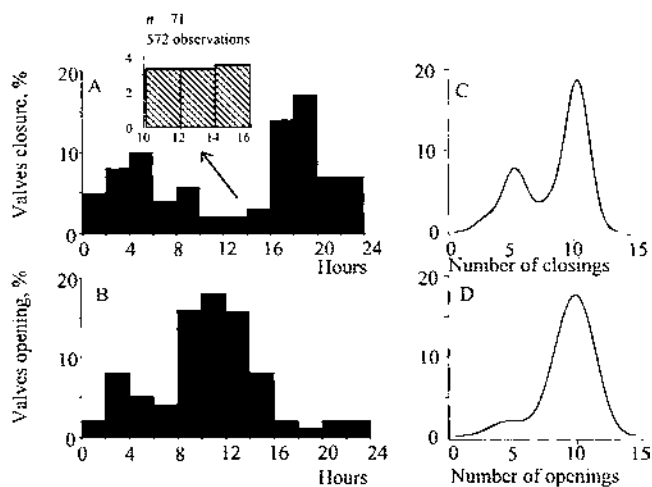


Fig. 4. Distribution of the closing/opening valve daily rhythm in *Corbicula fluminea*. (A, B) Histogram representations by 1-h time classes over a 24-h period in 15 bivalves. In insert, probability of closure in 71 bivalves between 10 AM and 4 PM. (A, B) Kernel density estimators of closing (C) and opening (D) variables; their realization is given on the abscissa.

with the periods 2 to 6 AM and 4 to 8 PM. Similarly, comparing Figure 4B and D shows a one-mode distribution opening variable centered in the range 8 to 16 h (Gaussian kernel and bandwidth parameter = 1.54). Bivariate kernel estimators of time (between 10 AM and 4 PM) and closing variables show that the probability of closure was minimal and equal to 3.27%. To confirm this, we analyzed the behavior of a larger number of animals during this time period ( $n = 572$  d in 71 bivalves). The insert of Figure 4 confirms that this probability is equal to  $3.3 \pm 0.1\%$ , which still confirms the replicability of our resting control conditions. It demonstrates also that  $n = 15$  (135 d in 15 bivalves) is a large enough value to estimate precisely this rhythm. Note also that the probability of spontaneous closure over 24 h was less than 1 event/d/animal ( $0.63 \pm 0.05$ ).

Thus, the sensitivity of a valvometer based on *C. fluminea* use at  $15^\circ\text{C}$  is optimal between 10 AM and 4 PM, when the probability of spontaneous closure is lowest. In follow-up studies, we have carried out detection tests during this time period only. Our aim was to reach a maximum sensitivity following an exposure.

#### Determining the cadmium sensitivity thresholds

To define these thresholds, for each concentration, we determined the number of closures or rapid opening/closure series observed in 1, 15, 30, 45, 60, 120, 210, and 300 min. Then, for each integration time, we represented the evolution of the percentage of responses according to the three concentrations of cadmium studied. As a rule, the response was evidently faster at higher Cd concentrations. This type of representation enabled us to determine the necessary and sufficient concentration to observe 50% of response in a given time (EC50). The results of this analysis for integration times of 30, 60, 120, and 300 min are shown in Figure 5. The Mitscherlich model fits well with our data, as the determination coefficient  $R^2$  was  $> 0.98$ . Interestingly, this analysis quantified how EC50 depends on the response integration time. After 30 min, EC50 was  $155 \mu\text{g/L}$ , decreasing to a minimum of  $16 \mu\text{g/L}$  after a 300-min recording. The increase in sensitivity was 10-fold. For a better characterization of the response, we next

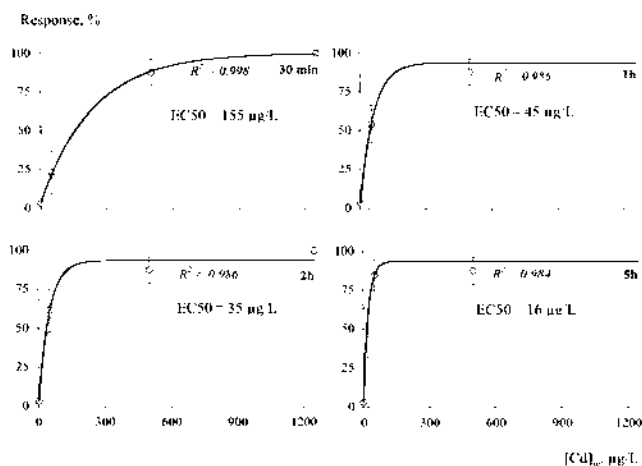


Fig. 5. Percentage of events (closures or brief opening followed by closure) in relation to occasional additions of Cd to the water between 10 AM and 4 PM, integrated over four analysis periods: 30 min and 1, 2, and 5 h;  $n = 20$  bivalves for each Cd dose studied and  $n = 71$  bivalves for the condition without Cd. The response threshold to Cd, concentration effect of 50% (EC50) of bivalves, was obtained using Mitscherlich's model.

modeled the relationship between EC50 and the integration time as

$$\text{EC50} = (50.54 - 0.12T)I(T \leq 64.60) + (269.50 - 4.13T)I(T > 64.60)$$

which is in good agreement with experimental data ( $R^2 = 0.998$ ; Fig. 6). Here, the breakdown point estimator ( $50 \mu\text{g/L}$  and 65 min) strongly suggests a different, changing type of physiological response mechanism to cadmium. At first, there is a rapid detection mechanism in response to concentrations above  $50 \mu\text{g/L}$ . Next, a second mechanism is involved, with longer response times, in the detection of concentrations below  $50 \mu\text{g/L}$ .

#### DISCUSSION

The use of bivalve mollusks as biosensors has been developing over the last 20 years [1-7,16,17]. Importantly, the major aim of the present work was not a comparative study between various valvometer types nor the publication of a new, although especially light, design. It was rather an analysis characterizing the existence of potential problems in bivalves susceptible to stress when particular species are glued within

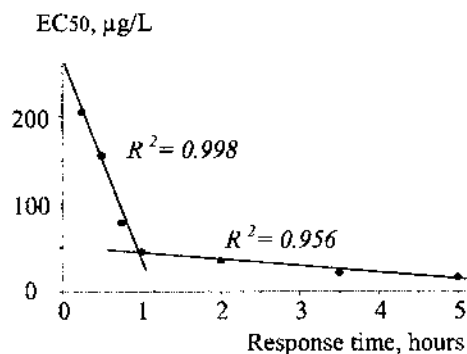


Fig. 6. Relation between the response threshold of *Corbicula* to Cd concentration effect of 50% (EC50) and the response time. There were two types of response to Cd, the first was rapid (0-1 h) and the second was slower (1-5 h).





a valvometer device (Fig. 2) and the development of a new analytical approach to describe an optimized relationship between bivalve closure response sensitivity and response time (Figs. 5 and 6) in low-stress animals (Fig. 1). To our knowledge, these questions have not been addressed until now.

A preliminary study into the behavior of *C. fluminea* over a daily cycle enabled us to determine an optimal period of time (10 AM–4 PM; Fig. 4) during which the probability of unspecific closing is minimal and thus sensitivity to any contaminant is optimal. We applied this optimal measurement period to the detection of cadmium and showed how the cadmium sensitivity estimation is time dependent (Fig. 6). This technique proved its effectiveness, as we improved by a factor of six the cadmium sensitivity threshold reported in the literature. The lowest threshold previously reported was 100  $\mu\text{g/L}$  [17], as for *Dreissena polymorpha* [7]. It was 50  $\mu\text{g/L}$  in the oyster *Crassostrea gigas* as measured with the Ifremer–Micrel valvometer [18]. In the present work, it is 16  $\mu\text{g/L}$  for *C. fluminea* if the response is integrated over an integration time of 5 h.

#### The problem of stress in biocaptors

To our knowledge, this problem is considered only rarely in the literature on water breathers, never on bivalves, and we strongly suggest that it is underestimated. Massabuau et al. [9], in *Anodonta cygnea*, and Tran et al. [10], in *C. fluminea*, reported that stress can very easily change the composition of gases in the blood and hence ventilatory activity. We provide further evidence (Fig. 2) by describing the effect of gluing on the open/close status in a bivalve population. We show that this phenomenon has a direct impact on the probability of valve closure in response to the equipment itself.

Another level of analysis of the effect of stress on *Corbicula* can be based on a comparison with an animal's behavior when free on a natural substrate. Because in this situation *Corbicula* is motionless, it is therefore surprising at first to see the impact of fixing with glue (Fig. 2). This difference is obviously due to the difference between an experimentally imposed immobilization in open water and a self-imposed absence of moving. Several mechanisms associated with positioning can be suggested. The first is that, when the animals are glued in a valvometer device, they are placed in water with their foot no longer in contact with the sediment. The consequence is perfectly clear as, during the first 2 to 3 d of fixation, we observe movements of the foot, which was an attempt to get into position. After this initial period, the foot was retracted between the valves, a position that does not correspond to resting behavior in natural conditions, where it is permanently out. Also in our experience, the behavior brought about by being kept in a basket in water, a method often used in ecotoxicological experiments with caging methods, can lead to the same abnormal behavior in *Corbicula* (personal observation). The second cause of disturbance is that fixing via a valve will necessarily modify, in a prolonged or permanent way, the biomechanics of the closing/opening movements. It is possible that, by doing this, some proprioceptors were stimulated in an abnormal fashion by producing a state of constant stress. This critical analysis for the case of *C. fluminea* also applies to *Anodonta cygnea* [6] and hence possibly also to other burrowing animals.

#### Sensitivity of the impedance valvometer

Taking into account the problem of stress provoked by valve fixation and the natural opening/closing rhythm enabled us to

improve considerably on the cadmium sensitivity studies already reported for *Corbicula* and other bivalves [4,7,17]. Once this problem was taken into consideration, we have shown that the detection limit was closely linked to the response integration time predefined by the user. We suggest two types of response for this metal. A rapid response, covering the time 0 to 1 h; then a slower response, which we have analyzed up to +5 h. We hypothesize that either there are two types of receptor (external and internal, e.g.) or a single type of receptor functioning with two mechanisms at different thresholds. In all cases, for cadmium detection capacities by *Corbicula*, it is clear that the mechanism with the low detection threshold is not triggered rapidly. A rapid response, occurring within less than 1 h, can only be obtained if one is dealing with concentrations higher than 45  $\mu\text{g/L}$ .

#### Application in the field

The minimum concentration of dissolved Cd that our system is able to detect is 16  $\mu\text{g/L}$ . This concentration is still high by comparison with in situ situations. In San Francisco Bay (CA, USA), Cd concentrations vary from 0.01 to 0.14  $\mu\text{g/L}$  [19] ([www.sfei.org/rmp/1997](http://www.sfei.org/rmp/1997)). In France, in the River Lot, the average concentration is less than 2  $\mu\text{g/L}$ . The ambient water-quality criterion in Europe and the United States is 5  $\mu\text{g/L}$  (<http://www.epa.gov/ost/humanhealth/dcp8.html>). It is only within more contaminated sites that concentrations of dissolved Cd reach 25 to 30  $\mu\text{g/L}$  [20]. Valvometry based on *Corbicula* could not therefore be applied in such situations. Thus, it could only be useful in sites where at least 5-h transient rises above this value are expected. This is the kind of key information the present screening technique can provide before any tentative field application.

A further limitation is the problem of biotic and abiotic conditions (temperature, photoperiod, light intensity, trophic additions), which may modify the daily rhythm of activity and thus modify the sensitivity of the signal by provoking false responses or an absence of response [21–23]. Clearly, the complexity of the environment, which is so far removed from the optimized conditions found in the laboratory, always poses problems of interpretation for low concentrations. The notion of background noise, alongside that of optimized limits, is therefore fundamental. These problems are not, however, specific to valvometry but apply to the use of biosensors in general that seem more suitable in cases where pollution is acute.

#### CONCLUSIONS

We suggest that the methodological changes developed here could be applied to other bivalves and other contaminants to better define their optimal response capacities in simplified, although perfectly controlled, conditions. The important points to consider are, first, the characterisation of valve behavior in the face of stress due to the experimental set-up; second, the definition of a natural valve closing/opening rhythm (equivalent to background noise) to permit work during the optimal period; and third, mathematical description, using an analysis of the dose–response-type curve that integrates time of any detection mechanism(s) used.

*Acknowledgement*—D. Tran and A. Ciutat were supported by a grant from the French Ministry of Research and Education. All experiments presented in this article complied with the current laws of France, where they were performed.



## REFERENCES

1. Véro M, Salanki J. 1969. Inductive attenuator for continuous registration of rhythmic and periodic activity of mussel in natural environment. *Med Biol England* 7:235–237.
2. Ham KD, Peterson MJ. 1994. Effect of fluctuating low-level chlorine concentration on valve movement behaviour of the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*). *Environ Toxicol Chem* 13:493–498.
3. Englandlund VPM, Heino MP, Melas G. 1994. Field method for monitoring valve movement of bivalve molluscs. *Water Res* 28:2219–2221.
4. Borcharding J. 1997. The “Dreissena-monitor”—Improved evaluation of dynamic limits for the establishment of alarm-threshold during toxicity tests and for continuous water control. In Hill IR, Heimbach F, Leeuwangh P, Matthiessen P, eds, *Freshwater Field Tests for Hazard Assessment of Chemicals*. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp 477–484.
5. Curtis TM, Williamson R, Depledge MH. 2000. Simultaneous, long-term monitoring of valve and cardiac activity in the mussel *Mytilus edulis* exposed to copper. *Mar Biol* 136:837–846.
6. Floch A. 1998. Un capteur biologique original enregistrant les mouvements valvaires des mollusques bivalves. *Bulletin de la Société des Sciences Naturelles* 20:1–11.
7. Kramer KJM, Jenner HA, De Zwart D. 1989. The valve movement response of mussels: A tool in biological monitoring. *Hydrobiologia* 188/189:433–443.
8. Borcharding J, Wolf J. 2001. The influence of suspended particles on the acute toxicity of 2-chloro-4-nitro aniline, cadmium and pentachlorophenol on the valve movement response of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Arch Environ Contam Toxicol* 40:497–504.
9. Massabuau J-C, Burtin B, Weathly M. 1991. How is O<sub>2</sub> consumption maintained independent of ambient oxygen in mussel *Anodonta cygnea*? *Respir Physiol* 83:103–114.
10. Tran D, Boudou A, Massabuau J-C. 2000. Mechanism of oxygen consumption maintenance under varying levels of oxygenation in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Can J Zool* 78:2027–2036.
11. Scott DW. 1992. *Multivariate Density Estimation*. John Wiley, New York, NY, USA.
12. Jones MC, Marron JS, Sheather SJ. 1996. A brief survey of bandwidth selection for density estimation. *J Am Stat Assoc* 91:401–407.
13. Venables WN, Ripley BD. 1994. *Modern Applied Statistics with S-Plus*. Springer-Verlag, New York, NY, USA.
14. Pavé A. 1994. *Modélisation en Biologie et en Ecologie*. Aléas, Lyon, France.
15. Sluyts H, Van Hoof F, Cornet A, Paulussen P. 1996. A dynamic new alarm system for use in biological early warning systems. *Environ Toxicol Chem* 15:1317–1323.
16. Bouget JF, Mazurie J. 1997. Dispositif de surveillance biologique de la qualité d’eau d’un site conchylicole estuarien utilisant un biocapteurs valvaire muni d’huitres et de moules. *Techniques Sciences Méthodes* 11:71–79.
17. Doherty FG, Cherry DS, Cairns J. 1987. Valve closure response of the Asiatic clam *Corbicula fluminea* exposed to cadmium and zinc. *Hydrobiologia* 153:159–167.
18. Sloff W, De Zwart D, Marquenie JM. 1983. Detection limits of a biological monitoring system for chemical water pollution based on mussel activity. *Bull Environ Contam Toxicol* 30:400–405.
19. San Francisco Estuary Institute. 1999. 1997 Annual report for the regional monitoring program for trace substances in the San Francisco Estuary. Richmond, CA, USA.
20. Andrès S. 1999. Etude écotoxicologique des transferts de cadmium et de zinc entre la colonne d’eau et les sédiments du Lot (France) et les organismes aquatiques—Approches in situ et expérimentales. PhD thesis. University of Bordeaux 1, Bordeaux, France.
21. Englandlund V, Heino M. 1994. Valve movement of *Anodonta anatina* and *Unio tumidus* (Bivalvia, Unionidae) in a eutrophic lake. *Ann Zool Fenn* 31:257–262.
22. Higgins PJJ. 1980. Effects of food availability on the valve movement and feeding behaviour of juvenile *Crassostrea virginica* (Gmelin). I. Valve movement and periodic activity. *J Exp Mar Biol Ecol* 45:229–244.
23. McCorckle ST, Shirley TC, Dietz TH. 1979. Rhythm of activity and oxygen consumption in the common pond clam, *Ligumia substrata* (Say). *Can J Zool* 57:1960–1964.



## **Impact de la bioturbation des sédiments sur les transferts et la biodisponibilité des métaux - Approches expérimentales.**

**RESUME.** Les recherches ont reposé sur l'analyse expérimentale, à partir de modèles multi-compartimentaux (microcosmes), des effets de la bioturbation sur les flux métalliques (principalement le cadmium) à l'interface "eau/sédiment", la source initiale de contamination étant soit la colonne d'eau, soit le compartiment sédimentaire. Les microcosmes étaient composés d'un biotope mixte "colonne d'eau – sédiment naturel", avec deux modèles biologiques : des organismes "bioturbateurs" (larves d'éphémère : *Hexagenia rigida* ; oligochètes tubificidés) et des organismes indicateurs de la biodisponibilité des métaux présents dans la colonne d'eau (bivalves filtreurs : *Corbicula fluminea*). Cette étude résolument pluridisciplinaire s'est appuyée sur l'utilisation de plusieurs techniques complémentaires : analyses physico-chimiques, traceurs particuliers fluorescents, dosages métalliques, micro-électrodes polarographiques, radioscopie RX, ... Deux modes de remaniement sédimentaire distincts ont été quantifiés : une forte bioadvection pour les tubificidés, accompagné d'un granulo-classement, alors que les larves d'*H. rigida*, creusant de larges galeries, sont à l'origine d'une biodiffusion. En présence de métaux dans l'eau, les oligochètes augmentent d'un facteur 2 le piégeage du métal dans le sédiment. Lorsque la source initiale de contamination est le compartiment sédimentaire, *H. rigida* entraîne un relargage de Cd vers la colonne d'eau environ 10 fois plus important que les tubificidés. Ce relargage, principalement sous forme particulaire, est expliqué par la remise en suspension des particules sédimentaires, générée par les larves d'*H. rigida* ; par contre, le cadmium transféré dans la colonne d'eau n'est pas biodisponible pour le bivalve *C. fluminea*.

**MOTS CLEFS.** Bioturbation, Biodisponibilité, Bioaccumulation, Interface eau-sédiment, Cadmium, Microcosmes, tubificidés, *Hexagenia rigida*, *Corbicula fluminea*

## **Effects of sediment bioturbation on metal transfers and bioavailability - Experimental approaches.**

**ABSTRACT.** The research was based on experimental studies of the effects of bioturbation on metal fluxes (essentially cadmium) at the "water/sediment" interface, using multi-compartment indoor models (microcosms). The initial contamination sources were the water column or the sediment compartment. The microcosms were made of a mixed biotope "water column and natural sediment", with two biological models: bioturbating organisms (burrowing mayfly nymphs, *Hexagenia rigida* and tubificid oligochaetes) and benthic bivalves (*Corbicula fluminea*) as indicators of metal bioavailability from the water compartment. These multidisciplinary studies used several complementary techniques: physico-chemical measurements, fluorescent particulate tracers, trace-metal determination, polarographic micro-electrodes, X-ray radioscopy, ... Two types of sediment reworking were analyzed: high bioadvection from tubificids, leading to a sediment grading, and biodiffusion for the nymphs of *H. rigida*, owing to their large burrows. When cadmium was added to the water column, metal storage in the sediment layers inhabited by tubificids was increased by a factor close to 2. When the initial contamination source was the sediment, the Cd release induced by *H. rigida* nymphs was 10 times higher than those measured in presence of tubificids. This release, essentially under the particulate form, was linked to the resuspension of sediment particles; the cadmium transferred to the water column was not bioavailable for the benthic bivalves.

**KEY WORDS.** Bioturbation, Bioavailability, Bioaccumulation, Sediment-water interface, Cadmium, Microcosms, tubificids, *Hexagenia rigida*, *Corbicula fluminea*