



**HAL**  
open science

# Influence de la bioturbation des macro-invertébrés benthiques sur le comportement biogéochimique de l'uranium au sein des sédiments d'eau douce

Sandra Lagauzère

► **To cite this version:**

Sandra Lagauzère. Influence de la bioturbation des macro-invertébrés benthiques sur le comportement biogéochimique de l'uranium au sein des sédiments d'eau douce. Sciences de l'environnement. Aix-Marseille Université, 2008. Français. NNT : 2008AIX22059 . tel-04344113

**HAL Id: tel-04344113**

**<https://irsn.hal.science/tel-04344113>**

Submitted on 14 Dec 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**IRSN**INSTITUT  
DE RADIOPROTECTION  
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE

# Influence de la bioturbation des macro-invertébrés benthiques sur le comportement biogéochimique de l'uranium au sein des sédiments d'eau douce

**Sandra LAGAUZÈRE**

Juin 2008

N° ISRN/IRSN-2008/101

Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie

Système de management  
de la qualité IRSN certifié



Université de la Méditerranée Aix-Marseille II

N° | |\_| |\_| |\_| |\_| |\_| |\_| |\_| |\_| |\_| |\_|

## **THÈSE**

pour obtenir le grade de  
Docteur de l'université de la Méditerranée Aix-Marseille II  
Discipline: Sciences de l'Environnement

présentée et soutenue publiquement par

**Sandra LAGAUZÈRE**

le 13 juin 2008

Titre:

**Influence de la bioturbation des macro-invertébrés benthiques sur le  
comportement biogéochimique de l'uranium au sein des sédiments  
d'eau douce**

Directeurs de thèse: Georges STORA & Jean-Marc BONZOM

### **JURY:**

#### **Rapporteurs:**

- Magali GERINO, Professeure, Université de Toulouse III
- Mikaël MOTELICA-HEINO, Professeur, Université d'Orléans

#### **Examineurs:**

- Jean-Christophe POGGIALE, Professeur, Université d'Aix-Marseille II
- Eric VIOLLIER, Maître de conférences, IPGP, Université de Paris VII
- Georges STORA, Directeur de recherche CNRS, Marseille
- Jean-Marc BONZOM, Chercheur IRSN, St-Paul-Lez-Durance







*A ma grand-mère, Odette*





*C'est la foi que les autres mettent en nous, qui nous indique la route.*

François Mauriac.

*La clef de toutes les sciences est sans contredit le point d'interrogation. Nous devons la plupart des grandes découvertes au « comment ? », et la sagesse dans la vie consiste peut-être à se demander, à tout propos, « pourquoi ? ».*

Honoré de Balzac.



**M**erci bien évidemment à mes deux chers encadrants de thèse, Georges Stora & Jean-Marc Bonzom, pour m'avoir choisie comme thésarde et pour m'avoir donné leur confiance dans la réalisation de ce travail. Je les remercie en particulier, pour la grande autonomie qui m'a été accordée, pour leur écoute et pour leurs conseils avisés, mais aussi pour m'avoir « supportée » comme je suis, c'est-à-dire avec mon caractère, qui je le reconnais volontiers, n'est pas toujours facile à gérer. Enfin, il est également important de souligner leur motivation pour que je réussisse non seulement ma thèse, mais également mon avenir dans la recherche, et je leur dois beaucoup aujourd'hui, notamment pour les deux post-docs que je vais entreprendre.

**E**nsuite, je voudrais sincèrement remercier toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer au cours de cette thèse, et sans qui je n'aurais pas pu réaliser des recherches aussi variées.

- Les confrères et consœurs de la bioturbation : Magali Gérino, Franck Gilbert, Philippe Cuny, Aurélie Ciutat, Laura Pischedda, Sébastien Delmotte ;
- Les amis géochimistes que je comprends mieux désormais (mais ça demande beaucoup d'efforts !!) : Mikaël Motelica-Heino, Eric Viollier, Dominique Boust ;
- Et ces chers tueurs de grenouille grâce à qui j'ai découvert le monde de la génotox : Florence Mouchet et Laury Gauthier.

**R**emerciements également aux membres du LRE qui ont largement contribué à ce travail : Frédéric Coppin pour ses mises au point au fluorimètre, Virginie Camillieri et Daniel Orjollet qui ont dû traiter des milliers d'échantillons et qui l'ont fait avec une grande patience. Merci aussi à Patrick Boyer du LME pour son travail de modélisation sur mes petits vers, et surtout pour son écoute, ses réponses super rapides, son intérêt pour mon travail, et surtout pour sa grande gentillesse et son humour.

**C**omment ne pas dire aussi un grand merci à toutes les personnes travaillant ou ayant travaillé au laboratoire, avec qui j'ai partagé plus ou moins 3 ans de ma courte existence ?... mes petites stagiaires adorées, Sophie Portela et Raphaële Terrail, avec qui ont à vraiment bien bossé, puisqu'elles ont toutes deux brillamment réussi, et avec qui j'ai bien rigolé aussi... mes camarades de galère, les thésards et post-docs, avec qui ont partagé tant de discussions réconfortantes : Olivia, Stéphanie, Florence, Hélène, Valérie, Elodie, Sabrina, Christophe... les personnes attentionnées, qui ont toujours eu un petit mot gentil : Cathy, Chantal, Nadine, Pierre, Laureline, Arnaud, Rodolphe, Claude... j'en oublie sûrement, tout ça pour dire que c'était finalement agréable de travailler au LRE ! Et, spéciale dédicace pour la crème des secrétaires, Mme Claudine Van Crasbeck, qui a toujours été là pour moi, dans les moments de joie comme dans les moments plus difficiles : merci du fond du cœur ma Cloclo.

**I**névitablement j'ai gardé le meilleur pour la fin !! Merci, merci, merci à tous les amis rencontrés en Provence : Adélina, Cricri, Carole, Jocelyn, Vinçou, Audrey, Valou, Laurie, Laure, Cyrille, Jonathan, Sergio, Maeva, Sandra, Miguel, Boris, Liliou... merci pour tout, les fêtes, les sorties, les délires et pour votre soutien quand j'en ai eu besoin. Sans vous non plus, cette thèse ne serait pas. Un merci tout particulier à Johannes Stuttmann, mon ami pour la vie, qui en plus de m'avoir directement aidée dans ma thèse (correction anglais, mise en page et autres), m'a permis de tenir bon jusqu'au bout et avec qui j'ai partagé des moments inoubliables. Pour finir, je tiens à remercier ma mère et ma sœur, qui malgré la distance qui nous séparait, m'ont toujours encouragée et ont toujours été fières de moi.



---

## RÉSUMÉ

Dans les écosystèmes aquatiques continentaux, les sédiments représentent un compartiment d'accumulation pour les polluants métalliques comme l'uranium. Secondairement, ils peuvent également se comporter comme des sources endogènes de contamination, par remise en suspension (*e.g.* crues, bioturbation) ou par évolution de la spéciation des métaux, laquelle va également jouer sur leur biodisponibilité. En effet, les composés métalliques peuvent être transformés en composés plus ou moins toxiques ou inertes sous l'effet de modifications des conditions physico-chimiques (pH, conditions rédox, force ionique) et microbiologiques du sédiment. Ces conditions sont elles-mêmes sous le contrôle de l'activité des macro-invertébrés benthiques *via* les processus de bioturbation.

L'objectif principal de ce doctorat a été de déterminer l'influence de la bioturbation de deux espèces de macro-invertébrés benthiques (*Chironomus riparius* et *Tubifex tubifex*) sur la répartition et les transferts de l'uranium dans le sédiment des écosystèmes aquatiques continentaux. Pour cela, des expériences en laboratoire avec des dispositifs de type microcosmes, ont été réalisées pour (i) évaluer les effets de l'uranium sur les macro-invertébrés benthiques, plus particulièrement sur leur activité de bioturbation, (ii) déterminer l'influence de ces organismes sur le comportement de l'uranium grâce à des mesures physico-chimiques à haute résolution (*e.g.* optodes à oxygène, gels DET), et (iii) appréhender les conséquences de ces interactions sur un organisme de la colonne d'eau, *Xenopus laevis*, *via* des mesures de génotoxicité (essai micronoyaux) et de biomarqueurs moléculaires (taux d'expression d'un certain nombre de gènes codant pour des protéines induites lors de stress environnementaux).

Les principaux résultats obtenus montrent que l'intensité de la bioturbation des macro-invertébrés peut être diminuée dans un sédiment contaminé par de l'uranium, mais que les espèces étudiées dans cette étude présentent une bonne tolérance. Pour des concentrations en uranium élevées (>100 fois le bruit de fond géochimique naturel), les vers *T. tubifex* sont capables de maintenir une activité de bioturbation suffisante pour entraîner une forte remobilisation de l'uranium initialement associé au sédiment vers la colonne d'eau. Ceci représente donc un risque potentiel pour le reste de la biocénose aquatique. Cependant, en voulant tester cette hypothèse, il a été constaté de façon surprenante que le comportement des vers pouvait être modifié en présence d'un autre organisme dans la colonne d'eau et qu'ainsi il n'entraînait plus de relargage d'uranium vers la colonne. Toutefois, l'uranium associé au sédiment, sans l'effet de la bioturbation, induit des effets négatifs sur cet organisme.

Au final, ce travail de thèse a permis de décrire les interactions pouvant exister entre les organismes aquatiques, la biogéochimie du sédiment et un polluant métallique comme l'uranium. Les informations apportées sont originales et permettent d'envisager de façon plus précise les conséquences d'une pollution à l'uranium dans l'environnement aquatique. Plus globalement, les travaux de recherche entrepris dans le cadre de cette thèse contribueront à améliorer les connaissances actuelles en vue d'une meilleure évaluation des risques écologiques des écosystèmes aquatiques contaminés par des polluants.

**Mots-clés :** bioturbation, bioconvoyage, bioirrigation, macro-invertébrés benthiques, métaux lourds, processus biogéochimiques, sédiments, écotoxicité



**SOMMAIRE**





<b><u>INTRODUCTION GÉNÉRALE</u></b> .....	<b>1</b>
<b><u>CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE ET OBJECTIFS</u></b> .....	<b>7</b>
<b>1.1 BIOGÉOCHIMIE DES SÉDIMENTS SUPERFICIELS</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1.1 Introduction</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1.2 Transformations diagénétiques</b> .....	<b>9</b>
1.1.2.1 Introduction .....	9
1.1.2.2 Minéralisation de la matière organique.....	11
1.1.2.3 Réactions diagénétiques secondaires .....	13
<b>1.1.3 Distribution des espèces géochimiques majeures</b> .....	<b>15</b>
1.1.3.1 Les éléments particulaires .....	15
1.1.3.2 Les éléments dissous .....	15
<b>1.1.4 Profils de concentration et flux diffusifs</b> .....	<b>19</b>
<b>1.1.5 Effet de la température</b> .....	<b>21</b>
<b>1.1.6 Cas des sédiments en milieu continental</b> .....	<b>22</b>
<b>1.1.7 Conclusion</b> .....	<b>25</b>
<b>1.2 L'URANIUM : DE SON UTILITÉ À SA TOXICITÉ</b> .....	<b>26</b>
<b>1.2.1 Caractéristiques de l'uranium</b> .....	<b>26</b>
1.2.1.1 Introduction .....	26
1.2.1.2 Propriétés chimiques et physiques .....	26
1.2.1.3 Origine et répartition .....	27
1.2.1.4 Utilisation industrielle, commerciale et militaire.....	28
<b>1.2.2 Comportement de l'uranium dans les sédiments des systèmes aquatiques continentaux</b> .....	<b>31</b>
1.2.2.1 Spéciation de l'uranium dans l'eau .....	31
1.2.2.2 Diagenèse précoce de l'uranium .....	35
1.2.2.3 Origine de l'uranium dans les eaux continentales.....	36
1.2.2.4 Contamination des sédiments.....	37
1.2.2.5 Bioremédiation des eaux de surface contaminées.....	39

1.2.2.6	Biodisponibilité et toxicité de l'uranium vis-à-vis des organismes vivant dans les sédiments d'eau douce.....	40
<b>1.2.3</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>45</b>
<b>1.3</b>	<b>RÔLE DE LA BIOTURBATION DES MACRO-INVERTÉBRÉS BENTHIQUES .....</b>	<b>46</b>
<b>1.3.1</b>	<b>Bioturbation : définition et caractérisation .....</b>	<b>46</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Conséquences de la bioturbation sur la biogéochimie des sédiments superficiels.....</b>	<b>52</b>
1.3.2.1	Introduction .....	52
1.3.2.2	Conséquences physiques.....	52
1.3.2.3	Conséquences biogéochimiques.....	53
1.3.2.4	Conséquences biologiques .....	57
1.3.2.5	Conséquences sur la répartition et les flux des polluants métalliques .....	59
<b>1.4</b>	<b>OBJECTIFS DE LA THÈSE .....</b>	<b>63</b>
<b><u>CHAPITRE 2 : MATÉRIELS &amp; MÉTHODES.....</u></b>		<b>65</b>
<b>2.1</b>	<b>DISPOSITIFS EXPÉRIMENTAUX .....</b>	<b>67</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>67</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Choix des macro-invertébrés bioturbateurs .....</b>	<b>69</b>
2.1.2.1	Introduction .....	69
2.1.2.2	<i>Chironomus riparius</i> (Meigen) .....	69
2.1.2.3	<i>Tubifex tubifex</i> (Müller) .....	71
2.1.2.4	Acclimatation et conditions expérimentales .....	74
<b>2.1.3</b>	<b>Contamination du système .....</b>	<b>74</b>
<b>2.2</b>	<b>PRÉSENTATION DES PRINCIPALES MÉTHODES D'ANALYSE .....</b>	<b>76</b>

<b>2.2.1</b>	<b>Mesures d'écotoxicité.....</b>	<b>76</b>
2.2.1.1	Macro-invertébrés bioturbateurs .....	76
2.2.1.2	Organismes pélagiques.....	78
<b>2.2.2</b>	<b>Mesures physico-chimiques.....</b>	<b>79</b>
2.2.2.1	Mesures diverses .....	79
2.2.2.2	Mesures de l'uranium et des autres éléments métalliques .....	79
2.2.2.3	Mesures des éléments anioniques dissous.....	80
2.2.2.4	Mesures des profils de concentrations des éléments dissous dans le sédiment .....	80
2.2.2.5	Mesures des flux d'oxygène dissous à l'interface eau/sédiment.....	81
<b>2.2.3</b>	<b>Mesures de la bioturbation.....</b>	<b>81</b>
<b><u>CHAPITRE 3 : EFFETS DE L'URANIUM SUR LES MACRO- INVERTÉBRÉS BENTHIQUES.....</u></b>		
<b>103</b>		
<b>3.1</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>105</b>
<b>3.2</b>	<b>ÉCOTOXICITÉ DE L'URANIUM SUR DES LARVES DE <i>CHIRONOMUS RIPARIUS</i> EXPOSÉES À DES SÉDIMENTS CONTAMINÉS .....</b>	<b>105</b>
3.2.1	Introduction .....	105
3.2.2	Méthodologie.....	106
3.2.3	Résultats .....	107
3.2.4	Discussion .....	108
3.2.5	Conclusion.....	109
<b>3.3</b>	<b>ÉCOTOXICITÉ DE L'URANIUM SUR DES VERS <i>TUBIFEX TUBIFEX</i> EXPOSÉS À DES SÉDIMENTS CONTAMINÉS.....</b>	<b>110</b>

Présentation sous forme d'article

<b>3.4</b>	<b>EFFETS DE L'URANIUM SUR LA BIOTURBATION DE <i>CHIRONOMUS RIPARIUS</i> ET <i>TUBIFEX TUBIFEX</i> EXPOSÉS À DES SÉDIMENTS CONTAMINÉS</b>	<b>123</b>
------------	---	------------

Présentation sous forme d'article

**CHAPITRE 4 : INFLUENCE DE LA BIOTURBATION SUR LE FONCTIONNEMENT BIOGÉOCHIMIQUE DES SÉDIMENTS ET SUR LE COMPORTEMENT DE L'URANIUM ..... 151**

<b>4.1</b>	<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>153</b>
------------	---------------------------	------------

<b>4.2</b>	<b>INFLUENCE DE LA BIOTURBATION SUR LA CONSOMMATION D'OXYGÈNE AU SEIN DES SÉDIMENTS</b> .....	<b>154</b>
------------	---	------------

Présentation sous forme d'article

<b>4.3</b>	<b>INFLUENCE DE LA BIOTURBATION SUR LE COMPORTEMENT BIOGÉOCHIMIQUE DE L'URANIUM</b> .....	<b>180</b>
------------	---	------------

<b>4.3.1</b>	<b>Introduction</b> .....	<b>180</b>
--------------	---------------------------	------------

<b>4.3.2</b>	<b>Matériels &amp; méthodes</b> .....	<b>183</b>
--------------	---------------------------------------	------------

4.3.2.1	Préparation des aquariums .....	183
---------	---------------------------------	-----

4.3.2.2	Origine, acclimatation et introduction des organismes .....	184
---------	---	-----

4.3.2.3	Déroulement de l'expérience .....	184
---------	-----------------------------------	-----

4.3.2.4	Mesures physico-chimiques .....	185
---------	---------------------------------	-----

4.3.2.5	Mesure de la bioaccumulation.....	187
---------	-----------------------------------	-----

4.3.2.6	Analyses statistiques .....	187
---------	-----------------------------	-----

<b>4.3.3</b>	<b>Résultats</b> .....	<b>188</b>
--------------	------------------------	------------

4.3.3.1	Paramètres physico-chimiques et uranium total dans la colonne d'eau.....	188
---------	--	-----

4.3.3.2	Profils de concentrations des éléments dissous.....	189
---------	---	-----

4.3.3.3	Flux diffusifs à l'interface eau/sédiment.....	193
---------	--	-----

4.3.3.4	Variations des concentrations dans la colonne d'eau.....	194
---------	--	-----

4.3.3.5	Bioaccumulation de l'uranium et bilan de masse.....	195
---------	---	-----

4.3.4	Discussion .....	196
4.3.5	Conclusion.....	199
<b><u>CHAPITRE 5 : CONSÉQUENCES DES INTERACTIONS</u></b>		
<b><u>BIOTURBATION/URANIUM DANS LA COLONNE D'EAU.....</u></b>		
<b>201</b>		
5.1	INTRODUCTION.....	203
5.2	OBJECTIF.....	205
5.3	MATÉRIELS & MÉTHODES .....	205
5.3.1	Présentation du modèle biologique : le têtard de Xénope ( <i>Xenopus laevis</i> )	205
5.3.2	Description du bioessai .....	207
5.3.2.1	Remarque préliminaire.....	207
5.3.2.2	Préparation des aquariums .....	208
5.3.2.3	Origine et acclimatation des organismes.....	209
5.3.2.4	Protocoles de mesures .....	211
5.3.2.5	Déroulement des expériences.....	214
5.4	RÉSULTATS/DISCUSSION.....	215
5.4.1	Expérience 1: Essai standardisé dans l'eau .....	215
5.4.2	Expérience 2: Pré-essai avec du sédiment contaminé.....	216
5.4.2.1	Paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau.....	216
5.4.2.2	Essai micronoyaux .....	218
5.4.2.3	Analyses des biomarqueurs moléculaires .....	220
5.4.2.4	Mortalité et biomasse .....	222
5.4.2.5	Synthèse des résultats.....	223
5.4.3	Expérience 3 : Second essai avec du sédiment contaminé.....	225
5.4.3.1	Paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau.....	225
5.4.3.2	Essai micronoyaux .....	227

---

5.4.3.3	Analyses des biomarqueurs moléculaires .....	227
5.4.3.4	Mortalité et biomasse .....	229
5.4.3.5	Bioaccumulation.....	231
5.4.3.6	Synthèse des résultats.....	232
<b>5.5</b>	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>234</b>
	 <b><u>CONCLUSION GÉNÉRALE</u> .....</b>	 <b>237</b>
	 <b><u>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>.....</b>	 <b>245</b>
	 <b><u>GLOSSAIRE</u>.....</b>	 <b>271</b>
	 <b>ANNEXE : Présentation des protéines dont l'expression génique a été mesurée par RT-PCR au chapitre 5 .....</b>	 <b>277</b>

**INTRODUCTION GÉNÉRALE**





La pollution de l'environnement aquatique par les substances toxiques d'origine anthropique, en particulier les métaux, est un des problèmes majeurs auxquels doivent faire face les sociétés actuelles. Ces substances contaminent les systèmes aquatiques à partir de sources ponctuelles et diffuses (eaux de drainage, eaux usées, effluents industriels et agricoles), tendent à s'accumuler dans les sédiments et, dans certains cas, peuvent se concentrer dans les réseaux trophiques. Cette dégradation de la qualité des ressources peut avoir des répercussions sociales et économiques importantes. Des actions souvent coûteuses sont menées pour restaurer la qualité des milieux aquatiques et assurer un développement durable des activités humaines. Cependant, pour être efficaces, ces actions doivent s'appuyer sur une bonne connaissance des processus qui contrôlent la répartition et les échanges des substances toxiques entre les sédiments, l'eau et les organismes aquatiques. Elles doivent également prendre en compte l'évaluation des effets écotoxicologiques induits par ces substances sur les biocénoses aquatiques.

La quasi-totalité des études menées *in situ* révèlent le rôle primordial des sédiments dans le cycle biogéochimique des métaux: ils constituent en effet des sites privilégiés pour l'accumulation de ces éléments (Alfaro-De-la-Torre & Tessier 2002). 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 (Tessier & Campbell 1988, Luoma 1989). Secondairement, les sédiments peuvent aussi se comporter comme des sources endogènes de contamination, par évolution de la spéciation physico-chimique des métaux, laquelle influence directement leur mobilité et leur biodisponibilité (Soster et al. 1992). En effet, les composés métalliques peuvent être transformés en composés plus ou moins toxiques ou inertes sous l'effet de modifications des conditions physico-chimiques (*e.g.* pH, conditions rédox, force ionique) et microbiologiques des sédiments (Fig.1). Ces conditions sont elles-mêmes contrôlées par les processus de bioturbation des sédiments (Kristensen 2000), lesquels se définissent comme l'ensemble des perturbations induites par l'activité des organismes vivant à la surface (épibenthiques) et dans le sédiment superficiel (benthiques) (Rhoads 1974).

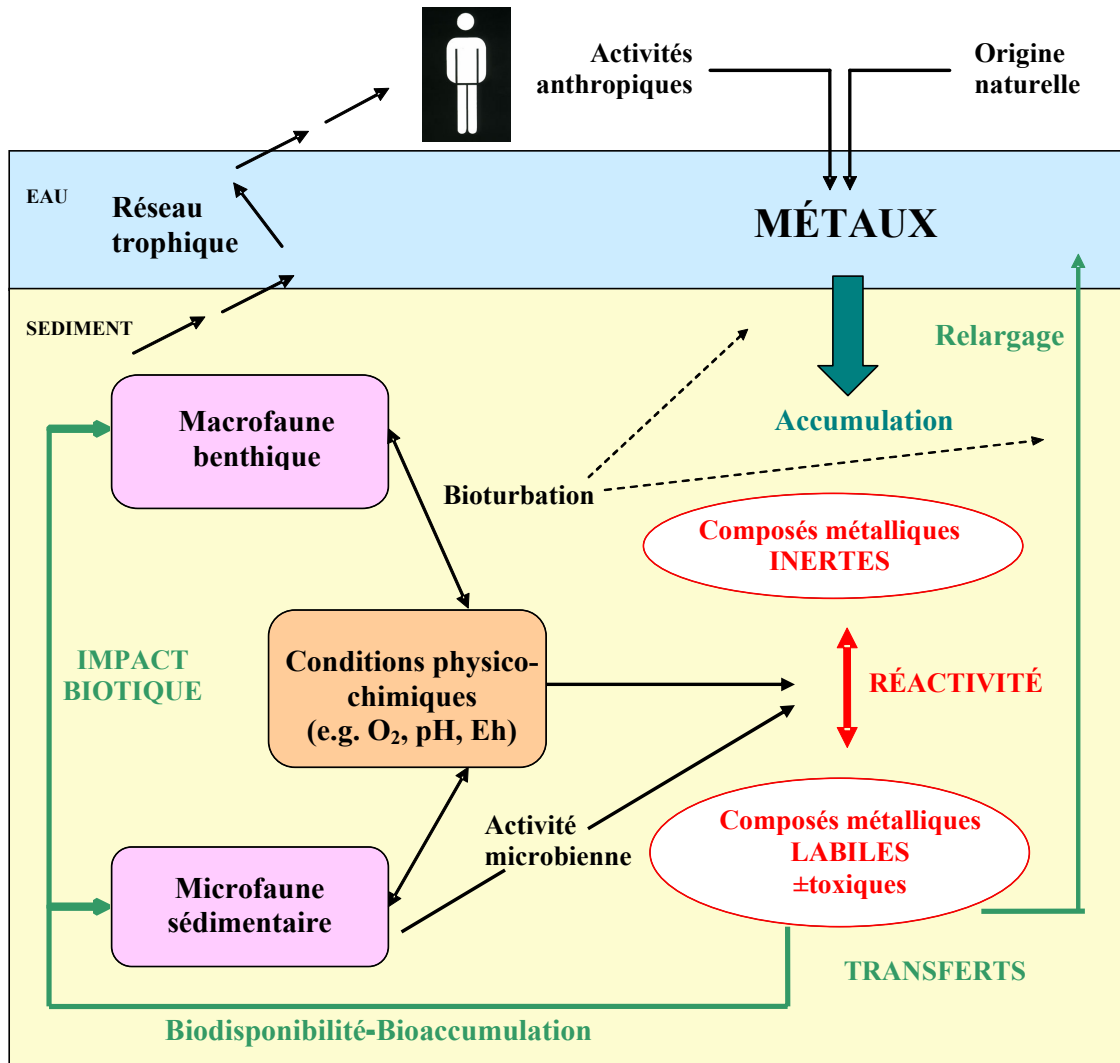


Figure 1 - Schéma conceptuel mettant en évidence le rôle des organismes benthiques sur le cycle biogéochimique des métaux au sein des hydrosystèmes continentaux.

Au cours des dernières décennies, de nombreuses études ont montré la forte influence de la bioturbation de la macrofaune sur le fonctionnement biogéochimique des sédiments. Les organismes benthiques sont ainsi considérés de façon consensuelle comme des « ingénieurs écologiques » (Gérino et al. 2003, Mermillod-Blondin & Rosenberg 2006). La plupart des milieux aquatiques sont étudiés, depuis les grands fonds marins, les sédiments côtiers et estuariens, les sédiments des lacs et des rivières, jusqu'à des sédiments plus artificiels comme dans les bassins d'orage. Malgré les différences évidentes entre ces écosystèmes, les communautés benthiques y induisent des effets similaires. L'augmentation des flux de solutés à l'interface eau/sédiment et le remaniement des particules sédimentaires représentent les principales conséquences. Combinés avec d'autres modifications physiques, comme une plus forte porosité ou des changements granulométriques, la bioturbation influence directement les communautés microbiennes contrôlant la diagenèse précoce (Aller et al. 2001). Les sédiments de surface sont ainsi constitués d'une mosaïque tri-dimensionnelle de micro-habitats avec des gradients variables d'oxygénation et de conditions redox qui vont altérer les processus diagénétiques (Kristensen 2000).

Parmi les conséquences écologiques, l'impact de ces modifications sur la distribution, la spéciation et les processus de mobilisation/immobilisation des polluants accumulés dans les sédiments est de première importance et a reçu beaucoup d'attention de la part de la communauté scientifique (Banta & Andersen 2003).

Ceci est d'autant plus vrai lorsqu'à plus ou moins court terme ces polluants peuvent se répercuter directement sur l'être humain *via* des phénomènes de bioconcentration dans les réseaux trophiques. Cependant, peu de données concernent les radionucléides tels que l'uranium, dont l'exploitation minière ou l'utilisation militaire ont pourtant entraîné la contamination de nombreux sites à travers le monde (Lottermoser et al. 2005, Baborowski & Bozau 2006, Antunes et al. 2007a, Saari et al. 2007).

C'est dans ce contexte général que se positionne ce travail de doctorat, le métal étudié étant l'uranium. Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche plus global qui concerne l'étude des effets écotoxicologiques de l'uranium ainsi que l'étude de son comportement biogéochimique au sein des sédiments des écosystèmes aquatiques continentaux (Bonzom et al. 2005). Ce projet est développé dans le cadre du programme ENVIR'HOM lancé à l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN) en 2001, et a trait au volet relatif à la radioprotection de l'environnement (Garnier-Laplace & Paquet 2001). Le principal objectif de ce programme est d'acquérir les connaissances de base

nécessaires à l'évaluation du risque écologique («Ecological Risk Assessment») lié à la présence ou au rejet de radionucléides dans l'environnement en condition d'exposition chronique. Actuellement, il n'existe que très peu de données concernant les effets des radionucléides sur les organismes benthiques et sur le rôle de ces derniers dans le cycle biogéochimique des radionucléides à l'interface eau/sédiment. Cette méconnaissance constitue un obstacle majeur dans l'évaluation du risque écologique associé aux radionucléides et donc dans la gestion raisonnée des hydrosystèmes pollués.

D'un point de vue plus spécifique, ce travail de doctorat a eu pour principal objectif de déterminer l'influence de la bioturbation des macro-invertébrés vivant dans les sédiments superficiels sur le comportement biogéochimique de l'uranium.

Pour éclairer le lecteur, le premier chapitre constitue une synthèse bibliographique couvrant les trois points-clés de cette étude, que sont :

- (i) la biogéochimie des sédiments superficiels,
- (ii) l'uranium : caractéristiques, répartition dans l'environnement, interactions avec les organismes vivants,
- (iii) la bioturbation : définition et conséquences physiques, chimiques et biologiques.

Le second chapitre décrit ensuite les dispositifs expérimentaux et les techniques de mesure utilisés au cours de ce travail.

Les trois autres chapitres présentent, principalement sous forme de publications, l'ensemble des résultats obtenus, concernant :

- (i) les effets de l'uranium sur les macro-invertébrés benthiques, et plus particulièrement sur leur activité de bioturbation (chapitre 3),
- (ii) l'influence de la bioturbation sur la biogéochimie du sédiment et sur la répartition et les transferts de l'uranium au sein de l'écosystème benthique (chapitre 4),
- (iii) les conséquences des interactions uranium/bioturbation sur la toxicité de l'uranium chez un organisme pélagique modèle, le têtard de Xénope (chapitre 5).

L'ensemble des résultats est finalement discuté dans une conclusion générale.

**CHAPITRE 1 :**  
**SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE ET**  
**OBJECTIFS**



## **1.1 BIOGÉOCHIMIE DES SÉDIMENTS SUPERFICIELS**

### **1.1.1 INTRODUCTION**

Le processus global de sédimentation débute par la chute des particules organiques et minérales dans la colonne d'eau, se poursuit par leur transformation biogéochimique dans la zone benthique et leur enfouissement pour constituer le sédiment et devenir à plus long terme de la roche sédimentaire.

Les sédiments superficiels, situés dans les premiers décimètres sous l'interface eau/sédiment, représentent un écosystème fortement structuré et dynamique qui est parfois fortement colonisé par la faune (macrofaune, méiofaune, micro-organismes) et la flore (racines des macrophytes, microalgues). Ils sont le siège des modifications biogéochimiques des éléments particulaires venant de la colonne d'eau, qu'ils soient plus ou moins agrégés entre eux, biogènes ou authigènes, autochtones ou allochtones, avant leur incorporation définitive dans le sédiment. Ces transformations directement liées à la décomposition (minéralisation) de la matière organique (MO) par les micro-organismes regroupent des processus de nature biologique, chimique et physique (Berner 1980, Henrichs 1992). L'ensemble de ces processus se produisant après le dépôt des sédiments est appelé diagenèse précoce ou prédiagenèse. La fraction organique réfractaire à ces transformations est enfouie dans les sédiments profonds où elle subit des transformations diagénétiques plus tardives (catagenèse et métagenèse) sous l'effet de la pression et de la température (Fig. 2) (Tissot & Welte 1984).

### **1.1.2 TRANSFORMATIONS DIAGÉNÉTIQUES**

#### **1.1.2.1 Introduction**

Après leur agrégation et leur sédimentation dans la colonne d'eau, les éléments particulaires, principalement la MO formée par photosynthèse et les débris des organismes pélagiques morts, arrivent au niveau de l'interface eau/sédiment. A ce niveau-là, des composés oxydés vont permettre leur décomposition et faciliter ainsi leur incorporation au sédiment. Ce phénomène de diagenèse précoce se limite aux sédiments de surface qui se caractérisent par des températures peu élevées et la saturation en eau des espaces interstitiels.



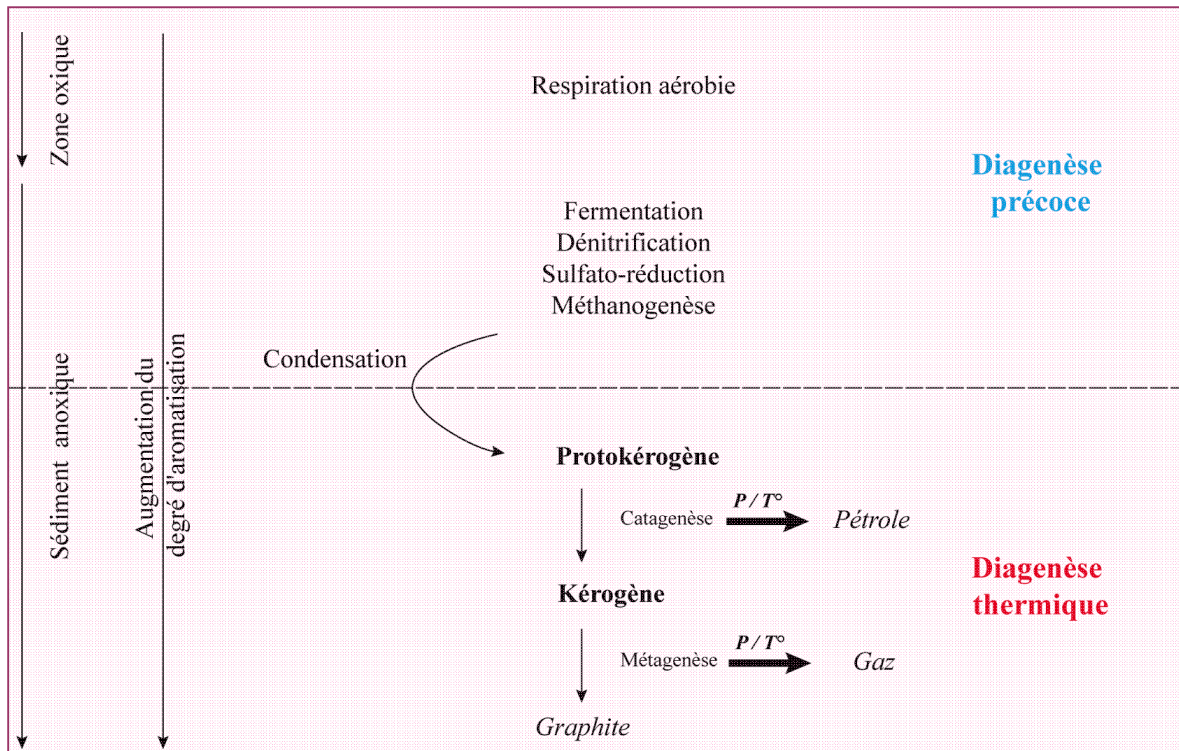


Figure 2 - Evolution de la matière organique après enfouissement dans les sédiments (d'après Tissot & Welte 1984).

### 1.1.2.2 Minéralisation de la MO

Les principales réactions qui gouvernent la dégradation de la MO et donc les cycles biogéochimiques des éléments sont des réactions d'oxydo-réduction (rédox). Ces réactions de transfert d'électrons généralement lentes sont largement catalysées par les micro-organismes vivant dans le sédiment (Berner 1980, Henrichs 1992). L'oxydation de la MO consomme de façon séquentielle les différents accepteurs d'électrons inorganiques présents dans le système selon le « modèle de Froelich » (Froelich et al. 1979, Tableau 1). Les micro-organismes impliqués ne réduisent ces éléments que dans des conditions physico-chimiques particulières (Eh, pH, O<sub>2</sub>) et selon leur potentialité thermodynamique. L'enchaînement des réactions rédox se réalise du potentiel rédox le plus fort vers des potentiels rédox de plus en plus faibles (pour un pH constant). Globalement, après avoir consommé l'oxygène (O<sub>2</sub>) puis les ions nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) dans les premiers centimètres de la colonne sédimentaire, le consortium bactérien va réduire les oxydes et les oxyhydroxydes de fer et de manganèse (Fe(OH)<sub>3</sub>, FeOOH, MnOx) puis les sulfates (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). Finalement, lorsque tous les oxydants sont consommés dans les sédiments anoxiques, la MO elle-même sert d'oxydant et de réducteur (méthanogenèse).

**Tableau 1 - Principales réactions de la diagenèse précoce liées à la dégradation de la matière organique avec MO = (CH<sub>2</sub>O)<sub>106</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>16</sub>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> et ΔG<sup>0</sup><sub>R</sub> = énergie libre de réaction en kcal mol<sup>-1</sup>**

Réactions de minéralisation	ΔG <sup>0</sup> <sub>R</sub>
138 O <sub>2</sub> + MO → 106 CO <sub>2</sub> + 16 HNO <sub>3</sub> + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 122 H <sub>2</sub> O	-13,472
236 MnO <sub>2</sub> + MO + 472 H <sup>+</sup> → 106 CO <sub>2</sub> + 236 Mn <sup>2+</sup> + 8 N <sub>2</sub> + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 366 H <sub>2</sub> O	-13,050
94,4 HNO <sub>3</sub> + MO → 106 CO <sub>2</sub> + 55,2 N <sub>2</sub> + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 177,2 H <sub>2</sub> O	-12,796
84,8 HNO <sub>3</sub> + MO → 106 CO <sub>2</sub> + 42,4 N <sub>2</sub> + 16 NH <sub>3</sub> + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 148,4 H <sub>2</sub> O	-11,614
212 Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + MO + 848 H <sup>+</sup> → 106 CO <sub>2</sub> + 424 Fe <sup>2+</sup> + 16 NH <sub>3</sub> + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 520 H <sub>2</sub> O	-5,955
424 FeOOH + MO + 848 H <sup>+</sup> → 106 CO <sub>2</sub> + 424 Fe <sup>2+</sup> + 16 NH <sub>3</sub> + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 742 H <sub>2</sub> O	-5,617
424 Fe(OH) <sub>3</sub> + MO + 848 H <sup>+</sup> → 106 CO <sub>2</sub> + 424 Fe <sup>2+</sup> + 16 NH <sub>3</sub> + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 1166 H <sub>2</sub> O	-3,783
53 SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> + MO → 106 HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 53 H <sub>2</sub> S + 16 NH <sub>3</sub> + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	-1,605
MO → 53 CO <sub>2</sub> + 53 CH <sub>4</sub> + 16 NH <sub>3</sub> + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	-1,478

Dans le cas des sédiments marins profonds, cette séquence réactionnelle se reflète directement dans les profils de concentrations des différentes espèces chimiques (Claypool & Kaplan 1974, Froelich et al. 1979, Reeburgh 1983) et dans la répartition des différentes communautés microbiennes (Nealson 1997). Selon le modèle de Park & Jaffé (1996), on peut ainsi découper verticalement le sédiment superficiel en six couches (Fig. 3).

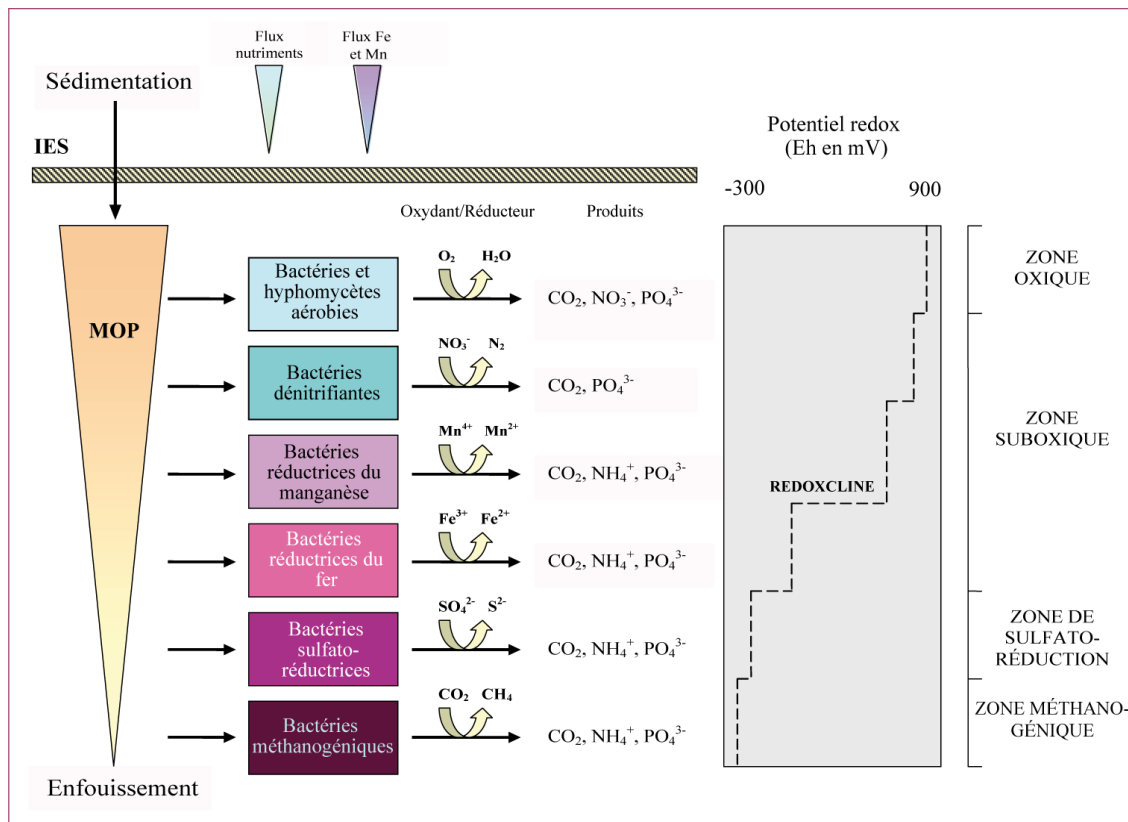
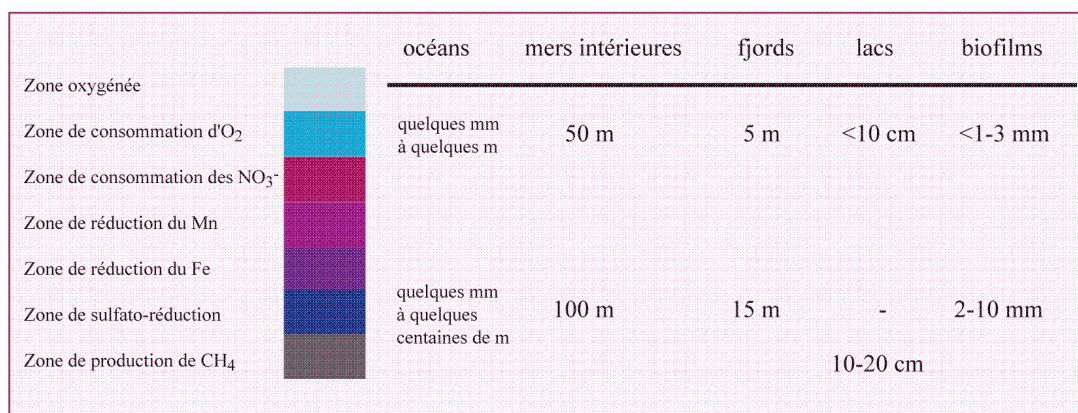


Figure 3 - Séquence des réactions de minéralisation de la matière organique et profil rédox dans le sédiment marin superficiel, avec *IES* = *Interface eau/sédiment*, *MOP* = *Matière organique particulière* (d'après Froelich et al. 1979, Park & Jaffé 1996).

Cette distribution verticale peut se faire à différentes échelles spatiales au sein des écosystèmes aquatiques: sur des profondeurs métriques dans les eaux marines profondes, sur des profondeurs centimétriques dans les sédiments d'eau douce et sur quelques millimètres dans les biofilms de surface (Fig. 4). Egalement retrouvée dans les sols, elle constitue ainsi une véritable signature de la présence de vie sur la Terre et elle est activement recherchée sur d'autres planètes (Nealson & Berelson 2003). Cependant, cette séquence n'est clairement observée qu'au sein des sédiments très stratifiés, qui ne subissent pas trop de perturbations physiques et/ou biologiques. Ainsi, elle se trouve très souvent altérée en eau douce. De plus, les cinétiques de minéralisation y sont plus rapides car la MO autochtone qui sédimente est plus labile du fait de son faible temps de séjour dans la colonne d'eau. Les flux de MO sont également plus importants et les accepteurs d'électrons sont rapidement utilisés. Certains des composés réduits dans les réactions diagénétiques représentées dans la figure 3 peuvent donc apparaître à différentes profondeurs dans le sédiment (cf. paragraphe 1.1.6).



**Figure 4 – Échelles spatiales de la zonation géochimique des milieux aquatiques (d'après Nealson & Berelson 2003 et Claypool 2004)**

### 1.1.2.3 Réactions diagénétiques secondaires

Les réactions rédox décrites précédemment produisent des composés réduits qui vont pouvoir à leur tour intervenir dans de nouvelles réactions d'oxydo-réduction thermodynamiquement possibles. Ces réactions dites secondaires mettent principalement en interaction les cycles biogéochimiques des espèces azotées et ceux du fer et du manganèse (Hulth et al. 1999, Anschutz et al. 2000) (Tableau 2). On note en particulier la migration à travers l'eau interstitielle de Fe(II) et Mn(II) vers l'interface eau/sédiment pour être réoxydés au niveau du sédiment oxygène. Les nitrates produits par la dégradation aérobie sont réutilisés comme accepteurs d'électrons lors de la dénitrification. Les sulfures libres (S<sub>2</sub><sup>-</sup>) peuvent

précipiter avec  $\text{Fe}^{2+}$  (FeS) ou être aussi réoxydés en présence d'oxygène pour former des espèces intermédiaires (soufre natif  $\text{S}^0$ , polysulfures  $\text{S}_n^-$ , thiosulfates  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  et sulfites  $\text{SO}_3^{2-}$ ) avant de redonner du sulfate (Gaillard 1995). Parallèlement à ces réactions rédox, des phénomènes de diffusion, de précipitation, d'adsorption, de désorption, d'agrégation des composés dissous et solides vont également agir sur la redistribution des éléments dans le sédiment (précipitation des minéraux authigènes, remobilisation) mais aussi dans la colonne d'eau (relargage).

**Tableau 2 - Principales réactions diagénétiques secondaires**  
(d'après Postma & Jakobsen 1996, Anschutz et al. 2000, Hyacinthe et al. 2001).

- Production de nitrates par nitrification	$\text{NH}_4^+ + 2 \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^- + 2 \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$
- Oxydation de $\text{Mn}^{2+}$ par l'oxygène	$2 \text{Mn}^{2+} + \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{MnO}_2 + 4 \text{H}^+$ $4 \text{Mn}^{2+} + \text{O}_2 + 6 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 4 \text{MnOOH} + 8 \text{H}^+$
- Oxydation de $\text{Mn}^{2+}$ par le nitrate	$5 \text{Mn}^{2+} + 2 \text{NO}_3^- + 4 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 5 \text{MnO}_2 + \text{N}_2 + 8 \text{H}^+$ $10 \text{Mn}^{2+} + 2 \text{NO}_3^- + 14 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 10 \text{MnOOH} + \text{N}_2 + 18 \text{H}^+$
- Oxydation de $\text{Fe}^{2+}$ par le nitrate	$5 \text{Fe}^{2+} + \text{NO}_3^- + 12 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 5 \text{Fe}(\text{OH})_3 + \frac{1}{2} \text{N}_2 + 9 \text{H}^+$
- Oxydation de $\text{Fe}^{2+}$ par les oxydes de Mn	$\text{Fe}^{2+} + \text{MnOOH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Fe}(\text{OH})_3 + \text{Mn}^{2+}$ $2 \text{Fe}^{2+} + \text{MnO}_2 + 4 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{Fe}(\text{OH})_3 + \text{Mn}^{2+} + 2 \text{H}^+$
- Réduction des oxydes de Mn par l'ammonium pour donner du diazote	$\frac{3}{2} \text{MnO}_2 + \text{NH}_4^+ + 2 \text{H}^+ \rightarrow \frac{3}{2} \text{Mn}^{2+} + \frac{1}{2} \text{N}_2 + 3 \text{H}_2\text{O}$ $3 \text{MnOOH} + \text{NH}_4^+ + 5 \text{H}^+ \rightarrow 3 \text{Mn}^{2+} + \frac{1}{2} \text{N}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$
- Réduction des oxydes de Mn par l'ammonium pour donner du nitrate	$8 \text{MnOOH} + \text{NH}_4^+ + 6 \text{H}^+ \rightarrow 4 \text{Mn}^{2+} + \text{NO}_3^- + 5 \text{H}_2\text{O}$ $4 \text{MnO}_2 + \text{NH}_4^+ + 6 \text{H}^+ \rightarrow 4 \text{Mn}^{2+} + \text{NO}_3^- + 5 \text{H}_2\text{O}$
- Précipitation/dissolution de FeS, $\text{CaCO}_3$ , $\text{FeCO}_3$ , $\text{MnCO}_3$	
- Précipitation des minéraux authigènes	
- Adsorption des métaux en trace	
- Cimentation : selon la saturation des eaux interstitielles, une précipitation chimique peut cimenter les grains de sédiments $\rightarrow \text{CaCO}_3$ , $\text{SiO}_2$	
- Compaction	
- Substitutions ioniques	

### 1.1.3 DISTRIBUTION DES ESPÈCES GÉOCHIMIQUES MAJEURES

#### 1.1.3.1 Les éléments particuliers

**Le manganèse** – En général, la zone oxique est riche en oxyhydroxydes de Mn(III) et Mn(IV). L'épaisseur de l'horizon enrichi est positivement corrélée à la profondeur de pénétration de l'oxygène. Un maximum est observé au niveau du front rédox du Mn où les profils de  $Mn^{2+}$  et d' $O_2$  interstitiels se croisent à des concentrations quasi nulles. Sous la zone oxique, les teneurs en oxyhydroxydes de Mn diminuent rapidement jusqu'à devenir nulles en profondeur. Le Mn dissous ( $Mn^{2+}$ ) peut, au lieu de diffuser vers le haut, atteindre l'équilibre avec une phase carbonatée ( $MnCO_3$  = rhodocrosite) et être enfoui dans le sédiment profond (Nealson 1997, Lovley et al. 2004).

**Le fer** – Le comportement benthique du fer est beaucoup plus complexe que celui du manganèse car il intervient dans un grand nombre de cycles géochimiques et sous de nombreuses formes. La diversité des oxydes et oxyhydroxydes de Fe, des sulfures et des silicates de Fe complique les choses. Cependant, chaque phase ferrique a une réactivité différente liée à son état cristallin: les oxydes de Fe amorphes sont préférentiellement réduits avant les formes plus cristallines ( $Fe(OH)_3 > FeOOH > Fe_2O_3$ ). Leur distribution est similaire à celle des oxydes de Mn avec un enrichissement en surface, un maximum sous le front rédox du Mn puis une diminution en profondeur pour atteindre des valeurs assez constantes. Dans certains cas, le fer particulaire peut augmenter à nouveau en profondeur du fait de la précipitation de FeS. Comme pour le Mn, l'épaisseur de la couche enrichie en oxydes ferriques est corrélée à l'épaisseur de la zone oxique et aux teneurs en Fe (Nealson 1997, Lovley et al. 2004).

#### 1.1.3.2 Les éléments dissous

De façon générale et selon la séquence diagénétique présentée précédemment, les espèces dissoutes ( $O_2$ ,  $NO_3^-$ ) disparaissent rapidement sous l'interface eau/sédiment tandis que les espèces réduites ( $NH_4^+$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) augmentent avec la profondeur, en réponse aux différentes activités métaboliques des organismes (Tableau 3). Cependant, les réactions diagénétiques secondaires et les phénomènes de diffusion peuvent redistribuer ces composés dissous.

**Tableau 3 - Eléments dissous mesurés communément dans les sédiments: sources biologiques, puits, processus et organismes impliqués (d'après Nealson 1997).**

Source : processus/organismes		Puits : processus/organismes
Photosynthèse/Cyanobactéries, algues	<b>O<sub>2</sub></b>	Oxydation du C organique/Hétérotrophes aérobies Oxydation de composés inorganiques (e.g. H <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> S) /Chémolithotrophes aérobies
Oxydation NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /bactéries nitrifiantes	<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Oxydation du C organique/Dénitrificateurs Oxydation de composés inorganiques (e.g. H <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> S, Fe <sup>2+</sup> )/Chémolithotrophes anaérobies
Ammonification/bactéries dégradant les protéines	<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	Oxydation aérobie/Nitrificateurs
Réduction Mn/Réducteurs du Mn	<b>Mn<sup>2+</sup></b>	Oxydation Mn/Oxydateurs du Mn
Réduction Fe/Ferro-réducteurs	<b>Fe<sup>2+</sup></b>	Oxydation Fe/Oxydateurs du Fe aérobies, anaérobies et photosynthétiques
Oxydation S (H <sub>2</sub> S, S <sup>0</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> )/oxydateurs du S aérobies	<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	Réduction hétérotrophe SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /bactéries sulfato-réductrices Assimilation SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /plupart des bactéries
Réduction S (H <sub>2</sub> S, SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> )/Réducteurs du S	<b>H<sub>2</sub>S</b>	Oxydation des sulfures/Oxydateurs des sulfures aérobies et anaérobies Oxydation photosynthétique/bactéries photosynthétiques
Méthanogenèse/Méthanogènes	<b>CH<sub>4</sub></b>	Oxydation aérobie CH <sub>4</sub> /Méthanotrophes Oxydation anaérobie CH <sub>4</sub> /consortium inconnu
Fermentation/bactéries fermentatrices Réduction H <sup>+</sup> /bactéries syntrophes	<b>H<sub>2</sub></b>	Oxydation aérobie d'H/Chémolithotrophes Oxydation anaérobie d'H/nombreuses bactéries Méthanogenèse/Méthanogènes Acétogenèse/Acétogènes
Fermentation/bactéries fermentatrices Respiration/nombreuses bactéries	<b>CO<sub>2</sub></b>	Autotrophie/Chémoautotrophes ou photoautotrophes Méthanogenèse/Méthanogènes Acétogenèse/Acétogènes

**L'oxygène (O<sub>2</sub>)** – Sous l'interface eau/sédiment, les concentrations en oxygène diminuent brusquement car il est utilisé par les organismes aérobies (micro- et macrofaune) pour respirer et pour dégrader la MO venant de la colonne d'eau ou déjà présente dans le sédiment. Il est aussi un oxydant privilégié pour les éléments réduits plus en profondeur lors de la respiration anaérobie (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, ΣH<sub>2</sub>S, CH<sub>4</sub>) et qui diffusent depuis la zone anoxique. L'épaisseur de la couche oxiqne est négativement corrélée aux teneurs et aux flux de MO

venant de la colonne d'eau : plus le flux est important, plus la consommation d'oxygène est rapide et plus la zone oxique est étroite et condensée dans les tous premiers millimètres de sédiment (Froelich et al. 1979, Reeburgh 1983). Dans les sédiments marins profonds, moins de 1% de la MO produite dans la colonne d'eau arrive au niveau du sédiment (Tissot & Welte 1984), et la zone oxique peut alors atteindre plusieurs dizaines de mètres de profondeur (Nealson 1997).

**Les composés azotés** – Quand la concentration en  $O_2$  devient faible, il est commun d'observer une zone riche en  $NO_3^-$ . Le  $NH_4^+$  produit en profondeur diffuse vers le haut puis est converti en  $NO_3^-$  (nitrification). Les  $NO_3^-$  produits sont à leur tour utilisés pour oxyder la MO (dénitrification). L'importance relative de ces deux processus est difficile à mesurer car ils se produisent dans des zones adjacentes et que le réactant pour l'un est le produit pour l'autre (couplage) (Nealson 1997).

**Le méthane ( $CH_4$ )** – Le méthane est produit en profondeur par fermentation (méthanogenèse). Dans les conditions physico-chimiques de la plupart des sédiments, ce processus ne peut se faire que par catalyse biologique. Le méthane peut être réoxydé en surface, principalement par l'oxygène. L'oxydation anaérobie existe mais elle est plutôt rare (Reeburgh 1983). Ainsi, le méthane apparaît juste au-dessous de l'interface entre les zones oxique et anoxique. Sa concentration augmente ensuite avec la profondeur. Il constitue l'indicateur majoritaire du *turnover* de la MO dans les systèmes d'eau douce (Nealson 1997).

**Le fer et le manganèse** – Le fer et le manganèse solubles ( $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) diffusent vers le haut, sont oxydés et précipitent. Pour de faibles concentrations en oxygène, ils se déposent alors sous forme de couches d'oxydes métalliques ou de croûtes. La couche d'oxydes de Mn ( $MnO_2$ ) surmonte en général celle des oxydes de Fe, qui est plus rapidement oxydé et précipite sous la couche de Mn. De telles couches ferro-manganésiques sont très souvent observées dans les sédiments. Les deux processus sont équivalents en termes d'énergie fournie mais très différents en termes de cinétique pour un même pH. Le  $Mn^{2+}$  est stable cinétiquement et son oxydation nécessite des catalyseurs. L'oxydation de  $Fe^{2+}$  est par contre très rapide et ne nécessite pas de catalyse biologique (Stumm & Morgan 1981).

Sous la zone de réduction des nitrates, la MO est oxydée par la réduction de ces métaux. Il en résulte des concentrations interstitielles de  $Mn^{2+}$  et  $Fe^{2+}$  croissantes. Les ions  $Fe^{2+}$  sont de bons réducteurs de  $MnO_2$  et sont réoxydés en  $Fe^{3+}$  par cette réaction (Myers & Nealson



1988b). La concentration en  $Mn^{2+}$  augmente en profondeur et elle suivie par l'apparition de  $Fe^{2+}$ . Dans les sédiments d'eau douce, les profils de concentration sont souvent clairement définis, tandis qu'en milieu marin, les profils de fer peuvent être difficiles à interpréter, en particulier à cause du cycle du soufre, la diffusion vers le haut des sulfures tendant à mobiliser  $Fe^{2+}$  pour former de la pyrite ( $FeS$ ). La réduction du fer et du manganèse peut être biotique comme abiotique. Le manganèse est facilement réduit par les composés organiques (Stone et al. 1994) ainsi que par quelques composés inorganiques, comme les sulfures (Burdige et al. 1992) ou le fer  $Fe^{2+}$  (Myers & Nealson 1988a). Le fer peut aussi être réduit par les sulfures ou par des composés organiques, mais il est beaucoup plus résistant à la réduction chimique. Certains auteurs considèrent que, dans le milieu naturel, la réduction du fer est uniquement réalisée par catalyse biologique (Lovley et al. 1991, Lovley et al. 2004).

**Les composés soufrés** – La réduction des sulfates est bien caractérisée dans les sédiments, tandis que la réduction des thiosulfates est bien moins quantifiée. Hormis pour des températures très élevées, comme dans les sources hydrothermales, les sulfates sont stables à moins d'une réduction catalysée biologiquement. Il n'existe pas de réduction purement chimique dans les sédiments. Sous la zone de réduction des métaux, l'espèce réduite majoritaire suivante dans les eaux interstitielles est la forme sulfure  $S_2^-$ , ce qui est généralement attribué aux bactéries sulfato-réductrices. L'importance des autres formes intermédiaires de sulfures, comme les ions thiosulfates et le sulfure élémentaire (polysulfure), reste à élucider, probablement à cause de la complexité de la chimie du soufre.

La production de sulfures par réduction des ions sulfates est une des principales différences existant entre les sédiments marins et dulçaquicoles. En eau douce, la concentration en sulfates varie entre 100 et 250  $\mu M$ , tandis qu'elle est d'environ 25mM en milieu marin. Les sulfates sont donc les accepteurs d'électrons dominants dans les sédiments marins, même par rapport à l'oxygène. La consommation des oxydants se fait grâce à la diffusion vers le haut des espèces sulfurées réduites (ions polysulfures, thiosulfates et sulfites) qui sont produites par oxydation de la MO. Au cours de leur remontée vers l'interface, ces ions sont oxydés par  $Fe(III)$ ,  $Mn(IV)$  et l'oxygène. Chaque oxydant produit des espèces soufrées intermédiaires capables d'interagir avec d'autres composés, ce qui rend ce système complexe difficile à étudier. Dans la plupart des cas, le potentiel d'oxydation du sédiment fait que les sulfures sont consommés dans les sédiments, soit par l'oxygène, soit par d'autres oxydants, comme les nitrates ou les métaux. Au contraire, en eau douce, le cycle du soufre est beaucoup moins important (Nealson 1997, Nealson & Berelson 2003, Claypool 2004).

### 1.1.4 PROFILS DE CONCENTRATION ET FLUX DIFFUSIFS

Comme vu précédemment, la distribution verticale des composés solubles dans l'eau interstitielle reflètent les réactions diagénétiques qui se produisent dans les sédiments. Les profils de concentration permettent le calcul des flux entre le sédiment et l'eau interstitielle, et à l'interface eau/sédiment (Boudreau & Jorgensen 2000). La distribution des éléments dissous va s'établir en réponse à (i) la dégradation de la MO, (ii) la libération dans l'eau interstitielle d'éléments initialement piégés ou adsorbés sur la phase solide (= remobilisation) et (iii) le transport diffusif de la colonne d'eau vers l'eau interstitielle à travers l'interface eau/sédiment.

La figure 5 illustre les différents types de profils qu'il est possible d'observer dans les sédiments (Schultz & Zabel 2000):

- a) la concentration de l'élément reste constante avec la profondeur : aucune réaction diagénétique n'a lieu.
- b) un profil concave indique la consommation de l'élément. Un gradient de concentration s'établit entre l'interface eau/sédiment et la profondeur de consommation maximale. A l'équilibre, l'élément va donc diffuser de l'eau vers le sédiment sur une certaine profondeur.
- c) ce profil indique également la consommation d'un élément mais au niveau d'une zone réactive particulière dans le sédiment. Le gradient au-dessus de cette couche est constant, la diffusion est constante. Au niveau de la couche réactive, l'élément est consommé, la concentration tend à devenir nulle et le flux diffusif s'annule.
- d) par analogie, un profil convexe indique le relargage de l'élément vers la colonne d'eau à travers l'interface.
- e) la libération de l'élément vers l'eau interstitielle a lieu au niveau d'une zone réactive particulière.
- f) le dernier cas associe deux niveaux réactifs. L'élément libéré dans la couche 1 est ensuite consommé au niveau de la couche 2. Entre les deux, l'élément diffuse selon le gradient de concentration (ici, vers le bas). Par exemple, le méthane migre vers le haut et réduit les sulfates dans le niveau 2. Les sulfures produits diffusent vers le haut jusqu'au niveau 1 où ils sont à nouveau oxydés et donnent des sulfates.

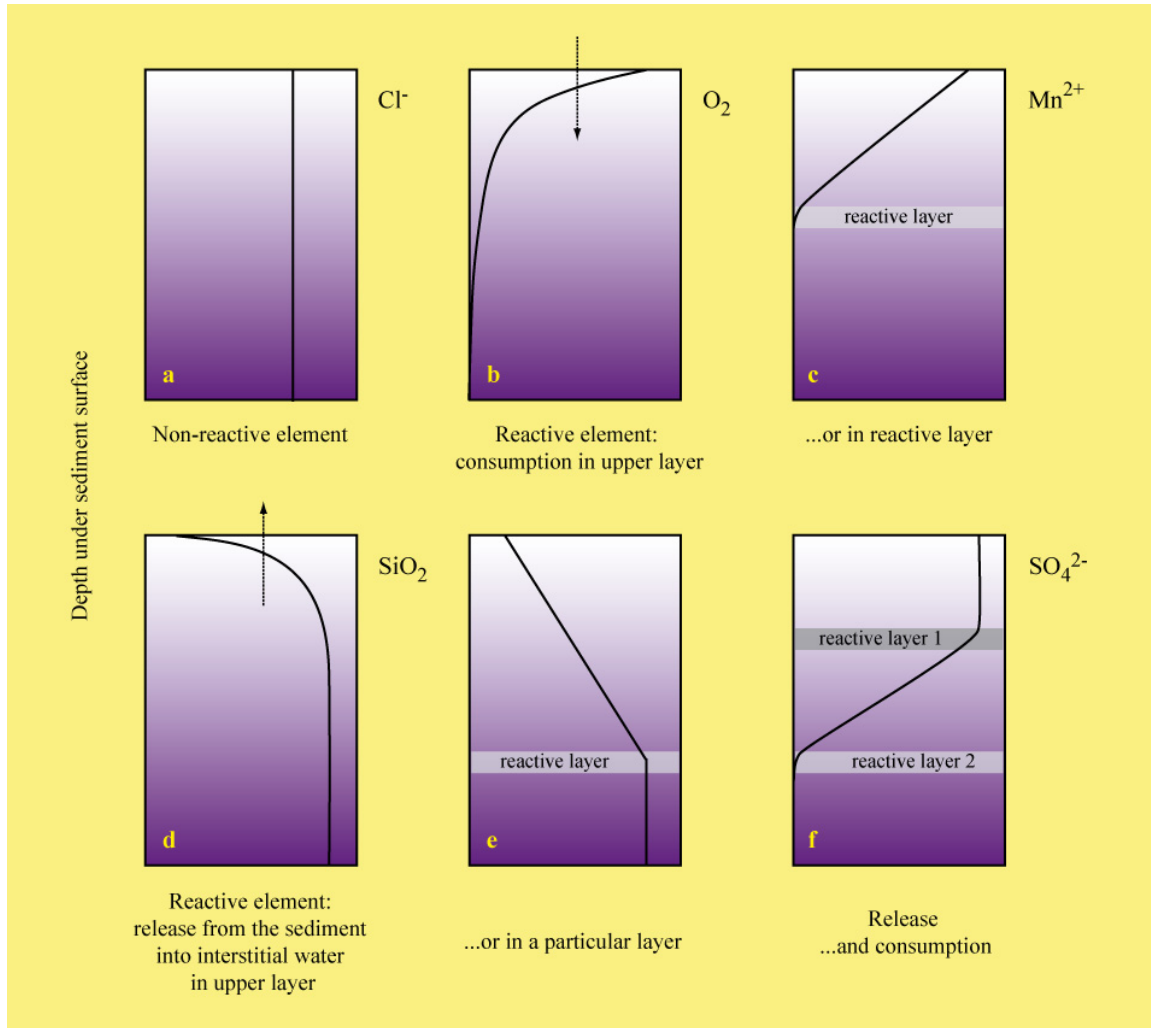


Figure 5 - Principaux types de profils de concentrations dans l'eau interstitielle du sédiment (d'après Schultz & Zabel 2000).

A partir des gradients de concentrations, les flux diffusifs peuvent être estimés grâce à la première loi de Fick (Li & Gregory 1974, Berner 1980):

$$\mathbf{1}^{\text{ère}} \text{ loi de Fick} \quad \mathbf{J(z)} = - \mathbf{D} \cdot (d\mathbf{C(z)} / dz) \quad (1)$$

$$\mathbf{J(z)} = - \boldsymbol{\varphi} \cdot \mathbf{D}_{\text{séd}} \cdot (d\mathbf{C(z)} / dz) \quad (2)$$

$$\mathbf{D}_{\text{séd}} = \mathbf{D} / \boldsymbol{\theta}^2 \quad (3)$$

L'équation (1) permet de calculer le flux diffusif  $\mathbf{J(z)}$  de l'espèce chimique considérée en un point de profondeur  $\mathbf{z}$  en fonction de sa concentration  $\mathbf{C(z)}$ .  $\mathbf{D}$  représente le coefficient de diffusion du composé dans l'eau qui est fonction de la salinité et de la température de l'eau (Garcia & Gordon 1992). Cependant, cette équation n'est valable qu'au sein d'une solution aqueuse. Dans le sédiment, les particules vont freiner la diffusion. La deuxième équation (2) permet de calculer le flux diffusif en tenant compte de la porosité  $\boldsymbol{\varphi}$  et de la tortuosité  $\boldsymbol{\theta}$  du sédiment et donc du coefficient de diffusion de l'espèce chimique dans le sédiment  $\mathbf{D}_{\text{séd}}$  (3).

### 1.1.5 EFFET DE LA TEMPÉRATURE

Dans les sédiments superficiels, les variations du degré d'oxygénation de la colonne d'eau vont entraîner des variations des concentrations des différents composés de l'eau interstitielle. L'apport en  $\text{O}_2$  peut changer en réponse aux fluctuations quotidiennes et saisonnières: stratification des eaux, apports allochtones, photosynthèse (Nealson 1997, Wenzhöfer & Glud 2004). Les concentrations interstitielles des éléments vont principalement être affectées par la différence de température entre les eaux du fond et le sédiment. Ceci peut se traduire par un changement du taux de décomposition de la MO, de l'activité métabolique des micro-organismes, de la diffusion des éléments et de l'activité bioturbatrice (Charbonneau & Hare 1998, Maire et al. 2007). Les gradients de concentrations sont en général plus marqués en été qu'en hiver.

### 1.1.6 CAS DES SÉDIMENTS EN MILIEU CONTINENTAL

Au sein des sédiments d'eau douce, la succession verticale des zones diagénétiques ne se développe que sur les premiers millimètres ou centimètres sous l'interface (Fig. 3). Ceci est lié à l'apport de MO réactive mais aussi à la faible disponibilité des oxydants dissous dans la colonne d'eau, en particulier les nitrates et les sulfates, par rapport au milieu marin. Ces sédiments riches en MO qui se déposent sous une colonne d'eau généralement oxygénée, se caractérisent par une très fine couche oxique, les conditions anoxiques apparaissant très vite sous l'interface eau/sédiment. Les eaux interstitielles sont donc rapidement marquées par la disparition des oxydants dissous ( $O_2$ ,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ) et la présence de  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  et  $H_2S$ . Ensuite les profils sont influencés par la réduction des oxyhydroxydes de Fe et de Mn et par des réactions post-dépositionnelles (dissolution-précipitation, adsorption-désorption).

La figure 6 montre deux exemples de profils de concentrations des espèces dissoutes caractéristiques d'environnements continentaux (sédiment du Lac Michigan) et marins (colonne d'eau de la Mer Noire) (Nealson 1997). Le cas de la Mer Noire constitue une illustration typique de la séquence diagénétique car la colonne d'eau est très bien stratifiée et la zone oxique fait plus de 50 m de profondeur en raison du faible flux de MO. Cependant, les deux profils sont fondamentalement similaires si l'on ne tient pas compte de l'échelle spatiale (centimétrique en eau douce, métrique en milieu marin). Les valeurs rapportées dans la figure 6 correspondent au pourcentage des valeurs maximales qui peuvent être mesurées dans ces milieux (Tableau 4).

**Tableau 4 - Concentrations maximales des éléments dissous généralement rencontrées dans les milieux d'eau douce et marins.**

	eau douce	milieu marin
$O_2$		300-400 $\mu M$
$NO_3^-$ $NO_2^-$		quelques $\mu M$
$SO_4^{2-}$	100-200 $\mu M$	25 mM
$Mn^{2+}$	100 $\mu M$	10 $\mu M$
$Fe^{2+}$	10 $\mu M$	25 nM
$NH_4^+$		quelques $\mu M$
$H_2S$	non détecté	<quelques $\mu M$
$CH_4$	de quelques nM à la saturation (bulles de gaz)	

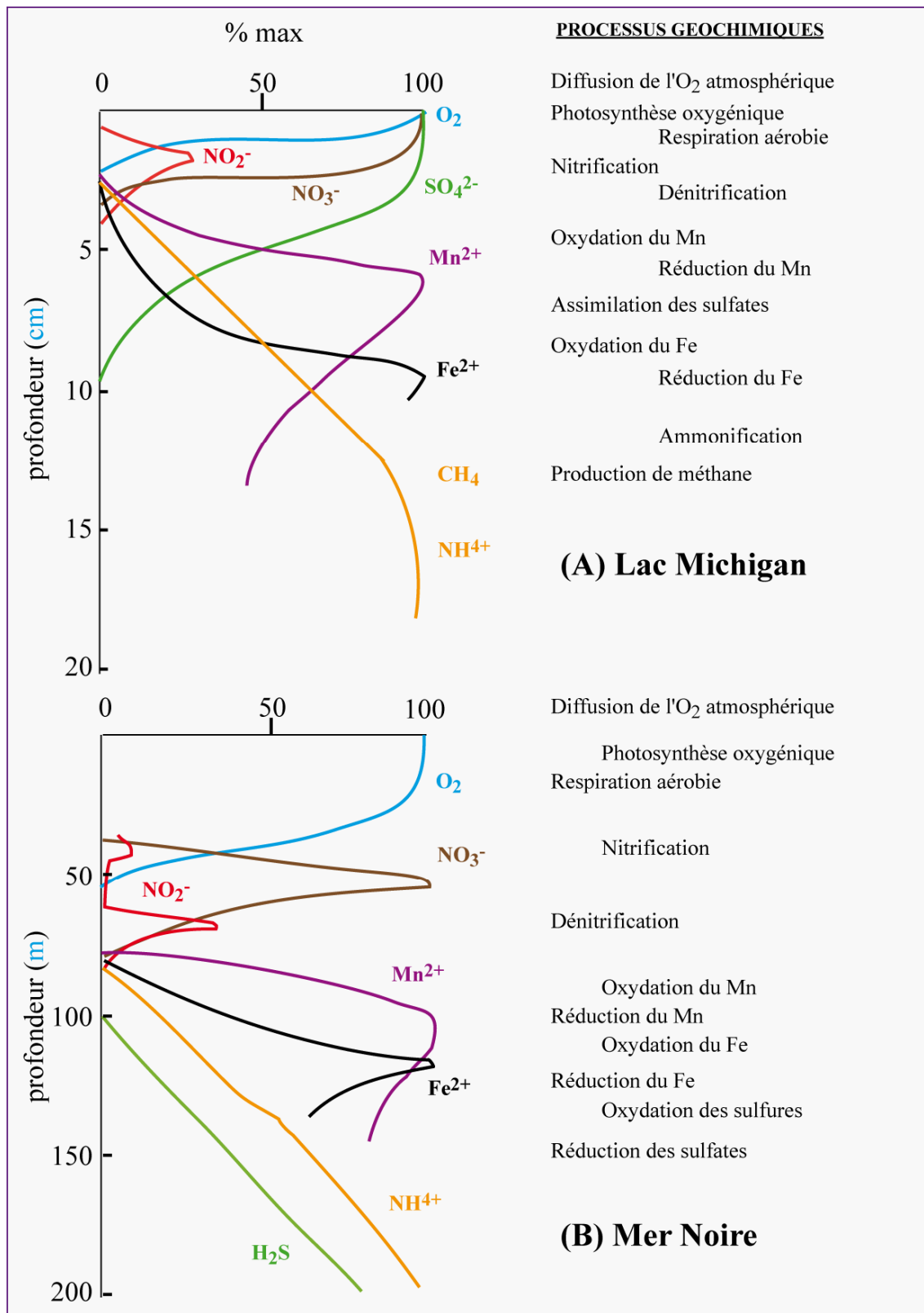


Figure 6 - Profils verticaux des nutriments dans des environnements typiques : (A) eau douce, (B) marin. Ces profils sont considérés comme représentatifs des profils mesurables dans l'eau interstitielle des sédiments d'eau douce et marins (d'après Neilson 1997).

La principale différence est la dominance du cycle du soufre dans les sédiments marins, tandis que la méthanogenèse prédomine en eau douce. Dans les sédiments d'eau douce, on note également les observations suivantes (Nealson 1997) :

- Les conditions aérobies se limitent aux millimètres supérieurs du sédiment. Ceci diminue le flux diffusif des éléments réduits de l'eau interstitielle vers la colonne d'eau sus-jacente.

- La dénitrification est limitée aux premiers centimètres. Le  $\text{NO}_3^-$  est totalement réduit étant donné le faible flux de nitrates venant de la colonne d'eau et le taux de dégradabilité élevé de la MO qui sédimente.

- Les ions  $\text{Mn}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{4+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$  des oxy-hydroxydes passent vers d'autres phases solides réduites (e.g.  $\text{MnCO}_3$ ,  $\text{FeCO}_3$ ,  $\text{FeS}$ ). Le profil de concentration du  $\text{Mn}^{2+}$  atteint un maximum sous l'interface eau/sédiment puis diminue. Sa distribution entre la phase solide et la phase dissoute est contrôlée par la précipitation de rhodocrosite ( $\text{MnCO}_3$ ).

- Le fer et le manganèse dissous sont séparés verticalement suite à l'oxydation de  $\text{Fe}^{2+}$  par  $\text{MnO}_2$ . L'équilibre impliquant des minéraux magnésiens est plus rapidement atteint que celui impliquant des minéraux ferrifères. Une augmentation de  $\text{Fe}^{2+}$  interstitiel avec la profondeur peut s'observer, même sous la zone de sulfato-réduction. Cette tendance s'explique par l'hétérogénéité du sédiment et la différence de comportement vis-à-vis de la dissolution des oxydes ou oxy-hydroxydes de fer. La sursaturation des eaux porales anaérobies par rapport à la sidérite ( $\text{FeCO}_3$ ) ou à la vivianite ( $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ) favorise aussi un comportement du fer hors de l'équilibre. Du fait de la bioturbation de la macrofaune et du mélange physique des particules sédimentaires, le fer et le manganèse, dissous ou associés à la phase solide, peuvent être oxydés ou re-précipités. Ces oxydes ont des propriétés d'adsorption importantes et jouent un rôle sur le piégeage d'éléments en traces. Lorsque la couche oxydée est mince ou absente, la diffusion de  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{2+}$  vers la colonne d'eau est possible.

- Les sulfates sont totalement épuisés dans les premiers centimètres de sédiment. Ils sont réduits en sulfures principalement sous forme inorganique. Bien que la pyrite ( $\text{FeS}_2$ ) soit le précipité le plus stable, sa formation dans les sédiments continentaux est controversée. De plus, la formation de  $\text{FeS}_2$  n'est pas encore totalement élucidée, une des voies proposées étant la réaction entre  $\text{FeS}$  et  $\text{S}^0$  (Gaillard 1995). Contrairement aux sédiments marins, les sédiments d'eau douce présentent un excès en  $\text{Fe}^{3+}$  par rapport à la production de sulfures. Par conséquent,  $\text{FeCO}_3$  et  $\text{FeS}$  peuvent contrôler la concentration en  $\text{Fe}^{2+}$  des eaux interstitielles dans la zone anoxique du sédiment.

• Le profil de concentration de  $\text{NH}_4^+$  interstitiel, produit par la dégradation de la MO, montre une augmentation avec la profondeur. La diminution de la pente du profil en profondeur suggère une diminution du taux de décomposition de la MO. Cette dernière est en effet préférentiellement oxydée à proximité de l'interface eau/sédiment. La production continue de  $\text{NH}_4^+$  même sous la zone de sulfato-réduction indique un processus de méthanogenèse. L'apport des oxydants externes étant assez limités en eau douce, la fermentation méthanogénique est souvent le processus dominant de la décomposition de la MO. Dans les sédiments particulièrement riches en MO, la concentration en méthane dépasse souvent la limite de solubilité et des bulles de gaz peuvent se former.

### 1.1.7 CONCLUSION

La biogéochimie des sédiments superficiels est sous la dépendance directe du phénomène de diagenèse précoce qui commence dès le dépôt des particules sédimentaires à la surface du sédiment et se poursuit pendant leur enfouissement. Les transformations diagénétiques, principalement liées à la dégradation de la MO, se traduisent par des transferts de matière aux interfaces entre l'eau et les composés solides (colonne d'eau/sédiment, particules/eau interstitielle). Au final, de nombreux éléments associés à la phase solide passent dans l'eau interstitielle et diffusent vers la colonne d'eau. Leur concentration peut augmenter jusqu'à ce que la précipitation des minéraux authigènes soit initiée, ce qui les réentraîne vers le fond. Ils peuvent aussi directement s'adsorber à la surface de certaines particules et sédimenter.

Les réactions de minéralisation, de précipitation et de dissolution de certaines phases solides, regroupent donc l'ensemble des phénomènes diagénétiques qui affectent le sédiment et conduisent à la formation des sédiments permanents.

Les principales caractéristiques des sédiments superficiels d'eau douce sont : (i) la faible épaisseur de la zone oxygène (quelques millimètres à quelques centimètres), (ii) la consommation rapide des accepteurs d'électrons dissous sous l'interface eau/sédiment, en particulier les nitrates et les sulfates et (iii) la dominance du processus de méthanogenèse dans la dégradation de la MO.



## **1.2 L'URANIUM : DE SON UTILITÉ À SA TOXICITÉ**

### **1.2.1 CARACTÉRISTIQUES DE L'URANIUM**

#### **1.2.1.1 Introduction**

L'uranium est un métal lourd radioactif, présent naturellement dans l'environnement et que l'on retrouve sous diverses formes chimiques dans les sols, les eaux continentales, les océans, l'atmosphère et dans les organismes vivants. L'uranium a été mis en évidence en 1789 par le chimiste prussien Martin Heinrich Klaproth en chauffant la pechblende ( $\text{UO}_2$ ), un minerai d'uranium. Klaproth donna le nom d'« urane » ou « uranite » au composé qu'il venait d'identifier, en référence à la découverte de la planète Uranus faite par William Herschel huit ans plus tôt (1781). Le français Henri Becquerel ne découvrit la propriété radioactive de l'uranium que beaucoup plus tard, en 1896, lorsqu'il constata que des plaques photographiques placées à côté de sels d'uranium avait été impressionnées sans avoir été exposées à la lumière du soleil.

#### **1.2.1.2 Propriétés chimiques et physiques**

L'uranium (U) est un radioélément du groupe des actinides, de numéro atomique  $Z = 92$ . Il est le dernier élément naturel du tableau périodique de Mendeleïev, et donc le plus lourd. Il possède dix-sept isotopes, tous radioactifs, émetteurs de particules alpha et d'un faible rayonnement électromagnétique (X et gamma).

A l'état pur, l'uranium solide est un métal de couleur gris-blanc, voire argentée, qui rappelle celle du nickel. Il est dur, malléable et ductile. Il ternit au contact de l'air et est attaqué par la vapeur et les acides. Il est également caractérisé par une très forte densité de  $19 \text{ g cm}^{-3}$ , soit environ deux fois celle du plomb, et par sa pyrophoricité, c'est-à-dire sa capacité à s'enflammer au contact de l'air quand il est sous forme de microparticules.

L'élément uranium se retrouve toujours en combinaison avec d'autres éléments tels que l'oxygène, l'azote, le soufre ou le carbone. On le trouve, par exemple, en combinaison avec

l'oxygène dans l'uranite et la pechblende, deux des principaux minerais d'uranium, constitués d'oxyde uraneux (UO<sub>2</sub>). Enfin, les ions uranyles (UO<sub>2</sub><sup>2+</sup>) se dissolvent très bien dans la plupart des acides, comme dans l'acide nitrique ou fluorhydrique en donnant des sels d'uranyle tels que le nitrate d'uranyle.

L'uranium naturel est composé d'un mélange de trois isotopes : <sup>238</sup>U, <sup>235</sup>U et <sup>234</sup>U, dont les proportions sont pratiquement toujours les mêmes, quelque soit le type de milieu concerné et sa teneur en uranium (Tableau 5). Ces isotopes présentent des caractéristiques radiologiques différentes mais les mêmes propriétés physico-chimiques.

**Tableau 5 - Abondances, radioactivités, périodes et activités des 3 isotopes de l'uranium naturel.**

	<b>Abondance relative (%)</b>	<b>Radioactivité relative (%)</b>	<b>Période (années)</b>	<b>Activité spécifique (Bq g<sup>-1</sup>)</b>
<sup>238</sup> U	99,27	48,9	4,5.10 <sup>9</sup>	1,24.10 <sup>4</sup>
<sup>235</sup> U	0,72	2,2	7,1.10 <sup>8</sup>	8,0.10 <sup>4</sup>
<sup>234</sup> U	0,0054	48,9	2,44.10 <sup>5</sup>	2,3.10 <sup>8</sup>

L'uranium utilisé comme combustible nucléaire est enrichi en <sup>235</sup>U, seul isotope naturel fissile, donc capable d'entretenir une réaction en chaîne. Après séparation de la fraction enrichie, le métal restant est appelé uranium appauvri (moins de 0,7% d' <sup>235</sup>U) et sa radioactivité se situe à environ 60% de celle de l'uranium naturel.

### **1.2.1.3 Origine et répartition**

Au moment de la formation du système solaire, de très nombreux éléments radioactifs étaient présents. Cependant, seuls ceux dont la période de désintégration spontanée est très importante ont pu subsister jusqu'à nos jours puisqu'ils n'ont pas eu le temps de disparaître totalement. Il s'agit principalement de l'uranium 238 et du thorium 232 ainsi que de leurs descendants respectifs. Actuellement, la croûte terrestre en contient en moyenne 2,8 ppm (µg U kg<sup>-1</sup>), où il est le 49<sup>ème</sup> élément le plus abondant. L'uranium n'est donc pas rare, cette concentration étant comparable à celle d'autres métaux, comme l'étain, le molybdène ou le tungstène. L'uranium se concentre préférentiellement dans certains granites (4 ppm) et certaines roches sédimentaires (2 ppm). Les gisements de minerai se forment le long de discontinuités géologiques, où l'on trouve de l'uranium dans de nombreuses roches (minerai à 0,1%, 1000 ppm). Cependant, il n'existe en quantités importantes (20 000 ppm) que dans

certaines roches (minerai à 2%) comme la pechblende et la carnotite (Rich et al. 1977, Ragnarsdottir & Charlet 2000).

L'uranium n'existe pas seulement à l'état de minerai, mais aussi sous forme de poussières atmosphériques et sous forme dissoute. L'eau de mer en contient environ 4 milliards de tonnes représentant ainsi son plus grand réservoir mondial même s'il y est très dilué (0,003 ppm, soit  $3 \mu\text{g U L}^{-1}$ ). Les plus grandes rivières du monde présentent une concentration moyenne de  $0,35 \mu\text{g U L}^{-1}$  (Palmer & Edmond 1993, Windom et al. 2000). Mais la concentration des eaux douces varie entre 0,01 et  $6,6 \mu\text{g U L}^{-1}$  selon le temps de contact avec des strates rocheuses contenant de l'uranium, le taux d'évaporation et la disponibilité d'agents ioniques complexants (Gascoyne 1992). Dans les estuaires, les concentrations en uranium augmentent généralement de façon linéaire avec le gradient de salinité (*i.e.* comportement conservatif, Windom et al. 2000), jusqu'à atteindre un plateau autour de  $3 \mu\text{g U L}^{-1}$  dans l'eau de mer (Cochran 1992). Bien que l'uranium se comporte de façon conservative pendant le mélange estuarien (*e.g.* Zaïre, Gironde, Tama, Medway), il peut aussi avoir un comportement non-conservatif, comme dans le Gange ou l'Amazone, où l'uranium est, respectivement, piégé ou relargué par les sédiments (Moore 1992, Windom et al. 2000). Les eaux des grands fleuves représentent le seul apport significatif d'uranium dissous à l'océan avec un flux annuel de 7 à 12 tonnes (Palmer & Edmond 1993, Windom et al. 2000). Dans les sédiments aquatiques, la concentration moyenne est de  $3 \mu\text{g U g}^{-1}$ . Elle peut varier entre 0,5 et  $5 \mu\text{g U g}^{-1}$  (Scott 1982), selon la taille des particules, la composition minéralogique et la physico-chimie de l'eau surnageante, particulièrement dans les milieux d'eau douce. Les valeurs référencées dans ce paragraphe pour les eaux et les sédiments continentaux correspondent au bruit de fond géochimique naturel pour des hydrosystèmes qui ne situent pas dans des terrains particulièrement riches en uranium ou qui ne sont pas contaminés, comme c'est le cas autour des sites miniers ou des sites de fabrication d'armes nucléaires. En effet, des valeurs 100 voire 1000 fois supérieures ont été relevées sur certains de ces sites (cf paragraphe 1.2.2.4).

#### **1.2.1.4 Utilisation industrielle, commerciale et militaire**

L'exploitation du minerai existe depuis le Moyen-âge mais elle s'est particulièrement développée au cours du XX<sup>ème</sup> siècle. La production mondiale cumulée depuis 1920 est estimée à 4,5 millions de tonnes (WNA 2007). Ceci reste très inférieur à la quantité estimée contenue dans la lithosphère qui est de  $10^{15}$  tonnes (Andersson et al. 2001).

Avant la découverte de la radioactivité, l'uranium a été surtout utilisé comme pigment pour le verre. Il a également servi à cet effet pour les céramiques dentaires jusqu'au début des années 80 et est encore utilisé dans la joaillerie. Actuellement il sert principalement de combustible nucléaire (centrales nucléaires, réacteurs des sous-marins nucléaires, bombes atomiques A et thermonucléaires H). L'uranium appauvri, sous-produit de l'enrichissement de l'uranium, est très prisé pour sa dureté, sa densité et sa pyrophoricité. Il est ainsi utilisé : (i) comme bouclier anti-radiations en milieu médical et lors du transport de matériel radioactif, (ii) comme contrepoids et ballasts dans les bateaux, les avions, les satellites et les missiles à tête nucléaire, (ii) dans le blindage des chars d'assaut, et (iii) dans la composition des munitions des armes à fort pouvoir perforant.

En 2006, la production mondiale d'uranium était d'environ 40 000 t pour une consommation de 67 000 t. La différence entre la consommation et la production annuelles s'explique par l'utilisation des stocks, qui sont estimés à plus de 3,5 millions de tonnes (OECD/AEN 2006). Dix-huit pays participent à cette production. Les quatre plus grands producteurs (Canada, Australie, Kazakhstan, Niger) fournissent 66% de la production totale (Tableau 6). La France a été dans le passé un producteur significatif, mais les gisements n'offrent plus de conditions d'exploitation économiquement satisfaisantes. La dernière mine, exploitée près de Limoges (Jouac), a fermé en 2001.

**Tableau 6 - Production mondiale d'uranium entre 2002 et 2006 (en tonnes)**  
 - d'après WNA 2007, [www.world-nuclear.org](http://www.world-nuclear.org) -

<b>Pays</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>
Canada	11 604	10 457	11 597	11 628	9 852
Australie	6 854	7 572	8 982	9 516	7 593
Kazakhstan	1 800	3 300	3 719	3 357	5 279
Niger	2 075	3 143	3 282	3 093	3 434
Russie	2 900	3 150	3 200	3 431	3 262
Namibie	2 333	2 036	3 038	3 147	3 067
Ouzbékistan	1 860	1 598	2 016	2 300	2 260
USA	919	779	878	1 039	1 652
Ukraine	800	800	800	800	800
Chine	730	750	750	750	750
Afrique du Sud	824	758	755	674	534
République Tchèque	465	452	412	408	359
Inde	230	230	230	230	177
Brésil	270	310	300	110	190
Roumanie	90	90	90	90	90
Allemagne	212	150	150	77	50
Pakistan	38	45	45	45	45
France	20	0	7	7	5
<b>TOTAL</b>	<b>36 063</b>	<b>35 613</b>	<b>40 251</b>	<b>41 702</b>	<b>39 429</b>

## 1.2.2 COMPORTEMENT DE L'URANIUM DANS LES SÉDIMENTS DES SYSTÈMES AQUATIQUES CONTINENTAUX

### 1.2.2.1 Spéciation de l'uranium dans l'eau

Une des caractéristiques les plus importantes de l'uranium dans les eaux de surface, est, comme pour les autres métaux, sa distribution relative entre les phases particulaires (>450 nm), colloïdales (1-450 nm) et dissoutes (<1 nm) (Ure & Davidson 1995). Cette distribution est gouvernée par la solubilité de l'uranium et son affinité pour les particules qui dépendent du pH, du potentiel d'oxydoréduction Eh ou de la concentration en ligands. D'un point de vue strictement chimique, l'uranium peut exister à plusieurs états d'oxydation, allant de (+III) à (+VI), les formes les plus stables étant U(+IV) en milieu réducteur et U(+VI) en milieu oxydant. La spéciation de l'uranium est principalement liée aux valeurs du pH et du potentiel d'oxydoréduction Eh (Langmuir 1978). Elle dépend aussi fortement de nombreux autres paramètres physico-chimiques comme l'alcalinité, la pression partielle en CO<sub>2</sub>, la force ionique, la teneur en MO, la concentration en uranium dans le milieu ou la présence de ligands organiques et minéraux (Ragnarsdottir & Charlet 2000, Davis et al. 2002, Davis et al. 2004, Denison 2004, Curtis et al. 2006, Davis et al. 2006) ainsi que de l'activité microbienne (Renshaw et al. 2007).

Dans les eaux douces oxiques, dont le pH varie entre 5 et 9, l'uranium existe sous une forme libre, l'ion uranyle UO<sub>2</sub><sup>2+</sup> qui est à l'état (VI). Pour des concentrations environnementales naturelles (<30 µg U L<sup>-1</sup>), l'ion uranyle est l'espèce dominante jusqu'à pH 6 (Fig. 7 et 8a). Au-delà d'un pH=6, apparaissent par complexation des formes hydroxylées (*e.g.* UO<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>). Mais les carbonates représentent un des agents complexants les plus importants dans la plupart des hydrosystèmes d'eau douce (Clark et al. 1995). Pour une faible alcalinité (<40 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>) et une faible concentration en MO dissoute (<0.5 mg C L<sup>-1</sup>), l'espèce uranyle UO<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> est dominante entre pH 5 et 6, puis c'est l'espèce mixte hydroxyle-carbonatée (UO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>3</sub>CO<sub>3</sub><sup>-</sup> qui le devient entre pH 6 et 7,5, tandis que l'espèce hydroxylée UO<sub>2</sub>(OH)<sub>3</sub><sup>-</sup> devient majoritaire au-delà d'un pH 7,5 (Fig. 8a). Pour une concentration en uranium 100 fois supérieure (30 µg L<sup>-1</sup>), ce qui englobe les concentrations relevées dans des sites impactés (*e.g.* mines), la distribution relative des espèces d'uranyle est modifiée (Fig. 8b). La principale différence est la dominance de l'espèce (UO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>3</sub>CO<sub>3</sub><sup>-</sup> pour des pH allant de 5 à 8,5 (Markich 2002).

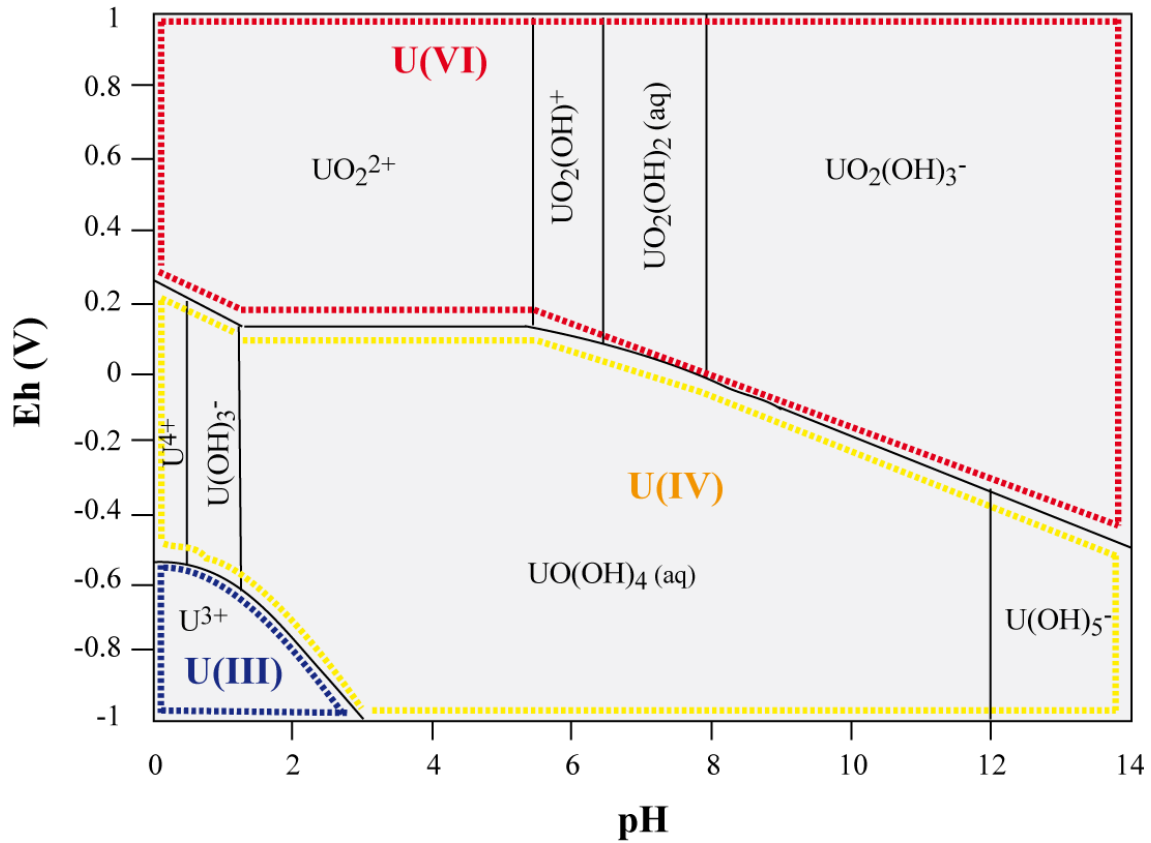


Figure 7 - Formes chimiques stables de l'uranium sous différentes conditions de pH et de Eh. Diagramme construit pour le système U-O-H, servant de première approximation pour prédire la spéciation et la mobilité de l'uranium dans les sols et les sédiments, pour une activité en  $[UO_2]_T$  de  $10^{-6}$  M à 25°C (modélisation JCHESS, d'après Denison 2004).

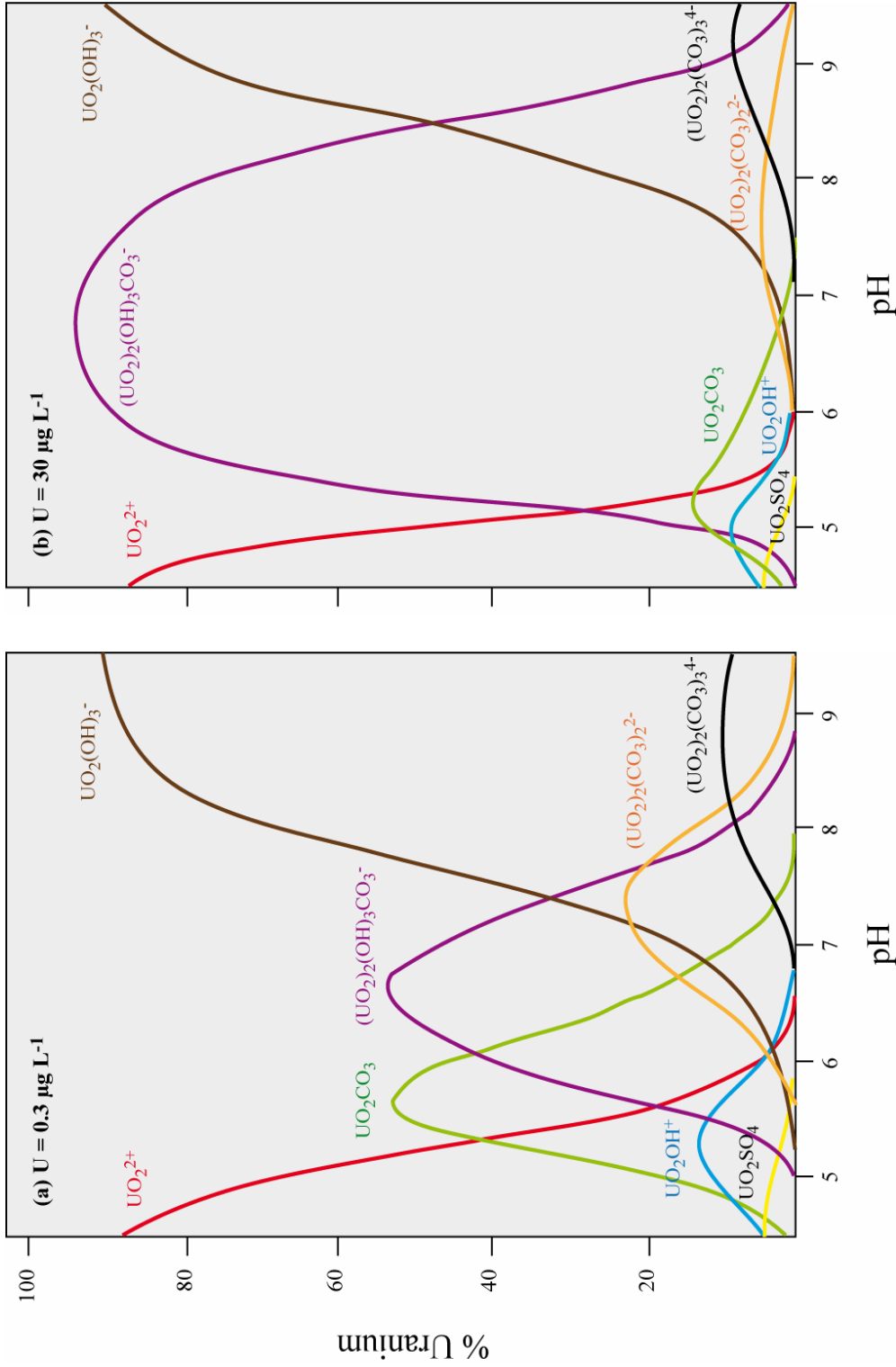


Figure 8 - Distribution de l'uranium en fonction du pH (4,5 à 9,5) pour un modèle d'eau douce à (a) 0,3  $\mu g L^{-1}$  et (b) 30  $\mu g L^{-1}$  sans substances humiques. Par clarté, les formes représentées à moins de 2% ne sont pas rapportées. Spéciation modélisée par HARPHRO pour la composition ionique d'une rivière australienne (carbonates : 40  $mg L^{-1}$ , sulfates : 9,4  $mg L^{-1}$ , chlorures : 5,1  $mg L^{-1}$ , force ionique : 0,002 M), à 25°C (d'après Markish 2002).



L'ion uranyle peut également se complexer avec des phosphates, des oxy-hydroxydes, des fluorures, des chlorures et des substances organiques comme les acides humiques et fulviques (Grenthe et al. 1992, Ragnarsdottir & Charlet 2000).

L'adsorption joue également un rôle-clé dans la distribution de l'uranium au sein des milieux d'eau douce (Curtis et al. 2006). L'adsorption sur des minéraux argileux (*e.g.* smectite ou montmorillonite) à un  $\text{pH} < 5$ , et sur des oxy-hydroxydes de fer et d'aluminium, sur la silice, et sur les surfaces biotiques à des pH plus élevés, réduit la mobilité de l'uranium (Kohler et al. 1996, Pabalan et al. 1998, Payne et al. 1998). Il en est de même pour l'adsorption sur la matière organique insoluble ou particulaire (Pompe et al. 1996). Il est généralement établi que l'adsorption particulaire augmente avec le pH jusqu'à un certain seuil (Willett & Bond 1995), qui varie selon la concentration en uranium, l'adsorbant, les ions en compétition (*e.g.* carbonates), les agents chélateurs et la force ionique (Dzombak & Morel 1990). Dans les eaux de surface, pour un pH 6 à 8, la solubilité des minéraux d'U(VI) est proche de son minimum (Gascoyne 1992) et l'adsorption de l'uranyle sur les acides humiques et fulviques est proche de son maximum (Choppin 1989).

**Les formes uranyles sont les formes les plus solubles et donc les plus mobiles de l'uranium. Par conséquent, elles sont souvent considérées comme les plus biodisponibles et leur présence dans les écosystèmes constitue un risque potentiel pour les biocénoses** (Colle et al. 2001).

Bien que la relation entre spéciation et biodisponibilité soit relativement complexe à établir, la majorité des modélisations thermodynamiques s'accorde pour considérer  $\text{UO}_2^{2+}$  et  $\text{UO}_2\text{OH}^+$  comme les formes dominantes de l'U(VI) disponible pour les organismes aquatiques, plutôt que l'uranium fortement complexé (*e.g.* fulvate d'uranyle) ou adsorbé à la matière colloïdale ou particulaire. Les complexes d'U(VI) avec des ligands inorganiques (*e.g.* phosphates ou carbonates) et des substances humiques réduisent apparemment la biodisponibilité de l'uranium en réduisant l'activité de  $\text{UO}_2^{2+}$  et  $\text{UO}_2\text{OH}^+$  (Markich 2002).

En milieu réducteur (eau anoxique), l'uranium est réduit en U(V) et U(IV). La forme U(V) étant instable, l'U(IV) est la forme prédominante. Celle-ci s'hydrolyse pour un pH proche de 1 et a une très faible solubilité, et donc une très faible mobilité, pour une gamme de pH proche de la neutralité, comme c'est le cas dans la plupart des eaux de surface (Kim 1986). L'uranium peut alors précipiter sous forme d'oxydes insolubles (*e.g.* uranite, uraninite,

schoepite) ou être adsorbé à la surface des particules en suspension (Ueda et al. 2003). Cependant, pour des  $\text{pH} > 8$ , il peut se former des complexes solubles d'U(IV) avec des carbonates (*e.g.*  $\text{U}[\text{CO}_3]_3^{2-}$  et  $\text{U}[\text{CO}_3]_5^{6-}$ ) et de la MO dissoute, si les concentrations sont suffisamment élevées (Kim 1986).

### **1.2.2.2 Diagenèse précoce de l'uranium**

Le comportement géochimique de l'uranium dans les sédiments superficiels, et donc la présence de formes plus ou moins toxiques, sont directement liés à son état d'oxydation (IV ou VI), la chimie des phases aqueuses et solides, les phénomènes d'adsorption et les transformations biogéochimiques liées à la diagenèse précoce. Sa mobilité est ainsi contrôlée par les interactions physico-chimiques qui s'opèrent entre les phases aqueuses (eau surnageante et eau interstitielle) et les phases solides (organiques et minérales) en fonction des conditions locales.

Dans les milieux d'eau douce, où la colonne d'eau est généralement oxygène, l'uranium peut arriver au niveau de l'interface eau/sédiment, soit sous une forme dissoute (ion uranyle libre ou complexé) et va alors diffuser dans le sédiment, soit lié à la matière en suspension qui sédimente. Dans ce dernier cas, différents types d'associations sont possibles (Forstner & Wittmann 1981): comme les autres métaux, l'uranium peut être (i) intégré dans la structure cristalline des minéraux, (ii) intégré à la MO (fèces, débris animaux et végétaux), (iii) précipité ou coprecipité (*e.g.* avec des carbonates, des phosphates, des oxydes de Fe et de Mn, des sulfures), ou (iv) adsorbé sur les particules (*e.g.* argiles, MO, oxydes de Fe et Mn).

Au cours de son incorporation au sédiment, l'uranium va « traverser » les différents fronts d'oxydo-réduction mis en place par les micro-organismes qui dégradent la MO (cf. paragraphe 1.1). Il va alors subir différents types de transformations biogéochimiques qui vont jouer sur ses transferts entre les différents compartiments biotiques et abiotiques.

De façon générale, pour tous les éléments métalliques, quatre grands groupes de réactions chimiques interviennent: complexation / dissociation, oxydation / réduction, adsorption / désorption et dissolution / précipitation (Nagao et al. 2002).

Dans la zone oxygène du sédiment, l'uranium est sous la forme uranyle, complexée ou non, qui est soluble et donc mobile. Plus bas dans la colonne sédimentaire, le milieu devenant de

plus en plus réducteur, l'uranium va être réduit en U(IV) et va tendre à s'accumuler et à être immobilisé dans les couches plus profondes par précipitation (formation d'oxydes insolubles : *e.g.* uraninite, schoepite) et par adsorption sur des sulfures (*e.g.* FeS, MnS) ou sur des minéraux authigènes (Lovley et al. 2004). Ce processus de réduction peut également être réalisé de façon biotique par des bactéries métallo-réductrices, ce qui est exploité depuis plusieurs années dans des programmes de bioremédiation de sites contaminés, où l'immobilisation de l'uranium dans les sédiments est augmentée par un amendement organique (cf. paragraphe 1.2.2.5). Cependant, des perturbations peuvent survenir dans cette stratification verticale du sédiment et la modifier (*e.g.* remise en suspension lors de crues, bioturbation). Ainsi, l'uranium peut être ré-oxydé de façon abiotique par la pénétration d'oxygène dans des couches de sédiment préalablement anoxiques, ce qui va donc à nouveau le resolubiliser et le remobiliser vers l'eau interstitielle et la colonne d'eau. L'oxydation biotique de l'U(IV) immobilisé peut également être possible dans certains cas où la dénitrification ou la sulfato-réduction ont lieu en présence de minéraux de Fe(III) (Wu et al. 2007, Wall & Krumholz 2006).

### **1.2.2.3 Origine de l'uranium dans les eaux continentales**

Les milieux aquatiques continentaux sont des écosystèmes particulièrement exposés à la contamination par l'uranium et par les métaux en général. Ils constituent en effet des sites d'accumulation des polluants par leur rôle de réceptacle des eaux de pluies, des eaux de drainage, des eaux usées et des rejets industriels et agricoles. L'utilisation de l'uranium par l'homme depuis les années 1920, en tant que combustible nucléaire (mines et centrales nucléaires) et pour la fabrication d'armes militaires, a conduit à une contamination des milieux naturels dans de nombreux sites à travers le monde (*e.g.* Baborowski & Bozau 2006, Antunes et al. 2007, Saari et al. 2007). A cela, il faut ajouter une contamination plus discrète, liée au relargage de quantités traces d'uranium venant de :

- la combustion du charbon qui relargue dans l'atmosphère divers radionucléides et dont l'usage domestique est encore très important à l'échelle mondiale,
- l'usage agricole d'engrais et de compléments alimentaires phosphatés issus de phosphates naturels riches en uranium,
- et toutes les applications militaires, scientifiques et médicales de l'uranium appauvri vues précédemment (Markich 2002).

#### **1.2.2.4 Contamination des sédiments**

Malgré la forte solubilité de l'uranium dans les eaux de surface (Cowart & Burnett 1994), ceux sont les sédiments qui présentent les plus fortes charges dans les écosystèmes d'eau douce (Hynes 1990). Compte-tenu de son comportement biogéochimique dans les sédiments, *i.e.* réduction vers une forme U(IV) peu soluble, l'uranium tend, comme la plupart des métaux, à s'accumuler dans ce compartiment (Ribera et al. 1996).

Alors qu'on estime les concentrations naturelles constituant le bruit de fond géochimique naturel dans les sédiments d'eau douce inférieures à  $10 \mu\text{g U g}^{-1}$  poids sec, des valeurs bien supérieures (jusqu'à près de  $20\ 000 \mu\text{g U g}^{-1}$ ) ont été relevées dans différents sédiments impactés par l'activité minière actuelle ou passée (Tableau 7). Dans ce dernier cas, c'est essentiellement au niveau des sédiments que se manifeste encore l'influence minière, les eaux surnageantes ne présentant plus de teneurs en uranium remarquables après quelques années.

A titre d'exemple, un rapport récent de l'IRSN (2007), constituant une expertise de l'impact d'une ancienne mine d'uranium exploitée par AREVA dans le Limousin jusqu'en 1995, montre que dans les sédiments des cours d'eau et étangs en amont du site, les concentrations en uranium sont comprises entre 2,4 et  $122 \mu\text{g U g}^{-1}$  tandis qu'elle atteignent des valeurs maximales de 13, 81, 444 et  $5160 \mu\text{g U g}^{-1}$  dans les ruisseaux, rivières, lacs et étangs, respectivement, en aval de la mine. Par contre, 12 années après la fin de l'exploitation, les eaux de surface ne présentent plus de marquage significatif de l'impact minier.

**Tableau 7 - Tableau non exhaustif des concentrations en uranium considérées comme naturelles (sites non impactés) en comparaison avec des concentrations maximales relevées à proximité de mines d'uranium (sites impactés).**

Pays	[U] $\mu\text{g g}^{-1}$	Références
<b>Sites non impactés</b>		
Albanie	0,65-2,18	(Tsabaris et al. 2007)
Algérie	0,89-2,02	(Benamar et al. 1997)
Italie	3,39-5,65	(Doretto et al. 1992)
Turquie	1,29-9,11	(Lambrechts et al. 1992)
France	0,73-5	(Kurnaz et al. 2007)
<b>Sites impactés (valeurs maximales)</b>		
Canada	110	(Swanson 1985)
Australie	450	(Lottermoser et al. 2005)
Espagne	810	(Lozano et al. 2002)
Canada	~1000	(McKee et al. 1987)
Canada	~3000	(Joshi et al. 1989)
France	5160	(IRSN 2007)
Canada	5650	(Neame et al. 1982)
Canada	18000	(Hart et al. 1986)

### 1.2.2.5 Bioremédiation des eaux de surface contaminées

Depuis la découverte de Lovley et al. (1991), mettant en évidence la capacité de certaines bactéries métallo-réductrices à réduire l'uranium, l'inventaire des microorganismes capables de réaliser cette bioréduction ne cesse d'augmenter (*e.g.* bactéries des genres *Geobacter*, *Desulfovibrio*, *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, Wall & Krumholz 2006). De nombreux efforts ont permis de mettre en place des programmes de bioremédiation des eaux de surface dans différents sites contaminés, notamment en Amérique du Nord (cf. revues de Wall & Krumholz 2006, Wilkins et al. 2006, Renshaw et al. 2007). Le principe de ces opérations est relativement simple : grâce à l'ajout de donneurs d'électrons (*e.g.* glucose, éthanol, acétate), les processus de bioréduction incluant celle des radionucléides, sont favorisés. Ceci permet le passage de formes mobiles avec des états d'oxydation élevés vers des formes immobiles qui vont être piégées par les sédiments.

Cependant, compte-tenu de la complexité de la chimie de l'uranium dans l'environnement naturel, de nombreux travaux sont menés actuellement pour assurer sa persistance à l'état réduit dans les sédiments. Par exemple, près du site d'*Old Rife* aux Etats-Unis, où des déchets radioactifs se sont dispersés dans le fleuve Colorado, il a été possible de diminuer la teneur en uranium des eaux de surface en seulement 9 jours après un amendement d'acétate. Après 50 jours, les valeurs sont passées de 216-405  $\mu\text{g L}^{-1}$  à moins de 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Mais, après quelques temps, la sulfato-réduction est devenue dominante dans les sédiments entraînant une réaugmentation des concentrations en uranium dans l'eau (Renshaw et al. 2007). Ceci illustre combien il est difficile de maintenir le système avec des conditions favorables pour les bactéries Fe(III)-réductrices. Il a également été montré que, contrairement à l'uranite naturelle (pechblende  $\text{UO}_2$ ) qui est très stable dans les sédiments anoxiques, les produits néoformés par bioréduction de l'uranium constituent un matériel de petite taille, peu cristallin, amorphe et en phase hydratée (oxydes hydrés) qui continue à évoluer chimiquement et structurellement. Les effets dans le temps sont donc importants. Une fois que la phase active de bioréduction en subsurface a cessée, il reste à comprendre l'éventualité de nouvelles réactions rédox, pouvant être associées ou non avec un retour en conditions oxydantes (*e.g.* par remise en suspension ou bioturbation), qui entraîneraient la redissolution de contaminants précipités. De nombreuses expériences d'amendements *in situ* ou utilisant des cultures pures en laboratoire ont ainsi permis de décrire les mécanismes possibles pour expliquer la réoxydation de l'U(IV) (Finneran et al. 2002, Senko et al. 2002, Beller 2005,

Frazier et al. 2005, Gu et al. 2005, Senko et al. 2005a, Senko et al. 2005b). Parmi ceux-ci, les nitrates  $\text{NO}_3^-$ , qui sont souvent associés à l'U(VI) dans les sites contaminés, peuvent entraîner l'oxydation de l'U(IV) (Finneran et al. 2002, Senko et al. 2002). La bactérie *Geobacter metallireducens* est par exemple capable d'oxyder directement Fe(II) ou U(IV) avec  $\text{NO}_3^-$  comme accepteur d'électrons (Finneran et al. 2002). D'autres travaux montrent l'oxydation rapide de l'U(IV) par interaction abiotique avec Fe(III) ou Mn(IV), qui servent d'accepteurs d'électrons en milieu réducteur (Senko et al. 2005a, Wan et al. 2005). Des conditions de sulfato-réduction sont également favorables à une réoxydation de l'U(IV) (Sani et al. 2005).

Des limites à la bioréduction existent aussi en amont du processus, comme notamment l'adsorption des ions uranyles sur certaines phases minérales (e.g. oxydes de Fe(III), argiles) qui réduisent l'accessibilité des microorganismes à l'uranium, et donc son éventuelle réduction (Renshaw et al. 2007).

Bien que tous ces travaux récents remettent en question la vision préalable de l'uranite  $\text{UO}_2(\text{s})$  comme un minéral stable et inerte, plus de 60% de l'uranium relargué dans l'environnement par l'accident de Tchernobyl est toujours piégé sous une forme solide U(IV), quinze années après (Mironov et al. 2002). Malgré les doutes existant sur la stabilité à long terme de l'U(IV), les connaissances acquises récemment permettent toutefois de faire des prédictions pour une gestion raisonnée de l'uranium rejeté par les activités humaines (Wu et al. 2005), et par extrapolation des autres actinides.

#### **1.2.2.6 Biodisponibilité et toxicité de l'uranium vis-à-vis des organismes vivant dans les sédiments d'eau douce**

Bien qu'il ait été montré, chez un bivalve, que l'uranium pouvait être « confondu » avec le calcium, un métal essentiel, par des récepteurs membranaires au niveau de la surface cellulaire (Markich 2002), cet élément n'est pas connu pour avoir un rôle dans les réactions biochimiques qui ont lieu normalement dans les organismes vivants (WHO 2004). En tant que métal lourd, l'uranium présente une toxicité chimique pour les organismes aquatiques. Du fait de sa faible activité spécifique ( $2,53 \cdot 10^4 \text{ Bq g}^{-1} \text{ U}$ ), on considère en revanche que sa radiotoxicité, bien qu'elle ne puisse pas être négligée, est relativement peu importante dans les écosystèmes d'eau douce (Thomas & Liber 2001, Kuhne et al. 2002, Zeman et al. 2008).

La toxicité de l'uranium va directement dépendre de sa biodisponibilité pour les organismes vivants. Comme vu précédemment, celle-ci est principalement liée à sa spéciation chimique, et ce sont les formes uranyles U(VI) qui présentent le plus grand risque pour les biocénoses (Colle et al. 2001). Ainsi, seule une fraction de la quantité totale de métal présent dans le compartiment sédimentaire est réellement biodisponible. Par ailleurs, les différents modes d'assimilation des organismes vont faire varier la prise biologique d'uranium. L'enjeu actuel visant à établir des seuils de toxicité pour les organismes aquatiques, et ainsi veiller à la préservation des écosystèmes, reposent donc sur une meilleure prédiction des interactions entre spéciation et biodisponibilité (Markich 2002).

D'une manière générale, on considère que la toxicité de l'uranium diminue avec l'augmentation du pH, de la dureté, de l'alcalinité (concentration en carbonates) ou de la présence de ligands organiques dans les phases aqueuses (Ribera et al. 1996, Ebbs et al. 1998, Franklin et al. 2000, Markich et al. 2000, Riethmuller et al. 2001, Charles et al. 2002, Borgmann et al. 2005, Sheppard et al. 2006, Zeman et al. 2008). Ceci reposerait sur une diminution de la biodisponibilité par compétition de l'ion uranyle avec les espèces cationiques, notamment les protons, présentes dans l'eau (Markich 2002).

Les macro-invertébrés dulçaquicoles, qui nous intéressent plus particulièrement dans ce travail de doctorat, peuvent coloniser les sédiments superficiels avec des densités parfois très fortes. Les communautés benthiques peuvent être également très diversifiées selon la qualité des sédiments et les conditions physico-chimiques rencontrées dans les différents types d'écosystèmes. Ces organismes *via* leur position intermédiaire dans le réseau trophique (consommateurs primaires ou secondaires, proies) et leur activité de bioturbation (cf paragraphe 1.3) ont un rôle majeur dans la structuration et le fonctionnement de l'écosystème benthique. Ils se concentrent préférentiellement dans les couches superficielles des sédiments, là où la MO est la plus abondante et l'oxygène disponible. Leur présence dans des sédiments contaminés à l'uranium, dans des zones où il est donc le plus mobile, peut ainsi avoir un effet important sur sa redistribution. Mais, ces organismes sont par là-même particulièrement exposés à l'uranium associé aux sédiments, que ce soit à certains stades (*e.g.* insectes hétérométaboles) ou sur la totalité de leur cycle de vie. Certaines activités (*e.g.* pompage d'eau dans des terriers creusés dans les sédiments) les exposent également à l'uranium dissous dans la colonne d'eau.



Cependant, bien que cela soit classiquement entrepris pour d'autres métaux lourds, peu d'études ont évalué l'écotoxicité de l'uranium vis-à-vis des macro-invertébrés benthiques par une exposition à un sédiment contaminé. Parmi celles-ci, on peut citer un rapport d'Environnement Canada (2003), avec une première étude qui concernait le taux de survie chez l'amphipode épibenthique *Hyaella azteca* après 14 jours d'exposition à un sédiment artificiel contaminé. Les valeurs de  $CL_{50}$  (i.e. concentration pour laquelle 50% des individus survivent) mesurées étaient de 57 et 436  $\mu\text{g U g}^{-1}$  sédiment (poids sec), pour des individus juvéniles et des individus adultes, respectivement. Les juvéniles se sont donc avérés beaucoup plus sensibles. Un deuxième bioessai a été réalisé sur la larve de diptère *Chironomus tentans* après 10 jours d'exposition. La toxicité de l'uranium était bien plus faible pour cet organisme, avec une  $CL_{50}$  de 10551  $\mu\text{g U g}^{-1}$ . Des effets sur la croissance ont également été rapportés dans cette étude ( $EC_{50}=2695 \mu\text{g U g}^{-1}$ ). Des résultats très différents ont été obtenus chez la larve de *Chironomus riparius* lors d'un bioessai de 10 jours où l'uranium a entraîné un effet significatif à partir d'une concentration de seulement 6,07  $\mu\text{g U g}^{-1}$  ( $CL_{50}=5,30 \mu\text{g U g}^{-1}$ ) sur la survie, et à partir d'une concentration de 2,97  $\mu\text{g U g}^{-1}$  sur la croissance. Des retards de développement ainsi que des déformations des pièces buccales ont également été observés (Dias et al. 2008). Les derniers résultats obtenus par ces auteurs (Dias et al. non publiés) confirment la grande variabilité des réponses d'écotoxicité de l'uranium suivant les conditions. En effet, en renouvelant leurs mesures sur une autre souche de *Chironomus riparius*, avec une eau de composition différente dans les aquariums, la mortalité n'a été significative qu'à partir de 512  $\mu\text{g U g}^{-1}$  ( $CL_{50}=562 \mu\text{g U g}^{-1}$ ), et l'inhibition de croissance qu'à partir de 256  $\mu\text{g U g}^{-1}$ .

Une autre étude concerne également *Chironomus riparius*, et son utilisation en tant que modèle biologique dans la bioévaluation (*bioassessment*) d'effluents et de sédiments naturels provenant d'un site contaminé proche d'une ancienne mine d'uranium au Portugal (Antunes et al. 2007a). Les auteurs de cette étude ont montré que la toxicité de l'uranium pour cette espèce d'invertébrés était principalement liée à la colonne d'eau qui présentait un pH assez faible, tandis que les sédiments ne se sont pas avérés toxiques, suggérant une faible biodisponibilité de l'uranium et des autres métaux dans ce compartiment. Par contre, dans la bioévaluation de sédiments contaminés en Australie, d'autres auteurs ont relevé une toxicité significative des sédiments sur l'espèce *Chironomus crassiforceps*. L'acidité et la forte teneur en sulfates des sédiments semblent avoir favorisé la biodisponibilité de l'uranium dans ce cas-là (Peck et al. 2002). A noter que ces auteurs ont également mesuré une toxicité de l'uranium

accrue avec une augmentation du pH au cours d'un bioessai avec de l'eau contaminée ( $CL_{50}=36 \text{ mg L}^{-1}$  à pH 6,  $CL_{50}=58 \text{ mg L}^{-1}$  à pH 4), ce qui s'oppose aux observations faites par d'autres auteurs (*e.g.* Markich et al. 2000, Fournier et al. 2004), et illustre encore une fois la difficulté d'établir des modèles spéciation/biodisponibilité/toxicité pour l'uranium (Markich 2002).

Enfin, il reste à citer une étude d'encagement *in situ*, dans deux lacs contaminés, proches d'une mine d'uranium au Canada (Robertson & Liber 2007). En comparaison avec deux sites contrôles, la mortalité de *Hyaella azteca* était significativement plus élevée dans ces deux lacs. Grâce à des encagements dans la colonne d'eau et des encagements en contact avec le sédiment, ces auteurs ont montré par ailleurs que l'eau constituait la voie d'exposition majeure pour cette espèce.

Ces quelques données montrent que l'uranium présent dans des sédiments contaminés peut effectivement entraîner des effets négatifs sur les macro-invertébrés mais elles restent insuffisantes pour établir des comparaisons de toxicité avec d'autres métaux lourds et surtout il est très difficile d'interpréter les différences de biodisponibilité et de toxicité liées aux caractéristiques physico-chimiques des sédiments et aux méthodologie employées (*e.g.* bioessais standardisés vs bioévaluation de sédiment naturel contaminé) entre ces travaux. Pourtant, comme cela a été démontré dans une étude *in situ* sur un site contaminé proche d'une ancienne mine d'uranium aux Etats-Unis, les macro-invertébrés benthiques représentent des bioindicateurs sensibles pour évaluer l'impact de telles activités sur les écosystèmes d'eau douce (Peterson et al. 2002). De même, Thomas & Liber (2001) ont montré en laboratoire que les doses radioactives délivrées par des sédiments contaminés venant de sites proches de mines au Canada, étaient significatives chez *Chironomus tentans* et *Hyaella azteca*. Il apparaît donc pertinent de continuer à mener des tests d'écotoxicologie sur les macro-invertébrés vivant dans les sédiments et d'élargir ces travaux à d'autres groupes taxonomiques de la communauté benthique tels que les Annélides ou les Mollusques qui peuvent également être fortement représentés, même dans des sites pollués. Enfin, la plupart des travaux cités précédemment ont testé les effets de l'uranium sur le seul critère de la mortalité. Pour une meilleure évaluation du risque, il apparaît important de prendre plus largement en compte des critères d'effets sub-létaux (*e.g.* malformations, retard de croissance) dans les futures recherches.

Concernant les autres groupes d'organismes présents dans les écosystèmes aquatiques, il sera simplement noté :

- qu'il existe d'avantage d'études concernant des macro-invertébrés, benthiques et pélagiques, exposés à de l'eau contaminée (*e.g.* Poston et al. 1984, Markich et al. 2000, Kuhne et al. 2002b, Peck et al. 2002, Fournier et al. 2004, Borgmann et al. 2005, Antunes et al. 2007a, Antunes et al. 2007b, Robertson & Liber 2007, Zeman et al. 2008).
- qu'aucune donnée n'est disponible sur la toxicité de l'uranium vis-à-vis des invertébrés méiofauniques. Diverses études ont cependant montré que ces organismes peuvent être sensibles aux métaux lourds (Coull & Chandler 1992, Austen & Mc Evoy 1997, Gyedu-Ababio & Baird 2006, Heininger et al. 2007), ce qui laisse supposer un effet potentiel de l'uranium.
- que malgré les nombreuses investigations menées pour comprendre les interactions entre l'uranium et les micro-organismes (Renshaw et al. 2007), il est rarement rapporté des effets négatifs de l'uranium chez les bactéries (*e.g.* (Joner et al. 2007). Il semblerait cependant que sa toxicité soit relativement faible en comparaison avec d'autres métaux lourds (Nies 1999). Il a même été montré des cas de tolérance (Joner et al. 2007) et de résistance à l'uranium mettant en jeu des processus de détoxification tels que l'accumulation intra-cytoplasmique de granules d'uranium lié à des phosphates (Suzuki & Banfield 2004).
- que l'uranium peut également entraîner des effets négatifs chez les plantes aquatiques (*e.g.* Ebbs et al. 1998, Sheppard et al. 2006) ainsi que chez les organismes pélagiques comme les amphibiens (Mitchell et al. 2005) ou les poissons (*e.g.* mortalité, effets génotoxiques, bioaccumulation) (*e.g.* Poston 1982, Sheppard et al. 2006, Barillet 2007), mais que sa toxicité reste modérée en comparaison avec d'autres métaux lourds.

### **1.2.3 CONCLUSION**

Alors que l'uranium était naturellement incorporé dans des compartiments isolés de la géosphère depuis des milliards d'années, et qu'il n'était présent qu'en faible quantité dans les milieux plus ouverts, son exploitation par l'homme depuis près d'un siècle, a largement contribué à sa redistribution dans l'environnement. Aujourd'hui de nombreux travaux sont menés afin de comprendre la physico-chimie complexe de cet élément et de trouver des stratégies de bioremédiation des milieux contaminés, d'autant plus que son impact écotoxicologique est encore assez mal connu.

### **1.3 RÔLE DE LA BIOTURBATION DES MACRO-INVERTÉBRÉS BENTHIQUES**

#### **1.3.1 BIOTURBATION : DÉFINITION ET CARACTÉRISATION**

La bioturbation se définit comme l'ensemble des perturbations induites par l'activité des organismes vivant à la surface (épibenthiques) et dans le sédiment superficiel (benthiques) (Rhoads 1974). Elle concerne différents groupes d'espèces animales (macro-invertébrés, méio-invertébrés et vertébrés) et végétales (développement racinaire des plantes aquatiques supérieures) ainsi que des micro-organismes (bactéries, champignons, micro-algues). La littérature montre que la majorité des travaux sur la bioturbation s'intéressent essentiellement aux perturbations liées à la macrofaune ou aux poissons vivants sur le fond. Compte-tenu du sujet de cette thèse, la bibliographie présentée ici se limitera donc aux macro-invertébrés et se concentrera plus particulièrement sur les écosystèmes d'eau douce.

Dans les sédiments dulçaquicoles, les différents taxons de macro-invertébrés rencontrés sont :

- des larves d'insectes (*e.g.* Trichoptères, Epheméroptères, Diptères)
- des Mollusques (Bivalves, Gastéropodes)
- des Crustacés (Amphipodes, Isopodes, Ecrevisses)
- et des Annélides (Oligochètes, Achètes).

Les densités et les abondances relatives de ces groupes de macro-invertébrés dans les différents types d'écosystèmes aquatiques continentaux (*e.g.* torrents, rivières, fleuves, lacs) sont liées aux caractéristiques physico-chimiques des habitats, principalement à la granulométrie des sédiments et à la nature de la MO disponible (*'River Continuum Concept'*, Vannote et al. 1980), ainsi qu'à la qualité des eaux de surface. L'analyse des communautés d'invertébrés benthiques est notamment utilisée pour évaluer la qualité des milieux (*e.g.* IBGN 'Indice Biologique Global Normalisé').

La bioturbation de ces organismes est liée à l'ensemble de leurs activités comportementales dans la colonne sédimentaire. Ceci regroupe leurs déplacements, la recherche de nourriture, leurs modes alimentaires et leurs mécanismes respiratoires, dont les

manifestations les plus facilement observables sont: (i) le creusement de galeries et de terriers (structures biogènes), (ii) la formation de sillons à la surface du sédiment, (iii) l'ingestion de particules sédimentaires (microphagie ou *deposit-feeding*), (iv) la production de fèces, (v) l'excrétion de déchets métaboliques, et (vi) la circulation d'eau dans les galeries (irrigation). Les macro-invertébrés colonisent surtout les couches superficielles des sédiments où la MO est la plus abondante et la plus fraîche, et l'oxygène le plus disponible, mais ils peuvent également pénétrer assez profondément dans le sédiment (Gérino 1992, Gérino et al. 1999).

Selon les effets que la bioturbation entraîne sur la dynamique sédimentaire, on classe les macro-invertébrés en 5 grands groupes fonctionnels (François 1999, Gérino et al. 2003) (Fig. 9):

- *Biodiffuseurs* : ce groupe rassemble des espèces qui déplacent de façon aléatoire les particules de sédiment en surface, sur de courtes distances, de l'interface vers la profondeur maximale de mélange. Ceci génère un transport diffusif par homogénéisation des premiers centimètres de sédiment. C'est par exemple le cas des Amphipodes (Robbins 1982).

- *Bioconvoyeurs vers le haut* : ce groupe rassemble des espèces qui s'orientent verticalement dans le sédiment, avec la partie antérieure vers le bas. Ces organismes déplacent les particules de sédiment depuis des zones profondes (souvent réduites) et les expulsent au niveau de l'interface eau/sédiment *via* un passage par le tractus digestif. A ce transport 'actif' du sédiment du bas vers le haut s'ajoute un transport 'passif' tout autour des organismes, de l'interface vers la zone d'ingestion, dû à la continuité du dépôt sédimentaire et à l'affaissement de la colonne sédimentaire dans la cavité d'ingestion. Ce mode de mélange est classiquement observé chez les Oligochètes Tubificidae (*e.g.* Fisher et al. 1980, Matisoff et al. 1999, Mermillod-Blondin et al. 2002).

- *Bioconvoyeurs vers le bas* : inversement, ce groupe rassemble des espèces qui s'orientent verticalement dans le sédiment, avec la partie antérieure vers le haut. Les particules de sédiment sont ainsi transportées de façon active de l'interface eau/sédiment vers une zone d'éjection en profondeur. Ce type de bioconvoyage n'a été décrit que pour des invertébrés marins (*e.g.* Sipunculidae, Smith et al. 1986).

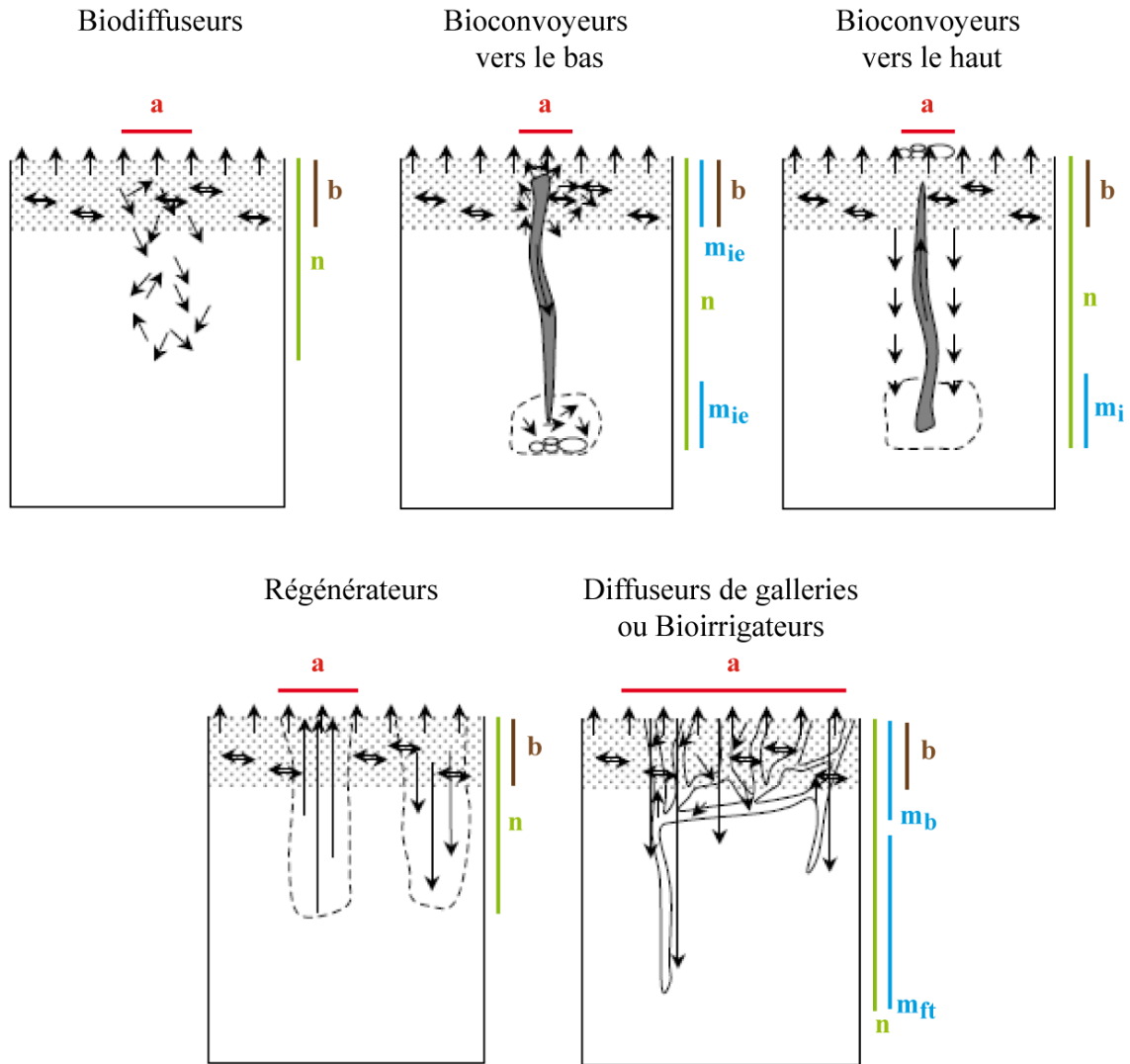


Figure 9 - Représentation schématique des mécanismes de remaniement physique et biologique induits par les différents groupes fonctionnels de macro-invertébrés bioturbateurs, avec  $a$  = largeur de la zone de mélange,  $n$  = profondeur de la zone de mélange,  $m_{ie}$  = hauteur de la zone d'ingestion/excrétion,  $m_i$  = hauteur de la zone d'ingestion,  $m_{ft}$  = profondeur du fond des galeries,  $m_b$  = profondeur de diffusion,  $b$  = profondeur initiale de la matrice utilisée pour la modélisation du transport. Les flèches représentent le mouvement des particules de sédiment (d'après François et al. 2001).

- Diffuseurs de galeries ou Bioirrigateurs : ce groupe rassemble les espèces qui creusent dans le sédiment des réseaux de galeries, des tubes ou des terriers, qui vont être irrigués par un pompage actif de l'eau surnageante. Ce mode de bioturbation entraîne un mélange pseudo-diffusif dans la zone où le réseau de structures biogènes est dense, et un transport advectif à double sens entre l'interface eau/sédiment et le fond des tubes, dû aux mouvements des organismes et à l'éjection de fèces (transports 'non-local' et 'non-local inverse'). En eau douce, ce mode de bioturbation est par exemple décrit chez les larves de Chironomes et d'Ephémères (e.g. Matisoff & Wang 1998). Chez beaucoup d'espèces, les larves se maintiennent dans des terriers en forme de tube, avec une ou les deux extrémités ouvertes vers la colonne d'eau, dans lesquels elles créent un courant d'eau, de façon plus ou moins intermittente.

- Régénérateurs : ce dernier groupe concerne les espèces fousseuses qui creusent des terriers avec une large ouverture à l'interface eau/sédiment. Ce comportement entraîne un mélange biodiffusif avec une expulsion massive de sédiment pendant le creusement (phase active) et un affaissement du sédiment de surface vers le fond du terrier après son abandon (phase passive). Ce mode de mélange a été décrit en milieu marin, chez le crabe violoniste (*Uca pugnax*) (Gardner et al. 1987), mais doit vraisemblablement s'appliquer au cas de certaines espèces d'Ecrevisses en eau douce, comme l'espèce invasive *Procambarus clarkii* (ou Ecrevisse de Louisiane) connue pour creuser activement des terriers qu'elle abandonne ensuite et qui se collapsent (Barbaresi et al. 2004).

De nombreuses études ont permis de décrire ces différents modes de bioturbation dans les sédiments marins et dulçaquicoles, à la fois *in situ* et en laboratoire, grâce à l'utilisation de traceurs dissous et particulaires, dont la migration verticale dans la colonne sédimentaire a été suivie dans le temps.

Ces traceurs peuvent être naturellement présents dans les sédiments, comme l'oxygène dissous, certains radionucléides ou des pigments naturels (e.g. Berg et al. 2001, Sun & Torgersen 2001, Landrum et al. 2004), ou bien être délibérément ajoutés dans le système, comme des billes de verre, des particules fluorescentes, du bromure, des métaux ou des micro-algues marquées avec un isotope radioactif (e.g. Wheatcroft et al. 1994, Blair et al. 1996, Gérino et al. 1998, Meysman et al. 2006). L'analyse des changements spatio-temporels des profils verticaux de ces traceurs permet ainsi de quantifier l'intensité de la bioturbation.



Grâce à des simulations avec des modèles mathématiques, des coefficients de biotransport (ou bioadvection) et de biodiffusion peuvent ainsi être calculés. Ceci permet de comparer de façon quantitative la bioturbation entre différentes espèces d'invertébrés ou d'évaluer, par exemple, l'impact d'un polluant (*e.g.* Ciutat et al. 2005, Fernandes et al. 2006) ou de la compétition avec une autre espèce. De plus, l'intégration de ces paramètres a permis d'améliorer considérablement les modèles de diagenèse précoce préexistants, qui tenaient compte uniquement de paramètres physico-chimiques (Boudreau 1997).

A titre d'exemple, la figure 10 illustre les principaux modes de bioturbation existant en eau douce, mis en évidence grâce à des traceurs dissous ( $^{137}\text{Cs}$ ) ou des traceurs particulaires (luminophores) initialement déposés en surface des sédiments (*e.g.* Robbins et al. 1979, Fisher et al. 1980, Matisoff et al. 1999, Matisoff & Wang 2000, Mermillod-Blondin et al. 2002).

On peut également noter que l'observation de la bioturbation a été particulièrement améliorée ces dernières années grâce à l'utilisation de techniques d'imagerie, comme les rayons X et la tomodesitométrie (*e.g.* Charbonneau & Hare 1998, Charbonneau et al. 1998, De Montety et al. 2003, Mermillod-Blondin et al. 2003, Dufour et al. 2005, Ciutat et al. 2006) ou des caméras à haute résolution (Gilbert et al. 2003, Solan et al. 2004, Duport et al. 2006, Maire et al. 2007). Celles-ci permettent le déploiement de protocoles expérimentaux non-invasifs, à la fois en laboratoire, mais aussi *in situ*, qui continuent à apporter des données essentielles pour comprendre et quantifier la bioturbation.

A partir de cette vision macroscopique de la bioturbation, qui montre comment la macrofaune peut remanier les sédiments de surface et jouer sur les processus de diffusion et de transport, il apparaît évident que ces phénomènes vont entraîner des modifications plus ou moins importantes des propriétés physiques, chimiques et biologiques des sédiments superficiels, et donc vont avoir une influence sur les processus de diagenèse précoce et sur le comportement des métaux.

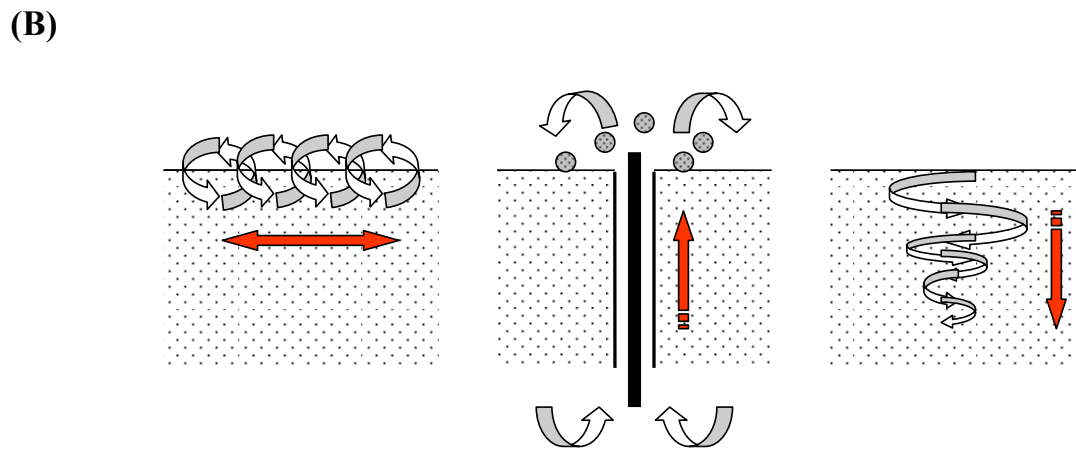
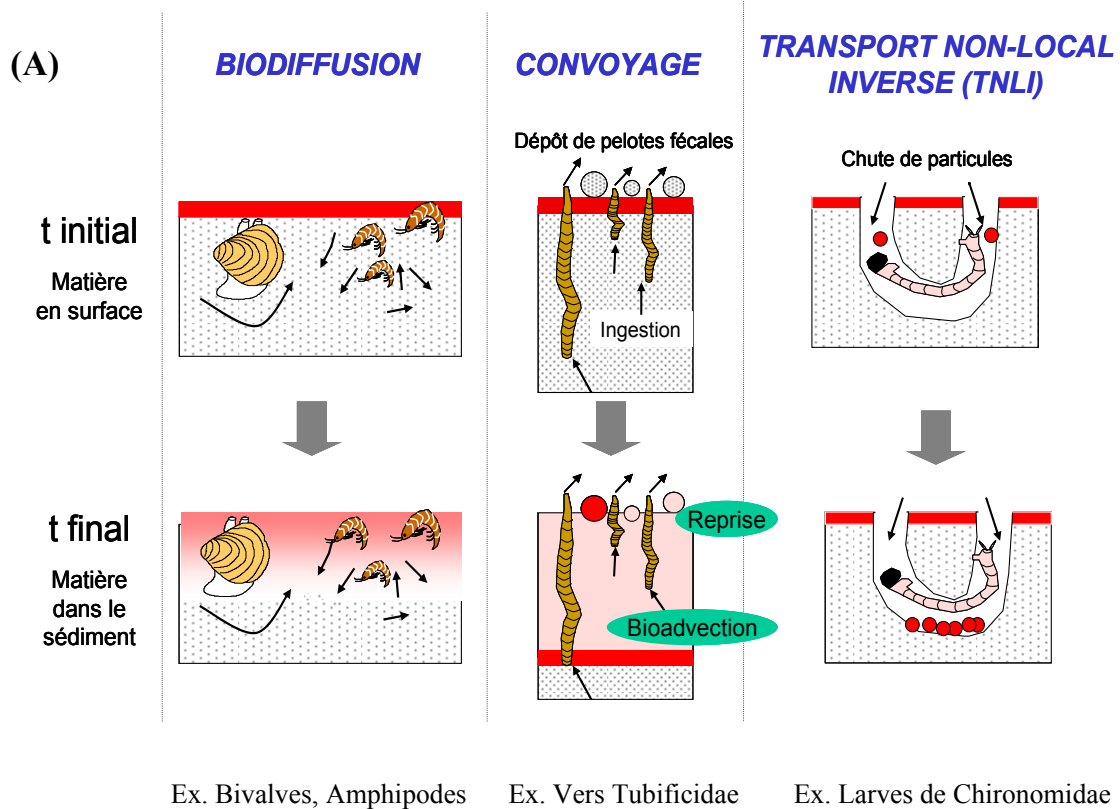


Figure 10 – (A) Déplacement d'une couche de traceurs particulaires (en rouge) disposée à la surface du sédiment en fonction des différents modes de bioturbation des macro-invertébrés benthiques dulçaquicoles (auteur : Gérino, com pers); (B) Schématisation du transport particulaire dans les sédiments d'eau douce (d'après Hakanson & Jansson 1983).

## **1.3.2 CONSÉQUENCES DE LA BIOTURBATION SUR LA BIOGÉOCHIMIE DES SÉDIMENTS SUPERFICIELS**

### **1.3.2.1 Introduction**

Comme vu précédemment, la bioturbation entraîne un mélange et un brassage des particules du sédiment superficiel ainsi qu'un transport de l'eau interstitielle et des solutés qui lui sont associés (Matisoff 1995, Ketterer et al. 2000, Sun & Torgersen 2001). Il en résulte une hétérogénéité spatiale, verticale et horizontale, des sédiments (Mermillod-Blondin et al. 2003), sur des profondeurs excédant parfois plusieurs décimètres en eau douce (Robbins 1982), à plusieurs mètres en milieu marin (Gérino 1992). Ces mécanismes vont donc engendrer d'importantes modifications physiques, chimiques, minéralogiques et biologiques dans le sédiment qui vont avoir une action sur les flux de certains composés chimiques dont les métaux comme l'uranium.

Depuis les années 60, et plus particulièrement depuis les travaux pionniers de Rhoads (1974), un nombre considérable de recherches scientifiques ont permis de décrire et de modéliser la bioturbation et ses conséquences sur les propriétés des sédiments marins et dulçaquicoles. Pour illustrer ce propos et à titre d'exemple, 1 684 références sont répertoriées à ce jour (avril 2008) sur le moteur de recherche SCOPUS ([www.scopus.com](http://www.scopus.com)) pour les mots '*bioturbation +sediments*'. L'objectif de ce paragraphe est de rapporter les principales conséquences de la bioturbation sur les propriétés physiques, chimiques et biologiques des sédiments en citant des références-clefs et/ou relatives au milieu d'eau douce.

### **1.3.2.2 Conséquences physiques**

Parmi les effets directs de la bioturbation, le déplacement des organismes entraîne une remise en suspension et une décohésion des particules de sédiment qui va diminuer la compaction et augmenter la porosité du substrat. Ceci est accentué par le creusement de terriers et de galeries, particulièrement dans les cas où ils sont irrigués. De plus, ces structures biogènes augmentent la surface d'échange entre la colonne d'eau et le sédiment, ce qui favorise les échanges de matière à l'interface. Enfin, la plupart des macro-invertébrés bioturbateurs étant microphages, l'ingestion/égestion de particules va modifier la répartition granulométrique du sédiment.

Les perturbations entraînées par les organismes *bioconvoyeurs* (cf. paragraphe 1.3.1), comme les vers Tubificidae, illustrent clairement les conséquences potentielles de la bioturbation sur les propriétés physiques des sédiments. Ces organismes altèrent la granulométrie des sédiments de manière spécifique en sélectionnant les particules les plus fines au niveau de leur cavité d'ingestion en profondeur et en les faisant remonter au niveau de l'interface dans leurs pelotes fécales. Il en résulte un appauvrissement de ces petites particules en profondeur et un enrichissement en surface (*granulo-reclassement*) (Mc Call & Fisher 1980, Ciutat et al. 2006). L'intense activité de ces organismes entraîne la formation d'une couche de surface très peu dense, formée par l'agglomération de ces fines particules avec du mucus. Avec une porosité accrue et une compaction faible, les flux à l'interface eau/sédiment sont ainsi augmentés et la remise en suspension du sédiment est facilitée (Rhoads 1974, Mc Call & Fisher 1980). On peut noter cependant, que certaines espèces qui construisent des tubes consolidés par des particules agglomérées avec du mucus, augmentent au contraire la compaction et la cohésion du sédiment (Rhoads 1974, Gerbersdorf et al. 2008).

Ces modifications physiques du sédiment peuvent avoir à plus long terme des effets majeurs sur la sédimentation, la stabilité et l'érosion du substrat, ainsi que sur la distribution des radioéléments, des polluants et des dépôts fossiles. D'un point de vue géologique, la bioturbation peut influencer sur la stratigraphie des sédiments et donc sur la datation et la détermination des paléoenvironnements (Wheatcroft 1990, Leuschner et al. 2002).

### **1.3.2.3 Conséquences biogéochimiques**

D'après Rhoads (1974), les processus biogéochimiques pouvant être significativement influencés par la bioturbation sont :

- la forme et l'amplitude des gradients de Eh, pH et O<sub>2</sub>,
- les taux d'échange des composés chimiques dissous ou adsorbés entre les phases solides et aqueuses,
- la distribution verticale des espèces biogéochimiques majeures,
- et donc les cycles biogéochimiques des éléments (C, N, S, P).

Comme la température, la lumière, la vitesse du courant et les apports de MO, la bioturbation est donc un facteur important de contrôle des processus diagénétiques dans les sédiments superficiels (Krantzberg 1985, Kristensen 2000, Mermillod-Blondin & Rosenberg 2006).

L'augmentation de la surface d'échange entre la colonne d'eau et le sédiment au niveau des structures biogènes, permet une pénétration plus importante de l'oxygène et des nutriments dans le sédiment (*e.g.* Svensson et al. 2001, Wang et al. 2001, Stief & De Beer 2002, Glud et al. 2003, Wenzhöfer & Glud 2004). La séquence diagénétique 1D des processus rédox décrite idéalement dans les sédiments superficiels se trouve ainsi perturbée et il en résulte une mosaïque tri-dimensionnelle de microhabitats avec des gradients variables d'oxygénation et de potentiel rédox (Kristensen 2000, Aller et al. 2001). Comme illustré sur la figure 11, la succession des fronts d'oxydo-réduction se reporte ainsi sur le contour des structures biogènes qui sont bien oxygénés (Wang et al. 2001) ou autour de microhabitats anaérobies comme les pelotes fécales (Aller et al. 2001). A cela, il faut ajouter les effets du bioconvoyage qui va permettre la remontée de particules depuis des zones réduites en profondeur vers des zones oxiques à l'interface. Les éléments réduits associés à ces particules vont pouvoir alors être réoxydés et servir à nouveau d'accepteurs d'électrons pour dégrader la MO.

Bien que les macro-invertébrés d'eau douce soient globalement de plus petite taille que les macro-invertébrés marins, de nombreux travaux, utilisant notamment des outils de mesure à haute résolution (micro-électrodes, optodes), ont clairement démontré que ces organismes augmentent les flux d'oxygène et de nutriments à l'interface eau/sédiment ainsi que dans la paroi des terriers, favorisant ainsi les processus aérobies et anaérobies de dégradation de la MO. La plupart de ces études concernent :

- des larves d'insectes bioirrigatrices (Matisoff & Wang 1998, Wang et al. 2001, Stief et al. 2004, Leal et al. 2007), plus particulièrement des larves de Chironomes (Frenzel 1990, Svensson & Leonardson 1996, Svensson 1997, Kajan & Frenzel 1999, Stief & De Beer 2002, De Haas et al. 2005, Stief et al. 2005, Polerecky et al. 2006, Stief & De Beer 2006, Lewandowski et al. 2007, Stief 2007),
- et des vers Tubificidae (Chatarpaul et al. 1980, Mc Call & Fisher 1980, Matisoff 1995, Pelegri & Blackburn 1995, Svensson et al. 2001, Mermillod-Blondin et al. 2005, Nogaro et al. 2007).

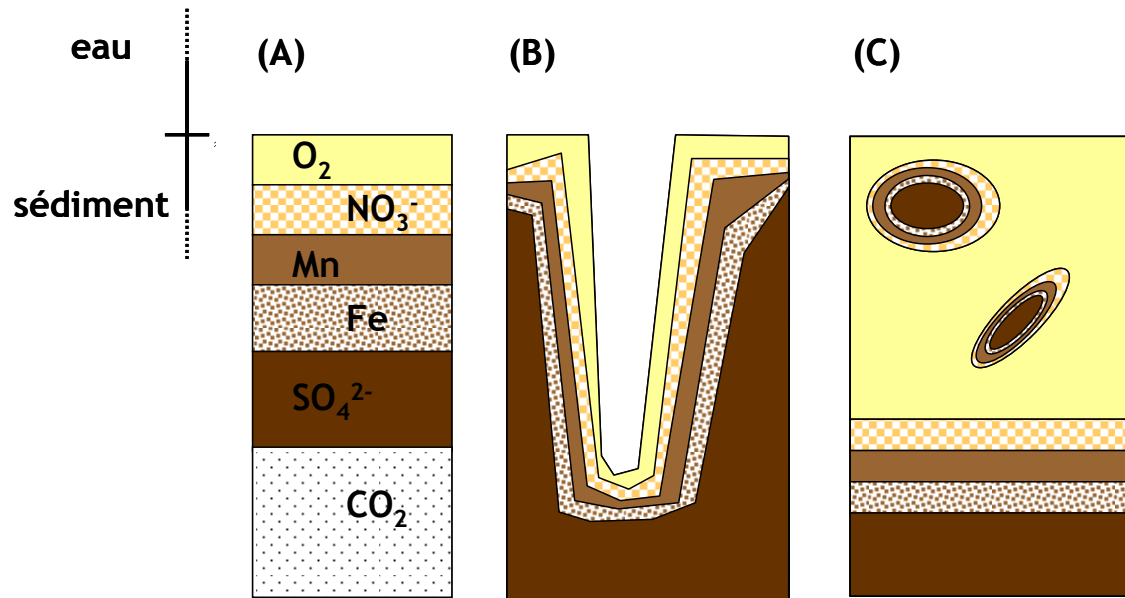


Figure 11 - Influence des structures biogènes construites par les organismes bioturbateurs sur la mise en place des fronts rédox dans le sédiment. (A) distribution idéalisée dans un sédiment stratifié non bioturbé, (B) zonation cylindrique autour d'un micro-environnement de type terrier bioirrigué, (C) zonation sphérique ou ellipsoïdale autour de micro-environnements anaérobies de type pelotes fécales (d'après Aller 2001).

Les déplacements et le mode alimentaire de ces organismes (*deposit-feeding*) expose la MO associée au sédiment à des conditions variables d'oxygénation et de potentiel redox par l'alternance de l'enfouissement/remise en suspension et de l'ingestion/égestion des particules sédimentaires. Stief (2007) a démontré que ces mécanismes stimulaient la production d'exoenzymes microbiens en surface et donc la minéralisation de la MO.

La présence de *bioirrigateurs* (e.g. larves de Chironomes) peut considérablement augmenter la surface d'échange à l'interface eau/sédiment et donc les flux des solutés et des gaz vers le sédiment (e.g.  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{O}_2$ ) ou vers la colonne d'eau (e.g.  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ) (Fukuhara & Sakamoto 1987, Svensson 1997, Kajan & Frenzel 1999, Matisoff & Wang 2000, De Haas et al. 2005, Lewandowski et al. 2007). En plus d'augmenter la disponibilité en nutriments, ces organismes apportent aussi de la MO fraîche et labile (e.g. mucus, fèces) au sédiment de subsurface, ce qui fait de leurs terriers des habitats favorables pour certaines communautés microbiennes (Stief & De Beer 2002, Stief et al. 2005, Gerbersdorf et al. 2008). La simultanéité entre la ventilation des terriers et l'excrétion d'ammonium par les organismes dans les terriers, peut ainsi stimuler la nitrification, tandis que la dénitrification est facilitée par la pénétration accrue de nitrates dans des couches de sédiment périodiquement anoxiques (bioirrigation intermittente). Il en résulte un couplage plus marqué de ces deux processus, à la fois spatialement et temporellement (Svensson & Leonardson 1996, Svensson 1997, Stief & De Beer 2002).

Le comportement des *bioconvoyeurs* (e.g. Tubificidae) exerce également une forte influence sur les processus de minéralisation de la MO, d'autant plus que leur densité peut être très importante dans certains milieux ( $> \text{plusieurs } 10^6 \text{ ind m}^{-2}$ ) (Palmer 1968). La remontée de matériel sédimentaire réduit et la formation d'une couche de surface pelotisée riche en MO fraîche et labile, stimulent les réactions rédox aérobies et anaérobies. Par exemple, Mc Call & Fisher (1980) ont montré que pour une densité de  $100\,000 \text{ ind m}^{-2}$ , la consommation d'oxygène des sédiments (e.g. paramètre mesuré classiquement pour estimer le taux de minéralisation de la MO) était multipliée par deux par rapport à des sédiments non bioturbés, avec 50-70% de cette augmentation relatifs à une réoxydation des sulfates de fer (FeS) remontés en surface depuis les couches réduites, 10-30% relatifs à une stimulation microbienne, et seulement 20% attribuable à la propre respiration des vers. La forte porosité de la couche de surface, couplée avec un accroissement de la surface d'échange entre l'eau et les sédiments due à la densité du réseau de galeries creusées dans les sédiments, augmente la

diffusion, l'advection, et donc les flux des solutés (Matisoff 1995, Mermillod-Blondin et al. 2005, Nogaro et al. 2007). Ainsi, ces organismes stimulent la respiration aérobie et la dénitrification (Chatarpaul et al. 1980, Svensson et al. 2001), proportionnellement à leur densité (Mc Call & Fisher 1980, Pelegri & Blackburn 1995). Par contre, Pelegri & Blackburn (1995) ont montré que la nitrification pouvait être stimulée pour de faibles densités ( $<20\ 000\ \text{ind m}^{-2}$ ), tandis qu'elle est inhibée pour de fortes densités ( $20\ 000$  à  $70\ 000\ \text{ind m}^{-2}$ ). Comme supposé par ces auteurs, la pénétration d'oxygène dans les sédiments peut être réduite par le transport de matériel réduit et l'intense activité microbienne dans la couche de fèces. Ces conditions anoxiques stimulent la dénitrification et limitent la nitrification à une très fine couche sous la surface des sédiments.

#### **1.3.2.4 Conséquences biologiques**

Les perturbations physiques et les variations biogéochimiques engendrées par la bioturbation transforment le milieu de vie de l'ensemble des espèces benthiques. Elles peuvent donc jouer sur la répartition, la composition et le fonctionnement des communautés macrofauniques, méiofauniques et microbiennes ainsi que sur leurs dynamiques de populations.

Comme cela a été exposé dans le paragraphe précédent, la bioturbation influence fortement la répartition et le métabolisme des différentes communautés microbiennes, avec des conséquences importantes sur les processus de diagenèse précoce ; les structures biogènes constituant des habitats privilégiés pour certaines communautés (*gardening*). Cependant, les micro-organismes peuvent également être consommés par les macro-invertébrés brouteurs (*grazing*), plus particulièrement à la surface du sédiment (Mermillod-Blondin et al. 2002, Stief & De Beer 2002). Van de Bund et al. (1994) ont ainsi montré en laboratoire que la biomasse bactérienne pouvait être significativement diminuée par la bioturbation de *Monoporeia affinis* (Amphipode), de *Chironomus riparius* (larves de Chironomes) et *Tubifex tubifex* (vers Tubificidae), alors que la productivité bactérienne était multipliée par 3,2, 1,4 et 4,4, respectivement par chacune de ces espèces. A cela, on peut vraisemblablement ajouter des effets en cascade: le broutage de certaines bactéries peut créer des surfaces libres qui pourront être recolonisées par des populations microbiennes en croissance dans des phases connectées (Reichelt 1991).



Concernant les interactions des macro-invertébrés avec la méiofaune dans les sédiments d'eau douce, très peu de données sont disponibles dans la littérature et les relations écologiques entre ces groupes sont mal connues (Traunspurger et al. 2006). Des effets directs comme la prédation et la compétition peuvent être attendus, mais les effets indirects de la bioturbation sont plus difficiles à déterminer. Cela pourrait résulter d'un équilibre entre des conséquences positives, comme l'apport en oxygène et en nutriments qui favoriseraient des microniches pour la méiofaune (Aller & Aller 1986), et des conséquences négatives comme la migration en profondeur par évitement de la prédation. Une étude récente (Traunspurger et al. 2006) a montré en laboratoire que la bioturbation de Copépodes et de larves de Chironomes n'affectait pas le nombre de Nématodes présents dans le sédiment. Par contre, un effet a été constaté sur la distribution verticale de ces vers qui se sont concentrés dans le premier centimètre de sédiment, plus particulièrement les juvéniles, les adultes creusant par contre plus en profondeur. *In situ*, ces auteurs ont pu observer que l'abondance de Nématodes était corrélée avec celles des Chironomes, des Oligochètes, des Ostracodes et des Copépodes.

Les macro-invertébrés peuvent également interagir entre eux. Le *granulo-reclassement* provoqué par les *bioconvoyeurs* peut, par exemple, favoriser l'installation de certaines larves d'insectes, tandis que l'accumulation de pelotes fécales peut être néfaste pour d'autres espèces (Frouz et al. 2004). Plus généralement, une influence directe par compétition de l'espace et des ressources, par prédation, ou par une augmentation de la disponibilité de la nourriture *via* un refractionnement de la MO particulière peut être observée (De Haas et al. 2005).

Enfin, on notera que la bioturbation peut également agir sur les communautés d'organismes pélagiques, comme par exemple le zooplancton. Il a été montré en milieu marin, que le recrutement de populations de Cladocères ou de Copépodes zooplanctoniques pouvait être influencé. Les œufs pondus par ces organismes se déposent en effet à la surface des sédiments, où ils sont soit consommés, soit enfouis en profondeur par diverses espèces de macro-invertébrés, dont des Amphipodes, des Bivalves, ou des Polychètes (Marcus & Schmidt-Gengenbach 1986, Viitasalo 2007). Mais inversement, la bioturbation peut être positive pour le zooplancton : Marcus & Schmidt-Gengenbach (1986) rapportent le cas d'un Polychète *bioconvoyeur* qui permet la remontée à la surface de ces œufs enfouis par d'autres bioturbateurs, sans les endommager dans son tractus digestif, favorisant ainsi la dynamique de la population zooplanctonique.

### **1.3.2.5 Conséquences sur la répartition et les flux des polluants métalliques**

La distribution des polluants métalliques dans les écosystèmes aquatiques dépend principalement des caractéristiques physico-chimiques de ces éléments. En raison de leur réactivité avec les particules, les concentrations de beaucoup de métaux sont souvent bien plus fortes dans les sédiments que dans la colonne d'eau. Ainsi, les sédiments constituent de véritables puits pour ces éléments et sont considérés comme des « bombes chimiques à retardement » (Stigliani 1991). 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 (Tessier & Campbell 1988, Luoma 1989). Cependant, certaines perturbations physiques, chimiques ou biologiques peuvent dans certaines circonstances entraîner une remobilisation des métaux préalablement piégés dans les sédiments (Petersen et al. 1997), ce qui représente un risque écologique important. Au final, la répartition des métaux dans un environnement donné est déterminée par leurs propriétés physico-chimiques propres, les processus diagénétiques dans les sédiments, et la stabilité physique de cet environnement. La bioturbation, étant donné son influence sur les caractéristiques physiques et biogéochimiques des sédiments, peut donc affecter cette répartition, et entraîner un relargage vers la colonne d'eau (Krantzberg 1985, Ciutat & Boudou 2003, Ciutat et al. 2007).

Pour comprendre l'influence des macro-invertébrés sur la répartition des métaux, il est important de considérer les deux composantes de la bioturbation, que sont le mélange des particules d'un côté, et le transport des solutés de l'autre, car leurs effets sont différents :

- le transport particulaire entraîne les métaux associés à travers différentes zones dans le sédiment, y compris le tube digestif des organismes (*e.g. deposit-feeders*),
- l'irrigation transporte les composés métalliques venant de l'eau, soit dissous, soit associés à la MO, entraînant souvent un flux à l'interface et affectant les cinétiques d'adsorption/désorption (Banta & Andersen 2003).

Secondairement, les conditions locales vont jouer sur la spéciation physico-chimique des métaux, qui va déterminer leur mobilité et leur biodisponibilité. La macrofaune peut jouer un rôle direct *via* son propre métabolisme de transformation des métaux (*e.g. bioaccumulation, détoxification, e.g. Michaud et al. 2005*) ou un rôle indirect en modifiant les conditions rédox et le pH, ce qui va déplacer l'équilibre chimique des métaux, et donc leur répartition entre

phase solide et phase aqueuse (Krantzberg 1985), ou en stimulant certaines communautés microbiennes, comme par exemple les bactéries métallo-réductrices ou les bactéries sulfato-réductrices qui vont favoriser des processus de précipitation (Warren & Haack 2001).

Au final, selon les cas, la bioturbation peut accentuer aussi bien les phénomènes d'enfouissement que de relargage des métaux (Soster et al. 1992, Petersen et al. 1995, Zoumis et al. 2001, Alfaro-De-la-Torre & Tessier 2002, Zheng et al. 2002, Ciutat & Boudou 2003, De Haas et al. 2005, Ciutat et al. 2007).

Les *bioconvoyeurs* enfouissent progressivement les métaux associés aux particules de surface (e.g. dans le cas d'une contamination de la colonne d'eau) et entraînent ainsi les polluants en profondeur jusqu'à une profondeur maximale qui correspond à la zone d'ingestion (Soster et al. 1992). Le plus souvent cet enfouissement descend sous la redoxcline, et dans le cas des métaux cationiques, entraîne leur réduction et favorise leur immobilisation. Cependant, les métaux peuvent ensuite être remontés en surface par advection les rendant à nouveau potentiellement dangereux pour les communautés benthiques, et les réexposant à la colonne d'eau. Après plusieurs passages, on peut arriver à une homogénéisation de la contamination dans la couche bioturbée ou à une atténuation jusqu'à l'enfouissement ultime du polluant sous la couche d'ingestion (Krantzberg 1985, Matisoff et al. 1999). Thamdrup (2000) a montré, pour le fer et le manganèse, que ce mécanisme pouvait prendre jusqu'à 100 cycles successifs avant que le métal ne soit définitivement incorporé aux sédiments.

Dans les terriers des *bioirrigateurs*, la circulation d'eau entraîne les métaux dissous ou adsorbés à la MO depuis la colonne d'eau vers le fond des tubes où ils peuvent se complexer avec des ligands organiques du mucus (Petersen et al. 1998). Cependant, la bioirrigation peut également relarguer les métaux présents dans le sédiment par remise en suspension de particules lors de la construction des terriers ou lors du rejet de pelotes fécales (Hare et al. 1991, De Haas et al. 2005).

Le mélange des particules et des solutés causé par la bioturbation entraîne des altérations continues dans les sédiments. Les effets nets sur la répartition des métaux ne sont pas toujours directs, cependant, et varient beaucoup selon les circonstances.

La taille des organismes impliqués, leur densité, les modes de bioturbation dominants ainsi que l'intensité de la bioturbation, couplés avec les concentrations en métaux, la

composition des mélanges de polluants, ainsi que la géochimie du sédiment, sont autant de facteurs qui affectent les interactions complexes entre bioturbation et métaux et la répartition ultime de ces éléments dans l'environnement.

En conclusion, en tenant compte de l'ensemble des connaissances rassemblées dans cette synthèse bibliographique, un schéma récapitulatif est proposé pour visualiser le comportement biogéochimique de l'uranium dans le sédiment d'eau douce, et de proposer des hypothèses quant à l'influence de la bioturbation sur ces mécanismes (Fig. 12).

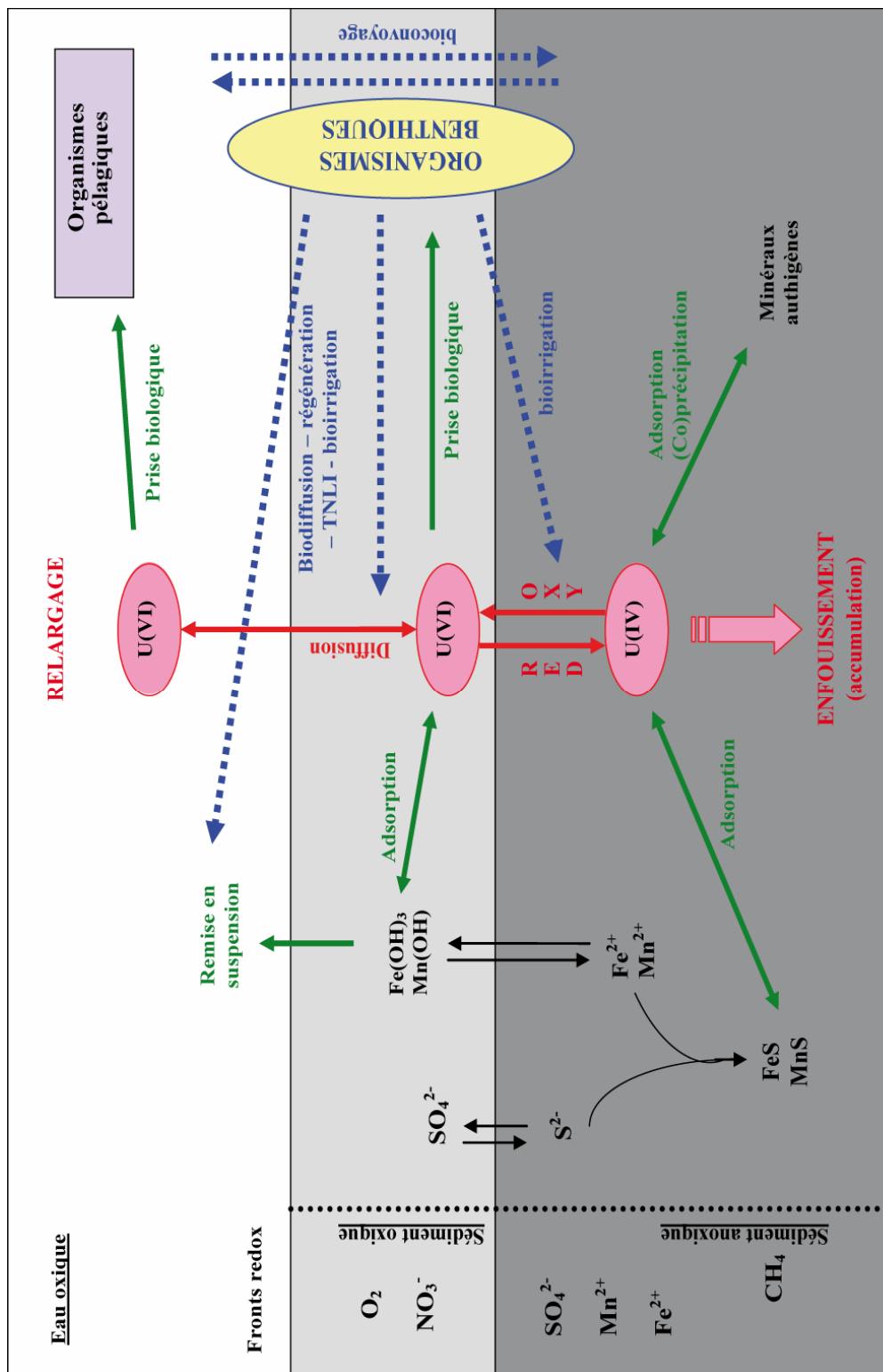


Figure 12 - Cycle biogéochimique simplifié de l'uranium dans les systèmes aquatiques continentaux et effets potentiels de la bioturbation des macro-invertébrés benthiques.

## 1.4 OBJECTIFS DE LA THÈSE

L'objectif général de la thèse a été de déterminer l'influence de la bioturbation des macro-invertébrés benthiques sur la répartition, les transferts et la biodisponibilité de l'uranium dans le sédiment des écosystèmes aquatiques continentaux.

Pour y parvenir, il a été nécessaire de prendre en compte trois objectifs spécifiques:

- (i) Evaluer les effets de l'uranium sur les macro-invertébrés benthiques, en particulier sur l'intensité de leur activité de bioturbation.
- (ii) Inversement, déterminer quelle influence la bioturbation pouvait avoir sur le comportement biogéochimique de l'uranium, plus précisément sur sa répartition entre les différents compartiments de l'écosystème benthique et sur les phénomènes de transferts (im/mobilisation), en tenant compte des perturbations biogéochimiques entraînées par le remaniement sédimentaire.
- (iii) Appréhender les conséquences potentielles de ces interactions au niveau benthique sur des organismes de la colonne d'eau (pélagiques).

***Hypothèse de départ*** – Certaines espèces de macro-invertébrés benthiques dulçaquicoles, connues pour être relativement tolérantes vis-à-vis des polluants métalliques accumulés dans les sédiments, peuvent induire, par le biais de leurs activités de bioturbation, des modifications biogéochimiques qui vont modifier le comportement de l'uranium.

En se plaçant dans l'hypothèse d'un sédiment contaminé, par exemple, par un rejet minier, sa colonisation par de tels organismes va pouvoir remobiliser l'uranium vers la colonne d'eau où il pourra alors avoir des effets néfastes sur des organismes pélagiques non exposés préalablement à la contamination.



**CHAPITRE 2 :**  
**MATÉRIEL & MÉTHODES**





## **2.1 DISPOSITIFS EXPÉRIMENTAUX**

### **2.1.1 INTRODUCTION**

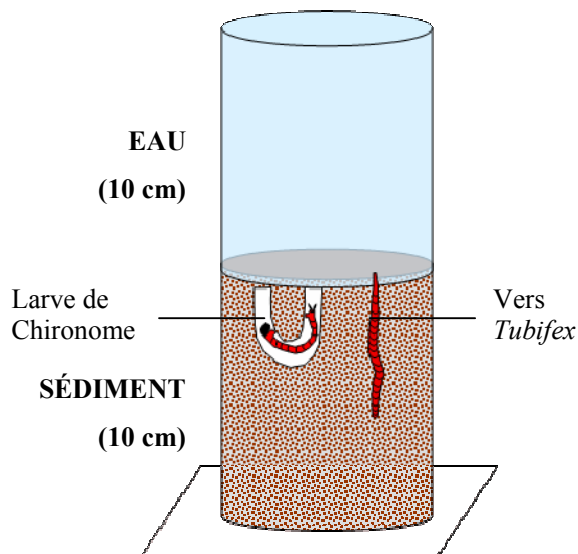
Afin d'atteindre les objectifs exposés précédemment, différentes expériences en laboratoire ont été réalisées en utilisant des aquariums reproduisant un environnement benthique lacustre (Fig. 1). Ces aquariums se composaient tous d'une colonne sédimentaire de 10 cm (contaminée ou non), d'une colonne d'eau de 10 cm (toujours non contaminée au départ), et ont été maintenus dans des conditions contrôlées de température (21°C), de photopériode (16H jour/8H nuit) et d'oxygénation (bullage constant), à la fois durant les phases d'équilibration, et durant le déroulement des tests.

Les sédiments et l'eau utilisés dans ces expériences ont été prélevés dans le milieu naturel, dans un site choisi principalement pour la qualité des eaux de surface et la texture fine et vaseuse du fond. Ce point de prélèvement se situe dans un bras mort du lac d'Esparron qui est un lac-réservoir en amont d'un barrage aménagé par l'homme sur la rivière Verdon dans les Alpes-de-Haute-Provence (France). Les sédiments ont été traités de façon à en éliminer les phases les plus grossières (*e.g.* débris végétaux, cailloux, déchets) et le maximum d'organismes pouvant s'y trouver par un tamisage sur 2mm et une congélation à -20°C pendant 48H. Ils ont ensuite été homogénéisés mécaniquement et conservés à 4°C jusqu'à la préparation des aquariums. Quant à l'eau, elle a été filtrée à 20µm lors de son prélèvement, afin d'éliminer les invertébrés, y compris la méiofaune, puis également conservée à 4°C avant d'être utilisée. Pour chaque expérience, une phase de stabulation de 4 semaines a été observée après la mise en place des aquariums afin d'assurer une relative équilibration du système et de permettre un développement microbien suffisant.

Les principales caractéristiques physico-chimiques des sédiments et de l'eau sont rapportées dans le Tableau 1.

**Tableau 1 - Principales caractéristiques des sédiments et de l'eau utilisés pour les expériences**

Sédiment		Eau	
Fractions granulométriques (%)			
<2 µm	9,6		
2-20 µm	14,2		
20-50 µm	32,9		
50-200 µm	41,8		
>200 µm	1,5		
Carbone organique (%)	2,4		
Calcite totale CaCO <sub>3</sub> (%)	69,8	Dureté (Eq mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	152
pH	8,2	pH	8,6
Concentrations (g kg <sup>-1</sup> )		Concentrations (mg L <sup>-1</sup> )	
Aluminium (Al)	11,50	Chlorures (Cl <sup>-</sup> )	38,1
Calcium (Ca)	297,0	Nitrites (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	1,20
Fer (Fe)	7,060	Nitrates (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	7,73
Manganèse (Mn)	0,134	Sulfates (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	69,6
Magnésium (Mg)	3,180	Phosphates (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )	<0,01
Sodium (Na)	1,430	Sodium (Na)	18,0
Nitrates (N-NO <sub>3</sub> )	0,001	Calcium (Ca)	52,0
Ammonium (N-NH <sub>4</sub> )	0,029	Cuivre (Cu)	<0,1
Phosphore (P-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	<0,002	Magnésium (Mg)	5,32
Chlore (Cl)	0,016	Potassium (K)	3,44
Soufre (S)	0,125	Fer (Fe)	<0,1
		Aluminium (Al)	<0,1
		Zinc (Zn)	<0,1
		Manganèse (Mn)	<0,1
		Chrome (Cr)	<0,1
		Cobalt (Co)	<0,1
		Nickel (Ni)	<0,1
		Cadmium (Cd)	<0,1
		Plomb (Pb)	<0,1



**Figure 1 – Représentation schématique d'un aquarium-type utilisé au cours des expériences.**

## 2.1.2 CHOIX DES MACRO-INVERTÉBRÉS BIOTURBATEURS

### 2.1.2.1 Introduction

Deux espèces de macro-invertébrés ont été retenues pour coloniser le sédiment des aquariums : des larves de *Chironomus riparius* (Diptères, Chironomes) et des vers *Tubifex tubifex* (Annélides, Clitellates, Oligochètes). Ces deux taxons sont largement répandus dans les sédiments potamaux et lacustres, avec des densités parfois très fortes pouvant atteindre plusieurs dizaines de milliers d'individus par mètre carré (Armitage et al. 1985, Giani 1984, Palmer 1968, Rasmussen 1984), et même jusqu'à plusieurs millions pour les Tubificidae (Palmer 1968). Ils peuvent être parfois les seuls invertébrés présents dans certains milieux hypoxiques, pollués et/ou très riches en matière organique, et constituent donc des modèles de choix pour étudier des systèmes contaminés à l'uranium. De plus, bien que pouvant vivre dans le même type de milieu, ces espèces appartiennent à deux groupes fonctionnels de macro-invertébrés bioturbateurs différents : *bioirrigateurs* pour les Chironomes, *bioconvoyeurs* pour les Oligochètes. Il était donc intéressant, par rapport à notre problématique, de constater les effets combinés ou non de ces deux modes de bioturbation.

### 2.1.2.2 *Chironomus riparius* (Meigen)

*Chironomus riparius* est un insecte hétérométabole (Diptère, Chironomidae) dont la plus grande partie du cycle de vie se déroule dans la phase aquatique, au contact du sédiment (Fig. 2). En apparence, les adultes ressemblent à de petits moustiques, mais les femelles ne piquent pas. Cette espèce relativement commune en Amérique du Nord et en Europe, est très utilisée en écotoxicologie pour évaluer la toxicité de sédiments pollués par des métaux (e.g. De Lange et al. 2005, Faria et al. 2007, Lee et al. 2006, Péry et al. 2007, Riba et al. 2006, Servia et al. 2006, Vogt et al. 2007). Ceci est lié à sa facilité d'élevage, son cycle de vie rapide, son contact étroit avec le sédiment pendant les stades précoces, et donc sensibles, de son développement, ainsi qu'à sa position intermédiaire dans le réseau trophique (i.e. consommateurs primaires ou secondaires, source de nourriture pour les poissons). Elle était déjà étudiée au sein du Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie (LRE) où un élevage y était maintenu depuis quelques années avant le début de cette thèse. De ce fait, avec des données disponibles concernant sa sensibilité à l'uranium (Dias 2005), *C. riparius* a constitué un excellent modèle biologique pour cette étude.

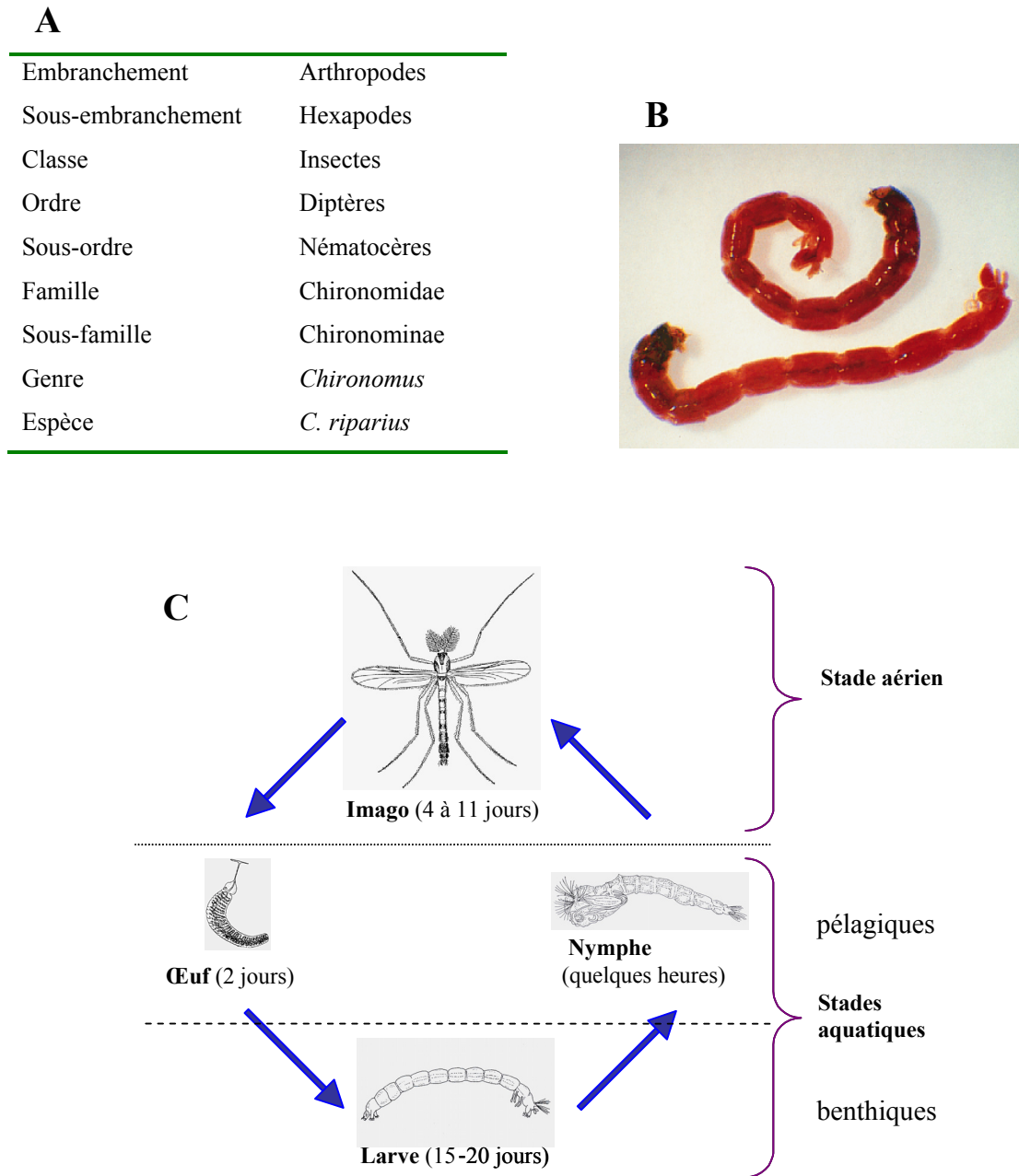


Figure 2 - Planche illustrative pour l'espèce *Chironomus riparius* : (A) Systématique, (B) Photographie de larves, (C) Cycle de vie à 21°C.

De plus, les travaux récents de Peter Stief en Allemagne (Stief 207, Stief and De Beer 2002, 2006, Stief et al. 2005), ont apporté beaucoup d'informations quant aux effets de la bioturbation des larves de *C. riparius* sur les communautés de micro-organismes et sur le cycle de l'azote (nitrification, dénitrification) dans les sédiments superficiels ; ce qui a constitué une solide base de données pour analyser et comparer les résultats obtenus en présence d'uranium.

A ce propos, il est important de noter que *C. riparius* n'est pas un *bioirrigateur* strict. En effet, les larves de cette espèce peuvent (i) soit errer à la surface du sédiment où elles vont alors se nourrir principalement par *grazing* sur le biofilm microbien épilithique, (ii) soit se nourrir de particules de sédiment (*deposit-feeding*) qu'elles vont alors soumettre à des cycles d'enfoncement/remise en suspension et d'ingestion/égestion, (iii) ou encore creuser des terriers temporaires qu'elles vont bioirriguer de façon intermittente. L'importance relative de ces trois modalités comportementales dépend principalement de l'oxygénation de la colonne d'eau, de la disponibilité de la MO et de sa labilité, de la granulométrie du sédiment, de la densité de larves et de la présence ou non d'autres espèces de macro-invertébrés. Stief et al. (2005) ont également montré que dans le cas de conditions hypoxiques, les larves peuvent construire des cheminées qui prolongent les orifices de sortie de leurs terriers au-dessus de la surface du sédiment. Activement bioirriguées, celles-ci permettent d'augmenter la disponibilité en oxygène pour les larves et sont fortement colonisées par de la microfaune aérobie qui constitue une source supplémentaire de nourriture.

### **2.1.2.3 *Tubifex tubifex* (Müller)**

Les vers *Tubifex tubifex* (Fig. 3), et plus généralement les Tubificidae d'eau douce, communément appelés 'vers de vase', sont des vers segmentés (Annélides) qui vivent en colonies dans la plupart des rivières et des lacs, jusque dans les estuaires, sur la plupart des continents. Il est difficile de distinguer *T. tubifex* d'espèces proches car leur identification est basée sur les organes reproducteurs (clitellum), lesquels se résorbent après l'accouplement, et sur des caractéristiques extérieures (*e.g.* setae) qui peuvent varier avec les conditions du milieu (*e.g.* salinité). Ces vers sont connus pour leur capacité à vivre dans des sites très pollués, notamment par des contaminants organiques, et dans des conditions très hypoxiques (Brinkhurst and Kennedy 1965, Thienemann 1920). Grâce à un enkystement et une diminution de leur activité métabolique, ils peuvent survivre à la sécheresse ou à un manque de nourriture. L'enkystement permet de plus la dispersion des individus (Budd 2005).

<b>A</b>	Embranchement	Annélides
	Classe	Clitellates
	Sous-classe	Oligochètes
	Ordre	Haplotaxides
	Famille	Tubificidae
	Genre	<i>Tubifex</i>
	Espèce	<i>T.tubifex</i>

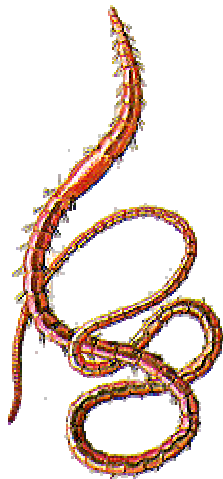
**B**



**C**



**D**



**E**

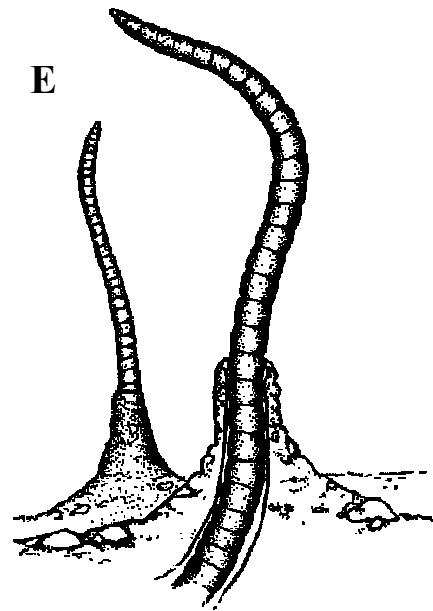


Figure 3 - Planche illustrative pour l'espèce *Tubifex tubifex* : (A) Systématique, (B) Photographie de deux individus, (C) Photographie d'une colonie de vers dans du sédiment, (D) Dessin d'un individu sexuellement mature, (E) Dessin de deux individus dans du sédiment, avec la partie caudale sortant dans la colonne d'eau.

Egalement couramment utilisé en écotoxicologie pour évaluer les effets des métaux (*e.g.* Martinez-Madrid et al. 1999, Reynoldson et al. 1991, Wiederholm et al. 1987), *T. tubifex* a représenté un modèle biologique très intéressant par rapport à la problématique de cette thèse : facilité d'utilisation au laboratoire, totalité du cycle de vie dans le sédiment, position intermédiaire dans le réseau trophique, polluo-résistance, et surtout forte activité de bioturbation. De plus, contrairement à *C. riparius*, aucune donnée concernant sa sensibilité à l'uranium n'était disponible avant cette étude.

Le comportement particulier de ces vers (*i.e.* verticalement orientés la tête dans le sédiment et la partie postérieure dans la colonne d'eau) a été décrit depuis longtemps dans la littérature (Alsterberg 1922, Dausend 1931, Fox and Taylor 1955). Plus les conditions sont hypoxiques, plus les vers étendent la partie postérieure de leur corps dans la colonne d'eau tout en augmentant les mouvements d'ondulations. Dans des conditions oxiques, au contraire, ils peuvent totalement se rétracter dans leurs tubes. Il est communément admis que cette migration verticale est une réponse à la disponibilité de l'oxygène dans le milieu (Weber 1978), et que l'extension du corps dans la colonne d'eau est une manœuvre de l'organisme pour obtenir suffisamment d'oxygène pour sa respiration. Cependant, certains travaux suggèrent que la migration vers le sédiment en réponse à des concentrations en oxygène élevées dans la colonne d'eau, pourrait refléter un comportement d'évitement, tandis que la migration vers le haut en conditions hypoxiques reflèterait plutôt des niveaux d'oxygène tolérables pour les vers qu'une stratégie pour disposer de plus d'oxygène. Il est en effet bien connu que les colonies de *Tubifex* peuvent se tasser en une masse très dense si on les expose à de l'eau saturée en oxygène, tout comme à des perturbations physiques trop importantes (Palmer 1968). La respiration des *Tubifex* est plus faible lorsqu'ils sont ainsi regroupés et la pression partielle en oxygène au sein de la masse d'individus est significativement réduite comparativement à l'eau environnante (Famme and Knudsen 1985). De même, il a été montré que des conditions d'oxygène saturantes pouvaient avoir un effet négatif sur la croissance des juvéniles (Fox and Taylor 1955). Famme & Knudsen (1985) ont réussi à montrer que les *Tubifex* présentaient effectivement une aérotaxie négative pour l'oxygène, et que la réaction d'évitement était rapide et se faisait pour de très faibles gradients d'oxygène, suggérant la présence de capteurs sensoriels très sensibles. Enfin, il faut également noter que la migration verticale des vers dans leurs tubes de sédiment représente un mécanisme de protection contre les prédateurs comme les poissons.



Les vers utilisés pour les expérimentations de cette thèse provenaient d'un élevage commercial (Société *Grebyl & Fils*, Arry, France). Ils ont été identifiés comme appartenant majoritairement à l'espèce *T. tubifex* (identification par le professeur N. Giani de l'Université Paul Sabatier de Toulouse), bien que quelques individus immatures n'aient pas pu être identifiés de façon totalement certaine.

#### **2.1.2.4 Acclimatation et conditions expérimentales**

Les macro-invertébrés utilisés dans ce travail de thèse ont été acclimatés aux futures conditions expérimentales par la mise en place d'élevages au sein du laboratoire. Pour chaque espèce quatre bacs cubiques de 25 cm de côté contenant du sédiment et de l'eau provenant du site de prélèvement ont été maintenus à 21°C avec un bullage constant. La colonne d'eau a été renouvelée environ une fois par mois et les organismes ont été nourris une à deux fois par semaine avec de la Tetramin®. Avant le début de chaque expérience, les organismes ont été prélevés délicatement de ces bacs d'élevage et maintenus quelques jours dans du sédiment artificiel (sable de Fontainebleau) sans apport de nourriture.

La durée des expériences a toujours été limitée à 12 jours en raison du cycle de vie des Chironomes à 21°C (Fig. 2). En effet, pour certains tests, des larves âgées de moins de 24 heures ont été introduites en début d'expérience, et un arrêt après 12 jours a permis de s'assurer qu'aucune émergence d'adultes ne s'était produite pendant cette période. En effet, après 12 jours, les larves ont atteint le quatrième et dernier stade de leur développement mais n'ont pas encore commencé leur nymphose (en ne supposant aucun retard de développement).

Les densités d'organismes utilisées au cours de ces expériences étaient proches des densités moyennes rencontrées dans l'environnement naturel : 14 000 ind m<sup>-2</sup> pour les larves de *C. riparius* et 60 000 ind m<sup>-2</sup> pour les *Tubifex*.

### **2.1.3 CONTAMINATION DU SYSTÈME**

Comme cela a été développé dans la synthèse bibliographique, le sédiment représente un compartiment d'accumulation pour les métaux présents dans la colonne d'eau (rôle de puits), mais il peut également relarguer ces éléments *a posteriori* alors que l'eau surnageante ne reçoit plus de polluants (rôle de source). Dans ce travail de doctorat, le choix a été fait de

contaminer les différents dispositifs expérimentaux *via* le compartiment sédimentaire, afin de reproduire le second *scenario*. Ceci a donc permis d'évaluer les conséquences d'une contamination du sédiment par de l'uranium sur un écosystème aquatique sans que celui-ci ne continue à recevoir des doses supplémentaires de polluants. C'est un choix arbitraire puisque les deux cas de contamination existent dans l'environnement naturel. Cependant, sa pertinence écologique semble plus forte compte tenu des diverses activités humaines (activités minières, exploitation du combustible nucléaire, utilisation militaire) qui par le passé ont malheureusement conduit à accumuler de l'uranium dans le sédiment des rivières et des lacs et dont les conséquences indirectes actuelles pour ces milieux sont très peu connues.

D'un point de vue pratique, dans chacune des expériences, pour chaque concentration testée, le sédiment a été contaminé en une fois dans un grand bidon à partir d'une solution de nitrate d'uranyle  $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Le bidon a été ensuite agité quotidiennement durant deux semaines avant le début des expériences pour assurer l'adsorption de l'uranium sur les particules et une contamination homogène.

Trois concentrations ont été retenues pour réaliser les expériences : 150, 300 et 600  $\mu\text{g U g}^{-1}$  sédiment sec. Celles-ci ont été choisies à la suite d'un test de sensibilité de type dose-réponse (modèle de Hill) réalisée sur des larves de *C. riparius*, *a priori* taxon le plus sensible, sur une durée de douze jours avec des concentrations comprises entre 0 et 1000  $\mu\text{g U g}^{-1}$  sédiment sec (cf chapitre 3). Comme cela a été rapporté dans la synthèse bibliographique, ces concentrations sont représentatives de concentrations rencontrées dans des sédiments contaminés, par exemple près de sites miniers. Pour évaluer les effets écotoxiques de l'uranium sur *T. tubifex*, des concentrations plus élevées (1200, 2400 et 4800  $\mu\text{g U g}^{-1}$  sédiment sec) ont également été testées, ce qui par ailleurs a demandé une réduction du dimensionnement des aquariums (4 cm de sédiment, 6 cm d'eau) pour respecter les règles de sécurité liées à la manipulation de radionucléides en laboratoire (cf chapitre 3).

## **2.2 PRÉSENTATION DES PRINCIPALES MÉTHODES D'ANALYSE**

Au cours de ce travail de doctorat, six expériences différentes ont été réalisées afin de répondre aux objectifs exposés précédemment. L'analyse de nombreux paramètres a été nécessaire pour prendre en compte les différentes composantes du système benthique : critères d'effet d'écotoxicité, mesures physico-chimiques, mesure de la bioturbation. Cela a été réalisé grâce à l'utilisation de diverses techniques de mesure pour lesquelles quelques détails sont présentés ici.

### **2.2.1 MESURES D'ÉCOTOXICITÉ**

#### **2.2.1.1 Macro-invertébrés bioturbateurs**

Afin de mesurer les effets écotoxiques de l'uranium chez les larves de *Chironomus riparius* et les vers *Tubifex tubifex*, des bioessais d'écotoxicologie classiques ont été appliqués aux conditions expérimentales retenues pour cette thèse (e.g. bioessais de 12 jours, eau et sédiment d'origine naturelle, densités d'organismes).

Comme cela avait été montré préalablement au LRE (Laboratoire d'Ecotoxicologie et de Radioécologie), les larves de *C. riparius* peuvent être affectées par l'uranium lors d'une exposition à un sédiment contaminé (Dias 2005). Un des premiers objectifs a donc été de déterminer si l'uranium induisait de tels effets avec l'eau et le sédiment retenus pour ce travail de thèse. Le protocole expérimental du bioessai a été adapté à partir de celui utilisé par Dias (2005) puis publié par Dias et al. (2008). Les principales différences ont été (i) la durée du test (12 jours pour cette étude vs 10 jours), (ii) les caractéristiques physico-chimiques de l'eau et du sédiment (origine naturelle dans cette étude vs sédiment artificiel et eau reconstituée), (iii) la densité des larves (14 000 ind m<sup>-2</sup> dans cette étude vs 2300 ind m<sup>-2</sup>), et la gamme de concentrations testées (0-1000 µg U g<sup>-1</sup> sédiment sec dans cette étude vs 0-24 µg U g<sup>-1</sup>).

Contrairement à *C. riparius*, aucune donnée n'était disponible quant à la toxicité de l'uranium chez *T. tubifex*. Un second bioessai a donc été mis en place avec une gamme de concentration étendue jusqu'à 4800 µg U g<sup>-1</sup> sédiment sec, compte-tenu de la forte capacité de

tolérance de cette espèce. En se basant sur les critères d'effet classiquement mesurés dans la littérature pour les vers Tubificidae, il en a été retenu six.

Le tableau 2 présente les critères d'effets mesurés après 12 jours d'exposition pour chaque espèce et la méthodologie employée pour ce faire. Les détails de ces méthodes ainsi que les résultats obtenus sont présentés au chapitre 3.

**Tableau 2 - Critères d'effets mesurés chez des larves de *Chironomus riparius* et les vers *Tubifex tubifex* après 12 jours d'exposition à un sédiment contaminé à l'uranium.**

<b>Critères d'effet</b>	<b>Méthodologie</b>
<b><i>Chironomus riparius</i></b>	
Survie	Comptage des individus vivants Détermination de la CL <sub>50</sub> et CL <sub>20</sub> (modèle de Hill)
Croissance	Mesure de la longueur des larves
Développement larvaire	Mesure de la largeur de la capsule céphalique
Malformations	Observations des pièces buccales : nombre et forme des dents Détermination du % de larves malformées
<b><i>Tubifex tubifex</i></b>	
Survie	Comptage des individus vivants Détermination de la CL <sub>50</sub> et CL <sub>20</sub> (modèle de Hill)
Autotomie	Comptage des individus autotomisés
Malformations	Observations générales, % d'individus malformés
Perte de biomasse	Pesées, détermination de la différence entre t <sub>final</sub> et t <sub>initial</sub>
Comportement	Mesure de la longueur du réseau de galeries creusées dans le sédiment
Bioaccumulation	Mesure de la concentration en uranium dans les tissus secs

Pour évaluer les effets de l'uranium sur la bioturbation des deux espèces de macro-invertébrés étudiées, le choix a été fait d'utiliser des traceurs particuliers fluorescents, appelés microsphères, qui ont été récemment employés par d'autres auteurs pour suivre le remaniement du sédiment induit par des invertébrés d'eau douce (Ciutat et al. 2005, Delmotte et al. 2007). Il s'agit de petites billes de latex de 1 µm de diamètre recouvertes d'une peinture fluorescente. Déposées à la surface du sédiment en début d'expérience, elles sont ensuite comptabilisées dans les différentes couches de sédiments obtenues par découpage de la carotte sédimentaire en fin d'expérience. En comparant les profils obtenus dans des aquariums contaminés ou non, en présence ou non de *C. riparius* et/ou de *T. tubifex*, il a ainsi été possible d'estimer l'intensité de bioturbation de chaque espèce et des deux espèces

ensemble, ainsi que de déterminer l'impact de l'uranium sur ces activités. Pour cela, un modèle classique de bioadvection-biodiffusion a été utilisé pour estimer des paramètres permettant de quantifier la bioturbation. Cependant, dans le cas des *T. tubifex*, la simulation des profils s'est avérée peu fidèle en raison de la remontée des traceurs par bioconvoyage. Un nouveau modèle prenant en compte ce paramètre a donc été développé à partir des données recueillies, grâce à une collaboration avec Patrick Boyer (Laboratoire de Modélisation Environnementale, IRSN). Ceci est détaillé au chapitre 3. Compte-tenu du grand nombre d'échantillons de sédiment qu'il a fallu traiter au cours de cette expérience, une nouvelle technique a été mise au point pour faciliter le comptage des microsphères dans les différentes couches de sédiment. Cette technique, qui représente une avancée méthodologique pour la mesure de la bioturbation a fait l'objet d'une publication qui est actuellement soumise à la revue *Limnology and Oceanography : Methods*, et qui est présentée au paragraphe 2.2.3.

#### **2.2.1.2 Organismes pélagiques**

Afin d'évaluer les effets potentiels de l'uranium associé au sédiment, en présence ou en absence de macro-invertébrés bioturbateurs, sur des organismes pélagiques, une des expériences a consisté à rajouter au dispositif expérimental déjà décrit, des larves de *Xenopus laevis* (Amphibien, Anoure) dans la colonne d'eau. Cette espèce est un modèle biologique classiquement utilisée en écotoxicologie, plus particulièrement dans le cadre de mesures de génotoxicité.

Cinq critères d'effet ont été mesurés : (i) la mortalité, (ii) la bioaccumulation, (iii) la biomasse, (iv) la toxicité génétique grâce à l'essai micronoyaux sur érythrocytes du sang circulant, et (v) l'expression génique de quatre protéines connues pour être induites lors d'exposition à des substances toxiques (Métallothionéines MTs, protéines chaperonnes HSP 70, Récepteur multi-drogues XeMdr – MRP de Xénope, Cytochrome CYP450-1A1). Une présentation de ces protéines est rapportée en annexe.

Ce travail a été réalisé grâce à la collaboration de Florence Mouchet et Laury Gauthier (Ecolab, Toulouse) pour la partie 'micronoyaux' et celle de Rosalba Gornati (Laboratoire de Biotechnologie et Sciences moléculaires, Université de Varese, Italie) pour la partie 'biomarqueurs moléculaires'. La description de ces méthodes et les résultats obtenus sont présentés au chapitre 5.

## 2.2.2 MESURES PHYSICO-CHIMIQUES

### 2.2.2.1 Mesures diverses

Au cours des différentes expériences, la température, le pH et la concentration en oxygène dissous de la colonne d'eau ont été suivis dans le temps, afin de s'assurer de la stabilité du dispositif mis en place (*e.g.* bain-marie, bullage) et de son homogénéité entre les différents aquariums.

La composition du sédiment et de l'eau du Lac d'Esparron ont été analysés au LRE (par ICP-AES, chromatographie ionique et granulométrie laser) et au Laboratoire d'Analyse des Sols (INRA, Arras, France). Les principaux résultats de ces analyses sont présentés dans le Tableau 1.

### 2.2.2.2 Mesures de l'uranium et des autres éléments métalliques

La concentration en uranium, et éventuellement d'autres métaux (*e.g.* Fe, Ca, Na), dans les différents compartiments du système (*e.g.* eau, sédiment, organismes) a été réalisée par spectrométrie d'émission atomique par plasma à couplage inductif (ICP-AES). Cette technique de mesure est dite élémentaire – par opposition à nucléaire – car elle donne un résultat en nombre de masse et non en unité d'activité nucléaire. Le principe de la spectrométrie d'émission atomique repose sur le fait que les atomes ou les molécules qui sont excités par un apport externe d'énergie émettent des radiations électromagnétiques caractéristiques. Ceci se traduit par des transferts d'électrons vers les couches électroniques externes, qui pour revenir vers le noyau atomique émettent des photons avec des fréquences variables selon les différences de niveaux d'énergie entre l'état initial et l'état excité. A chaque transition électronique correspond l'émission d'un rayonnement de fréquence déterminée sous la forme d'une raie lumineuse. Chaque élément chimique génère un spectre de raies spécifique qui permet ainsi de le caractériser. Dans le cas de l'ICP-AES, la stimulation des atomes est obtenue par une source d'énergie thermique (ici, plasma d'argon généré par couplage inductif).

L'analyse des échantillons d'eau a pu être réalisée directement après acidification dans de l'acide nitrique à 2%. Par contre, l'analyse des échantillons de sédiment ou d'organismes a nécessité préalablement leur mise en solution. Pour cela, les échantillons ont été minéralisés par des attaques acides, avec des acides forts et du peroxyde d'oxygène, dans des mélanges en

proportion variable selon la masse et la composition du substrat (cf détails des protocoles aux chapitres 3, 4 et 5).

Les mesures par ICP-AES ont été réalisées par Virginie Camillieri (LRE) sur un appareil de type Optima 4300DV (Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA) dont la limite de détection pour l'uranium est de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  pour des échantillons aqueux.

### **2.2.2.3 Mesures des éléments anioniques dissous**

Les concentrations des espèces anioniques dissoutes dans les phases aqueuses (colonne d'eau, eau interstitielle) ont été mesurées par chromatographie ionique. Le principe de cette technique repose sur les propriétés des résines échangeuses d'ions qui permettent une fixation sélective des anions présents dans une solution. Sur la résine échangeuse d'ions conditionnée sous forme d'une colonne chromatographique, circule en permanence un éluant. On injecte une très faible quantité de la solution à analyser (0,5-3 mL) et les ions sont fixés sélectivement sur la colonne chromatographique. L'éluant circulant en permanence sur la colonne, les ions sont ensuite progressivement 'décrochés' en fonction de leur taille, leur charge et leur degré d'hydratation. Chaque espèce ionique est ainsi séparée et détectée par conductimétrie à la sortie de la colonne. La concentration de l'espèce ionique dans la solution est directement proportionnelle à la conductivité.

Ces analyses ont été réalisées par Daniel Orjollet (LRE) sur un appareil de type DX120 avec une colonne AS11HC de 4 mm et un générateur d'éluant KOH (Dionex®, Sunnyvale, USA).

### **2.2.2.4 Mesures des profils de concentrations des éléments dissous dans le sédiment**

Les profils de concentrations des éléments dissous (cations et anions) ont été obtenus grâce à des sondes contenant des gels de diffusion insérées verticalement dans le sédiment. La mesure repose sur la technique d'équilibre diffusif dans des gels minces (Davison et al. 1991) connue sous le nom de DET (*Diffusive Equilibration in Thin-films*), qui est basée sur le principe d'équilibration des solutés présents dans la phase aqueuse (eau interstitielle) par diffusion à travers un gel hydraté (95-98 % d'eau). Le support est divisé en logettes pour empêcher une rééquilibration dans le gel (Fones et al. 1998). Ce type de sonde où le gel est prédécoupé avec une résolution millimétrique est appelé « *constrained DET sampler* ».

L'équilibration du gel avec la solution à mesurer est modélisée à partir de la 1<sup>ère</sup> loi de Fick, en faisant l'hypothèse que l'eau extérieure est parfaitement homogène et que le transport vers le gel est uniquement diffusif. Le temps d'équilibration est de 30 minutes dans de l'eau libre et de 24H dans du sédiment (Davison et al. 2000). Lors du retrait de la sonde, le gel contenu dans chaque logette (22 µL) est élué dans 2 mL d'HNO<sub>3</sub> à 2% pour les échantillons destinés à la mesure des cations, et dans 2 mL d'eau milliQ pour les échantillons destinés à la mesure des anions. Ils sont ensuite respectivement analysés par ICP-AES (cf paragraphe 2.2.2.2) et par chromatographie ionique (cf paragraphe 2.2.2.3) pour obtenir les profils de concentrations.

Les sondes DET ont été achetées chez DGT Research (Lancaster, GB). Les résultats obtenus avec cette technique sont présentés au chapitre 4.

#### **2.2.2.5 Mesures des flux d'oxygène dissous à l'interface eau/sédiment**

Les flux d'oxygène dissous à l'interface eau/sédiment ont été obtenus à partir d'une mesure en continu de la distribution 2-D de l'oxygène à l'interface eau/sédiment grâce à l'utilisation d'optodes à oxygène (senseur optique avec une forte résolution). Le principe de cette technique est décrit en détail au chapitre 4.

Ces mesures ont été effectuées en collaboration avec Laura Pischedda, actuellement doctorante en Sciences de l'Environnement à l'Université Aix-Marseille II, et ses encadrants, Philippe Cuny (CNRS, COM, Marseille) et Franck Gilbert (CNRS, Ecolab, Toulouse).

### **2.2.3 MESURE DE LA BIOTURBATION**

Comme cela a déjà été évoqué, le choix a été fait dans cette thèse, de mesurer la bioturbation des larves de *Chironomus riparius* et des vers *Tubifex tubifex* à l'aide de traceurs particuliers fluorescents appelés microsphères. Devant le grand nombre d'échantillons à analyser (48 carottes de sédiment découpées chacune en 16 tranches), la technique classique de comptage des traceurs dans chaque tranche de sédiment par microscopie à épifluorescence s'est avérée très fastidieuse. Grâce à la collaboration de Frédéric Coppin (LRE), une nouvelle technique de mesure basée sur l'utilisation d'un fluorimètre à microplaques a donc été développée. Ce travail représentant une avancée technique pour mesurer la bioturbation, il fait l'objet d'une publication scientifique qui est présentée ci-après.



**État actuel de la publication** – 1<sup>ère</sup> soumission : 06/07/2007, 2<sup>ème</sup> soumission : 11/12/2007, à la revue *Limnology and Oceanography : Methods*.

**Titre en français** – Une nouvelle méthode pour estimer l'activité de bioturbation utilisant des microsphères comme traceurs particuliers fluorescents et des mesures par fluorimétrie.

**Résumé en français** – Les traceurs particuliers fluorescents conservatifs (luminophores et microsphères) sont communément utilisés dans les expériences de bioturbation pour évaluer le remaniement sédimentaire induit par la macrofaune benthique. Initialement déposés à la surface du sédiment, ces traceurs sont ensuite comptés dans les différentes tranches de la carotte sédimentaire après son découpage afin d'obtenir des profils de concentration avec la profondeur. Ce comptage est traditionnellement réalisé dans des sous-échantillons de sédiment sec par microscopie à épifluorescence, une méthode certes efficace mais qui peut s'avérer fastidieuse. Cet article décrit une nouvelle technique de comptage des traceurs fluorescents (ici, des microsphères) utilisant un fluorimètre à microplaques pour quantifier rapidement le transport vertical des particules dans le sédiment. Cette technique a permis d'obtenir des résultats très satisfaisants et relativement similaires à ceux obtenus par épifluorescence. A titre d'illustration, les résultats obtenus dans une expérience en laboratoire avec des vers *Tubifex* sont rapportés dans cet article. La facilité et la rapidité des mesures permettent de considérer des expériences de bioturbation plus complexes. Cette technique de fluorimétrie peut également augmenter la précision (i) de la résolution verticale des profils de traceurs en diminuant l'épaisseur de découpage du sédiment, et (ii) de l'évaluation de la variabilité entre répliquats en augmentant leur nombre. Ainsi, en augmentant considérablement le nombre d'échantillons à analyser, les variations spatiales et temporelles liées à la bioturbation pourraient être mieux estimées. Tous ces facteurs peuvent améliorer les modèles de bioturbation existants, spécialement dans le cas de petits organismes bioturbateurs comme les invertébrés d'eau douce.

**Mots-clés** : bioturbation, fluorimétrie, microscopie à épifluorescence, microsphères.

## **A new method for estimating bioturbation activity using microspheres as particulate fluorescent tracers and fluorimetric measurements**

*S. Lagauzère<sup>1</sup>, F. Coppin<sup>1</sup>, M. Gérino<sup>2</sup>, S. Delmotte<sup>2</sup>, G. Stora<sup>3</sup>, and J.M. Bonzom<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, DEI/SECRE/LRE, Cadarache 186, BP 3, F-13115 Cedex, Saint Paul Lez Durance, France.

<sup>2</sup>EcoLab, Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle, UMR 5245 CNRS/ /INP/Université Paul Sabatier, 29 Rue Jeanne Marvig, F-31055 Cedex 4, Toulouse, France.

<sup>3</sup>Laboratoire de Microbiologie, Géochimie et Ecologie Marines, UMR 6117 CNRS/COM/Université de la Méditerranée, Campus de Luminy, Case 901, F-13288 Cedex 09, Marseille, France.

---

### **Acknowledgments**

This work was supported by the EnvirHom research program, funded by the Institute of Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN, France). The authors are grateful to the two anonymous reviewers of this article for their very helpful and interesting remarks, which have greatly improved the manuscript.

## **Abstract**

Conservative particulate fluorescent tracers (luminophores and microspheres) are commonly used in bioturbation studies to assess the sediment reworking induced by benthic organism. Initially deposited at the top of the sediment, they are afterwards counted in the different layers of sediment core to obtain concentration profiles in relation to depth. This counting has traditionally been performed in dry sediment subsamples by epifluorescence microscopy, a time-consuming yet effective method. This article describes a new procedure for counting fluorescent tracers (here, microspheres) using a microplate fluorimeter to rapidly quantify the vertical transport of particles within sediment. In comparison with the previous-used method, very satisfactory and similar results were obtained by fluorimetry, as illustrated in a 12-day laboratory experiment with Tubificid worms. The easy and quick measurements obtained from this method permit increasingly complex bioturbation experiments. Use of fluorimetry leads to a potential greater accuracy in (i) the vertical resolution of tracer profiles, as more sediment layers can be sliced, and (ii) on the assessment of inter-replicate variability, as more replicates can be settled. Hence, spatial and temporal variations linked to bioturbation could be better assessed by considerably increasing the number of samples analysed. All of these factors would improve existing bioturbation models, especially those involving small organisms like freshwater invertebrates.

**Key-words** : bioturbation, fluorimetry, epifluorescence microscopy, microspheres.

## 1. Introduction

Marine and freshwater benthic ecosystems are inhabited by many bottom-dwelling macroinvertebrate species that generate bioturbation, *i.e.* the reworking of surface sediments by their burrowing, feeding, breathing, defecating and irrigating activities. This alteration results in the dispersal of particles as well as the redistribution of pore water and associated solutes within the sediments (Matisoff 1995, Matisoff & Wang 1998, Martin et al. 2005, Waldbusser & Marinelli 2006). It affects the physical, chemical, mineralogical, and biological properties of the sediment (Rhoads 1974, Krantzberg 1985, Kristensen 2000, Mermillod-Blondin & Rosenberg 2006), and therefore has significant influence on the transport and transformation of various chemical species, including pollutants (Soster et al. 1992, Reible et al. 1996, Zoumis et al. 2001, Zheng et al. 2002, Banta & Andersen 2003, Ciutat & Boudou 2003, Mermillod-Blondin et al. 2005, Klerks et al. 2007).

Many previous studies have described this kind of biological transport and quantified it using various solute and particulate tracers. These tracers could either be naturally present in the sediment, in the form of dissolved oxygen, radionuclides, or natural pigments (Sun et al. 1991, Berg et al. 2001, Landrum et al. 2004), or deliberately added, such as glass beads, fluorescent particles, bromide, metals, and isotopically-labelled algae (Wheatcroft et al. 1994, Blair et al. 1996, Gérino et al. 1998, Meysman et al. 2006), to monitor their vertical migration with time. The quantifying of bioturbation is based on spatial and temporal changes in the vertical profiles of tracer materials in sediments. Mathematically modelling tracer profiles provides an estimation of transport rates, and hence improves existing diagenetic models (Boudreau 1997).

During the past decade, conservative luminescent tracers have been increasingly used to assess the biological transport of particles during short-term experiments for the following reasons : (i) the large range of particle diameters allows their use to be adapted to various sedimentary environments and for various benthic organisms; and (ii) their conservative nature enables them to characterize the non-local nature of biological transport over short time periods. The two types of luminescent particles commonly used to track the movement of particles within bioturbated sediments are luminophores and microspheres. Luminophores, which are sand particles (10-250  $\mu\text{m}$  in diameter) dyed with fluorescent paint (pink, yellow or green), have been used in many bioturbation studies (Gérino et al. 1998, François et al. 1999, Mugnai et al. 2003, Solan et al. 2004, Ciutat et al. 2005, Duport et al. 2006, Fernandes et al. 2006, Nogaro et al. 2006, Maire et al. 2007). More recently, some experiments have been

performed with smaller particles called microspheres, which are fluorescent latex balls 1  $\mu\text{m}$  in diameter (Ciutat et al. 2005, Delmotte et al. 2007). The regularity of their form (perfect spheres) facilitates counting them in sediment samples, as they are readily distinguished from the natural particles. Their small size permits easier movement and ingestion by small organisms, such as freshwater macroinvertebrates (Rodriguez et al. 2001, Ciutat et al. 2005), thus enabling most of the reworking linked to bioturbation to be recognized. Finally, they are suitable for studies involving very fine sediments in which sandy particles are absent or only present in small amounts.

In bioturbation laboratory studies using microcosms, and in field studies, these two types of luminescent particle tracers are generally deposited directly onto the sediment surface or mixed with mud and frozen in the form of a cake. Under the effects of bioturbation, they become buried and redistributed within the substratum. At the end of the experiment, the sediment core is sliced into several layers, the number of which depends on the experimental requirements. Finally, after counting the amount of tracer in each layer, a profile of its concentration relative to depth is determined and a mathematical model is used to assess the intensity of bioturbation during the experiment.

Various methods exist to count the fluorescent particles and estimate their distribution along a vertical profile. Epifluorescence microscopy is commonly used to count luminophores or microspheres in dry sediment samples. This method is efficient but very time-consuming, as it usually involves tedious microscope mountings of slides, repeated readings for each sample, dilutions when the tracer concentration is too high, and introduces the potential for subjective decisions on the part of the individual doing the counting. Moreover, it takes around three to four hours to establish a single tracer profile (pers. comm.). All of this considerably limits the number of sediment slices that can be made from each sediment core and the number of tracer profiles that can be measured during any bioturbation study. Hence, improvements in the tracer counting method should lead to increased precision in measuring (i) the tracer concentration per slice, (ii) the vertical distribution of tracer in a sediment core, and (iii) the spatial and temporal variability of the bioturbation rates in a sedimentary facies.

In this context, a method of luminophore counting based on digital photography and image analysis has recently been developed by Duport et al. (2006). Other authors have also applied image analysis directly to photographs of sediment columns, eliminating the need for slicing. Luminophore profiles with very high temporal and spatial resolution can be obtained through these non-intrusive procedures (Gilbert et al. 2003, Solan et al. 2004, Maire et al. 2007). Although these methods are very promising for future investigations in bioturbation,

the ‘classical’ method of sediment slicing and epifluorescence counting remains the most widely used (Gérino et al. 2007).

The aim of the present work is to report an alternative procedure for counting fluorescent particle tracers (here, microspheres) using a microplate fluorimeter. This permits the movement of particles within sediment to be quantified more easily and quickly than in epifluorescence counting. We first give detailed descriptions of the calibration steps (preparation, analysis, and comparison with previously used methods), and then we apply this method to a laboratory bioturbation experiment conducted with Tubificid worms. Finally, we give a range of application examples in bioturbation studies and other settings.

## 2. Materials and procedures

*Sediment origin and treatment* — The sediment was collected in the muddy zone of a lake (Lac d’Esparron, Verdon, southeast France). Its main physicochemical characteristics are reported in Table 1. It was sieved using a 2-mm mesh to remove coarse fragments and macrofauna, and then frozen at -20°C for one week to destroy most of the organisms. After being thawed, it was mechanically homogenized by stirring, and stored at 4°C until use.

**Table 1 - Main physicochemical characteristics of the sediment (Lac d’Esparron, Verdon, SE-France, fraction < 2mm)**

<b>Grain size fraction (%)</b>	
< 2 µm	9.6
2-20 µm	14.2
20-50 µm	32.9
50-200 µm	41.8
> 200 µm	1.5
<b>D<sub>50</sub> (µm)</b>	33.8
<b>Porosity (%)</b>	64
<b>Organic carbon (%)</b>	2.4
<b>Total calcite CaCO<sub>3</sub> (%)</b>	69.8
<b>pH</b>	8.2

*Calibration* — Calibration curves were obtained from twelve sediment samples prepared with differing microsphere concentrations (Fluoresbrite® YG Microspheres, Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Germany). Each calibration sample was prepared by adding a different volume of the microsphere suspension to 2 g of dry sediment (drying for 48h, at

60°C), in order to obtain a range of concentrations from  $3.2 \times 10^7$  to  $5.1 \times 10^{10}$  microspheres.g<sup>-1</sup> of dry sediment (Table 2). After 48 hours of further drying at room temperature, they were manually homogenized in a mortar prior to analysis with the fluorimeter.

**Table 2 - Microsphere concentrations of calibration sediment samples**

Calibration sample	Dry sediment mass (g)	Microsphere suspension volume added* (µL)	Final concentration (number of microspheres per gram of dry sediment)
(blank) 1	2.00	0	0
2	2.00	1.5	$3.2 \times 10^7$
3	2.00	3.5	$7.4 \times 10^7$
4	2.00	7	$1.5 \times 10^8$
5	2.00	14	$3.1 \times 10^8$
6	1.99	35	$8.1 \times 10^8$
7	2.00	70	$1.6 \times 10^9$
8	2.00	175	$4.0 \times 10^9$
9	2.00	350	$8.0 \times 10^9$
**10	2.00	660	$1.5 \times 10^{10}$
11	2.00	1300	$3.5 \times 10^{10}$
12	2.00	2200	$5.1 \times 10^{10}$

\* Microsphere suspension concentration:  $45.5 \times 10^9$  microspheres mL<sup>-1</sup>

\*\*This sample generally corresponds to the maximum used in our bioturbation experiments

The measurements were made using a fluorimeter with a 96-well microplate reader (Molecular Device Gemini XS). The optimized settings of the microplate reader are summarized in Table 3.

**Table 3 - Settings of the microplate reader (Fluorimeter, Molecular Device Gemini XS)**

	Optimized	Tested
Mode	Endpoint	Endpoint Well scan (density 3 to 9)
Excitation wavelength (nm)	441	430, 441, 450
Emission wavelength (nm)	486	486, 510
Cut-off	None	None
Sensitivity	Readings 6 PMT auto	Readings 1 to 15 PMT : low, medium, high and auto
Automix	5 s (outside the reader) before analysis	5 s between readings
Autocalibrate	None between replicates ON	ON

For the calibration, a microplate (costar 3792 black, Corning) was carefully filled with twelve blank sample replicates (i.e. sediment without any microsphere) and five replicates of each sample containing microspheres, representing 50% of the total sample. 200 (±0.1) mg of

sediment were put into each microplate well using a small pot that was accurately weighed. Five consecutive readings of the microplate were run at excitation/emission wavelengths given by the microsphere manufacturer (441-nm excitation/486-nm emission). The fluorimeter was programmed without auto-shaking of the microplate to avoid cross contamination of wells due to pulverulence of the dry sediment. The analysis time was two minutes for one full microplate (96 wells). As the microsphere concentration of each sample and the sediment mass added to each microplate well were known, the microsphere content per well was calculated and a calibration curve was obtained. This curve was fitted by linear regression using SIGMAPLOT® Software (Systat, Inc., San Jose, CA, USA). To evaluate the temporal drift of the fluorimeter response, the results of six calibration tests made with one day in between, with the same sediment-filled microplate, will be discussed below. One calibration test was statistically analyzed toward estimating the potential variance between consecutive readings and between replicates of a same sediment sample. All data were checked for compliance with the assumption of normal distribution and homogeneous variance (Shapiro-Wilk W and Levene's tests). Because the assumptions of normality and variance were not met, even after transformation of the data, non-parametric tests were performed. All statistical analyses were carried out using the STATISTICA® software package (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA), and were considered significant at  $p \leq 0.05$ .

*Epifluorescence method* — In the interest of thoroughly evaluating our proposed method, three replicates of each calibration sediment sample were also prepared for epifluorescence counting (Nikon Eclipse-600 microscope), so as to compare the two methods. For each replicate, a fine layer of sediment was deposited on a microscopic slide. Based on 30 different readings, the mean number of microspheres per microscopic field, i.e. for a given surface area, was obtained for each subsample.

*The laboratory bioturbation experiment* — The efficiency of the method was tested during a 12-day laboratory bioturbation experiment involving *Tubifex tubifex* worms (Annelida, Oligochaeta). In this study, three freshwater microcosms consisting of 5-cm diameter aquaria containing 10 cm of 20 $\mu$ m-filtered lake water and 10 cm of sediment were settled in a large tank maintained at 21°C ( $\pm 0.1^\circ$ C). Each microcosm received a constant supply of air pumped from the overlying water. After two weeks of equilibration, a frozen mud “cake” spiked with microspheres was gently deposited on the sediment surface of each microcosm. These mud cakes consisted of a 3-mm thick disc of sediment 5-cm diameter, and 0.15 mL of the commercial microsphere suspension ( $45.5 \text{ e}^{+9} \text{ microspheres.mL}^{-1}$ ), which corresponded to a final concentration of  $1.5 \text{ e}^{+9} \text{ microspheres.g}^{-1}$  of dry sediment, in line with



previous calibration samples (0.25 to 300 %; Table 2). After 24 hours, 120 worms were added to each microcosm, for a density of 60 000 ind.m<sup>-2</sup>. These organisms were obtained from a commercial breeder (Grebyl & Fils, Arry, France), and were acclimated to experimental conditions for one month prior to the tests. At the end of the experiment (day 12), the sediment cores were sliced into 16 layers corresponding to depths of 0 – 0.3 – 0.6 – 0.9 – 1.2 – 1.5 – 1.8 – 2.1 – 2.4 – 2.7 – 3 – 3.5 – 4 – 5 – 6 – 8 – 10 cm. A sample was retrieved from each layer, air-dried at room temperature for 48 hours, and manually homogenized in a mortar prior to analysis by the fluorimetric method described above. Three replicate microplate wells of 200 mg per sample were analysed, and their microsphere concentrations were obtained with reference to the previously mentioned calibration curve. The amount of time required for the analysis was relatively short. Two 16-layer profiles could be obtained with a single full microplate. The preparation of one microplate took less than one hour (only about 40 minutes after training), and the fluorimeter reading took two minutes for five consecutive readings. The calibration microplate was stored under a lid and was analyzed again prior to each set of new samples from the same sediment.

### 3. Assessment

*Calibration* — The fluorimetric intensity detection limit (DL) was determined from the average intensity of the readings from twelve blank well replicates, plus three times their standard deviation. In plotting the calibration curve, only points of fluorimetric intensity greater than the DL were used. Hence, for the six calibration tests made with one day between, the lowest two or three concentrations were excluded in most cases. A linear regression was obtained between the measured intensity and the number of microspheres per well, and subsequently, per gram of dry sediment ( $R^2 = 0.99$ ; Fig. 1 and Table 4). Table 4 summarized the results of the six calibration tests. This method can detect at least  $1.5 \times 10^7$  ( $\pm 6\%$ ) microspheres per microplate well (i.e.  $7.7 \times 10^7$  microspheres.g<sup>-1</sup> dry sediment). Few variations appeared between the six calibration tests, indicating the temporal stability of the fluorimeter. Nonetheless, it is recommended that the calibration readings be repeated before the analysis of each new sediment sample series, as emphasized above in the description of measurement methods.

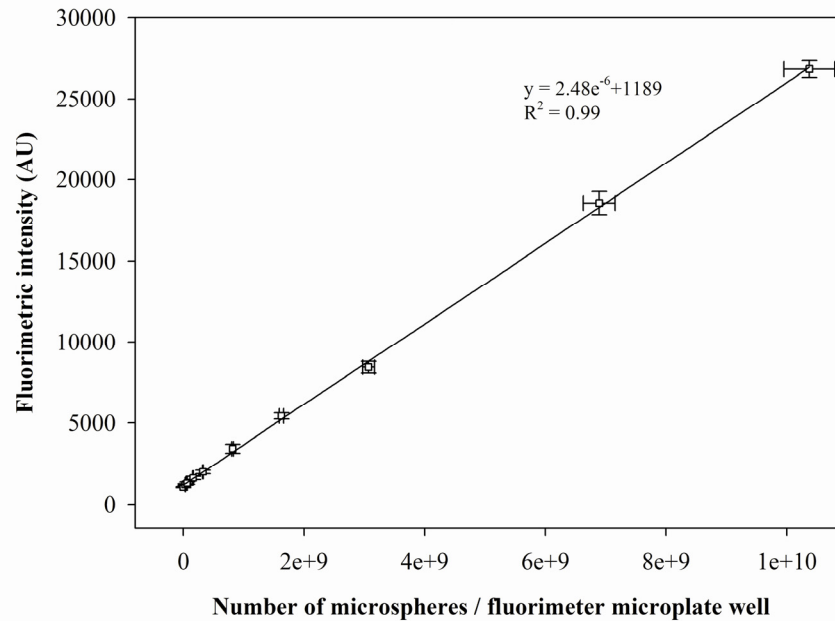


Figure 1 - Example of a calibration test : Fluorimetric intensity response as a function of the calculated number of microspheres per fluorimeter microplate well.

Table 4 - Influence of time on calibration measurements : coefficients of determination ( $R^2$ ) and detection limits (DL) of six calibration tests made one day apart with the same sediment-filled microplate. The right column gives the DL of the method applied to our bioturbation experiments.

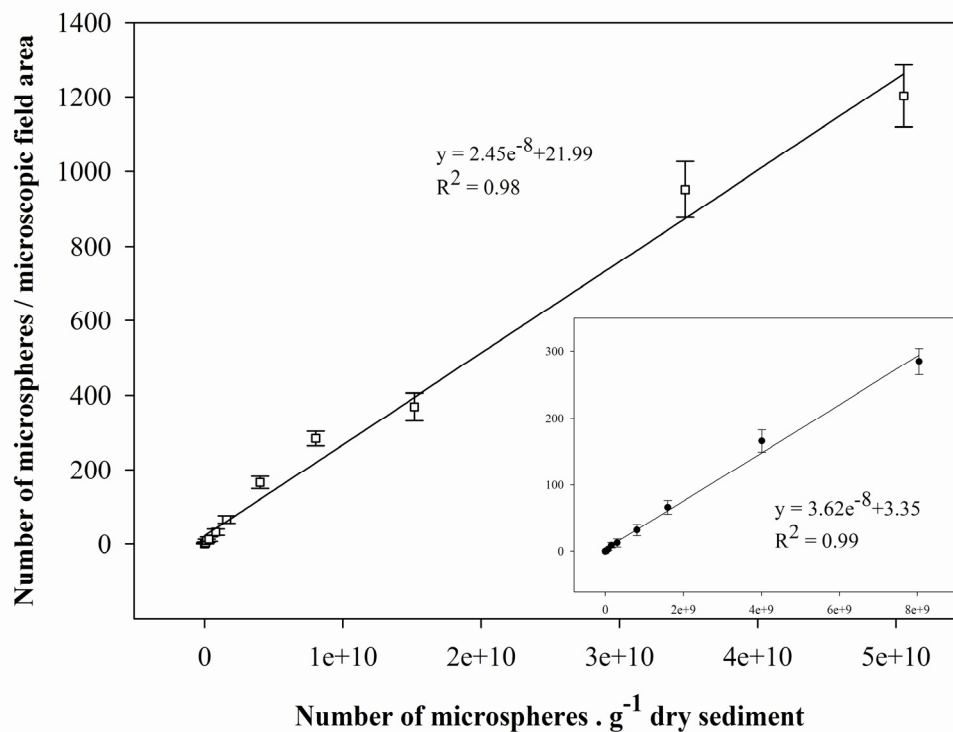
Test	$R^2$	DL Number of microspheres per well	DL Number of microspheres per gram of dry sediment	DL % of the maximum used in our bioturbation experiments*
1	0.99	$4.5 \text{ e}^{+7}$	$2.3 \text{ e}^{+8}$	1.5
2	0.99	$5.2 \text{ e}^{+7}$	$2.7 \text{ e}^{+8}$	1.8
3	0.99	$4.7 \text{ e}^{+7}$	$2.4 \text{ e}^{+8}$	1.6
4	0.99	$4.9 \text{ e}^{+7}$	$2.5 \text{ e}^{+8}$	1.7
5	0.99	$4.7 \text{ e}^{+7}$	$2.4 \text{ e}^{+8}$	1.6
6	0.99	$5.2 \text{ e}^{+7}$	$2.6 \text{ e}^{+8}$	1.8
Mean		$4.9 \text{ e}^{+7}$	$2.5 \text{ e}^{+8}$	1.6
$\pm$ SD		$2.9 \text{ e}^{+6}$	$1.5 \text{ e}^{+8}$	0.1
(%)		(6%)	(6%)	(6%)

\*see calibration sample 10 in Table 2.

Statistical analyses of the variance between calibration results did not reveal any significant difference, neither between consecutive readings of the same microplate well (Friedman test:  $p > 0.05$ ), nor between replicates of a single sediment sample (Kruskal-Wallis test:  $p > 0.05$ ). However, even if consecutive fluorimeter readings could be avoided, taking measurements of at least three replicates per sample is a useful practice in case of experimental error or doubt concerning any of the values.

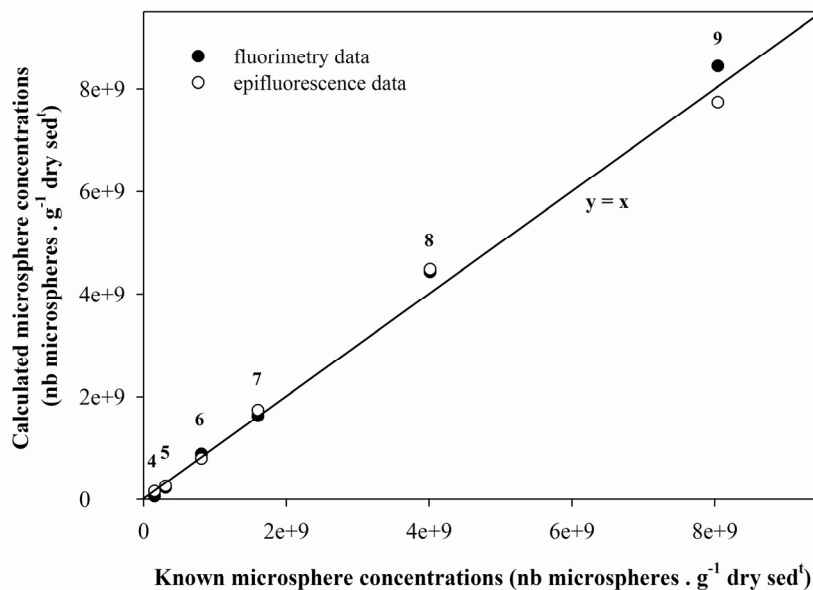
As the weight of the dry sediment put into each fluorimeter microplate well is an important variable that could influence the physical excitation and emission parameters (*e.g.* angle of reflection), and therefore also the DL and the linear response of the analysis, its potential effects were also studied. It was supposed that the height of sediment in the microplate well could affect the diffraction of the fluorimeter light beam and thus the measured fluorimetric intensity (by auto-absorption phenomena). We therefore filled two separate microplates with the calibration samples, one with 200 mg per well (which completely filled the well), and the other with 100 mg per well. No significant difference was observed in terms of the detection limit or the sensitivity of microsphere response (data not shown). The larger amount of the sediment (200 mg) was therefore preferred so as to enhance its representability.

*Comparison with the epifluorescence microscopy method* — The linear relationship between the mean number of microspheres per microscopic field as detected by epifluorescence and the known microsphere concentrations of calibration subsamples is shown in Figure 2. At the highest concentrations, in which large numbers of microspheres were present in each studied microscopic field, counting the microspheres was problematic (calibration samples 10 to 12). These high concentrations (>300 microspheres/ microscopic field) were therefore considered to represent the upper limit of this method, exceeding its dynamic range. The linear relationship between the number of microspheres per microscopic field and the corresponding known concentrations within the dynamic range of this method is illustrated in the inset graph of Figure 2.



**Figure 2 - Number of microspheres per microscopic field (x400) as a function of microsphere concentration in dry calibration sediment samples (microspheres.g<sup>-1</sup> dry sediment) for the twelve calibration samples, and for calibration samples 1-9 (inset graph).**

When comparing two different techniques for making direct measurements, it is necessary to use samples that can be analysed within the common dynamic range of both methods. As the epifluorescence method did not permit the correct analysis of calibration samples 10 through 12, and the DL of the fluorimetry method did not allow us to consider calibration samples 1 through 3, the two methods were compared using calibration samples 4 through 9 (Table 2). The concentrations of the calibration samples were calculated for both methods using the equations given in Figures 1 and 2, and were compared with the known concentrations of the sediments reported in Table 2 (Fig. 3). In each case, the slope was 1 with  $R^2$  greater than 0.99, which confirmed the accuracy of both methods and validated the reliability of our method.



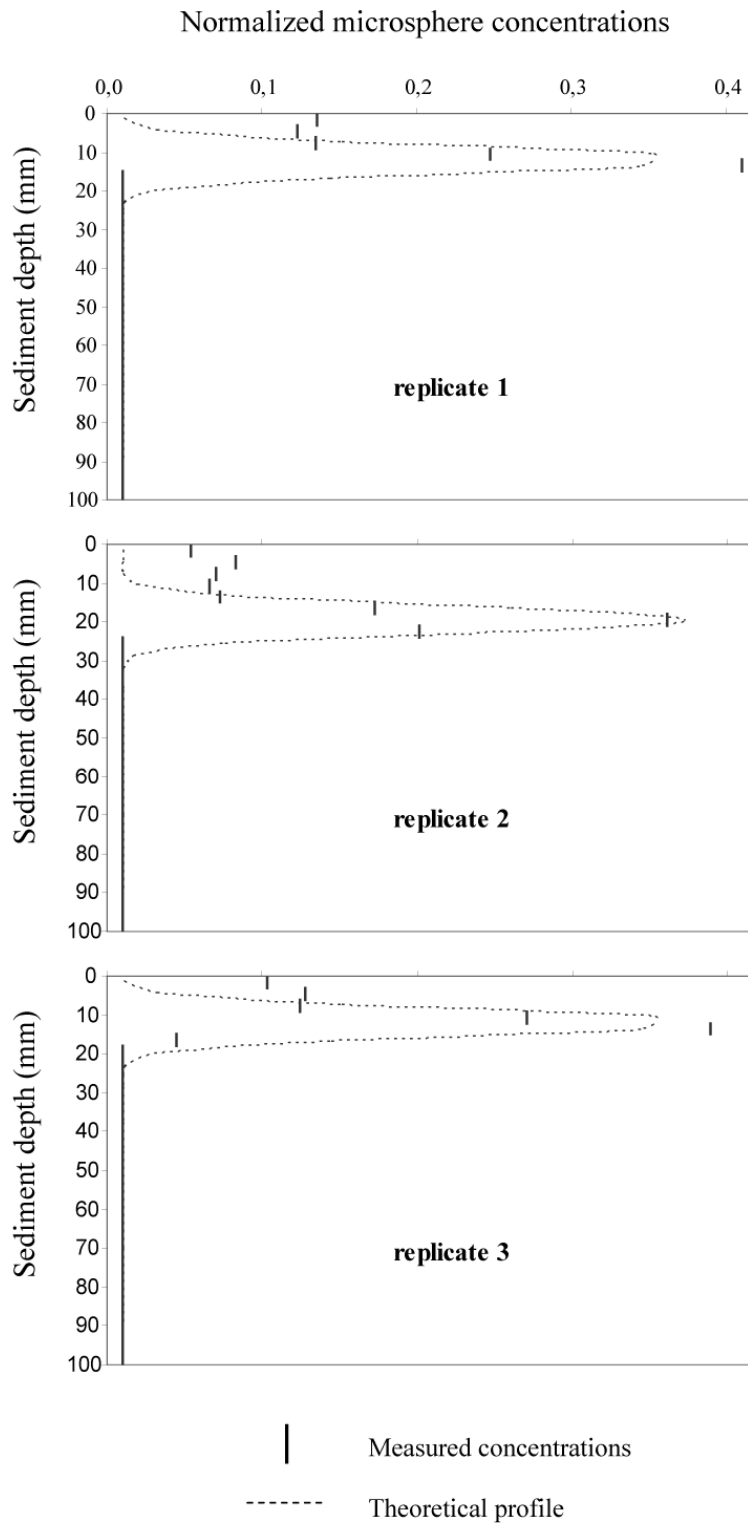
**Figure 3 - Comparison of the calculated number of microspheres per gram of dry sediment, using the two considered methods (fluorimetry and epifluorescence microscopy), with the known microsphere concentrations of calibration samples 4 through 9.**

Unlike the epifluorescence microscopy technique, fluorimetry cannot be used to analyze samples containing very few microspheres (concentrations below the DL). However, this limitation does not prevent this method from being entirely adequate for obtaining correct profiles of microsphere concentration in relation to sediment depth and applying bioturbation mathematical models. These models cannot consider samples with less than 10 microspheres per microscopic field, a concentration corresponding to the calibration number 5, which is in the dynamic range of the proposed technique.

In addition to the higher amount of work it imposes, the epifluorescence technique depends on an observer to do the counting, which introduces the potential for subjective variations in the results. Even if the same person were to perform all the counting, the results could still vary due to errors, although it remains under the variance of replicates. The readings given by a machine, such as the fluorimeter, would seem to be more consistent and objective. Moreover, with epifluorescence technique, after counting, the microsphere concentrations expressed in area units must be transposed to a sediment volume (layer), which can add additional errors to the final result. The fluorimeter readings, however, directly provide tracer concentrations.

*Bioturbation laboratory experiment* — The DL of the proposed method represents 0.51% ( $\pm 0.03\%$ ) of the maximum concentration used in our bioturbation experiments, i.e. the microsphere concentration of the mud cakes initially deposited into the microcosms (Table 4). The 16-layer depth profiles of microsphere concentrations obtained using this method are shown in Figure 4. They all seem to be typical of the sediment mixing activity of Tubificid worms (Ciutat et al. 2005). These organisms live with their heads embedded in the sediment, and thus actively transport particles from the ingestion zone, through their gut, and to the sediment surface ('conveyor-belt feeders'). This results in one sub-surficial peak generated by the subduction of microspheres (bioadvection) to the maximum depth of ingestion (1.2 to 2.1 cm in this case), and their occurrence in surficial layers as a result of their egestion within fecal pellets. Indeed, 33% ( $\pm 0.3\%$ ) of microspheres were found above the accumulation zone. This observation is consistent with the previous work of (Ciutat et al. 2005), in which the bioturbation activity of the same type of worm was assessed using both luminophores and microspheres. Those authors obtained the same depths of tracer peaks in both cases, but only the microspheres reappeared on the sediment surface, while all the luminophores remained buried.

As Figure 4 illustrates, the fitting of the 'classical' model of bioadvection-biodiffusion (Officer & Lynch 1982, Gérino et al. 1994) corresponds rather poorly with the present data, particularly for the surficial sediment layers. As suggested by (Ciutat et al. 2005), it was then difficult to estimate a  $D_b$  (biodiffusion coefficient) that could be compared with previous studies using luminophores, and no value is reported here.



**Figure 4 - Normalized microsphere concentration profiles in relation to sediment depth during a 12-day bioturbation experiment involving Tubificid worms (three replicates). Data are represented by straight lines, model profiles are represented by dotted lines.**

#### 4. Discussion

The data presented above suggest that the use of fluorimetry is well suited for measuring the microsphere concentrations of sediment samples in bioturbation studies. The method has been validated by comparison with the most commonly used method in bioturbation experiments, and its performance was demonstrated in the laboratory. Although the results are equivalent to the epifluorescence technique, fluorimetry constitutes a new approach to bioturbation experiments that involves easier, faster, and more reliable readings, thus permitting more complex experiments to be considered. In both laboratory and field studies, the number of experimental parameters (*e.g.* densities of organisms, interactions between species, sediment or water pollutant contamination levels) and the number of sample replicates are often limited by practical requirements. The method presented here reduces laboratory work by eliminating the restrictive and tedious microscopic preparation and counting procedures. This is particularly advantageous for sediment samples with high microsphere concentrations, which are difficult to count reliably by epifluorescence.

Compared to epifluorescence counting, the main strength of this technique is an indirect potential gain in accuracy in (i) the vertical resolution of tracer profiles, because more sediment layers can be considered, and (ii) in the assessment of inter-replicate variability, as a large number of replicate samples could be utilized. Hence, it represents an opportunity to better assess the spatial and temporal variations linked to bioturbation by considerably increasing the number of samples to be analysed. Moreover, it enables the possibility of sub-sampling within a single sediment layer, so as to assess spatial variations of particle transport within the sediment, and the quantification of horizontal transport. A more thorough understanding of these processes could improve existing bioturbation models and open the possibility of creating more comprehensive models. Finally, as highly comparable results were obtained from all the studies performed with epifluorescence counting, it can be said that the fluorimetry results are more easily reproducible within the same experiment and would be directly comparable between different studies.

In addition, the advantages and disadvantages of the present method relative to the emerging image analysis methods need to be addressed. The method proposed by Duport et al. (2006) remains closed to epifluorescence and fluorimetry methods, though it also involves sediment core slicing and drying of sediment samples before counting luminophores. Its main



advantage is obviously that it saves considerable time, because the sediment preparation for taking an image is very simple. However, it does not enhance the resolution of the analysis, either in terms of time (also an integrative method), or space (sediment layers of 0.5-cm thickness). On the other hand, recently described non-intrusive methods have successfully provided luminophore profiles with a high spatial resolutions (mm), and have been able to follow the movement of tracers within the sediment with a high time resolution (in seconds). Nonetheless, there are disadvantages to these techniques. First, these methods offer only a 2D view of the degree of sediment reworking, whether in the laboratory with images of an aquarium side (Gilbert et al. 2003, Maire et al. 2007) or in situ with a camera placed directly into the sediment (Solan et al. 2004). Also, not all of the tracer initially deposited at the sediment surface is afterwards found in the vertical profile. In contrast, the data from tracer counting in a previously homogenized sediment layer is representative of the average concentration in the layer. Furthermore, horizontal heterogeneities occurring during sediment reworking could highly affect the bioturbation assessment (Delmotte 2007), and it is not inevitably visible from an aquarium side or in front of a camera objective because ‘side-effect’ could hide it. Moreover, the behaviour of the organisms could be modified in such apparatus, particularly in the case of a very fine aquarium (Maire et al. 2007). Gilbert et al. (2003) emphasized that their method is complementary with the ‘classical’ epifluorescence procedures, and that is therefore necessary to retain the sediment at the end of an experiment in case the images are not useable. In addition, it must be kept in mind that these methods, including that of Duport et al. (2006), are not suitable for the use of microspheres or small luminophores. In fact, they are based on binary image analysis limited by pixel size (75µm). Pixels containing the image of a tracer are coded by 1, while those without tracer are coded by 0; and no distinction is made if a pixel contains one, ten, or a hundred fluorescent particles. Moreover, all of these experiments involved specific conditions with strong bioturbation effects of relatively large invertebrates in sandy marine sediments. Although these techniques are very promising for future investigations on bioturbation, their performance in freshwater sediment with smaller organisms still needs to be assessed. Finally, the digital camera use and image analysis require experienced persons, while anybody can easily reproduce the fluorimetry procedure.

Although the measurement resolution of the fluorimetry method presented here is not higher than that of the epifluorescence or image analysis methods, the former technique offers the advantage of considerably enhancing the number of sample replicates that can be analysed

during a single experiment. This is highly important for achieving a reliable estimation of bioturbation parameters that would allow a better characterization of biotransport modes. Moreover, as illustrated in Figure 4, the ‘classical’ model of bioadvection-biodiffusion (Officer & Lynch 1982, Gérino et al. 1994) did not fit well with the microsphere profiles because some of the microspheres were brought to the sediment-water interface. Fluorimetry experiments that could couple the use of microspheres or smaller luminophores with finer slicing would improve existing bioturbation models by accounting the non-local transport of particles by small organisms, like freshwater invertebrates. Parameters such as particle ingestion rate, depth of maximum ingestion, or digestion duration should be integrated in existing models. The more data are available, the more biological parameters can be included in models (Meysman et al. 2003, Delmotte 2007, Delmotte et al. 2007).

Another option to investigate is the use of this method with different Fluoresbrite® microparticles. The manufacturer proposes a wide range of tracers, with seven different fluorescent dyes and a range of sizes from 0.05 to 150 µm in diameter. Such a variety of tracers would allow the reworking of different size-classes of particles to be followed, using several fluorimetric readings at different excitation/emission conditions. This could be very useful to bioturbation experiments and in other disciplinary fields (*e.g.* sedimentology), in which grain size distribution is investigated. For example, differences between the reworking of ingested and not ingested particles could be easily followed in bioturbation studies.

Finally, it must be emphasized that coupling the use of microspheres as particle tracers with fluorimetry could be applied to other studies in a dry solid substrates, such as those concerning colloid or particle transfers in soil columns.

## **5. Comments and recommendations**

The method described in the present article was used on freshwater mud, and is not necessarily suitable for use with other types of sediment. This is especially true for coarse and sandy sediments with high organic matter contents that would induce more auto-fluorescence. In such cases, the DL could be higher than ours. However, experiments should be conducted with chemical or physical treatments that would reduce this background level (*e.g.* organic matter digestion) without altering the tracers. For information, we have successfully tested a calibration procedure using marine sandy sediment samples with known luminophore contents (results not shown).

## 6. References

- Banta, G. T., and O. Andersen. 2003. Bioturbation and the fate of sediment pollutants- Experimental case studies of selected infauna species. *Vie Milieu* 53 : 233-248.
- Berg, P., S. Rysgaard, P. Funch, and M. K. Sejr. 2001. Effects of bioturbation on solutes and solids in marine sediments. *Aquat. Microb. Ecol.* 26 : 81-94.
- Blair, N. E., L. A. Levin, D. J. Demaster, and G. Plaia. 1996. The short-term fate of fresh algal carbon in continental slope sediments. *Limnol.Oceanogr.* 41 : 1208-1219.
- Boudreau, B. P. 1997. Diagenetic models and their implementation: modelling transport and reactions in aquatic sediments. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Ciutat, A., and A. Boudou. 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., M. Gérino, N. Mesmer-Dudons, P. Anschutz, and A. Boudou. 2005. Cadmium bioaccumulation in Tubificidae from the overlying water source and effects on bioturbation. *Ecotox. Environ. Safe.* 60: 237-246.
- Delmotte, S. 2007. Rôle de la bioturbation dans le fonctionnement biogéochimique de l'interface eau-sédiment: Modélisation de la diversité des transports biologiques et effets sur la diagenèse précoce des sédiments d'une retenue. Thèse de Docteur de l'Université Toulouse III. 282pp.
- Delmotte, S., F. J. R. Meysman, A. Ciutat, A. Boudou, S. Sauvage, and M. Gérino. 2007. Cadmium transport in sediments by tubificid bioturbation: An assessment of model complexity. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 71: 844-862.
- Duport, E., G. Stora, P. Tremblay, and F. Gilbert. 2006. Effects of population density on the sediment mixing induced by the gallery-diffusor *Hediste (Nereis) diversicolor* O.F. Müller, 1776. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 336: 33-41.
- Fernandes, S., F. J. R. Meysman, and P. Sobral. 2006. The influence of Cu contamination on *Nereis diversicolor* bioturbation. *Mar. Chem.* 102: 148-158.
- François, F., K. Dalègre, F. Gilbert, and G. Stora. 1999. Specific variability within functional groups. Study of the sediment reworking of two Veneridae bivalves, *Ruditapes decussatus* and *Venerupis aurea* [Variabilité spécifique à l'intérieur des groupes fonctionnels. Etude du remaniement sédimentaire de deux bivalves Veneridae, *Ruditapes decussatus* et *Venerupis aurea*]. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Serie III* 322: 339-345.
- Gérino, M., R. C. Aller, C. Lee, J. K. Cochran, J. Y. Aller, M. A. Green, and D. Hirschberg. 1998. Comparison of different tracers and methods used to quantify bioturbation during a spring bloom: 234-thorium, luminophores and chlorophyll a. *Estuar. Coast. Shelf S.* 46: 531-547.
- Gérino, M., M. Frignani, C. Mugnai, L. G. Bellucci, D. Prevedelli, A. Valentini, A. Castelli, S. Delmotte, and S. Sauvage. 2007. Bioturbation in the Venice Lagoon: Rates and relationship to organisms. *Acta Oecol.* 32: 14-25.
- Gérino, M., G. Stora, and J.-P. Durbec. 1994. Quantitative estimation of biodiffusive and bioadvective sediment mixing: in situ experimental approach. *Oceanol. Acta.* 17: 547-554.
- Gilbert, F., S. Hulth, N. Strömberg, K. Ringdahl, and J.-C. Poggiale. 2003. 2-D optical quantification of particle reworking activities in marine surface sediments. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 285-286: 251-263.
- Klerks, P. L., D. L. Felder, K. Strasser, and P. W. Swarzenski. 2007. Effects of ghost shrimp on zinc and cadmium in sediments from Tampa Bay, FL. *Mar. Chem.* 104: 17-26.
- Krantzberg, G. 1985. The influence of bioturbation on physical, chemical and biological parameters in aquatic environments: a review. *Environ. Pollut.* 39: 99-122.
- 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.
- Landrum, P. F., D. C. Gossiaux, B. J. Eadie, M. B. Lansing, M. Leppänen, J. V. K. Kukkonen, S. D. Robinson, G. A. Burton, and M. Greenberg. 2004. Effect of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl on the reworking behavior of *Lumbriculus variegatus* exposed to contaminated sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 178-186.
- Maire, O., J. C. Duchêne, A. Grémare, V. S. Malyuga, and F. J. R. Meysman. 2007. A comparison of sediment reworking rates by the surface deposit-feeding bivalve *Abra ovata* during summertime and wintertime, with a comparison between two models of sediment reworking. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 343: 21-36.
- Martin, P., X. Boes, B. Goddeeris, and N. Fagel. 2005. A qualitative assessment of the influence of bioturbation in Lake Baikal sediments. *Global Planet. Change.* 46: 87-99.
- Matisoff, G. 1995. Effects of bioturbation on solute and particle transport in sediments. In H. E. Allen [ed.], *Metal contaminated aquatic sediments*. Ann Arbor Press.

- Matisoff, G., and X. Wang. 1998. Solute transport in sediments by freshwater infaunal bioirrigators. *Limnol. Oceanogr.* 43: 1487-1499.
- Mermillod-Blondin, F., G. Nogaro, T. Datry, F. Malard, and J. Gibert. 2005. Do tubificid worms influence the fate of organic matter and pollutants in stormwater sediments? *Environ. Pollut.* 134: 57-69.
- Mermillod-Blondin, F., and R. Rosenberg. 2006. Ecosystem engineering: the impact of bioturbation on biogeochemical processes in marine and freshwater benthic habitats. *Aquat. Sci. - Research Across Boundaries* 68: 434-442.
- Meysman, F. J. R., B. P. Boudreau, and J. J. Middelburg. 2003. Relations between local, nonlocal, discrete and continuous models of bioturbation. *J. Mar. Res.* 61: 391-410.
- Meysman, F. J. R., O. S. Galaktionov, B. Gribsholt, and J. J. Middelburg. 2006. Bioirrigation in permeable sediments: Advective pore-water transport induced by burrow ventilation. *Limnol. Oceanogr.* 51: 142-156.
- Mugnai, C., M. Frignani, L. G. Bellucci, M. Gérino, and S. Sauvage. 2003. Bioturbation experiments in the Venice Lagoon. *Hydrobiologia.* 494: 245-250.
- Nogaro, G., F. Mermillod-Blondin, F. François- Carcaillet, J. P. Gaudet, M. Lafont, and J. Gibert. 2006. Invertebrate bioturbation can reduce the clogging of sediment: an experimental study using infiltration sediment columns. *Freshwater Biol.* 51: 1458-1473.
- Officer, C. B., and D. R. Lynch. 1982. Interpretation procedures for the determination of sediment parameters from time-dependent flux inputs. *Earth. Planet. Sc. Lett.* 61: 55-62.
- Reible, D. D., V. Popov, K. T. Valsaraj, L. J. Thibodeaux, F. Lin, M. Dikshit, M. A. Todaro, and J. W. Fleeger. 1996. Contaminant fluxes from sediment due to Tubificid oligochaete bioturbation. *Water Res.* 30: 704-714.
- Rhoads, D. C. 1974. Organism-sediment relations on the muddy sea floor. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 12: 263-300.
- Rodriguez, P., M. Martinez-Madrid, J. A. Arrate, and E. Navarro. 2001. Selective feeding by the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* (Tubificidae, Clitellata). *Hydrobiologia.* 463: 133-140.
- Solan, M., B. D. Wigham, I. R. Hudson, R. Kennedy, C. H. Coulon, K. Norling, H. C. Nilsson, and R. Rosenberg. 2004. In situ quantification of bioturbation using time-lapse fluorescent sediment profile imaging (f-SPI), luminophore tracers and model simulation. *Mar. Ecol-Prog. Ser.* 271: 1-12.
- Soster, F. M., D. T. Harvey, M. R. Troksa, and T. Grooms. 1992. The effect of Tubificid oligochaetes on the uptake of zinc by Lake Erie sediments. *Hydrobiologia.* 248: 249-258.
- Sun, M., R. C. Aller, and C. Lee. 1991. Early diagenesis of chlorophyll-a in Long Island Sound sediments: a measure of carbon flux and particle reworking. *J. Mar. Res.* 49: 379-401.
- Waldbusser, G. G., and R. L. Marinelli. 2006. Macrofaunal modification of porewater advection: role of species function, species interaction, and kinetics. *Mar. Ecol-Prog. Ser.* 311: 217-231.
- Wheatcroft, R. A., I. Olmez, and F. X. Pink. 1994. Particule bioturbation in Massachusetts Bay: preliminary results using a new deliberate tracer technique. *J. Mar. Res.* 52: 1129-1150.
- Zheng, Y., R. Anderson, A. Van Geen, and M. Fleisher. 2002. Remobilization of authigenic uranium in marine sediments by bioturbation. *Geochim. Cosmochim. Acta* 66: 1759-1772.
- Zoumis, T., A. Schmidt, L. Grigороva, and C. W. 2001. Contaminants in sediments: remobilisation and demobilisation. *Sci. Total Environ.* 266: 195-202.



**CHAPITRE 3 :**  
**EFFETS DE L'URANIUM SUR LES**  
**MACRO-INVERTÉBRÉS BENTHIQUES**



### **3.1 INTRODUCTION**

Dans ce chapitre, sont rapportés les résultats relatifs à trois expériences différentes: les deux premières sont des bioessais d'écotoxicologie dont l'objectif était de tester les effets de l'uranium sur chacune des espèces étudiées, dans les conditions expérimentales définies pour l'ensemble du travail de doctorat (e.g. sédiments et eau d'origine naturelle, contamination du système *via* le compartiment sédimentaire, densités d'organismes, température). Alors qu'il existait des données antérieures pour *Chironomus riparius*, ce travail a par contre constitué la première évaluation des effets de l'uranium chez *Tubifex tubifex*.

Ces bioessais ont également permis de déterminer les concentrations en uranium à utiliser pour le reste des expériences. En effet, l'objectif principal de la thèse étant d'évaluer l'influence de la bioturbation sur le comportement biogéochimique de l'uranium, il était nécessaire de se placer dans des conditions sub-létales pour les macro-invertébrés bioturbateurs.

La troisième expérience répond directement au premier objectif spécifique de la thèse, à savoir évaluer l'impact d'une contamination d'un sédiment par de l'uranium sur l'activité de bioturbation des larves de *C. riparius* et/ou des vers *T. tubifex*.

### **3.2 ÉCOTOXICITÉ DE L'URANIUM SUR DES LARVES DE CHIRONOMUS RIPARIUS EXPOSÉES À DES SÉDIMENTS CONTAMINÉS**

#### **3.2.1 INTRODUCTION**

Afin de déterminer la toxicité de l'uranium sur *Chironomus riparius* dans les conditions expérimentales choisies pour ce travail de doctorat, le protocole expérimental utilisé par Dias (2005) pour un bioessai de 10 jours utilisant un sédiment artificiel et une eau reconstituée, a été adapté à celles-ci. Les critères d'effet mesurés ont été : la mortalité, la croissance, le développement larvaire et les malformations des pièces buccales. Les détails



méthodologiques et l'ensemble des résultats obtenus sont synthétisés dans le rapport de Master 1 de Sophie Portela (2005). Les points importants de ce travail sont présentés ici.

### 3.2.2 MÉTHODOLOGIE

Pour cette expérience, une gamme de seize concentrations en uranium a été testée : 0 – 3,4 – 5,1 – 7,7 – 12 – 17 – 26 – 39 – 58 – 88 – 130 – 198 – 300 – 440 – 670 et 1000  $\mu\text{g U g}^{-1}$  sédiment sec. Ceci a été réalisé au sein d'aquariums cylindriques de 5,6 cm de diamètre et 20 cm de hauteur, avec trois répliquats par concentration. Ces aquariums ont été maintenus à 21°C dans un grand bain-marie, sous un éclairage de photopériode 16H jour/ 8H nuit, et ont chacun reçu un bullage d'air constant pour maintenir une concentration en oxygène supérieure à 7 mg  $\text{L}^{-1}$ . Pour compenser les pertes d'eau dues à l'évaporation et à l'échantillonnage, le volume de la colonne d'eau a été maintenu constant par un ajustement quasi-journalier. Après quatre semaines d'équilibration, 35 larves de moins de 24 heures ont été introduites dans chaque aquarium, ce qui représente une densité d'environ 14 000 ind  $\text{m}^{-2}$ . Elles ont été nourries deux fois au cours du bioessai (5<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> jour) avec 2 mL d'une solution de Tetramin® à 10 g  $\text{L}^{-1}$ . Après 12 jours d'exposition, les larves survivantes, alors au stade 3 ou 4 de leur développement, ont été récupérées par un tamisage des sédiments à 500  $\mu\text{m}$ , comptabilisées puis conservées chacune séparément dans un tube eppendorf avec de l'éthanol à 70%. Pour le reste des analyses, chaque individu a d'abord été observé sous une loupe binoculaire reliée à un dispositif d'analyse d'images (SPOT). La longueur totale des larves et la largeur de la capsule céphalique mesurées à partir de ces images (sur le logiciel ImageJ) ont permis de déterminer respectivement les critères de croissance et de développement larvaire. Un montage entre lame et lamelle a été ensuite réalisé pour observer la capsule céphalique sous un stéréomicroscope ( $\times 10-40$ ) et ainsi caractériser et compter le nombre de malformations présentes sur les dents du mentum et des mandibules, selon la méthode de Vermeulen et al. (1998). Le pourcentage de larves malformées et l'intensité des malformations ont ainsi été pris en compte.

Les concentrations létales ( $\text{LC}_{50}$ ,  $\text{LC}_{20}$ ) ont été déterminées en simulant les données de survie avec la macro REGTOX Excel basée sur l'algorithme de Marquardt (<http://eric.vindimian.9online.fr>, Arzul et al. 2006). Les intervalles de confiance à 95% ont été estimés par bootstrap. Le reste des analyses statistiques a été réalisé sur le logiciel SPSS 9.0. Après avoir testé la normalité des données par un test de Kolmogorov-Smirnov, et

l'homogénéité des variances par un test de Levene, les effets de l'uranium sur la mortalité et la longueur des larves (*i.e.* critère de croissance) ont été analysés par des ANOVAs à un facteur, suivies de tests post-hoc de Fisher. Pour les effets sur le développement larvaire et les malformations, des tests de Kruskal-Wallis ont permis d'analyser les données, car elles ne présentaient pas une distribution normale, même après transformation.

### 3.2.3 RÉSULTATS

L'uranium a entraîné un effet significatif sur la survie des larves pour les trois concentrations les plus élevées, 440, 670 et 1000  $\mu\text{g U g}^{-1}$  sédiment sec (Fig. 1 ; ANOVA,  $p=0,004$  ; test LSD Fisher,  $p<0,05$ ). Les concentrations létales  $CL_{50}$  et  $CL_{20}$  étaient respectivement de 856 ( $IC_{95\%}=669-1170$ ) et 424 ( $IC_{95\%}=236-646$ )  $\mu\text{g U g}^{-1}$  sédiment sec.

Par contre, aucun effet significatif n'a été observé sur la croissance, le développement larvaire et les malformations (données non présentées).

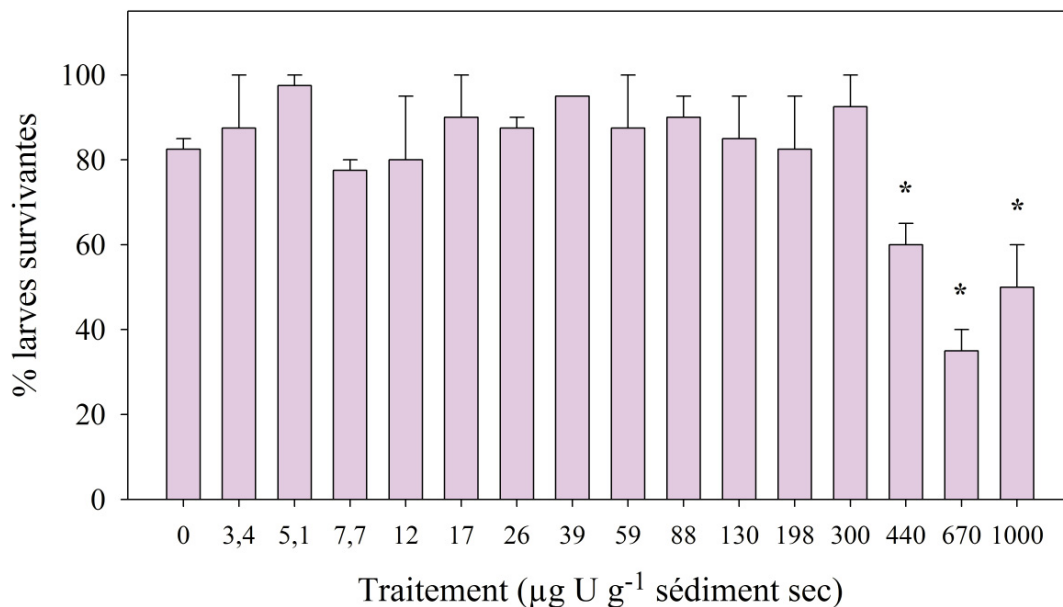


Figure 13 - Pourcentage de larves de *Chironomus riparius* vivantes après douze jours d'exposition à différentes concentrations en uranium dans les sédiments.

### 3.2.4 DISCUSSION

Avec un pourcentage de survie supérieur à 70% et une taille moyenne des larves de 11,7 ( $\pm 0,5$ ) mm dans les aquariums contrôles après douze jours d'exposition, les conditions expérimentales de ce bioessai étaient optimales pour mesurer les effets de l'uranium (Bonnet 2000, Ristola et al. 1999). Les résultats obtenus dans ces conditions montrent que les larves de *Chironomus riparius* ont été relativement peu sensibles à l'uranium. En effet, une baisse significative du taux de survie n'a été mesurée que pour les trois concentrations les plus fortes ( $> 300 \mu\text{g U g}^{-1}$  sédiment sec), et aucun autre paramètre n'a été affecté par la contamination des sédiments.

Cependant, Dias et al. (2008) ont montré des effets significatifs de l'uranium sur la même souche de *C. riparius* (même élevage) pour des concentrations testées considérablement plus faibles ( $< 24 \mu\text{g U g}^{-1}$  sédiment sec). Ces auteurs ont estimé une  $CL_{50}$  de 5,30 ( $IC_{95\%}=3,94-7,25$ )  $\mu\text{g U g}^{-1}$  sédiment sec et une  $CL_{20}$  de 2,49 ( $IC_{95\%}=1,48-4,27$ )  $\mu\text{g U g}^{-1}$  sédiment sec. L'uranium a entraîné des effets significatifs sur la survie et le développement larvaire à partir de 6,07  $\mu\text{g U g}^{-1}$  sédiment sec, et sur la croissance à partir de 2,97  $\mu\text{g U g}^{-1}$  sédiment sec. De plus, un effet dose-réponse inverse a été observé pour l'apparition de malformations au niveau des pièces buccales : le taux de malformations a diminué avec l'augmentation de la concentration en uranium, avec un effet significatif à partir de 6,07  $\mu\text{g U g}^{-1}$  sédiment sec. Pour ce dernier résultat, étant donné que la mesure des malformations n'a pu être réalisée que sur les individus ayant survécu après 10 jours d'exposition, les auteurs suggèrent un effet de sélection dans la population de *C. riparius*, s'expliquant par la survie des individus les mieux adaptés (non malformés).

Malgré des niveaux de contamination 10 à 100 fois supérieurs, de tels effets n'ont pas été observés dans la présente étude. Ceci peut très probablement s'expliquer par une différence de biodisponibilité de l'uranium dans les deux bioessais, liée à la nature des sédiments et de l'eau utilisés. Parmi les paramètres les plus influents, le pH et la dureté de l'eau étaient favorables à une plus forte biodisponibilité dans le bioessai de Dias et al. (2008). En effet, le pH était proche de la neutralité, mais surtout l'eau était beaucoup plus douce que dans le bioessai présenté ici (pH=8.6, dureté=152 Eq mg  $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ). L'utilisation d'un sédiment artificiel

(sable de fontainebleau + cellulose) a pu également limiter la complexation de l'uranium avec des ligands organiques, et donc augmenter sa biodisponibilité.

### 3.2.5 CONCLUSION

Ce bioessai a permis de montrer que les résultats obtenus dans un cadre expérimental donné doivent être considérés avec prudence. Alors que des effets significatifs avaient pu être mis en évidence avec des concentrations inférieures à  $10 \mu\text{g U g}^{-1}$  sédiment sec en utilisant des conditions proches de tests normalisés (Dias et al. 2008), ceux-ci n'ont pas été observés pour des concentrations jusqu'à 100 fois supérieures en appliquant le même protocole expérimental à des sédiments d'origine naturelle. De même, Dias et al. (en préparation) ont obtenus des résultats très différents en renouvelant leurs tests sur une autre souche de *C. riparius* avec une eau de composition différente ( $CL_{50}=562 \mu\text{g U g}^{-1}$  sédiment sec, inhibition de croissance à partir de  $256 \mu\text{g U g}^{-1}$  sédiment sec). Pour préciser quels paramètres sont les plus influents sur la biodisponibilité et la toxicité de l'uranium pour des larves de *C. riparius*, il serait pertinent de mener plusieurs bioessais avec différents types de sédiments (*e.g.* granulométrie, teneur en MO) et des conditions variables de pH, de composition ionique de l'eau, et de densités d'organismes. Cependant, par rapport à la problématique générale de cette thèse, les résultats de ce bioessai sont satisfaisants puisqu'ils ont montré une certaine tolérance des larves dans les conditions expérimentales choisies. Afin d'évaluer l'influence de la bioturbation sur le comportement géochimique de l'uranium, il a donc été décidé d'utiliser par la suite des concentrations inférieures à la  $LC_{50}$  mesurée dans ce bioessai. La concentration de  $600 \mu\text{g U g}^{-1}$  sédiment sec a été retenue comme la concentration maximale à tester, ce qui correspond à plus de 100 fois le niveau moyen rencontré dans les écosystèmes d'eau douce et qui est représentatif de concentrations mesurées dans des sites contaminés (*e.g.* mines d'uranium).

### **3.3 ÉCOTOXICITÉ DE L'URANIUM SUR DES VERS TUBIFEX** **TUBIFEX EXPOSÉS À DES SÉDIMENTS CONTAMINÉS**

- Présentation sous forme d'article -

**État actuel de la publication** – Acceptée pour publication dans la revue *Ecotoxicology and Environmental Safety* (sous presse).

**Titre en français** – Ecotoxicité de l'uranium sur des vers *Tubifex tubifex* (Annelida, Clitellata) exposés à des sédiments contaminés.

**Résumé en français** – Dans les écosystèmes d'eau douce, les sédiments représentent un compartiment d'accumulation pour les polluants métalliques comme l'uranium. Cependant, ils sont aussi l'habitat privilégié de nombreuses espèces de macro-invertébrés benthiques qui influencent directement la structure et le fonctionnement de ces milieux. En conséquence, l'uranium accumulé dans les sédiments peut affecter ces organismes. L'objectif de cette étude en laboratoire était d'évaluer l'écotoxicité de l'uranium sur l'espèce *Tubifex tubifex* avec comme critères d'effet, la mortalité, les modifications morphologiques (autotomie, malformations), la perte de biomasse, la bioaccumulation et l'activité de creusement du sédiment. Après 12 jours d'exposition à des sédiments contaminés (0-5980  $\mu\text{g U g}^{-1}$  poids sec), l'uranium a entraîné des effets significatifs sur les taux de survie et d'autotomie pour les plus fortes concentrations testées ( $> 599 \mu\text{g U g}^{-1}$  poids sec,  $\text{CL}_{50}=2910 \mu\text{g U g}^{-1}$  poids sec,  $\text{CE}_{50/\text{autotomie}}=3580 \mu\text{g U g}^{-1}$  poids sec). Un effet Hormesis a été observé pour la variation de biomasse dans le temps, et l'activité de creusement a été réduite, avec notamment une distribution plus superficielle du réseau de galeries. Cette étude représente la première évaluation de l'impact de l'uranium sur *T. tubifex* à des concentrations que l'on peut rencontrer dans l'environnement, comme par exemple près d'anciens sites miniers.

**Mots-clés** : bioessai avec du sediment, métaux lourds, macro-invertébrés, activité de creusement, autotomie, effet Hormesis, malformations, uranium, *Tubifex tubifex*.



Contents lists available at ScienceDirect

## Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ecoenv](http://www.elsevier.com/locate/ecoenv)

## Ecotoxicity of uranium to *Tubifex tubifex* worms (Annelida, Clitellata, Tubificidae) exposed to contaminated sediment<sup>☆</sup>

Sandra Lagauzère<sup>1</sup>, Raphaële Terrail, Jean-Marc Bonzom<sup>\*</sup>

Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie, Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN), DEI/SECRE, Cadarache bât. 186, BP 3, 13115 Saint-Paul-lez-Durance, Cedex, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 November 2007

Received in revised form

23 April 2008

Accepted 27 April 2008

Available online 13 June 2008

#### Keywords:

Sediment bioassay

Heavy metals

Macroinvertebrates

Burrowing activity

Autotomy

Hormetic effect

Malformations

Uranium

*Tubifex tubifex*

### ABSTRACT

In freshwater ecosystems, sediments act as an accumulation compartment for metallic pollutants as uranium. However, they are also the habitats of numerous benthic macroinvertebrates that directly influence the structure and functioning of such environments. Consequently, these organisms could be affected by uranium. This laboratory study aimed to assess the ecotoxicity of uranium on *Tubifex tubifex* through 12-day exposure to contaminated sediment (0–5980  $\mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt). At high concentrations ( $> 599 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt), malformations were observed, and survival, biomass and burrowing activity were all reduced. This relative high resistance in polluted environments can be explained mainly by the implementation of several processes as autotomy, regeneration ability, increased production of mucus, a hormetic effect on biomass and a probable strategy for avoiding the contaminated sediment. This study represents the first assessment of uranium impact on *T. tubifex* at realistic concentrations in sediments near mining sites.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Uranium (U) is a radioactive heavy metal that occurs naturally in various solid or diluted forms. However, certain human activities have caused increased uranium concentration in the environment, particularly in freshwater ecosystems (Antunes et al., 2007; Baborowski and Bozau, 2006; Saari et al., 2007). Sediments in such ecosystems may act as major storage compartment for uranium, which, like many other metals, will tend to accumulate there. Natural uranium concentrations in freshwater sediments range below  $10 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt (Kurnaz et al., 2007 and references therein), but higher levels have been measured in some specific sites. For example, maximum concentrations of  $450 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt (Lottermoser et al., 2005),  $810 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt (Lozano et al., 2002),  $5650 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt (Neame et al., 1982) and  $18,000 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt (Hart et al., 1986)

have been detected near mining sites in Australia, Spain and Canada.

Sediments provide a habitat for various benthic macroinvertebrates that have an important influence on the structure and functioning of aquatic ecosystems. Their feeding and burrowing activities may lead individuals to be chronically exposed to uranium-associated sediment during a specific developmental stage or during their entire life cycle. Given its low specific activity ( $2.53 \times 10^4 \text{ Bq g}^{-1} \text{ U}$ ), natural uranium is considered to be more chemotoxic than radiotoxic in freshwater ecosystems (Kuhne et al., 2002). Nonetheless, its radiotoxicity must not be dismissed (Thomas and Liber, 2001).

Although it was classically performed for other heavy metals, few studies have assessed the ecotoxicity of uranium on freshwater benthic macroinvertebrates via an exposure to contaminated sediments. Among them, a report from Environnement Canada (2003) presents the results of two different experiments. In the first one,  $\text{LC}_{50}$  (i.e., concentration leading to 50% of mortality) of 57 and  $436 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt were, respectively, measured for juveniles and adults of the epibenthic amphipod *Hyaella azteca*, after 14 days of exposure, suggesting a higher sensitivity of individuals in early stages of their development. The second bioassay, carried out on *Chironomus tentans* (Diptera) larvae after 10 days of exposure, showed a lower toxicity of uranium for this species ( $\text{LC}_{50} = 10,500 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt). Addi-

<sup>☆</sup> The work described in this manuscript did not involve any humans or experimental vertebrate animals. It involved invertebrate animals. The study was conducted in accordance with national and institutional guidelines for the protection of human subjects and animal welfare.

<sup>\*</sup> Corresponding author. Fax: +33 4 42 19 91 51.

E-mail address: [jean-marc.bonzom@irsn.fr](mailto:jean-marc.bonzom@irsn.fr) (J.-M. Bonzom).

<sup>1</sup> The authors contributed equally to this work and should be considered co-first authors.

tionally, significant effects on growth were reported in this study ( $EC_{50} = 2695 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt). Higher sensitivity was reported for *Chironomus riparius* larvae during a 10-day bioassay: survival of the larvae began to be affected from  $6.07 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt ( $LC_{50} = 5.30 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt), while the sizes of individuals began to be reduced from  $2.97 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt. Delays of development and mouthpart deformities were also observed (Dias et al., 2008). To be completed, it should be noted the use of Chironomid larvae (*C. riparius* and *Chironomus crassiforceps*) as biological models in the bioassessment of effluents and sediments coming from former uranium mines in Portugal (Antunes et al., 2007) and in Australia (Peck et al., 2002), and finally, an *in situ* enclosure experiment in two contaminated lakes in Canada with *H. azteca* (Robertson and Liber, 2007).

Among benthic macroinvertebrates, *Tubifex tubifex* worms and, more generally, oligochaetes Tubificidae, are one of the most abundant and ubiquitous groups in freshwater ecosystems (Mosleh et al., 2006; Wiederholm et al., 1987). These organisms, which live at the sediment–water interface, can colonize a wide range of substrata, even with very high densities, up to as many as 6,000,000 ind.  $\text{m}^{-2}$  (Palmer, 1968). These burrowing worms come into contact with every phase of the benthic environment (water and particles), both cutaneously and via the trophic pathway (ingestion of sediment particles). In fact, they live partially submerged in the sediment, with the posterior section of their body free in the water column so as to respire by cutaneous diffusion. Tubificid worms burrow into the sediment, digging galleries in order to ingest sediment particles below the surface and to feed on the fine organic matter found therein (microphagia). These particles then pass through the worm's digestive tract and are rejected at the surface of the sediment in the form of faecal pellets (Robbins et al., 1979). The bioturbation activity of these worms generally favours the exchange of matter between the water column and the sediment (Matisoff, 1995).

The ability of Tubificid worms to survive in highly polluted, toxic and/or oxygen-poor ecosystems under a wide range of conditions (e.g., from 0 to 30 °C) (Guérin, 1994; Walker, 1970), together with their intermediate position in the trophic network and the ease with which they can be bred in the laboratory, are the main factors for their use as standard models in ecotoxicology experiments and as environmental pollution indicators (Chapman et al., 1982; Fargasova, 1998; Khangarot, 1991; Reynoldson et al., 1991; Rodriguez and Verdonshot, 2002; Wiederholm et al., 1987). Among the most important physiological adaptations observed in these organisms are the autotomy and regeneration of their caudal part, very efficient processes of detoxification for eliminating pollutants that accumulate in their extremities (Bouché et al., 2000; Lucan-Bouché et al., 1999; Meller et al., 1998).

Concerning the *T. tubifex* species, any study dealing with uranium toxicity has yet been reported. A number of ecotoxicity tests have been performed for other metals (e.g., copper, cadmium, zinc, lead, mercury) (Chapman et al., 1982; Fargasova, 1998; Milani et al., 2003; Rathore and Khangarot, 2003) and organic pollutants (Meller et al., 1998; Mosleh et al., 2006, 2005; Raj et al., 2005), most of which involve exposure to contaminated water. Although the life mode of these organisms is closely related to the sediment, few bioassays were carried out with sediment (Martinez-Madrid et al., 1999; Reynoldson et al., 1991; Vecchi et al., 1999; Wiederholm et al., 1987). It was demonstrated that these worms can bioaccumulate metals from water and/or sediments, with relative high rates in some cases (Bouché et al., 2000; Ciutat et al., 2005). The relative importance of each route of exposure depends on the considered metal and physicochemical conditions (Redeker et al., 2004). Although bioaccumulation represents a risk for the predators (Singh et al., 2007), the bioconcentration in worms generally remains low, due to efficient detoxification processes (Bouché et al., 2000).

The main objective of our study has therefore been to fill the knowledge gap regarding the ecotoxicity of uranium in *T. tubifex* worms exposed to artificially contaminated natural sediment. To this end, a laboratory bioassay was carried out to assess the effects of uranium on the survival and morphology of individuals (including autotomy and malformations), bioaccumulation, biomass and burrowing behaviour (digging galleries in the sediment) among a population of *T. tubifex* worms exposed to contaminated sediment during a short period (12 days).

## 2. Material and methods

### 2.1. Sediment and water preparation

The sediment and water used in our experiments were sampled from a closed channel of a lake on the Verdon River (Lac d'Esparron, south-eastern France). This sampling site was chosen because of the nature of the sediment (fine mud) and the quality of water (low turbidity, no pollution). Sediment was sieved through a 2-mm mesh to remove coarse fragments (e.g., stones, leaves and waste) and macrofauna, and kept frozen at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for a week in order to kill most of organisms that may have been present. After thawing and homogenizing (mixing by mechanical stirring), the sediment was kept at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  until setting up the aquaria. The water was filtered through a  $20\text{-}\mu\text{m}$  filter and then stored at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The main characteristics of the sediment and water are given in Table 1.

### 2.2. Origin and acclimatization of the worms

Tubificidae worms of the species *T. tubifex* (identification confirmed by N. Giani from Toulouse University, France) were obtained from a commercial breeder (Greblay and Fils, Arry, France). They were acclimated to the experimental conditions for 2 weeks, and fed daily with  $3\text{ mg ind.}^{-1}$  of TetraMin<sup>®</sup> flakes (Tetra Werke, Melle, Germany) from a suspension of  $10\text{ g L}^{-1}$ . Before the beginning of the experiment, they were placed in artificial sand without food for 48 h.

### 2.3. Contamination of the sediment and setting up the aquaria

Seven 15 L beakers of sediment were prepared: one for a control group to which no contaminant was added, and six others that were contaminated with a solution of uranyl nitrate  $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, France) to obtain nominal concentrations of 150, 300, 600, 1200, 2400 and  $4800\text{ }\mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt. All the beakers of sediment were hand-shaken for 2 min each day for 2 weeks to

**Table 1**

Principal physicochemical characteristics of the sediment and the water (Lac d'Esparron, Verdon, southeast France, fraction  $< 2\text{ mm}$ )

Sediment		Water	
Grain size fraction (%)			
<2 $\mu\text{m}$	9.6		
2–20 $\mu\text{m}$	14.2		
20–50 $\mu\text{m}$	32.9		
50–200 $\mu\text{m}$	41.8		
>200 $\mu\text{m}$	1.5		
Organic carbon (%)	2.4		
Total calcite $\text{CaCO}_3$ (%)	69.8	Hardness (Eq $\text{mg CaCO}_3\text{ L}^{-1}$ )	152
pH	8.2	pH	8.6
Concentration ( $\text{g kg}^{-1}$ )		Concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ )	
Aluminum (Al)	11.5	Sodium (Na)	18.0
Calcium (Ca)	297	Calcium (Ca)	52.0
Iron (Fe)	7.06	Copper (Cu)	<0.1
Manganese (Mn)	0.13	Magnesium (Mg)	5.32
Magnesium (Mg)	3.18	Potassium (K)	3.44
Sodium (Na)	1.43	Iron (Fe)	<0.1
Nitrates (N– $\text{NO}_3$ )	0.001	Aluminum (Al)	<0.1
Ammonium (N– $\text{NH}_4$ )	0.029	Zinc (Zn)	<0.1
Phosphorus (P– $\text{P}_2\text{O}_5$ )	<0.002	Manganese (Mn)	<0.1
Chlorides (Cl)	0.016	Chromium (Cr)	<0.1
Sulfur (S)	0.125	Cobalt (Co)	<0.1
		Nickel (Ni)	<0.1
		Cadmium (Cd)	<0.1
		Lead (Pb)	<0.1

ensure that the contamination was homogeneous. The sediment from each beaker was then divided between six identical aquaria (height = 4 cm, volume = 80 cm<sup>3</sup>), i.e., 42 aquaria in all for the entire bioassay. One hundred and twenty millilitre of filtered water was added to each, resulting in a water column 6 cm high. All aquaria were randomly placed in a large tank kept at a constant temperature of 20.8 ( $\pm 0.1$ ) °C and received a gentle aeration through the water column. Losses due to evaporation and sampling were systematically compensated by adding filtered water. Prior to inoculation, the aquaria were left to equilibrate for 2 weeks.

#### 2.4. Bioassay procedure

At day 0, for each uranium treatment (0, 150, 300, 600, 1200, 2400 and 4800  $\mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt), six replicate aquaria were colonized with a *T. tubifex* density of 60,000 ind. m<sup>-2</sup> (i.e., 150 individuals), reflecting natural ecological conditions. The individuals added in each aquarium were chosen according to their body length (> 1 cm) from a mixture of mature and immature worms. Three replicates were devoted to assessing the effects of uranium on survival, autotomy and burrowing activity; while the three others were used to test its effects on biomass and bioaccumulation.

Following exposure for 12 days, the worms that were still alive were collected by heating the aquaria in a water bath (50 °C, 45–55 min), which caused them to rise to the surface of the sediment (OECD, 2005). They were then carefully collected using a pipette and placed in a crystallizer. Trial collections carried out beforehand made it possible to ensure that heating would not have any effect on the survival or morphology of the worms. This method was preferred to a classical sieving of sediments because of safety rules linked to the handling of radionuclides in laboratory. Relative high quantities of water required for sieving would provide more difficulties to eliminate it as nuclear wastes.

The sediment used was sufficiently rich in organic matter, so that it was not necessary to feed the worms during the experiment.

#### 2.5. Physical and chemical measurements

The temperature, pH, and amount of dissolved oxygen in the overlying water of the aquaria were measured on days 0 (addition of organisms), 7 and 12. Total uranium concentration was assessed by ICP-AES (Optima 4300 DV, Perkin-Elmer, USA) from acidified (2% HNO<sub>3</sub>) water samples collected when the aforementioned measurements were taken. In order to indirectly estimate the release of uranium from the sediment into the overlying water, the ratio between the total uranium concentrations in the water column on days 12 and 0 was used to calculate a variation factor ('uranium release factor') of this concentration over the entire duration of the experiment. Total uranium concentrations were also determined in the sediment before setting up aquaria and at the end of the experiment (day 12). After drying (at 60 °C for 48 h), sediment samples were mineralized by HNO<sub>3</sub>, HCl and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> additions to be analysed by ICP-AES (Dias et al., 2008). In this study, all reagents were of analytical grade (Sigma-Aldrich, USA), and recommended for metals analysis by ICP-AES. All the dilutions were made in ultra pure water.

#### 2.6. Biological measurements

##### 2.6.1. Survival

The living worms were counted at the end of the test (day 12). Organisms that reacted with movement to physical stimulation (contact with forceps) were considered to be alive. The survival rate was obtained using the ratio (number of worms alive on day 12/number of worms put into the aquarium on day 0). The worms were then placed in a Petri dish containing filtered lake water for performing the next series of measurements.

##### 2.6.2. Autotomy and malformations

The percentage of worms that displayed an autotomy reflex was determined according to the ratio (number of autotomized worms/number of worms collected on day 12). Each individual was then placed in a separate Petri dish containing filtered lake water to observe its morphology. The number of individuals with a malformation among the autotomized worms was thus quantified, and the different types of malformations were identified qualitatively. To follow the potential regeneration process, each worm was afterwards photographed in its own Petri dish using a standard binocular magnifier (10 ×, 20 ×, 45 ×) once a day for 8 days.

##### 2.6.3. Change in biomass

After collecting the worms by heating the remaining aquaria on day 12, they were gently cleaned from sediment particles with forceps and weighed using a precision balance ( $1 \pm 0.0001$  g). The difference between this weight and the biomass originally placed in the aquarium was then calculated.

##### 2.6.4. Bioaccumulation

After 24 h of depuration in tap water at ambient temperature (22–25 °C), the worm samples (i.e., all the worms retrieved at day 12 in each aquarium for biomass measurements) were dried at 60 °C for 48 h, then mineralized to measure total uranium concentration by ICP-AES (Optima 4300 DV, Perkin-Elmer). The mineralization of each sample consisted of addition of 5 mL of 65% HNO<sub>3</sub> and 5 mL of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, followed by heating at 95 °C during two cycles of 90 min. After complete evaporation, the residue was resuspended in 10 mL of 2% HNO<sub>3</sub> and let at ambient temperature for 24 h. Therefore, the sample was filtered on 0.45  $\mu\text{m}$  (Minisart<sup>®</sup>, filter of cellulose acetate) to be analysed by ICP-AES. The quality control sample was prepared by adding a known concentration of U to mineralized *T. tubifex*; this preparation was necessary because no certified biological material was available for uranium measurement by ICP-AES in aquatic organisms.

##### 2.6.5. Burrowing activity: excavating galleries in the sediment

The worms's burrowing activity in the sediments was estimated indirectly by measuring the 2-D total length of the gallery network burrowed out by the worms, from the aquarium side (similar method as Rodriguez et al., 2006). Each aquarium was photographed from one side on days 3 and 12. The photographed side was chosen at random as there was no visible difference between any of the sides. Day 3 was taken as the initial state for these observations, because the worms were well established in the microcosm by that time. Using these photographs, the total length of the gallery network was measured across the entire sediment column, and also according to the depth, by dividing the height of the sediment into four layers of 1-cm thickness. These measurements were performed using an electronic curvimeter (Silva, Sweden). Additionally, photographs were taken from the top of the aquaria to observe the removal of reduced sediments, which appear generally darker than oxidized surface sediments.

##### 2.6.6. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the STATISTICA software package (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Before each analysis, the normality (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of data variance (Levene's test) were tested (Zar, 1999). Non-parametric tests were applied when these two conditions were not found. A significance level of 5% was applied to all analyses. The effects of uranium on survival and autotomy rates were analysed using the  $\chi^2$ -test (comparing each treatment stage to the control group) with a Bonferroni correction. Lethal concentrations (LC) and effective concentrations (EC) were determined from initial uranium concentrations measured in sediment samples using the REGTOX Excel macro based on the Marquardt algorithm (<http://eric.vindimian.9online.fr>, Arzul et al., 2006). A 95% confidence interval (CI<sub>95%</sub>) was estimated by bootstrapping. Fisher's exact test, together with a Bonferroni correction, was used to assess the effects of uranium on the frequency of malformed individuals. A one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a multiple comparison test (Newman-Keuls test) (Zar, 1999) was performed to gauge the effects of uranium on biomass and on the uranium release factor. The relations between bioaccumulation measurements and the uranium concentrations in both the water column and the sediment were assessed by using Pearson correlations. The total length of the gallery network was analysed by analysis of variance with repeated measures (RM-ANOVA) followed by a Newman-Keuls multiple comparison test. In the text, we indicate the mean  $\pm$  S.D.

### 3. Results

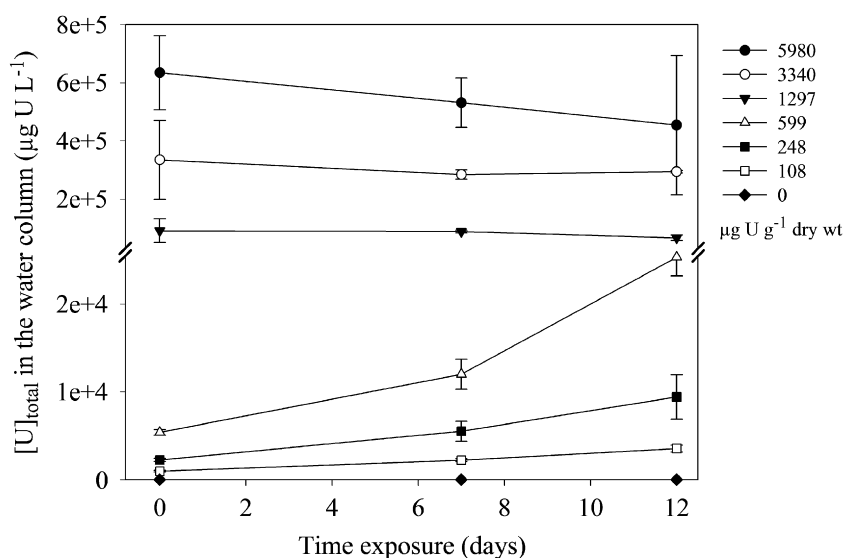
#### 3.1. Physical and chemical measurements

The dataset from all of the aquaria shows that the temperature was maintained at 20.8 °C ( $\pm 0.1$ ), the dissolved oxygen concentration at 8 mg L<sup>-1</sup> ( $\pm 0.2$ ) and pH at 8 ( $\pm 0.2$ ) throughout the experiment. No significant treatment-related differences were observed for any of these water quality parameters on any of the sampling days (ANOVA,  $P > 0.05$ ).

Before setting up the aquaria, the initial uranium concentrations in the sediments of the progressively U-enriched contamination beakers were 0, 108, 248, 599, 1297, 3340 and 5980  $\mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt, respectively. These concentrations differed from nominal concentrations with a deviation of 0%, -27%, -17%, -0.2%, +8.1%, +39% and +24%, respectively. Actual initial concentrations are used throughout the text and in figures.

The total uranium concentration in the water column significantly increased over time in the 108, 248 and 599  $\mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt treatments, with a significant uranium release factor between day 12 and day 0 of 3.8 ( $\pm 0.5$ ), 4.1 ( $\pm 0.9$ ) and 4.8 ( $\pm 0.8$ ),





**Fig. 1.** Evolution of total uranium concentrations in the water column during the 12-day experiment for the seven experimental treatments (initial uranium concentrations in the sediment). Means  $\pm$  S.D. ( $N = 3$ ). Analysis of the data shows significant uranium release factors between days 0 and 12 for 108, 248 and 599  $\mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt treatments ( $P < 0.001$ , one-way ANOVA;  $P < 0.001$ , Newmans–Keuls test).

respectively (one-way ANOVA:  $F_{6,13} = 17.64$ ;  $P < 0.001$ ; Newmans–Keuls test:  $P < 0.001$ ). For the highest concentrations, the uranium concentrations remained relatively stable and the release factors were lower than 1 (Fig. 1).

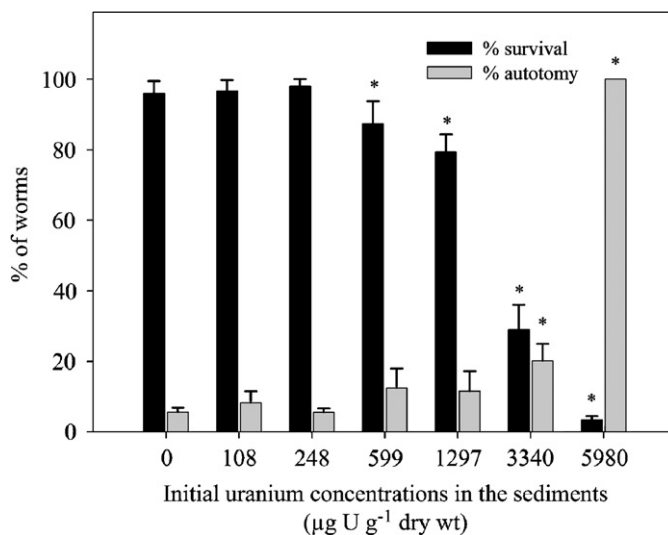
### 3.2. Survival

In the control aquaria, 96% ( $\pm 3.5$ ) of the *T. tubifex* worms survived the duration of the experiment. Starting at 599  $\mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt, the survival rate fell significantly as the uranium concentration in the sediment increased ( $\chi^2 = 7.37$ ;  $P < 0.01$ ) (Fig. 2). For the highest concentration (5980  $\mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt), only 5 of the 150 worms initially placed in the aquarium survived. The LC values were  $\text{LC}_{20} = 1778$  ( $\text{CI}_{95\%} = 1222\text{--}2575$ ) and  $\text{LC}_{50} = 2910$  ( $\text{CI}_{95\%} = 2419\text{--}3618$ )  $\mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt.

### 3.3. Autotomy and malformations

In the control aquaria, the *T. tubifex* autotomy rate was 5.6% ( $\pm 1.3$ ). This rate is significantly higher for the two highest concentrations (3340 and 5980  $\mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt), reaching 100% in the latter case ( $\chi^2 = 7.43$  and 54.12, respectively;  $P < 0.01$ ) (Fig. 2). The concentration at which half of the worms were affected by autotomy was  $\text{EC}_{50} = 3580$  ( $\text{CI}_{95\%} = 3469\text{--}3721$ )  $\mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt.

According to Fisher's exact test, a significant rise in the frequency of individuals with a malformation (100%) was observed at the highest concentration tested (5980  $\mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt) (Fisher's exact test:  $P < 0.01$ ). It should be noted that no individual with a malformation was observed in the control aquaria. Although this could not be statistically analysed given the low sample group ( $< 8$  individuals per microcosm), malformations were observed for all the uranium treatments on the first day of observation and worsened in size and number over the subsequent 8 days of observation. As illustrated in Fig. 3, the most typical malformations were deformities of the prostomium (e.g., formation of two heads) and epidermal excrescences (non-characterized). During these observations, regeneration of the caudal part clearly occurred in all the autotomized worms that survived, though it was not possible to statistically quantify this. Autotomy and regeneration of the anterior part was scarcely observed ( $< 5$  individuals).



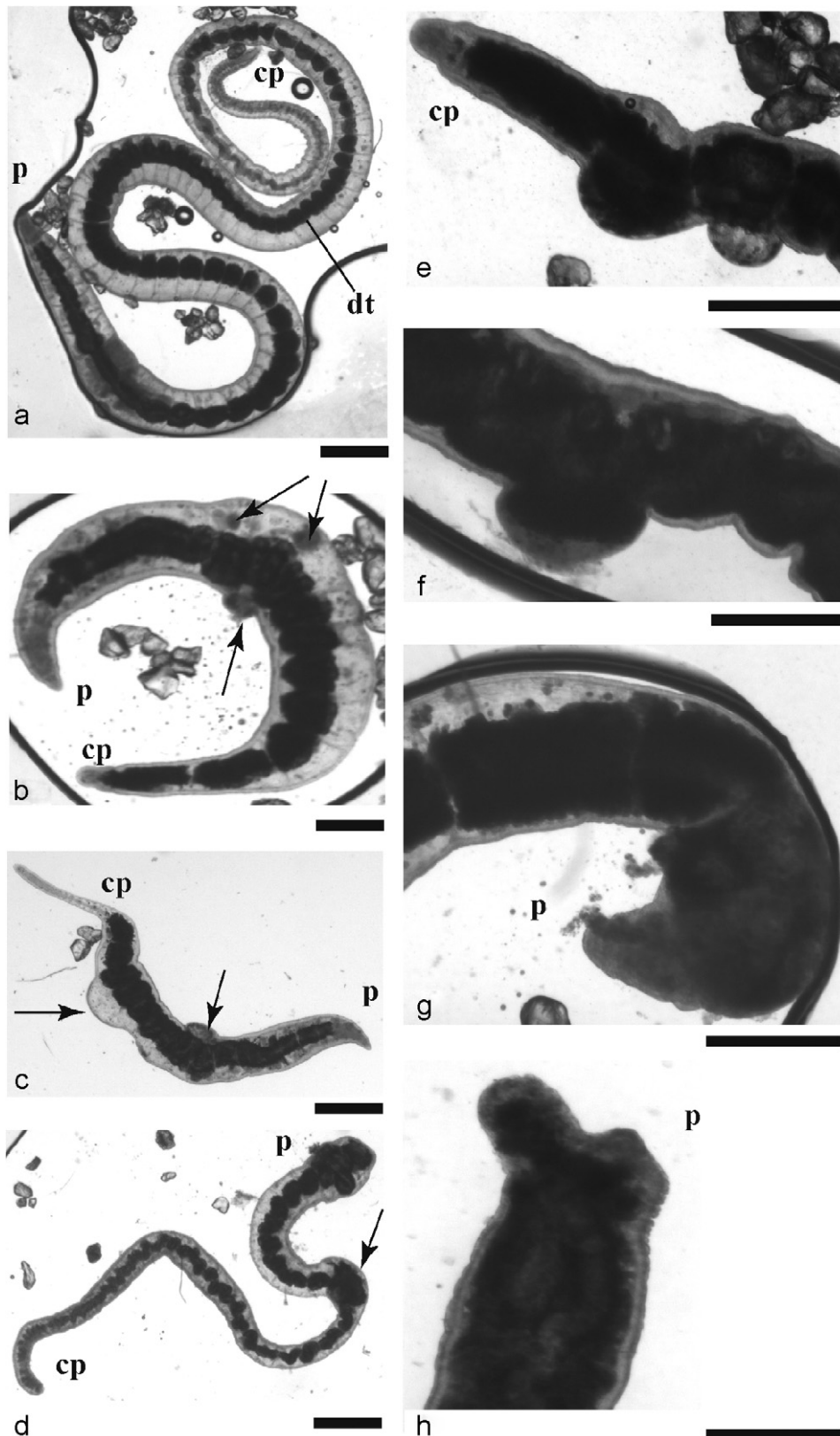
**Fig. 2.** Percentage of surviving and autotomized *Tubifex tubifex* worms after 12-day exposure to the seven experimental treatments (initial uranium concentrations in the sediment). Means  $\pm$  S.D. ( $N = 3$ ). Stars correspond to significant differences with the control group ( $\chi^2$ -tests,  $P < 0.01$ ).

### 3.4. Biomass

Biomass increased significantly during the experiment only at the lowest concentration tested (108  $\mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt) (ANOVA:  $F_{6,12} = 1.29$ ;  $P < 0.001$ ; Newman–Keuls test:  $P < 0.05$ ). However, a significant loss of biomass was observed at the two highest concentrations (3340 and 5980  $\mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt) (Newman–Keuls test:  $P < 0.01$ ) (Fig. 4).

### 3.5. Bioaccumulation

Uranium bioaccumulation in the *T. tubifex* worms increased with the degree of contamination. Significant positive correlations were revealed with uranium concentrations in both the water column ( $R^2 = 0.99$ ,  $F = 444$ ,  $P = 0.000$ ; Fig. 5a) and the sediments ( $R^2 = 0.94$ ,  $F = 78$ ,  $P = 0.003$ ; Fig. 5b). At the highest



**Fig. 3.** Examples of *Tubifex tubifex* malformations after 12-day exposure to sediment contaminated with uranium: (a) morphology of a non-exposed worm with intact prostomium (p), caudal part (cp) and digestive tract (dt) (10 ×); (b, c) morphology of a uranium-exposed worm, arrows show malformations (20 ×); (d) morphology of a worm exposed to the highest uranium concentration (5980  $\mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt) (10 ×); (e, f) increase in size of a body part with excrescences (45 ×); (g, h) increase in size of a deformed prostomium (45 ×).

concentration ( $5980 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt), the value could not be measured due to insufficient biomass. The bioconcentration factor (BCF = concentration in worms/concentration in the surrounding environment) was lower than 1 in most cases.

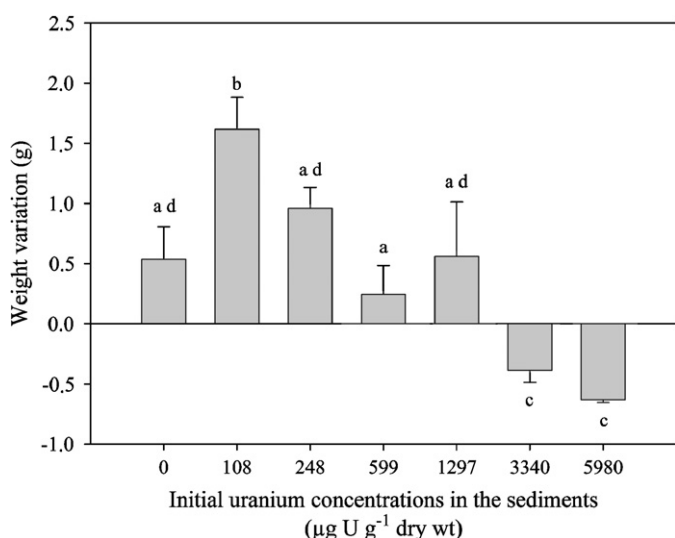
### 3.6. Burrowing activity: excavating galleries within the sediments

#### 3.6.1. Total length of gallery network

After only 3 days of exposure (day 3), the total length of the gallery network was significantly shorter in the two highest concentrations (3340 and  $5980 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt). By the end of the experiment (day 12), this was true for all concentrations, with more pronounced effects at 3340 and  $5980 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt, that differed markedly from all the others (ANOVA:  $F_{6,13} = 34.32$ ;  $P < 0.001$ ) (Fig. 6).

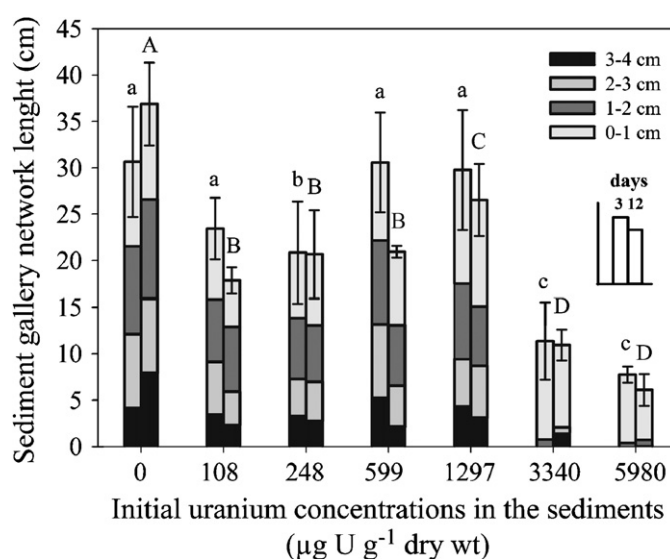
#### 3.6.2. Length of gallery network in relation to depth

After 3 days of exposure (day 3), the distribution of the *T. tubifex* worms was homogeneous across all the sediment layers in

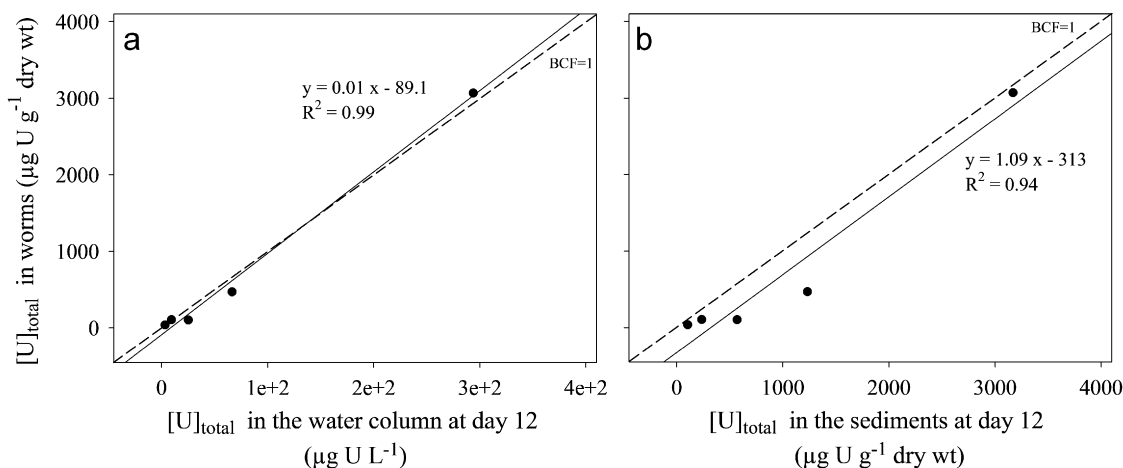


**Fig. 4.** Evolution of biomass of *Tubifex tubifex* worms after 12-day exposure to the seven experimental treatments (initial uranium concentrations in the sediment). Means  $\pm$  S.D. ( $N = 3$ ). Different letters correspond to significant differences ( $P < 0.001$ , one-way ANOVA;  $P < 0.05$ , Newmans–Keuls test).

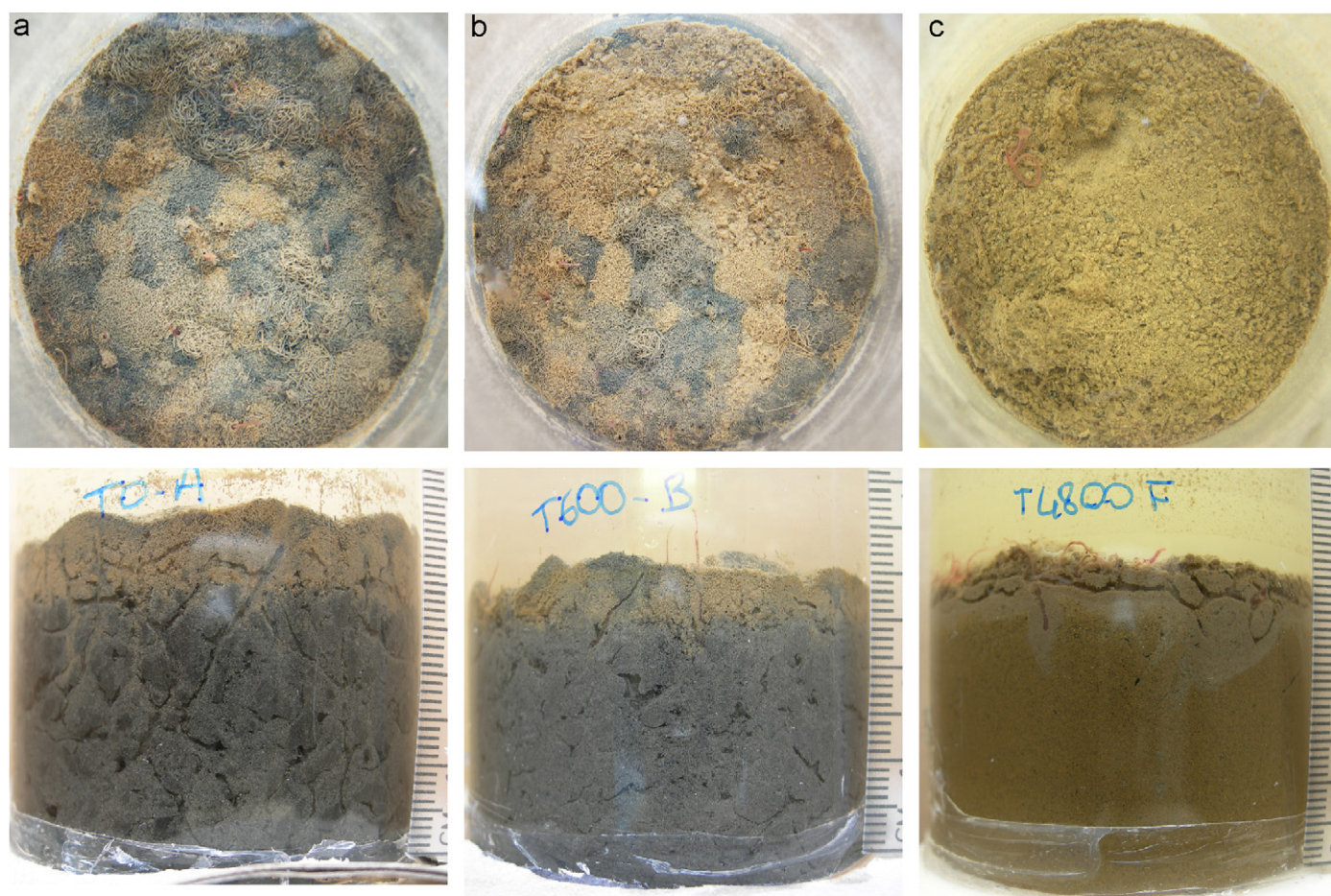
the case of the lowest concentrations ( $0\text{--}599 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt). Higher concentrations of uranium affected this distribution: progressive reduction of the gallery network in relation to depth in the case of the  $1297 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt concentration was observed, while burrowing activity below a depth of 2 cm deep was completely absent in the two highest concentrations (3340 and  $5980 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt). This same trend was observed at the end of the experiment (day 12) from  $108 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt (Fig. 6). The *T. tubifex* worms responded to the presence of uranium in the sediment by concentrating in the upper layer of the sediment and by increasing the horizontality of the gallery network (Fig. 7). Photographs taken from the top of the aquaria showed a visible reduction of the amount of reduced materials removed to the surface from the bottom sediments. This qualitative observation



**Fig. 6.** Length of the sediment gallery network of *Tubifex tubifex* after 3-day and 12-day exposure in the seven experimental treatments (initial uranium concentrations in the sediment). Means  $\pm$  S.D. ( $N = 3$ ). The data do not show any difference corresponding to time exposure, but significant differences between different uranium concentrations ( $P < 0.05$ , repeated measures analysis of variance). Letters correspond to significant differences between treatments after 3 days (small letters) and after 12 days (capital letters) ( $P < 0.001$ , Newmans–Keuls test). Each bar is subdivided into four parts corresponding to 1 cm layers.



**Fig. 5.** Total uranium concentrations in *Tubifex tubifex* worms after 12-day exposure to five experimental treatments ( $108\text{--}3340 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt, initial uranium concentrations in the sediment) relative to final uranium concentrations in the water column (a) and in the sediment (b). Means  $\pm$  S.D. ( $N = 3$ ). Solid lines represent linear regressions ( $P < 0.05$ , Pearson's correlations). Dotted lines represent a bioconcentration factor of 1.



**Fig. 7.** Photographs of the sediment surface (upper panel) and of the sediment column (lower panel) for three levels of uranium contamination ((a) control, (b)  $599 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt, (c)  $5980 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt).

confirmed the limited penetration of the worms measured into contaminated sediments.

#### 4. Discussion

##### 4.1. Experimental conditions and uranium monitoring

The experimental conditions (temperature, pH and dissolved  $\text{O}_2$ ), as well as the procedure for retrieving the worms from the sediments were designed to ensure a high survival percentage in the control aquaria (96%). The conditions were therefore ideal for performing such a bioassay on *T. tubifex*. Measuring the physical and chemical parameters of the water did not reveal any significant difference for these variables between the aquaria. As a result, any variation observed between the concentrations can mainly be explained by the initial presence of uranium in the sediments.

By monitoring the total uranium concentration in the water column, it was possible to show that the *T. tubifex* worms induce the release of uranium from the contaminated sediment into the water column. During the 12 days of exposure, this concentration increased by a factor of around 4 in the first few concentrations ( $108$ – $599 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt), but remained stable in the highest concentrations ( $1297$ – $5980 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt). For the very high concentrations, the organisms were therefore not active enough to induce such a release. Although numerous examples of metallic pollutant release induced by bioturbation are reported both in

marine and freshwater sediments (Banta and Andersen, 2003), this parameter has generally not been used to assess ecotoxic effects. However, behavioural responses represent relevant integrative ecotoxicological endpoints of different parameters like mortality or malformations.

##### 4.2. Effect on survival

Survival of the *T. tubifex* worms was significantly affected beginning at  $599 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt, a concentration that represents a relatively high level of contamination, i.e., >100 times the background level of freshwater sediments, (Kurnaz et al., 2007 and references therein). The calculated  $\text{LC}_{20}$  ( $1778 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt) and  $\text{LC}_{50}$  ( $2910 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt) were considerably higher than that obtained in other studies on other organisms and/or under different exposure conditions. The  $\text{LC}_{50}$  of our study was seven times higher than that for the amphipod, *H. azteca*, after 14 days ( $\text{LC}_{50} = 436 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt; Environnement\_Canada, 2003) and 459 times higher than that for *C. riparius* (Dias et al., 2008) after 10 days ( $\text{LC}_{50} = 5.30 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt, respectively), all of which involved exposure to artificial sediments contaminated with uranium. Further, in a bioassay conducted on *C. riparius* under the same conditions as ours (same composition of water and sediments), the  $\text{LC}_{50}$  and  $\text{LC}_{20}$  were  $856 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt ( $\text{CI}_{95\%} = 669$ – $1170$ ) and  $424$  ( $\text{CI}_{95\%} = 236$ – $646$ )  $\mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt, respectively (unpublished data). In this more comparable case, the  $\text{LC}_{50}$  and  $\text{LC}_{20}$  of *T. tubifex* were three times higher than those of *C. riparius*. On the basis of all these results, *T. tubifex*

would thus seem to be less sensitive than these other three species of invertebrates. This sensitivity gradient between species ( $H. azteca \geq C. riparius > T. tubifex$ ) has previously been observed in sediments contaminated by copper, cadmium and nickel (Milani et al., 2003). However, the different conditions under which these studies were performed, and the distinct biology of the species involved (e.g., *H. azteca* is an epibenthic organism that lives on the surface of the sediment), make it difficult to draw any relevant comparison. Moreover, the high pH and hardness of the water used in the present bioassay can explain a lower bioavailability and/or toxicity of uranium (Markich, 2002; Sheppard et al., 2005, 2006). Rathore and Khangarot (2003) readily demonstrated that toxicity of metals on *T. tubifex* decreases with water hardness. The same trend is illustrated by the *C. riparius* results in the same conditions (previously cited,  $LC_{50} = 856 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt) compared with the work of Dias et al. (2008) in artificial sediments ( $LC_{50} = 5.30 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt).

The results of Liber (2001, cited by Environnement Canada, 2003) on *C. tentans* ( $LC_{50} = 10,551 \mu\text{g U g}^{-1}$ , i.e., 4.5 times higher than  $LC_{50}$  of *T. tubifex* in the present study) illustrate the difficulty to compare results since this species of Chironomid presented the highest tolerance to uranium—if comparing all data of uranium toxicity to benthic macroinvertebrates, including ours. As suggested by Sheppard et al. (2005), all these studies represent few data, with high divergence and resulting from different approaches. In their review, these authors proposed to consider the value of  $100 \mu\text{g U g}^{-1}$  as the PNEC (previsible no effect concentration) for invertebrates in natural sediments, as estimated by screening of field data in contaminated sites in Canada (Thompson et al., 2002, cited by Sheppard et al., 2005).

In cases of sediment contamination by copper, cadmium and nickel, the sensitivity of *T. tubifex* follows the gradient  $\text{Cu} > \text{Cd} > \text{Ni}$ , from most toxic to least toxic metal, with  $LC_{50}$  of 524 ( $CI_{95\%} = 478\text{--}567$ ), 787 ( $CI_{95\%} = 715\text{--}931$ ) and 1136 ( $CI_{95\%} = 1006\text{--}1380$ )  $\mu\text{g g}^{-1}$  dry wt, respectively (Milani et al., 2003). A  $LC_{50}$  higher than  $1000 \mu\text{g Cu g}^{-1}$  dry wt was also estimated after 96 h of exposure to a sediment contaminated with copper sulphate (Meller et al., 1998). With an  $LC_{50}$  of  $2910 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt, the toxicity of uranium in *T. tubifex* therefore seems to be lower. Also, since variability in the toxicity of metals in *T. tubifex* is highly dependent on the experimental conditions (e.g., water hardness, alkalinity, pH, temperature, sediment type), the results of different studies will not always be directly comparable. Furthermore, the *T. tubifex* worms used in all these different experiments do not all come from the same population group, and it has been shown that sensitivity can vary from one strain to another (Reynoldson et al., 1996). However, the present results confirm the strong resistance of *T. tubifex* in highly polluted environments (Palmer, 1968).

#### 4.3. Autotomy and morphological changes

As for the survival rate, the autotomy process was significantly triggered in the case of highly contaminated sediments ( $3340$  and  $5980 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt). This detoxification process has been previously described by Chapman et al. (1982) in the case of *T. tubifex* exposed to mercury-contaminated sediment. To our knowledge, only two studies have estimated  $EC_{\text{autotomy}}$  in relation to contamination levels: (i) Meller et al. (1998) estimated an  $EC_{50}$  of  $601 \mu\text{g Cu g}^{-1}$  wt ( $CI_{95\%} = 500\text{--}1000$ ) using an artificial sediment contaminated with copper, and (ii) Bouché et al. (2000) found an  $EC_{50}$  of  $15 \mu\text{g Cd L}^{-1}$  ( $CI_{95\%}$  not available), in water contaminated with cadmium. In our study, the estimated  $EC_{50}$  was around 20 and 200 times higher, respectively, than these values. By comparison, the concentration of uranium in the

sediments must be much higher to trigger the autotomy process. Even so, the toxicity of these three metals cannot be directly compared based on these results, because the exposure conditions were very different in each study.

Surprisingly, the  $EC_{50}$  for autotomy was higher than  $LC_{50}$ . Usually the  $LC$  is higher than concentrations producing sublethal effects (e.g., Meller et al., 1998). This result can be explained by the measurement procedure: as the worms were collected at the end of the experiment, autotomy was only measured on 12-day surviving individuals. Therefore,  $EC_{50}$  was probably overestimated since total autotomy occurring during the bioassay was not taken into account. It might be the reason why uranium has a significant effect on survival for a lower concentration than on autotomy. Moreover, the proportion of autotomized worms among surviving individuals became significant in the two highest treatments, reaching 100% for the latter. More investigations are required to confirm this result, but it seems indicate that autotomy favours the survival, and then that selection of individuals with efficient autotomy reflex might have occurred in this population of *T. tubifex*.

Concerning the other malformations observed in this bioassay, as most of them appeared during the regeneration process, it leads us to believe that uranium may disrupt tissue mechanisms such as cell growth and differentiation. Nonetheless, when the worms were replaced in a non-contaminated environment, their earlier exposure to uranium had no limiting effect on regeneration since it was observed for all the individuals. The results of the present study are still preliminary, as the initial goal was only to count autotomized worms and to follow their regeneration. During the observations, it was obvious that the uranium-exposed worms had morphological differences (e.g., excrescences, deformities, formation of two heads) compared with control worms. Then, although some malformations have not been clearly characterized, we decided to take into account malformations as an additional endpoint of the bioassay. Unfortunately, the number of observed worms was insufficient for correct statistical analyses, and this observation remains qualitative. However, such malformations induced by metals have not been mentioned in any other study in the literature. It would be very informative to pursue this issue by quantifying and characterizing all the malformations that may be caused by uranium and other metallic pollutants. To our knowledge, the only study on the ability of Tubificidae worms to regenerate following exposure to a pollutant utilized copper (Bouché et al., 2003). The authors of that study recorded the full regeneration of the sectioned part after 8 days, i.e., 1 day longer than the controls. However, no malformations were reported in that study.

To complete our analysis, another protective reflex displayed by Tubificidae worms exposed to pollution should be considered, that of mucus production. We observed, beginning at  $507 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt, a thickening of mucus around the worm bodies as the uranium concentration in the sediments increased (data not shown). This same reaction has been observed during exposure to copper, cadmium, zinc, lead and mercury (Bouché et al., 2000; Khangarot, 1991; Meller et al., 1998; Rathore and Khangarot, 2003). The mucus seems to limit exchanges between the worms and the contaminated sediments. Indeed, it actually sequesters metals (Dhainaut-Courtois et al., 1988) making it a highly effective barrier and detoxification mechanism.

#### 4.4. Loss of biomass

At very high concentrations, the uranium caused a loss of biomass to the worm population, whereas it stimulated an increase at the lowest concentration ( $108 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt). A clear

hormetic effect was therefore observed. Stebbing (1982) defined hormesis as a stimulatory response occurring after low-dose exposure followed by inhibition at higher doses. This phenomenon may be an adaptive response to environmentally induced disruptions in homeostasis (Calabrese and Baldwin, 2001), and may be induced by low doses of radionuclides (Calabrese et al., 1987). The mechanisms by which low concentrations of uranium may increase biomass are unknown. A possible interpretation such as enhanced food consumption or assimilation by sub-optimal sediment conditions remains to be explored. As mature individuals were present in the mixture introduced in aquaria (Fig. 3a), a stimulation of reproduction cannot be excluded either (Martinez-Madrid et al., 1999; Reynoldson et al., 1996). Nonetheless, at very high concentrations, the effect was drastic: mortality and autotomy rates were very high, leading to a loss of biomass. This result is consistent with hormetic effects observed in the growth rate of annelids exposed to contaminants in marine (Moore and Dillon, 1993), freshwater (Keilty and Landrum, 1990), and terrestrial environments (Spurgeon et al., 2004). More particularly, Martinez-Madrid et al. (1999) have reported a similar hormetic effect on *T. tubifex* in a polluted (heavy metals and PCBs) sediment bioassessment in Spain.

#### 4.5. Bioaccumulation

*T. tubifex* worms accumulated relatively low amounts of uranium in their body tissues, ranging from  $38.2 (\pm 4.2) \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt at the lowest contamination level to  $3070 (\pm 71.8) \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt at the highest. According to autotomy process and production of mucus observed in this study, this result suggests involvement of efficient detoxification mechanisms (Bouché et al., 2000). Moreover, these values are lower than the concentrations measured in the surrounding sediment, suggesting no bioconcentration of uranium by this species.

Nevertheless, the very close correlations of these values with both the water (99%) and the sediment concentrations (94%) suggested the possibility of two exposure routes for uranium accumulation in the worms. Considering the life mode of these organisms, metal could actually be incorporated by passive diffusion through the epidermis of the caudal part that remains freely exposed to the overlying water, and actively from sediment particle ingestion. In the latter case, the assimilation process in the digestive tract would depend on the binding of the specific metal to the sediment. These results are consistent with previous studies dealing with the bioaccumulation of metals in *T. tubifex*, all of which report high accumulation rates that demonstrate one or both of these two modes of exposure (Bervoets et al., 1997; Bouché et al., 2000; Ciutat et al., 2005; Redeker et al., 2004; Redeker and Blust, 2004; Sager and Pucsko, 1991; Warren et al., 1998).

#### 4.6. Burrowing activity: excavating galleries

The presence of uranium in the sediments had a negative effect on the burrowing behaviour of *T. tubifex*, reducing the total length of the gallery network and concentrating it in the layers nearest the surface. This change in behaviour was observed at the onset of introduction of the worms in the aquaria. It was particularly marked in the highest concentrations (3340 and 5980  $\mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt), where the worms did not burrow below 2 cm and where the gallery network was extremely horizontal. The visible reduction of the amount of reduced materials removed to the surface from the bottom sediments confirmed the lower penetration of the worms into contaminated sediments. This may be the result of a trade-off in the worms's behaviour, between avoiding the contaminated

sediments and yet having remain within it to meet their physiological needs and to protect themselves from predators of the water column. In the present study, this observation could be related to results concerning the loss of biomass that would be consistent with reduced feeding (Mulson et al., 2002).

The effects of pollutants on the burrowing activity of annelids have not been thoroughly described in the literature, though a few studies do exist. Concerning metals, the effects of cadmium and copper on particle sediment reworking of a freshwater Tubificidae community (Ciutat et al., 2005) and the marine species *Nereis diversicolor* (Fernandes et al., 2006) have been reported. Bioturbation activity was not affected in these experiments probably because of the low concentrations used. However, in the framework of ecotoxicological studies on freshwater species, positive (Landrum et al., 2002) and negative (Keilty et al., 1988b; Landrum et al., 2004; Mulson et al., 2002) effects were revealed in the case of contamination by organic pollutants. Similar to the findings of the present study, Keilty et al. (1988a) have observed a more surficial distribution of the worms *Limnodrilus hoffmeisteri* and *Stygodrilus heringianus* in a sediment column contaminated with an insecticide (endrine). Moreover, our results after only 3 days of exposure are in agreement with the rapid response obtained by these other authors. A similar avoidance behaviour was also described with *Lumbriculus variegatus* exposed to PAH, heavy metal and pesticide contamination (West and Ankley, 1998), and with *L. hoffmeisteri* and *T. tubifex* exposed to lindane and copper (Meller et al., 1998).

Regarding polluted soil, structural changes in the gallery network excavated by earthworms (Oligochaeta, Lumbricidae) have also been observed: (i) in the case of contamination with metals in *Lumbriculus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* (Nahmani et al., 2005), and (ii) in the case of contamination with an insecticide (Imidaclopride) in *Aporrectodea nocturna* and *Allolobophora icterica* (Capowiez et al., 2006; Capowiez and Bérard, 2006). These authors noted a reduction in the burrowed surface area, an increase in the sinuosity of the burrow system (reflecting the exploration behaviour of the organisms), a reduction in the depth of the gallery network and a disturbance in the oscillating motions of the worms.

As a remark, we tried to measure the sinuosity of the gallery network from the photographs taken in the present study. No significant effect was revealed but it was difficult to apply the method used by Capowiez et al. (2006) to smaller organisms than terrestrial worms and through an aqueous interface. As technical improvements are required to measure this parameter, related data are not shown here. However, during the retrieval of worms, asynchronous, disordered and slower movements of the *T. tubifex* were clearly observed beginning at  $599 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt and became more marked at higher concentrations (not quantified). It seems that this reduction in the worms's activity may also be due to a reduction in their exploratory abilities given the morphological changes caused by the pollutant.

The results pertaining to *T. tubifex* burrowing behaviour agree with those given above, concerning uranium release from the sediment to the water column, which demonstrated an apparent reduction in their activity beginning at a concentration of  $1297 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt.

## 5. Conclusion

This study provides the first demonstration of the ecotoxic effects of uranium on *T. tubifex* in the case of sediment contamination. Although uranium toxicity has not been thoroughly assessed and comparison of the data from different studies remains troublesome, this species appears highly tolerant and less

sensitive to uranium than other invertebrates. Given the complexity of uranium chemistry, it remains difficult to link its speciation to its bioavailability, and further investigations are required to clearly assess its ecotoxicity to benthic macroinvertebrates on the wide range of physico-chemical conditions (e.g., pH, water hardness, sediment granulometry). The use of *T. tubifex* as biological model is therefore particularly recommended. As demonstrated here, several relevant sub-lethal endpoints can be measured to assess the toxicity of uranium at realistic concentrations of polluted environments.

Lastly, up to concentrations of 599  $\mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt, the activity displayed by *T. tubifex* led to a significant release of uranium from the contaminated sediment into the water column. This study thus confirms the ability of *T. tubifex* to tolerate environmental pollution and their crucial role in the functioning of ecosystems, particularly in the biogeochemical cycle of metals.

### Acknowledgments

The authors wish to thank Virginie Camilleri for technical assistance. Special thanks are given to Yvan Capowicz for his useful comments on improving the manuscript and for his assistance in analysing the worms's gallery network. We are also grateful to the two anonymous reviewers of this article for their very helpful and interesting remarks.

This work was supported by the EnvirHom research program funded by the Institute of Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN, France).

### References

- Antunes, S.C., De Figueiredo, D.R., Marques, S.M., Castro, B.B., Pereira, R., Gonçalves, F., 2007. Evaluation of water column and sediment toxicity from an abandoned uranium mine using a battery of bioassays. *Sci. Total Environ.* 374, 252–259.
- Arzul, G., Quiniou, F., Carrie, C., 2006. In vitro test-based comparison of pesticide-induced sensitivity in marine and freshwater phytoplankton. *Toxicol. Mech. Method* 16, 431–437.
- Baborowski, M., Bozau, E., 2006. Impact of former mining activities on the uranium distribution in the River Saale (Germany). *Appl. Geochem.* 21, 1073–1082.
- Banta, G.T., Andersen, O., 2003. Bioturbation and the fate of sediment pollutants—experimental case studies of selected infauna species. *Vie Milieu* 53, 233–248.
- 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*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46, 246–251.
- Bouché, M.L., Arnoult, F., Vernet, G., 2003. Caudal regeneration in *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae) following copper exposure. *Invertebr. Biol.* 122, 42–51.
- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., 2001. Hormesis: a generalizable and unifying hypothesis. *Crit. Rev. Toxicol.* 31, 353–424.
- Calabrese, E.J., McCarthy, M.E., Kenyon, E., 1987. The occurrence of chemically induced hormesis. *Health Phys.* 52, 531–541.
- Capowicz, Y., Bérard, A., 2006. Assessment of the effects of imidacloprid on the behavior of two earthworm species (*Aporrectodea nocturna* and *Allolobophora icterica*) using 2D terraria. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 198–206.
- Capowicz, Y., Bastardie, F., Costagliola, G., 2006. Sublethal effects of imidacloprid on the burrowing behaviour of two earthworm species: modifications of the 3D burrow systems in artificial cores and consequences on gas diffusion in soil. *Soil Biol. Biochem.* 38, 285–293.
- Chapman, P.M., Farrell, M.A., Brinkhurst, R.O., 1982. Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. *Aquat. Toxicol.* 2, 47–67.
- Ciutat, A., Gérino, M., Mesmer-Dudons, N., Anschutz, P., Boudou, A., 2005. Cadmium bioaccumulation in Tubificidae from the overlying water source and effects on bioturbation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 237–246.
- Dhainaut-Courtois, N., Arrouijal, F.Z., Demuyne, S., 1988. Effets biologiques de trois métaux lourds (chrome, nickel et plomb) sur *Nereis diversicolor* (Annélide, polychète). *Oceanis* 14, 423–433.
- Dias, V., Vasseur, C., Bonzom, J.M., 2008. Exposure of *Chironomus riparius* larvae to uranium: effects on survival, development time, growth, and mouthpart deformities. *Chemosphere* 71, 574–581.
- Environnement\_Canada, 2003. Liste des substances d'intérêt prioritaire—Rapport d'évaluation—Rejets de radionucléides des installations nucléaires (effets sur les espèces autre que l'être humain), Gouvernement du Canada.
- Fargasova, A., 1998. Comparative acute toxicity of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{6+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{V}^{5+}$  to *Chironomus plumosus* larvae and *Tubifex tubifex* worms. *Biologia* 53, 315–319.
- Fernandes, S., Meysman, F.J.R., Sobral, P., 2006. The influence of Cu contamination on *Nereis diversicolor* bioturbation. *Mar. Chem.* 102, 148–158.
- Guérin, C., 1994. L'activité des oligochètes aquatiques à l'interface sédiment-eau: étude analytique et conséquences écologiques. Thèse de doctorat de l'Université Paul Sabatier, Toulouse, France.
- Hart, D.R., McKee, P.M., Burt, A.J., Goffin, M.J., 1986. Benthic community and sediment quality assessment of Port Hope Harbour, Lake Ontario. *J. Great Lakes Res.* 12, 206–220.
- Keilty, T.J., Landrum, P.F., 1990. Population-specific toxicity responses by the freshwater oligochaete, *Stylodrilus heringianus*, in natural lake Michigan sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 1147–1154.
- Keilty, T.J., White, D.S., Landrum, P.F., 1988a. Short-term lethality and sediment avoidance assays with endrin-contaminated sediment and two oligochaetes from Lake Michigan. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 17, 95–101.
- Keilty, T.J., White, D.S., Landrum, P.F., 1988b. Sublethal responses to endrin in sediment by *Limnodrilus hoffmeisteri* (Tubificidae), and in mixed-culture with *Stylodrilus heringianus* (Lumbriculidae). *Aquat. Toxicol.* 13, 227–250.
- Khangarot, B.S., 1991. Toxicity of metals to a freshwater tubificid worm, *Tubifex tubifex* (Müller). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 906–912.
- Kuhne, W.W., Caldwell, C.A., Gould, W.R., Fresquez, P.R., Finger, S., 2002. Effects of depleted uranium on the health and survival of *Ceriodaphnia dubia* and *Hyalella azteca*. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2198–2203.
- Kurnaz, A., Küçükömeroglu, B., Keser, R., Okumusoglu, N.T., Korkmaz, F., Karahan, G., Çevik, U., 2007. Determination of radioactivity levels and hazards of soil and sediment samples in Firtina Valley (Rize, Turkey). *Appl. Radiat. Isot.* 65, 1281–1289.
- Landrum, P.F., Gedeon, M.L., Burton, G.A., Greenberg, M.S., Rowland, C.D., 2002. Biological responses of *Lumbriculus variegatus* exposed to fluoranthene-spiked sediment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 292–302.
- Landrum, P.F., Gossiaux, D.C., Eadie, B.J., Lansing, M.B., Leppänen, M., Kukkonen, J.V.K., Robinson, S.D., Burton, G.A., Greenberg, M., 2004. Effect of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl on the reworking behavior of *Lumbriculus variegatus* exposed to contaminated sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 178–186.
- Lottemoser, B., Ashley, P., Costelloe, M., 2005. Contaminant dispersion at the rehabilitated Mary Kathleen uranium mine, Australia. *Environ. Geol.* 48, 748–761.
- Lozano, J.C., Blanco Rodríguez, P., Vera Tomé, F., 2002. Distribution of long-lived radionuclides of the  $^{238}\text{U}$  series in the sediments of a small river in a uranium mineralized region of Spain. *J. Environ. Radioact.* 63, 153–171.
- Lucan-Bouché, M.-L., Biagianti-Risbourg, S., Arsac, F., Vernet, G., 1999. An original decontamination process developed by the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* exposed to copper and lead. *Aquat. Toxicol.* 45, 9–17.
- Markich, S.J., 2002. Uranium speciation and bioavailability in aquatic systems: an overview. *Scientific World Journal* 2, 707–729.
- Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I., Navarro, E., 1999. Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion River (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* reproduction sediment bioassay. *Ecotoxicology* 8, 111–124.
- 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.
- Meller, M., Egeler, P., Römbke, J., Schallnass, H., Nagel, R., Streit, B., 1998. Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene, and copper sulfate to tubificid slugworms (oligochaeta) in artificial media. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 39, 10–20.
- Milani, D., Reynoldson, T.B., Borgmann, U., Kolasa, J., 2003. The relative sensitivity of four benthic invertebrates to metals in spiked-sediment exposures and application to contaminated field sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 845–854.
- Moore, D.W., Dillon, T.M., 1993. The relationship between growth and reproduction in the marine polychaete *Nereis (Neanthes) arenaceodentata* (Moore): implications for chronic sublethal sediment bioassays. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 173, 231–246.
- Mosleh, Y.Y., Paris-Palacios, S., Couderchet, M., Biagianti-Risbourg, S., Vernet, G., 2005. Effects of the herbicide isoproturon on metallothioneins, growth, and antioxidative defenses in the aquatic worm *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae). *Ecotoxicology* 14, 559–571.
- Mosleh, Y.Y., Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S., 2006. Metallothioneins induction and antioxidative response in aquatic worms *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae) exposed to copper. *Chemosphere* 64, 121–128.
- Mulsow, S., Landrum, P.F., Robbins, J.A., 2002. Biological mixing responses to sublethal concentrations of DDT in sediments by *Heteromastus filiformis* using a  $^{137}\text{Cs}$  marker layer technique. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 239, 181–191.
- Nahmani, J., Capowicz, Y., Lavelle, P., 2005. Effects of metal pollution on soil macroinvertebrate burrow systems. *Biol. Fert. Soils* 42, 31–39.
- Neame, P.A., Dean, J.R., Zytaruk, B.G., 1982. Distribution and concentrations of naturally occurring radionuclides in sediments in a uranium mining area of northern Saskatchewan, Canada. *Hydrobiologia* 91–92, 355–361.

- OECD, 2005. (Organisation for Economic Cooperation and Development). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an International Ring Test.
- Palmer, M.F., 1968. Aspects of the respiratory physiology of *Tubifex tubifex* in relation to its ecology. *J. Zool., Lond.* 154, 463–473.
- Peck, M.R., Klessa, D.A., Baird, D.J., 2002. A tropical sediment toxicity test using the dipteran *Chironomus crassiforceps* to test metal bioavailability with sediment pH change in tropical acid-sulfate sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 720–728.
- Raj, A., Chandra, R., Patel, D.K., 2005. Physico-chemical characterisation of pulp and paper mill effluent and toxicity assessment by a tubificid worm, *Tubifex tubifex*. *Toxicol. Int.* 12, 109–118.
- Rathore, R.S., Khangarot, B.S., 2003. Effects of water hardness and metal concentration on a freshwater *Tubifex tubifex* (Müller). *Water Air Soil Pollut.* 142, 341–356.
- Redeker, E.S., Blust, R., 2004. Accumulation and toxicity of cadmium in the aquatic Oligochaete *Tubifex tubifex*: a kinetic modeling approach. *Environ. Sci. Technol.* 38, 537–543.
- Redeker, E.S., Bervoets, L., Blust, R., 2004. Dynamic model for the accumulation of cadmium and zinc from water and sediment by the aquatic oligochaete, *Tubifex tubifex*. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6193–6200.
- Reynoldson, T.B., Thompson, S.P., Bamsey, J.L., 1991. A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm *Tubifex tubifex*. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1061–1072.
- Reynoldson, T.B., Rodriguez, P., Madrid, M.M., 1996. A comparison of reproduction, growth and acute toxicity in two populations of *Tubifex tubifex* (Müller, 1774) from the North American Great Lakes and Northern Spain. *Hydrobiologia* 334, 199–206.
- Robbins, J.A., McCall, P.L., Fisher, J.B., Krezoski, J.R., 1979. Effect of deposit feeders on migration of <sup>137</sup>Cs in lake sediments. *Earth Planet Sci. Lett.* 42, 277–287.
- Robertson, E.L., Liber, K., 2007. Bioassays with caged *Hyalella azteca* to determine *in situ* toxicity downstream of two Saskatchewan, Canada, uranium operations. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 2345–2355.
- Rodriguez, P., Verdonschot, P.F.M., 2002. Aquatic oligochaete biology VIII. In: Proceedings of the 8th International Symposium on Aquatic Oligochaeta, Held in Bilbao, Spain, 18–22 July 2000. Springer.
- Rodriguez, P., Arrate, J., Martinez-Madrid, M., Reynoldson, T.B., Schumacher, V., Viguri, J., 2006. Toxicity of Santander Bay sediments to the euryhaline freshwater oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri*. *Hydrobiologia* 564, 157–169.
- Saari, H.-K., Schmidt, S., Coynel, A., Huguet, S., Schäfer, J., Blanc, G., 2007. Potential impact of former Zn ore extraction activities on dissolved uranium distribution in the Riou-Mort watershed (France). *Sci. Total Environ.* 382, 304–310.
- 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.
- Sheppard, S.C., Sheppard, M.I., Gallerand, M.O., Sanipelli, B., 2005. Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *J. Environ. Radioact.* 79, 55–83.
- Sheppard, S.C., Sheppard, M.I., Tait, J.C., Sanipelli, B.L., 2006. Revision and meta-analysis of selected biosphere parameter values for chlorine, iodine, neptunium, radium, radon and uranium. *J. Environ. Radioact.* 89, 115–137.
- Singh, R.K., Chavan, S.L., Sapkale, P.H., 2007. Heavy metal concentrations in water, sediments and body tissues of red worm (*Tubifex spp.*) collected from natural habitats in Mumbai, India. *Environ. Monit. Assess.* 129, 471–481.
- Spurgeon, D.J., Svendsen, C., Kille, P., Morgan, A.J., Weeks, J.M., 2004. Responses of earthworms (*Lumbricus rubellus*) to copper and cadmium as determined by measurement of juvenile traits in a specifically designed test system. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 54–64.
- Stebbing, A.R.D., 1982. Hormesis: the stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Sci. Total Environ.* 22, 213–234.
- Thomas, P., Liber, K., 2001. An estimation of radiation doses to benthic invertebrates from sediments collected near a Canadian uranium mine. *Environ. Int.* 27, 341–353.
- Vecchi, M., Reynoldson, T.B., Pasteris, A., Bonomi, G., 1999. Toxicity of copper-spiked sediments to *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae): comparison of the 28-day reproductive bioassay with an early-life-stage bioassay. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1173–1179.
- Walker, J.G., 1970. Oxygen poisoning in the annelid *Tubifex tubifex*. I. Response to oxygen exposure. *Biol. Bull. US* 138, 235–244.
- Warren, L.A., Tessier, 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.
- West, C.W., Ankley, G.T., 1998. A laboratory assay to assess avoidance of contaminated sediments by the freshwater Oligochaete *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 20–24.
- Wiederholm, T., Wiederholm, A.-M., Milbrink, G., 1987. Bulk sediment bioassays with five species of fresh-water oligochaetes. *Water Air Soil Pollut.* 36, 131–154.
- Zar, J.H., 1999. *Biostatistical Analysis*, fourth ed. Prentice-Hall International, Upper Saddle River, NJ, USA.





### **3.4 EFFETS DE L'URANIUM SUR LA BIOTURBATION DE CHIRONOMUS RIPARIUS ET TUBIFEX TUBIFEX EXPOSÉS À DES SÉDIMENTS CONTAMINÉS**

- Présentation sous forme d'article -

*Etat actuel de la publication* – soumise à la revue *Environmental Toxicology & Chemistry*.

*Titre en français* – Effets de l'uranium sur la bioturbation de *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) et *Tubifex tubifex* (Annelida, Tubificidae) exposés à des sédiments contaminés.

*Résumé en français* – Les sédiments d'eau douce représentent un compartiment d'accumulation pour les substances toxiques, notamment pour les polluants métalliques tel que l'uranium. Cependant, ils constituent aussi l'habitat privilégié de nombreuses espèces de macro-invertébrés benthiques qui ont une influence majeure dans la structure et le fonctionnement de ces écosystèmes, particulièrement *via* leurs activités de bioturbation. L'uranium accumulé dans les sédiments peut donc entraîner des effets néfastes sur ces organismes (*e.g.* retard de développement, malformations, mortalité). L'objectif de cette étude en laboratoire était d'évaluer les conséquences de tels effets sur la bioturbation de larves de *Chironomus riparius* et de vers *Tubifex tubifex*, deux espèces largement répandues dans les écosystèmes d'eau douce et caractéristiques de deux modes de bioturbation différents: bioirrigation et bioconvoyage vers le haut, respectivement. Le remaniement sédimentaire induit par ces macro-invertébrés a été mesuré en quantifiant l'enfoncement et la redistribution de traceurs particuliers fluorescents (microsphères) après douze jours d'exposition. Les taux de biodiffusion  $D_b$  et de bioadvection  $W$ , ainsi que plusieurs autres paramètres, ont été calculés afin d'estimer et de comparer la bioturbation des deux espèces, chacune séparément et en association, entre des sédiments contrôles et des sédiments contaminés par de l'uranium. Les résultats montrent que les larves de *C. riparius* sont sensibles à l'uranium mais leurs activités de bioturbation même pour les organismes non exposés n'ont que peu d'effet sur le remaniement sédimentaire. Le mélange particulaire est majoritairement induit par les

vers *T. tubifex*, lesquels ne sont affectés par l'uranium que pour de fortes concentrations dans les sédiments. Enfin, la bioturbation de *T. tubifex* a entraîné un important relargage d'uranium du sédiment vers la colonne d'eau, ce qui met en avant le rôle important de cette espèce, très souvent dominante, dans le cycle biogéochimique de l'uranium, à des concentrations représentatives de sites naturels contaminés.

**Mots-clés** : microsphères, taux d'ingestion, biodiffusion, bioadvection, bioconvoyage, vers Tubificidés, larves de Chironomes, uranium.

**Effects of uranium-contaminated sediments on the bioturbation activity of  
*Chironomus riparius* larvae (Insecta, Diptera) and *Tubifex tubifex* worms  
(Annelida, Tubificidae)**

*Lagauzère, S.<sup>1</sup>, Boyer, P.<sup>2</sup>, Stora, G.<sup>3</sup> and Bonzom, J-M.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie, Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN), DEI/SECRE, Cadarache bât. 186, BP 3, 13115 Saint-Paul-lez-Durance, Cedex, France.

<sup>2</sup> Laboratoire de Modélisation Environnementale, Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN), DEI/SECRE, Cadarache bât. 159, BP 3, 13115 Saint-Paul-lez-Durance, Cedex, France.

<sup>3</sup> Laboratoire de Microbiologie, Géochimie et Ecologie Marines, UMR 6117 CNRS/COM/Université de la Méditerranée, Campus de Luminy, Case 901, F-13288 Cedex 09, Marseille, France.

---

**Acknowledgments**

The authors wish to thank Virginie Camilleri for technical assistance with ICP, and Christophe Vasseur who was very helpful in the preparation of the experiment. Special thanks are given to Sébastien Delmotte for his useful comments on modelling. This work was supported by the EnvirHom research program funded by the Institute of Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN, France).

## Abstract

Freshwater sediments represent a compartment for accumulation of toxic substances, notably of metallic pollutants such as uranium. However, they also constitute a privileged habitat for many benthic macro-invertebrate species with important roles in the structure and functioning of these ecosystems, particularly through their bioturbation activities. Uranium accumulation in sediments can thus have harmful effects on these organisms (e.g., developmental delay, malformations, mortality). The aim of the present study was to evaluate the consequences of these effects on the bioturbation activity of *Chironomus riparius* larvae and *Tubifex tubifex* worms. These two species, which are widespread in freshwater ecosystems, are characteristic of two different modes of bioturbation: bioirrigation and upward-bioconveying, respectively. By quantifying the burial and redistribution of fluorescent particulate tracers (microspheres), sediment reworking induced by these macro-invertebrates was measured after 12 days of exposure. Biodiffusion  $D_b$  and bioadvection  $W$  rates, as well as several other parameters, were estimated to assess and compare the bioturbation activity of the two species, separately and in combination, between uncontaminated and uranium-spiked sediments. The results reveal that *C. riparius* larvae were more sensitive to uranium, but their bioturbation activity, even under uncontaminated conditions, had little effect on sediment reworking. Particle mixing was mainly induced by *T. tubifex* worms, which were only affected by uranium at high concentrations in the sediment. Finally, bioturbation by *T. tubifex* led to a high degree of uranium release from sediment to the overlying water, which highlights the crucial role of this mostly dominant species on uranium biogeochemical cycles at concentrations existing in naturally contaminated sites.

**Key-words:** microspheres, ingestion rate, biodiffusion, bioadvection, bioconveying, Tubificid worms, Chironomid larvae, uranium

## 1. Introduction

During the last few decades, numerous studies have demonstrated the strong influence of macrofauna bioturbation activity on biogeochemical functioning of sediments, leading to the current consensus on benthic organisms as 'ecological engineers' (Mermillod-Blondin & Rosenberg 2006). Most aquatic environments have been investigated, from deep and coastal seafloors to sediments in estuaries, lakes and rivers, as well as stormwater sediments of infiltration basins. Despite evident differences between these ecosystems, representative functional benthic communities induce similar effects (Gérino et al. 2003). Solute fluxes and mixing of solids are enhanced by bioirrigation of burrows/galleries dug into the sediments and by bioconveying of sediment particles. In combination with physical changes such as increase in porosity and granulometric reworking, these activities directly influence microbial communities (Aller et al. 2001). Therefore, surface sediments constitute a mosaic of microhabitats with various gradients in oxygenation and redox conditions that affect diagenetic processes (Kristensen 2000). Among the most relevant ecological consequences, the impact of bioturbation on the distribution, speciation and (im)mobilisation of metallic pollutants accumulated in sediments is of prime importance and has attracted much attention (Krantzberg 1985, Soster et al. 1992, Petersen et al. 1995, Thamdrup 2000, Zoumis et al. 2001, Alfaro-De-la-Torre & Tessier 2002, Zheng et al. 2002, Banta & Andersen 2003, Ciutat & Boudou 2003, Michaud et al. 2005, Ciutat et al. 2007). Nevertheless, although the ecotoxicological effects of metals on benthic macroinvertebrates are well documented, few studies have assessed the effects of these compounds on bioturbation activity (Ciutat et al. 2005, Fernandes et al. 2006). The same is true for organic pollutants (Keilty et al. 1988, White & Keilty 1988, Landrum et al. 2002, 2004, Mulsow et al. 2002). Given that bioturbation represents an integrating factor of macro-invertebrate activities (food foraging, respiration, burrowing, defecating), such investigations appear to be particularly pertinent.

The aim of the present study was thus to assess the effect of uranium on the bioturbation activity of two freshwater macroinvertebrate species exposed to contaminated sediments. Owing to their widespread distribution and abundance in most freshwater ecosystems, the species *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) and *Tubifex tubifex* (Annelida, Oligochaeta) were chosen as biological models because they belong to two distinct bioturbation functional groups. *C. riparius* larvae are surface deposit-feeders with low burrowing activity mainly dependent on oxygen, organic matter availability and the presence

of predators in the water column (Rasmussen 1984, Hölker & Stief 2005). Intermittent ventilation of their tubes induces a slight downward transport of sediment particles and influences solute fluxes at the sediment-water interface (Stief & De Beer 2002, 2006, De Haas et al. 2005, Stief 2007). *T. tubifex* worms are 'conveyer-belt' deposit-feeders, living head-down and partially submerged in the sediment, with the posterior section of their body free in the overlying water to allow cutaneous respiration. Foraging galleries into the sediment, these worms ingest sediment particles and egest them at the surface within mucus-bound faecal pellets (Robbins et al. 1979). This results in intense and ordered mixing of sediment particles, with predominant upward transport that affects solute distribution (Chatarpaul et al. 1980, McCall & Fisher 1980, Matisoff 1995, Pelegri & Blackburn 1995, Svensson et al. 2001, Mermillod-Blondin et al. 2005, Nogaro et al. 2007).

The choice of uranium as a contaminant was motivated by the scarcity of ecotoxicological data for benthic macroinvertebrates. Uranium is a natural radioactive heavy metal whose content in the environment has increased because of human activities, particularly in freshwater ecosystems (Baborowski & Bozau 2006, Antunes et al. 2007, Saari et al. 2007) where it can accumulate in sediments. Natural uranium concentrations considered as a 'background level' in freshwater sediments are lower than  $10 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt (Kurnaz et al. 2007), but concentrations higher than several hundred to several thousand  $\mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt have been registered in rivers and lakes close to mining sites in Spain (Lozano et al. 2002), Australia (Lottermoser et al. 2005) and Canada (Neame et al. 1982, Hart et al. 1986). The few ecotoxicological data available indicate that uranium-contaminated sediments can have harmful effects on macroinvertebrates such as mortality, deformities and developmental delay (Environnement Canada 2003, Dias et al. 2008, Lagauzère et al. in press) that probably affect the intensity of their bioturbation activity.

To assess the effect of uranium on bioturbation, conservative fluorescent tracers were used to follow particle mixing within sediments of laboratory aquaria. From vertical profiles of their distribution after 12 days of exposure, the biodiffusion rate  $D_b$  and bioadvection rate  $W$  were estimated using simulation with a classical bioadvection-biodiffusion model. In addition, a second model taking into account the ingestion of tracers by *T. tubifex* worms as bioconveyers was developed with the data to estimate further bioturbation parameters and to improve the analysis of results.

## 2. Materials & methods

### 2.1. Sediment and water preparation

Sediments and water were sampled from a dead channel in a lake on the Verdon River (Lac d'Esparron, southeast France). This sampling site was chosen because of the nature of the sediment (fine mud) and the water quality (low turbidity, no detectable pollution). Sediments were sieved through a 2-mm mesh to remove coarse fragments (e.g., stones, leaves, wastes) and macrofauna, and were frozen at -20°C for 1 week to kill most of the remaining organisms. After thawing and homogenisation, samples were stored at 4°C until the aquaria were being set up. The water was filtered through a 20-µm filter and then stored at 4°C. The main characteristics of the sediment and water are reported in Table 1.

**Table 1 - Main physicochemical characteristics of the sediment and the water (Lac d'Esparron, Verdon, southeast France, fraction < 2mm)**

Sediment		Water	
Grain size fraction (%)			
<2 µm	9.6		
2-20 µm	14.2		
20-50 µm	32.9		
50-200 µm	41.8		
>200 µm	1.5		
Organic carbon (%)	2.4		
Total calcite CaCO <sub>3</sub> (%)	69.8	Hardness (Eq mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	152
pH	8.2	pH	8.6
Concentration (g kg <sup>-1</sup> )		Concentration (mg L <sup>-1</sup> )	
Aluminum (Al)	11.5	Sodium (Na)	18.0
Calcium (Ca)	297	Calcium (Ca)	52.0
Iron (Fe)	7.06	Copper (Cu)	<0.1
Manganese (Mn)	0.134	Magnesium (Mg)	5.32
Magnesium (Mg)	3.18	Potassium (K)	3.44
Sodium (Na)	1.43	Iron(Fe)	<0.1
Nitrates (N-NO <sub>3</sub> )	0.001	Aluminum (Al)	<0.1
Ammonium (N-NH <sub>4</sub> )	0.029	Zinc (Zn)	<0.1
Phosphorus (P-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	<0.002	Manganese (Mn)	<0.1
Chlorides (Cl)	0.016	Chromium (Cr)	<0.1
Sulfur (S)	0.125	Cobalt (Co)	<0.1
		Nickel (Ni)	<0.1
		Cadmium (Cd)	<0.1
		Lead (Pb)	<0.1



### 2.2. *Aquaria setting-up*

Four different beakers of sediment were prepared. One beaker was uncontaminated sediment, to which no contaminant was added. The other beakers were spiked with a solution of uranyl nitrate  $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, France) to final concentrations of  $[\text{U1}]=150$ ,  $[\text{U2}]=300$  and  $[\text{U3}]=600 \mu\text{g U g}^{-1}$  of dried sediment (dry wt). These concentrations correspond to sub-lethal concentrations ( $\text{LC}_{50} = 856$  and  $2910 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt, for *Chironomus riparius* and *Tubifex tubifex*, respectively; Lagauzère et al. in press) and are representative of values measured in contaminated sites. All sediments were mechanically stirred daily for a period of 2 weeks to ensure homogeneous contamination. Using sediment from each beaker, 12 separate aquaria with an area of  $25 \text{ cm}^2$ , a sediment height of 10 cm and a water height of 10 cm were prepared. From these, nine were allocated for addition of organisms: three with *Chironomus riparius* larvae [Chir], three with *Tubifex tubifex* worms [Tub] and three with the two species together [Chir+Tub]. No organism was added to the three remaining aquaria, which served as replicate controls [Control].

All aquaria were randomly placed in a large incubator maintained at  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . Ambient air was continuously pumped through the water column of each aquarium ( $8.2 \pm 0.4 \text{ mg L}^{-1}$ ). Losses due to evaporation and sampling were continuously compensated by addition of filtered lake water. Prior to organism introduction, the aquaria were left to equilibrate for 4 weeks.

### 2.3. *Organism addition*

Tubificid worms (*Tubifex tubifex*) and chironomid larvae (*Chironomus riparius*) were reared in the laboratory in sediment and water as described for the experimental conditions. The tubificid worms were obtained from a commercial source (Grebil & Fils, Arry, France) whereas the chironomid larvae were already being reared in our laboratory. A total of 150 tubificid worms and 35 chironomid larvae (first instar larvae, 2 days post hatch) were added to each aquarium, resulting in initial densities of 60000 and 14000 ind  $\text{m}^{-2}$ , respectively. These are within the range of typical densities observed in natural environments (Palmer 1968, Rasmussen 1984, Armitage et al. 1995). Experiments lasted for 12 days to avoid the first emergence of *C. riparius* larvae, which normally occurs after 14 days at  $21^\circ\text{C}$ .

#### 2.4. Physico-chemical measurements

Between the introduction of organisms (day 0) and the end of the experiment (day 12), temperature, pH and dissolved oxygen concentrations were measured in the overlying water on days 0, 3, 6, 9 and 12. To indirectly estimate the release of uranium from sediment to the overlying water, the total uranium concentration was assessed by ICP-AES (Optima 4300 DV, Perkin-Elmer, USA) from acidified (2% HNO<sub>3</sub>) water samples collected at the aforementioned time points. The difference in uranium concentration in the water column between day 12 and day 0 divided by the area of the aquarium was used as an estimate of the uranium flux at the sediment/water interface.

Vertical profiles of sediment porosity were measured for the slices obtained for bioturbation estimation (see below).

#### 2.5. Bioturbation activity measurements

The bioturbation activity of *Tubifex tubifex* worms and *Chironomus riparius* larvae was assessed using inert fluorescent microspheres. These are dyed balls of latex ( $\text{Ø}=1 \mu\text{m}$ ,  $\lambda_{\text{excitation}}$  441 nm,  $\lambda_{\text{emission}}$  486 nm) stored in a liquid phase at  $45.5 \times 10^9$  microspheres  $\text{mL}^{-1}$  (Fluoresbrite<sup>®</sup> YG Microspheres, Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Germany). In each aquarium, 150  $\mu\text{L}$  of microsphere suspension were deposited on the sediment surface in the form of a 3-mm-thick frozen mud cake, one day before organism introduction.

At the end of the experiment, the overlying water was gently retrieved and the sediment core was carefully sliced into 16 layers of 3 mm in thickness from the surface down to 3 cm, 0.5 mm in thickness between 3 and 4 cm, 10 mm in thickness between 4 and 6 cm, and 20 mm in thickness down to 10 cm. Each layer was hand-homogenised and a sediment sample was retrieved, weighed and dried at room temperature for 72 h. Two subsamples were retrieved and re-weighed to estimate the microsphere content in one and the porosity in the other. Microspheres were counted using a fluorimetric technique that was calibrated with sediment samples of known microsphere concentrations (Lagauzère et al. submitted). From this, the number of microspheres per layer ( $n$ ) and the total number in the profile ( $N$ ) were obtained. Hence, the fraction ( $n/N$ ) of microspheres per layer could be determined. The microsphere concentration was estimated as  $C=n/(z \times A \times N)$ , where  $z$  (cm) is the thickness of the sampling layer and  $A$  is the core area.

To estimate bioturbation parameters, the profiles were simulated using two diagenetic models: (i) a classical biodiffusion-bioadvection model under non-steady-state conditions (Officer & Lynch 1982, Gérino et al. 1994, 1998) to obtain the biodiffusion coefficient  $D_b$  and

advective velocity  $W$ ; and (ii) a model specially developed using our data to take into account the ingestion of microspheres by tubificid worms.

The second model is also a non-steady-state, vertical one-dimensional model. It is based on the approach developed by Delmotte et al. (2007). It specifically introduces a term that takes into account direct bioconveying from different depths of the sediment column to the surface. These exchanges, resulting from particle egestion of particles by tubificid worms, were modelled using a transfer function that integrates vertical distributions of the ingestion rate and of microspheres concentrations according to the following equations:

$$\frac{\partial m_z^t}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z} (Db_z \cdot \frac{\partial m_z^t}{\partial z}) - \frac{\partial (W_z \cdot m_z^t)}{\partial z} - Ing_z \cdot m_z^t + EG_z^t$$

Where  $m$  is the concentration of microspheres ( $\text{g cm}^{-3}$ ),  $D_b$  is the biodiffusion coefficient ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ),  $W$  is the bioadvection velocity ( $\text{cm s}^{-1}$ ),  $Ing$  is the ingestion rate ( $\text{day}^{-1}$ ),  $EG$  is the egestion rate ( $\text{g m}^{-3} \text{day}^{-1}$ ),  $z$  is depth (cm), and  $t$  is time (days).

$Ing$  is expressed as a function of its maximal value  $Ing_{\max}$  and the dispersion  $\sigma$  of the worms around the depth of maximal ingestion  $z_{Ing}$ :

$$Ing_z = Ing_{\max} \cdot e^{-\frac{(z-z_{Ing})^2}{2 \cdot \sigma_{Ing}^2}}$$

$EG$  and  $W$  are expressed as a function of  $Ing$ :

$$EG_0^t = \int_0^L d(Ing_z \cdot m_z^t)$$

$$W_z = \int_z^h Ing_z \cdot dz = Ing_{\max} \cdot \int_z^h e^{-\frac{(z-Z_{ing})^2}{2 \cdot \sigma_{ing}^2}} \cdot dz$$

### 2.6. Statistical analyses

All statistical analyses were performed using the STATISTICA<sup>®</sup> software package (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Before each analysis, the normality (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of data variance (Levene's test) were tested. This was repeated after data transformation when these assumptions were initially not confirmed. A significance level of 5% was applied to all analyses.

Repeated-measure analyses of variance (RM ANOVAs) were used to examine the physico-chemical parameters of the water column. For each treatment ([Control], [Chir], [Tub], [Chir+Tub]), the effects of uranium on bioturbation parameters estimated from fitting data with the bioadvection-biodiffusion model were analysed by one-way ANOVAs, followed by Fisher's LSD post hoc tests. In addition, values of  $W$  and  $D_b$  in uncontaminated treatments were analysed by separate one-way ANOVAs to estimate the bioturbation activity of each species in the absence of uranium. The effective concentrations at 50% ( $EC_{50}$ ) of the significant parameters were estimated and compared with  $LC_{50}$  values previously measured under the same experimental conditions (Lagauzère et al. in press) to assess the relevance of bioturbation as an ecotoxicological endpoint. These concentrations were determined using the REGTOX Excel macro based on the Marquardt algorithm (<http://eric.vindimian.9online.fr>, Arzul et al. 2006). A 95% confidence interval ( $CI_{95\%}$ ) was estimated by bootstrapping.

For treatments with *Tubifex tubifex* ([Tub] and [Chir+Tub]), one-way ANOVAs were also performed to assess the effects of uranium on complementary bioturbation parameters estimated from the second model. To compare the two treatments, i.e., to test if the presence of *C. riparius* modified these parameters, data were also analysed by two-way ANOVAs (first factor, uranium concentration; second factor, absence/presence of *C. riparius*).

### 3. Results

#### 3.1 Physico-chemical measurements

The data set for all aquaria demonstrates that the temperature was maintained at  $22.2 \pm 0.2^\circ\text{C}$ , the dissolved oxygen concentration at  $8.2 \pm 0.4 \text{ mg L}^{-1}$  and the pH at  $8.6 \pm 0.2$  throughout the experiments. No significant treatment-related differences were observed for any of the water quality parameters between the sampling days (RM ANOVAs:  $P > 0.05$ ).

The total uranium concentration in the water column of all contaminated aquaria significantly increased over time in the presence of *Tubifex tubifex* worms, whereas *Chironomus riparius* larvae had no effect on this parameter (Fig. 1). The corresponding 12-day uranium fluxes are represented in Figure 2. The average fluxes for [Tub] and [Chir+Tub] treatments were  $4.85 \pm 1.45 \cdot 10^{-3}$ ,  $12.4 \pm 2.31 \cdot 10^{-3}$  and  $16.7 \pm 4.43 \cdot 10^{-3} \text{ mmol U m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  for [U1], [U2] and [U3], respectively.

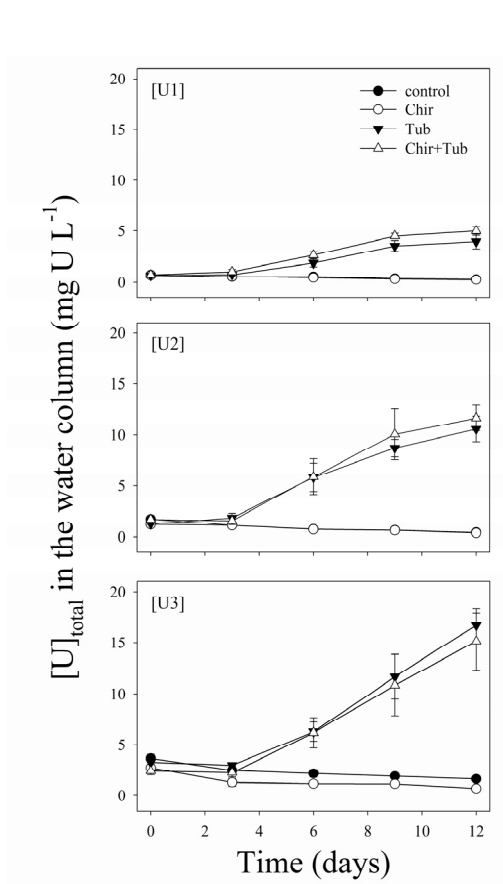


Figure 1 – Evolution of the uranium concentrations in the water column during 12 days (initial concentration in the sediments: U1=150, U2=300 and U3=600  $\mu\text{g U g}^{-1} \text{ wt}$ ).

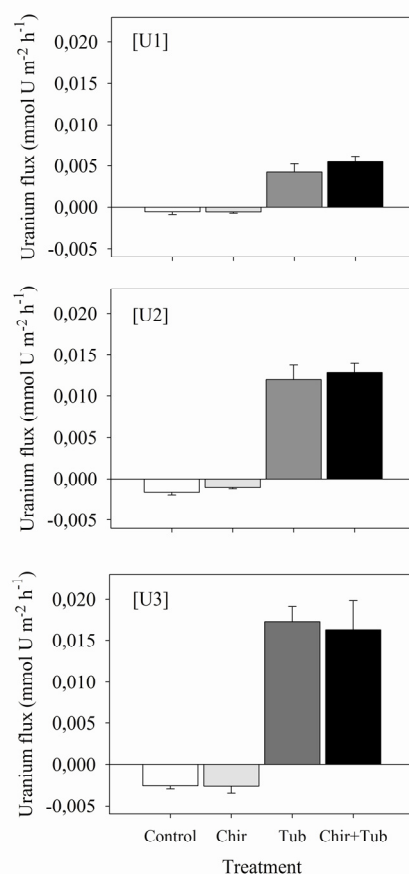


Figure 2 – Uranium fluxes over 12 days for each treatment. Negative values indicate an uptake by the sediments whereas positive values indicate a release to the water column (initial concentrations in the sediments: U1=150, U2=300 and U3=600  $\mu\text{g U g}^{-1} \text{ wt}$ ).

For all the treatments, the porosity of the upper sediment layers was enhanced by 10-20% in the presence of the organisms (Fig. 3). *Chironomus riparius* induced water penetration of 0.6-1 cm in depth, independent of the uranium concentration. Water penetration reached approximately 2 cm with *Tubifex tubifex*, except at the highest uranium concentration [U3]. In addition, the porosity enhancement linked to *T. tubifex* bioturbation activity was more marked at [U1].

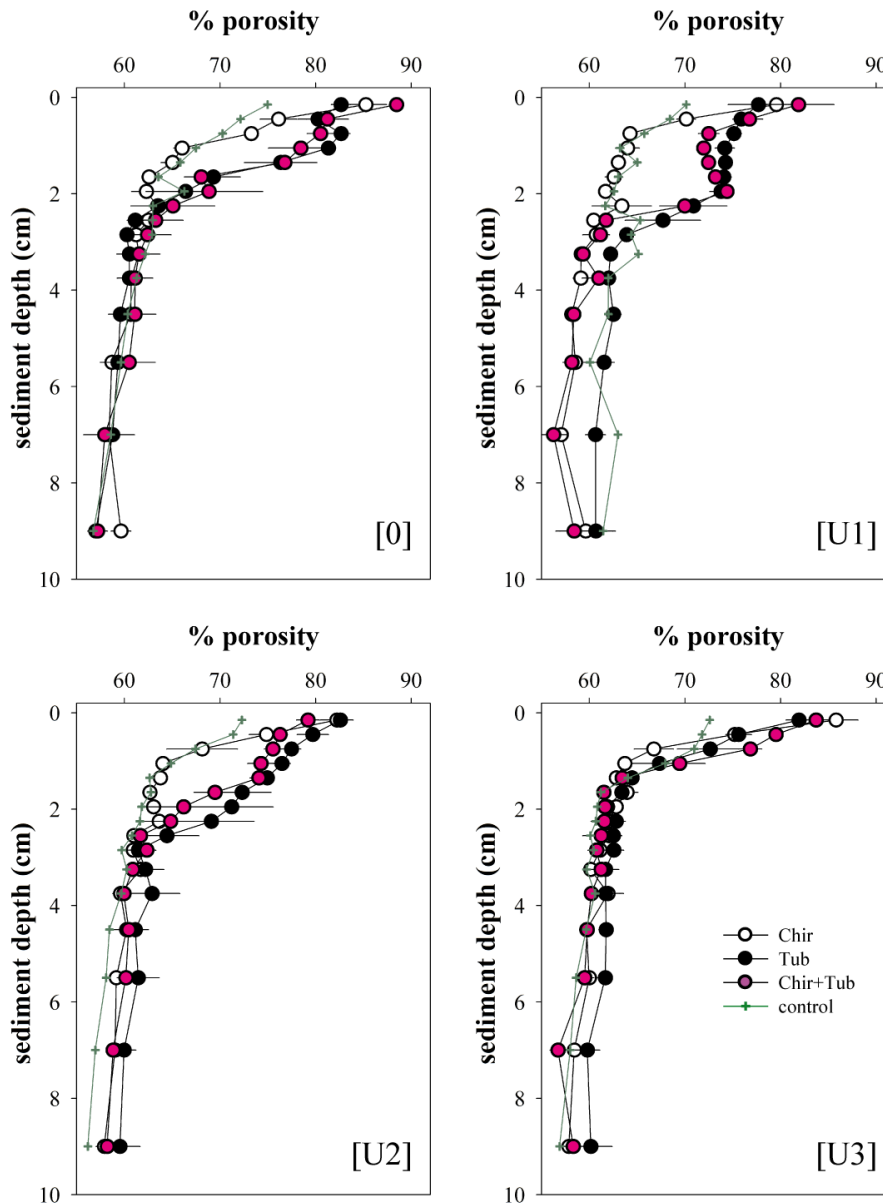
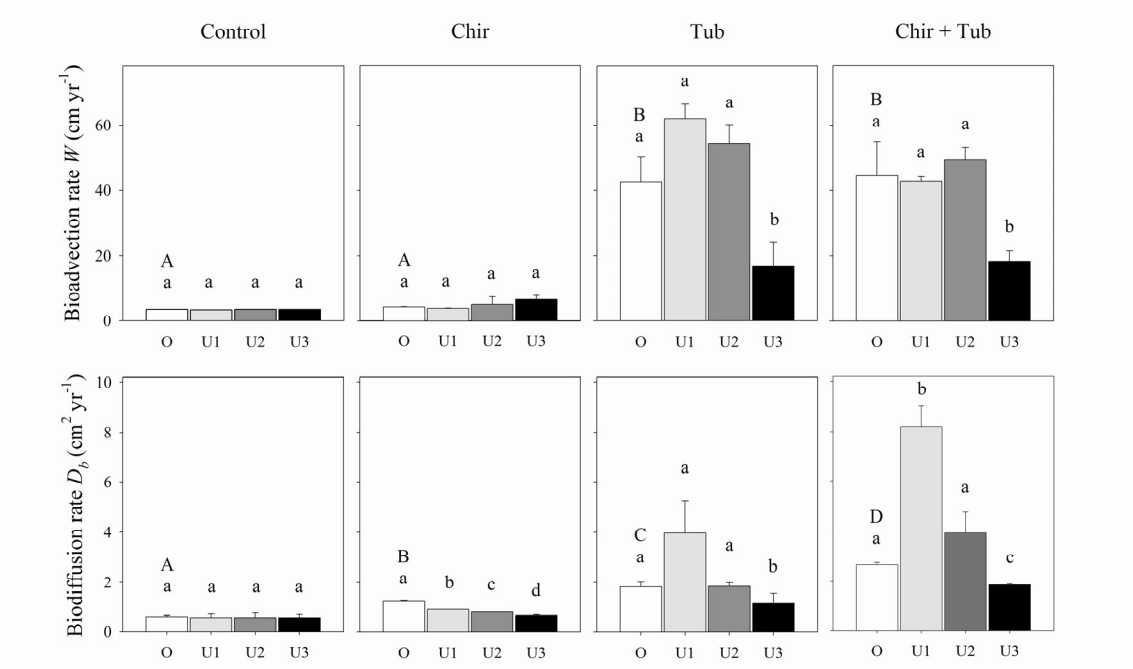


Figure 3 – Vertical profiles of sediment porosity in presence of *Chironomus riparius* [Chir] or *Tubifex tubifex* [Tub], and with the two species associated [Chir+Tub], for each uranium concentration (O=uncontaminated, U1=150, U2=300, U3=600  $\mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt)

### 3.2 Bioadvection-biodiffusion modelling

Bioadvection rate ( $W$ ) and biodiffusion rate ( $D_b$ ) estimates from fitting of microsphere profiles to the bioadvection-biodiffusion model after 12 days revealed a significant effect of uranium on the bioturbation activity of both *Chironomus riparius* and *Tubifex tubifex* (Fig. 4).



**Figure 4 – Bioadvection and biodiffusion rates as a function of the initial uranium concentrations in the sediments (0=uncontaminated, U1=150, U2=300, U3=600  $\mu\text{g U g}^{-1}$  wt) for each treatment. Means  $\pm$  SD ( $N=3$ ). Different letters correspond to significant differences between O, U1, U2 and U3 (small letters) and between bioturbation treatments in uncontaminated sediments – concentration 0 – (capital letters).**

The bioturbation activity of *C. riparius* had a small effect on particle reworking: compared to the control,  $D_b$  was slightly higher (ANOVA:  $F_{8,3}=66.5$ ,  $P=0.000$ ; Fisher's LSD test:  $P<0.05$ ) and  $W$  was not significantly different (ANOVA:  $F_{8,3}=12.1$ ,  $P=0.002$ ; Fisher's LSD test:  $P>0.05$ ). Uranium at the lowest concentration [U1] significantly decreased  $D_b$  (ANOVA:  $F_{8,3}=128$ ,  $P=0.000$ ; Fisher's LSD test:  $P<0.05$ ) and had no effect on  $W$  (ANOVA:  $F_{8,3}=0.75$ ,  $P=0.55$ ).

Particle reworking by *T. tubifex* was higher than that by *C. riparius*:  $D_b$  was slightly higher (ANOVA:  $F_{8,3}=66.5$ ,  $P=0.000$ ; Fisher's LSD test:  $P<0.05$ ) and  $W$  was strongly enhanced by the worms (ANOVA:  $F_{8,3}=12.1$ ,  $P=0.002$ ; Fisher's LSD test:  $P<0.05$ ). These parameters decreased for uranium at the highest concentration [U3] (ANOVA for  $D_b$ :  $F_{8,3}=3.21$ ,  $P=0.05$ ; ANOVA for  $W$ :  $F_{8,3}=9.28$ ,  $P=0.005$ ; Fisher's LSD test:  $P<0.05$ ). Similar

results were observed for the combined presence of *T. tubifex* and *C. riparius*. There was no difference in  $W$  between [Tub] and [Chir+Tub] treatments (ANOVA:  $F_{8,3}=12.1$ ,  $P=0.002$ ; Fisher's LSD test:  $P>0.05$ ) and it decreased at the highest uranium concentration (ANOVA:  $F_{8,3}=5.62$ ,  $P=0.02$ ; Fisher's LSD test:  $P>0.05$ ).  $D_b$  was slightly higher for [Chir+Tub] than for [Tub] treatment (ANOVA:  $F_{8,3}=66.5$ ,  $P=0.000$ ; Fisher's LSD test:  $P<0.05$ ) and also decreased at the highest uranium concentration (ANOVA:  $F_{8,3}=11.0$ ,  $P=0.003$ ; Fisher's LSD test:  $P<0.05$ ). An increase in biodiffusion occurred at the lowest concentration [U1] for the [Tub] treatment. This trend became significant when *C. riparius* was also present ([Chir+Tub] treatment) (ANOVA:  $F_{8,3}=11.0$ ,  $P=0.003$ ; Fisher's LSD test:  $P<0.05$ ).

Finally, to estimate the sensitivity of bioturbation as a relevant endpoint in ecotoxicological tests, effective concentrations were calculated. For  $D_b$  in the [Chir] treatment,  $EC_{50}$  was  $787 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt ( $CI_{50\%}=618-1016$ ), and for  $W$  in the [Tub] treatment,  $EC_{50}$  was  $547 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt. ( $CI_{50\%}=408-607$ ), representing 8% and 81% of the corresponding  $LC_{50}$  concentrations.

### 3.3 Microsphere bioconveying modelling

As illustrated in Figure 5, fitting of the second model, which takes into account the bioconveying of microspheres by *Tubifex tubifex*, yielded better graphical fitting than the bioadvection-biodiffusion model. Although the bioadvection peak was similarly simulated, only the second model fitted the microsphere concentrations in the upper sediment layers.

Nevertheless, similar statistical results were obtained for bioadvection and biodiffusion coefficients (Fig. 6), i.e., a decrease in  $D_b$  and  $W$  at the highest concentration [U3] and stimulation of biodiffusion at the lowest concentration [U1] (significant effects for [Chir+Tub] treatment; ANOVA for  $D_b$ :  $F_{8,3}=5.51$ ,  $P=0.02$ ; ANOVA for  $W$ :  $F_{8,3}=6.34$ ,  $P=0.01$ ; Fisher's LSD test:  $P<0.05$ ). The presence of *Chironomus riparius* had a significant effect on biodiffusion (ANOVA [Chir]:  $F_{16,3}=12.6$ ,  $P=0.002$ ) but not on bioadvection (ANOVA [Chir]:  $F_{16,3}=1.73$ ,  $P=0.20$ ).

The other parameters permitted an estimation of how the bioturbation activity of *T. tubifex* was affected by uranium (Fig. 6). The maximal ingestion rate  $Ing_{\text{max}}$  was higher at concentrations [U2] and [U3] in both [Tub] (ANOVA:  $F_{8,3}=7.33$ ,  $P=0.01$ ; Fischer's LSD test:  $P<0.05$ ) and [Tub+Chir] treatments (ANOVA:  $F_{8,3}=228$ ,  $P=0.000$ ; Fischer's LSD test:  $P<0.05$ ).



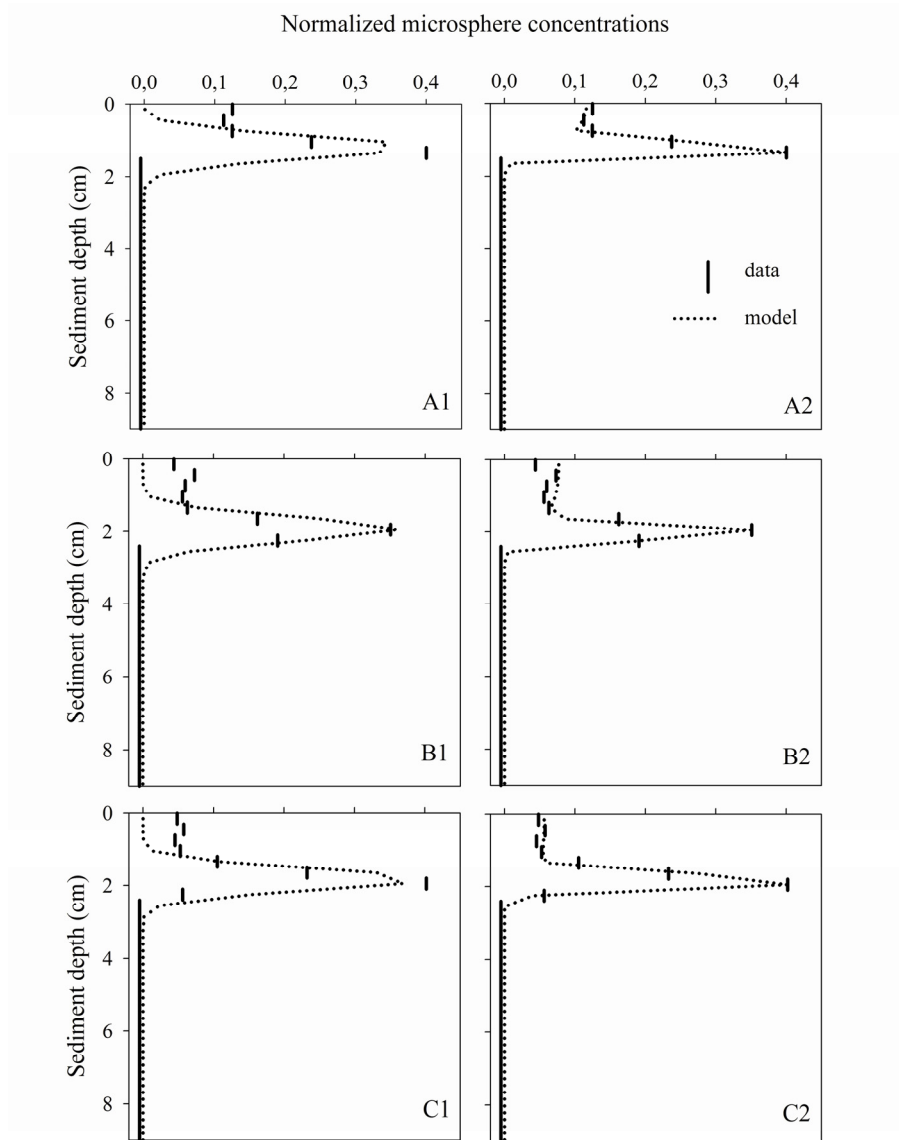


Figure 5 – Vertical profiles of microsphere concentrations in the sediments of the three replicates of [Tub/no uranium] treatment. Data are both simulated with the bioadvection-biodiffusion model (A1, B1, C1) and with the new model taking into account the removal of particles by bioconveying (A2, B2, C2).

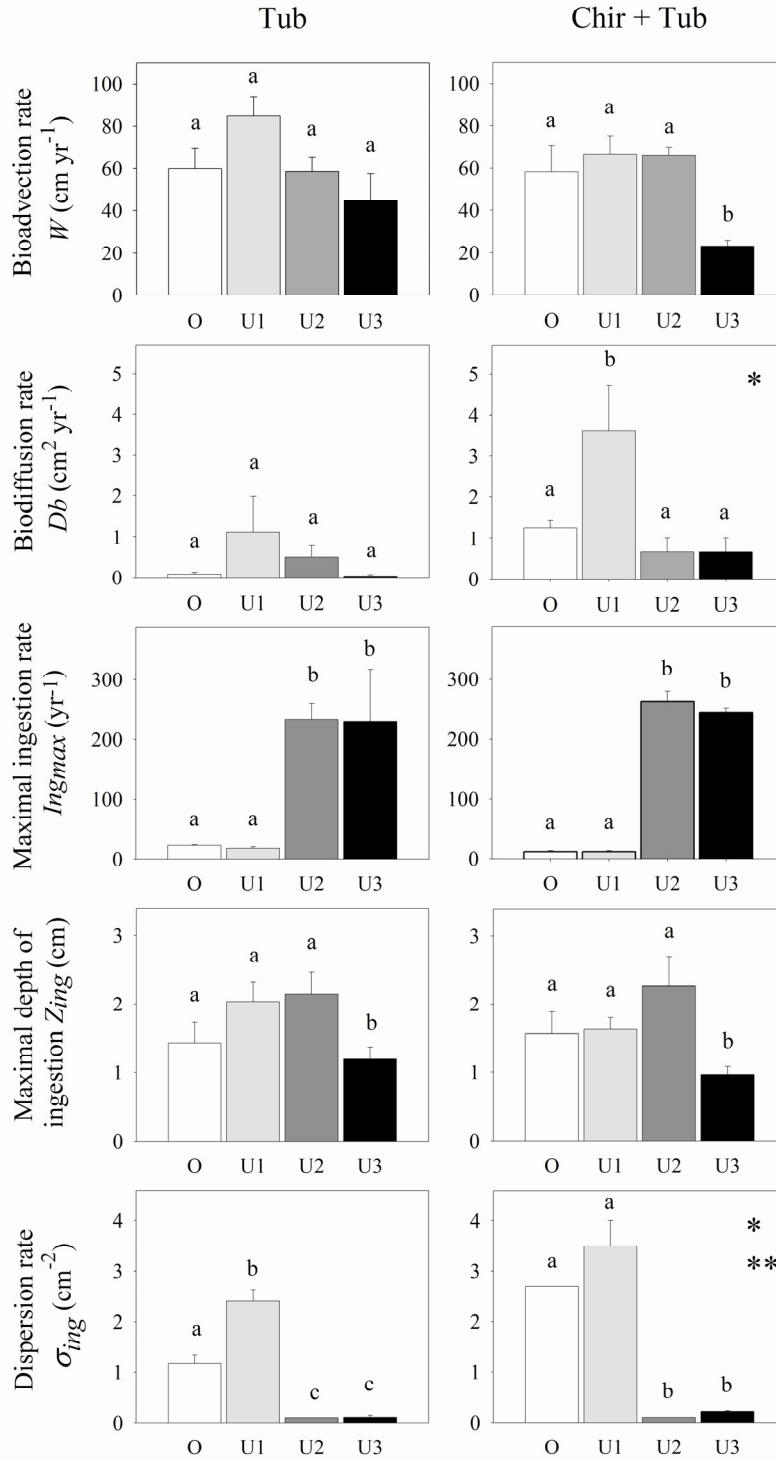


Figure 6 – Bioadvection rate, biodiffusion rate, maximal ingestion rate, maximal depth of ingestion and dispersion rate as a function of the initial uranium concentration in the sediments (0=uncontaminated, U1=150, U2=300, U3=600  $\mu\text{g U g}^{-1}$  wt) for [Tub] and [Chir+Tub] treatments. Means  $\pm$  SD ( $N=3$ ). Different letters correspond to significant differences between O, U1, U2 and U3. Stars indicate significant influence of *Chironomus riparius* (one star: effect of *C. riparius*, two stars: effect of the interaction *C. riparius*\*uranium)

The presence of *C. riparius* had no influence on  $\text{Ing}_{\text{max}}$  (ANOVA [Chir]:  $F_{16,3}=1.73$ ,  $P=0.20$ ). In parallel, the ingestion rate as a function of depth exhibited a Gaussian distribution that was very narrow for the first 2 cm of sediments at concentrations [U2] and [U3], independent of the presence of *C. riparius* (Fig. 7).

The depth of maximal ingestion  $z_{\text{Ing}}$  was only decreased for the highest uranium concentration [U3] for both [Tub] (ANOVA:  $F_{8,3}=3.8$ ,  $P=0.049$ ; Fischer's LSD test:  $P<0.05$ ) and [Tub+Chir] treatments (ANOVA:  $F_{8,3}=3.4$ ,  $P=0.05$ ; Fischer's LSD test:  $P<0.05$ ). The presence of *C. riparius* had no influence on this parameter (ANOVA [Chir]:  $F_{16,3}=0.23$ ,  $P=0.64$ ).

Finally, dispersion around  $z_{\text{Ing}}$ ,  $\sigma$ , decreased for the two highest uranium concentrations for both [Tub] (ANOVA:  $F_{8,3}=57$ ,  $P=0.000$ ; Fischer's test:  $P<0.05$ ) and [Tub+Chir] treatments (ANOVA:  $F_{8,3}=47.9$ ,  $P=0.000$ ; Fischer's LSD test:  $P<0.05$ ). For this parameter, two-way ANOVA revealed significant effects of the presence of *C. riparius* and of the interaction uranium\**C. riparius* (ANOVA [Chir]:  $F_{16,3}=22.5$ ,  $P=0.000$ ; ANOVA [uranium\*Chir]:  $F_{16,3}=6.79$ ,  $P=0.004$ ).

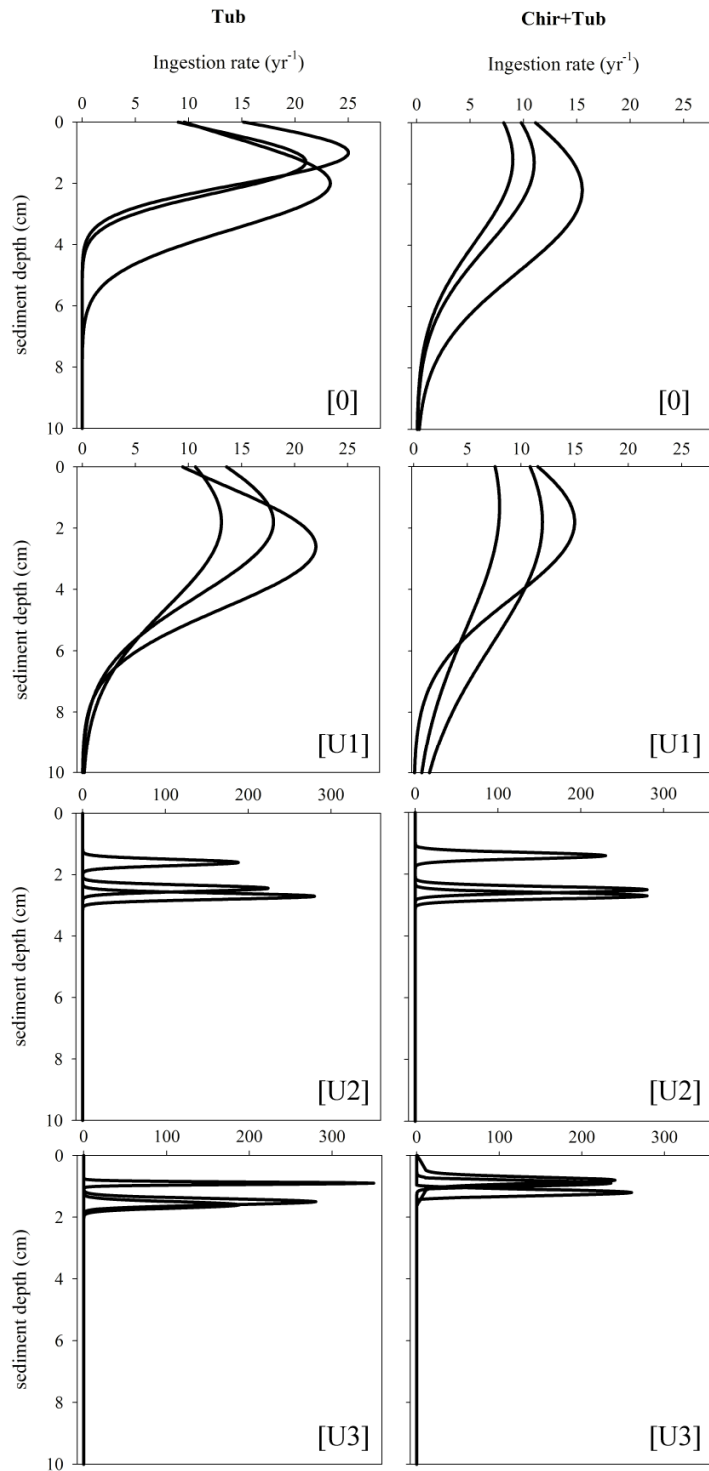


Figure 7 – Ingestion rate of *Tubifex tubifex* as a function of depth, when alone [Tub] and when associated with *Chironomus riparius* [Chir+Tub], for each uranium concentration (0=uncontaminated, U1=150, U2=300, U3=600 µg U g<sup>-1</sup> wt). The three replicates are represented.

## 4. Discussion

### 4.1 *Chironomus riparius* bioturbation

The bioturbation activity of *Chironomus riparius* was mainly limited to biodiffusion processes rather than bioadvection, since the rate of the latter was not significantly different from the control (Fig. 4). This result is in accordance with previous measurements of biodiffusion rates for other chironomid species (Matisoff & Wang 2000). Nevertheless, although the bioturbated sediment layer was less than 1 cm in depth, non-local transport of sediment particles by *C. riparius* cannot be neglected. As reported by Stief (2007) and observed in the present experiment, the larvae globally roamed on the surface of sediments, where they ate by deposit-feeding and grazing, leading to biodiffusion of particles in the top layer of sediments. However, the larvae also randomly burrowed tubes into the sediment in which they intermittently pumped water. This behaviour clearly favours the transport of particles from the top of the sediments to the bottom of the tubes. The microsphere profiles measured in the present study effectively show burial of particles in the first two or three sliced layers (<0.6-1 cm), but the maximal concentration remained at the top of the sediments after 12 days, which explains the lack of detection of significant bioadvection. Stief (2007) demonstrated that the tracer distribution tends to be homogenised in this layer after 4 weeks, meaning that the effects of biodiffusion and non-local transport cannot be distinguished. Nonetheless, the porosity profiles confirmed that bioturbation by *C. riparius* induced slight transport of water into the sediments that was limited to a very fine layer in the subsurface.

The biodiffusion rate of *C. riparius* significantly decreased with initial uranium contamination of the sediment from the lowest concentration tested ( $[U1] = 150 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt). It has already been demonstrated that the survival, growth, development and mouthpart morphology of this species can be affected by uranium (Dias et al. 2008). However, the authors detected significant effects for concentrations lower than  $10 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt in artificial sediments. Such results were not observed under our experimental conditions (data not shown). Considering the  $EC_{50}$  value ( $787 \mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt), which is 8% lower than the  $LC_{50}$ , we suggest that the bioturbation activity of *C. riparius* mainly decreased as a consequence of larval mortality in this experiment, as this endpoint was actually not sub-lethal.

Therefore, the low bioturbation activity of this species did not induce uranium release from sediment to the water column (Figs. 1 and 2). However, release from sediment under the effect of bioturbation by chironomid larvae has been reported for other heavy metals (De Haas et al. 2005), suggesting that uranium or more likely the relatively high concentrations tested in this study had a harmful effect on the larvae.

#### 4.1 *Tubifex tubifex* bioturbation

The bioturbation activity of *Tubifex tubifex* exerted a strong influence on particle reworking, with a high bioadvection rate linked to their feeding behaviour (Figs. 4 and 6). Similar findings have been reported for different freshwater oligochaete species using bioadvection and/or biodiffusion models (Fisher et al. 1980, Keilty & Landrum 1990, Matisoff et al. 1999, Landrum et al. 2002, 2004, Ciutat et al. 2005). In freshwater sediments, these worms are considered as the taxonomic group with the greatest influence on particle reworking (Matisoff & Wang 2000, Martin et al. 2004), especially since their abundance can reach very high values, even in polluted environments (Budd 2005).

The parameters measured for simulations of the two models indicate a significant negative effect of uranium for [U2] (300  $\mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt) and [U3] (600  $\mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt). The  $\text{EC}_{50}$  value for the bioadvection rate  $W$  estimated from the first model (547  $\mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt), which was 81% lower than the  $\text{LC}_{50}$ , revealed that this endpoint was appropriate for testing the effect of uranium on *T. tubifex* at a sub-lethal level. Comparable results were reported for three other species of freshwater oligochaetes, *Lumbriculus variegatus*, *Limnodrilus hoffmeisteri* and *Styiodrilus herengianus*, exposed to organic pollutants (endrine, fluoranthene, PCB) (Keilty et al. 1988, Landrum et al. 2002, 2004). Only one study tested the effect of a metallic pollutant, cadmium, on  $W$  and  $D_b$  of freshwater worms (Ciutat et al. 2005). The authors did not observe a significant effect of Cd, but a trend was apparent ( $P$ -values close to 0.05) and they suggested that the concentrations tested might be too low.

As illustrated by the different parameters measured for the second model, the lower biodiffusion  $D_b$  and bioadvection  $W$  rates corresponded to a higher maximal ingestion rate  $\text{Ing}_{\text{max}}$ , but lower penetration  $Z_{\text{ing}}$  and dispersion  $\sigma$  of the worms within the sediment column (Fig. 6). Likewise, whereas ingestion was spread over depth in uncontaminated or weakly contaminated sediments, it was limited to a fine layer near the interface to intermediate uranium concentrations (Fig. 7). As suggested by Mulsow et al. (2002) for a similar

experiment on a marine annelid species (*Heteromastus filiformis*) exposed to DDT, the worms probably decrease their ingestion rate and mainly mix the sediments by biodiffusion in the upper layers. Bioconveying still exists, but transports limited amounts of particles to the sediment surface.

The results are in accordance with observations made in a complementary study in which the length of the gallery network dug by the worms was measured from the aquarium side for a wider range of concentrations (0-5980  $\mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt). With increasing uranium concentrations, the worms concentrated in the upper sediment layers, from a homogeneous vertical distribution in uncontaminated sediments to a horizontal gallery network limited to 1 cm in depth in highly contaminated sediments (Lagauzère et al. in press). This may be the result of a trade-off in the worms' behaviour between avoiding contaminated sediment and yet having to remain within it to meet their physiological needs and to protect themselves from predators in the water column. Similar avoidance behaviour was also described for *Lumbriculus variegatus* exposed to PAH, heavy metal and pesticide contamination (West & Ankley 1998) and *Limnodrilus hoffmeisteri* and *T. tubifex* exposed to lindane and copper (Meller et al. 1998).

The additional presence of *Chironomus riparius* in sediments had no influence on most bioturbation parameters, except for biodiffusion  $D_b$  and dispersion around the depth of maximal ingestion  $\sigma$ . An apparent increase in these parameters occurred at [U1] for *T. tubifex* treatment [Tub] that became significant for *C. riparius* addition [Chir+Tub]. No interaction between the two species has yet been described in the literature. The present experimental results allow us to propose the following assumptions. First, the response of *T. tubifex* to uranium contamination can be explained by a hormetic effect, as defined by Stebbing (1982). A stimulatory response occurred after low-dose exposure that was followed by inhibition at higher doses. This phenomenon may be an adaptive response to environmentally induced disruptions of homeostasis (Calabrese & Baldwin 2001), and may be induced by low doses of radionuclides (Calabrese et al. 1987). It might be related to the effect on biomass measured under the same experimental conditions (Lagauzère et al. in press). The mechanisms by which low uranium concentrations might favour a biomass increase are unknown. Possible explanations such as enhanced food consumption or assimilation by sub-optimal sediment conditions remain to be explored. However, an increase in the exploration behaviour of worms to find more available resources, which could result in enhanced biodiffusion or

dispersion, represents a relevant assumption. Moreover, the ingestion rate measured as a function of depth seems to corroborate this notion (Fig. 7).

However, the stimulation of *T. tubifex* bioturbation at [U1] was only significant when *C. riparius* was also present in the sediments. This could be linked to space competition between the two species and to a cumulative effect of their biodiffusion activities. We can speculate that *C. riparius* favoured a hormetic effect of uranium on *T. tubifex* by increasing the supply of organic matter through mortality, mucus and faecal production and/or the refractioning of particulate organic matter by deposit-feeding at the surface (De Haas et al. 2005).

All these results are consistent with the porosity profiles (Fig. 3) since they indirectly demonstrate that bioturbation by *T. tubifex* had the greatest impact on sediments and that uranium negatively affected it, even though stimulation occurred at the lowest uranium concentration [U1]. Indeed, the profiles in uncontaminated sediments and at [U2] were very similar, whereas the profile at [U1] revealed greater penetration of water in the upper sediment layers and the profile at [U3] was not different from all the other treatments.

Finally, although uranium had significant negative effects on *T. tubifex* worms, their activity remained sufficiently high to imply important release of this metal from sediments to the overlying water (Figs. 1 and 2), as usually observed with this mode of bioturbation (e.g. Ciutat et al. 2007). Indeed, upward bioconveyers are known to favour the removal of reduced metals from bottom sediments to the interface, where the conditions favour their reoxidation and their mobility through the water column.

## 5. Conclusion

This study clearly demonstrated that tubificid worms had a greater effect than chironomid larvae on particle mixing in sediments and that they were less sensitive to uranium. As the experimental conditions were realistic compared to environmental conditions (e.g., uranium concentrations in polluted sediments, organism densities), this work shows that bioturbation by tubificid worms can have a significant impact on uranium-contaminated sediments. Under these conditions, *T. tubifex* exhibits relatively high tolerance to uranium and induces the release of this metal previously accumulated in sediment to the overlying water.



However, the uranium concentrations used in this experiment were high compared to concentrations that had significant negative effects in other ecotoxicological studies with benthic macro-invertebrates. The physico-chemical conditions (e.g., high pH and water hardness) of this experiment probably favoured low bioavailability and/or toxicity of uranium to the organisms. Nevertheless, negative effects on bioturbation were measured, and we could demonstrate that the parameters estimated from the models were useful in assessing the ecotoxicity of sub-lethal uranium levels. More investigations are now required to better estimate uranium toxicity, notably by performing other bioassays with various metallic pollutants to compare their toxicity and under different physico-chemical conditions to identify the parameters with the greatest influence on uranium toxicity. Given the risk due to the release of uranium in water, it appears crucial to understand how interactions between bioturbation and physico-chemical conditions could be modulated.

## 6. References

- Alfaro-De-la-Torre MC, Tessier A (2002) Cadmium deposition and mobility in the sediments of an acidic oligotrophic lake. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66:3549-3562
- Aller RC, Aller JY, Kemp PF (2001) Effects of particle and solute transport on rates and extent of remineralization in bioturbated sediment. In: Aller JY, Woodin SA, Aller RC (eds) *Organism-sediment interactions*. University of South Carolina Press, Columbia, SC, p 315-333
- Antunes SC, De Figueiredo DR, Marques SM, Castro BB, Pereira R, Gonçalves F (2007) Evaluation of water column and sediment toxicity from an abandoned uranium mine using a battery of bioassays. *Science of the Total Environment* 374:252-259
- Armitage PD, Cranston PS, Pinder LCV (1995) *The Chironomidae: The biology and ecology of non-biting midges.*, Vol. Chapman and Hall.
- Arzul G, Quiniou F, Carrie C (2006) In vitro test-based comparison of pesticide-induced sensitivity in marine and freshwater phytoplankton. *Toxicol Mech Method* 16:431-437
- Baborowski M, Bozau E (2006) Impact of former mining activities on the uranium distribution in the River Saale (Germany). *Applied Geochemistry* 21:1073-1082
- Banta GT, Andersen O (2003) Bioturbation and the fate of sediment pollutants- Experimental case studies of selected infauna species. *Vie Milieu* 53:233-248
- Budd GC (2005) *Tubifex tubifex*: A sludge-worm. Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Sub-programme (on-line). Plymouth: Marine Biological Association of the United Kingdom. [www.marlin.ac.uk/species/Tubifextubifex.htm](http://www.marlin.ac.uk/species/Tubifextubifex.htm).
- Calabrese EJ, Baldwin LA (2001) Hormesis: A generalizable and unifying hypothesis. *Crit Rev Toxicol* 31:353-424
- Calabrese EJ, McCarthy ME, Kenyon E (1987) The occurrence of chemically induced hormesis. *Health Phys* 52:531-541
- Chatarpaul L, Robinson JB, Kaushik NK (1980) Effects of tubificid worms on denitrification and nitrification in stream sediment. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37:656-663
- Ciutat A, 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, Gerino M, Boudou A (2007) Remobilization and bioavailability of cadmium from historically contaminated sediments: Influence of bioturbation by tubificids. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68:108-117

- Ciutat A, Gerino M, Mesmer-Dudons N, Anschutz P, Boudou A (2005) Cadmium bioaccumulation in Tubificidae from the overlying water source and effects on bioturbation. *Ecotox Environ Safe* 60:237-246
- De Haas EM, Kraak MHS, Koelmans AA, Admiraal W (2005) The impact of sediment reworking by opportunistic chironomids on specialised mayflies. *Freshwater Biology* 50:770-780
- Delmotte S, Meysman FJR, Ciutat A, Boudou A, Sauvage S, and Gerino M (2007) Cadmium transport in sediments by tubificid bioturbation: An assessment of model complexity. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71: 844-862.
- Dias V, Vasseur C, Bonzom JM (2008) Exposure of *Chironomus riparius* larvae to uranium: effects on survival, development time, growth, and mouthpart deformities. *Chemosphere* 71:574-581
- Environnement\_Canada (2003) Liste des substances d'intérêt prioritaire - Rapport d'évaluation - Rejets de radionucléides des installations nucléaires (effets sur les espèces autres que l'être humain), Gouvernement du Canada.
- Fernandes S, Meysman FJR, Sobral P (2006) The influence of Cu contamination on *Nereis diversicolor* bioturbation. *Mar Chem* 102:148-158
- Fisher JB, Lick WJ, McCall PL, Robbins JA (1980) Vertical mixing of lake sediments by tubificid oligochaetes. *Journal of Geophysical Research* 85:3997-4006
- Gérino M, Aller RC, Lee C, Cochran JK, Aller JY, Green MA, Hirschberg D (1998) Comparison of different tracers and methods used to quantify bioturbation during a spring bloom: 234-thorium, luminophores and chlorophyll a. *Estuar Coast Shelf S* 46:531-547.
- Gérino M, Stora G, Durbec J-P (1994) Quantitative estimation of bioturbation and bioadvective sediment mixing: in situ experimental approach. *Oceanologica Acta* 17:547-554.
- Gérino M, Vervier P, Stora G, Gilbert F, Poggiale J-C, François-Carcaillet F, Mermillod-Blondin F, Desrosiers G (2003) Macro- invertebrate functional groups in freshwater and marine sediments: A common mechanistic classification. *Vie et Milieu* 53:221-232.
- Hart DR, McKee PM, Burt AJ, Goffin MJ (1986) Benthic community and sediment quality assessment of Port Hope Harbour, Lake Ontario. *Journal of Great Lakes Research* 12:206-220
- Hölker F, Stief P (2005) Adaptive behaviour of chironomid larvae (*Chironomus riparius*) in response to chemical stimuli from predators and resource density. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 58:256-263
- Keilty TJ, Landrum PF (1990) Population-specific toxicity responses by the freshwater oligochaete, *Stygodrilus heringianus*, in natural lake Michigan sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9:1147-1154
- Keilty TJ, White DS, Landrum PF (1988) Sublethal responses to endrin in sediment by *Limnodrilus hoffmeisteri* (Tubificidae), and in mixed-culture with *Stygodrilus heringianus* (Lumbriculidae). *Aquatic Toxicology* 13:227-250
- Krantzberg G (1985) The influence of bioturbation on physical, chemical and biological parameters in aquatic environments: a review. *Environ Pollut* 39:99-122.
- 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.
- Kurnaz A, Küçükömeroglu B, Keser R, Okumusoglu NT, Korkmaz F, Karahan G, Cevik U (2007) Determination of radioactivity levels and hazards of soil and sediment samples in Firtina Valley (Rize, Turkey). *Applied Radiation and Isotopes* 65:1281-1289
- Lagauzère S, Coppin F, Gérino M, Delmotte S, Stora G, Bonzom J-M (submitted) A new method for estimating bioturbation activity using microspheres as particulate fluorescent tracers and fluorimetric measurements. *Limnology and Oceanography: Methods*
- Lagauzère S, Terrail R, Bonzom JM (accepted) Ecotoxicity of uranium on *Tubifex tubifex* (Annelida, Tubificidae) exposed to contaminated sediment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*
- Landrum PF, Gedeon ML, Burton GA, Greenberg MS, Rowland CD (2002) Biological responses of *Lumbriculus variegatus* exposed to fluoranthene-spiked sediment. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42:292-302
- Landrum PF, Gossiaux DC, Eadie BJ, Lansing MB, Leppänen M, Kukkonen JVK, Robinson SD, Burton GA, Greenberg M (2004) Effect of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl on the reworking behavior of *Lumbriculus variegatus* exposed to contaminated sediment. *Environ Toxicol Chem* 23:178-186.
- Lottermoser B, Ashley P, Costelloe M (2005) Contaminant dispersion at the rehabilitated Mary Kathleen uranium mine, Australia. *Environmental Geology* 48:748-761
- Lozano JC, Blanco Rodríguez P, Vera Tomé F (2002) Distribution of long-lived radionuclides of the <sup>238</sup>U series in the sediments of a small river in a uranium mineralized region of Spain. *Journal of Environmental Radioactivity* 63:153-171

- Martin P, Boes X, Goddeeris B, Fagel N (2004) A qualitative assessment of the influence of bioturbation in Lake Baikal sediments. *Global Planet Change* 46:87-99.
- Matisoff G (1995) Effects of bioturbation on solute and particle transport in sediments. In: Allen HE (ed) *Metal contaminated aquatic sediments*. Ann Arbor Press, Chelsea, MI.
- Matisoff G, 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, Wang X, McCall PL (1999) Biological redistribution of lake sediments by tubificid Oligochaetes : *Branchiura sowerbyi* and *Limnodrilus hoffmeisteri/Tubifex tubifex*. *J Great Lakes Res Internat Assoc Great Lakes Res* 25:205-219
- Mc Call PL, Fisher JB (1980) Effects of tubificid oligochaetes on physical and chemical properties of Lake Erie sediments. In: Brinkhurst RO, Cook DG (eds) *Aquatic oligochaete biology*. Plenum Press, New York. p253-317
- Meller M, Egeler P, Römbke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998) Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene, and copper sulfate to tubificid sludgeworms (oligochaeta) in artificial media. *Ecotox Environ Safe* 39:10-20
- Mermillod-Blondin F, Nogaro G, Datry T, Malard F, Gibert J (2005) Do tubificid worms influence the fate of organic matter and pollutants in stormwater sediments? *Environ Pollut* 134:57-69.
- Mermillod-Blondin F, Rosenberg R (2006) Ecosystem engineering: The impact of bioturbation on biogeochemical processes in marine and freshwater benthic habitats. *Aquatic Sciences* 68:434-442.
- Michaud AL, Hare L, Campbell PGC (2005) Exchange rates of cadmium between a burrowing mayfly and its surroundings in nature. *Limnology and Oceanography* 50:1707-1717
- Mulsow S, Landrum PF, Robbins JA (2002) Biological mixing responses to sublethal concentrations of DDT in sediments by *Heteromastus filiformis* using a <sup>137</sup>Cs marker layer technique. *Marine Ecology Progress Series* 239:181-191
- Neame PA, Dean JR, Zytaruk BG (1982) Distribution and concentrations of naturally-occurring radionuclides in sediments in a uranium mining area of northern Saskatchewan, Canada. *Hydrobiologia* 91-92:355-361
- Nogaro G, Mermillod-Blondin F, Montuelle B, Boisson JC, Lafont M, Volat B, Gibert J (2007) Do tubificid worms influence organic matter processing and fate of pollutants in stormwater sediments deposited at the surface of infiltration systems? *Chemosphere* 70:315-328
- Officer CB, Lynch DR (1982) Interpretation procedures for the determination of sediment parameters from time-dependent flux inputs. *Earth & Planetary Science Letters* 61:55-62
- Palmer MF (1968) Aspects of the respiratory physiology of *Tubifex tubifex* in relation to its ecology. *J Zool, Lond* 154:463-473
- Pelegri SP, Blackburn TH (1995) Effects of *Tubifex tubifex* (Oligochaeta: Tubificidae) on N-mineralization in freshwater sediments, measured with <sup>15</sup>N isotopes. *Aquatic Microbial Ecology* 9:289-294
- Petersen W, Wallmann K, Pinglin L, Schroeder F, Knauth H-D (1995) Exchange of trace elements at the sediment-water interface during early diagenesis processes. *Marine & Freshwater Research*:19-26
- Rasmussen JB (1984) The life-history, distribution, and production of *Chironomus riparius* and *Glyptotendipes paripes* in a prairie pond. *Hydrobiologia* 119:65-72
- Robbins JA, McCall PL, Fisher JB, Krezoski JR (1979) Effect of deposit feeders on migration of <sup>137</sup>Cs in lake sediments. *Earth Planet Sc Lett* 42:277-287
- Saari H-K, Schmidt S, Coynel A, Huguet S, Schafer J, Blanc G (2007) Potential impact of former Zn ore extraction activities on dissolved uranium distribution in the Riou-Mort watershed (France). *Science of the Total Environment* 382:304-310
- 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.
- Stebbing ARD (1982) Hormesis: The stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Sci Total Environ* 22:213-234
- Stief P (2007) Enhanced exoenzyme activities in sediments in the presence of deposit-feeding *Chironomus riparius* larvae. *Freshwater Biology* 52:1807-1819
- Stief P, De Beer D (2002) Bioturbation effects of *Chironomus riparius* on the benthic N-cycle as measured using microsensors and microbiological assays. *Aquatic Microbial Ecology*:175-185
- Stief P, De Beer D (2006) Probing the microenvironment of freshwater sediment macrofauna: Implications of deposit-feeding and bioirrigation for nitrogen cycling. *Limnology and Oceanography* 51:2538-2548
- Svensson JM, Enrich-Prast A, Leonardson L (2001) Nitrification and denitrification in a eutrophic lake sediment bioturbated by oligochaetes. *Aquatic Microbial Ecology* 23:177-186
- Thamdrup B (2000) Bacterial manganese and iron reduction in aquatic sediments. *Advances in Microbial Ecology* 16:41-84

- West CW, Ankley GT (1998) A laboratory assay to assess avoidance of contaminated sediments by the freshwater Oligochaete *Lumbriculus variegatus*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 35:20-24
- White DS, Keilty TJ (1988) Burrowing avoidance assays of contaminated Detroit River sediments, using the freshwater Oligochaete *Stylodrilus heringianus* (Lumbriculidae). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 17:673-681
- Zheng Y, Anderson R, Van Geen A, Fleisher M (2002) Remobilization of authigenic uranium in marine sediments by bioturbation. Geochim Cosmochim Acta 66:1759-1772.
- Zoumis T, Schmidt A, Grigorova L, W C (2001) Contaminants in sediments: remobilisation and demobilisation. Sci Total Environ 266:195-202.



**CHAPITRE 4 :**

**INFLUENCE DE LA BIOTURBATION**

**SUR LE FONCTIONNEMENT**

**BIOGÉOCHIMIQUE DES SÉDIMENTS**

**ET SUR LE COMPORTEMENT DE**

**L'URANIUM**



## 4.1 INTRODUCTION

Les résultats présentés dans le chapitre précédent ont permis de montrer que les deux espèces de macro-invertébrés étudiées dans ce travail de doctorat, *Chironomus riparius* et *Tubifex tubifex*, présentaient une certaine tolérance à l'uranium lors d'exposition à des sédiments contaminés. En effet, dans les conditions expérimentales choisies pour cette étude, et à partir des critères d'effets étudiés (e.g. survie, bioturbation), il est possible de dire que l'uranium n'a affecté ces organismes de façon significative que pour des concentrations plus de 10 à 100 fois supérieures aux valeurs considérées comme le bruit de fond géochimique naturel pour les sédiments d'eau douce ( $<10 \mu\text{g U g}^{-1}$  sédiment sec). Ces niveaux de contamination sont représentatifs de certains sites naturels impactés. Il est vrai que les conditions physico-chimiques de ces expériences, notamment le pH et la forte dureté de l'eau, n'ont pas été favorables à une forte biodisponibilité et/ou toxicité de l'uranium, mais les résultats obtenus montrent que ces deux espèces de macro-invertébrés sont capables de se maintenir dans des sédiments fortement contaminés en uranium, avec une activité de bioturbation suffisante pour modifier certaines propriétés des sédiments, comme la porosité et la répartition de l'uranium. Plus particulièrement, on a pu observer que la bioturbation pouvait entraîner un important relargage d'uranium vers la colonne d'eau. Ceci constituant un risque potentiel majeur pour le reste de la biocénose aquatique, il apparaît primordial de mieux comprendre les mécanismes d'interactions entre l'uranium et la bioturbation des macro-invertébrés benthiques. Afin d'approfondir ce dernier point, deux expériences complémentaires ont été menées. Elles ont consisté respectivement, à mesurer l'influence de la bioturbation (i) sur les flux d'oxygène dissous à l'interface eau/sédiment, paramètre intégrateur permettant de décrire le fonctionnement biogéochimique des sédiments, et (ii) sur la répartition et les flux de l'uranium entre les différents compartiments de l'écosystème benthique. Afin d'étudier les mécanismes géochimiques et biotiques d'im/mobilisation de l'uranium à l'interface eau-sédiment différents paramètres chimiques de l'eau et du sédiment ont été mesurés par la technique des DET (*Diffusive Equilibration in Thin-films*).

Les résultats relatifs à ces travaux sont présentés dans ce chapitre.



## **4.2 INFLUENCE DE LA BIOTURBATION SUR LA CONSOMMATION D'OXYGÈNE AU SEIN DES SÉDIMENTS**

- Présentation sous forme d'article -

**État actuel de la publication** – soumise à la revue *Freshwater Biology*.

**Titre en français** – Etude des effets combinés des invertébrés benthiques bioturbateurs et d'une pollution métallique (uranium) sur les flux d'oxygène à l'interface eau/sédiment.

**Résumé en français** – La consommation d'oxygène au sein de sédiments colonisés par des larves de *Chironomus riparius* et des vers *Tubifex tubifex* a été suivie au cours d'une expérience en laboratoire de 12 jours, grâce à un dispositif d'optodes planaires à oxygène. Ceci a été complété par des mesures de l'activité de bioturbation à partir de profils verticaux de luminophores. Des mesures supplémentaires ont été réalisées dans des sédiments contaminés à l'uranium pour évaluer l'impact d'un polluant métallique sur ces processus. Comme attendu, les deux espèces d'invertébrés ont augmenté de façon significative la consommation d'oxygène des sédiments. Après 72 heures, cette augmentation atteignait 13 et 14% en présence de *C. riparius* et *T. tubifex*, respectivement, et ceci n'a plus varié ensuite. Dans le cas des sédiments contaminés, le taux de consommation d'oxygène était 24% plus élevé dès le début de l'expérience (*i.e.* avant l'introduction des organismes), ce qui laisse supposer une influence directe de l'uranium sur la biogéochimie des sédiments. En conséquence d'une plus faible activité de bioturbation dans les sédiments contaminés, le taux de consommation d'oxygène n'a pas été modifié en présence de larves de *C. riparius*, comme c'était le cas dans les sédiments non contaminés. De façon surprenante, il était par contre plus élevé (+18%) en présence de vers *T. tubifex*. Au final, les effets combinés de l'uranium et de la bioturbation des *T. tubifex* ont entraîné une augmentation du taux de consommation d'oxygène de 53%. Ces résultats confirment l'importance écologique des larves de Chironomes et des vers Tubificidae dans les sédiments d'eau douce et mettent en avant la nécessité de mener de nouvelles recherches pour prendre en compte les interactions existant entre la bioturbation de la macrofaune, les différents métabolismes microbiens et les polluants métalliques. **Mots-clés:** bioturbation, macro-invertébrés d'eau douce, taux de consommation d'oxygène, sédiments, uranium.

**Influence of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) and *Tubifex tubifex* (Annelida, Oligochaeta) on oxygen uptake by sediments.  
Consequences of uranium contamination**

*Lagauzère S.<sup>1</sup>, Pischedda L.<sup>2</sup>, Cuny P.<sup>2</sup>, Gilbert F.<sup>3</sup>, Stora G.<sup>2</sup> and Bonzom J-M<sup>1</sup>*

---

<sup>1</sup>Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie, Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, DEI/SECRE/LRE, Cadarache 186, BP 3, F-13115 Cedex, Saint Paul Lez Durance, France.

<sup>2</sup>Laboratoire de Microbiologie, Géochimie et Ecologie Marines, UMR 6117 CNRS/COM/Université de la Méditerranée, Campus de Luminy, Case 901, F-13288 Cedex 09, Marseille, France.

<sup>3</sup>EcoLab, Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle, UMR 5245 CNRS/INP/Université Paul Sabatier, 29 Rue Jeanne Marvig, F-31055 Cedex 4, Toulouse, France.

**Abstract**

The oxygen uptake of sediments inhabited by *Chironomus riparius* larvae and *Tubifex tubifex* worms was investigated during a 12-day laboratory experiment using a planar oxygen optode device, and complemented by measurements of bioturbation activity from luminophores profiles. Additional experiments were carried out within uranium-contaminated sediment to assess the impact of a metallic pollutant on these processes. As expected, the two invertebrate species significantly increased the oxygen uptake of sediments. After 72 hours, this enhancement reached 13 and 14% for sediments inhabited by *Chironomus riparius* and *Tubifex tubifex*, respectively, and no temporal variation occurred afterwards. In the case of contaminated sediments, the oxygen uptake rate was already 24% higher from the beginning of the experiment (i.e. before the introduction of the organisms), suggesting that uranium directly influenced the sediment biogeochemistry. As a consequence of lower bioturbation activity within uranium-contaminated sediments, the oxygen uptake was not modified in presence of *C. riparius* larvae. However, it was surprisingly higher (+18%) in presence of *T. tubifex* worms. The combined effects of uranium and *T. tubifex* into the sediments lead to an increase of 53% of the oxygen uptake. These results confirmed the ecological importance of Chironomid larvae and Tubificid worms in freshwater sediments and highlight the necessity of further investigations in order to take into account the interactions existing between bioturbation, microbial metabolism and metallic pollutants.

**Key-words:** bioturbation, freshwater macroinvertebrates, oxygen uptake rate, sediment, uranium

## 1. Introduction

The oxygen uptake rate at the sediment-water interface is the main parameter used to estimate the benthic mineralization of organic matter occurring in the early diagenesis of sediments (Thamdrup & Canfield 2000). It is considered as a relevant indicator of the biogeochemical functioning of sediments. Oxygen consumption by sediments results both from abiotic and biotic processes. Molecular diffusion from the water column and advection forces induce oxygen penetration into sediments of a few millimetres or centimetres (Jorgensen & Revsbech 1985). The thickness of the oxic layer is negatively correlated to amount and flux of organic matter coming from the overlying water. An increase of organic matter input in surface sediments will lead to the increase of biological oxygen demand and thus to the reduction of the thickness of the oxygenated layer. The sediment-water interface constitutes a dynamic zone with intense oxygen consumption by heterotrophic and lithoautotrophic organisms but also production by benthic photosynthetic communities. Sediment-dwelling macrofauna, in addition to its own respiration, exert a strong influence on sediment properties that can enhance oxygen penetration and uptake rate (e.g. Heilskov & Holmer 2001, Karlson 2007). Particle mixing and solute transport induced by macrofauna bioturbation lead to a three-dimensional structuring of sediment in a mosaic of microenvironments with different physical, chemical and biological properties (Kristensen 2000). Bioturbation favours abiotic redox reactions and the growth and the development of some aerobic microbial communities and meiofauna (Aller & Aller 1986). These organisms could in return influence chemical reactions in zones with variable redox conditions. Oxygen uptake rate has been used in many studies to assess the bioturbation impact on sediment biogeochemistry, particularly in marine ecosystems (e.g. Glud et al. 2003, Mermillod-Blondin et al. 2004, Wenzhöfer & Glud 2004, Michaud et al. 2005, Zorn et al. 2006), where the benthic metabolism has been shown to increase from 25 to 271% (Kristensen 2000).

Comparatively, for freshwater ecosystems, there are few studies dealing with the influence of macroinvertebrate bioturbation on oxygen consumption by sediments. Most of the time measurements were associated to studies related to nitrogen cycling, gases or nutrients fluxes at the sediment-water interface as well as in burrow walls. Most of them concerned sediment-dwelling insect larvae (Wang et al. 2001, Stief et al. 2004, Leal et al. 2007), principally Chironomid larvae (Frenzel 1990, Svensson & Leonardson 1996, Svensson

1997, Kajan & Frenzel 1999, Lewandowski et al. 2007), which irrigate their burrows more or less permanently. Some experiments were also conducted with Tubificid worms (Chatarpaul et al. 1980, Mc Call & Fisher 1980, Matisoff 1995, Pelegri & Blackburn 1995, Svensson et al. 2001, Mermillod-Blondin et al. 2005, Nogaro et al. 2007). Precise measurements performed in the burrows of freshwater benthic macroinvertebrates and in the corresponding surrounding sediments, particularly through microsensor experiments, clearly demonstrated that these organisms, globally smaller than marine invertebrates, can also enhance oxygen and nutrient fluxes. Nevertheless, it remains difficult to perform microsensor profiles in highly bioturbated sediments and to obtain an integrative response of sediments by averaging local 1D-profiles, and so, to compare efficiently sediments with and without bioturbation. Recent developments in two-dimensional O<sub>2</sub> sensors - planar optodes - now enable detailed analysis and quantification of the oxygen distribution dynamics into sediments at a high spatial and temporal resolution (Glud et al. 1996). Although there is an increasing use of optode measurements in bioturbation studies in marine ecosystems (e.g. Timmermann et al. 2006, Behrens et al. 2007), only one study involving freshwater macroinvertebrates is currently reported in the literature (Polerecky et al. 2006).

The main objective of the present study is to provide new insights relative to the influence of bioturbation of two freshwater macroinvertebrate species, at relative high densities, on the global oxygen uptake of sediments using a planar optode device through a 12-day laboratory microcosm experiment.

The species *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) and *Tubifex tubifex* (Annelida, Tubificidae) were chosen as biological models because of their widespread distribution and abundance in freshwater ecosystems and their belonging to two distinct bioturbation functional groups as defined by (Gérino et al. 2003).

*C. riparius* larvae are surface deposit-feeders with a low burrowing activity mainly dependant of oxygen and organic matter availability and presence of predators in the water column (Rasmussen 1984, Hölker & Stief 2005). The intermittent ventilation of their tubes induces a slight downward transport of sediment particles and influences solute fluxes at the sediment-water interface (Stief & De Beer 2002, 2006, Stief 2007).

*T. Tubifex* worms are ‘conveyer-belt’ subsurface deposit-feeders, living head-down oriented and partially submerged in the sediment, with the posterior section of the body free in the overlying water so as to ensure cutaneous respiration. Foraging galleries into the sediment, these worms ingest sediment particles in reduced sediment and excrete them at the surface within fecal pellets (Robbins et al. 1979). This results in a high and ordered mixing of sediment particles with a dominant upward transport and effects on solute distribution (Chatarpaul et al. 1980, Mc Call & Fisher 1980, Matisoff 1995, Pelegri & Blackburn 1995, Svensson et al. 2001, Mermillod-Blondin et al. 2005, Nogaro et al. 2007).

To complete our analysis, measurements were additionally performed within uranium-contaminated sediments. Uranium is a natural radioactive heavy metal whose content in the environment has increased due to human activities, particularly in freshwater ecosystems (*e.g.* Baborowski & Bozau 2006, Antunes et al. 2007, Saari et al. 2007) where it can accumulate in sediments. Natural uranium concentrations considered as the ‘background level’ for freshwater sediments range below 10  $\mu\text{g U g}^{-1}$  dry weight (Kurnaz et al. 2007 and references therein), but concentrations exceeding several hundreds to several thousands of  $\mu\text{g U g}^{-1}$  dry wt have been registered in rivers and lakes closed to mining sites in Spain, Australia or Canada (Neame et al. 1982, Hart et al. 1986, Lozano et al. 2002, Lottermoser et al. 2005). Given that uranium can negatively affect benthic macroinvertebrates (Environnement Canada 2003, Dias et al. 2008, Lagauzère et al. accepted), and influence microbial community metabolism (for reviews see: Wall & Krumholz 2006, Wilkins et al. 2006, Renshaw et al. 2007), we have studied here the potential consequences of sediment contamination on oxygen fluxes at the sediment-water interface.

## 2. Materials & methods

### 2.1 Sediment and water preparation

Sediment and water used in our experiments were sampled from a closed channel of a lake on the Verdon River (Lac d’Esparron, south-eastern France). This sampling site was chosen because of the nature of the sediment (fine mud) and the quality of water (low turbidity, no pollution). Sediments were sieved through a 2-mm mesh to remove coarse fragments (*e.g.* stones, leaves, and wastes) and macrofauna, and kept frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  for a week in order to kill most of organisms that may have been present. After thawing and homogenization (mixing by mechanical stirring), they were kept at  $4^{\circ}\text{C}$  until setting up the

microcosms. The water was filtered through a 20- $\mu\text{m}$  filter and then stored at 4°C. Sediment and water main characteristics are reported in Table 1.

**Table 1 - Main physicochemical characteristics of the sediment and the water (Lac d'Esparron, Verdon, southeast France, fraction < 2mm)**

Sediment		Water	
Grain size fraction (%)			
<2 $\mu\text{m}$	9.6		
2-20 $\mu\text{m}$	14.2		
20-50 $\mu\text{m}$	32.9		
50-200 $\mu\text{m}$	41.8		
>200 $\mu\text{m}$	1.5		
Organic carbon (%)	2.4		
Total calcite $\text{CaCO}_3$ (%)	69.8	Hardness (Eq mg $\text{CaCO}_3 \text{L}^{-1}$ )	152
pH	8.2	pH	8.6
Concentration ( $\text{g kg}^{-1}$ )		Concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ )	
Aluminum (Al)	11.5	Sodium (Na)	18.0
Calcium (Ca)	297	Calcium (Ca)	52.0
Iron (Fe)	7.06	Copper (Cu)	<0.1
Manganese (Mn)	0.134	Magnesium (Mg)	5.32
Magnesium (Mg)	3.18	Potassium (K)	3.44
Sodium (Na)	1.43	Iron(Fe)	<0.1
Nitrates (N- $\text{NO}_3$ )	0.001	Aluminum (Al)	<0.1
Ammonium (N- $\text{NH}_4$ )	0.029	Zinc (Zn)	<0.1
Phosphorus (P- $\text{P}_2\text{O}_5$ )	<0.002	Manganese (Mn)	<0.1
Chlorides (Cl)	0.016	Chromium (Cr)	<0.1
Sulfur (S)	0.125	Cobalt (Co)	<0.1
		Nickel (Ni)	<0.1
		Cadmium (Cd)	<0.1
		Lead (Pb)	<0.1

## 2.2 Microcosm setting-up

Two beakers of sediment were prepared: one non-contaminated hereafter referred to as 'control' and a second one that was spiked with a solution of uranyl nitrate  $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, France) to obtain end concentration of 600  $\mu\text{g U g}^{-1}$  of dry sediment. Previous work performed in the same experimental conditions has demonstrated that this concentration was sublethal for the two studied species with an  $\text{LC}_{50}$  of 851  $\mu\text{g U g}^{-1}$  wt for *Chironomus riparius* and 2320  $\mu\text{g U g}^{-1}$  wt for *Tubifex tubifex*, respectively (Lagauzère et al. accepted). The beakers of sediment were hand-shaken for ten minutes each day for two weeks to ensure that the contamination was homogeneous.

Five separate microcosms, constituted of transparent aquaria (10 × 10 × 20 cm; length × width × height) equipped with oxygen optodes on each face, were settled. In order to restrict the organism distribution to the microcosm side, a PVC cube was inserted inside the

microcosm that reduced the sediment thickness to 1 cm in front of the optodes. Microcosms were then filled with 10 cm height of sediment and 10 cm height of water. As each microcosm side was isolated from the others, it was then considered as a replicate (i.e. four replicates/microcosm). Five different experimental conditions were considered: contaminated sediment / with Chironomid larvae [U-Chir], contaminated sediment / with Tubificid worms [U-Tub], control sediment / with Chironomid larvae [C-Chir], control sediment / with Tubificid worms [C-Tub], and control sediment / without Tubificid worms nor Chironomid larvae [C-no].

All microcosms were placed in a closed dark room with a constant temperature of 21°C and received a gentle continuous ambient air pumping through the water column. Losses due to evaporation and sampling were systematically compensated by addition of filtered lake water. Prior to inoculation, microcosms were left to equilibrate for four weeks.

### 2.3 Organism acclimatization and addition

The Tubificid worms (*Tubifex tubifex*) and the Chironomid larvae (*Chironomus riparius*) were reared at the laboratory in the same sediment and water than those used for the experiments. The Tubificid worms came from a commercial breeding (GREBIL & Fils, Arry, France) whereas the Chironomid larvae were already reared in the laboratory. Exactly 216 Tubificid worms and 51 Chironomid larvae (third and fourth instars, 5-12 mm body length) were introduced per microcosm allocated for their addition, resulting in initial densities of 60,000 and 14,000 ind m<sup>-2</sup>, respectively. These are typical densities observed under natural conditions (Palmer 1968, Rasmussen 1984, Armitage et al. 1995). After introduction of organisms, series of oxygen measurements and corresponding sediment structure images were made daily during the experimental period (twelve days).

### 2.4 Oxygen optode measurements

*Oxygen optode* – The two-dimensional oxygen distribution in sediment and overlying water was measured with semi-transparent planar oxygen optodes. Oxygen measurement was based on the dynamic quenching of oxygen on an immobilized fluorophore (Kautsky 1939). The optical sensor was composed of two thin layers, the transparent polyester support foil (HP transparency, C2936A, ~ 150 µm thick) and the sensing layer where the oxygen-quenchable fluorophore, the platinumium (II) meso-tetra (pentafluorophenyl) porphyrin (Frontier



Scientific Inc.) was embedded in a polystyrene matrix (~20 µm) (Papkovsky et al. 1992, Liebsch et al. 2000). Sensing layer mixture was composed of 3 mg (1 mg mL<sup>-1</sup>) of Pt-PFPP dissolved in 3ml of toluene (Rathburn Chemicals Ltd) and 0.65 g (5%) of polystyrene pellets (Acros Organics) dissolved in 15ml of toluene. The two solutions were mixed and spread on the polyester support foil (300 cm<sup>2</sup>). The solvent was let to evaporate slowly until the membrane became completely dry. Optodes were further cut to fit inside the different microcosms (one per face).

*O<sub>2</sub> measurement-calibration-O<sub>2</sub> value getting* – For the oxygen measurement, each microcosm replicate was placed in front of the optical system which was controlled by the Image Pro Plus - Scope Pro package. The optode was excited by a Xenon lamp light (Perkin Elmer, 300 Watts) passing through a shutter and a glass filter (405 ± 10 nm, Omega Optical). The fluorescence emitted by the optode passed through another glass filter (654 ± 24 nm) and was collected by a Peltier cooled 12 bit monochrome CDD camera (KAI 2000, 1600 × 1200 pixels, 7.4 × 7.4 µm). The oxygen optodes were calibrated before and after each experiment by a 3-points calibration method. For the two intermediate calibration points (90%, air bubbling and 50%, N<sub>2</sub> bubbling) the oxygen concentration was first measured just behind the optode with an oxygen probe (LDO HQ10, Hach) and immediately followed by the capture of the oxygen image. The 0% saturation was taken in the deeper non-bioturbated sediments.

Three measurements were taken for each replicate (side of microcosm) before introduction of organisms (time 0) and repeated after 0.5, 72, 120, 216 and 288 hours. Images of the sediment structure were obtained without the use of filters. Their acquisition was performed in darkness during an exposure time of 30 s and 1 s for oxygen and sediment structure, respectively. Interval between the two image acquisitions was 30s. The digital images were then stored in 12 bit grey scale (0 to 4095). For each time series, the acquisition and storage of images were automatized with a custom-made script. Final image pixel resolution was 56 µm (1 cm corresponded to 180 µm).

Pixel intensity on the recorded images was then converted in oxygen concentration by the use of a non-linear relation, slightly modified from Stern-Volmer equation (Klimant et al. 1995), allowing to take into account the oxygen quenching constant and the non-quenchable fraction of the luminescence:

$$I = I_0 [\alpha + (1 - \alpha) \cdot (I / (I + K_{sv} \cdot C))] \quad (1)$$

where  $I_0$  is the fluorescence intensity in the absence of oxygen,  $K_{sv}$  is the quenching constant expressing the quenching efficiency,  $C$  is the oxygen concentration (Stern & Volmer 1919) and  $\alpha$  is the non-quenchable fraction of the luminescence including scattered stray light. The constants  $\alpha$  and  $K_{sv}$  were determined from the two intermediate calibration points with oxygen concentration  $C1$  and  $C2$  corresponding to  $I1$  and  $I2$  intensities respectively, and integrated in Eq. (1):

$$K_{sv} = [I_0(C_2 - C_1) - (I_1 C_2 - I_2 C_1)] / [(I_1 - I_2) C_1 C_2] \quad (2)$$

$$\alpha = [I(I + K_{sv} C) - I_0] / (I_0 K_{sv} C_1) \quad (3)$$

Having estimated the  $\alpha$ ,  $K_{sv}$  and  $I_0$ , oxygen concentration was obtained by rearranging Eq. (1):

$$C = (I - I_0) / (K_{sv} (I - I_0) \cdot \alpha) \quad (4)$$

The applied oxygen optode were custom made and were homogenous enough, it was therefore possible to use average constants of  $\alpha$  et  $K_{sv}$ , rather than performing pixel to pixel calibration as in some earlier planar optode studies (Glud et al. 1996).

Oxygen flux ( $O_2$  uptake rate) and penetration depth ( $pdO_2$ ) into the sediment were measured from the obtained images whereas the length of the sediment-water interface ( $L_{SWI}$ ) was measured on the sediment structure images.

*Diffusive oxygen flux calculation* – Vertical oxygen profiles extracted from images make it possible to determine diffusive oxygen flux  $J_{(z)}$  which was calculated from Fick's first law of diffusion (Berner 1980, Jorgensen & Revsbech 1985, Rasmussen & Jorgensen 1992):

$$J_{(z)} = -\Phi D_s \frac{\partial C_{(z)}}{\partial z}, \text{ where } \Phi \text{ is the porosity, } D_s \text{ is the oxygen diffusion coefficient in}$$

sediments ( $cm^2 s^{-1}$ ),  $C$  is the oxygen concentration ( $\mu mol m^{-3}$ ),  $z$  is the depth (cm) and  $\frac{\partial C_{(z)}}{\partial z}$

is the oxygen gradient. This approach works on the assumption that molecular diffusion is the main oxygen transport mechanism. Oxygen fluxes were calculated by using the software PROFILE (Berg et al. 1998).

### 2.5 Bioturbation activity measurement

The bioturbation activity of *Tubifex tubifex* worms and *Chironomus riparius* larvae was assessed using green luminophores which are inert sand particles coated with a fluorescent

paint ( $\emptyset = 63 \mu\text{m}$ ,  $\lambda_{\text{excitation}} = 450 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{émission}} = 520 \text{ nm}$ , Geologisch-paleontologisches institute and Museum of Kiel University, Germany). One day before introduction of organisms, 2 g of luminophores were gently deposited on the top of the sediment of each microcosm.

Destructive sampling took place after 12 days of exposure, i.e. 288 hours. The overlying water was removed and the sediment core was carefully sliced in fourteen layers of 0.5-cm thickness from 0 to 4 cm of depth and 1-cm thickness from 4 to 10 cm of depth. Each layer was hand-homogenized and a sediment subsample was retrieved, weighted and dried 72 hours at room temperature to evaluate the luminophore content. This counting was achieved by a fluorimetric technique after a calibration step with sediment samples of known luminophore concentrations (Lagauzère et al. submitted). From this, the number of luminophores per layer ( $n$ ) and the total number in the profile ( $N$ ) were obtained, and hence, the fraction ( $n/N$ ) of luminophores per layer could be determined. The luminophore concentration was estimated as  $C=n/(z \times A \times N)$ , where  $z$  (cm) is the thickness of the sampling layer and  $A$  the core area. To estimate bioturbation parameters, biodiffusion coefficient  $D_b$  and bioadvective rate  $V$ , the profiles were simulated using the classical biodiffusion-bioadvection model in non-steady state conditions (Officer & Lynch 1982, Gérino et al. 1994, Gérino et al. 1998). The maximal depth where luminophores were qualitatively detected by epifluorescence microscopy was also reported as maximal depth of bioturbation (MDB).

### *2.6 Physico-chemical measurements*

The temperature, pH, and concentration of dissolved oxygen in the overlying water of the microcosms were measured at days -2, 0 (introduction of organisms), 4, 7 and 12 (end of the experiment). In order to indirectly estimate the release of uranium from the sediment to the overlying water, total uranium concentration was assessed by ICP-AES (Optima 4300 DV, Perkin-Elmer, USA) from acidified (2%  $\text{HNO}_3$ ) water samples collected when the aforementioned measurements were taken.

### *2.7 Statistical analyses*

All statistical analyses were performed using the STATISTICA® software package (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Before each analysis, the normality (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of data variance (Levene test) were tested. It was repeated after transformation of data when these assumptions were not first found. A significance level of 5 % was applied to all analyses.

The physico-chemical parameters, the oxygen uptake rate, the oxygen penetration depth, and the length of the sediment-water interface were analyzed by repeated-measures ANOVAs (RM-ANOVA), both with all the data to test effect of treatment, time, and time\*treatment; and with data from 72 to 288 hours to compare treatments after equilibration. These analyses of variance were followed by Newman-Keuls multiple-comparisons tests.

For each macroinvertebrate species, the effects of uranium on bioturbation parameters (bioadvective rate  $V$  and biodiffusive rate  $Db$ ) were analyzed using one-way ANOVAs, including the control treatment [C-no], followed by Tukey's post hoc comparison tests.

### 3. Results

#### 3.1 Oxygen uptake rate

Analysis of oxygen data on times 0, 0.5, 72, 120, 216 and 288 hours, revealed significant effects of both time, treatment and time\*treatment (RM-ANOVA 'time', 'treatment', 'time\*treatment':  $F_4=6.44$ ,  $F_{4,13}=4.86$ ,  $F_{16,52}=3.20$ , respectively,  $P<0.05$ ). These differences mainly came from the two first series of data. The analysis of data from 72 to 288 hours, showed only a significant effect of treatment (RM-ANOVA 'treatment':  $F_{4,15}=10.58$ ,  $P<0.05$ ) and these data were averaged in order to consider the systems after equilibration (Fig. 1).

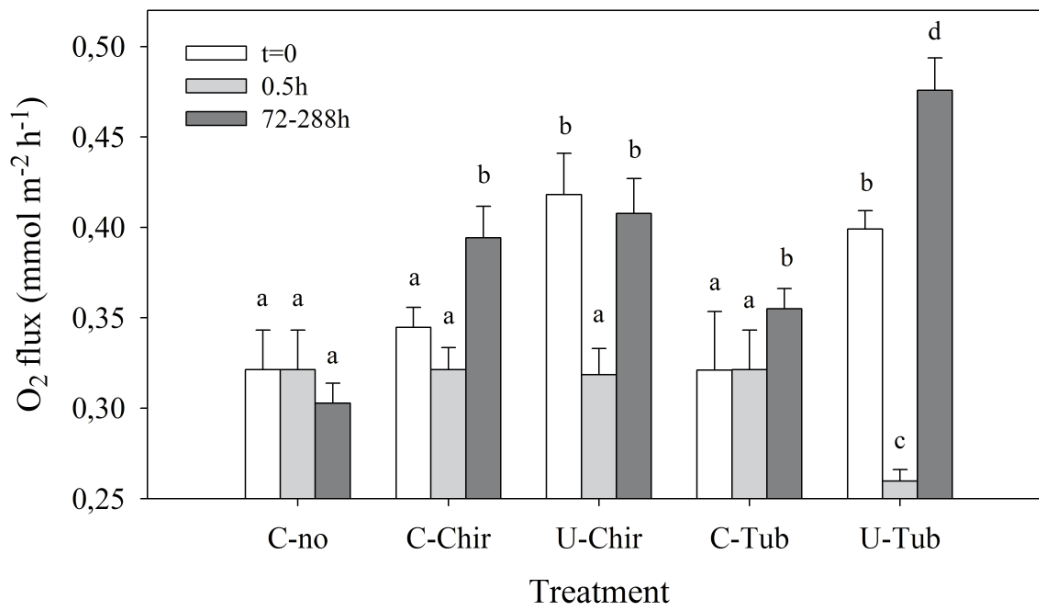


Figure 1 – Oxygen fluxes at the sediment/water interface in the different treatments (C: uncontaminated, U: contaminated, Chir: presence of *Chironomus riparius*, Tub: presence of *Tubifex tubifex*, no: no organism) before the introduction of organisms (white bars), after 0.5 hours (grey bars), and after 72 hours to the end (black bars). Means  $\pm$  SD ( $N=4$ ). Different letters indicate significant differences.

At the beginning of the experiment, i.e. before introduction of organisms and after four weeks of equilibration (time 0), the two microcosms corresponding to the uranium-contaminated experimental treatments, [U-Chir] and [U-Tub], had a higher diffusive oxygen uptake rate than uncontaminated microcosms, [C-no], [C-Chir] and [C-Tub] (Newman-Keuls test:  $P < 0.05$ ). With an oxygen flux at the sediment-water interface of  $0.33 (\pm 0.08) \text{ mmol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  in uncontaminated treatments and  $0.41 (\pm 0.06) \text{ mmol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  in contaminated treatments, that corresponded to an increase of 24% in presence of uranium.

Thirty minutes after introduction of organisms in microcosms, oxygen uptake rate was similar for all the treatments, except for [U-Tub] with a lower value (Newman-Keuls test:  $P < 0.05$ ). Compared to initial conditions, the oxygen uptake decreased significantly in uranium-contaminated microcosms (Newman-Keuls test:  $P < 0.05$ ).

During the rest of the experiment, oxygen uptake rate was constant in each treatment (data not shown, RM-ANOVA ‘time’:  $F_{4,15}=1.16$ ,  $P > 0.05$ ). It was significantly higher in all inhabited microcosms than in control microcosm, particularly in the [U-Tub] treatment which was significantly different from all the others (RM-ANOVA ‘treatment’:  $F_{4,15}=10.58$ ,  $P < 0.05$ ; Newman-Keuls test:  $P < 0.05$ ). Compared to initial conditions, this rate increased during the experiment, except in the [U-Chir] treatment (RM-ANOVA ‘time\*treatment’:  $F_{16,52}=3.20$ ,  $P < 0.05$ ; Newman-Keuls test:  $P < 0.05$ ).

### 3.2 Oxygen penetration depth ( $pdO_2$ )

As for oxygen uptake rate, RM-ANOVA of all the data concerning  $pdO_2$  depth, showed significant effects of time, treatment and time\*treatment; while only the treatment had a significant effect with data from 72 to 288 hours. However, given that any significant difference exist between initial conditions and after thirty minutes for each microcosm (RM-ANOVA ‘time\*treatment’:  $F_{16,52}=1.33$ ,  $P > 0.05$ ), only the averaged data from 72 to 288 hours were represented in Figure 2. Compared to non-inhabited control treatment, the  $pdO_2$  was similar in *C. riparius* treatments, while it was reduced in *T. tubifex* treatments, independently of the uranium contamination (RM-ANOVA ‘treatment’:  $F_{4,15}=16.932$ ,  $P < 0.05$ ; Newman-Keuls test:  $P < 0.05$ ).

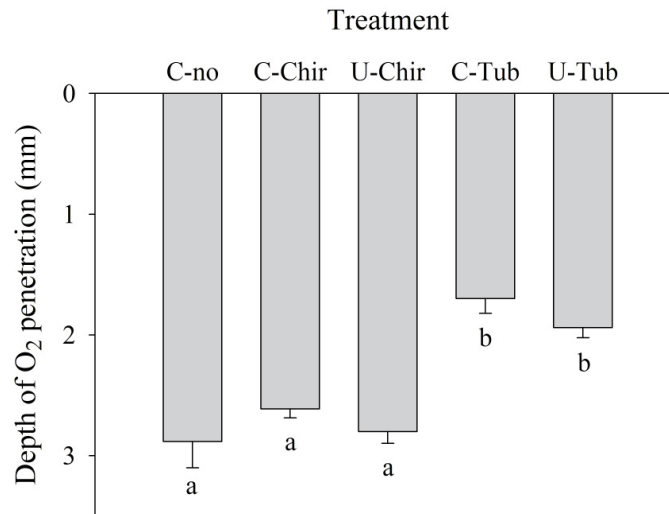


Figure 2 – Depth of oxygen penetration  $p_{dO_2}$  into the sediments of the different treatments (C: uncontaminated, U: contaminated, Chir: presence of *Chironomus riparius*, Tub: presence of *Tubifex tubifex*, no: no organism). Means  $\pm$  SD ( $N=4$ ). Different letters indicate significant differences.

### 3.3 Length of the sediment-water interface ( $L_{SWI}$ )

For the same reasons than for oxygen penetration, only the averaged  $L_{SWI}$  measurements from 72 to 288 hours are represented on Figure 3. These data showed a significant effect of treatment (RM-ANOVA ‘treatment’:  $F_{4,15}=10.65$ ,  $P<0.05$ ). In all inhabited treatments, the  $L_{SWI}$  was higher than in the non-inhabited control treatment, and there was a significant difference between [C-Chir] and [C-Tub] treatments (Newman-Keuls test:  $P<0.05$ ).

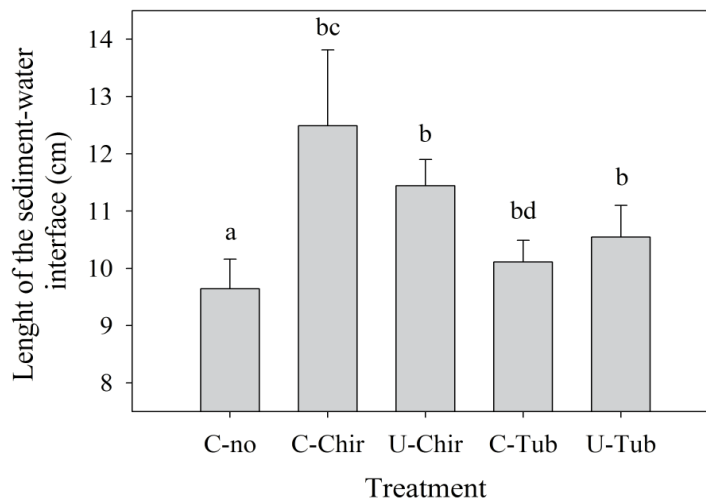


Figure 3 – Length of the sediment/water interface  $L_{SWI}$  of the different treatments (C: uncontaminated, U: contaminated, Chir: presence of *Chironomus riparius*, Tub: presence of *Tubifex tubifex*, no: no organism). Means  $\pm$  SD ( $N=4$ ). Different letters indicate significant differences.

### 3.4 Bioturbation activity

Bioadvective rate  $V$  and biodiffusive rate  $Db$  estimates from fitting the luminophore profiles after 12 days showed significant effect of uranium on both *Chironomus riparius* and *Tubifex tubifex* bioturbation activities (Table 2).

**Table 2 - Effect of uranium on bioadvective rates ( $V$ ), biodiffusive rates ( $Db$ ), and maximal depth of bioturbation (MDB) of *Chironomus riparius* and *Tubifex tubifex* after 12 days, compared to control experimental treatment (no uranium, no organism). Means  $\pm$  SD.**

Treatment	Code	$V$ (cm y <sup>-1</sup> )	$Db$ (cm <sup>2</sup> y <sup>-1</sup> )	MDB (cm)
<i>C. riparius</i>				
control	C-no	1.5 ( $\pm$ 1.0) <sup>a</sup>	1.0 ( $\pm$ 0.0) <sup>a</sup>	1.5
- uranium	C-Chir	2.8 ( $\pm$ 0.9) <sup>a</sup>	3.7 ( $\pm$ 0.2) <sup>b</sup>	3.5
+ uranium	U-Chir	2.7 ( $\pm$ 1.7) <sup>a</sup>	2.4 ( $\pm$ 0.2) <sup>c</sup>	2.5
<i>T. tubifex</i>				
control	C-no	1.5 ( $\pm$ 1.0) <sup>A</sup>	1.0 ( $\pm$ 0.0) <sup>A</sup>	1.5
- uranium	C-Tub	59 ( $\pm$ 1.7) <sup>B</sup>	5.0 ( $\pm$ 0.9) <sup>B</sup>	10.0
+ uranium	U-Tub	21 ( $\pm$ 4.0) <sup>C</sup>	3.8 ( $\pm$ 1.3) <sup>B</sup>	6.0

<sup>a, b, c</sup> Different letters correspond to significant differences in *C. riparius* experiments

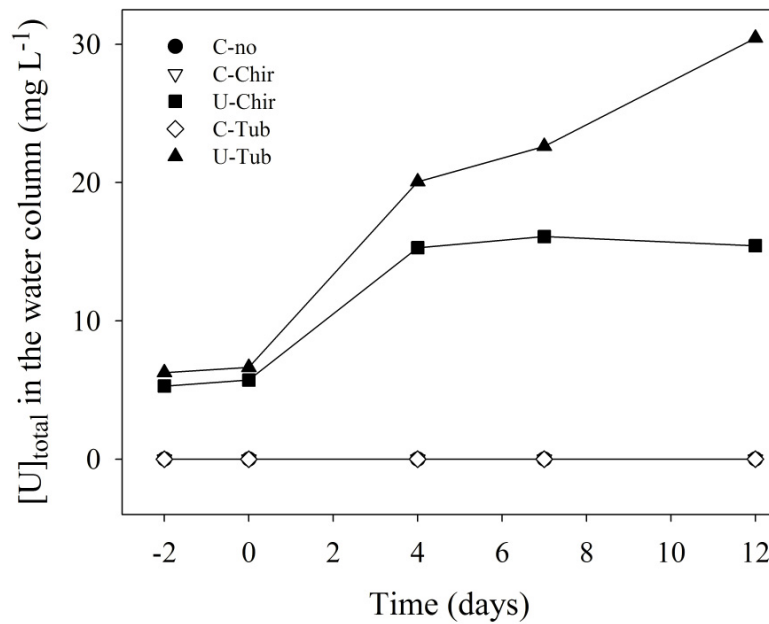
<sup>A, B, C</sup> Different letters correspond to significant differences in *T. tubifex* experiments

*C. riparius* led to a low sediment particle reworking as illustrated by the slight downward transport of luminophores within the sediment (<3.5 cm of depth). This particle burial was lower within uranium-contaminated sediment (<2.5 cm of depth). Comparison of [C-no], [C-Chir] and [U-Chir] treatments, showed that the bioturbation of *C. riparius* was mainly limited to biodiffusion processes (quantified by the  $Db$ ), and that this parameter was reduced in presence of uranium (ANOVA:  $F_{2,6}=273.5$ ,  $P<0.05$ ; Tukey test:  $P<0.05$ ), while any significant difference was detected for bioadvective rate  $V$  (ANOVA:  $F_{2,6}= 0.98$ ,  $P>0.05$ ).

On the other hand, *T. tubifex* led to a strong burial of luminophores as attested by the presence of these tracers at the bottom of the uncontaminated microcosm (10 cm). In uranium-contaminated sediment, no luminophore was detected below 6 cm. Compared to control treatment [C-no], both bioadvection and biodiffusion rates were enhanced in *T. tubifex* treatments, [C-Tub] and [U-Tub] (ANOVA:  $F_{2,6}= 396.97$  and  $F_{2,6}=13.8$ , respectively,  $P<0.05$ ; Tukey test:  $P<0.05$ ), but only the bioadvective rate was affected by uranium (Tukey test:  $P<0.05$ ).

### 3.5 Physico-chemical measurements

The data set from all of the microcosms showed that the temperature was maintained at  $21.1 (\pm 0.1)^\circ\text{C}$ , the dissolved oxygen concentration at  $7.7 (\pm 0.3) \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  and pH at  $8 (\pm 0.2)$  throughout the experiment, without any significant difference between treatments (RM-ANOVA:  $P > 0.05$ ). The total uranium concentration in the water column of microcosms gradually increased over time in both [U-Chir] and [U-Tub] treatments, with a factor of 2.7 and 4.6, respectively (Fig. 4).



**Figure 4 – Evolution of the uranium concentration in the water column of the different microcosms during 12 days.**

## 5. Discussion

### 5.1 Effects of bioturbation

As previously demonstrated both in marine and freshwater ecosystems, the present results confirmed that benthic macroinvertebrates enhance the diffusive oxygen uptake of sediments. Three days after introduction of *Chironomus riparius* and *Tubifex tubifex* in the microcosms, this parameter has increased of 13% and 14%, respectively, and remained stable until the end of the experiment (Fig. 1). Compared to control treatment [C-no], the oxygen uptake between 72 and 288 hours was 27% and 20% much higher in *C. riparius* [C-Chir] and *T. tubifex* [C-Tub] treatments, respectively. However, this enhancement is lower than the one



observed in previous studies where oxygen uptake rates were shown to be increased by a factor 2 or 3 with similar densities for the same organisms (Pelegri & Blackburn 1995, Svensson & Leonardson 1996 and references therein). Despite of the variability of experimental conditions, results obtained using oxygen microelectrodes measurements were relatively similar between those studies. Thus, differences between the present results and previous ones can be probably linked to the measurement procedure used (2D vs. microelectrodes measurements). Indeed, for each time of measurement, the presented results correspond to the averaged data of 3 random oxygen profile measurements per replicate, i.e. a total of 12 measurements per treatment. Maximal values indicated locally an increase of a factor 2.0 and 1.8 for *C. riparius* and *T. tubifex* treatments, respectively, and are more in agreement with those previously observed. Yet the only experiment using oxygen optodes in freshwater sediments only focuses on local oxygen fluxes in the burrow wall of *Chironomus plumosus* (Polerecky et al. 2006). The behaviour of organisms was the same in our case than in the latter cited experiment, i.e. a rapid burial of organisms into the sediment after their introduction in microcosms. However, these authors measured significantly higher oxygen uptake rates in the sediment surrounding the burrows during 16 minutes after the introduction of organisms in the sediments; whereas no changes in the global oxygen uptake rate is observable 30 minutes after the introduction in our study (Fig. 1). Although local changes probably occur very rapidly during the settling of macroinvertebrates into the sediments changes are, at the global scale of the benthic interface, not necessarily visible.

The oxygen uptake rate enhancement in microcosms inhabited by *C. riparius* and *T. tubifex* can be related both to their own respiration and to the effects of their bioturbation activities on the oxygen fluxes within the sediment (oxygen pore water diffusion, bacterial respiration). Even if it is not possible to determine the contribution of each process without respiration rate measurements, as shown by bioadvective and biodiffusive rates (Table 2), effects of bioturbation could not be excluded to explain the higher oxygen uptake of macroinvertebrate-inhabited sediments. Indeed, Glud et al. (2003) demonstrated that the respiration of burrowing organisms represents a minor part of the total oxygen benthic consumption linked to marine macrofauna. This observation was also reported in freshwater experiments involving *Chironomus* larvae (Svensson & Leonardson 1996) and *Tubifex* worms (Mc Call & Fisher 1980). These authors measured that only 42% and 20% of the total oxygen consumption of sediments were relative to the own respiration of the macro-organisms, respectively. The increased oxygen consumption of sediments is also linked to the physical,

chemical and biological modifications induced by bioturbation. Among physical disturbances, in bioturbated sediments, a longer sediment-water interface (Fig. 3) has been shown to favour the oxygen exchanges by increasing the diffusion surface (Pischedda et al. 2008). Advective transport can also be increased due to higher porosity of the uppermost layers of sediments. However, the measured oxygen penetration into the sediment was not higher in *C. riparius* treatment and was lower in *T. tubifex* treatment, comparatively to control treatment (Fig. 2). Although penetration of oxygen into the sediment due to bioturbation is effective as shown by the existence of clearer brown areas (oxic) in the sediment surrounding the organisms (data not shown) and microsensor measurements in the wall of burrows reported in previous studies (Wang et al. 2001, Polerecky et al. 2006), this result suggests that intense oxygen consumption occurred in subsurface sediments by stimulation of the microbial respiration. Through microcosm experiments, Van de Bund et al. (1994) demonstrated that the microbial production increased by a factor 4.4 and 1.4 in sediments inhabited by *C. riparius* and *T. tubifex*, respectively, despite of reduction of the bacterial abundance.

The consequences of *C. riparius* larvae bioturbation on the sediment biogeochemistry have already been well documented (Rasmussen 1984, Van de Bund et al. 1994, Stief & De Beer 2002, De Haas et al. 2005, Hölker & Stief 2005, Stief 2007). Larvae can exhibit two distinct behavioral modalities: (i) displacements at the top of the sediment and/or (ii) digging and irrigating of burrows. Their relative importance is mainly determined upon density of organisms, oxygenation of the overlying water, granulometry and organic content of sediments. In our experiment, both these two behaviours were observed, with no apparent dominance of one of them. At first sight, larvae roamed at the sediment surface where they could feed by grazing leading to the reduction of microbial biomasses. They could also act as deposit-feeders, resulting in the exposition of sediment-associated organic matter to variable oxic and redox conditions through alternative burial/rising and ingestion/egestion of particles. Stief (2007) demonstrated that this mechanism stimulates microbial hydrolytic exoenzyme production and thus the decomposition of organic matter. Furthermore, larvae randomly built burrows into the sediment and irrigate them through intermittent pumping of the overlying water. These burrows clearly enhance the exchange area at the sediment-water interface and as a consequence the fluxes of solutes and gases (Svensson 1997, Kajan & Frenzel 1999, Lewandowski et al. 2007). With supply of fresh organic matter linked to mucus and faeces production, as well as availability of nutrients, these burrows provide privileged habitats for microbial communities in subsurface sediments (Stief & De Beer 2002). Therefore, aerobic

nitrification can be stimulated by concomitant ventilation and ammonium excretion in the burrows, and denitrification can be facilitated by higher nitrate penetration into periodically anoxic sediment (Svensson & Leonardson 1996, Svensson 1997, Stief & De Beer 2002).

Comparatively, the influence of Tubificid worms on oxygen dynamics has received less attention, principally because they live in non-irrigated galleries. However, their behaviour exert a strong influence on sediment reworking and thus on organic matter processing, all the more so their abundance can reach very high values in natural sediments, up to several millions ind m<sup>-2</sup> (Palmer 1968). Their conveyer-belt feeding activity leads to the transport of reduced materials from the bottom sediment to the surface and to the formation of a top layer mainly composed of mucus-bounded faecal pellets. Both abiotic and biotic oxidation reactions are then stimulated. For instance, Mc Call & Fisher (1980) demonstrated that, for a density of 100000 ind m<sup>-2</sup>, oxygen uptake rate of sediments was doubled in presence of worms, with 50-70% relative to the oxidation of removed iron sulfates (Fe-S) from the bottom sediments, 10-30% relative to the stimulation of microbial activity, and only 20% relative to the own respiration of worms. The high porosity of the pelletized top layer, coupling with the higher exchange surface of the sediment-water interface due to the dense network of galleries dug into sediments; enhance diffusion and advection, and then the fluxes of solutes (Matisoff 1995, Mermillod-Blondin et al. 2005, Nogaro et al. 2007). Therefore, aerobic respiration and denitrification can be stimulated by these worms (Chatarpaul et al. 1980, Svensson et al. 2001), proportionally to their density into the sediments (Mc Call & Fisher 1980, Pelegri & Blackburn 1995). On the other hand, Pelegri & Blackburn (1995) demonstrated that nitrification was stimulated at low densities (<20000 ind m<sup>-2</sup>) whereas it was inhibited at high densities (20000 to 70000 ind m<sup>-2</sup>). These authors suggested that at high densities, the oxygen penetration into the sediments is reduced by the transport of reduced materials and the intense aerobic microbial activity in the feces layer. These anoxic conditions stimulate denitrification and limit nitrification to a very fine layer under the surface of sediments. The lower oxygen penetration measured in *T. tubifex* treatments (Fig. 3) fits well with this assumption.

Finally, despite their different ways of life, both *C. riparius* larvae and *T. tubifex* worms enhanced the oxygen utilization in subsurface sediments, with a quantitatively similar resultant oxygen flux at the sediment-water interface (Fig. 1). However, the density of *T. tubifex* in microcosms was more than 4 times higher than the density of *C. riparius*. Given that oxygen uptake rate of sediments is correlated with the density of organisms (Pelegri &

Blackburn 1995, Svensson & Leonardson 1996), this result suggests that the bioturbation of Chironomid larvae has a more pronounced effect on oxygen distribution than the bioturbation of Tubificid worms. This probably reflects the higher oxygen demand of Chironomid larvae compared to Tubificid worms, and above all the higher impact of bioirrigation on oxygen distribution compared to bioconveying. Svensson et al. (2001) suggested the same interpretation for the influence of the bioturbation on denitrification. Be that as it may, the applied densities of organisms fall well within the range of abundances that are realistic for natural sediments.

### 5.2 Consequences of sediment uranium contamination

At initial conditions (time 0), the oxygen uptake rate of sediments was 24% higher in uranium-contaminated microcosms compared to uncontaminated microcosms (Fig. 1). Given that sediments were contaminated before introduction of *Chironomus riparius* and *Tubifex tubifex*, this result suggests that uranium directly influenced the benthic biogeochemistry. Two assumptions can be proposed: the oxidation of uranium into the sediment consumed oxygen and/or uranium modified the microbial community by directly or indirectly stimulating aerobic organisms. The first hypothesis can be consistent with the uranium concentration measured at initial conditions in the water column. Indeed, before the setting-up of microcosms, the sediments were spiked with uranium in a close beaker. Given the low oxygen availability, uranium contained in the sediments might be under its reduced form, at the redox state (+IV), which is not soluble (Markich 2002). During the 4 weeks of equilibration of the microcosms, the exposure to a constantly aerated water column, probably favoured the oxidation of uranium in U(+VI) in surface sediments, and thus its higher solubility (Markich 2002). The relative high uranium concentration observed in the water column before the introduction of organisms may reflect the release of uranium from the sediments during this step of the experiment. The second hypothesis related to the stimulation of microbial respiration by uranium is more difficult to assess. Most of available literature dealing with the interactions between sedimentary micro-organisms and uranium focuses on immobilization of uranium through the bioreduction of U(+VI) in U(+IV) in the context of bioremediation of contaminated sites (Wall & Krumholz 2006, Wilkins et al. 2006, Renshaw et al. 2007). The toxicity of uranium to micro-organisms has been so far poorly investigated, but it seems to be much lower than toxicity of other heavy metals (Nies 1999). A case of resistance was also reported on an aerobic bacterium which can incorporate uranium in the form of intra-cytoplasmic polyphosphate-associated granules by a detoxification process

(Suzuki & Banfield 2004). Furthermore, uranium may be positive factor for some micro-organisms as it can be a potential substrate for anaerobic respiration (Lovley et al. 1991). Most of iron-reducing micro-organisms able to conserve energy by coupling H<sub>2</sub> and organic matter oxidation with the reduction of ferrous ions can also reduce uranium. Some sulphate-reducers bacteria can also enzymatically reduce ferrous ions and uranium without keeping energy or grow up with either ferrous ions or uranium as sole electron acceptor (Wilkins et al. 2006). In natural uranium-contaminated environments, it was demonstrated that anaerobic prokaryotes were easily cultivable on nuclear wastes, and that nitrate-reducers represent a dominant community (Akob et al. 2007). However, neither negative nor positive effects on aerobic microbial communities non-previously exposed to uranium were reported. Therefore, the present results demonstrated that more investigations are required to assess the interactions between uranium and micro-organisms in a different context of bioremediation. Finally, although the preparation of sediments avoided the persistence of meiofauna in the microcosms, it can not be excluded that some organisms were maintained after all. Even there is no data in the literature concerning uranium toxicity to meiofauna living in sediments; several authors reported negative effects for other heavy metals (Coull & Chandler 1992, Austen & Mc Evoy 1997, Gyedu-Ababio & Baird 2006, Heininger et al. 2007). Uranium could have affected some meiofauna, decreasing the grazing pressure on micro-organisms, and leading to the supply of labile organic matter which could have stimulated the microbial activity.

Thirty minutes after introduction of *C. riparius* larvae and *T. tubifex* worms into the contaminated microcosms, the oxygen uptake dramatically decreased in both cases. Such a result was not observed in uncontaminated microcosms indicating that the sudden exposure to uranium modified the behaviour of organisms with a significant impact on oxygen uptake of sediments. In the contaminated sediments, it was noticed that organisms regrouped themselves and that their burial into the sediments was visibly reduced. It is probable that such a concentration of organisms at the sediment-water interface has limited the diffusion of oxygen into the sediments. Avoidance of sediment polluted with metals was previously described for Chironomid larvae (Wentzel et al. 1977) and Tubificid worms (Meller et al. 1998, West & Ankley 1998). Moreover, the latter are known to congregate together in a form of a tightly packed mass when exposed to environmental perturbations (Palmer 1968). This phenomenon was effectively observed at the time of the introduction of the worms in the microcosms which may explain why these organisms induced a strongest limitation on

oxygen diffusion. However, after 24 hours, the organisms have colonized the sediments, and the subsequent measurements of oxygen uptake rates have shown similar values as initial conditions (data not shown). Compared to uncontaminated treatments, the burial of organisms into the sediments was delayed but not inhibited, even if the maximal depth of burial during the rest of the experiment was lower (Table 2).

As in uncontaminated microcosms, oxygen measurements performed between 72 and 288 hours did not show any significant temporal variation. Compared with initial conditions, *T. tubifex* increased the oxygen uptake of sediments by 18%, whereas *C. riparius* larvae did not induce significant difference. In the case of *C. riparius*, the negative effects of uranium have probably limited the effect of bioturbation on oxygen dynamics into the sediments. On the other hand, in the case of *T. tubifex*, such a conclusion can not be drawn as the oxygen uptake rate was surprisingly higher despite of the significant reduction of bioturbation intensity induced by uranium (Table 2). Compared to control treatment [C-no], the association of uranium contamination with the presence of *T. tubifex* lead to the increase of 53% of the oxygen consumption of sediments. Without additional investigations to understand the interactions between uranium, bioturbation and microbial communities into the sediment, we can only speculate that *T. tubifex* stimulated some micro-organisms already favoured by uranium contamination, such as nitrate-reducers, metal-reducers or sulphate-reducers. However, these organisms have generally an anaerobic metabolism which can not totally explain the higher consumption of oxygen, even if, for instance, some sulphate-reducers can use O<sub>2</sub> as terminal electron acceptor. On the other hand, aerobic micro-organisms can be stimulated by the supply of fresh organic matter induced by the effect of uranium on *T. tubifex*. Indeed, it was demonstrated that, in the same experimental conditions and for the same level of contamination, the worms secreted more mucus to protect themselves and reacted by a caudal autotomy process permitting their detoxification (Lagauzère et al. accepted). Additionally to the death of some individuals (~20%), these mechanisms may therefore induce a significant supply of organic matter all the more so the initial density of worms into the sediments was high. Finally, despite their more surficial distribution into uranium-contaminated sediment (<6cm), *T. tubifex* continued to remove reduced materials from the bottom sediments, as attested by the significant bioadvection of particles (Table 2). This can be related to the increase of uranium concentration in the water column during the 12 days of exposure, which was probably due to the removal of uranium from the sediment through egestion of faecal pellets and its subsequent reoxidation.

## 5. Conclusion

This work confirmed the ecological importance of Chironomid larvae and Tubificid worms within freshwater benthic ecosystems. Despite of their different ways of life, the bioturbation of these two different taxonomic groups stimulated the microbial metabolism in the sediments. Although a lower influence of bioturbation was expected within uranium-contaminated sediment, it was demonstrated that this can be straight contradicted in the case of Tubificid worms, since their presence strongly increased the oxygen uptake of the sediments. This result raises fundamental questions concerning the interactions existing between bioturbation, micro-organisms and metallic pollutants into freshwater sediments.

## 6. References

- Akob DM, Mills HJ, Kostka JE (2007) Metabolically active microbial communities in uranium-contaminated subsurface sediments. *FEMS Microbiology Ecology* 59:95-107
- Aller JY, Aller RC (1986) Evidence for localized enhancement of biological activity associated with tube and burrow structures in deep-sea sediments at the HEBBLE site, western North Atlantic. *Deep-Sea Research* 33:755-790
- Antunes SC, De Figueiredo DR, Marques SM, Castro BB, Pereira R, Gonçalves F (2007) Evaluation of water column and sediment toxicity from an abandoned uranium mine using a battery of bioassays. *Science of the Total Environment* 374:252-259
- Armitage PD, Cranston PS, Pinder LCV (1995) *The Chironomidae: The biology and ecology of non-biting midges.*, Chapman and Hall., London, UK
- Austen MC, Mc Evoy AJ (1997) The use of offshore meiobenthic communities in laboratory microcosm experiments: Response to heavy metal contamination. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 211:247-261
- Baborowski M, Bozau E (2006) Impact of former mining activities on the uranium distribution in the River Saale (Germany). *Applied Geochemistry* 21:1073-1082
- Behrens JW, Stahl HJ, Steffensen JF, Glud RN (2007) Oxygen dynamics around buried lesser sandeels *Ammodytes tobianus* (Linnaeus 1785): Mode of ventilation and oxygen requirements. *Journal of Experimental Biology* 210:1006-1014
- Berg P, Risgaard-Petersen N, Rysgaard S (1998) Interpretation of measured concentration profiles in sediment pore water. *Limnology and Oceanography* 43:1500-1510
- Berner RA (1980) *Early diagenesis : A Theoretical Approach.*, Princeton University Press., USA
- Chatarpaul L, Robinson JB, Kaushik NK (1980) Effects of tubificid worms on denitrification and nitrification in stream sediment. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37:656-663
- Coull BC, Chandler GT (1992) Pollution and meiofauna: field, laboratory, and mesocosm studies. *Oceanography and marine biology: an annual review* Vol 30:191-271
- De Haas EM, Kraak MHS, Koelmans AA, Admiraal W (2005) The impact of sediment reworking by opportunistic chironomids on specialised mayflies. *Freshwater Biology* 50:770-780
- Dias V, Vasseur C, Bonzom JM (2008) Exposure of *Chironomus riparius* larvae to uranium: effects on survival, development time, growth, and mouthpart deformities. *Chemosphere* 71:574-581
- Environnement Canada (2003) Liste des substances d'intérêt prioritaire - Rapport d'évaluation - Rejets de radionucléides des installations nucléaires (effets sur les espèces autre que l'être humain), Gouvernement du Canada.
- Frenzel P (1990) Influence of Chironomid Larvae on Sediment Oxygen Microprofiles. *Archiv für Hydrobiologie* AHYBA4 119:427-437

- Gérino M, Aller RC, Lee C, Cochran JK, Aller JY, Green MA, Hirschberg D (1998) Comparison of different tracers and methods used to quantify bioturbation during a spring bloom: 234-thorium, luminophores and chlorophyll a. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 46:531-547.
- Gérino M, Stora G, Durbec J-P (1994) Quantitative estimation of biodiffusive and bioadvective sediment mixing: in situ experimental approach. *Oceanologica Acta* 17:547-554.
- Gérino M, Vervier P, Stora G, Gilbert F, Poggiale J-C, François-Carcaillet F, Mermillod-Blondin F, Desrosiers G (2003) Macro- invertebrate functional groups in freshwater and marine sediments: A common mechanistic classification. *Vie et Milieu* 53:221-232.
- Glud RN, Gundersen JK, Røy H, Jørgensen BB (2003) Seasonal dynamics of benthic O<sub>2</sub> uptake in a semienclosed bay: Importance of diffusion and faunal activity. *Limnology and Oceanography* 48:1265-1276
- Glud RN, Ramsing NB, Gundersen JK, Klimant I (1996) Planar optodes: A new tool for fine scale measurements of two- dimensional O<sub>2</sub> distribution in benthic communities. *Marine Ecology Progress Series* 140:217-226
- Gyedu-Ababio TK, Baird D (2006) Response of meiofauna and nematode communities to increased levels of contaminants in a laboratory microcosm experiment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63:443-450
- Hart DR, Mc Kee PM, Burt AJ, Goffin MJ (1986) Benthic community and sediment quality assessment of Port Hope Harbour, Lake Ontario. *Journal of Great Lakes Research* 12:206-220
- Heilskov AC, Holmer M (2001) Effects of benthic fauna on organic matter mineralization in fish-farm sediments: importance of size and abundance. *ICES Journal of Marine Science* 58:427-434
- Heininger P, Höss S, Claus E, Pelzer J, Traunspurger W (2007) Nematode communities in contaminated river sediments. *Environmental Pollution* 146:64-76
- Hölker F, Stief P (2005) Adaptive behaviour of chironomid larvae (*Chironomus riparius*) in response to chemical stimuli from predators and resource density. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 58:256-263
- Jørgensen BB, Revsbech NP (1985) Diffusive Boundary Layers and the Oxygen Uptake of Sediments and Detritus. *Limnology and Oceanography* 30:111-122
- Kajan R, Frenzel P (1999) The effect of chironomid larvae on production, oxidation and fluxes of methane in a flooded rice soil. *FEMS Microbiology Ecology* 28:121-129
- Karlson K (2007) Diurnal bioturbating activities of *Monoporeia affinis*: effects on benthic oxygen and nutrient fluxes. *Marine Ecology Progress Series* 331:195-205
- Kautsky H (1939) Quenching of luminescence by oxygen. *Transactions of the Faraday Society* 35:216-219
- Klimant I, Meyer V, Kuhl M (1995) Fiber-optic oxygen microsensors, a new tool in aquatic biology. *Limnology and Oceanography* 40:1159-1165
- 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.
- Kurnaz A, Küçükömeroglu B, Keser R, Okumusoglu NT, Korkmaz F, Karahan G, Cevik U (2007) Determination of radioactivity levels and hazards of soil and sediment samples in Firtina Valley (Rize, Turkey). *Applied Radiation and Isotopes* 65:1281-1289
- Lagauzère S, Coppin F, Gérino M, Delmotte S, Stora G, Bonzom J-M (submitted) A new method for estimating bioturbation activity using microspheres as particulate fluorescent tracers and fluorimetric measurements. *Limnology and Oceanography: Methods*
- Lagauzère S, Terrail R, Bonzom JM (accepted) Ecotoxicity of uranium on *Tubifex tubifex* (Annelida, Tubificidae) exposed to contaminated sediment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*
- Leal JJF, Dos Santos Furtado AL, De Assis Esteves F, Bozelli RL, Figueiredo-Barros MP (2007) The role of *Campsurus notatus* (Ephemeroptera: Polymitarcyidae) bioturbation and sediment quality on potential gas fluxes in a tropical lake. *Hydrobiologia* 586:143-154
- Lewandowski J, Laskov C, Hupfer M (2007) The relationship between *Chironomus plumosus* burrows and the spatial distribution of pore-water phosphate, iron and ammonium in lake sediments. *Freshwater Biology* 52:331-343
- Liebsch G, Klimant I, Frank B, Holst G, Wolfbeis OS (2000) Luminescence lifetime imaging of oxygen, pH, and carbon dioxide distribution using optical sensors. *Applied Spectroscopy* 54:548-559
- Lottermoser B, Ashley P, Costelloe M (2005) Contaminant dispersion at the rehabilitated Mary Kathleen uranium mine, Australia. *Environmental Geology* 48:748-761
- Lovley DR, Phillips EJP, Gorby YA, Landa ER (1991) Microbial reduction of uranium. *Nature* 350:413-416
- Lozano JC, Blanco Rodríguez P, Vera Tomé F (2002) Distribution of long-lived radionuclides of the <sup>238</sup>U series in the sediments of a small river in a uranium mineralized region of Spain. *Journal of Environmental Radioactivity* 63:153-171



- Markich SJ (2002) Uranium speciation and bioavailability in aquatic systems: an overview. *The Scientific World Journal* [electronic resource] 2:707-729
- Matisoff G (1995) Effects of bioturbation on solute and particle transport in sediments. In: Allen HE (ed) *Metal contaminated aquatic sediments*. Ann Arbor Press, Chelsea, MI.
- Mc Call PL, Fisher JB (1980) Effects of tubificid oligochaetes on physical and chemical properties of Lake Erie sediments. In: Brinkhurst RO, Cook DG (eds) *Aquatic oligochaete biology*. Plenum Press, New York. p253-317
- Meller M, Egeler P, Römbke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998) Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene, and copper sulfate to tubificid sludgeworms (oligochaeta) in artificial media. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 39:10-20
- Mermillod-Blondin F, Nogaro G, Datry T, Malard F, Gibert J (2005) Do tubificid worms influence the fate of organic matter and pollutants in stormwater sediments? *Environmental Pollution* 134:57-69.
- Mermillod-Blondin F, Rosenberg R, Norling K, François-Carcaillet F, Mauclaire L (2004) Influence of bioturbation by three benthic infaunal species on microbial communities and biogeochemical processes in marine sediment. *Aquatic Microbial Ecology* 36:271-284
- Michaud E, Desrosiers G, Mermillod-Blondin F, Sundby B, Stora G (2005) The functional group approach to bioturbation: I. The effects of biodiffusers and gallery-diffusers of the *Macoma balthica* community on sediment oxygen uptake. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 326:77-88
- Neame PA, Dean JR, Zytaruk BG (1982) Distribution and concentrations of naturally-occurring radionuclides in sediments in a uranium mining area of northern Saskatchewan, Canada. *Hydrobiologia* 91-92:355-361
- Nies DH (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51:730-750
- Nogaro G, Mermillod-Blondin F, Montuelle B, Boisson JC, Lafont M, Volat B, Gibert J (2007) Do tubificid worms influence organic matter processing and fate of pollutants in stormwater sediments deposited at the surface of infiltration systems? *Chemosphere* 70:315-328
- Officer CB, Lynch DR (1982) Interpretation procedures for the determination of sediment parameters from time-dependent flux inputs. *Earth & Planetary Science Letters* 61:55-62
- Palmer MF (1968) Aspects of the respiratory physiology of *Tubifex tubifex* in relation to its ecology. *Journal of Zoology, London* 154:463-473
- Papkovsky DB, Olah J, Troyanovsky IV, Sadovsky NA, Rumyantseva VD, Mironov AF, Yaropolov AI, Savitsky AP (1992) Phosphorescent polymer films for optical oxygen sensors. *Biosensors and Bioelectronics* 7:199-206
- Pelegri SP, Blackburn TH (1995) Effects of *Tubifex tubifex* (Oligochaeta: Tubificidae) on N-mineralization in freshwater sediments, measured with <sup>15</sup>N isotopes. *Aquatic Microbial Ecology* 9:289-294
- Pischedda L, Poggiale JC, Cuny P, Gilbert F (2008) Imaging Oxygen Distribution in Marine Sediments. The Importance of Bioturbation and Sediment Heterogeneity. *Acta Biotheoretica*:1-13
- Polerecky L, Volkenborn N, Stief P (2006) High temporal resolution oxygen imaging in bioirrigated sediments. *Environmental Science and Technology* 40:5763-5769
- Rasmussen H, Jorgensen BB (1992) Microelectrode studies of seasonal oxygen uptake in a coastal sediment: role of molecular diffusion. *Marine Ecology Progress Series* 81:289-303
- Rasmussen JB (1984) The life-history, distribution, and production of *Chironomus riparius* and *Glyptotendipes paripes* in a prairie pond. *Hydrobiologia* 119:65-72
- Renshaw JC, Lloyd JR, Livens FR (2007) Microbial interactions with actinides and long-lived fission products. *Comptes Rendus Chimie* 10:1067-1077
- Robbins JA, Mc Call PL, Fisher JB, Krezoski JR (1979) Effect of deposit feeders on migration of <sup>137</sup>Cs in lake sediments. *Earth and Planetary Science Letters* 42:277-287
- Saari H-K, Schmidt S, Coynel A, Huguet S, Schäfer J, Blanc G (2007) Potential impact of former Zn ore extraction activities on dissolved uranium distribution in the Riou-Mort watershed (France). *Science of the Total Environment* 382:304-310
- Stern O, Volmer M (1919) Über die Abklingungszeit der Fluoreszenz. *Physik Zeitschr* 20:183-188
- Stief P (2007) Enhanced exoenzyme activities in sediments in the presence of deposit-feeding *Chironomus riparius* larvae. *Freshwater Biology* 52:1807-1819
- Stief P, Altmann D, De Beer D, Bieg R, Kureck A (2004) Microbial activities in the burrow environment of the potamal mayfly *Ephoron virgo*. *Freshwater Biology* 49:1152-1163
- Stief P, De Beer D (2002) Bioturbation effects of *Chironomus riparius* on the benthic N-cycle as measured using microsensors and microbiological assays. *Aquatic Microbial Ecology*:175-185
- Stief P, De Beer D (2006) Probing the microenvironment of freshwater sediment macrofauna: Implications of deposit-feeding and bioirrigation for nitrogen cycling. *Limnology and Oceanography* 51:2538-2548
- Suzuki Y, Banfield JF (2004) Resistance to, and accumulation of, uranium by bacteria from a uranium-contaminated site. *Geomicrobiology Journal* 21:113-121

- Svensson JM (1997) Influence of *Chironomus plumosus* larvae on ammonium flux and denitrification (measured by the acetylene blockage- and the isotope pairing-technique) in eutrophic lake sediment. *Hydrobiologia* 346:157-168
- Svensson JM, Enrich-Prast A, Leonardson L (2001) Nitrification and denitrification in a eutrophic lake sediment bioturbated by oligochaetes. *Aquatic Microbial Ecology* 23:177-186
- Svensson JM, Leonardson L (1996) Effects of bioturbation by tube-dwelling chironomid larvae on oxygen uptake and denitrification in eutrophic lake sediments. *Freshwater Biology* 35:289-300
- Thamdrup B, Canfield DE (2000) Benthic respiration in aquatic sediments. In: Sala OE, Mooney HA, Jackson RB, Howarth RW (eds) *Methods in ecosystems science*. Springer, New York, p 86-103
- Timmermann K, Banta GT, Glud RN (2006) Linking *Arenicola marina* irrigation behavior to oxygen transport and dynamics in sandy sediments. *Journal of Marine Research* 64:915-938
- Van de Bund WJ, Goedkoop W, Johnson RK (1994) Effects of deposit-feeder activity on bacterial production and abundance in profundal lake sediment. *Journal of the North American Benthological Society* 13:532-539
- Wall JD, Krumholz LR (2006) Uranium reduction *Annual Review of Microbiology*, p 149-166
- Wang F, Tessier A, Hare L (2001) Oxygen measurements in the burrows of freshwater insects. *Freshwater Biology* 46:317-327
- Wentzel R, McIntosh A, McCafferty WP, Atchison G, Anderson V (1977) Avoidance response of Midge Larvae (*Chironomus Tentans*) to sediments containing heavy metals. *Hydrobiologia* 55:171-175
- Wenzhöfer F, Glud RN (2004) Small-scale spatial and temporal variability in coastal benthic O<sub>2</sub> dynamics: Effects of fauna activity. *Limnology and Oceanography* 49:1471-1481
- West CW, Ankley GT (1998) A laboratory assay to assess avoidance of contaminated sediments by the freshwater Oligochaete *Lumbriculus variegatus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 35:20-24
- Wilkins MJ, Livens FR, Vaughan DJ, Lloyd JR (2006) The impact of Fe(III)-reducing bacteria on uranium mobility. *Biogeochemistry* 78:125-150
- Zorn ME, Lalonde SV, Gingras MK, Pemberton SG, Konhauser KO (2006) Microscale oxygen distribution in various invertebrate burrow walls. *Geobiology* 4:137-145

### **4.3 INFLUENCE DE LA BIOTURBATION SUR LE COMPORTEMENT BIOGÉOCHIMIQUE DE L'URANIUM**

#### **4.3.1 INTRODUCTION**

Comme cela a été développé dans la synthèse bibliographique (chapitre 1), l'uranium est un métal lourd naturellement présent dans l'environnement, qui a vu sa teneur augmenter dans certains milieux en réponse aux différentes activités humaines liées à son utilisation (*e.g.* exploitation minière, combustible nucléaire, armement militaire). En raison, de leur rôle de réceptacle dans le cycle de l'eau (eaux de pluies, eaux de drainage, eaux usées, rejets industriels et agricoles), les écosystèmes aquatiques continentaux sont particulièrement touchés par les pollutions diffuses. Malgré la forte solubilité de l'uranium dans les eaux de surface (Coward & Burnett 1994), cet élément, comme la plupart des métaux, tend à se concentrer dans les sédiments anoxiques. Ces derniers représentent ainsi le compartiment avec les plus fortes concentrations en uranium (Hynes 1990). Alors qu'on estime les concentrations naturelles constituant le bruit de fond géochimique naturel dans les sédiments d'eau douce inférieures à  $10 \mu\text{g U g}^{-1}$  poids sec (Kurnaz et al. 2007), des valeurs bien supérieures, atteignant plusieurs centaines à plusieurs milliers de  $\mu\text{g U g}^{-1}$  poids sec ont été relevées dans des rivières et des lacs proches de sites miniers, comme par exemple en Espagne, en France, au Canada ou en Australie (Neame et al. 1982, Hart et al. 1986, Lozano et al. 2002, Lottermoser et al. 2005).

Le comportement biogéochimique (*i.e.* solubilité, mobilité) de l'uranium dans les sédiments superficiels est directement lié à sa spéciation, la chimie des phases aqueuses et solides, les phénomènes d'adsorption/complexation et les transformations biogéochimiques liées à la diagenèse précoce. D'un point de vue strictement chimique, l'uranium peut exister à plusieurs états d'oxydation, allant de (+III) à (+VI), les formes les plus stables étant U(+IV) en milieu réducteur et U(+VI) en milieu oxydant. La spéciation de l'uranium est principalement liée aux valeurs du pH et du potentiel d'oxydoréduction Eh (Langmuir 1978), mais dépend aussi fortement de nombreux autres paramètres physico-chimiques comme la pression partielle en  $\text{CO}_2$ , la force ionique, la teneur en matière organique, la concentration en uranium dans le milieu ou la présence de ligands organiques et minéraux (Ragnarsdottir &

Charlet 2000, Davis et al. 2002, Davis et al. 2004, Denison 2004, Curtis et al. 2006, Davis et al. 2006) ainsi que de l'activité microbienne (Renshaw et al. 2007).

De façon très simplifiée, dans la plupart des eaux d'eau douce de surface (conditions oxydées et pH de 5 à 9), l'uranium se trouve sous une forme libre et soluble, l'ion uranyle  $UO_2^{2+}$ , qui est à l'état d'oxydation (+VI). Selon le pH et la composition ionique de l'eau, l'ion uranyle peut se complexer avec d'autres ions, principalement des ions hydroxydes ou des carbonates, mais aussi avec des phosphates, des fluorures, des chlorures et certaines substances organiques comme les acides humiques (Grenthe et al. 1992, Ragnarsdottir & Charlet 2000). L'adsorption sur des phases particulières minérales (*e.g.* oxy-hydroxydes de fer, silice, argiles) ou organiques joue également un rôle important en diminuant la mobilité de l'uranium sous sa forme uranyle (Curtis et al. 2006).

L'uranium qui arrive au contact des sédiments va donc se trouver soit sous une forme totalement soluble, libre ou complexée, et va alors diffuser vers les eaux interstitielles, soit une forme adsorbée à la matière en suspension et va être peu à peu être incorporé par sédimentation. Au cours de son enfoncement dans la colonne sédimentaire, l'uranium va « traverser » les différents fronts d'oxydo-réduction mis en place par les micro-organismes qui dégradent la matière organique, jusqu'à atteindre la redoxcline, limite sous laquelle le potentiel redox Eh est favorable à sa réduction. L'uranium est alors réduit en U(+IV), qui est une forme peu soluble qui va tendre à s'accumuler et à être immobilisé dans les couches plus profondes par précipitation (formation d'oxydes insolubles: *e.g.* uraninite, schoepite) et par adsorption sur des sulfures (*e.g.* FeS, MnS) ou sur des minéraux authigènes (Lovley et al. 2004). Ce processus de réduction peut également être réalisé de façon biotique par des bactéries métallo-réductrices (Lovley et al. 1991), ce qui est exploité depuis plusieurs années dans des programmes de bioremédiation de sites contaminés, où l'immobilisation de l'uranium dans les sédiments est augmentée par un amendement organique (Wall & Krumholz 2006, Wilkins et al. 2006, Renshaw et al. 2007).

Cependant, des perturbations peuvent survenir dans cette stratification verticale du sédiment et la modifier (*e.g.* remise en suspension lors de crues, bioturbation). Ainsi, l'uranium peut être réoxydé de façon abiotique par la pénétration d'oxygène dans des couches de sédiment préalablement anoxiques, ce qui va donc à nouveau le solubiliser et le remobiliser vers l'eau interstitielle et la colonne d'eau. A noter également que pour des pH élevés (pH>8), des complexes solubles d'U(+IV) peuvent se former avec des carbonates (*e.g.*  $U[CO_3]_3^{2-}$  et  $U[CO_3]_5^{6-}$ ) et/ou de la matière organique dissoute, si les concentrations sont suffisamment élevées (Kim 1986). Enfin, l'oxydation biotique de l'U(IV) immobilisé peut

également être possible dans certains cas où la dénitrification ou la sulfato-réduction ont lieu en présence de minéraux de Fe(III) (Wu et al. 2005, Wall & Krumholz 2006).

Bien que de nombreux travaux aient été menés pour comprendre la biogéochimie complexe de l'uranium, notamment dans le cadre des traitements de bioremédiation des eaux de surface contaminées, dont le principal enjeu actuel est de stabiliser l'accumulation de l'uranium dans les sédiments, peu d'études ont cherché à évaluer l'influence que pouvait avoir la bioturbation des macro-invertébrés benthiques sur ces processus d'im/mobilisation (Zheng et al. 2002). Pourtant, certaines espèces capables de se maintenir dans des environnements pollués, telles que certains vers oligochètes (Annelida, Clitellata), peuvent entraîner un important remaniement sédimentaire qui va jouer sur l'enfoncement et/ou le relargage des métaux (Soster et al. 1992, Petersen et al. 1995, Zoumis et al. 2001, Alfaro-De-la-Torre & Tessier 2002, Zheng et al. 2002, Ciutat & Boudou 2003, De Haas et al. 2005, Ciutat et al. 2007). En effet, ces vers vivent orientés verticalement dans les sédiments, avec la tête vers le bas, et la partie postérieure libre dans la colonne d'eau. Ils se nourrissent par microphagie à partir de la matière organique associée au sédiment (Robbins et al. 1979). En ingérant des particules en profondeur et en les rejetant en surface via leur tractus digestif, ces organismes exercent un transport des sédiments vers le haut (*i.e.* bioconvoyage vers le haut), qui peut entraîner les métaux potentiellement associés à ces phases (Ciutat et al. 2007). En faisant passer ces éléments de zones plutôt réductrices vers des zones oxydées, ce type de bioturbation peut donc favoriser une remobilisation vers la colonne d'eau et donc conduire à un risque pour le reste de la biocénose aquatique. Parallèlement, la bioturbation des bioconvoyeurs permet aussi la pénétration des métaux dans les sédiments puisque la remontée de leurs pelotes fécales ajoutée au processus de sédimentation, entraîne un enfoncement progressif des couches superficielles, jusqu'à atteindre la zone d'ingestion où les particules vont pouvoir à nouveau être ré-entraînées vers le haut. Il s'en suit un phénomène cyclique d'enfoncement/remontée des métaux dont la répartition tend finalement à s'homogénéiser dans la couche de bioturbation (Krantzberg 1985, Soster et al. 1992, Matisoff et al. 1999).

Le principal objectif de cette étude a donc été d'évaluer l'influence de la bioturbation de vers *Tubifex tubifex* (Annelida, Clitellata, Tubificidae) sur la répartition et les flux de l'uranium au sein d'un écosystème benthique dont les sédiments étaient initialement contaminés. Ceci a été réalisé en laboratoire grâce à la mise en place d'aquariums avec des sédiments d'origine naturelle artificiellement contaminés. L'influence des vers *Tubifex* a été estimée en comparant différents paramètres chimiques, dont les profils verticaux des concentrations en uranium dans les phases aqueuses par la technique des DET (*Diffusive*

*Equilibration in Thin-films*), dans des aquariums avec et sans organismes, après douze jours d'exposition.

## 4.3.2 MATÉRIELS & METHODES

### 4.3.2.1 Préparation des aquariums

Les sédiments et l'eau utilisés dans cette expérience ont été prélevés dans le milieu naturel, dans un site choisi principalement pour la qualité des eaux de surface et la texture fine et vaseuse du fond. Ce point de prélèvement se situe dans un bras mort du lac d'Esparron qui est un lac-réservoir en amont d'un barrage aménagé par l'homme sur la rivière Verdon dans les Alpes-de-Haute-Provence (France). Les sédiments ont été traités de façon à en éliminer les phases les plus grossières (*e.g.* débris végétaux, cailloux, déchets) et le maximum d'organismes pouvant s'y trouver par un tamisage sur 2mm et une congélation à -20°C pendant 48H. Ils ont ensuite été homogénéisés mécaniquement et conservés à 4°C jusqu'à la préparation des aquariums. Quant à l'eau, elle a été filtrée à 20µm lors de son prélèvement, afin d'éliminer les invertébrés, y compris la méiofaune, puis également conservée à 4°C avant d'être utilisée. Les principales caractéristiques physico-chimiques des sédiments et de l'eau sont rapportées dans le tableau 1 du chapitre 2.

Le sédiment a été contaminé en une fois dans un grand bidon à partir d'une solution de nitrate d'uranyle  $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , pour atteindre la concentration nominale de  $600 \mu\text{g U g}^{-1}$  poids sec (concentration effective mesurée :  $539 \mu\text{g U g}^{-1}$  ps). Le bidon a été ensuite agité quotidiennement durant deux semaines avant le début de l'expérience pour assurer l'adsorption de l'uranium sur les particules et une contamination homogène. Cette concentration a été choisie en fonction des résultats obtenus dans les travaux antérieurs avec des conditions expérimentales identiques (cf chapitre 3). Elle correspond à une activité de bioturbation, bien que diminuée, qui entraîne un relargage important d'uranium vers la colonne d'eau. Parallèlement, un bidon de sédiment non contaminé a été préparé dans les mêmes conditions pour constituer les aquariums contrôles.

Pour chaque lot de sédiment (contaminé et contrôle), un total de neuf aquariums a été préparé. Il s'agissait de récipients cylindriques en PVC de 12 cm de diamètre et d'une hauteur de 20 cm, chacun rempli avec 10 cm de sédiment et 10 cm d'eau. Ces aquariums ont été ensuite placés de façon aléatoire dans un grand bain-marie à 21°C sous un éclairage de

photopériode 16H jour/ 8H nuit, avec pour chacun un bullage d’air constant dans la colonne d’eau. Ce dispositif a stabulé pendant quatre semaines pour permettre une certaine équilibration du système avant l’introduction des vers *Tubifex*. Seuls des ajouts d’eau ont été réalisés de façon quasi-quotidienne pour compenser les pertes liées à l’évaporation.

#### 4.3.2.2 Origine, acclimatation et introduction des organismes

Les vers *Tubifex tubifex* (identification confirmée par Pr N. Giani, Université de Toulouse, France) provenaient d’un élevage commercial (Grebyl & Fils, Arry, France). Ils ont été acclimatés aux futures conditions expérimentales pendant plusieurs semaines durant lesquelles ils ont été nourris quotidiennement à partir de granulés de Tetramin® (Tetra Werke, Melle, Germany) broyés et mis en suspension (3 mg ind<sup>-1</sup> à partir d’une suspension à 10 g L<sup>-1</sup>). Avant le début de l’expérience, les vers ont été transférés dans du sable artificiel sans ajout de nourriture pendant 48 heures.

Dans chaque aquarium prévu pour recevoir des organismes, une masse de 28 g (poids frais) a été ajoutée délicatement à la surface du sédiment. Cette masse correspond à environ 6800 individus, i.e. une densité de 60000 ind m<sup>-2</sup>, ce qui est représentatif d’une densité naturelle moyenne (Budd 2005). Le bullage d’air a été interrompu pendant 3 heures pour permettre aux vers de s’enfoncer dans le sédiment.

#### 4.3.2.3 Déroulement de l’expérience

Sur les neuf aquariums préparés pour chaque condition (contaminés/contrôles): 3 sont retirés le premier jour de l’expérience (jour 0), soit après les quatre semaines d’équilibration ; 3 reçoivent des vers *Tubifex* au jour 0 et sont retirés après douze jours (jour 12) ; et les 3 autres ne reçoivent pas d’organismes et sont également retirés au jour 12. Ceci est résumé dans le Tableau 1 où sont également indiqués les codes utilisés pour ces conditions expérimentales.

Tableau 1 – Conditions expérimentales testées et codification.

Contamination du sédiment	Vers <i>Tubifex</i>	Temps d’analyse (jour)	Codes
-	-	0	C-0
-	-	12	C-12
-	+	12	CT-12
+	-	0	U-0
+	-	12	U-12
+	+	12	UT-12

#### 4.3.2.4 Mesures physico-chimiques

*Mesures directes dans la colonne d'eau: suivi dans le temps* – La température, le pH et la concentration en oxygène dissous de la colonne d'eau ont été mesurés un jour avant l'introduction des vers *Tubifex*, puis tous les deux jours jusqu'à la fin de l'expérience (jour 12). La concentration en uranium total dans l'eau a été suivie de la même façon à partir d'échantillons d'eau non filtrés et acidifiés (2% HNO<sub>3</sub>), puis analysés par ICP-AES (Optima 4300 DV, Perkin-Elmer, USA). A partir des concentrations mesurées au jour 0 et au jour 12, la variation de la quantité d'uranium dans la colonne d'eau sur cette durée, ramenée à la surface de l'aquarium, a permis d'estimer le flux apparent d'échange entre le sédiment et l'eau au cours des douze jours d'expérience.

*Profils de concentrations des espèces chimiques dissoutes* – Afin de mesurer les profils de concentrations des différents éléments dissous (uranium, cations et anions majeurs) à une résolution millimétrique, dans la colonne d'eau et l'eau interstitielle du sédiment, deux sondes DET ont été délicatement enfoncées dans le sédiment de chaque aquarium 48 heures avant le temps d'analyse désiré, soit deux jours avant l'introduction des organismes pour les traitements C-0 et U-0, et au jour 10 pour les traitements C-12, CT-12, U-12 et UT-12. Une des sondes a été utilisée pour l'analyse de l'uranium et des cations par ICP-AES (Optima 4300 DV, Perkin-Elmer, USA). La seconde a été utilisée pour l'analyse des anions par chromatographie ionique en phase liquide (DX120, colonne AS11HC 4 mm, générateur d'éluant KOH, Dionex, Sunnyvale, USA). Ces sondes DET se composaient de gels pré-assemblés dans un cadre en plastique (24 × 4 × 0.5 cm) contenus dans des petites logettes (0.1 × 1.8 × 0.1 cm) avec une fenêtre ouverte vers le milieu à analyser (15 × 1.8 cm) (DGT Research Ltd., Lancaster, Royaume-Uni). Elles ont été conservées dans une solution de NaCl à 0,01 M puis désoxygénées avant leur utilisation par un bullage à l'azote pendant 48 heures. Lors de leur retrait sous atmosphère azotée (boîte à gants), chaque bande de gel contenue dans les logettes, a été éluée dans 1 mL de HNO<sub>3</sub> à 2% pour les échantillons mesurés par ICP et dans 1 mL d'eau milliQ pour les échantillons mesurés par chromatographie.

*Calcul des flux diffusifs à l'interface eau/sédiment* – A partir des profils de concentrations obtenus avec les DET, les flux diffusifs à l'interface eau/sédiment ont été estimés grâce à la première loi de Fick (équation 1) (Li & Gregory 1974, Berner 1980) :



$$J(z) = -D \cdot (dC(z) / dz) \quad (1)$$

$$J(z) = -\varphi \cdot D_{séd.} \cdot (dC(z) / dz) \quad (2)$$

$$D_{séd.} = D_{eau} / \theta^2 \quad (3)$$

L'équation (1) permet de calculer le flux diffusif  $J(z)$  de l'espèce chimique considérée en un point de profondeur  $z$  en fonction de sa concentration  $C(z)$ .  $D$  représente le coefficient de diffusion du composé dans l'eau qui est fonction de la salinité et de la température de l'eau (Garcia & Gordon 1992). Cependant, cette équation n'est valable qu'au sein d'une solution aqueuse.

Dans le sédiment, les particules vont freiner la diffusion. La deuxième équation (2) permet de calculer le flux diffusif en tenant compte de la porosité  $\varphi$  et de la tortuosité  $\theta$  du sédiment et donc du coefficient de diffusion de l'espèce chimique dans le sédiment  $D_{séd.}$  (3). Les coefficients de diffusion dans l'eau ont été calculés à partir de la loi de Stokes-Einstein (4):

$$D_{eau} (molécule) = R \cdot T / 6 \cdot N \cdot \pi \cdot \mu_{eau} \cdot r (molécule) \quad (4)$$

avec,  $R = 8,31441$  (constante des gaz parfaits),  $T =$  température en calvins (ici,  $273+21$ ),  $N = 6,022045 \cdot 10^{23}$  (nombre d'Avogadro),  $\mu_{eau} =$  viscosité de l'eau (ici,  $10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ),  $r (molécule) =$  rayon moléculaire.

*Variation des concentrations des espèces dissoutes dans la colonne d'eau* – La variation des concentrations de certaines espèces chimiques dissoutes (e.g. sulfates, nitrates, nitrites, calcium) dans la colonne d'eau a été estimée à partir des concentrations moyennes mesurées avec les DET. Pour cela, la différence entre la concentration moyenne de l'espèce considérée dans la colonne d'eau au jour 12 et celle au jour 0 a été exprimée en termes de flux moyen sur la durée de l'expérience.

*Mesures des espèces chimiques solides dans les sédiments* – Lors du démontage des aquariums (au jour 0 pour C-0 et U-0 et au jour 12 pour les autres traitements), après avoir délicatement retiré la colonne d'eau, la colonne sédimentaire a été découpée en tranches de 1 cm. Chaque tranche de sédiment a ensuite été séchée à  $60^\circ\text{C}$  pendant 72 heures puis homogénéisée par un broyage au mortier. Trois sous-échantillons de 1 g de sédiment sec ont

été ensuite retirés pour être minéralisés par des ajouts successifs de HNO<sub>3</sub>, HCl et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Après deux cycles de minéralisation/évaporation (105°C, 90 min), les minéralisats ont ensuite été filtrés à 0,45 µm (Minisart®, filtre en acétate de cellulose) puis analysés par ICP-AES pour mesurer la teneur en uranium du sédiment. La concentration en uranium dans le sédiment lors de la mise en place des aquariums a également été mesurée.

#### **4.3.2.5 Mesure de la bioaccumulation**

Quatre heures avant le démontage des aquariums contaminés contenant des vers *Tubifex* (UT-12), le bullage d'air a été stoppé afin de favoriser leur sortie du sédiment. Un échantillon de vers a ainsi été récupéré grâce à une pipette afin de mesurer la bioaccumulation de l'uranium dans ces organismes. Après 24 heures de dépuración dans de l'eau non contaminée à température ambiante (22-25°C), les échantillons de vers ont été séchés à 60°C pendant 48 heures, puis minéralisés. Pour chaque échantillon (environ 700 mg), la minéralisation a consisté à l'ajout de 5 mL de HNO<sub>3</sub> à 65% et 5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30%, suivi de deux cycles de chauffage de 90 minutes à 95°C. Après complète évaporation, les résidus ont été remis en suspension dans 10 mL de HNO<sub>3</sub> à 2% et laissés à température ambiante pendant 24 heures. Les échantillons ont ensuite été filtrés à 0,45 µm (Minisart®, filtre en acétate de cellulose) pour être analysés par ICP-AES. Pour estimer la quantité d'uranium contenu dans la biomasse totale, la mesure a été ramenée à la masse de vers initialement introduite dans les aquariums, avec une minoration de 10%, compte-tenu des précédents résultats obtenus pour la mortalité de cette espèce à cette concentration en uranium (cf. chapitre 3).

#### **4.3.2.6 Analyses statistiques**

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel STATISTICA® (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Avant chaque analyse, la normalité des données a été testée par un test de Shapiro-Wilk et l'homogénéité des variances par un test de Levene. Ces tests ont été répétés après transformation des données quand ces hypothèses n'étaient pas vérifiées. Un seuil de significativité de 5% a été appliqué pour toutes les analyses.

Les paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau ont été analysés par des analyses de variances à mesures répétées (RM-ANOVAs) pour chaque traitement. Pour comparer les traitements entre eux, les moyennes des mesures ont été comparées par des ANOVAs à deux facteurs (*Tubifex*/contamination).

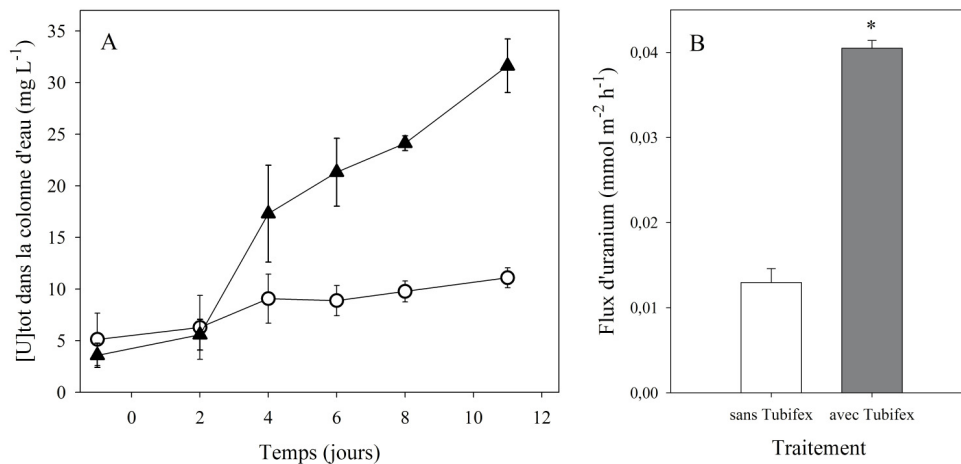
Les variations de concentrations des différentes espèces chimiques mesurées dans la colonne d'eau ont été comparées selon deux facteurs, la présence de *Tubifex* et la contamination en uranium, par des tests de Student (cas de l'uranium) ou des ANOVAs à deux facteurs (*Tubifex*/contamination) complétées par des tests post-hoc de Fisher LSD (cas des autres espèces chimiques). Les flux diffusifs de chaque traitement ont été comparés entre eux par des ANOVAs à un facteur, également complétées par des tests post-hoc de Fisher LSD.

### 4.3.3 RÉSULTATS

#### 4.3.3.1 Paramètres physico-chimiques et uranium total dans la colonne d'eau

L'ensemble des mesures réalisées dans les différents aquariums montre que la température a été maintenue à 21,2 ( $\pm 0,1$ ) °C, la concentration en oxygène dissous à 8,1 ( $\pm 0,3$ ) mg L<sup>-1</sup>, et le pH à 8,4 ( $\pm 0,2$ ) sur toute la durée de l'expérience, sans aucune différence significative entre les traitements (RM-ANOVAs:  $P > 0,05$ ; ANOVAs à 2 facteurs:  $P > 0,05$ ).

La concentration en uranium total dans la colonne d'eau des aquariums contaminés a clairement augmenté dans le temps en présence de vers *Tubifex* dans le sédiment (Fig. 1). Le flux total apparent d'uranium du sédiment vers la colonne d'eau était significativement supérieur dans les aquariums avec des vers (test t de Student:  $t = -14,7$ ,  $P = 0,000$ ).



**Figure 1 – Evolution de la concentration en uranium total dans la colonne d'eau pendant douze jours, en absence (○) ou en présence (▲) de vers *Tubifex* dans le sédiment (A), et flux d'uranium total correspondants (B). Moyennes  $\pm$  écart-types ( $N=3$ ). L'astérisque montre une différence significative entre les deux traitements (t-test,  $P=0,000$ ).**

#### 4.3.3.2 Profils de concentrations des éléments dissous

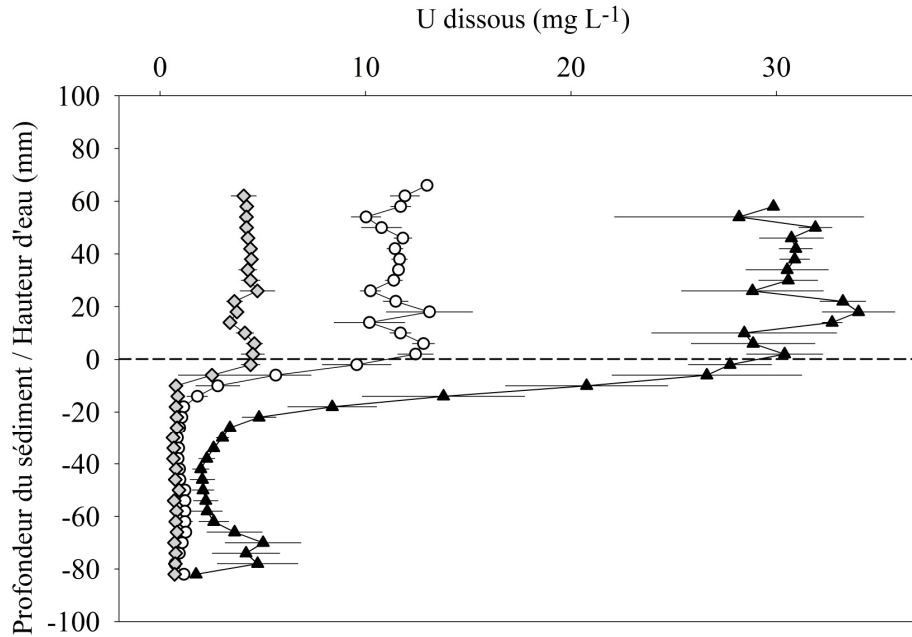
*Uranium* – Les profils d’uranium dissous montrent des différences entre les trois traitements mesurés U-0, U-12 et UT-12 (Fig. 2). Tout d’abord, en comparant les traitements sans *Tubifex*, on peut observer que la distribution de l’uranium entre le sédiment et l’eau n’a pas atteint un état d’équilibre après douze jours, puisque la concentration dans la colonne d’eau a continué d’augmenter au cours de l’expérience. Cependant, les deux profils indiquent un flux diffusif de l’uranium de l’eau vers le sédiment, qui ne semble pas se modifier dans le temps puisque la pente du profil du traitement U-12 est similaire à celle du traitement U-0. Plus en profondeur, les concentrations en uranium dissous sont plus faibles et ne présentent pas de différence entre U-0 et U-12.

Par contre, le profil de concentrations de l’uranium dissous après douze jours en présence de vers *Tubifex* (UT-12), est clairement différent des deux autres. La concentration dans la colonne d’eau après douze jours est près de 3 fois plus élevée sous l’effet de la bioturbation des vers *Tubifex*. L’uranium dissous pénètre également plus profondément dans le sédiment bien que le flux diffusif à l’interface ne semble pas être augmenté (pente équivalente).

Pour les trois traitements, la concentration moyenne dans la colonne d’eau mesurée avec les gels DET, ne diffère pas de la mesure obtenue précédemment à partir d’un échantillon d’eau non filtrée. Ceci indique que la quasi-totalité de l’uranium présent dans la colonne d’eau se trouve donc sous une forme dissoute.

*Autres éléments dissous* – Les profils de concentration du fer, du calcium, des sulfates, des nitrates, des nitrites et des chlorures sont représentés dans les Figures 3 et 4. Les profils de manganèse, de potassium, de magnésium et des phosphates ne sont pas représentés car leurs concentrations dans le sédiment étaient sous le seuil de détection ( $0,001 \text{ mg L}^{-1}$  pour les métaux à l’ICP, et  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  pour les phosphates en chromatographie).

Les profils de Fe montrent une remobilisation de cet élément sous l’interface eau/sédiment qui reflète la dissolution réductive des oxydes de fer par voie microbienne. Le fer dissous diffuse ensuite vers la colonne d’eau où il est immédiatement réoxydé et reprécipité vers le sédiment. Les profils mesurés dans les différents traitements ne montrent pas d’influence de la bioturbation ou de l’uranium sur ses processus.



**Figure 2 – Profils de concentrations en uranium dissous dans l'eau et le sédiment des aquariums contaminés dans les conditions initiales (jour 0, code: U-0, losanges gris), et après 12 jours, en absence (U12, cercles blancs) et en présence (UT12, triangles noirs) de vers *Tubifex* dans le sédiment. Moyennes  $\pm$  écart-types ( $N=3$ ). La ligne en pointillés représente l'interface eau/sédiment.**

Les profils de  $\text{SO}_4^{2-}$  sont caractéristiques d'une production de ces ions sous l'interface eau/sédiment due à la remontée diffusive des sulfures qui sont alors réoxydés en sulfates. Ce phénomène a été amplifié par la présence des vers *Tubifex* qui ont entraîné les sulfures directement dans la colonne d'eau où ils ont été réoxydés (augmentation nette de la concentration en sulfates dans la colonne d'eau) avant de rediffuser vers le sédiment. L'uranium a également modifié ces profils : la production de sulfates sous l'interface n'est plus observée, ce qui traduit l'absence de remontée des sulfures, probablement due à la coprécipitation de ces éléments en profondeur.

Les profils de  $\text{NO}_3^-$  et plus particulièrement ceux de  $\text{NO}_2^-$  reflètent des processus de dénitrification sous l'interface eau/sédiment. Ceci est d'autant plus marqué sous l'effet de la bioturbation et dans le cas où le sédiment était contaminé avec de l'uranium. Un couplage de ces réactions avec l'oxydation de l'uranium peut expliquer ces profils.

Enfin, les profils de  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Cl}^-$  ne traduisent aucune réaction diagénétique. La répartition de ces éléments conservatifs ne traduit que des flux diffusifs. Seuls les flux de  $\text{Ca}^{2+}$  ont été modifiés par la bioturbation (cf paragraphe suivant).

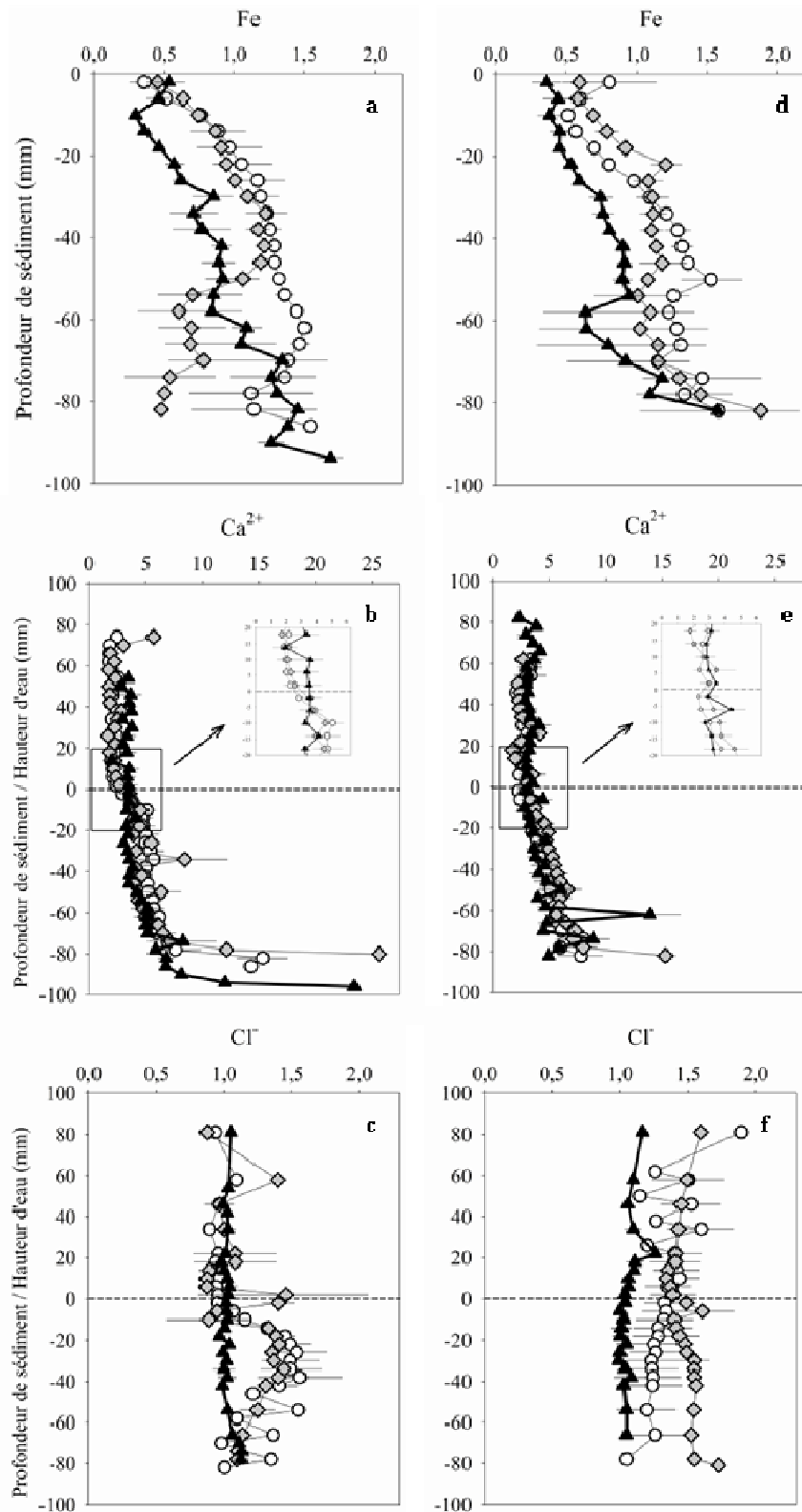


Figure 3 - Profils de concentrations du fer, du calcium et du chlore dissous au jour 0 (losanges gris), et après 12 jours, en absence (cercles blancs) et en présence (triangles noirs) de vers *Tubifex* dans le sédiment: a, b, c: aquariums contrôles ; d, e, f : aquariums contaminés. Moyennes  $\pm$  écart-types en mmol L<sup>-1</sup> (N=3). La ligne en pointillé représente l'interface eau/sédiment.

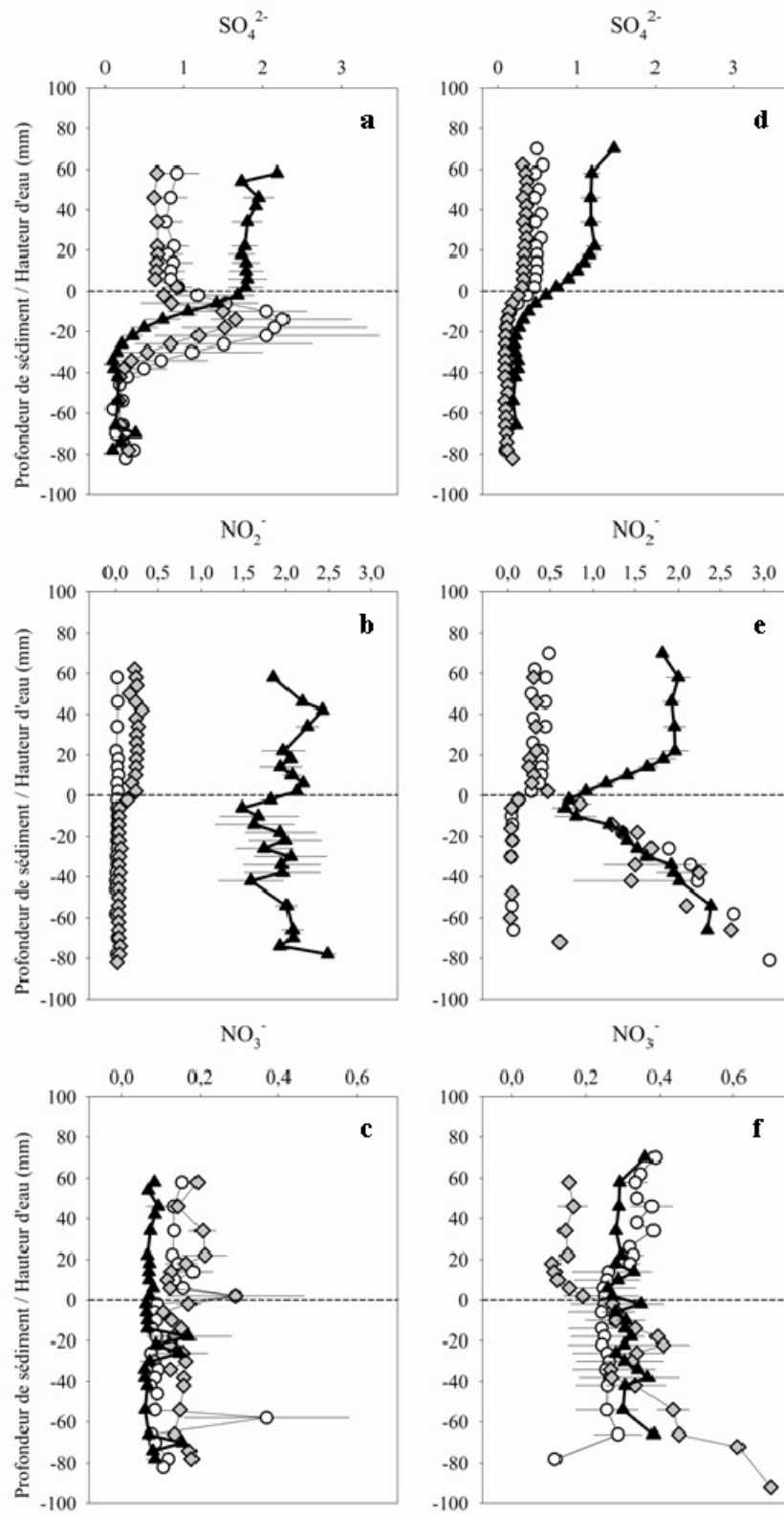


Figure 4 - Profils de concentrations des sulfates, nitrites et nitrates au jour 0 (losanges gris), et après 12 jours, en absence (cercles blancs) et en présence (triangles noirs) de vers *Tubifex* dans le sédiment: a, b, c: aquariums contrôlés ; d, e, f : aquariums contaminés. Moyennes  $\pm$  écart-types en mmol L<sup>-1</sup> (N=3). La ligne en pointillé représente l'interface eau/sédiment.

### 4.3.3.3 Flux diffusifs à l'interface eau/sédiment

Les flux diffusifs à l'interface eau/sédiment de l'uranium, des nitrates, des sulfates, des nitrites et du calcium, correspondant à chaque condition expérimentale, sont rapportés dans le tableau 2.

**Tableau 2 – Flux diffusifs à l'interface eau/sédiment dans les différents traitements. Les lettres différentes indiquent des différences significatives. Moyennes ( $\pm$ écart-type).**

Flux en $10^{-3}$ mmol $m^{-2}$ $h^{-1}$						
Aquariums contrôles			Aquariums contaminés			
Jour 0	Jour 12	Jour 12	Jour 0	Jour 12	Jour 12	
C-0	sans <i>Tubifex</i> C-12	avec <i>Tubifex</i> CT-12	U-0	sans <i>Tubifex</i> U-12	avec <i>Tubifex</i> UT-12	
U	-	-	-	-	-	
Ca	+6,61 (0,59) <sup>a</sup>	+7,21 (1,54) <sup>a</sup>	+2,21 (0,70) <sup>b</sup>	-3,61 (0,11) <sup>a</sup>	-3,78 (0,33) <sup>a</sup>	-3,06 (0,47) <sup>a</sup>
Cl	+0,20 (0,70) <sup>a</sup>	+0,04 (0,35) <sup>a</sup>	-0,14 (0,21) <sup>a</sup>	+0,26 (1,28) <sup>c</sup>	-0,94 (0,73) <sup>d</sup>	-0,94 (0,75) <sup>d</sup>
SO <sub>4</sub>	+7,24 (6,11) <sup>a</sup>	+2,00 (0,68) <sup>b</sup>	-2,07 (0,70) <sup>c</sup>	+0,48 (0,80) <sup>a</sup>	-0,51 (0,22) <sup>a</sup>	+0,01 (0,28) <sup>a</sup>
NO <sub>2</sub>	+1,33 (0,34) <sup>a</sup>	-0,16 (0,17) <sup>b</sup>	-3,87 (0,33) <sup>c</sup>	-1,46 (1,11) <sup>c</sup>	-2,00 (1,14) <sup>c</sup>	-2,68 (0,18) <sup>c</sup>
NO <sub>3</sub>	-1,33 (0,34) <sup>a</sup>	-0,16 (0,17) <sup>b</sup>	-3,87 (0,33) <sup>c</sup>	+3,76 (0,77) <sup>d</sup>	-2,02 (0,60) <sup>e</sup>	-2,71 (1,01) <sup>e</sup>
	-0,67 (0,89) <sup>a</sup>	-0,35 (0,04) <sup>a</sup>	-0,17 (0,12) <sup>a</sup>	+1,09 (0,53) <sup>b</sup>	-0,09 (0,27) <sup>a</sup>	+2,30 (0,81) <sup>c</sup>

Les flux diffusifs d'uranium étaient tous négatifs, *i.e.* flux entrants vers le sédiment, et n'ont pas été modifiés par la bioturbation (ANOVA:  $F_{12,5}=3,7$ ,  $P=0,08$ ).

Dans les aquariums non contaminés, les flux de calcium étaient positifs, *i.e.* flux sortants vers la colonne d'eau, et plus élevés pour les aquariums sans bioturbation, C-0 et C-12. Le flux n'a pas changé dans le temps puisque les valeurs dans ces deux traitements sont identiques. Cependant, la bioturbation (CT-12) a fait significativement diminuer ce flux. Dans les aquariums contaminés, les flux étaient tous pratiquement nuls (ANOVA:  $F_{12,5}=94,3$ ,  $P=0,000$ ; Fisher LSD :  $P<0,05$ ).

Les flux de chlorures étaient quasi-nuls dans tous les traitements, sans différence significative entre eux (ANOVA:  $F_{12,5}=15,8$ ,  $P=0,000$ ).

Comme pour le calcium, les flux de sulfates étaient significativement différents dans les traitements C-0 et C-12, avec des valeurs positives et assez élevées. Ces deux traitements présentaient tout de même une différence significative entre eux, qui indique une diminution du flux dans le temps. Sous l'effet de la bioturbation (CT-12), le flux est devenu négatif, tout comme c'était le cas dans le reste des traitements (U-0, U-12, UT-12) (ANOVA:  $F_{12,5}=12,4$ ,  $P=0,000$ ; Fisher LSD :  $P<0,05$ ).

Les flux de nitrites, dans les aquariums contrôles, étaient tous négatifs. Ils ont diminué au cours du temps en absence de bioturbation, tandis qu'ils ont augmenté sous l'effet de la



bioturbation. Dans les aquariums contaminés, les flux étaient par contre positifs en début d'expérience, puis sont devenus négatifs au cours du temps, indépendamment de la bioturbation. Ces flux ont atteint des valeurs intermédiaires par rapport aux valeurs mesurées dans les aquariums contrôles (ANOVA:  $F_{12,5}=70,8$ ,  $P=0,000$ ; Fisher LSD :  $P<0,05$ ).

Enfin, les flux de nitrates, dans les aquariums contrôles, étaient tous négatifs et assez faibles, et ne présentaient pas de différence significative entre les différents traitements. Dans les aquariums contaminés, on note un flux positif et significativement supérieur dès le début de l'expérience, puis une diminution (proche de zéro) sans bioturbation et une augmentation avec bioturbation (ANOVA:  $F_{12,5}=18,3$ ,  $P=0,000$ ; Fisher LSD :  $P<0,05$ ).

#### **4.3.3.4 Variations des concentrations dans la colonne d'eau**

Comme cela a été fait pour l'uranium à partir des mesures à l'ICP (Fig. 1), les variations sur douze jours des concentrations en sulfates, nitrates, nitrites et calcium dans la colonne d'eau, mesurées grâce aux gels DET, ont été exprimées en termes de flux (Fig. 5).

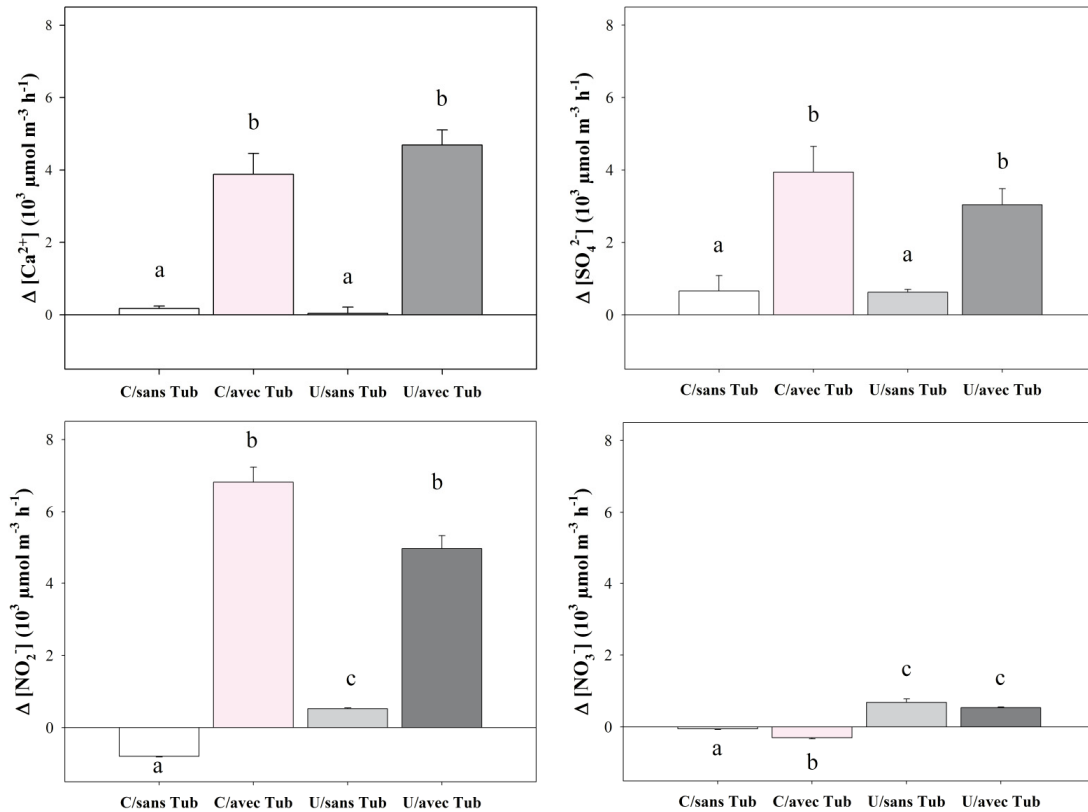
Les concentrations en calcium dans la colonne d'eau ont augmenté significativement en présence de vers *Tubifex* dans le sédiment, indépendamment de la contamination en uranium (ANOVA '*Tubifex*':  $F_{8,1}=130$ ,  $P=0,000$ ; 'uranium':  $F_{8,1}=0,84$ ,  $P=0,39$ ; '*Tubifex*\*uranium':  $F_{8,1}=1,64$ ,  $P=0,24$ ; Fisher LSD:  $P<0,05$ ).

La même observation est valable pour les sulfates (ANOVA '*Tubifex*':  $F_{8,1}=36,7$ ,  $P=0,000$ ; 'uranium':  $F_{8,1}=0,98$ ,  $P=0,35$ ; '*Tubifex*\*uranium':  $F_{8,1}=0,85$ ,  $P=0,38$ ; Fisher LSD:  $P<0,05$ ).

La concentration en nitrites a diminué dans les aquariums contrôles sans *Tubifex*, tandis qu'elle a fortement augmenté en présence de vers. Dans les aquariums contaminés, la concentration augmentée au cours du temps, et ceci était d'autant plus marqué en présence des vers *Tubifex*. Par contre, l'uranium n'a pas modifié l'effet de la bioturbation (ANOVA '*Tubifex*':  $F_{8,1}=482,6$ ,  $P=0,000$ ; 'uranium':  $F_{8,1}=3,85$ ,  $P=0,04$ ; '*Tubifex*\*uranium':  $F_{8,1}=32,8$ ,  $P=0,000$ ; Fisher LSD:  $P<0,05$ ).

Enfin, pour les nitrates, on observe des effets significatifs de la bioturbation (ANOVA '*Tubifex*':  $F_{8,1}=14,22$ ,  $P=0,005$ ) et de l'uranium (ANOVA 'uranium':  $F_{8,1}=223$ ,  $P=0,000$ ), mais pas de l'interaction *Tubifex*\*uranium (ANOVA '*Tubifex*\*uranium':  $F_{8,1}=0,89$ ,  $P=0,37$ ). Dans les aquariums contrôles, on note une diminution de la concentration en nitrates dans la colonne d'eau, qui a été d'autant plus marquée en présence de vers *Tubifex*. Dans les

aquariums contaminés, cette concentration a augmenté au cours du temps, indépendamment de la bioturbation (Fisher LSD:  $P < 0,05$ ).



**Figure 5 – Variations des concentrations en éléments dissous dans la colonne d'eau sur les douze jours d'expérience en fonction des traitements (C: contrôles, U: contaminés, Tub: *Tubifex*). Les valeurs positives indiquent une augmentation des concentrations dans la colonne d'eau, les valeurs négatives indiquent une diminution. Les lettres différentes correspondent à des différences significatives. Moyennes  $\pm$  écart-types ( $N=3$ ).**

#### 4.3.3.5 Bioaccumulation de l'uranium et bilan de masse

La concentration moyenne en uranium mesurée dans les tissus des vers *Tubifex* après douze jours d'exposition était de  $37,4 (\pm 8,3) \mu\text{g U g}^{-1}$  ps. La concentration en uranium du milieu environnant (sédiment) étant environ 10 fois plus élevée, on peut donc en conclure que les organismes n'ont pas bioconcentré l'uranium (Facteur de bioconcentration = bioaccumulation / concentration du milieu environnant,  $\text{BCF} \ll 1$ ). On note cependant une légère bioconcentration en comparant cette valeur de bioaccumulation à la concentration dans la colonne d'eau au niveau de l'interface ( $\text{BCF} = 1,26 \pm 0,09$ ) ou à la concentration de l'eau interstitielle dans la zone du sédiment occupée par les vers ( $\text{BCF} = 2,28 \pm 0,12$ ).

Le tableau 3 présente le bilan de masse de l'uranium entre les différents compartiments – colonne d'eau, sédiment, eau interstitielle, organismes – pour les conditions initiales de l'expérience (jour 0), et après douze jours sous l'effet ou non de la bioturbation.

**Tableau 3 – Bilan de masse de l'uranium entre les différents compartiments. Moyennes en % (écart-types). N=3.**

	Préparation des aquariums	Jour 0 <b>U-0</b>	Jour 12 sans bioturbation <b>U-12</b>	Jour 12 avec bioturbation <b>UT-12</b>
Sédiment	~100	99,2 (0,21)	98,1 (0,21)	95,5 (0,44)
Eau interstitielle	n.d.	0,16 (0,01)	0,37 (0,04)	0,84 (0,22)
Colonne d'eau	-	0,63 (0,20)	1,53 (0,19)	4,36 (0,44)
Vers <i>Tubifex</i> (bioaccumulation)	-	-	-	0,13 (0,06)

Ces résultats montrent que la distribution de l'uranium entre le sédiment et la colonne d'eau n'avait pas atteint un équilibre après douze jours d'expérience, puisque entre les traitements U-0 et U-12, la teneur de l'uranium dans l'eau a continué d'augmenter (~1%). Cependant, la bioturbation a un effet beaucoup plus marqué sur cette remobilisation avec un peu plus de 5% d'uranium qui a été remobilisé depuis le compartiment sédimentaire vers les phases aqueuses en fin d'expérience.

#### 4.3.4 DISCUSSION

Comme on peut l'observer en comparant les traitements contaminés au début de l'expérience (U-0) et après douze jours (U-12), l'uranium initialement associé au sédiment est en partie redistribué vers la colonne d'eau (~1%). Dans ce compartiment, la concentration en uranium est ainsi multipliée par 2 sur douze jours (Fig. 1 et 2). Ceci peut s'expliquer par des processus de transfert entre l'eau et le sédiment *via* des réactions de désorption et d'oxydation de l'uranium dans la zone oxique du sédiment, ce qui favorise sa mobilité vers la colonne d'eau (Markich 2002). Inversement, il existe aussi un transport de l'uranium dissous de la colonne d'eau vers le sédiment par diffusion comme le montre le calcul du flux diffusif à l'interface eau/sédiment (Tableau 2).

En présence de vers *Tubifex*, le transfert de l'uranium du sédiment vers la colonne d'eau est nettement amplifié, avec près de 5% de l'uranium total qui est remobilisé du sédiment vers

les phases aqueuses (Tableau 3). La concentration dans la colonne est dans ce cas multipliée par un facteur 10 (Fig. 1 et 2) sans que le flux diffusif de l'eau vers le sédiment ne soit modifié (Tableau 2). Comme cela est présenté au chapitre 3, dans ces conditions de contamination ( $600 \mu\text{g U g}^{-1}$  sédiment sec), les vers sont capables de maintenir une activité de bioturbation suffisante pour faire remonter les particules de sédiment, et ainsi l'uranium réduit qui leur est associé, depuis une zone d'ingestion en profondeur vers l'interface eau/sédiment. Bien que déjà observé en milieu marin (Zheng et al. 2002), ce résultat confirme donc que ce type de transfert, déjà rapporté pour d'autres métaux (Krantzberg 1985, Matisoff 1995, Ciutat & Boudou 2003, Ciutat et al. 2007), est également possible pour l'uranium en eau douce. De plus, il est important de noter, que celui-ci est particulièrement efficace compte-tenu de la faible bioconcentration de l'uranium par les vers. Vivant à l'interface eau/sédiment et se nourrissant par ingestion des particules de sédiment, ces organismes peuvent pourtant bioaccumuler les métaux par différentes voies d'exposition (Bouché et al. 2000, Ciutat et al. 2005): (i) à partir des phases aqueuses (colonne d'eau, eau interstitielle) par diffusion à travers le tégument, et (ii) à partir du sédiment par ingestion/assimilation dans le tractus digestif. Bien que l'on mesure un facteur de bioconcentration (BCF) supérieur à 1 dans le premier cas, celui-ci reste faible, probablement en raison des conditions de dureté ( $152 \text{ Eq mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ ) et de pH (8,6), qui limitent la biodisponibilité de l'uranium (Markich 2002, Sheppard et al. 2005). La production de mucus par les vers, qui est accrue à ce niveau de contamination du sédiment (cf chapitre 3), peut également limiter la diffusion de l'uranium à travers le tégument. Par rapport au sédiment, la bioaccumulation est également faible et il n'y a pas de bioconcentration, ce qui laisse supposer une faible assimilation de l'uranium dans le tractus digestif des vers, probablement liée à une forte adsorption de l'uranium sur les particules de sédiment (Redeker et al. 2004).

Les conséquences de la remontée des particules par bioconvoyage permettent également d'expliquer la répartition et les transferts du calcium et des sulfates. Le calcium est comme l'uranium remonté vers la surface du sédiment en présence de vers *Tubifex*, ce qui explique l'augmentation de sa concentration dans la colonne d'eau au cours du temps (Fig. 5). Le flux de diffusion de cet élément, du sédiment vers la colonne d'eau, est ainsi indirectement diminué, voire inversé, sous l'effet de la bioturbation (Tableau 2). De même, la concentration en sulfates dans la colonne d'eau augmente nettement au cours du temps en présence des vers *Tubifex*. Le bioconvoyage entraîne une remontée des sulfures depuis le sédiment anoxique directement dans la colonne d'eau, où ils sont alors oxydés en sulfates. De la même façon que

pour le calcium, le flux diffusif sortant à l'interface eau/sédiment s'en trouve indirectement inversé (Tableau 2), ce qui peut être favorable aux bactéries sulfato-réductrices. Ceci pourrait donc expliquer l'absence de pic de sulfates sous l'interface eau/sédiment par une forte utilisation de cet oxydant.

Ces résultats montrent que les vers *Tubifex* peuvent modifier fortement la répartition des solutés comme les ions métalliques et les sulfates entre la colonne d'eau et le sédiment sans pour autant directement augmenter leur diffusion au niveau de l'interface. Cela est confirmé par les profils de chlorures, qui en tant qu'élément conservatif, montrent que la diffusion au niveau de l'interface n'est pas modifiée de façon directe sous l'effet de la bioturbation (Fig. 3 et Tableau 2).

Les profils de nitrates et nitrites montrent une augmentation des processus de nitrification/dénitrification sous l'effet de la bioturbation et un couplage potentiel de ces réactions avec l'oxydation de l'uranium dans les traitements contaminés (Fig. 4). Ceci est particulièrement visible sur les mesures de  $\text{NO}_2^-$ , qui est pourtant un composé intermédiaire dans ces réactions, tandis que les concentrations en  $\text{NO}_3^-$ , ainsi que leur variation au cours du temps et leur flux diffusifs à l'interface eau/sédiment sont très faibles (Fig. 5 et Tableau 2). Une explication possible peut être un fort couplage de la nitrification et de la dénitrification sous l'effet de la bioturbation (Stief & De Beer 2002). Comme cela a été suggéré par différents auteurs (Pelegrí & Blackburn 1995, Svensson et al. 2001), la nitrification peut être stimulée dans la zone oxygène du sédiment en raison de l'excrétion de  $\text{NH}_4^+$  par les vers. Le nitrate ainsi produit serait alors rapidement consommé par les bactéries dénitrifiantes. Dans cette étude, la bonne oxygénation de la colonne d'eau, et donc des couches de surface du sédiment, aurait limité les phases finales de la dénitrification (production de monoxyde d'azote puis de diazote), ce qui pourrait expliquer les fortes concentrations de  $\text{NO}_2^-$  mesurées. Il en résulte une forte augmentation de la concentration en  $\text{NO}_2^-$  dans la colonne d'eau sous l'effet de la bioturbation (Fig. 5).

En plus de la remontée des sulfures par bioconvoyage et de l'excrétion de  $\text{NH}_4^+$ , l'influence de la bioturbation des vers *Tubifex* sur les réactions de sulfato-réduction et de nitrification/dénitrification, processus-clés dans la dégradation de la matière organique au cours de la diagenèse précoce (cf chapitre 1), peut également s'expliquer par : (i) l'apport de matière organique labile (fèces, mucus), (ii) les passages successifs des particules de sédiment

de conditions oxygènes à des conditions anoxiques (bioconvoyage, enfoncement des couches de sédiment, passage par le tractus digestif) qui favorisent fortement la dégradation de la matière organique (Stief 2007), (iii) un couplage fort des réactions diagénétiques (Stief & De Beer 2002), et (iv) des modifications de l'abondance et de la productivité de certaines communautés microbiennes (Van de Bund et al. 1994, Mermillod-Blondin et al. 2005).

Enfin, concernant les effets de l'uranium sur les processus biogéochimiques, les mesures des  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  et  $\text{SO}_4^{2-}$  réalisées dans cette expérience, semblent confirmer les hypothèses formulées lors de la mesure des flux d'oxygène à l'interface eau/sédiment (paragraphe 1.2. de ce chapitre). Avec une consommation d'oxygène au sein du sédiment accrue de 24% lorsque celui était contaminé avec de l'uranium, et de 53% lorsque des vers étaient également présents, une stimulation des communautés bactériennes ferro-réductrices, dénitrifiantes et sulfato-réductrices avait été envisagée. Les résultats présentés ici confirment que les communautés nitrate- et sulfato-réductrices sont stimulées. Par contre, les profils de concentration en fer dissous (Fig. 3) ne montrent pas d'effet de l'uranium, ni de la bioturbation sur les bactéries ferro-réductrices.

#### 4.3.5 CONCLUSION

Ce travail a permis de confirmer le rôle majeur de la bioturbation des vers Tubificidae dans la biogéochimie du sédiment (*e.g.* stimulation des processus diagénétiques, redistribution des solutés). En constatant le maintien de ces processus au sein de sédiments contaminés avec de l'uranium à une concentration relativement élevée (> 100 fois le bruit de fond géochimique naturel), la forte tolérance de ces organismes vis-à-vis de l'uranium, dans les conditions expérimentales de cette étude, a également été illustrée. Ainsi, il a pu être démontré que les vers *Tubifex* étaient capables d'entraîner une forte remobilisation de l'uranium initialement associé au sédiment vers la colonne d'eau, et que ce transfert était directement lié au bioconvoyage des particules de sédiment du fond vers la surface. Les modifications des processus biogéochimiques liées à la bioturbation ne semblent pas impliquées dans la distribution et les transferts de l'uranium. Un schéma conceptuel est proposé pour illustrer la répartition de l'uranium au sein d'un sédiment bioturbé par des vers *Tubifex* (Fig. 6).

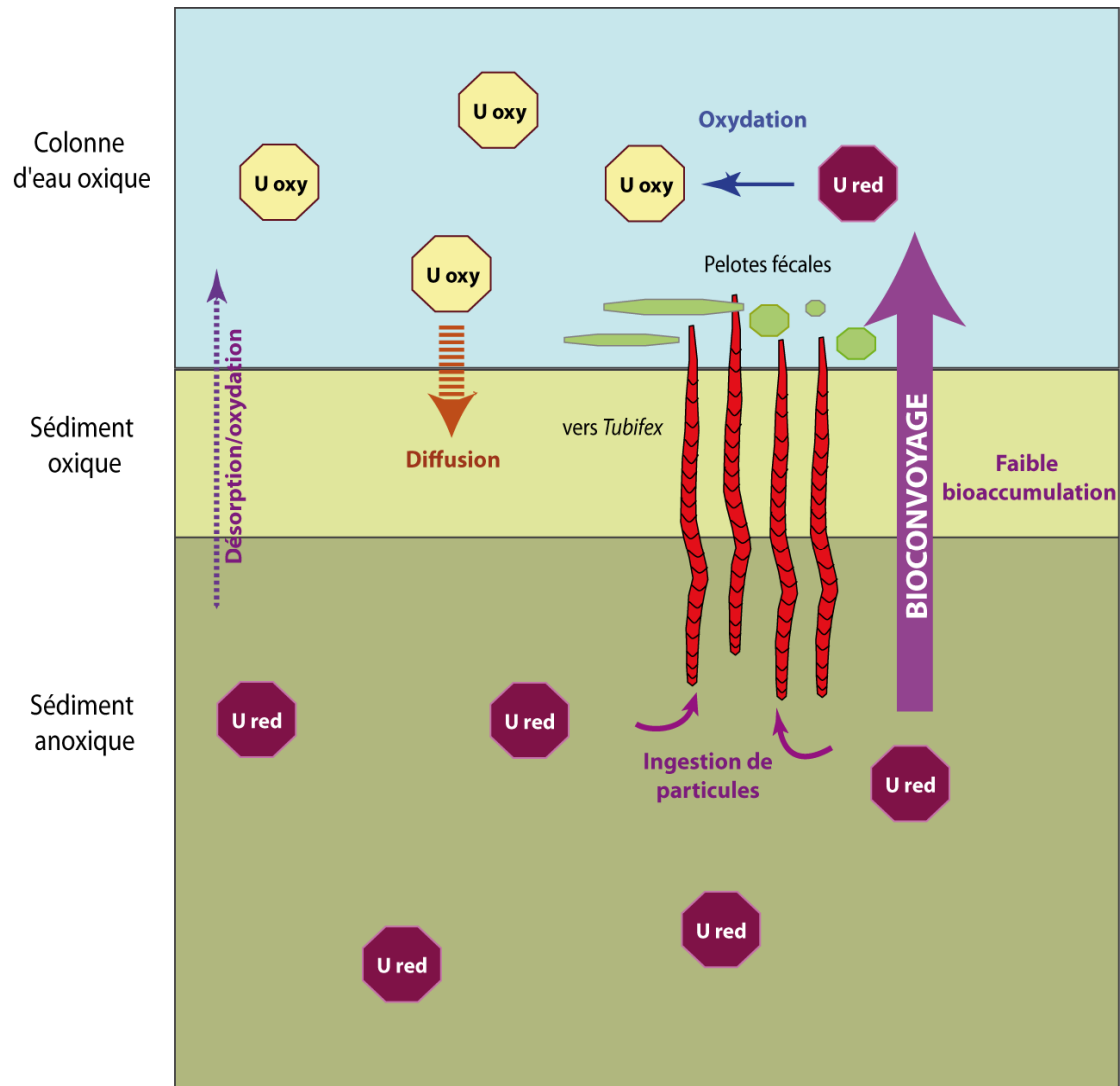


Figure 6 – Schéma conceptuel de la répartition et des transferts de l'uranium dans un sédiment bioturbé par des vers *Tubifex* avec une colonne d'eau oxygénée (U oxy = uranium sous sa forme oxydée, U red = uranium sous sa forme réduite).

**CHAPITRE 5 :**  
**CONSÉQUENCES DES INTERACTIONS**  
**BIOTURBATION/URANIUM DANS**  
**LA COLONNE D'EAU**





## 5.1 INTRODUCTION

Au cours des expériences présentées précédemment, toutes réalisées dans les mêmes conditions expérimentales, on a pu observer une importante remobilisation de l'uranium initialement présent dans le sédiment vers la colonne d'eau, en présence de macro-invertébrés bioturbateurs.

Comme cela avait déjà été montré dans plusieurs études, le bioconvoyage des particules de sédiment exercé par les oligochètes est le mode de bioturbation dominant pour expliquer le relargage des métaux dans la colonne d'eau dans les milieux dulçaquicoles (Matisoff et al. 1999, Matisoff & Wang 2000, Martin et al. 2004). Dans ce travail de doctorat, il a été démontré que l'espèce *Tubifex tubifex* était capable de maintenir son activité de bioturbation dans un sédiment fortement contaminé (concentration plus de 100 fois supérieure à la concentration moyenne dans les milieux d'eau douce non impactés), avec une intensité suffisante pour augmenter la concentration en uranium dans la colonne d'eau d'un facteur 2 à 10. Pour une concentration initiale dans le sédiment de  $600 \mu\text{g U g}^{-1}$  ps, les concentrations finales dans les aquariums après douze jours de bioturbation ont atteint des valeurs maximales de 20 à 30  $\text{mg U L}^{-1}$ . Ces valeurs sont représentatives d'environnements naturels impactés (e.g. sites miniers) (Ragnarsdottir & Charlet 2000), le bruit de fond géochimique naturel pour les eaux douces se situant entre 0,02 et 6  $\mu\text{g U L}^{-1}$  (Bonin & Blanc 2001).

Dans ce contexte, le travail présenté dans ce dernier chapitre, a eu pour objectif d'évaluer les conséquences potentielles d'un tel relargage d'uranium chez les organismes pélagiques. Dans la littérature, on trouve des données relatives à l'écotoxicité de l'uranium chez les invertébrés zooplanctoniques (e.g. hydres et cladocères), les macro-invertébrés épibenthiques (e.g. bivalves), et les poissons (Sheppard et al. 2005). Ces travaux ont notamment permis de déterminer des PNEC (*Previsible Non Effect Concentrations*) chez ces organismes et de mettre en avant l'influence de l'alcalinité, de la dureté et du pH de l'eau sur la toxicité de l'uranium (Sheppard et al. 2005). Il est clairement établi aujourd'hui que plus ces paramètres ont des valeurs élevées, plus la toxicité de l'uranium est faible. Bien que ces facteurs varient souvent de façon similaire, la dureté représenterait le facteur le plus influent : la compétition de l'ion uranyle  $\text{UO}_2^{2+}$ , forme majoritaire de l'uranium dans la phase aqueuse, avec les ions

Mg<sup>2+</sup> et Ca<sup>2+</sup>, limiterait la mobilité de l'uranium (Curtis et al. 2006) et son passage au niveau des barrières physiologiques (Riethmuller et al. 2001).

Dans les conditions expérimentales choisies dans ce travail (*i.e.* dureté=152 Eq mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>), en se basant sur les travaux de Sheppard (2005), la PNEC estimée chez les poissons serait de 23 mg U L<sup>-1</sup>. On peut donc penser que les concentrations obtenues dans la colonne d'eau par relargage de l'uranium (20-30 mg U L<sup>-1</sup>), pourraient affecter les organismes pélagiques.

Dans cette étude, la larve de *Xenopus laevis* (Amphibien, Anoure) a été retenue comme modèle biologique en raison de sa large utilisation en tant qu'espèce modèle pour évaluer les effets toxiques et génotoxiques des polluants, de sa biologie compatible avec nos conditions expérimentales (eau à 21°C) et de sa facilité d'élevage. De plus, il existait, à notre connaissance, peu de données concernant la toxicité de l'uranium chez les amphibiens (Mitchell et al. 2005, Scholtz et al. 2006). Cette espèce a été observée *in situ* dans des puits remplis d'eau dans d'anciennes mines d'uranium en Afrique du Sud (Scholtz et al. 2006). Des individus adultes exposés à une eau à 20 mg U L<sup>-1</sup>, présentaient des concentrations tissulaires élevées, notamment au niveau du foie, des reins et des os. Des coupes histologiques du foie et du rein ont révélé des formules lymphocytaires anormales, indicatrices de néoplasies, probablement liées à l'accumulation d'uranium dans ces tissus. La deuxième étude relative à l'exposition de *X. laevis* à l'uranium est un bioessai en laboratoire visant à estimer les effets de ce métal sur la mortalité, la croissance et l'apparition de malformations chez des larves. Ce travail se composait de deux tests : (i) un test aigu sur 96 heures (FETAX) pour tester les effets tératogènes de l'uranium avec des concentrations allant de 4,8 à 77,7 mg U L<sup>-1</sup> (stades de développement : 8-47 – table de Nieuwkoop & Faber, 1956), et (ii) un test chronique sur 64 jours avec des concentrations allant de 62 à 543 mg U L<sup>-1</sup> (stades : 8-66) (Mitchell et al. 2005). Les auteurs de ce travail n'ont pas montré d'effet significatif de l'uranium sur la tératogenèse ou sur la mortalité. Ils ont cependant observé un retard dans la métamorphose au cours du test chronique pour des concentrations supérieures à 13,1 mg U L<sup>-1</sup>. Dans le test aigu, les auteurs ont supposé que les individus ne se nourrissent pas activement à ce stade de développement car leurs branchies n'étaient pas totalement formées, l'absorption d'uranium a été limitée malgré les fortes concentrations d'exposition. Dans le test chronique, par contre, l'effet observé sur le retard de développement, semble lié à la bioaccumulation (0,98 à 2,82 mg U kg<sup>-1</sup>), les branchies et les pièces buccales étant devenues fonctionnelles. En plus d'être la seule étude relative à l'exposition de larves de *X. laevis* à de l'uranium, celle-ci est

particulièrement intéressante dans le cadre du travail présenté ici, car l'eau utilisée présentait des valeurs similaires de pH et de dureté (pH=8,2, dureté=177 Eq mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>), et les concentrations en uranium testées étaient du même ordre de grandeur.

## **5.2 OBJECTIF**

L'objectif de cette partie était donc d'évaluer les effets potentiels de l'uranium relargué par bioturbation chez un organisme pélagique modèle, le têtard de Xénope. Tout en maintenant les conditions expérimentales appliquées aux autres expériences présentées dans cette thèse, le bioessai a consisté à introduire cet organisme dans la colonne d'eau des aquariums, et à comparer des systèmes contrôles et contaminés, avec ou sans vers *Tubifex tubifex* dans le sédiment. Cinq paramètres ont été mesurés : (i) la mortalité, (ii) la bioaccumulation, (iii) la biomasse, (iv) la toxicité génétique grâce à l'essai micronoyaux (MN) sur érythrocytes du sang circulant, et (v) l'analyse de biomarqueurs moléculaires (BM) : expression génique (ARNm) de quatre protéines connues pour être induites lors de stress environnementaux (Métallothionéines MTs, protéines chaperonnes HSP 70, Récepteur multi-drogues XeMdr – MRP de Xénope, Cytochrome CYP450-1A1).

## **5.3 MATÉRIELS & MÉTHODES**

### **5.3.1 PRÉSENTATION DU MODÈLE BIOLOGIQUE : LE TÊTARD DE XÉNOPE (*XENOPUS LAEVIS*)**

*Xenopus laevis*, communément appelé Crapaud à griffe ou Dactylère du cap, est un amphibien anoure de la famille des Pipidae, originaire d'Afrique australe. Il possède un mode de vie essentiellement aquatique, ne montant à la surface de l'eau que pour respirer. Les femelles adultes mesurent plus de 11 centimètres, tandis que les mâles sont 30% plus petits en moyenne. Quelques données taxonomiques et physiologiques concernant cette espèce sont présentées dans la Figure 1.

**A**

Embranchement	Vertébrés
Classe	Amphibiens
Ordre	Anoures
Sous-ordre	Aglosses
Famille	Pipidae
Genres	<i>Xenopus</i>
Espèce	<i>X. laevis</i>

**B**

Polyploïdie	Allo-tétraploïde
Nombre de chromosomes	36
Température optimale	20-22 °C
Taille adulte	10 cm
Dimension œufs	1 à 1,3 mm
Nombre d'œufs par ponte	300-1000
Temps de génération	1 à 2 ans
Origine	Afrique du Sud

**C**



**D**



Figure 1 – Planche illustrative pour l'espèce *Xenopus laevis* : (A) Systématique, (B) Principales caractéristiques biologiques, (C) Photographie d'un couple d'adultes, (D) Photographies de larves à différents stades de développement.

Dans le domaine de l'écotoxicologie, *X. laevis* est une espèce bioindicatrice 'sentinelle' qui présente de nombreux avantages : (i) il est aisé d'obtenir des larves en laboratoire car les femelles pondent toute l'année et cette ponte peut être déclenchée par induction hormonale, (ii) comme pour tous les amphibiens, l'épiderme semi-perméable facilite les échanges et donc le passage des xénobiotiques présents dans l'eau, ce qui favorise une forte sensibilité vis-à-vis de ces substances, et (iii) ce modèle animal possède un arsenal enzymatique adapté à la détoxification. Différents essais standardisés de toxicité aiguë ou chronique ont ainsi été développés par les écotoxicologues pour évaluer les effets des contaminants présents dans l'environnement, en tant que substances pures ainsi qu'en mélange complexe. Les critères d'effet étudiés peuvent être variés mais sont complémentaires. Parmi ceux-ci, on peut citer :

- la mortalité, la tératogénèse, la croissance et le développement larvaire, comme par exemple dans le test FETAX (ASTM 1998, Monetti et al. 2003, Mitchell et al. 2005),
- des critères de génotoxicité (*e.g.* endommagement de l'ADN) comme dans l'essai micronoyaux et l'essai Comète (Van Hummelen et al. 1989, Mouchet 2002, Mouchet et al. 2005, Mouchet et al. 2006a, Mouchet et al. 2006b),
- l'analyse de biomarqueurs moléculaires comme l'expression génique (ARNm) de protéines induites par des stress environnementaux (*e.g.* métallothionéines) (Gornati et al. 2002, Monetti et al. 2002, Monetti et al. 2003).

### 5.3.2 DESCRIPTION DU BIOESSAI

#### 5.3.2.1 Remarque préliminaire

Trois expériences indépendantes (Expériences 1 à 3) de douze jours ont été réalisées en raison des difficultés rencontrées pour adapter l'essai micronoyaux – standardisé chez les larves d'amphibien exposées à des extraits aqueux principalement – au dispositif expérimental de cette étude (de type microcosme, *i.e.* eau+sédiment). En effet, en dépit de conditions favorables (*e.g.* 12 jours d'exposition, température de 21°C), la croissance des larves n'a pas toujours été optimale dans les différents traitements expérimentaux pour réaliser l'ensemble des mesures souhaitées.

La première expérience a consisté à exposer des larves de *Xenopus laevis* dans de l'eau contaminée à 20 mg U L<sup>-1</sup> en conditions normalisées pour le test micronoyaux (ISO INTERNATIONAL STANDARD 2006).

La seconde expérience a été réalisée en aquariums (Tableau 1), remplis de sédiments et d'eau avec un volume d'eau préconisé par la norme ISO 21427-1/2006 (*i.e.* 100 mL/larve). Les facteurs expérimentaux testés étaient : (i) deux concentrations en uranium, 150 et 600 µg U g<sup>-1</sup> sédiment sec, qui, pour rappel, sont sub-létales pour l'espèce *Tubifex tubifex* dans ces conditions expérimentales (cf chapitre 3), et (ii) la présence de vers *T. tubifex* dans le sédiment. Des tripliquats ont été systématiquement mis en œuvre.

Au vu des résultats de cette expérience, notamment en raison des problèmes de croissance des larves, ce même protocole a été reproduit dans des aquariums plus larges (Tableau 1) avec un volume d'eau plus grand (200 mL/larve) et avec une seule concentration en uranium à l'étude, à savoir la plus forte (600 µg U g<sup>-1</sup> sédiment sec), pour avoir une concentration dans la colonne d'eau relativement élevée. Il s'agit de la troisième expérience.

### **5.3.2.2 Préparation des aquariums**

Le prélèvement, la préparation et la conservation de l'eau et des sédiments, ainsi que la procédure de contamination ont été réalisés de la même façon que dans les expériences présentées précédemment (cf. chapitre 2, notamment pour les caractéristiques physico-chimiques). Pour rappel, avec les concentrations en uranium testées (150 et 600 µg U g<sup>-1</sup> sédiment sec) dans ces conditions expérimentales de cette étude, les vers *Tubifex tubifex*, sont capables de maintenir une activité de bioturbation suffisante pour entraîner un relargage d'uranium vers la colonne d'eau. La contamination des sédiments a été faite en une fois à partir de nitrate d'uranyle dans des bidons agités manuellement plusieurs fois par jour durant deux semaines. Les aquariums ont ensuite été remplis avec 10 cm de sédiment et un volume d'eau suffisant pour le nombre de larves de *Xenopus laevis* à introduire (100 ou 200 mL/larve). Après une phase d'équilibration de quatre semaines, avec un bullage constant pour maintenir une concentration en oxygène dissous dans la colonne d'eau autour de 7-8 mg L<sup>-1</sup>, et des ajustements du volume d'eau pour compenser l'évaporation, les organismes (vers *T. tubifex* et larves de *X. laevis*) ont été introduits dans les aquariums. Le tableau 1 présente les conditions expérimentales des 3 expériences.

**Tableau 1 – Récapitulatif des conditions expérimentales des trois expériences**

	<b>Contamination</b>	<b>Dimensions des aquariums</b>	<b>Nombre larves / aquarium</b>	<b>Volume / hauteur d'eau</b>
<b>Expérience 1</b> Essai standardisé ISO	Eau 20 mg U L <sup>-1</sup>	Cubique Côté = 17 cm	30 - 20 pour MN - 10 pour BM	3 L / 10 cm
<b>Expérience 2</b>	Sédiment (poids sec) U1=150 µg U g <sup>-1</sup> U2=600 µg U g <sup>-1</sup>	Cylindrique Hauteur = 20 cm diamètre = 12 cm	15 - 10 pour MN - 5 pour BM	1,5 L / 13 cm
<b>Expérience 3</b>	Sédiment (poids sec) U=600 µg U g <sup>-1</sup>	Cubique Côté = 25 cm	32 - 20 pour MN - 10 pour BM - 2 en plus	6 L / 9,6 cm

Les aquariums ont été placés dans des bains-marie pour maintenir la température à 21°C, avec un éclairage de photopériode 12 H jour/ 12 H nuit, et un bullage d'air constant de la colonne d'eau de chaque unité. Dans les expériences 2 et 3, pour tester les effets de l'uranium et/ou de la bioturbation des vers *T. tubifex* sur les différents paramètres, les modalités expérimentales (traitements) étaient les suivantes :

- sédiment contrôle/pas de *Tubifex* [CX],
- sédiment contrôle/présence de *Tubifex* [CXT],
- sédiment contaminé/pas de *Tubifex* [UX],
- sédiment contaminé/présence de *Tubifex* [UXT].

Pour estimer le relargage d'uranium induit par les vers *T. tubifex*, en absence de larve de *X. laevis* dans la colonne d'eau, des aquariums supplémentaires ont également été utilisés [UT]. Compte-tenu des résultats obtenus dans les expériences précédentes et en raison des contraintes liées à la manipulation de l'uranium dans le laboratoire, cette mesure n'a pas été réalisée en tripliquats.

### **5.3.2.3 Origine et acclimatation des organismes**

Les vers *Tubifex tubifex* provenaient d'un élevage commercial (Société *Grebyl & Fils*, Arry, France). Leur identification a été confirmée par le professeur N. Giani de l'Université Paul Sabatier de Toulouse. Acclimatés pendant plusieurs semaines aux conditions expérimentales, ils ont été placés dans du sédiment artificiel sans apport de nourriture durant



48 heures avant leur introduction dans les aquariums pour reproduire les conditions utilisées dans les autres expériences de la thèse. Pour la même raison, la densité de vers introduite était de 60 000 ind m<sup>-2</sup>, ce qui représente 700 et 3 750 individus par aquarium dans les expériences 2 et 3, respectivement.

Les larves de *Xenopus laevis* ont été obtenues au laboratoire Ecolab à Toulouse au sein de l'équipe d'Ecotoxicologie et Génotoxicologie environnementale (L. Gauthier, F. Mouchet). La fécondation est induite après l'injection de gonadotrophine sérique de jument gravide (PMSG pour *Pregnant Mare Serum Gonadotropin*) chez le mâle, et de gonadotrophine chorionique d'origine humaine (HCG pour *Human chorionic gonadotropin*) chez la femelle. Les œufs sont obtenus après accouplement naturel des adultes (fécondation externe) et éclosent environ 48H après la ponte. Les larves sont ensuite transférées dans des aquariums de 50 L munis de bulleurs et maintenus à 20 ± 2°C, jusqu'à atteindre le stade de développement souhaité pour les expérimentations (pour l'essai MN : stade 50 de la table de Nieuwkoop & Faber, 1956). Étant végétariennes, elles sont nourries quotidiennement avec des paillettes déshydratées réduites en poudre initialement commercialisées pour les poissons d'ornement (Tetraphyll®, Tableau 2). L'eau d'élevage des adultes provient de l'eau de distribution d'Auzeville-Tolosane, à côté de Toulouse, tandis que les larves sont maintenues en eau déminéralisée obtenue par filtration sur charbon actif de cette même eau. Dans la présente étude, les larves ont été acclimatées à l'eau utilisée pour les expériences (eau du lac d'Esparron filtrée à 20 µm) pendant une semaine avant l'exposition. Les caractéristiques physico-chimiques de cette eau sont rapportées dans le chapitre 2.

**Tableau 2 – Composition analytique du Tetraphyll®**

Protéines brutes	47 %
Matières grasses	8,5 %
Cendres brutes	10,5 %
Celluloses brutes	2,0 %
Humidité	6,0 %
Vitamines	Teneurs additionnées /kg (matière sèche)
A	31 220 UI
D3	1 717 UI
E	104 mg
Ascorbyle I-2-polyphosphate	133 mg

#### 5.3.2.4 Protocoles de mesures

*Paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau* – La température, le pH et la concentration en oxygène dissous de la colonne d'eau ont été mesurés un jour avant l'introduction des organismes, puis tous les deux jours jusqu'à la fin de l'expérience (jour 12). La concentration en uranium total dans l'eau a été suivie de la même façon à partir d'échantillons d'eau non filtrés et acidifiés (2% HNO<sub>3</sub>), puis analysés par ICP-AES (Optima 4300 DV, Perkin-Elmer, USA).

*Mortalité* – La mortalité a été analysée en termes de pourcentage de survie, calculé en ramenant le nombre d'individus vivants en fin d'expérience au nombre d'individus introduits dans les aquariums en début d'expérience, et en multipliant ce rapport par 100.

*Biomasse* – La biomasse par individu a été mesurée en fin d'expérience grâce à la pesée des larves avec une balance de précision ( $1\text{g} \pm 0,0001$ ). Cette mesure a été réalisée sur les larves ponctionnées pour le test MN. Elle est exprimée en mg de poids frais.

*Bioaccumulation* – Ces mêmes larves ont été séchées à l'étuve à 60°C pendant 48 heures, puis repesées. Chaque larve a ensuite été minéralisée par l'ajout de 3 mL de HNO<sub>3</sub> 67% et de 3 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30% suivi d'un cycle de chauffage à 95°C pendant 90 minutes. Après complète évaporation, les minéralisats ont été remis en suspension dans 10 mL de HNO<sub>3</sub> à 2%, puis filtrés (Minisart®, filtre 0,45 µm en acétate de cellulose) après 24 heures à température ambiante. Les échantillons ont été analysés par ICP-AES (Optima 4300 DV, Perkin-Elmer, USA) pour mesurer leur concentration en uranium. La bioaccumulation est exprimée en mg kg<sup>-1</sup> de poids sec.

*Essai micronoyaux (MN)* – Cet essai normalisé ISO 21427-1 (ISO, 2006) permet d'évaluer la toxicité génétique sous la forme de dommages chromosomiques et/ou génomiques générés chez les individus exposés à des substances génotoxiques. Ces dommages se matérialisent sous la forme de micronoyaux. L'intensité de la toxicité est quantifiée par un comptage des cellules avec au moins un micronoyau. Ces micronoyaux correspondent en fait à de petites masses de chromatine intra-cytoplasmique dont la formation est consécutive à une fragmentation chromosomique et/ou à un mauvais fonctionnement de l'appareil mitotique. Ces éléments sont des fragments de chromosomes qui, dépourvus de

centromères, n'ont pu contracter de relations avec les fibres du fuseau ou des chromosomes entiers dont l'ascension polaire ne s'est pas effectuée à cause d'anomalies fusoriales et/ou centrométriques. Les substances clastogènes (génératrices de cassures chromosomiques) et les poisons fusoriaux entraînent l'augmentation du nombre de cellules à micronoyaux. Chez la larve de *Xenopus laevis*, les globules rouges nucléés se divisent activement dans le sang circulant. Lorsque des micronoyaux sont présents dans ces cellules, ils sont très facilement repérés sur des frottis sanguins. A partir de cette observation, a été mise au point, à l'origine, une méthodologie permettant de détecter la génotoxicité d'une substance chimique vis-à-vis de la larve de *X. laevis* élevée dans de l'eau contenant cette substance (Zoll et al. 1988, Van Hummelen et al. 1989). Le test s'applique à des substances chimiques seules ou en association. La lecture des résultats, réalisée sur frottis sanguins, consiste à comparer le taux d'érythrocytes à micronoyaux provenant d'un lot de larves traitées par rapport à un lot témoin (non traité).

D'un point de vue pratique, après douze jours d'exposition, les larves ont été anesthésiées par immersion dans une solution de sulfonate de tricaïne méthane (MS222) pour prélever un échantillon de sang par ponction cardiaque afin de réaliser un frottis sanguin par individu. Après fixation au méthanol et coloration à l'hématoxyline (Sigma, France), les frottis sanguins ont été analysés par microscopie ( $\times 1500$ ) par immersion. Le nombre d'érythrocytes contenant un ou plusieurs micronoyaux a été déterminé sur un échantillon total de 1000 cellules par larve, et les données ont donc été exprimées en nombre d'érythrocytes à micronoyaux pour mille érythrocytes observés (*EMN* ‰). Pour chaque traitement, les résultats obtenus par larve sont classés par ordre croissant afin de déterminer les médianes et les quartiles. Les traitements ont ensuite été analysés statistiquement par comparaison de ces médianes (Mc Gill et al. 1978). La méthode consiste à déterminer des médianes théoriques  $M$  avec des effectifs de taille  $n$  (avec  $n \geq 7$ ) et des intervalles de confiance à 95%, égaux à  $M \pm 1,57 \times \text{EIQ} / \sqrt{n}$ , où EIQ est l'écart inter-quartiles. Ainsi, la différence entre les médianes théoriques des différents traitements et la médiane théorique du groupe contrôle négatif (exposition à une eau reconstituée<sup>1</sup>) a été considérée comme significative à 95% si il n'y avait pas de chevauchement. Cette comparaison a également été faite avec un groupe contrôle

---

<sup>1</sup> Eau déminéralisée à partir de l'eau du réseau d'Auzerville-Tolosane (Toulouse) dans laquelle sont ajoutés des sels minéraux : 294 mg L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 123,25 mg L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 64,75 mg L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, 5,75 mg L<sup>-1</sup> KC.

positif (exposition à un mutagène de référence dilué dans de l'eau reconstituée<sup>1</sup> : cyclophosphamide monohydraté (CP, [6055-19-2], Sigma France, à 20 mg L<sup>-1</sup>).

*Analyse des biomarqueurs moléculaires* – Pour analyser les niveaux d'expression des gènes MTs (qui codent pour les métallothionéines), HSP70 (qui codent pour les protéines chaperonnes «*Heat Shock Proteins*»), XeMdr (qui codent pour un récepteur multi-drogues MRP «*Multi-drug Resistance Proteins*»), CYP450-1A1 (qui codent pour un cytochrome P450 de la sous-famille 1A), le matériel génétique des larves a été extrait et amplifié par RT-PCR quantitative en temps réel par l'équipe de R. Gornati (Laboratoire de Biotechnologie et Sciences moléculaires, Université de Varese, Italie). L'ARN total a été extrait à partir d'échantillons de larves entières congelées en azote liquide, immédiatement après leur retrait des aquariums, soit après 24H et/ou douze jours d'exposition. Le niveau d'expression de chaque gène (ARNm) a été comparé à celui d'un gène exprimé de manière constitutive (actine ou GADPH).

L'expression de ces gènes est couramment analysée en écotoxicologie pour évaluer l'influence de divers stress environnementaux. Quelques détails sur les fonctions des protéines correspondantes ainsi que sur leur induction et leur régulation au niveau de l'expression des gènes qui les codent sont rapportés en annexe. De façon synthétique, ces protéines ont des rôles protecteurs pour les cellules lors d'exposition à des stress environnementaux (*e.g.* xénobiotiques, stress oxydatif, maladie). Les MTs sont capables d'immobiliser les métaux pour limiter leurs effets toxiques sur des macromolécules essentielles. Les HSP70 sont des protéines dites chaperonnes, qui limitent la dégradation de protéines essentielles. Les cytochromes P450 sont responsables de la biotransformation des substances toxiques (par oxydation), ce qui peut conduire à leur inactivité ou qui facilite leur prise en charge par d'autres enzymes agissant dans ces processus (transférases). Enfin, les transporteurs membranaires multi-drogues permettent l'évacuation des substances toxiques biotransformées hors de la cellule. Toutes ces protéines peuvent être induites par les substances toxiques par l'intermédiaire de système de régulation au niveau de la transcription des gènes qui les codent. C'est pourquoi une quantification de l'expression de ces gènes peut constituer un critère d'effet pertinent à prendre en compte pour évaluer l'écotoxicité d'un polluant, à des niveaux qui peuvent être très inférieurs à ceux auxquels on observe des réponses à l'échelle d'une cellule ou d'un organisme entier (*e.g.* mortalité, malformations, croissance).

Pour chaque réponse, les différents traitements ont été comparés statistiquement (Statistica®, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) par des ANOVAs à un facteur, suivies de

comparaisons multiples post hoc (test de Scheffé), lorsque les données présentaient une distribution normale (test de Shapiro-W) et une homogénéité des variances significative (test de Levene). Dans le cas inverse, la comparaison a été réalisée grâce à un test non paramétrique (Kruskal-Wallis). Pour chaque traitement, les réponses obtenues après 24H et après 12 jours ont été comparées par un test de Mann-Whitney. Un seuil de significativité de 5% a été appliqué à l'ensemble de ces analyses.

### 5.3.2.5 Déroulement des expériences

*Expérience 1* – Dans cette expérience, le protocole d'exposition recommandé dans le cadre de l'essai MN ISO 21427-1 a été appliqué à la concentration nominale de 20 mg U L<sup>-1</sup>. Les trois-quarts du volume d'eau ont été renouvelés tous les deux jours et les larves de *Xenopus laevis* ont été nourries quotidiennement avec des paillettes de Tetraphyll® (Tableau 2). Les excréments et la nourriture non consommée ont été retirés lors de chaque renouvellement d'eau. Après 24 heures d'exposition, un lot de 5 larves a été retiré pour l'analyse des biomarqueurs moléculaires. Ensuite, le volume d'eau a été ajusté pour garder un rapport de 100 mL/larve. Après douze jours d'exposition, un deuxième lot de 5 larves a été retiré pour l'analyse des biomarqueurs moléculaires, tandis que les 20 larves restantes ont été ponctionnées pour le test micronoyaux, puis conservées pour mesurer la biomasse et la bioaccumulation.

*Expérience 2* – L'objectif de ce travail étant d'ajouter aux dispositifs expérimentaux déjà utilisés dans les expériences antérieures de cette thèse (chapitres 2, 3 et 4), des larves de *X. laevis*, aucune autre modification n'a été apportée. Trois heures après avoir introduit les vers *Tubifex tubifex* dans les aquariums, un lot de 15 larves a donc été ajouté dans la colonne d'eau des aquariums. La colonne d'eau n'a pas été renouvelée au cours de l'expérience et les larves ont été nourries quotidiennement. Après douze jours d'exposition, les ponctions cardiaques pour le test MN (10 larves) ainsi que la congélation dans l'azote liquide pour l'analyse génétique par RT-PCR (5 larves), ont donc été réalisées simultanément. La bioaccumulation n'a pas été mesurée dans cette expérience.

*Expérience 3* – Globalement, le protocole utilisé était similaire à celui de l'expérience 2. La principale différence était liée au dimensionnement des aquariums, qui étaient beaucoup

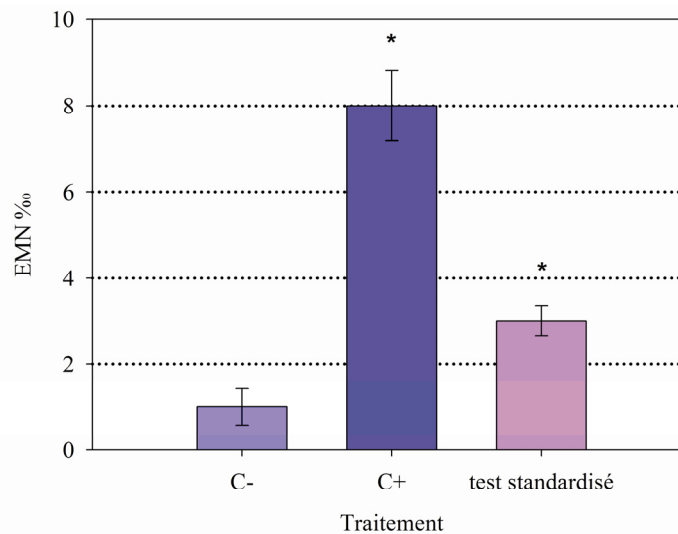
plus larges dans ce cas-là (Tableau 1). En effet, dans l'expérience 2, la colonne d'eau a semblé un peu trop étroite par rapport aux déplacements des larves. Dans ce même souci, le volume d'eau disponible par larve a été multiplié par deux. Pour augmenter le nombre d'individus analysés, le nombre total de larves introduites a été de 32, avec 20 larves pour les MN, 5 larves pour les BM à 24H, et 5 autres larves pour les BM après 12 jours.

## 5.4 RÉSULTATS/DISCUSSION

### 5.4.1 EXPÉRIENCE 1: ESSAI STANDARDISÉ DANS L'EAU

Avec seulement une larve morte au cours du test, le pourcentage de survie dans cette expérience était de 96,7%. La masse moyenne des larves après douze jours était de 494 ( $\pm 201$ ) mg. Concernant ces deux variables, aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence entre les traitements. Ces deux paramètres montrent une bonne tolérance et une bonne croissance des larves dans ces conditions expérimentales.

La concentration moyenne en uranium total dans la colonne a été maintenue à  $18,5 \pm 1,5$   $\mu\text{g U L}^{-1}$  tout au long de l'expérience. A cette concentration, le test micronoyaux s'est révélé positif (Fig. 2). Les résultats concernant la bioaccumulation et les biomarqueurs moléculaires sont présentés avec ceux de l'expérience 3.



**Figure 2 – Test micronoyaux pour une eau à 20 mg U L<sup>-1</sup>: nombre d'érythrocytes micronucléés pour mille (EMN‰) dans le test standardisé comparé au contrôle négatif (C-: eau reconstituée) et à un contrôle positif (C+: cyclophosphamide à 20 mg L<sup>-1</sup>). Médianes  $\pm 1,57\text{EIQ}/\sqrt{n}$ . Un astérisque indique une réponse significative par rapport au contrôle négatif.**

Le test micronoyaux révèle un effet génotoxique chez les larves de *Xenopus laevis* exposées à une eau contaminée à près de 20 mg U L<sup>-1</sup>. Cette concentration étant réaliste pour des milieux d'eau douce impactés par l'activité minière, ce résultat montre donc qu'une telle contamination pourrait affecter ce type d'organismes aquatiques, et ce, malgré le pH et la dureté élevés de l'eau utilisée pour ce bioessai. Sachant que ceci peut être obtenu sous l'effet de la bioturbation des vers *Tubifex tubifex*, ce premier résultat a laissé supposer que les larves pouvaient être affectées de la même façon dans des aquariums contenant du sédiment contaminé colonisé par des vers.

## 5.4.2 EXPÉRIENCE 2: PRÉ-ESSAI AVEC DU SÉDIMENT CONTAMINÉ

### 5.4.2.1 Paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau

Au cours des douze jours d'expérience, la température a été maintenue à  $21,8 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ , la concentration en oxygène dissous à  $7,9 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$  et le pH à  $8,3 \pm 0,2$ . Ces valeurs correspondent à la moyenne de toutes les mesures effectuées pour tous les traitements et tous les temps de mesure. Leur très faible variabilité montre que ces paramètres n'ont pas été modifiés par l'uranium et/ou les organismes, ce qui permet une comparaison raisonnable des traitements.

Par contre, la concentration en uranium total dans la colonne d'eau n'a pas été constante dans le temps, et les traitements avec les vers *Tubifex tubifex*, [U<sub>1</sub>XT] et [U<sub>2</sub>XT], ont montré de la variabilité inter-répliquats (Fig. 3). Comme pour les précédentes expériences présentées dans cette thèse, une nette augmentation de la concentration en uranium a été observée dans les aquariums en l'absence des larves de *Xenopus laevis* [UT], ce qui s'explique par le relargage d'uranium du sédiment vers l'eau, sous l'effet de la bioturbation. De même, dans les aquariums avec seulement les larves de *X. laevis* [UX], la concentration en uranium a peu varié au cours du temps. Lorsque les deux espèces étaient présentes [UXT], on observe une hétérogénéité de l'évolution de la concentration en uranium entre les répliquats. Pour la contamination la plus faible U1, la concentration en uranium a également augmenté au cours du temps, de façon plus ou moins forte, mais plus faiblement que dans le cas des vers seuls. Par contre, pour la contamination U2, ceci n'a été observé que dans un seul répliquat (n°1 dans la Fig. 3B). Dans les deux autres répliquats, une diminution de cette concentration a été mesurée et les valeurs en fin d'expérience étaient comparables à celles des aquariums sans bioturbation [UX].

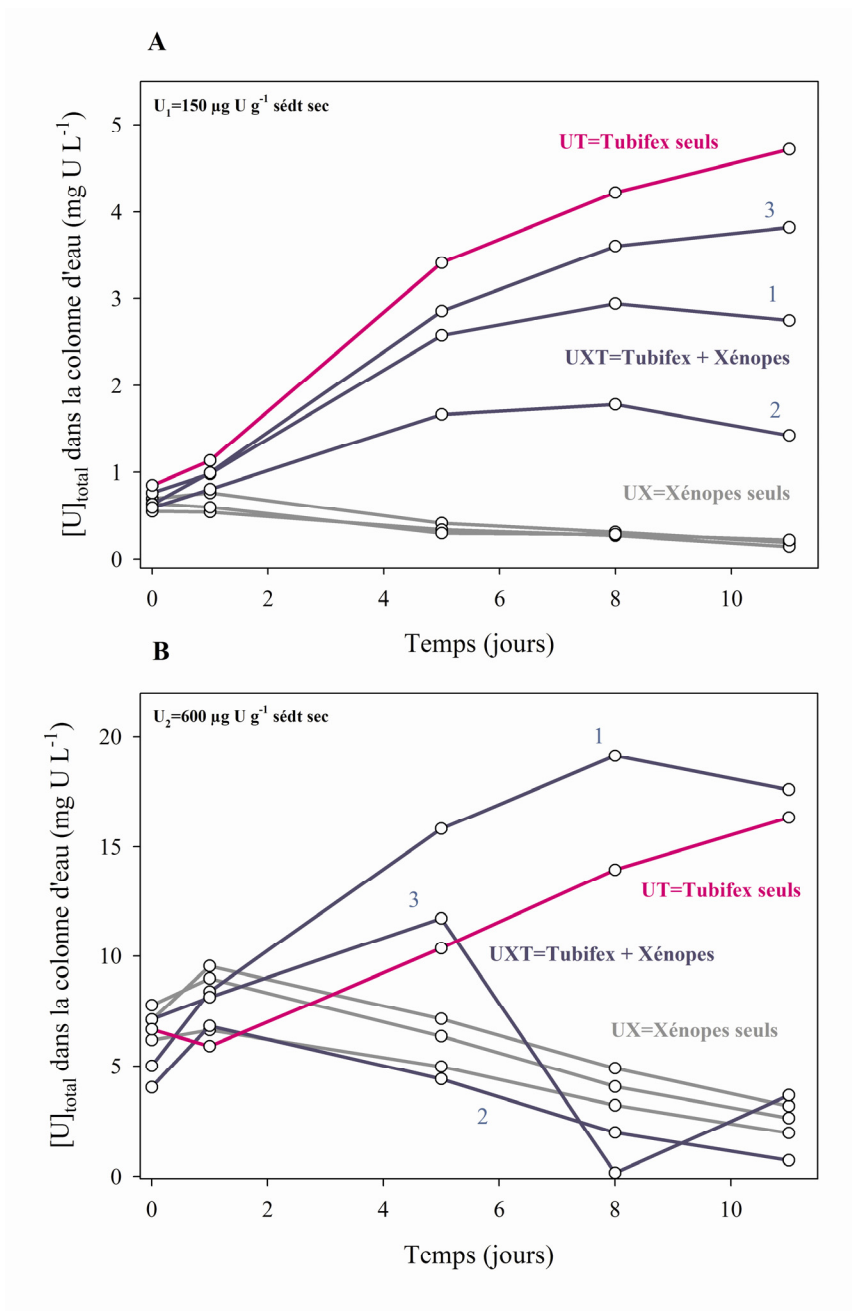


Figure 3 – Evolution de la concentration en uranium total dans la colonne d'eau dans les différents traitements, pour une concentration initiale dans le sédiment de  $150 \mu\text{g U g}^{-1}$  ps (A) et de  $600 \mu\text{g U g}^{-1}$  ps (B). Pour chaque condition, tous les répliquats sont représentés. Les chiffres 1, 2, 3, correspondent aux différents répliquats pour les traitements UXT (ils sont en correspondance avec les autres figures de ce paragraphe).



Ces résultats laissent supposer qu'il existe une interaction entre les larves de *X. laevis* et les vers *T. tubifex*. Deux hypothèses peuvent ainsi être proposées : (i) une partie de l'uranium relargué dans la colonne d'eau a pu être bioaccumulé par les larves de *X. laevis*, ce qui expliquerait des concentrations plus faibles en leur présence, et/ou (ii) les larves de *X. laevis* ont pu modifier le comportement de bioturbation des vers, ce qui aurait diminué leur effet sur le relargage, par exemple en entraînant une pénétration des vers plus en profondeur dans le sédiment. Ces deux hypothèses ne peuvent pas être testées car l'intensité de bioturbation des vers et la bioaccumulation chez les larves n'ont pas été mesurées dans cette expérience. Cependant, au vu des résultats obtenus précédemment (*i.e.* effet sur le bioconvoiage à partir de 600  $\mu\text{g U g}^{-1}$  ps, cf chapitre 3), et en comparant les traitements U1 et U2, on peut supposer que les effets combinés de l'uranium et de la présence de larves dans la colonne d'eau ont effectivement affectés le comportement des vers, excepté pour l'unique répliquat où du relargage a été tout de même observé (n°1 Fig. 3B). Dans ce dernier cas, la suite des mesures va pouvoir apporter des informations.

#### 5.4.2.2 Essai micronoyaux (Fig. 4)

Il est important de noter que le test micronoyaux a mis en évidence une réponse génotoxique chez les larves de Xénope dans les aquariums non contaminés, même si cette induction était très faible. Ceci montre que les conditions expérimentales (sédiment + eau  $\pm$  *Tubifex*) ont entraîné un léger effet génotoxique sur les larves de *Xenopus laevis*. Cependant, les analyses réalisées sur le sédiment et l'eau n'ont montré aucune trace de pollution organique ou métallique, le point de prélèvement ayant notamment été choisi pour sa qualité. Ainsi, on peut supposer que le dispositif expérimental en lui-même n'était pas optimal pour les larves de *X. laevis*. Ceci semble se confirmer avec les mesures de mortalité et de biomasse (voir paragraphes suivants).

Dans les aquariums contaminés sans vers *Tubifex tubifex* (U1X et U2X), le test a révélé une induction de cellules à micronoyaux un peu plus forte, mais de niveau équivalent en terme de médiane pour les deux contaminations (sans effet dose), malgré les fortes différences de concentration en uranium dans l'eau (factor 10 entre U1 et U2 après 12 jours).

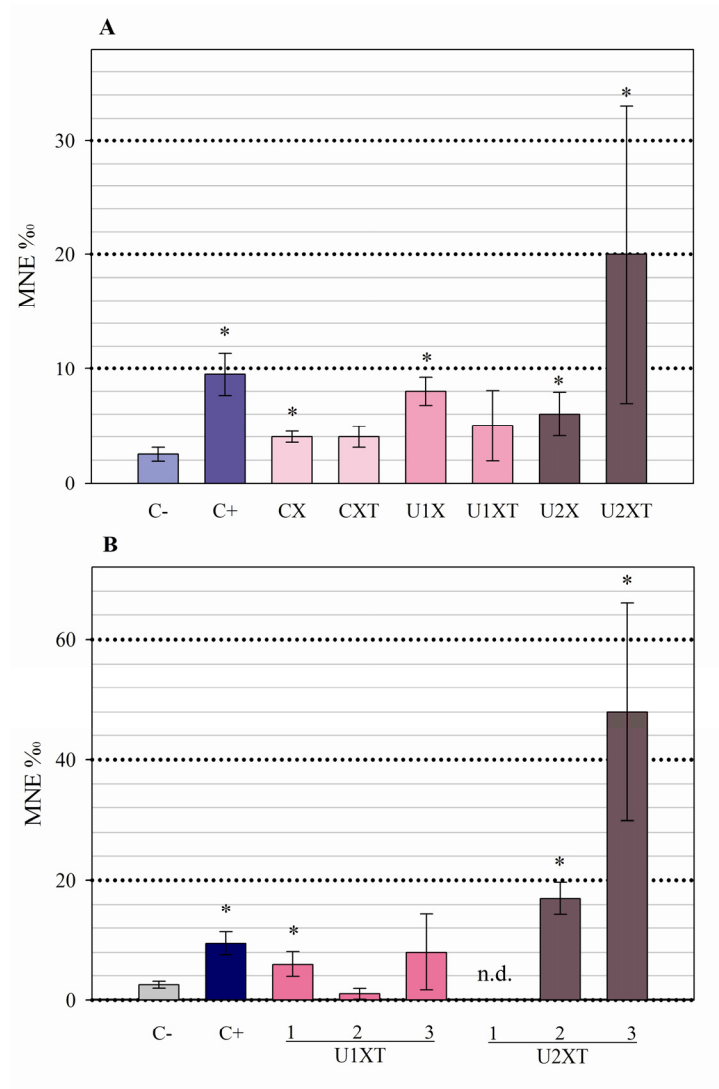


Figure 4 – (A) Test micronoyaux pour les différents traitements: nombre d'érythrocytes micronucléés pour mille (EMN%) comparé à un contrôle négatif (C-: eau reconstituée) et à un contrôle positif (C+: cyclophosphamide à 20 mg L<sup>-1</sup>). Médiane ± 1,57EIQ/√n. (B) Résultats des différents répliquats des traitements UXT. Un astérisque indique une réponse positive par rapport au contrôle négatif. [codes des traitements : C=contrôle, U=contaminé, X=Xénopes, T=Tubifex]

Enfin, dans les aquariums contaminés avec des vers *T. tubifex* (U1XT et U2XT), on retrouve à nouveau une forte hétérogénéité dans les résultats. Au niveau de contamination U1, l'induction de cellules à micronoyaux a été assez faible et n'a été statistiquement confirmée que dans un seul répliquat (n°1). Malgré tout, cette réponse semble en rapport avec le relargage d'uranium observé précédemment (du plus fort au plus faible: répliquats 3, 2 et 1).

Au niveau de contamination U2, l'induction de cellules à micronoyaux a été beaucoup plus forte, en particulier dans le répliquat 3 (Fig. 4B). Dans ce cas-là aussi, la réponse semble être liée à la concentration en uranium dans l'eau (5 fois plus forte dans le répliquat 3 que dans le répliquat 2). Cependant, il reste difficile et imprudent de tirer des conclusions compte-tenu de l'hétérogénéité des résultats et surtout de l'absence d'observation pour le répliquat n°1 où la mortalité a été très élevée et la taille des larves trop faible pour réaliser les ponctions en vue de l'essai micronoyaux (voir paragraphes suivants).

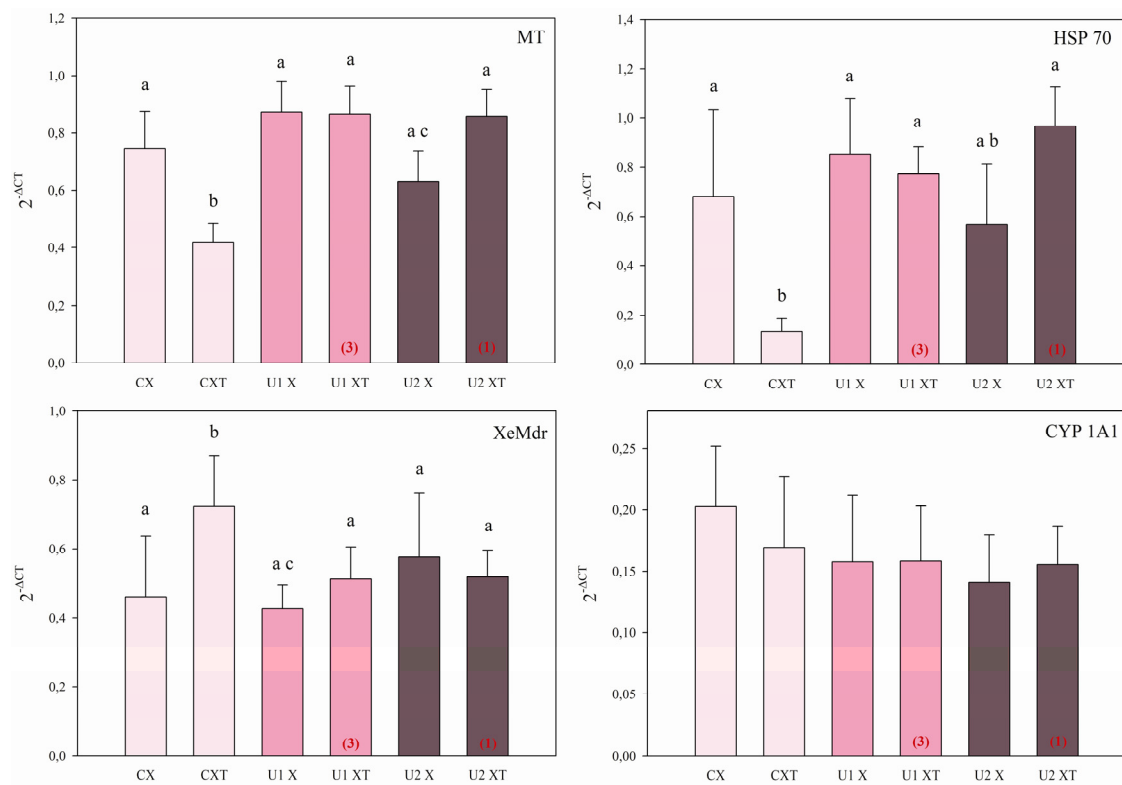
Malgré ces observations, si l'on analyse l'ensemble des résultats obtenus pour les traitements U1 et U2, on ne trouve aucune corrélation significative (corrélations de Pearson :  $P > 0.05$ ,  $R^2 = 0.13$ ) entre la concentration en uranium en fin d'expérience et EMN% évalué à l'aide de l'essai micronoyaux. L'hypothèse de départ suggérant que l'uranium présent dans l'eau affecterait les larves de *X. laevis* semblerait donc en partie vérifiée, mais la relation entre la concentration en uranium dans l'eau et les effets génotoxiques n'est pas linéaire (non concentration-dépendante). Le dispositif expérimental, tout comme la présence de macro-invertébrés bioturbateurs dans le sédiment, influencerait également cette réponse.

#### **5.4.2.3 Analyses des biomarqueurs moléculaires (Fig. 5)**

Seul le traitement CXT (contrôle + *Tubifex tubifex*) a présenté une différence significative avec les autres traitements. Dans ce dernier, les niveaux d'expression des gènes codant pour les MTs et les HSP70 étaient inférieurs à ceux des autres traitements (ANOVA MT:  $F_{5,30} = 15,6$ ,  $P < 0,001$ ; ANOVA HSP:  $F_{5,42} = 9,9$ ,  $P < 0,001$ ), tandis que celui des XeMdr était supérieur (ANOVA XeMdr:  $F_{5,29} = 3,07$ ,  $P = 0,024$ ). Etant donné que l'essai micronoyaux n'a pas montré d'effet génotoxique dans ce traitement, ce résultat semble montrer que les gènes codant pour les MTs et les HSP70 sont surexprimés dans les mêmes conditions que celles entraînant une induction de micronoyaux, tandis que les gènes codant pour les XeMdr seraient réprimés. En d'autres termes la génotoxicité observée par le biais du test

micronoyaux se traduirait également par une modification de l'expression génique de ces trois protéines. En revanche, aucune différence significative n'a été observée pour les gènes codant pour le CYP450-1A1 (ANOVA CYP:  $F_{5,31}=1,52$ ,  $P=0,21$ ).

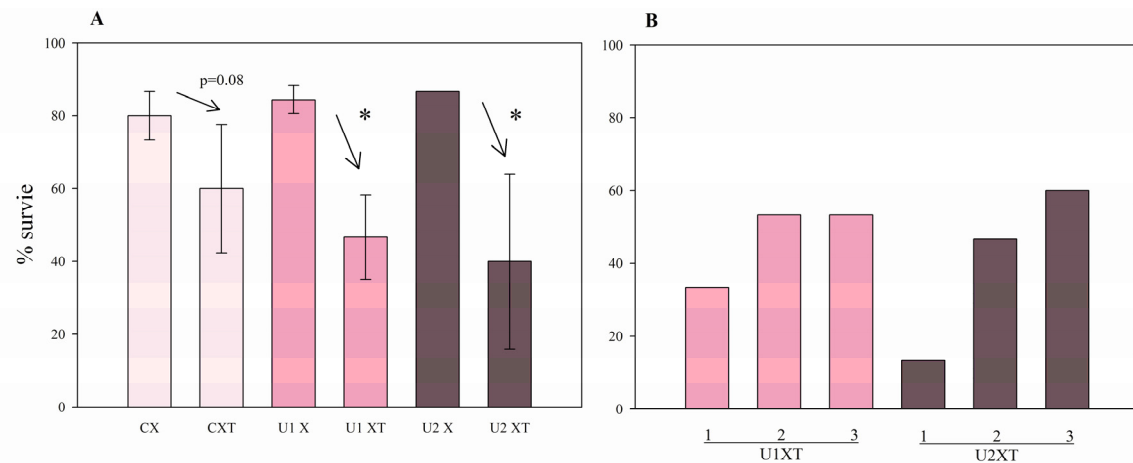
Cependant, il reste difficile de tirer des conclusions quant aux effets de la bioturbation et/ou de l'uranium en raison de la forte variabilité inter-répliquats et de l'absence de mesures pour deux répliquats sur trois dans les traitements [UXT], bien que ce soient les répliquats avec les concentrations en uranium dans la colonne d'eau les plus fortes qui aient été analysés. Par exemple, le seul répliquat ayant induit du relargage au niveau de contamination U2 (répliquat n°1) n'a pas été traité dans le test micronoyaux - car la taille des larves était trop faible - alors qu'il est le seul à avoir été analysé au niveau des marqueurs génétiques.



**Figure 5 – Différence du niveau d'expression génique (ARNm) des 4 protéines (MT, HSP70, XeMdr et CYP 1A1) par rapport à un gène de référence codant une protéine constitutive (ici, Actine), pour les différents traitements. Moyennes  $\pm$  SD. Pour les traitements UXT, le chiffre en rouge indique le numéro du seul répliquat analysé. Des lettres différentes indiquent des différences significatives [codes des traitements : C=contrôle, U=contaminé, X=Xénopes, T=Tubifex].**

#### 5.4.2.4 Mortalité et biomasse

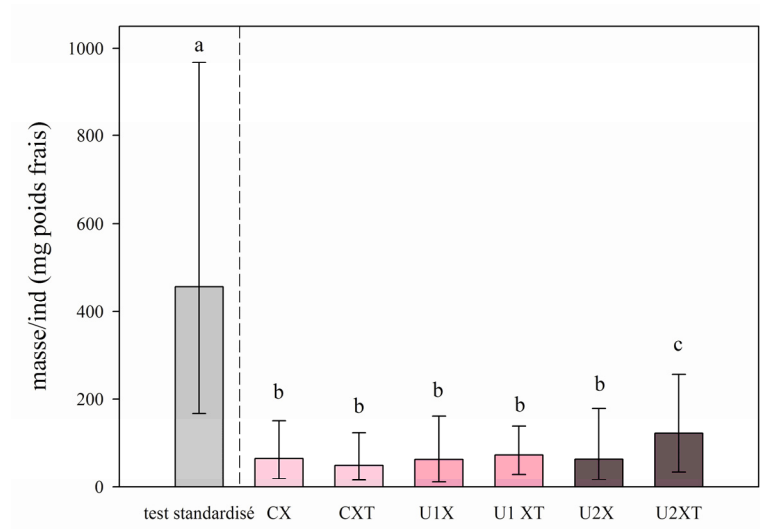
Dans les traitements sans vers *Tubifex tubifex* (CX, U1X, U2X), la mortalité a été de  $16,3 \pm 3,4$  %, alors qu'elle était non significative dans l'essai standardisé de l'expérience 1. La contamination en uranium n'a pas augmenté la mortalité des larves dans ces traitements. Par contre, la présence de vers *T. tubifex* a entraîné une baisse de la survie pour tous les niveaux de contamination, qui est significative pour les traitements contaminés en uranium (t-tests de Student:  $P < 0,05$ ; Fig. 6). Cependant, comme pour les autres paramètres testés dans cette expérience, une forte hétérogénéité inter-répliquats a été observée dans les traitements UXT, ce qui rend toute interprétation difficile (Fig. 6B).



**Figure 6 – (A) Pourcentage de survie des larves de *Xenopus laevis* après douze jours d'exposition dans les différents traitements. Moyennes  $\pm$  SD ( $N=3$ ). Un astérisque indique une diminution significative due à la présence de vers *Tubifex tubifex* pour chaque niveau de contamination. (B) Représentation de ce résultat pour les différents répliquats des traitements UXT. [codes des traitements : C=contrôle, U=contaminé, X=Xénopes, T=Tubifex]**

Au cours de l'expérience et plus particulièrement lors du prélèvement des larves après douze jours d'exposition, les larves ont montré une taille moyenne très inférieure à celle atteinte par les larves au stade 54 de la table de développement de Nieuwkoop & Faber (1956) après 12 jours de croissance. Elles sont également de taille inférieure à celle des larves exposées dans la condition C- (contrôle négatif en eau reconstituée). Les mesures de poids des larves, qui reflètent indirectement l'évolution de leur croissance, ont confirmé ces observations (Fig. 7). Comparativement au test standardisé (expérience 1) où les larves semblaient d'une taille normale, le poids des larves dans cette expérience était

considérablement inférieur, ne représentant que  $13 \pm 2$  % du poids moyen mesuré dans l'expérience 1. Seules les larves du traitement U2XT présentaient un poids légèrement supérieur mais celui-ci ne représentait que 26% de la valeur mesurée dans le test standardisé (Kruskal-Wallis:  $H_{6,149}=58,9$ ,  $P<0,001$ ).



**Figure 7 – Poids frais par larve de *Xenopus laevis* après douze jours d'exposition dans les différents traitements, comparés aux valeurs obtenues dans le test standardisé (expérience 1). Moyennes  $\pm$  min/max. Des lettres différentes indiquent des différences significatives. [codes des traitements : C=contrôle, U=contaminé, X=Xénopes, T=Tubifex]**

#### 5.4.2.5 Synthèse des résultats

Le nombre assez important de larves mortes en fin d'expérience (2 à 13 sur 15) ainsi que la petite taille des individus ont rendu certaines mesures difficiles à réaliser ou à quantifier. Par exemple, la quantité de sang obtenue par ponction cardiaque pour le test micronoyaux a souvent été très faible, ce qui a rendu impossible le dénombrement d'un nombre de cellules suffisant dans l'essai MN ( $<1000$ /individu). De même, le fait de ne pas disposer en fin d'expérience de toutes les larves initialement introduites dans les aquariums, a demandé de faire des choix de priorité pour les analyses, le test micronoyaux ayant été toujours favorisé, car la quantité de matériel nécessaire pour la RT-PCR pouvait plus facilement être diminuée. Ceci explique que certains répliquats n'aient pas été traités dans les analyses de biomarqueurs moléculaires.

L'exemple du répliquat n°1 du traitement [U2XT] est particulièrement illustratif des problèmes rencontrés dans ce travail. Alors qu'il était le seul à présenter un relargage d'uranium vers la colonne d'eau en présence de vers *Tubifex tubifex* – ce qui était le facteur à tester pour répondre à la problématique posée – les larves de cet aquarium ont été uniquement utilisées pour les analyses des biomarqueurs moléculaires. Avec seulement deux larves survivantes dont la taille était très faible, les ponctions cardiaques n'ont pas pu être réalisées, et ces larves ont donc été congelées pour réaliser les RT-PCR. Malgré tout, ce répliquat reste intéressant à prendre en compte. En effet, dans les deux autres répliquats de ce traitement, où la mortalité des larves de *Xenopus laevis* était moins forte, il n'a pas été observé de relargage d'uranium, ce qui laisse supposer un effet des têtards sur le comportement des vers qui serait dépendant de leur densité dans la colonne d'eau. Bien que non vérifiée, cette hypothèse a déjà été formulée par d'autres auteurs (Mermillod-Blondin et al. 2004). La présence d'autres organismes prédateurs ou compétiteurs, à la surface du sédiment ou dans la colonne d'eau pourrait augmenter le comportement de creusement des vers, qui vivent normalement à l'interface eau/sédiment, la tête vers le bas, et la partie postérieure libre dans la colonne d'eau. Si les vers s'enfoncent complètement dans le sédiment, le relargage des métaux lié à la remontée des particules *via* le tractus digestif serait ainsi limité.

Ces difficultés expérimentales ont conduit à une forte hétérogénéité des résultats de génotoxicité qui rend leur interprétation délicate. Avec une réponse génotoxique mise en évidence à l'aide de l'essai MN chez les larves présentes dans les aquariums non contaminés, il n'a pas été possible de comparer les résultats pour estimer les effets de la bioturbation et/ou de l'uranium. Ceci montre notamment que le dispositif expérimental en lui-même a entraîné un effet négatif chez les larves de *X. laevis*.

Toutefois, ce travail a permis de dégager quelques tendances, notamment sur l'expression génique des MTs, des HSP70 et des XeMdr, et sur les interactions susceptibles d'exister entre les larves de *X. laevis* et les vers *T. tubifex*. Le fait le plus marquant étant que le relargage d'uranium lié à la bioturbation, qui avait été observé de façon constante dans le reste de ce travail de thèse, puisse être inhibé lorsqu'on ajoute une nouvelle composante biologique au système. Il reste cependant à vérifier que cette différence de concentration en uranium dans la colonne d'eau ne s'explique pas par de la bioadsorption et/ou de la bioaccumulation sur les larves de *X. laevis*.

Afin de préciser ces résultats, il a donc été décidé de mener une deuxième expérience en essayant d'améliorer le protocole utilisé, par une augmentation du volume d'eau et de l'espace disponible pour les larves ainsi que des effectifs à analyser pour chaque paramètre. Par contre, un seul niveau de contamination a été retenu, à savoir le plus fort (U2) pour avoir une concentration dans la colonne d'eau relativement élevée. Etant donné que les calculs statistiques n'ont pas montré de corrélation entre la concentration en uranium dans l'eau et les différents paramètres testés, une mesure de la bioaccumulation a également été envisagée.

### 5.4.3 EXPÉRIENCE 3 : SECOND ESSAI AVEC DU SÉDIMENT CONTAMINÉ

#### 5.4.3.1 Paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau

Comme dans l'expérience 2, la température ( $21,3 \pm 0,2^\circ\text{C}$ ), la concentration en oxygène dissous ( $8,1 \pm 0,9$ ) et le pH ( $8,4 \pm 0,1$ ) sont restés stables au cours du temps et ne présentaient pas de différence entre les traitements.

Les résultats obtenus précédemment pour la concentration en uranium total dans la colonne d'eau se sont confirmés (Fig. 8). Comme toujours, les vers *Tubifex tubifex* seuls ont entraîné un relargage d'uranium du sédiment vers la colonne d'eau. En leur absence, la concentration en uranium est restée stable au cours du temps. Par contre, lorsque les deux espèces étaient associées, le relargage d'uranium a été annulé. On peut même observer une diminution de la concentration en uranium dans le temps, potentiellement liée à la bioaccumulation et/ou à la bioadsorption des larves de *Xenopus laevis*.

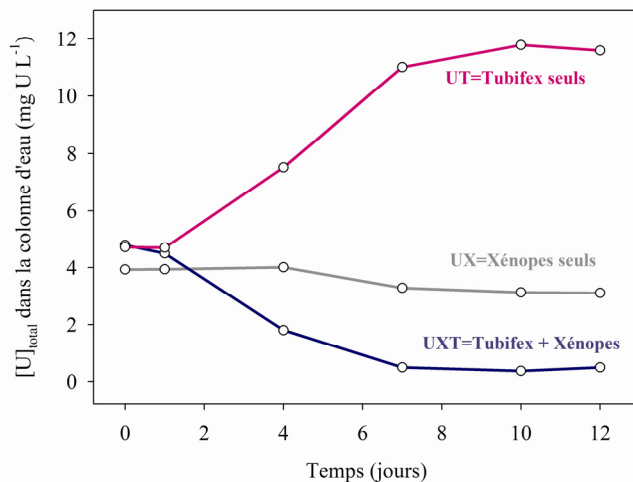


Figure 8 – Evolution de la concentration en uranium total dans la colonne d'eau pour les différents traitements, pour une concentration initiale dans le sédiment de  $600 \mu\text{g U g}^{-1} \text{ ps}$ .



Comme cela avait été suggéré avec les résultats de l'expérience 2, cette absence de relargage d'uranium pourrait s'expliquer par un changement du comportement de bioturbation des vers *T. tubifex* lorsque des organismes sont présents dans la colonne d'eau. De nombreux travaux ont décrit le mécanisme de bioconvoyage des particules exercé par ces vers vivant orientés verticalement dans le sédiment avec la tête en profondeur et la partie postérieure libre dans la colonne d'eau (e.g. Palmer 1968, Robbins et al. 1979). Ces auteurs ont également montré que ces vers pouvaient s'enfoncer plus ou moins profondément dans le sédiment selon le niveau d'oxygénation de la colonne d'eau pour adapter leur mécanisme respiratoire aux conditions environnantes. Leur distribution dans le sédiment peut également varier par compétition spatiale avec d'autres espèces de Tubificidae (Mermillod-Blondin et al. 2003). Comme suggéré par Mermillod-Blondin et al. (2004), la prédation d'organismes épibenthiques ou pélagiques pourrait également entraîner de tels effets. Ces auteurs ont testé les effets d'un prédateur, le gammare épibenthique (*Gammarus pulex*) sur la bioturbation de *T. tubifex* mais n'ont pas mesuré d'effet significatif, suggérant que la granulométrie grossière du sédiment utilisé dans leur expérience avait permis aux vers de trouver aisément des niches en subsurface pour se protéger des crustacés remuant la surface du sédiment, sans que cela ne modifie les mesures de remaniement particulière.

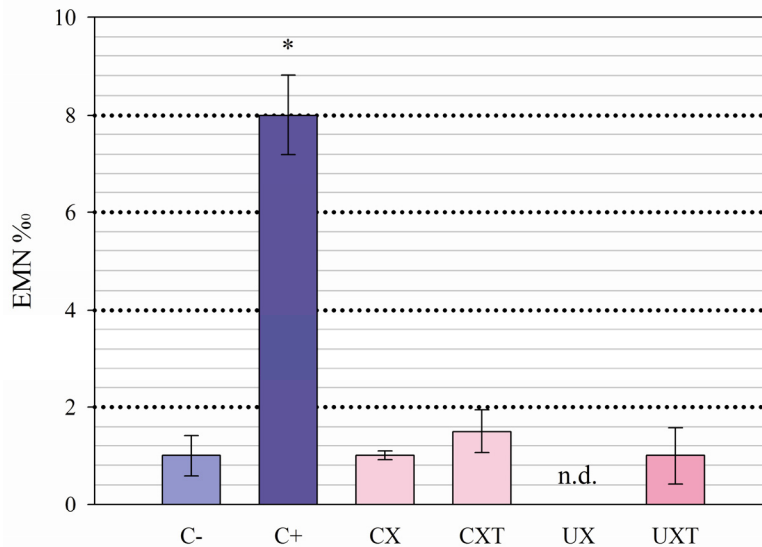
Cependant, il a été très facilement observable au cours des expériences réalisées dans cette thèse, notamment pour simplement récupérer des vers dans un aquarium, que leur réaction est très vive lorsqu'un objet comme une pipette ou une pince arrive près du sédiment. Dans nos aquariums, qui étaient bien oxygénés, les vers pouvaient avoir jusqu'à 1 à 2 cm de leur corps en dehors du sédiment en train d'onduler dans la colonne d'eau. Dès qu'on approchait un objet de la surface du sédiment, les vers se rétractaient dans leur tube, rendant leur capture impossible. Inversement, dès que l'objet était retiré, les vers ressortaient de leur tube. Au vu de ces observations, la présence de larves de *X. laevis* a indubitablement joué sur le comportement des *T. tubifex* modifiant ainsi les échanges d'uranium à l'interface eau/sédiment.

A côté de ces effets physiques, on peut également suggérer l'action de mécanismes de reconnaissance chimiques (e.g. kairomones) comme cela a été observé chez une autre espèce de macro-invertébré bioturbateur, la larve de *Chironomus riparius* (Diptera) exposée à la présence de poissons prédateurs (*Rutilus rutilus*, Gardon) dans la colonne d'eau (Hölker & Stief 2005). Dans cette expérience, l'activité de creusement de terriers par les larves, relative à

une réaction d'évitement et de protection, a été augmentée de façon proportionnelle à la densité de poissons.

#### 5.4.3.2 Essai micronoyaux

Aucun traitement n'a induit une réponse génotoxique chez les larves de *Xenopus laevis* (Fig. 9). Contrairement à l'expérience 2, aucun effet génotoxique n'a été induit par les conditions expérimentales puisque les larves des aquariums non contaminés n'avaient pas une valeur médiane significative d'érythrocytes micronucléés par rapport au contrôle négatif. De plus dans ces conditions contrôles, on ne met pas en évidence d'effet génotoxique de la bioturbation. Ceci semble se vérifier dans les aquariums contaminés, mais ne peut être confirmé car le traitement sans bioturbation n'a pas pu être analysé en raison de la petite taille des larves.



**Figure 9 – Test micronoyaux pour les différents traitements: nombre d'érythrocytes micronucléés pour mille (EMN‰) comparé à un contrôle négatif (C-: eau reconstituée) et à un contrôle positif (C+: cyclophosphamide, 20 mg L<sup>-1</sup>). Médianes ± 1,57EIQ/√n. Un astérisque indique une réponse positive par rapport au contrôle négatif. [codes: C=contrôle, U=contaminé, X=Xénopes, T=Tubifex]**

#### 5.4.3.3 Analyses des biomarqueurs moléculaires

Malgré une forte variabilité inter-individuelle pour le traitement [UX], les analyses statistiques montrent que seul ce traitement a présenté une différence significative de l'expression génique des quatre protéines par rapport aux autres traitements (Fig. 10).

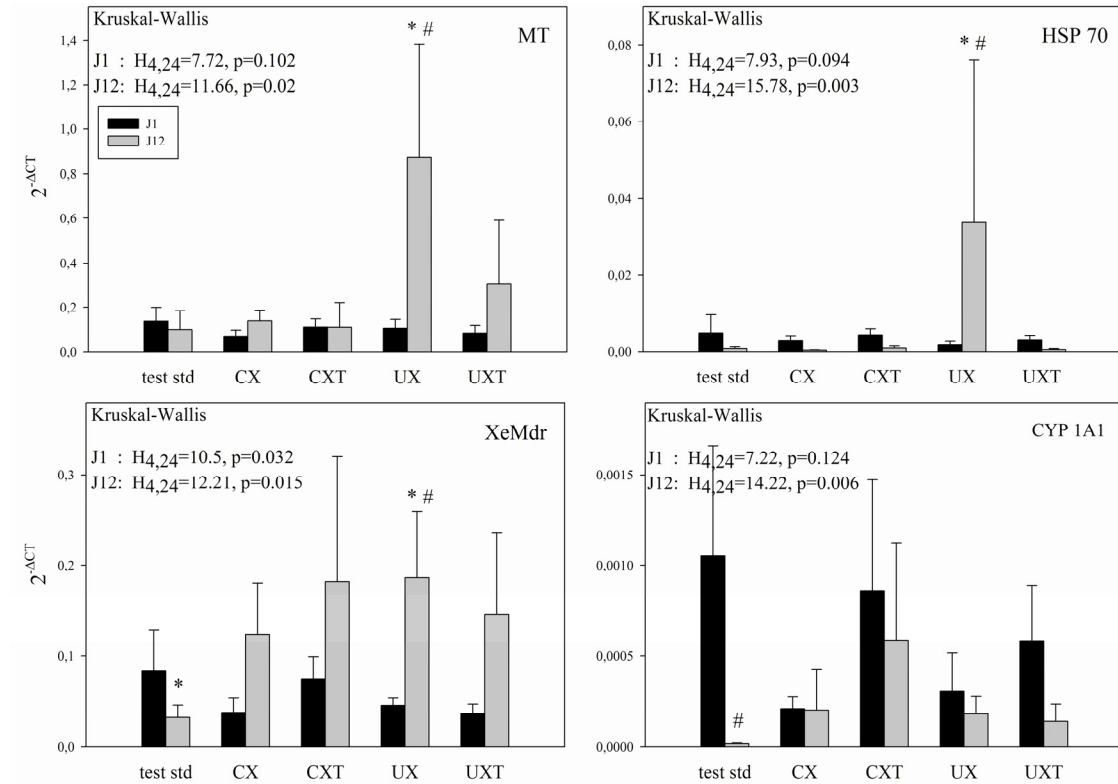
Comme dans l'expérience 2, l'expression des gènes des MTs, des HSP70 et des XeMdr a été modifiée, avec comme précédemment, une surexpression des gènes des MTs et des HSP70, mais aussi des gènes des XeMdr qui eux, étaient plutôt réprimés dans l'expérience 2. Comme indiqué en annexe, ces protéines sont connues pour être induites lors d'exposition à des substances toxiques, y compris à des métaux lourds. Cette induction se traduit par une surexpression des gènes codant ces protéines. Les MTs et les HSP70 permettent de protéger les cellules contre les effets des métaux, et les transporteurs multi-drogues de type XeMdr permettent le pompage de ces éléments vers le milieu extra-cellulaire. Par contre, les gènes codant pour le cytochrome CYP450-1A1 ne sont ni surexprimés, ni réprimés, ce qui laisse supposer une induction nulle de l'uranium sur ce biomarqueur. Ceci peut s'expliquer par le fait que la principale fonction de la protéine CYP450 est d'oxyder des composés aromatiques ou cycliques comme les hydrocarbures, et que son action sur les métaux lourds est plus limitée, de même que son induction par ces éléments.

Cependant, contrairement à l'expérience 2, il n'est pas possible ici de relier l'effet obtenu sur les gènes (niveaux d'expression) à celui de l'induction de micronoyaux car le traitement [UX] n'a pas pu être analysé. Par contre, il est intéressant de noter que la survie et la croissance des larves étaient significativement plus faibles dans ce traitement, ce qui laisse suggérer une induction de ces gènes chez les larves capables de survivre aux conditions d'exposition (voir paragraphe suivant). Ceci illustre le paradoxe souvent évoqué par les écotoxicologues pour expliquer l'induction de ce type de gène. La surexpression de HSP70, par exemple, peut être interprétée comme une réponse adaptative de la cellule ou bien comme une réponse pathologique : l'expression de ces protéines chaperonnes est souvent proportionnelle aux dommages protéiques dans la cellule, mais elle permet également une récupération plus efficace de ces dommages (Wirth et al. 2004).

On peut également noter que la réponse de ces gènes n'a été significative pour le traitement [UX] qu'après un certain temps d'exposition (> 24h) puisqu'aucune différence n'a été mise en évidence après 24H.

Pour les marqueurs XeMdr et CYP450-1A1, la variabilité inter-individuelle a été élevée (voir les écart-types, Fig. 10) et empêche de mettre en évidence des effets statistiquement significatifs. Graphiquement, dans la plupart des traitements, la tendance montre cependant que l'expression des gènes XeMdr augmenterait au cours du temps, tandis que celle des gènes CYP450-1A1 diminuerait. Pour ces derniers, si une surexpression ou une répression peuvent

être induite par les conditions d'exposition, la réponse doit probablement se faire de façon précoce, comme cela apparaît de façon significative dans le test standardisé de l'expérience 1. Parmi les nombreux facteurs pouvant réguler l'expression des gènes codant pour les cytochromes, les facteurs endogènes relatifs au stade de développement peuvent être importants et pourraient expliquer ces résultats (cf annexe).



**Figure 10 – Différence du niveau d'expression génique (ARNm) des 4 protéines (MT, HSP70, XeMdr et CYP 1A1) par rapport à un gène constitutif de référence (ici, GADPH), pour les différents traitements, après 24H (J1) et après douze jours (J12) d'exposition. Les résultats du test standardisé (expérience 1) sont également représentés (test std). Moyennes  $\pm$  SD. Un astérisque indique une différence significative entre les traitements pour un temps donné (Kruskal-Wallis:  $P < 0,05$ ). Un dièse indique une différence significative entre J1 et J12 dans un même traitement (U-test de Mann-Whitney:  $P < 0,05$ ). [codes: C=contrôle, U=contaminé, X=Xénopes, T=Tubifex].**

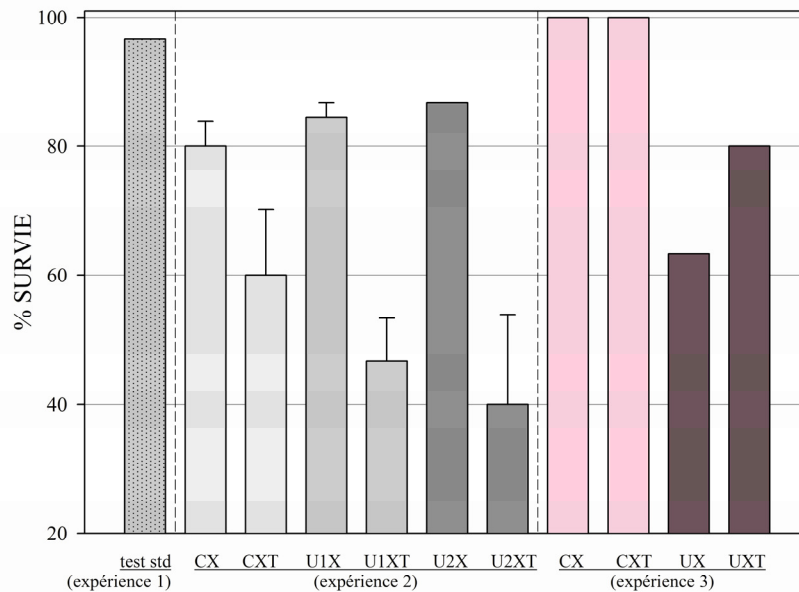
#### 5.4.3.4 Mortalité et biomasse

Les mesures du taux de survie et de la masse des larves après douze jours d'exposition indiquent que le nouveau dispositif expérimental a été plus adéquat (Fig. 11 et 12).

Toutes les larves ont survécu dans les aquariums contrôles, ce qui montre que les changements appliqués au protocole expérimental ont été favorables. De plus, la survie n'est

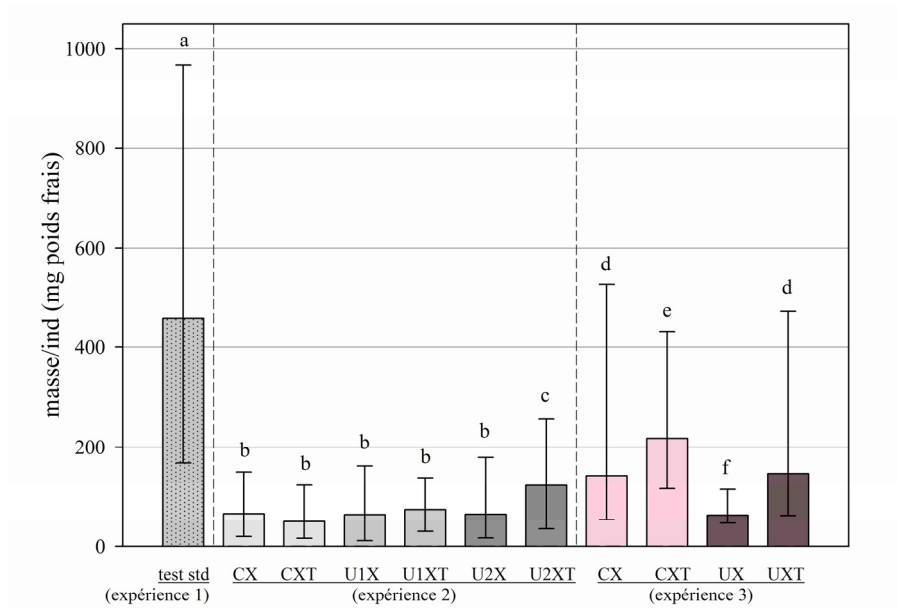
pas affectée par la présence des vers *Tubifex tubifex*, ce qui est en accord avec les résultats du test micronoyaux. En dehors de toute contamination, la bioturbation, n'a donc pas d'effet négatif sur les larves, du moins pas pour les paramètres observés dans cette étude.

Dans les aquariums contaminés, le taux de survie est diminué de 20 à 35 % mais reste supérieur aux traitements bioturbés dans l'expérience 2. Dans ce cas-là, la présence de vers *Tubifex tubifex*, semble avoir été favorable aux larves.



**Figure 11 - Pourcentage de survie des larves de *Xenopus laevis* après douze jours d'exposition pour les différents traitements dans l'expérience 3, en comparaison avec les valeurs obtenues dans les deux autres expériences. [codes : C=contrôle, U=contaminé, X=Xénopes, T=Tubifex]**

La même tendance a été observée pour la masse des larves. Bien que cela soit encore resté inférieur au test standardisé (expérience 1), la croissance des larves semble avoir été significativement favorisée en relation avec les nouvelles conditions expérimentales (ANOVA:  $F_{10,201}=31,47$ ,  $P<0,001$ ) et la bioturbation. Comme la survie, la croissance a également été affectée par l'uranium, mais de façon limitée en présence des vers *T. tubifex*. On peut supposer que la bioturbation entraîne un apport supplémentaire de matière organique dans la colonne d'eau par remise en suspension des particules de sédiment, qui serait favorable à une meilleure prise de poids des larves et ainsi à une meilleure survie. Il a été en effet observé une plus forte turbidité de l'eau dans les aquariums bioturbés (non quantifié).



**Figure 12 – Poids frais par larve de *Xenopus laevis* après douze jours d'exposition dans les différents traitements, comparés aux valeurs obtenues dans les deux autres expériences. Moyennes ± min/max. Des lettres différentes indiquent des différences significatives. [codes : C=contrôle, U=contaminé, X=Xénopes, T=Tubifex]**

#### 5.4.3.5 Bioaccumulation

Selon les traitements ([UX] et [UXT]) et les expériences (1 et 3), les concentrations tissulaires en uranium dans les larves entières ont été très variables: de 0,163 mg U kg<sup>-1</sup> dans le traitement [UXT] après 12 jours à 81 300 mg U kg<sup>-1</sup> dans le test standardisé après 24H (Tableau 3). Ces valeurs ne sont pas proportionnelles aux concentrations en uranium dans la colonne d'eau, ce qui montre que d'autres critères doivent être pris en compte pour expliquer la bioaccumulation de l'uranium, d'autant plus que les systèmes d'exposition et les stades de développement sont différents entre l'expérience 1, l'expérience 3, et l'expérience de Mitchell et al. (2005). Pour comparer ces résultats, il est intéressant de calculer le facteur de bioconcentration (BCF) qui, lorsqu'il est supérieur à 1, indique que l'organisme bioconcentre la substance mesurée. Ceci a été uniquement le cas dans le test standardisé avec de l'eau maintenue à 20 mg L<sup>-1</sup> pendant 12 jours, avec un BCF très élevé après 24H (×4450). Ceci peut expliquer la réponse significative de l'essai micronoyaux après 12 jours et la

**Tableau 3 – Bioaccumulation d'uranium dans les tissus des larves de *Xenopus laevis* dans les expériences 1 et 3, en comparaison avec les résultats de Mitchell et al. (2005). BCF= [U]bioaccumulé/[U]eau (facteur de bioconcentration).**

	Temps d'exposition	Stade larvaire	[U] bioaccumulé mg kg <sup>-1</sup>	[U]eau lors du prélèvement mg L <sup>-1</sup>	BCF
<b>Test sédiment (exp3)</b>					
<b>UX</b>	12 jours	54	<0,171	3,110	<0,05
<b>UXT</b>	12 jours	54	0,163 (±0,09)	0,489	0,33
<b>Test standard (exp1)</b>					
<b>J1</b>	24H	50	81300 (±3860)	18,27	4450
<b>J12</b>	12 jours	54	36,7 (±3,8)	16,16	2,27
<b>Mitchell et al. (2005)</b>					
	64 jours	66	0,98 (±0,38)	13,09	0,07
			1,12 (±0,14)	24,04	0,04
			2,82 (±0,57)	54,27	0,05

surexpression des gènes CYP1A1 après 24H, et donc un effet génotoxique de l'uranium dans ce système d'exposition.

Cependant, le BCF était encore supérieur à 1 après 12 jours sans que l'expression génique d'aucune protéine ne soit induite. Pour expliquer la forte différence de bioaccumulation après 24H (81300 mg U kg<sup>-1</sup>) et après 12 jours (36,7 mg U kg<sup>-1</sup>), deux hypothèses peuvent être formulées : (i) au cours des douze jours d'exposition, malgré le renouvellement du volume d'eau et l'élimination des fèces et des paillettes de nourriture en excès, la matière organique a pu avoir tendance à s'accumuler et ainsi diminuer la biodisponibilité de l'uranium par adsorption, (ii) les larves de *X. laevis* ont pu également mettre en place des processus de détoxification efficaces au cours du temps par acclimatation aux conditions d'exposition.

Dans le test avec du sédiment (expérience 3), tout comme dans le test de Mitchell et al. (2005), le BCF est inférieur à 1, ce qui indique que les larves n'ont pas bioconcentré l'uranium. Cependant, des effets ont été observés dans la présente étude, sur la survie, la croissance ou l'expression génique des MTs, des HSP70 et des XeMdr. De même, Mitchell et al. (2005) ont montré des retards de la métamorphose à ces niveaux de contamination.

#### 5.4.3.6 Synthèse des résultats

L'objectif d'amélioration du dispositif expérimental a été partiellement atteint. En effet, avec 100% de survie des larves, une augmentation de poids, une absence de

génétoxicité en termes d'induction de MN et aucune différence pour les biomarqueurs moléculaires, les aquariums contrôles ont constitué un système de référence pour estimer les effets de la bioturbation et/ou de l'uranium.

Cette expérience a également permis de confirmer que le relargage d'uranium sous l'effet de la bioturbation ne pouvait pas être observé en présence de larves de *Xenopus laevis* dans la colonne d'eau, mettant en évidence l'existence d'une influence des larves sur le comportement des vers *Tubifex tubifex*.

Parmi les effets observés de l'uranium dans cette expérience, on notera : une diminution de la survie, une croissance plus faible, la surexpression des gènes MTs, HSP70 et XeMdr, mais pas de bioconcentration, ni d'induction de cellules à micronoyaux – bien qu'il manque la mesure de [UX] pour totalement valider ce résultat.

Ceci s'oppose à ce qui a été observé dans le test standardisé dans de l'eau, où les larves ont bioconcentré l'uranium qui a induit des effets génotoxiques (e.g. micronoyaux, surexpression de CYP1A1 après 24H) mais pas d'effet sur la toxicité aiguë (mortalité ou croissance). Ceci montre qu'il n'est donc pas possible de comparer objectivement ces deux modes d'exposition, l'uranium associé au sédiment ou libre dans l'eau ne présentant pas la même biodisponibilité, et que le dispositif expérimental de type microcosme 'sédiment+eau' doit être encore optimisé.

De façon plus surprenante, les effets de la bioturbation, indépendamment de l'uranium, ont été positifs sur la survie et la croissance des larves, probablement par une augmentation de la disponibilité en matière organique dans la colonne d'eau. De même, la bioturbation ne semble pas impliquée dans les réponses génétiques (micronoyaux ou biomarqueurs moléculaires).

Enfin, le cas du traitement [UX] doit être discuté séparément. En effet, dans cet aquarium, où la mortalité était la plus forte (37%), et la biomasse la plus faible, une forte surexpression des gènes MTs et HSP70 a été mesurée après 12 jours. Sans la réponse du test micronoyaux, il est difficile de conclure à un effet génotoxique de l'uranium. Cependant, la très faible bioaccumulation (sous le seuil de détection) semble indiquer que les larves survivantes après 12 jours, sur lesquelles ont été mesurés l'ensemble des paramètres, seraient en fait les larves ayant mis en place des mécanismes de détoxification physiologique



efficaces, ce qui expliquerait la surexpression des gènes MTs et HSP70. Ne bénéficiant pas de l'effet positif de la bioturbation observé dans le traitement [UXT], les larves seraient restées tout de même plus petites. Ceci reste seulement une hypothèse et d'autres mesures seraient nécessaires pour la vérifier, notamment l'essai micronoyaux.

## **5.5 CONCLUSION**

A notre connaissance, ce travail a permis de tester pour la première fois les effets de l'uranium initialement présent dans le sédiment chez un organisme de la colonne d'eau, en présence ou non de macro-invertébrés bioturbateurs. Alors qu'une hypothèse simple avait été formulée – l'uranium relargué d'un sédiment contaminé par bioturbation peut affecter les organismes pélagiques, les expériences menées pour tenter de la vérifier ont montré de façon surprenante que ce relargage ne se faisait pas forcément lorsque des organismes étaient présents dans la colonne d'eau. Les interactions (*e.g.* prédation, compétition) entre organismes benthiques et pélagiques s'avèrent donc plus complexes qu'il n'y paraissait au départ.

Bien que nettement amélioré, le dispositif expérimental utilisé pour étudier ce système relativement complexe, mérite encore d'être optimisé. Pour cela, il serait pertinent de mener différents tests pour déterminer les conditions optimales au bon développement des larves dans de tels aquariums : *e.g.* apport de nourriture (quantité, qualité, périodicité), rapport eau/sédiment (hauteur, volume), renouvellement de l'eau, stades larvaires à introduire, durée de l'exposition.

Les résultats présentés ici sont des résultats préliminaires qui sont difficiles à interpréter pour répondre à la problématique de la toxicité de l'uranium associé au sédiment. De plus, ils sont représentatifs de certaines conditions physico-chimiques et ne permettent pas d'être extrapolés à d'autres systèmes. Cependant, ils soulèvent des questions fondamentales pour expliquer la toxicité de l'uranium et sa redistribution dans un écosystème relativement complexe. Il serait donc pertinent de réaliser en amont d'expériences de type microcosmes (eau + sédiment + macro-invertébrés bioturbateurs), une série d'essais micronoyaux et d'analyse de gènes choisis ici, dans des conditions d'exposition plus simples (eau), sur une gamme assez large de concentrations en uranium et en faisant varier certains paramètres-clé

contrôlant la biodisponibilité de l'uranium (*e.g.* dureté, alcalinité, pH). Avec une meilleure connaissance des effets effectivement induits par l'uranium chez les larves de *Xenopus laevis*, l'interprétation des résultats obtenus dans des expériences plus complexes serait ainsi facilitée.

Pour estimer les effets des larves de *X. laevis*, ou d'une autre espèce d'organisme pélagique, sur les macro-invertébrés benthiques, il serait également pertinent de mesurer l'intensité de bioturbation à l'aide de traceurs (particulaires ou solubles) ou de systèmes d'imagerie (*e.g.* scans, photographie du bord des aquariums), comme cela été fait dans cette thèse (cf chapitre 3). Inversement, il est nécessaire d'apporter des informations complémentaires pour expliquer l'influence de la bioturbation chez les larves de *X. laevis*, en dehors de toute contamination (*e.g.* mesures dans la colonne d'eau : turbidité, teneur en matière organique, kairomones).

Même si cela n'a pas été observé dans ce dispositif expérimental (système fermé), et avec cette combinaison d'espèces (*X. laevis*, *T. tubifex*), le relargage de contaminants accumulés dans le sédiment par bioturbation, entraînant un effet négatif chez les organismes de la colonne d'eau, a déjà été montré en laboratoire avec des organismes épibenthiques par exemple (Ciutat et al. 2007), et ne doit donc pas être négligé.



**CONCLUSION GÉNÉRALE**



L'objectif principal de cette thèse visait à évaluer l'influence de la bioturbation des larves de *Chironomus riparius* et des vers *Tubifex tubifex* sur le comportement biogéochimique de l'uranium en se plaçant dans un système expérimental donné. Après des bioessais d'écotoxicologie réalisés sur ces deux espèces, (chapitre 3), il a été possible de choisir, pour le reste de l'étude, des concentrations en uranium pour contaminer le sédiment, qui étaient sub-létales pour ces organismes et pour lesquelles l'activité de bioturbation restait suffisante pour entraîner des effets sur la biogéochimie du sédiment. Il est à souligner que les deux espèces de macro-invertébrés étudiées ont démontré une certaine tolérance à l'uranium. Bien que ces espèces soient connues pour être peu sensibles aux polluants, ces résultats doivent cependant être interprétés avec précaution car ils sont relatifs à des conditions expérimentales données (e.g. sédiment et eau d'origine naturelle, pH et dureté de l'eau élevés) et sont difficilement comparables aux quelques données existant dans la littérature. En effet, des effets négatifs de l'uranium sur les macro-invertébrés benthiques ont été détectés pour des concentrations beaucoup plus faibles que celles qui ont été testées dans ce travail, lors de bioessais utilisant des sédiments artificiels (Environnement Canada 2003, Dias et al. 2008).

Par la suite, il est apparu particulièrement intéressant d'analyser comment ces organismes pouvaient modifier leur habitat dans des conditions de contamination relativement élevées (> 100 fois le bruit de fond géochimique naturel). De plus, ces concentrations (150 à 600  $\mu\text{g U g}^{-1}$  sédiment sec) étant représentatives de ce qu'il est possible d'observer dans des sites naturels impactés par l'exploitation minière de l'uranium (e.g. IRSN 2007, Lottermoser et al. 2005, Lozano et al. 2002, Neame et al. 1982), les résultats obtenus au cours de ce travail peuvent être, dans une certaine mesure, transposables à ces milieux. Malgré l'utilisation d'un système expérimental simplifié (de type microcosmes) par rapport à l'environnement naturel, il a été démontré que des 'ingénieurs écologiques' comme les larves de *C. riparius* et les vers *T. tubifex* pouvaient avoir une influence significative sur les propriétés biogéochimiques de leur écosystème et plus particulièrement sur le comportement de l'uranium.

L'ensemble des résultats obtenus montrent que ce sont les vers *T. tubifex* qui exercent la plus grande influence sur leur habitat, y compris dans le cas où celui-ci est contaminé. Les larves de *C. riparius* occupent une très fine couche à la surface du sédiment (<1 cm) et ont une influence plus limitée. Leur activité de bioturbation se partage, de façon équivalente dans cette étude, entre le broutage du biofilm à la surface du sédiment, l'ingestion/ingestion de particules sédimentaires (*deposit-feeding*) et la construction aléatoire et temporaire de terriers dans lesquels est créée une circulation d'eau (chapitre 3). Il en résulte des phénomènes

d'enfoncement et de remise en suspension des particules de sédiment, qui stimulent les processus microbiens de décomposition de la matière organique, comme cela a été montré à partir des mesures de flux d'oxygène dissous à l'interface eau/sédiment (chapitre 4) et qui est en accord avec les données existant dans la littérature concernant cette espèce (De Haas et al. 2005, Stief 2007, Stief et al. 2005, Stief & De Beer 2006). Cependant, par rapport à *T. tubifex*, *C. riparius* s'est montré relativement plus sensible à l'uranium et son activité de bioturbation a été affectée à partir de la concentration en uranium la plus faible testée ( $150 \mu\text{g U g}^{-1}$  sédiment sec). La bioturbation de cette espèce n'a pas eu d'effet visible sur la répartition de l'uranium : la concentration dans la colonne d'eau est en effet restée stable au cours du temps, comme dans les aquariums sans organisme. De même, la présence des larves n'a pas augmenté la consommation d'oxygène au sein du sédiment (flux d'oxygène entrant à l'interface eau/sédiment) comme cela avait été observé sans uranium (chapitre 4). Enfin, il est important de noter que lorsque les deux espèces sont associées, que ce soit dans du sédiment contaminé ou non, les larves de *C. riparius* ont une influence sur la distribution des vers *T. tubifex*. Par compétition spatiale avec les larves de *C. riparius*, ces derniers se dispersent plus dans la colonne sédimentaire, ce qui se traduit par une légère augmentation de l'intensité de leur bioturbation (chapitre 3).

La bioturbation de ces vers, qui peuvent occuper toute la colonne sédimentaire (10 cm dans cette étude), exerce une influence beaucoup plus forte sur les propriétés biogéochimiques du sédiment dont la principale conséquence est une remobilisation importante de l'uranium initialement associé au sédiment vers la colonne d'eau. Selon les concentrations initiales dans le sédiment, la concentration dans la colonne d'eau peut ainsi être multipliée par un facteur 2 à 10 en douze jours et peut atteindre des valeurs de 20 à  $30 \text{ mg U L}^{-1}$ . Bien que les vers stimulent certaines communautés microbiennes, parfois déjà elles-mêmes stimulées par l'uranium (bactéries dénitrifiantes et bactéries sulfato-réductrices), leur impact sur la répartition de l'uranium ne dépend pas de ces modifications mais est directement lié à la remontée des particules depuis des couches de sédiment anoxique, où l'uranium est à un état réduit U(IV), vers la colonne d'eau où l'uranium est oxydé et passe sous sa forme U(VI). Ceci est d'autant plus efficace que les vers bioaccumulent peu d'uranium au cours du transit des particules de sédiment dans leur tractus digestif. Comme cela a déjà été montré pour d'autres métaux (*e.g.* Ciutat et al. 2003, Ciutat et al. 2007, Krantzberg 1985), ce travail a donc permis de confirmer que ce processus de bioconvoiage pouvait être également responsable de la remobilisation de l'uranium en eau douce. Beaucoup de travaux sont actuellement mener pour favoriser la rétention de l'uranium dans les sédiments dans le cadre de stratégies de

bioremédiation des eaux de surface contaminées près de sites miniers anciens ou toujours en cours d'exploitation (Wall & Krumholz 2006, Wilkins et al. 2006, Renshaw et al. 2007). Au vu de ce travail de thèse, il apparaît donc important de prendre en compte le rôle que peuvent jouer des macro-invertébrés tolérants à ces conditions sur le cycle de l'uranium.

(

La dernière partie de cette thèse (chapitre 5) a eu pour objectif d'évaluer les conséquences qui pouvaient être induites par un tel relargage d'uranium sur les organismes pélagiques. Les concentrations mesurées dans la colonne d'eau après douze jours de bioturbation (20 à 30 mg U L<sup>-1</sup>), pour un sédiment initialement contaminé à 600 µg U g<sup>-1</sup> sédiment sec, sont représentatives des concentrations mesurées dans des rivières et des lacs situés près de mines d'uranium (Ragnarsdottir & Charlet 2000). Il est donc apparu pertinent d'estimer l'impact de cette remobilisation. Pour cela, le choix a été fait d'utiliser le têtard de *Xenopus laevis* comme modèle biologique et de simplement ajouter cette espèce au dispositif expérimental utilisé dans le reste de l'étude. Afin d'évaluer l'écotoxicité de l'uranium sur cette espèce, ce travail s'est basé sur une approche de génotoxicologie par l'utilisation de l'essai micronoyaux (normalisé ISO 2006) complété par l'analyse de l'expression génique d'un certain nombre de gènes codant pour des protéines reconnues pour jouer un rôle chez des organismes soumis à un stress environnemental. Confrontés à quelques difficultés expérimentales pour réaliser ces analyses de façon optimale dans des dispositifs de type microcosmes (eau + sédiment + macro-invertébrés bioturbateurs) par rapport à une exposition en phase aqueuse, plusieurs expériences ont été nécessaires. Cela a permis d'une part de mettre en évidence les points à améliorer pour optimiser les protocoles expérimentaux à des dispositifs relativement complexes, et d'autre part de dégager quelques résultats importants.

De façon surprenante, il a tout d'abord été montré que le relargage d'uranium provoqué par la bioturbation des vers *T. tubifex* n'était plus observé en présence de larves de *X. laevis* dans la colonne d'eau. En autre hypothèse, il est très probable que les vers aient modifié leur comportement et se soient enfoncés plus profondément dans le sédiment par évitement (protection contre la prédation). Les larves de *X. laevis*, aux stades de développement auxquels elles ont été introduites dans les aquariums, étant microphages, cette interaction de type proie-prédateur diminuant le relargage d'uranium n'avait pas été envisagée mais reste cependant un résultat très intéressant. La remobilisation de l'uranium induite par les vers *T. tubifex*, qui avait été observée dans toutes les autres expériences de cette thèse, a pu être modifiée par une telle interaction.



Concernant la toxicité de l'uranium chez la larve de *X. laevis*, il a été montré qu'elle pouvait différer selon le milieu d'exposition. En effet, dans les dispositifs de type microcosmes, l'uranium initialement associé au sédiment a entraîné une diminution de la survie, une croissance plus faible, la surexpression des gènes codant pour les métallothionéines, les HSP70 et un récepteur membranaire multi-drogues, mais pas de bioconcentration, ni d'induction de cellules à micronoyaux. Ceci s'oppose à ce qui a été observé dans le test standardisé dans de l'eau, où les larves ont bioconcentré l'uranium qui a induit des effets génotoxiques (e.g. micronoyaux, surexpression d'un gène codant pour un cytochrome P450) mais pas d'effet sur la toxicité aiguë (mortalité ou croissance). Alors que la concentration dans la colonne d'eau des microcosmes était 5 fois plus faible que la concentration testée dans de l'eau seule (20 mg U L<sup>-1</sup>), ceci montre qu'il n'est donc pas possible de comparer objectivement ces deux modes d'exposition, l'uranium associé au sédiment ou libre dans l'eau ne présentant pas la même biodisponibilité, et que le dispositif expérimental de type microcosme doit être encore optimisé.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont permis de répondre aux objectifs qui avaient été posés et apportent des informations originales pour expliquer les effets de l'uranium sur les organismes benthiques et inversement, sur le rôle de ces derniers dans le cycle biogéochimique de l'uranium. Par exemple, aucune étude n'avait pour l'instant évalué les effets de l'uranium sur *T. tubifex*, de même qu'aucune donnée n'était disponible concernant l'impact de la bioturbation sur le cycle de l'uranium en eau douce. Toutefois, compte-tenu de la complexité du comportement biogéochimique de l'uranium, plus particulièrement de la difficulté à lier sa spéciation physico-chimique à sa biodisponibilité et à sa toxicité, ce travail n'est pas forcément généralisable à l'ensemble des hydrosystèmes. Les conditions expérimentales de cette étude (pH et dureté élevés) étaient plutôt favorables à une faible biodisponibilité de l'uranium, et des résultats différents auraient probablement été obtenus pour des conditions opposées. Mais on peut raisonnablement penser que les effets et les mécanismes mis en évidence auraient été les mêmes, et que seules les concentrations pour lesquelles ils auraient été observés fussent différentes. Afin de vérifier cela et d'apporter encore des données essentielles pour décrire le comportement de l'uranium dans l'environnement, les protocoles expérimentaux développés au cours de cette thèse doivent être appliqués à d'autres systèmes avec des conditions différentes (e.g. granulométrie du sédiment, composition de l'eau, teneur en matière organique, oxygénation de la colonne d'eau, densités d'organismes, espèces de macro-invertébrés bioturbateurs) et la variation de

ces divers paramètres doit être testée. Ce type d'expérimentations peut également être extrapolé à d'autres radionucléides.

Une autre perspective à explorer pour apporter des informations complémentaires à ce travail serait une analyse plus détaillée des communautés microbiennes présentes dans le sédiment, et plus particulièrement au sein des structures biogènes créées par les macro-invertébrés bioturbateurs. En effet, les techniques employées dans cette thèse (*e.g.* optodes à oxygène, gels DET) ont permis d'appréhender de façon indirecte les effets de l'uranium et de la bioturbation sur certaines activités microbiennes. Cependant, une caractérisation plus précise des communautés bactériennes impliquées dans ces processus apporterait des informations fondamentales pour la compréhension du fonctionnement d'un écosystème benthique contaminé. Dans le cadre de la mise en place de stratégies de bioremédiation des eaux contaminées par piégeage de l'uranium dans les sédiments (chapitre 1), de nombreuses études ont permis de décrire l'influence des micro-organismes sur le comportement biogéochimique de l'uranium. Néanmoins, les effets de l'uranium sur des communautés microbiennes existant préalablement dans un sédiment non contaminé, en présence ou non de macro-invertébrés bioturbateurs, n'ont jamais été investigués. Au vu des résultats présentés dans cette thèse, ces mécanismes apparaissent particulièrement importants à prendre en compte.

Au final, ce travail de thèse, basé sur des études en laboratoire, a permis d'avoir une vision holistique des interactions existant entre les organismes aquatiques, la biogéochimie du sédiment et un polluant métallique comme l'uranium. Il serait alors pertinent d'appliquer ces techniques d'analyse pluridisciplinaires à des écosystèmes naturels contaminés par de l'uranium (par exemple, près d'anciens sites miniers). La confrontation des résultats de laboratoire et des résultats de terrain permettrait alors de décrire de façon plus précise les conséquences d'une pollution à l'uranium dans l'environnement.



**RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**



- Alfaro-De-la-Torre MC, Tessier A (2002)** Cadmium deposition and mobility in the sediments of an acidic oligotrophic lake. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66:3549-3562
- Aller JY, Aller RC (1986)** Evidence for localized enhancement of biological activity associated with tube and burrow structures in deep-sea sediments at the HEBBLE site, western North Atlantic. *Deep-Sea Research* 33:755-790
- Aller RC, Aller JY, Kemp PF (2001)** Effects of particle and solute transport on rates and extent of remineralization in bioturbated sediment. In: Aller JY, Woodin SA, Aller RC (eds) *Organism-sediment interactions*. University of South Carolina Press, Columbia, SC, p 315-333
- Alsterberg G (1922)** Die Respiratorischen Mechanismen der Tubificiden. *Lunds Univ Arsskr* 18:1-222
- Andersson PS, Porcelli D, Gustafsson O, Ingri J, Wasserburg GJ (2001)** The importance of colloids for the behavior of uranium isotopes in the low-salinity zone of a stable estuary. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65:13-25
- Anschutz P, Sundby B, Lefrancois L, Luther III GW, Mucci A (2000)** Interactions between metal oxides and species of nitrogen and iodine in bioturbated marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*:2751-2763
- Antunes SC, De Figueiredo DR, Marques SM, Castro BB, Pereira R, Gonçalves F (2007a)** Evaluation of water column and sediment toxicity from an abandoned uranium mine using a battery of bioassays. *Science of the Total Environment* 374:252-259
- Antunes SC, Pereira R, Gonçalves F (2007b)** Acute and chronic toxicity of effluent water from an abandoned uranium mine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53:207-213
- Armitage PD, Cranston PS, Pinder LCV (1995)** *The Chironomidae: The biology and ecology of non-biting midges.*, Chapman and Hall.
- ASTM (1998)** American Society for Testing and Materials. Standard guide for conducting embryo teratogenesis assay-*Xenopus* (FETAX). E 1439-98. . In: ASTM (ed) *Annual book of ASTM standards*, Philadelphia, PA, USA, p 825-835
- Arzul G, Quiniou F, Carrie C (2006)** In vitro test-based comparison of pesticide-induced sensitivity in marine and freshwater phytoplankton. *Toxicology Mechanisms and Methods* 16:431-437

- Austen MC, Mc Evoy AJ (1997)** The use of offshore meiobenthic communities in laboratory microcosm experiments: Response to heavy metal contamination. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 211:247-261
- Baborowski M, Bozau E (2006)** Impact of former mining activities on the uranium distribution in the River Saale (Germany). *Applied Geochemistry* 21:1073-1082
- Banta GT, Andersen O (2003)** Bioturbation and the fate of sediment pollutants- Experimental case studies of selected infauna species. *Vie et Milieu* 53:233-248
- Barbaresi S, Tricarico E, Gherardi F (2004)** Factors inducing the intense burrowing activity of the red-swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, an invasive species. *Naturwissenschaften* 91:342-345
- Barillet S (2007)** Toxicocinétique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zèbre (*Danio rerio*). IRSN/Université Paul Verlaine, Metz
- Beller HR (2005)** Anaerobic, nitrate-dependent oxidation of U(IV) oxide minerals by the chemolithoautotrophic bacterium *Thiobacillus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology* 71:2170-2174
- Benamar MA, Zerrouki A, Idiri Z, Tobbeche S (1997)** Natural and artificial radioactivity levels in sediments in algiers bay. *Applied Radiation and Isotopes* 48:1161-1164
- Berg P, Rysgaard S, Funch P, Sejr MK (2001)** Effects of bioturbation on solutes and solids in marine sediments. *Aquatic Microbial Ecology* 26:81-94.
- Berner RA (1980)** Early diagenesis: A Theoretical Approach, Princeton University Press, USA
- Blair NE, Levin LA, DeMaster DJ, Plaia G (1996)** The short-term fate of fresh algal carbon in continental slope sediments. *Limnology & Oceanography* 41:1208-1219
- Bonin B, Blanc PL (2001)** L'uranium dans le milieu naturel, des origines jusqu'à la mine. In: Sciences E (ed) L'uranium de l'environnement à l'homme, Les Ulis, France, p 8-41
- Bonnet C (2000)** Développement de bioessais sur sédiments et applications à l'étude, en laboratoire, de la toxicité de sédiments dulçaquicoles contaminés. Université de Metz, Metz, France
- Bonzom JM, Dias V, Lagauzère S, Vasseur C (2005)** Effets éco-toxicologiques et biogéochimie de l'uranium au sein du compartiment sédimentaire des écosystèmes aquatiques continentaux. Rapport 05-28 IRSN/DEI/SECRE/LRE
- Borgmann U, Couillard Y, Doyle P, Dixon DG (2005)** Toxicity of sixty-three metals and metalloids to *Hyalella azteca* at two levels of water hardness. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24:641-652

- Bouché ML, Habets F, Biagianti-Risbourg S, Vernet G (2000)** Toxic Effects and Bioaccumulation of Cadmium in the Aquatic Oligochaete *Tubifex tubifex*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46:246-251
- Boudreau BP (1997)** Diagenetic models and their implementation: modelling transport and reactions in aquatic sediments, Springer-Verlag, Berlin, Germany
- Boudreau BP, Jorgensen BB (2000)** Diagenesis in the benthic boundary layer. In: Boudreau BP, Jorgensen BB (eds) *The benthic boundary layer: transport processes and biogeochemistry*. Oxford University Press, p 211-244
- Brinkhurst RO, Kennedy CR (1965)** Studies on the biology of the tubificidae (Annelida, Oligochaeta) in a polluted stream. *Journal of Animal Ecology* 34:429-443
- Budd GC (2005)** *Tubifex tubifex*: A sludge-worm. Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Sub-programme. Plymouth : Marine Biological Association of the United Kingdom.  
(on-line: [www.marlin.ac.uk/species/Tubifextubifex.htm](http://www.marlin.ac.uk/species/Tubifextubifex.htm))
- Burdige DJ, Dhakar SP, Neilson KH (1992)** Effects of manganese oxide mineralogy on microbial and chemical manganese reduction. *Geomicrobiology Journal* 10:27-48
- Charbonneau P, Hare L (1998)** Burrowing behavior and biogenic structures of mud-dwelling insects. *Journal of the North American Benthological Society* 17:239-249
- Charbonneau P, Hare L, Carignan R (1998)** Use of x-ray images and a contrasting agent to study the behavior of animals in soft sediments. *Limnology & Oceanography*:1823-1828
- Charles AL, Markich SJ, Stauber JL, De Filippis LF (2002)** The effect of water hardness on the toxicity of uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*). *Aquatic Toxicology* 60:61-73
- Chatarpaul L, Robinson JB, Kaushik NK (1980)** Effects of tubificid worms on denitrification and nitrification in stream sediment. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37:656-663
- Choppin GR (1989)** Soluble rare earth and actinide species in seawater. *Marine Chemistry* 28:19-26
- Ciutat A, Boudou A (2003)** Bioturbation effects on cadmium and zinc transfers from a contaminated sediment and on metal bioavailability to benthic bivalves. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22:1574-1581.



- Ciutat A, Gerino M, Boudou A (2007)** Remobilization and bioavailability of cadmium from historically contaminated sediments: Influence of bioturbation by tubificids. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68:108-117
- Ciutat A, Gerino M, Mesmer-Dudons N, Anschutz P, Boudou A (2005)** Cadmium bioaccumulation in Tubificidae from the overlying water source and effects on bioturbation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60:237-246
- Ciutat A, Weber O, Gérino M, Boudou A (2006)** Stratigraphic effects of tubificids in freshwater sediments: a kinetic study based on X-ray images and grain-size analysis. *Acta Oecologica* 30:228-237
- Clark DL, Hobart DE, Neu MP (1995)** Actinide carbonate complexes and their importance in actinide environmental chemistry. *Chemical Reviews* 95:25-48
- Claypool GE (2004)** Ventilation of marine sediments indicated by depth profiles of porewater sulfate and  $s^{34}S$ . *Geochemical Investigations in Earth and Space Science* 9:59-65
- Claypool GE, Kaplan IR (1974)** *Natural Gases in Marine Sediments*, Plenum Press, New York
- Cochran JK (1992)** The oceanic chemistry of the uranium- and thorium-series nuclides. In: Ivanovich M, Harmon RS (eds) *Uranium series disequilibrium: Applications to environmental problems* 2<sup>nd</sup> edition. Clarendon Press, Oxford, p 334-396
- Colle C, Garnier-Laplace J, Roussel-Debet S, Adam C, Baudin JP (2001)** **Comportement** de l'uranium dans l'environnement. In: *L'Uranium, de l'environnement à l'homme*, Vol chapitre 6. EDP Sciences, collection IPSN, Les Ulis (France), p 188-211
- Coull BC, Chandler GT (1992)** Pollution and meiofauna: field, laboratory, and mesocosm studies. *Oceanography and marine biology: an annual review* 30:191-271
- Cowart JB, Burnett WC (1994)** The distribution of uranium and thorium decay-series radionuclides in the environment - A review. *Journal of Environmental Quality* 23:651-662
- Curtis GP, Davis JA, Naftz DL (2006)** Simulation of reactive transport of uranium(VI) in groundwater with variable chemical conditions. *Water Resources Research* 42
- Dausend Kv (1931)** Über die Atmung der Tubificiden. *Z Vergl Physiol* 14:557-608
- Davis JA, Curtis GP, Wilkins MJ, Kohler M, Fox P, Naftz DL, Lloyd JR (2006)** Processes affecting transport of uranium in a suboxic aquifer. *Physics and Chemistry of the Earth* 31:548-555

- Davis JA, Meece DE, Kohler M, Curtis GP (2004)** Approaches to surface complexation modeling of Uranium(VI) adsorption on aquifer sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68:3621-3641
- Davis JA, Payne TE, Waite TD (2002)** Simulating the pH and pCO<sub>2</sub> dependence of uranium(VI) adsorption by a weathered schist with surface complexation models. In: *Geochemistry of Soil Radionuclides, Special Pub 59*. Soil Science Society America, Madison, WI., p 61-86
- Davison W, Fones G, Harper M, Teasdale P, Zhang H (2000)** Dialysis, DET and DGT: in situ diffusional techniques for studying water, sediments and soils. In *in situ monitoring of aquatic systems: chemical analysis and speciation*: pp 495-569
- Davison W, Grime GW, Morgan JAW, Clarke K (1991)** Distribution of dissolved iron in sediment pore waters at submillimetre resolution. *Nature* 352:323-325
- De Haas EM, Kraak MHS, Koelmans AA, Admiraal W (2005)** The impact of sediment reworking by opportunistic chironomids on specialised mayflies. *Freshwater Biology* 50:770-780
- De Lange HJ, De Haas EM, Maas H, Peeters E (2005)** Contaminated sediments and bioassay responses of three macroinvertebrates, the midge larva *Chironomus riparius*, the water louse *Asellus aquaticus* and the mayfly nymph *Ephoron virgo*. *Chemosphere* 61:1700-1709
- Delmotte S, Meysman FJR, Ciutat A, Boudou A, Sauvage S, Gerino M (2007)** Cadmium transport in sediments by tubificid bioturbation: An assessment of model complexity. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71:844-862
- De Montety L, Long B, Desrosiers G, Crémer JF, Locat J, Stora G (2003)** Scanner use for sediment study: the influence of physical parameters, Chemistry and biology on tomographic intensities. *Canadian Journal of Earth Sciences* 40:937-948
- Denison F (2004)** Uranium (VI) speciation: modelling, uncertainty and relevance to bioavailability models. Application to Uranium uptake by the gills of a freshwater bivalve., Thèse de Doctorat de l'Université Aix-Marseille I.
- Depledge MH (1994)** The rational basis for use of biomarkers as ecological tools. In: Fossi MC, Leonzio C (eds) *Non destructive biomarkers in vertebrates*. Boca Raton, p 271-295
- Dias V (2005)** Effet d'un sédiment contaminé à l'uranium sur un invertébré benthique: *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). Rapport DRT, IRSN/Université Denis Diderot - Paris VII

- Dias V, Vasseur C, Bonzom JM (2008)** Exposure of *Chironomus riparius* larvae to uranium: effects on survival, development time, growth, and mouthpart deformities. *Chemosphere* 71:574-581
- Doretti L, Ferrara D, Barison G, Gerbasi R, Battiston G (1992)** Natural radionuclides in the muds and waters used in thermal therapy in Abano Terme, Italy. *Radiation Protection Dosimetry* 45:175-178
- Dufour SC, Desrosiers G, Long B, Lajeunesse P, Gagnoud M, Labrie J, Archambault P, Stora G (2005)** A new method for three-dimensional visualization and quantification of biogenic structures in aquatic sediments using axial tomodesitometry. *Limnology & Oceanography: Methods*:372-380
- Duport E, Stora G, Tremblay P, Gilbert F (2006)** Effects of population density on the sediment mixing induced by the gallery-diffusor *Hediste (Nereis) diversicolor* O.F. Müller, 1776. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 336:33-41.
- Dzombak DA, Morel FMM (1990)** Surface Complexation Modeling: Hydrous Ferric Oxide., John Wiley & Sons, New-York
- Ebbs SD, Brady DJ, Kochian LV (1998)** Role of uranium speciation in the uptake and translocation of uranium by plants. *Journal of Experimental Botany* 49:1183-1190
- Environnement Canada (2003)** Liste des substances d'intérêt prioritaire - Rapport d'évaluation - Rejets de radionucléides des installations nucléaires (effets sur les espèces autre que l'être humain), [Priority substances list assessment report releases of radionuclides from nuclear facilities (impact on non-human biota)], Gouvernement du Canada.
- Famme P, Knudsen J (1985)** Aerotaxis by the freshwater oligochaete *Tubifex* sp. *Oecologia* 65:599-601
- Faria MS, Lopes RJ, Nogueira AJA, Soares AMVM (2007)** *In situ* and laboratory bioassays with *Chironomus riparius* larvae to assess toxicity of metal contamination in rivers: The relative toxic effect of sediment versus water contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26:1968-1977
- Fernandes S, Meysman FJR, Sobral P (2006)** The influence of Cu contamination on *Nereis diversicolor* bioturbation. *Marine Chemistry* 102:148-158
- Finneran KT, Housewright ME, Lovley DR (2002)** Multiple influences of nitrate on uranium solubility during bioremediation of uranium-contaminated subsurface sediments. *Environmental Microbiology* 4:510-516

- Fisher JB, Lick WJ, Mc Call PL, Robbins JA (1980)** Vertical mixing of lake sediments by tubificid oligochaetes. *Journal of Geophysical Research* 85:3997-4006
- Fones GR, Davison W, Grime GW (1998)** Development of constrained DET for measurements of dissolved iron in surface sediments at sub-mm resolution. *Science of the Total Environment* 221:127-137
- Forstner U, Wittmann G (1981)** *Metal Pollution in the Environment*, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York
- Fournier E, Tran D, Denison F, Massabuau JC, Garnier-Laplace J (2004)** Valve closure response to uranium exposure for a freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*): Quantification of the influence of pH. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:1108-1114
- Fox HM, Taylor AER (1955)** The tolerance of oxygen by aquatic invertebrates. *Proceedings of the Royal Society B - Biological Sciences* 143:215-225
- François F (1999)** Mise au point d'un nouveau modèle de bioturbation pour une approche fonctionnelle du remaniement sédimentaire lié à l'activité des communautés benthiques. Thèse de Doctorat en Sciences de l'Environnement Marin, Université de la Méditerranée - Aix-Marseille II.
- François F, Poggiale J-C, Durbec J-P, Stora G (2001)** A new model of bioturbation for a functional approach to sediment reworking resulting from macrobenthic community. In: Aller JY, Woodin SA, Aller RC (eds) *Organism-sediment interactions*. University of South Carolina Press, Columbia, SC, p 73-86
- Franklin NM, Stauber JL, Markich SJ, Lim RP (2000)** pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*). *Aquatic Toxicology* 48:275-289
- Frazier SW, Kretzschmar R, Kraemer SM (2005)** Bacterial siderophores promote dissolution of UO<sub>2</sub> under reducing conditions. *Environmental Science and Technology* 39:5709-5715
- Frenzel P (1990)** Influence of Chironomid Larvae on Sediment Oxygen Microprofiles. *Archiv für Hydrobiologie* AHYBA4 119:427-437
- Froelich PN, Klinkhammer GP, Bender ML, Luedtke NA, Heath GR, Cullen D, Dauphin P, Hammond D, Hartman B, Maynard V (1979)** Early oxidation of organic matter in pelagic sediments of the eastern equatorial Atlantic: suboxic diagenesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 43:1075-1090

- Frouz J, Lobinske RJ, Ali A (2004)** Influence of Chironomidae (Diptera) faecal pellet accumulation on lake sediment quality and larval abundance of pestiferous midge *Glyptotendipes paripes*. *Hydrobiologia* 518:169-177
- Fukuhara H, Sakamoto M (1987)** Enhancement of inorganic nitrogen and phosphate release from lake sediment by tubificid worms and chironomid larvae. *Oikos* 48:312-320
- Gaillard JF (1995)** Limnologie chimique : Principes & Processus. In: Pourriot R, Meybeck M (eds) *Limnologie générale*, Vol 25. Collection d'Ecologie, Masson, Paris, p 115-156
- Garcia HE, Gordon LI (1992)** Oxygen solubility in seawater: better fitting equations. *Limnology & Oceanography* 37:1307-1312
- Gardner LR, Sharma P, Moore WS (1987)** A regeneration model for the effect of bioturbation by fiddler crabs on  $^{210}\text{Pb}$  profiles in salt marsh sediments. *Journal of Environmental Radioactivity* 5:25-36
- Garnier-Laplace J, Paquet F (2001)** Radioprotection de l'ENVIRONNEMENT à l'HOMME - ENVIRHOM - Bioaccumulation de radionucléides dans des situations d'exposition chronique des écosystèmes et des personnes du public. Projet de programme de recherches commun DPHD - DPPE. Rapport IPSN - DPPE 00-01 / DPHD 00-03
- Gascoyne M (1992)** Geochemistry of the actinides and their daughters. In: Ivanovich M, Harmon RS (eds) *Uranium series disequilibrium: Applications to environmental problems* 2<sup>nd</sup> edition. Clarendon Press, Oxford, p 34-61
- Gerbal-Chaloin S (2000)** Etude de la régulation des CYP450, Thèse de doctorat de l'Université Montpellier I, [www.biochimie.univ-montp2.fr/maitrise/reinhard/these-sabine.pdf](http://www.biochimie.univ-montp2.fr/maitrise/reinhard/these-sabine.pdf).
- Gerbersdorf SU, Jancke T, Westrich B, Paterson DM (2008)** Microbial stabilization of riverine sediments by extracellular polymeric substances. *Geobiology* 6:57-69
- Gérino 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 de Aix-Marseille II.
- Gérino M, Aller RC, Lee C, Cochran JK, Aller JY, Green MA, Hirschberg D (1998)** Comparison of different tracers and methods used to quantify bioturbation during a spring bloom: 234-thorium, luminophores and chlorophyll a. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 46:531-547.
- Gérino M, Stora G, Weber O (1999)** Evidence of bioturbation in the Cap-Ferret Canyon in the deep northeastern Atlantic. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 46:2289-2307.

- Gérino M, Vervier P, Stora G, Gilbert F, Poggiale J-C, François-Carcaillet F, Mermillod-Blondin F, Desrosiers G (2003)** Macro- invertebrate functional groups in freshwater and marine sediments: A common mechanistic classification. *Vie et Milieu* 53:221-232.
- Giani N (1984)** The Riou Mort, a tributary of the River Lot, polluted by heavy metals. IV. A study of the oligochaetes, [Le Riou Mort, affluent du lot, pollué par les métaux lourds. IV. Etude des Oligochètes]. *Annales de Limnologie* 20:167-181
- Gilbert F, Hulth S, Strömberg N, Ringdahl K, Poggiale J-C (2003)** 2-D optical quantification of particle reworking activities in marine surface sediments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 285-286:251-263
- Glud RN, Gundersen JK, Røy H, Jørgensen BB (2003)** Seasonal dynamics of benthic O<sub>2</sub> uptake in a semienclosed bay: Importance of diffusion and faunal activity. *Limnology & Oceanography* 48:1265-1276
- Gornati R, Monetti C, Vigetti D, Bosisio S, Fortaner S, Sabbioni E, Bernardini G, Prati M (2002)** Arsenic toxicity and HSP70 expression in *Xenopus laevis* embryos. *ATLA* 30:597-603
- Grenthe I, Fuger J, Konings RJM, Lemire RJ, Muller AB, Nguyen-Trung C, Wanner H (1992)** Chemical Thermodynamics of Uranium, North-Holland, Amsterdam
- Gu B, Yan H, Zhou P, Watson DB, Park M, Istok J (2005)** Natural humics impact uranium bioreduction and oxidation. *Environmental Science and Technology* 39:5268-5275
- Gyedu-Ababio TK, Baird D (2006)** Response of meiofauna and nematode communities to increased levels of contaminants in a laboratory microcosm experiment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63:443-450
- Hakanson L, Jansson M (1983)** Principles of Lake Sedimentology, The Blackburn Press, New York
- Hardivillier Y (2005)** Caractérisation et expression des gènes de métallothionéines chez deux modioles hydrothermales : *Bathymodiolus thermophilus* et *Bathymodiolus azoricus*, Thèse de doctorat de l'Université du Maine, UFR Sciences et Techniques.
- 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. *Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences* 48:39-47

- Hart DR, McKee PM, Burt AJ, Goffin MJ (1986)** Benthic community and sediment quality assessment of Port Hope Harbour, Lake Ontario. *Journal of Great Lakes Research* 12:206-220
- Heininger P, Höss S, Claus E, Pelzer J, Traunspurger W (2007)** Nematode communities in contaminated river sediments. *Environmental Pollution* 146:64-76
- Henrichs SM (1992)** Early diagenesis of organic matter in marine sediments: progress and perplexity. *Marine Chemistry* 39:119-149
- Hölker F, Stief P (2005)** Adaptive behaviour of chironomid larvae (*Chironomus riparius*) in response to chemical stimuli from predators and resource density. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 58:256-263
- Homolya L, Váradi A, Sarkadi B (2003)** Multidrug resistance-associated proteins: Export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate. *Biofactors* 17:103-114
- Hulth S, Aller RC, Gilbert F (1999)** Coupled anoxic nitrification/manganese reduction in marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63:49-66
- Hyacinthe C, Anschutz P, Carbonel P, Jouanneau J-M, Jorissen FJ (2001)** Early diagenetic processes in the muddy sediments of the bay of Biscay. *Marine Geology*:111-128
- Hynes TP (1990)** The impacts of the Cluff Lake uranium mine and mill effluents of northern Saskatchewan: M.Sc. thesis. University of Saskatchewan
- ISO INTERNATIONAL STANDARD (2006)** Water quality - Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei - Part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae. . ISO 21427-1, ICS : 1306070, GENOVA - CH, 15 p
- IRSN (2007)** Expertise globale du bilan décennal environnemental d'AREVA NC, 2ème partie: Impact environnemental à l'échelle des bassins versants et évaluation de la surveillance. DEI/SARG/2007-042. 390 pages.
- Joner EJ, Munier-Lamy C, Gouget B (2007)** Bioavailability and microbial adaptation to elevated levels of uranium in an acid, organic topsoil forming on an old mine spoil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26:1644-1648
- Joshi SR, Waite DT, Platford RF (1989)** Vertical distribution of uranium mill tailings contaminants in Langley Bay, lake Athabasca sediments. *Science of the Total Environment* 87-88:85-104
- Kajan R, Frenzel P (1999)** The effect of chironomid larvae on production, oxidation and fluxes of methane in a flooded rice soil. *FEMS Microbiology Ecology* 28:121-129

- Ketterer M, Wetzel W, Layman R, Matisoff G, EC B (2000)** Isotopic studies of sources of uranium in sediments of the Ashtabula river, Ohio, USA. *Environmental Science & Technology* 34:966-972
- Kim JI (1986)** Chemical behaviour of transuranic elements in natural aquatic systems. In: Freeman AJ, Keller C (eds) *Handbook on the Physics and Chemistry of the Actinides*. Elsevier, Amsterdam, p 413-455
- Kohler M, Curtis GP, Kent DB, Davis JA (1996)** Experimental investigation and modeling of uranium (VI) transport under variable chemical conditions. *Water Resources Research* 32:3539-3551
- Krantzberg G (1985)** The influence of bioturbation on physical, chemical and biological parameters in aquatic environments: a review. *Environmental Pollution* 39:99-122.
- 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.
- Kuhne WW, Caldwell CA, Gould WR, Fresquez PR, Finger S (2002)** Effects of depleted uranium on the health and survival of *Ceriodaphnia dubia* and *Hyalella azteca*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21:2198-2203
- Kurnaz A, Küçükömeroglu B, Keser R, Okumusoglu NT, Korkmaz F, Karahan G, Cevik U (2007)** Determination of radioactivity levels and hazards of soil and sediment samples in Firtina Valley (Rize, Turkey). *Applied Radiation and Isotopes* 65:1281-1289
- Lambrechts A, Foulquier L, Garnier-Laplace J (1992)** Natural radioactivity in the aquatic components of the main French rivers. *Radiation Protection Dosimetry* 45:253-256
- Landrum PF, Gossiaux DC, Eadie BJ, Lansing MB, Leppänen M, Kukkonen JVK, Robinson SD, Burton GA, Greenberg M (2004)** Effect of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl on the reworking behavior of *Lumbriculus variegatus* exposed to contaminated sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:178-186.
- Langmuir D (1978)** Uranium solution-mineral equilibria at low temperatures with applications to sedimentary ore deposits. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42:547-596.
- Leal JFF, Dos Santos Furtado AL, De Assis Esteves F, Bozelli RL, Figueiredo-Barros MP (2007)** The role of *Campsurus notatus* (Ephemeroptera: Polymitarcyidae) bioturbation and sediment quality on potential gas fluxes in a tropical lake. *Hydrobiologia* 586:143-154



- Lee SE, Yoo DH, Son J, Cho K (2006)** Proteomic evaluation of cadmium toxicity on the midge *Chironomus riparius* Meigen larvae. *Proteomics* 6:945-957
- Leuschner DC, Sirocko F, Grootes PM, Erlenkeuser H (2002)** Possible influence of Zoophycos bioturbation on radiocarbon dating and environmental interpretation. *Marine Micropaleontology* 46:111-126
- Lewandowski J, Laskov C, Hupfer M (2007)** The relationship between *Chironomus plumosus* burrows and the spatial distribution of pore-water phosphate, iron and ammonium in lake sediments. *Freshwater Biology* 52:331-343
- Li Y, Gregory S (1974)** Diffusion of ions in sea water and in deep-sea sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 38:703-714
- Lottermoser B, Ashley P, Costelloe M (2005)** Contaminant dispersion at the rehabilitated Mary Kathleen uranium mine, Australia. *Environmental Geology* 48:748-761
- Lovley DR, Holmes DE, Nevin KP (2004)** Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Advances in Microbial Physiology* 49:219-286
- Lovley DR, Phillips EJP, Gorby YA, Landa ER (1991)** Microbial reduction of uranium. *Nature* 350:413-416
- Lozano JC, Blanco Rodríguez P, Vera Tomé F (2002)** Distribution of long-lived radionuclides of the  $^{238}\text{U}$  series in the sediments of a small river in a uranium mineralized region of Spain. *Journal of Environmental Radioactivity* 63:153-171
- Luoma SN (1989)** Can we determine the biological availability of sediment-bound trace elements? *Sediment/water interactions Proc 4th symposium, Melbourne, 1987*:379-396
- Maire O, Duchêne JC, Grémare A, Malyuga VS, Meysman FJR (2007)** A comparison of sediment reworking rates by the surface deposit-feeding bivalve *Abra ovata* during summertime and wintertime, with a comparison between two models of sediment reworking. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 343:21-36.
- Marcus NH, Schmidt-Gengenbach J (1986)** Recruitment of individuals into the plankton: the importance of bioturbation. *Limnology & Oceanography* 31:206-210
- Markich SJ (2002)** Uranium speciation and bioavailability in aquatic systems: an overview. *The Scientific World Journal [electronic resource]* 2:707-729
- Markich SJ, Brown PL, Jeffree RA, Lim RP (2000)** Valve movement responses of *Velesunio angasi* (Bivalvia: Hyriidae) to manganese and uranium: An exception to the free ion activity model. *Aquatic Toxicology* 51:155-175

- Martinez-Madrid M, Rodriguez P, Perez-Iglesias JI, Navarro E (1999)** Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion River (Northern Spain).  
2. *Tubifex tubifex* reproduction sediment bioassay. *Ecotoxicology* 8:111-124
- Martin P, Boes X, Goddeeris B, Fagel N (2004)** A qualitative assessment of the influence of bioturbation in Lake Baikal sediments. *Global Planet Change* 46:87-99.
- Matisoff G (1995)** Effects of bioturbation on solute and particle transport in sediments. In: Allen HE (ed) Metal contaminated aquatic sediments. Ann Arbor Press, Chelsea, MI.
- Matisoff G, Wang X (1998)** Solute transport in sediments by freshwater infaunal bioirrigators. *Limnology & Oceanography* 43:1487-1499.
- Matisoff G, Wang X (2000)** Particle mixing by freshwater infaunal bioirrigators : midges (Chironomidae :diptera) and mayflies (Ephemeroidea :Ephemeroptera). *Journal of Great Lakes Research* 26:174-182
- Matisoff G, Wang X, Mc Call PL (1999)** Biological redistribution of lake sediments by tubificid Oligochaetes : *Branchiura sowerbyi* and *Limnodrilus hoffmeisteri/Tubifex tubifex*. *Journal of Great Lakes Research* 25:205-219
- Mc Call PL, Fisher JB (1980)** Effects of tubificid oligochaetes on physical and chemical properties of Lake Erie sediments. In: Brinkhurst RO, Cook DG (eds) Aquatic oligochaete biology. Plenum Press, New York. p253-317
- Mc Gill R, Tuckey J, Larsen W (1978)** Variations of box plots. *The American Statistician* 32:12-16
- Mc Kee PM, Snodgrass WJ, Hart DR, Duthie HC, McAndrews JH, Keller W (1987)** Sedimentation rates and sediment core profiles of <sup>238</sup>U and <sup>232</sup>Th decay chain radionuclides in a lake affected by uranium mining and milling. *Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences* 44:390-398
- Mermillod-Blondin F, Creuzé Des Châtelliers M, Gaudet J-P, Gerino M, Desrosiers G, Jose J (2004)** Relative influence of bioturbation and predation on organic matter processing in river sediments: A microcosm experiment. *Freshwater Biology* 49:895-912
- Mermillod-Blondin F, Creuzé des Châtelliers M, Gérino M (2003)** Effects of the interaction between tubificid worms on the functioning of hyporheic sediments: An experimental study in sediment columns. *Archiv fur Hydrobiologie* 156:203-223
- Mermillod-Blondin F, Gérino M, Des Châtelliers MC, Degrange V (2002)** Functional diversity among 3 detritivorous hyporheic invertebrates: An experimental study in microcosms. *Journal of the North American Benthological Society* 21:132-149

- Mermillod-Blondin F, Marie S, Desrosiers G, De Montety L, Michaud E, Mermillod-Blondin F, Long B, Stora G (2003)** Assessment of the spatial variability of intertidal benthic communities by axial tomodesitometry: Importance of fine-scale heterogeneity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*:193-208
- Mermillod-Blondin F, Nogaro G, Datry T, Malard F, Gibert J (2005)** Do tubificid worms influence the fate of organic matter and pollutants in stormwater sediments? *Environmental Pollution* 134:57-69.
- Mermillod-Blondin F, Rosenberg R (2006)** Ecosystem engineering: The impact of bioturbation on biogeochemical processes in marine and freshwater benthic habitats. *Aquatic Sciences* 68:434-442
- Meysman FJR, Galaktionov OS, Gribsholt B, Middelburg JJ (2006)** Bioirrigation in permeable sediments: Advective pore-water transport induced by burrow ventilation. *Limnology & Oceanography* 51:142-156.
- Michaud AL, Hare L, Campbell PGC (2005)** Exchange rates of cadmium between a burrowing mayfly and its surroundings in nature. *Limnology & Oceanography* 50:1707-1717
- Mironov VP, Matusevich JL, Kudrjashov VP, Boulyga SF, Becker JS (2002)** Determination of irradiated reactor uranium in soil samples in Belarus using <sup>236</sup>U as irradiated uranium tracer. *Journal of Environmental Monitoring* 4:997-1002
- Mitchell SE, Caldwell CA, Gonzales G, Gould WR, Arimoto R (2005)** Effects of depleted uranium on survival, growth, and metamorphosis in the african clawed frog (*Xenopus laevis*). *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* 68:951-956
- Monetti C, Bernardini G, Vigetti D, Prati M, Fortaner S, Sabbioni E, Gornati R (2003)** Platinum toxicity and gene expression in *Xenopus* embryos: analysis by FETAX and differential display. *ATLA* 31:401-408
- Monetti C, Vigetti D, M. Prati, E. Sabbioni, G. Bernardini, Gornati R (2002)** Gene expression in *Xenopus* embryos after methylmercury exposure: a search for molecular biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21:2731-2736
- Moore WS (1992)** Radionuclides of the uranium and thorium decay series in the estuarine environment. In: Ivanovich M, Harmon RS (eds) *Uranium series disequilibrium: Applications to environmental problems* 2<sup>nde</sup> edition. Clarendon Press, Oxford, p 396-422
- Mouchet F (2002)** Validation du test comète sur larves d'amphibiens (*Xenopus laevis* et *Pleurodeles waltl*) et application à l'évaluation du potentiel génotoxique de sols,

- sédiments et déchets contaminés. Comparaison avec le test micronoyau amphibien. pp : 316.
- Mouchet F, Baudrimont M, Gonzalez P, Cuenot Y, Bourdineaud JP, Boudou A, Gauthier L (2006a)** Genotoxic and stress inductive potential of cadmium in *Xenopus laevis* larvae. *Aquatic Toxicology* 78:157-166
- Mouchet F, Gauthier L, Mailhes C, Ferrier V, Devaux A (2005)** A comparative study of the comet assay and the micronucleus test in amphibian larvae (*Xenopus laevis*) using benzo(a)pyrene, ethyl methanesulfonate, and methyl methanesulfonate: establishment of a positive control in the amphibian comet assay. *Environmental Toxicology* 20:74-84
- Mouchet F, Gauthier L, Mailhes C, Jourdain MJ, Ferrier V, Triffault G, Devaux A (2006b)** Biomonitoring of the genotoxic potential of aqueous extracts of soils and bottom ash resulting from municipal solid waste incineration, using the comet and micronucleus tests on amphibian (*Xenopus laevis*) larvae and bacterial assays (Mutatox® and Ames tests). *Science of the Total Environment* 355:232-246
- Myers CR, Neelson KH (1988a)** Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. *Science* 240:1319-1321
- Myers CR, Neelson KH (1988b)** Microbial reduction of manganese oxides: interactions with iron and sulfur. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 52:2727-2732
- Nagao S, Yanase N, Yamamoto M, Kofuji H, Sohrin Y, Amano H (2002)** The geochemistry of uranium in pore waters from lake sediments. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 252:225-232
- Neelson K, Berelson W (2003)** Layered microbial communities and the search for life in the universe. *Geomicrobiology Journal* 20:451-462
- Neelson KH (1997)** Sediment bacteria: Who's there, what are they doing, and what's new? *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 25:403-434
- Neame PA, Dean JR, Zytaruk BG (1982)** Distribution and concentrations of naturally-occurring radionuclides in sediments in a uranium mining area of northern Saskatchewan, Canada. *Hydrobiologia* 91-92:355-361
- Nies DH (1999)** Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51:730-750
- Nieuwkoop PD, Faber J (1956)** Normal tables of *Xenopus laevis* (Daudin). North-Holland Publ., Amsterdam.

- Nogaro G, Mermillod-Blondin F, Montuelle B, Boisson JC, Lafont M, Volat B, Gibert J (2007)** Do tubificid worms influence organic matter processing and fate of pollutants in stormwater sediments deposited at the surface of infiltration systems? *Chemosphere* 70:315-328
- OECD/AEN (2006)** Uranium 2005: origin, production and demand ("Red book"). [www.oecd.org/bookshop](http://www.oecd.org/bookshop)
- Pabalan RT, Turner DR, Bertetti FP, Prikryl JD (1998)** Uranium(VI) sorption onto selected mineral surfaces. In: Jenne EA (ed) Adsorption of Metals by Geomedia: Variables, Mechanisms, and Model Applications. Academic Press, San Diego, CA, p 99-130
- Palmer MF (1968)** Aspects of the respiratory physiology of *Tubifex tubifex* in relation to its ecology. *Journal of Zoology* 154:463-473
- Palmer MR, Edmond JM (1993)** Uranium in river water. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 57:4947-4955
- Park SS, Jaffé PR (1996)** Development of a sediment redox potential model for the assessment of postdepositional metal mobility. *Ecological Modelling* 91:169-181
- Payne TE, Lumpkin GR, Waite TD (1998)** Uranium(VI) adsorption on model minerals. In: Jenne EA (ed) Adsorption of Metals by Geomedia: Variables, Mechanisms, and Model Applications. Academic Press, San Diego, CA, p 75-97
- Peck MR, Klessa DA, Baird DJ (2002)** A tropical sediment toxicity test using the dipteran *Chironomus crassiforceps* to test metal bioavailability with sediment pH change in tropical acid-sulfate sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21:720-728
- Pelegri SP, Blackburn TH (1995)** Effects of *Tubifex tubifex* (Oligochaeta: Tubificidae) on N-mineralization in freshwater sediments, measured with <sup>15</sup>N isotopes. *Aquatic Microbial Ecology* 9:289-294
- Pelletier E, Denizeau F, Campbell PGC (2004)** Écotoxicologie moléculaire : principes fondamentaux et perspectives de développement, Saint-Foy (Québec) : Presses de l'Université du Québec
- Péry ARR, Ducrot V, Geffard A, Garric J (2007)** Do differences between metal body residues reflect the differences between effects for *Chironomus riparius* exposed to different sediments? *Chemosphere* 66:397-403
- Petersen K, Kristensen E, Bjerregaard P (1998)** Influence of bioturbating animals on flux of cadmium into estuarine sediment. *Marine Environmental Research* 45:403-415

- Petersen W, Wallmann K, Pinglin L, Schroeder F, Knauth H-D (1995)** Exchange of trace elements at the sediment-water interface during early diagenesis processes. *Marine & Freshwater Research*:19-26
- Petersen W, Willer E, Willamowski C (1997)** Remobilization of trace elements from polluted anoxic sediments after resuspension in oxic water. *Water, Air, and Soil Pollution* 99:515-522
- Peterson MJ, Smith JG, Southworth GR, Ryon MG, Eddlemon GK (2002)** Trace element contamination in benthic macroinvertebrates from a small stream near a uranium mill tailings site. *Environmental Monitoring and Assessment* 74:193-208
- Polerecky L, Volkenborn N, Stief P (2006)** High temporal resolution oxygen imaging in bioirrigated sediments. *Environmental Science and Technology* 40:5763-5769
- Pompe S, Bubner M, Denecke MA, Reich T, Brachmann A, Geipel G, Nicolai R, Heise KH, Nitsche H (1996)** A Comparison of Natural Humic Acids with Synthetic Humic Acid Model Substances: Characterization and Interaction with Uranium(VI). *Radiochimica Acta* 74:135-140
- Portela S (2005)** Effets d'un sédiment contaminé à l'uranium sur un invertébré benthique: *Chironomus riparius*. Rapport de Master 1, IUP Ingénierie des Milieux Aquatiques et Corridors Fluviaux. Université François Rabelais, Tours, France.
- Postma D, Jakobsen R (1996)** Redox zonation: Equilibrium constraints on the Fe(III)/SO<sub>4</sub>-reduction interface. *Geochimica et Cosmochimica Acta*:3169-3175
- Poston TM (1982)** Observations on the bioaccumulation potential of thorium and uranium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 28:682-690
- Poston TM, Hanf Jr. RW, Simmons MA (1984)** Toxicity of uranium to *Daphnia magna*. *Water, Air and Soil Pollution* 22:289-298
- Ragnarsdottir KV, Charlet L (2000)** Uranium behaviour in natural environments. In: Ireland MSoGB (ed) *Environmental mineralogy microbial interactions Anthropogenic influences Contaminated land and waste management*, p 333-377
- Rasmussen JB (1984)** The life-history, distribution, and production of *Chironomus riparius* and *Glyptotendipes paripes* in a prairie pond. *Hydrobiologia* 119:65-72
- Redeker ES, Bervoets L, Blust R (2004)** Dynamic model for the accumulation of cadmium and zinc from water and sediment by the aquatic oligochaete, *Tubifex tubifex*. *Environmental Science & Technology* 38:6193-6200

- Reeburgh WS (1983)** Rates of biogeochemical processes in anoxic sediments. Annual review of earth and planetary sciences Vol 11:269-298
- Reichelt AC (1991)** Environmental effects of meiofaunal burrowing. In: Meadows PS, Meadows A (eds) The environmental impact of burrowing animals and animal burrows. The Zoological Society of London, Clarendon Press, Oxford, p 33-52
- Renshaw JC, Lloyd JR, Livens FR (2007)** Microbial interactions with actinides and long-lived fission products. Comptes Rendus Chimie 10:1067-1077
- Reynoldson TB, Thompson SP, Bamsey JL (1991)** A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm *Tubifex tubifex*. Environmental Toxicology and Chemistry 10:1061-1072
- Rhoads DC (1974)** Organism-sediment relations on the muddy sea floor. Oceanography and marine Biology: An annual review 12:263-300
- Riba I, DelValls TA, Reynoldson TB, Milani D (2006)** Sediment quality in Rio Guadiamar (SW, Spain) after a tailing dam collapse: Contamination, toxicity and bioavailability. Environment International 32:891-900
- Ribera D, Labrot F, Tisnerat G, Narbonne JF (1996)** Uranium in the environment: occurrence, transfer, and biological effects. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 146:53-89
- Rich RA, Holland HD, Petersen U (1977)** Hydrothermal uranium deposits.
- Riethmuller N, Markich SJ, Van Dam RA, Parry D (2001)** Effects of water hardness and alkalinity on the toxicity of uranium to a tropical freshwater hydra (*Hydra viridissima*). Biomarkers 6:45-51
- Ristola T, Pellinen J, Ruokolainen M, Kostamo A, Kukkonen JVK (1999)** Effect of sediment type, feeding level, and larval density on growth and development of a midge (*Chironomus riparius*). Environmental Toxicology and Chemistry 18:756-764
- Robbins JA (1982)** Stratigraphic and dynamic effects of sediment reworking by Great Lakes zoobenthos. Hydrobiologia 91-92:611-622
- Robbins JA, Mc Call PL, Fisher JB, Krezoski JR (1979)** Effect of deposit feeders on migration of <sup>137</sup>Cs in lake sediments. Earth and Planetary Science Letters 42:277-287
- Robertson EL, Liber K (2007)** Bioassays with caged *Hyaella azteca* to determine *in situ* toxicity downstream of two Saskatchewan, Canada, uranium operations. Environmental Toxicology and Chemistry 26:2345-2355

- Saari H-K, Schmidt S, Coynel A, Huguet S, Schäfer J, Blanc G (2007)** Potential impact of former Zn ore extraction activities on dissolved uranium distribution in the Riou-Mort watershed (France). *Science of the Total Environment* 382:304-310
- Sani RK, Peyton BM, Dohnalkova A, Amonette JE (2005)** Reoxidation of reduced uranium with iron(III) (Hydr)oxides under sulfate-reducing conditions. *Environmental Science and Technology* 39:2059-2066
- Scholtz N, Scholtz OF, Potgieter G (2006)** Potential environmental impact resulting from inadequate remediation of uranium mining in the Karoo Uranium Province, South Africa. In: Merkel BJ, Hasche-Berger A (eds) *Uranium in the Environment*. Springer Berlin Heidelberg, p 789-799
- Schultz HD, Zabel M (2000)** *Marine geochemistry*, Springer, Berlin, New York
- Scott MR (1982)** The chemistry of U and Th series nuclides in rivers. In: Ivanovich M, Harmon RS (eds) *Uranium series disequilibrium: Applications to environmental problems* 2<sup>nd</sup> edition. Clarendon Press, Oxford, p 181-201
- Senko JM, Istok JD, Suflita JM, Krumholz LR (2002)** In-situ evidence for uranium immobilization and remobilization. *Environmental Science and Technology* 36:1491-1496
- Senko JM, Mohamed Y, Dewers TA, Krumholz LR (2005a)** Role for Fe(III) minerals in nitrate-dependent microbial U(IV) oxidation. *Environmental Science and Technology* 39:2529-2536
- Senko JM, Suflita JM, Krumholz LR (2005b)** Geochemical controls on microbial nitrate-dependent U(IV) oxidation. *Geomicrobiology Journal* 22:371-378
- Servia MJ, Péry ARR, Heydorff M, Garric J, Lagadic L (2006)** Effects of copper on energy metabolism and larval development in the midge *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology* 15:229-240
- Sheppard SC, Sheppard MI, Gallerand MO, Sanipelli B (2005)** Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *Journal of Environmental Radioactivity* 79:55-83
- Sheppard SC, Sheppard MI, Tait JC, Sanipelli BL (2006)** Revision and meta-analysis of selected biosphere parameter values for chlorine, iodine, neptunium, radium, radon and uranium. *Journal of Environmental Radioactivity* 89:115-137
- Smith CR, Jumars PA, Demaster DJ (1986)** *In situ* studies of megafaunal mounds indicate rapid sediment turnover and community response at the deep-sea floor. *Nature* 323:251-253



- Solan M, Wigham BD, Hudson IR, Kennedy R, Coulon CH, Norling K, Nilsson HC, Rosenberg R (2004)** *In situ* quantification of bioturbation using time-lapse fluorescent sediment profile imaging (f-SPI), luminophore tracers and model simulation. *Marine Ecology-Progress Series* 271:1-12.
- 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
- Stief P (2007)** Enhanced exoenzyme activities in sediments in the presence of deposit-feeding *Chironomus riparius* larvae. *Freshwater Biology* 52:1807-1819
- Stief P, Altmann D, De Beer D, Bieg R, Kureck A (2004)** Microbial activities in the burrow environment of the potamal mayfly *Ephoron virgo*. *Freshwater Biology* 49:1152-1163
- Stief P, De Beer D (2002)** Bioturbation effects of *Chironomus riparius* on the benthic N-cycle as measured using microsensors and microbiological assays. *Aquatic Microbial Ecology*:175-185
- Stief P, De Beer D (2006)** Probing the microenvironment of freshwater sediment macrofauna: Implications of deposit-feeding and bioirrigation for nitrogen cycling. *Limnology & Oceanography* 51:2538-2548
- Stief P, Nazarova L, De Beer D (2005)** Chimney construction by *Chironomus riparius* larvae in response to hypoxia: Microbial implications for freshwater sediments. *Journal of the North American Benthological Society* 24:858-871
- Stigliani WM (1991)** "Chemical Time Bombs" : Definitions, concepts and examples, Basic document 1, ER-91-16, IIASA, Laxenburg, Austria
- Stone AT, Godtfredsen KL, Baolin D (1994)** Sources and reactivity of reductants encountered in aquatic environments. *Chemistry of aquatic systems*:337-374
- Stumm W, Morgan JJ (1981)** *Aquatic Chemistry: An Introduction Emphasizing Chemical Equilibria in Natural Waters*, John Wiley and Sons, New York NY
- Sun Y, Torgersen T (2001)** Adsorption–desorption reactions and bioturbation transport of <sup>224</sup>Ra in marine sediments: a one-dimensional model with applications. *Marine Chemistry* 74:227-243.
- Suzuki Y, Banfield JF (2004)** Resistance to, and accumulation of, uranium by bacteria from a uranium-contaminated site. *Geomicrobiology Journal* 21:113-121
- Svensson JM (1997)** Influence of *Chironomus plumosus* larvae on ammonium flux and denitrification (measured by the acetylene blockage- and the isotope pairing-technique) in eutrophic lake sediment. *Hydrobiologia* 346:157-168

- Svensson JM, Enrich-Prast A, Leonardson L (2001)** Nitrification and denitrification in a eutrophic lake sediment bioturbated by oligochaetes. *Aquatic Microbial Ecology* 23:177-186
- Svensson JM, Leonardson L (1996)** Effects of bioturbation by tube-dwelling chironomid larvae on oxygen uptake and denitrification in eutrophic lake sediments. *Freshwater Biology* 35:289-300
- Swanson SM (1985)** Food-chain transfer of U-series radionuclides in a northern Saskatchewan aquatic system. *Health Physics* 49:747-770
- Tessier A, Campbell PGC (1988)** Partitioning of trace metals in sediments. In: Kramer R, Allen HE (eds) *Metal speciation : Theory, Analysis and Application*. Lewis Publishers Inc., MI, p 183-199.
- Thamdrup B (2000)** Bacterial manganese and iron reduction in aquatic sediments. *Advances in Microbial Ecology* 16:41-84
- Thienemann A (1920)** Untersuchungen über die Beziehungen zwischen dem Sauerstoffgehalt des Wassers und der Zusammensetzung der Fauna in norddeutschen Seen. *Archiv für Hydrobiologie* 12:16-65
- Thomas P, Liber K (2001)** An estimation of radiation doses to benthic invertebrates from sediments collected near a Canadian uranium mine. *Environment International* 27:341-353
- Tissot BP, Welte DH (1984)** *Petroleum Formation and Occurrence*, Springer-Verlag, 538 p.
- Traunspurger W, Bergtold M, Etemeyer A, Goedkoop W (2006)** Effects of copepods and chironomids on the abundance and vertical distribution of nematodes in a freshwater sediment. *Journal of Freshwater Ecology* 21:81-90
- Tsabarlis C, Eleftheriou G, Kapsimalis V, Anagnostou C, Vlastou R, Durmishi C, Kedhi M, Kalfas CA (2007)** Radioactivity levels of recent sediments in the Butrint Lagoon and the adjacent coast of Albania. *Applied Radiation and Isotopes* 65:445-453
- Ueda S, Hasegawa H, Takaku Y, Kondo K (2003)** Behavior of uranium under various redox conditions in a shallow brackish lake. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 256:247-252
- Ure A, Davidson CM (1995)** *Chemical Speciation in the Environment*, Blackie Academic and Professional, London
- Van de Bund WJ, Goedkoop W, Johnson RK (1994)** Effects of deposit-feeder activity on bacterial production and abundance in profundal lake sediment. *Journal of the North American Benthological Society* 13:532-539

- Van Hummelen P, Zoll C, Paulussen J, Kirsch-Volders M, Jaylet A (1989)** The micronucleus test in *Xenopus*: A new and simple 'in vivo' technique for detection of mutagens in fresh water. *Mutagenesis* 4:12-16
- Vannote RL, Minshall GW, Cummins KW, Sedell JR, Cushing CE (1980)** The River Continuum Concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37:130-137
- Vermeulen AC, Dall PC, Lindegaard C, Ollevier F, Goddeeris B (1998)** Improving the methodology of chironomid deformation analysis for sediment toxicity assessment: A case study in three Danish lowland streams. *Archiv für Hydrobiologie* 144:103-125
- Viitasalo S (2007)** Effects of bioturbation by three macrozoobenthic species and predation by necto-benthic mysids on cladoceran benthic eggs. *Marine Ecology Progress Series* 336:131-140
- Vogt C, Belz D, Galluba S, Nowak C, Oetken M, Oehlmann J (2007)** Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) - Baseline experiments for future multi-generation studies. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 42:1-9
- WHO (2004)** Radiological quality of drinking water: Chapter 9, Guidelines for drinking water quality (World Health Organization), 3<sup>rd</sup> edition. Geneva. pp197-209.
- WNA (2007)** [www.world-nuclear.org](http://www.world-nuclear.org)
- Wall JD, Krumholz LR (2006)** Uranium reduction *Annual Review of Microbiology*, p 149-166
- Wan J, Tokunaga TK, Brodie E, Wang Z, Zheng Z, Herman D, Hazen TC, Firestone MK, Sutton SR (2005)** Reoxidation of bio-reduced uranium under reducing conditions. *Environmental Science and Technology* 39:6162-6169
- Wang F, Tessier A, Hare L (2001)** Oxygen measurements in the burrows of freshwater insects. *Freshwater Biology* 46:317-327
- Warren LA, Haack EA (2001)** Biogeochemical controls on metal behaviour in freshwater environments. *Earth-Science Reviews* 54:261-320
- Weber RE (1978)** Respiration. In: Mill PJ (ed) *Physiology of annelids*. Academic Press, London, p 369-392
- Wenzhöfer F, Glud RN (2004)** Small-scale spatial and temporal variability in coastal benthic O<sub>2</sub> dynamics: Effects of fauna activity. *Limnology and Oceanography* 49:1471-1481
- Wheatcroft RA (1990)** Preservation potential of sedimentary event layers. *Geology* 18:843-845

- Wheatcroft RA, Olmez I, Pink FX (1994)** Particule bioturbation in Massachusetts Bay: preliminary results using a new deliberate tracer technique. *J Mar Res* 52:1129-1150
- Wilkins MJ, Livens FR, Vaughan DJ, Lloyd JR (2006)** The impact of Fe(III)-reducing bacteria on uranium mobility. *Biogeochemistry* 78:125-150
- Willett IR, Bond WJ (1995)** Sorption of manganese, uranium, and radium by highly weathered soils. *Journal of Environmental Quality* 24:834-845
- Windom H, Smith R, Alexander C, Niencheski F (2000)** Uranium in rivers and estuaries of globally diverse, smaller watersheds. *Marine Chemistry* 68:307-321
- Wirth D, Christians ES, Drion PV, Dessy-Doize C, Gustin P (2004)** Les protéines de choc thermique (heat shock proteins-Hsps) - II. Hsp70 : biomarqueur et acteur du stress cellulaire. *Annales de Médecine Vétérinaire* 147:127-144
- Wu WM, Gu B, Fields MW, Gentile M, Ku YK (2005)** Uranium(VI) reduction by denitrifying biomass. *Bioremediation Journal* 9:49-61
- Zeman FA, Gilbin R, Alonzo F, Lecomte-Pradines C, Garnier-Laplace J, Aliaume C (2008)** Effects of waterborne uranium on survival, growth, reproduction and physiological processes of the freshwater cladoceran *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 86:370-378
- Zheng Y, Anderson R, Van Geen A, Fleisher M (2002)** Remobilization of authigenic uranium in marine sediments by bioturbation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66:1759-1772
- Zoll C, Ferrier V, Gauthier L (1988)** Use of aquatic animals for monitoring genotoxicity in unconcentrated water samples. In: Kappas A (ed) *Mechanisms of environmental Mutagenesis-Carcinogenesis*. Plenum Press., New York
- Zoumis T, Schmidt A, Grigorova L (2001)** Contaminants in sediments: remobilisation and demobilisation. *Science of the Total Environment* 266:195-202



**GLOSSAIRE**



Adsorption : fixation d'une substance à la surface d'un solide. On différencie l'adsorption physique due à des forces non spécifiques de l'adsorption chimique due à des forces chimiques spécifiques.

Allochtone : ayant pour origine un milieu (ou un compartiment) différent de celui considéré.

Authigène ou néoformé : se dit d'une phase solide formée par précipitation directe ou par altération d'une phase solide préexistante, dans les sédiments ou les matières en suspension.

Autochtone : ayant pour origine le milieu considéré.

Bioaccumulation : phénomène par lequel des êtres vivants absorbent des substances naturellement présentes dans leur biotope ou polluantes et les accumulent dans leur organisme à des concentrations parfois supérieures à celles auxquelles elles se rencontrent dans le milieu naturel.

Biodisponibilité (*bioavailability*) : ensemble des formes chimiques d'un élément susceptibles de traverser les barrières biologiques et d'être accumulées au sein d'un organisme. Elle résulte des interactions avec l'organisme étudié et dépend de la spéciation de l'élément, de la source d'exposition et de l'état physiologique de l'organisme.

Bioirrigation : ventilation des terriers d'invertébrés benthiques tels que les Chironomes grâce aux mouvements branchiaux et à l'ondulation du corps.

Biogène : ayant une origine biologique.

Bioturbation : ensemble des perturbations induites par l'activité des organismes vivant dans le sédiment (creusement de terriers, déplacement, développement racinaire, etc...).

Biogéochimie (*biogeochemistry*) : étude des processus physiques, chimiques et biologiques qui gouvernent le cycle des éléments dans l'environnement.

Chironomes : groupe d'invertébrés appartenant à l'embranchement des Arthropodes, à la classe des Insectes, à l'ordre des Diptères, ayant un cycle de vie hétérométabole (larves aquatiques en eau douce, adulte aérien).

Catagenèse : ensemble des processus géochimiques se déroulant dans les sédiments profonds suite à la diagenèse précoce et qui conduisent à la formation de la roche sédimentaire.

Concentration létale 50 (CL<sub>50</sub>) : indicateur quantitatif de la toxicité d'une substance. Cet indicateur mesure la dose de substance causant la mort de 50 % d'une population d'organismes donnée dans des conditions d'expérimentation précises. La CL<sub>50</sub> correspond à la masse de substance nécessaire pour tuer 50 % des organismes dans un lot. Elle s'exprime en unité de masse de matière active par unité de masse d'organisme. Plus ce chiffre est petit, plus la substance est toxique.



Concentration effective 50 (CE50) : tout comme la CL50, cette valeur est un indicateur quantitatif de la toxicité d'une substance. Elle mesure la dose de substance entraînant un effet qui correspond à 50% de la réponse maximale. La CE50 peut être calculée pour l'ensemble des critères d'effet généralement pris en compte en écotoxicologie (mortalité, taux de reproduction, croissance, etc...)

Contaminant : toute substance ou matière physique, chimique, biologique ou radiologique qui a un effet négatif sur l'atmosphère, l'eau ou le sol.

Contamination : processus par lequel un biotope - et (ou) une population, voire une communauté toute entière - se trouve exposé à un polluant physique, chimique ou radioactif.

Dénitrification : oxydation des nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) et des nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) catalysée par des bactéries anaérobies qui produit de l'azote moléculaire ( $\text{N}_2$ ).

Diagenèse précoce : ensemble des processus physiques, chimiques et biologiques se déroulant au sein des sédiments superficiels immédiatement après leur dépôt et constituant la première étape du phénomène de sédimentation (cf. 3.1 « Biogéochimie des sédiments superficiels »).

Eau interstitielle (pore water) : eau qui occupe les interstices entre les grains d'un sédiment.

Ecosystème aquatique : unité écologique de base constituée d'éléments vivants et non vivants en interaction dans un milieu aqueux.

Macro-invertébrés : invertébrés dont la taille est supérieure à 1mm.

Méiofaune : invertébrés dont la taille varie entre 100 et 1000  $\mu\text{m}$ .

Méthanogenèse : réaction de réduction du  $\text{CO}_2$  et/ou des carbonates en méthane ( $\text{CH}_4$ ).

Micro-organismes : ensemble des organismes microscopiques (bactéries, champignons, micro-algues, virus).

Minéralisation : ensemble des réactions (bio)géochimiques qui transforment la matière organique en minéraux.

Nitrification : réaction d'oxydation de l'ammoniaque ( $\text{NH}_4^+$ ) en nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) qui se déroule en deux étapes : la nitritation et la nitratisation.

Oligochètes : groupe d'invertébrés terrestres ou aquatiques (dulçaquicoles ou marins) d'aspect vermiforme appartenant à l'embranchement des Annélides dont le corps n'est recouvert que de peu (-oligo) de soies (-chètes).

Oxydo-réduction : réactions chimiques qui consistent en un transfert d'électrons entre deux espèces chimiques.

Particules sédimentaires : ensemble des grains (argiles, colloïdes, substances humiques, matière organique...) constituant la phase solide du sédiment.

Radioactivité : propriété qu'ont certains noyaux d'atomes naturels ou artificiels de se désintégrer de manière spontanée pour donner un autre élément, en émettant des particules et/ou des rayonnements ionisants (électromagnétiques ou corpusculaires).

Radioélément : élément chimique dont tous les isotopes sont capables de se désintégrer en émettant des radiations.

Radionucléide : isotope radioactif d'un élément.

Sédiments : dépôts continentaux ou marins provenant de l'altération ou de la désagrégation des roches préexistantes et qui sont transportés par les fleuves, les glaciers ou les vents. Un sédiment est caractérisé par la nature physico-chimique et minéralogique de ses constituants, par leur taille, par leur état de surface et par leur éventuelle cimentation.

Spéciation : ensemble des formes solubles et/ou insolubles sous lesquelles peut se trouver un élément chimique dans un milieu donné.

Sulfato-réduction : réaction d'oxydo-réduction qui réduit les sulfates (+VI) pour donner des sulfures (-II).

Uranium : élément de numéro atomique  $Z = 92$ . Métal argenté, radioactif, malléable et ductile, qui ternit à l'air et est attaqué par la vapeur et les acides. On l'utilise comme combustible nucléaire et dans la fabrication des armes nucléaires. Il est présent à l'état naturel sous la forme d'un mélange comportant trois principaux isotopes toujours associés dans les mêmes proportions:  $^{238}\text{U}$  (99,27%),  $^{235}\text{U}$  (0,72%) et  $^{234}\text{U}$  (0,0053%).

Uranium appauvri : désigne l'uranium dont la teneur en isotope 235, le seul fissile, est inférieure à son niveau naturel (0,72% en masse). Il est principalement obtenu, d'une part en tant que co-produit d'une opération d'enrichissement (autour de 0,3% de  $^{235}\text{U}$ ), d'autre part en tant que sous-produit (1% de  $^{235}\text{U}$ ) d'un traitement de combustible usé après passage en réacteur.

Uranium enrichi : dans les réacteurs nucléaires de la filière à eau légère (où l'eau est le caloporteur), il est nécessaire d'augmenter jusqu'à 2 à 5% la part de l'isotope 235 de l'uranium pour que des réactions en chaîne de fission puissent se produire. On appelle enrichissement, les opérations (physiques ou chimiques selon les procédés) qui permettent de séparer les isotopes de l'uranium pour recueillir un flux enrichi (teneur en isotope  $^{235}\text{U}$  supérieure à 0,7%, teneur de l'uranium minier) et un flux appauvri.



**ANNEXE**



---

## PRÉSENTATION DES PROTÉINES DONT L'EXPRESSION GÉNÉRIQUE A ÉTÉ MESURÉE PAR RT-PCR AU CHAPITRE 5

### 1. Définition d'un biomarqueur moléculaire

En écotoxicologie, on définit comme un biomarqueur, toute réponse biologique (biochimique, cellulaire, physiologique ou comportementale) qui, dans un tissu, dans les liquides corporels ou au niveau d'un organisme dans son ensemble, donne une mesure d'exposition à un toxique et/ou d'effets produits par un ou plusieurs polluants (Depledge, 1994). Parmi l'ensemble des biomarqueurs, les biomarqueurs moléculaires sont des outils particulièrement importants depuis quelques années. Ils permettent d'améliorer l'évaluation du risque d'altérations cellulaires résultant d'une exposition à des xénobiotiques. Beaucoup de molécules intracellulaires ont été proposées ou utilisées comme biomarqueurs. Par exemple, les enzymes cytochrome P450, les métallothionéines et les enzymes antioxydants, qui ont pour fonction de complexer ou de métaboliser des composés nocifs, appartiennent à la catégorie des **biomarqueurs d'exposition**. Ils indiquent la présence de xénobiotiques plutôt que leur toxicité. En revanche, le mécanisme d'induction et la fonction des protéines chaperonnes HSP (*Heat Shock Proteins*) introduisent un lien direct entre les dommages protéiques dans la cellule et le niveau d'expression de ces protéines. La dégradation protéique représente un effet négatif du toxique présent dans l'environnement cellulaire qui peut être détecté par la cellule et contre lequel elle se défend par l'expression de HSP qui préviennent et réparent ces dommages. La mesure de l'induction de HSP dans les cellules est donc considérée comme un **biomarqueur moléculaire d'effet** et est de plus en plus exploité dans les tests toxicologiques.

### 2. Métabolisme des xénobiotiques

L'entrée d'un xénobiotique dans une cellule entraîne tout un ensemble de réactions métaboliques qui vont modifier sa structure chimique. Ces biotransformations agissent le plus souvent comme des processus de détoxification, bien que dans certains cas certains composés intermédiaires puissent causer des effets toxiques. Le métabolisme des xénobiotiques se compose de 3 étapes. Dans la phase I, des protéines enzymatiques, comme les cytochromes P450 oxydases, ajoutent des groupements polaires et/ou réactifs aux xénobiotiques. Ainsi

---

modifiés, ces composés sont alors conjugués avec des molécules anioniques (*e.g.* glutathion, glucuronate, sulfates) dans les réactions de phase II, qui sont catalysées par des protéines enzymatiques de type transférases, comme la glutathion S-transférase. Finalement, dans la phase III, les produits de conjugaison sont reconnus par des transporteurs membranaires (glycoprotéines de la super-famille des *ATP-Binding Cassette* ou ABC) et pompés en dehors de la cellule.

### **3. Présentation des quatre biomarqueurs moléculaires utilisés dans cette étude**

#### **3.1 Remarque importante**

Au cours de cette étude, ce sont les niveaux d'expression des gènes codant pour des protéines biomarqueurs que nous avons mesurés. Ceci a été réalisé par RT-PCR quantitative à partir des animaux entiers, ce qui permet donc de mesurer l'ARNm transcrit à partir de ces gènes, et donc leur niveau d'expression. Ceci n'est pas forcément transférable à la production finale de la protéine, en raison d'autres facteurs de régulation pouvant intervenir, notamment au niveau de la traduction. Néanmoins, une surexpression ou une répression de ces gènes restent significative d'une potentielle induction par une substance toxique ou un stress environnemental. Pour chaque gène étudié, une définition de la protéine correspondante est donnée, puis son rôle biologique est rapidement présenté. Quelques éléments de régulation de l'expression génique sont également rapportés.

Ces quelques données ont été collectées dans des documents de synthèse (thèses de doctorat, revues, livres) dont les références sont rapportées en fin de paragraphe.

#### **3.2 Métallothionéines**

*Définition* – Le terme métallothionéines (MTs) désigne un ensemble de protéines non enzymatiques cytoplasmiques, riches en soufre et en métaux, avec comme principales caractéristiques un faible PM (3500 à 14000 Da), une forte teneur en cystéine (30%), l'absence d'acides aminés aromatiques et d'histidine, et une induction de leur synthèse par les métaux. Les MTs sont ubiquistes dans le règne animal et ont également été décrites chez les végétaux et chez les procaryotes.

Elles existent *in vivo* sous forme libre, sans métal (apoprotéines ou thionéines), et sont capables de fixer de façon non covalente des ions métalliques (des groupes Ib et IIb du

---

tableau de Mendeleïev) par l'intermédiaire de groupes thiols sur les nombreux résidus de cystéine présents sur leur chaîne polypeptidique.

*Rôle biologique* – Bien que les fonctions des MTs ne soient pas encore entièrement connues, un de leurs rôles majeurs semble être lié à la régulation intracellulaire du métabolisme des métaux. Ces protéines sont responsables (i) de la régulation du métabolisme des métaux essentiels en réponse à des modifications physiologiques, (ii) et de la détoxification et du stockage des métaux lourds. Dans ce dernier cas, les MTs immobilisent les ions libres, qui sont souvent les formes biodisponibles et toxiques de ces éléments, et inhibent ainsi leur action sur d'autres molécules comme des macromolécules essentielles. L'efficacité des métallothionéines en tant que protecteurs intracellulaires face aux agents alkylants, aux radicaux libres et aux radiations a également été démontrée bien que les mécanismes d'action soient encore mal connus.

*Régulation* – L'expression des gènes codant pour les MTs peut être induite par une large variété de stimuli, comme une exposition à un métal, le stress oxydatif, les glucocorticoïdes. Le niveau d'induction de ces facteurs dépend de certaines séquences promotrices sur ces gènes. Les séquences régulant l'activité transcriptionnelle sous l'effet d'ions métalliques sont appelées MRE pour « *Metal Responsive Element* ». Outre ces motifs dont il existe une grande multiplicité, il existe une autre région répondant à la stimulation par des hormones stéroïdes appelée GRE pour « *Glucocorticoid Responsive Element* » et une région répondant aux radicaux libres et autres agents oxydants appelée ARE pour « *Antioxydant Responsive Element* ». Ces motifs permettent une augmentation du taux de transcription des gènes de métallothionéines en cas de stimulation hormonale ou de stress oxydant. La délétion de cette région n'affecte pas le niveau d'expression basal ni le niveau induit par l'action des ions métalliques.

### **3.3 Cytochromes P450 (CYP450-1A1)**

*Définition* – Les cytochromes P450 (CYP450) sont des hémoprotéines localisées sur le réticulum endoplasmique ou dans les mitochondries, que l'on retrouve dans tous les domaines du vivant. Leur nom est lié à la présence d'un pigment dont le pic d'absorption se situe à 450 nm. Ceux sont des enzymes-clés dans la fonction de détoxification cellulaire. Ils composent une famille multigénique de monooxygénases qui ont acquis un degré de diversité élevé au cours de l'évolution, leur permettant de métaboliser de très nombreux corps chimiques.



*Rôle biologique* – Les CYP450 sont impliqués d'une part dans le métabolisme des substances endogènes, notamment dans les processus de biosynthèse (e.g. catalyse de l'hydroxylation des stéroïdes, des vitamines, des acides biliaires). D'autre part, ces protéines jouent un rôle important dans le métabolisme des xénobiotiques en catalysant un très grand nombre de biotransformations. Dans la plupart des cas, la substance exogène étant dépourvue d'activité biologique, sa transformation permet de faciliter son élimination par ajout de groupements polaires. Une étape de conjugaison peut éventuellement s'ajouter et achever le mécanisme de détoxification initié par le cytochrome. Dans les cas où le produit de biotransformation présente une activité biologique, cela peut conduire à la formation de substances bénéfiques (prodrugs) ou toxiques (précancérogènes) pour l'organisme.

Les CYP450 de la sous famille 1A (CYP450-1A) sont particulièrement connus pour leur action de détoxification. Le CYP1A1 est notamment inductible par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) et constitue de ce fait un biomarqueur d'exposition à ces polluants. Chez les organismes aquatiques, ce cytochrome peut s'avérer être un bon marqueur de pollution de l'eau par les hydrocarbures.

*Régulation* – La variabilité d'expression des CYP450 est modulée à deux niveaux : (i) par des facteurs non génétiques (e.g. conditions environnementales, sexe, stade de développement, physiologie, pathologies, tissus), (ii) et par des facteurs génétiques (polymorphisme). Parmi les facteurs non génétiques, on distingue les effets de facteurs endogènes et exogènes. Les premiers sont principalement liés aux hormones sexuelles et thyroïdiennes qui régulent les gènes cyp450 à des niveaux transcriptionnels, mais aussi aux mécanismes d'inflammation lors de pathologies où les cytokinines régulent négativement les gènes cyp450 à des niveaux transcriptionnels et pré-traductionnels. Concernant les facteurs exogènes, l'induction des cyp450 par les xénobiotiques est un procédé de régulation assez lent car il fait intervenir un mécanisme transcriptionnel complexe. De plus, même si l'activité transcriptionnelle est souvent à l'origine de l'induction, une stabilisation de la protéine ou de l'ARNm peut également être impliquée.

### **3.4 Heat Shock Proteins (HSP)**

*Définition* – Les *Heat Shock Proteins* (HSP) correspondent à une famille de protéines dont l'expression est accrue lorsque les cellules sont exposées à une augmentation de la température ou à d'autres facteurs de stress. L'expression génique de ces protéines est régulée

---

à un niveau transcriptionnel principalement par des HSF (*Heat Shock Factors*) et représente une étape-clé de la HSR (*Heat Shock Response*).

La nomenclature des HSP est basée sur le poids moléculaire. Par exemple, HSP 60, HSP 70, HSP 90 font référence aux familles de HSP d'environ 60, 70 et 90 kDa, respectivement. On retrouve ces protéines dans tous les organismes vivants, des procaryotes à l'homme. La famille HSP70 représente certainement la famille de HSP la plus étudiée et la plus conservée sur le plan phylogénique.

*Rôle/Induction* – La plupart des HSP70 sont des protéines chaperonnes exprimées de manière constitutive. Elles participent au maintien de l'homéostasie cellulaire en protégeant et en régulant les fonctions des protéines auxquelles elles sont associées. Elles se distinguent des autres protéines par le fait qu'elles possèdent plus d'acides aminés capables d'établir de fortes interactions entre eux, ce qui les rend moins sensibles à la chaleur. Selon la plus ou moins bonne conformation d'une protéine, une HSP70 va pouvoir s'y associer ou non. Ainsi, la protéine peut être dirigée vers le protéasome pour y être dégradée, ou bien la HSP70 associée va servir de squelette à la protéine pour éviter sa dénaturation sous l'effet de la chaleur.

Dans des conditions normales, le degré d'expression des HSP70 est dépendant de l'activité métabolique. L'exposition d'une cellule à un traitement toxique induit trois étapes successives : (i) une étape d'altération qui se traduit par la dégradation de protéines ayant pour conséquence la perte de leur fonction et la formation d'agrégats insolubles, (ii) dans un second temps, une activation transcriptionnelle des gènes hsp aboutissant à la synthèse de HSP70, dont le taux cellulaire devient bien plus élevé que dans des conditions normales (réponse au choc thermique proprement dite), et (iii) enfin, une phase de récupération, durant laquelle les altérations morphologiques sont corrigées. Les protéines retrouvent des activités enzymatiques similaires à leurs valeurs initiales, et l'activation des gènes hsp est alors interrompue.

En plus du choc thermique, de nombreux stress, tels que l'exposition à certains agents chimiques (*e.g.* métaux lourds, oxydants, radicaux libres, éthanol), physiques (*e.g.* radiations, hypoxie), et biologiques (*e.g.* inflammation, infection, cancer) ont été identifiés comme inducteurs de la synthèse de HSP70. De plus, de nombreux travaux ont montré que la réponse des HSP70 était durée- et dose-dépendante, ce qui en fait un biomarqueur particulièrement intéressant. Une nuance doit tout de même être apportée à cela, car cette réponse dépend aussi du stimulus. Non seulement certains toxiques n'induisent pas de HSP70 malgré une

cytotoxicité démontrée mais la sensibilité et la précocité de la réponse diffèrent aussi d'un stress à l'autre.

*Régulation* – Chez les eucaryotes supérieurs, la régulation de l'expression des HSP70 se fait au niveau transcriptionnel. L'ARNm des gènes hsp inductibles ne comportant pas d'intron, il ne nécessite pas de maturation nucléaire et est rapidement disponible dans le cytoplasme où sa séquence « *leader* » favorise sa traduction. L'induction des hsp requiert l'activation et la translocation dans le noyau du facteur de transcription HSF, qui va alors reconnaître des séquences spécifiques, présentes en copies multiples dans le promoteur des gènes hsp, les HSE pour " *Heat Shock Elements* ".

### **3.5 MRP (Multi-drug Resistance-associated Proteins)**

*Définition* – Les MRP sont des glycoprotéines membranaires appartenant à la super-famille des transporteurs ABC (*ATP-Binding Cassette*). Leur nom fait référence à leur rôle potentiel dans la résistance multi-drogues en médecine, phénomène qui diminue notamment l'efficacité des chimiothérapies.

*Rôle* – Ces protéines jouent un rôle essentiel de détoxification et de défense contre le stress oxydatif. Ce sont des transporteurs membranaires ATP-dépendants qui permettent de pomper vers le milieu extra-cellulaire une grande variété de complexes anioniques hydrophobes. Les MRP sont donc efficaces pour éliminer les produits des biotransformations des xénobiotiques après leur oxydation/conjugaison par les cytochromes P450 et les transférases. Parmi les composés pouvant être ainsi rejeté hors de la cellule, on peut trouver divers ions, des drogues anticancéreuses, des antibiotiques, des pigments, des peptides, des phospholipides, ainsi que certains complexes de métaux lourds.

*Régulation* – Les mécanismes de régulation et d'induction de ces protéines sont relativement complexes. De façon générale, ils sont relatifs aux facteurs agissant sur l'expression des enzymes des phases I du métabolisme des xénobiotiques (*e.g.* CYP450).

## **4. Références de l'annexe**

Depledge MH (1994) The rational basis for use of biomarkers as ecological tools. In: Fossi MC, Leonzio C (eds) Non destructive biomarkers in vertebrates. Boca Raton, p 271-295

- Gerbal-Chaloin S (2000) Etude de la régulation des CYP450, Thèse de doctorat de l'Université Montpellier I, [www.biochimie.univ-montp2.fr/maitrise/reinhard/these-sabine.pdf](http://www.biochimie.univ-montp2.fr/maitrise/reinhard/these-sabine.pdf).
- Hardivillier Y (2005) Caractérisation et expression des gènes de métallothionéines chez deux modioles hydrothermales : *Bathymodiolus thermophilus* et *Bathymodiolus azoricus*, Thèse de doctorat de l'Université du Maine, UFR Sciences et Techniques.
- Homolya L, Váradi A, Sarkadi B (2003) Multidrug resistance-associated proteins: Export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate. *Biofactors* 17:103-114
- Pelletier E, Denizeau F, Campbell PGC (2004) Écotoxicologie moléculaire : principes fondamentaux et perspectives de développement, Saint-Foy (Québec) : Presses de l'Université du Québec
- Wirth D, Christians ES, Drion PV, Dessy-Doize C, Gustin P (2004) Les protéines de choc thermique (heat shock proteins-Hsps) - II. Hsp70 : biomarqueur et acteur du stress cellulaire. *Annales de Médecine Vétérinaire* 147:127-144





**Résumé** – Dans les écosystèmes aquatiques continentaux, les sédiments représentent un compartiment d'accumulation pour les polluants métalliques comme l'uranium. Secondairement, ils peuvent également se comporter comme des sources endogènes de contamination, par remise en suspension (*e.g.* crues, bioturbation) ou par évolution de la spéciation des métaux, laquelle va également jouer sur leur biodisponibilité. En effet, les composés métalliques peuvent être transformés en composés plus ou moins toxiques ou inertes sous l'effet de modifications des conditions physico-chimiques (*e.g.* pH, conditions rédox, force ionique) et microbiologiques du sédiment. Ces conditions sont elles-mêmes sous le contrôle de l'activité des macro-invertébrés benthiques *via* les processus de bioturbation. L'objectif principal de ce doctorat a été de déterminer l'influence de la bioturbation de deux espèces de macro-invertébrés benthiques (*Chironomus riparius* et *Tubifex tubifex*) sur la répartition et les transferts de l'uranium dans le sédiment des écosystèmes aquatiques continentaux. Pour cela, des expériences en laboratoire ont été réalisées pour (i) évaluer les effets de l'uranium sur les macro-invertébrés benthiques, plus particulièrement sur leur activité de bioturbation, (ii) déterminer l'influence de ces organismes sur le comportement de l'uranium grâce à des mesures physico-chimiques à haute résolution (*e.g.* optodes à oxygène, gels DET), et (iii) appréhender les conséquences de ces interactions sur un organisme de la colonne d'eau, *Xenopus laevis*, *via* des mesures de génotoxicité (essai micronoyaux) et de biomarqueurs moléculaires (taux d'expression d'un certain nombre de gènes codant pour des protéines induites lors de stress environnementaux). Les principaux résultats obtenus montrent que l'intensité de la bioturbation des macro-invertébrés peut être diminuée dans un sédiment contaminé par de l'uranium, mais que les espèces étudiées dans cette étude présentent une bonne tolérance. Pour des concentrations en uranium élevées (>100 fois le bruit de fond géochimique naturel), correspondant cependant à des concentrations relevées dans des sites très contaminés, les vers *T. tubifex* sont capables de maintenir une activité de bioturbation suffisante pour entraîner une forte remobilisation de l'uranium (facteur 2 à 10) initialement associé au sédiment vers la colonne d'eau. Ceci représente donc un risque potentiel pour le reste de la biocénose aquatique. Cependant, en voulant tester cette hypothèse sur *X. laevis*, il a été constaté de façon surprenante que le comportement des vers pouvait être modifié en présence de cet organisme dans la colonne d'eau et qu'ainsi l'effet sur le relargage d'uranium vers la colonne d'eau était modifié, aboutissant à des concentrations moins élevées dans l'eau. Toutefois, l'uranium associé au sédiment, sans l'effet de la bioturbation, induit des effets négatifs sur cet organisme pélagique. Au final, ce travail de thèse a permis de décrire les interactions pouvant exister entre les organismes aquatiques, la biogéochimie du sédiment et un polluant métallique comme l'uranium. Les résultats originaux obtenus permettent d'envisager de façon plus précise les conséquences d'une pollution à l'uranium dans l'environnement aquatique. Plus globalement, les travaux de recherche entrepris dans le cadre de cette thèse contribueront à améliorer les connaissances actuelles en vue d'une meilleure évaluation des risques écologiques des écosystèmes aquatiques contaminés par des polluants.

**Abstract** – In freshwater ecosystems, sediments act as an accumulation compartment for metallic pollutants as uranium. Secondary, there can also represent endogenous sources of contamination by resuspension (*e.g.* flood, bioturbation) or changes of metal speciation that acts upon their bioavailability. Indeed, metallic compounds can be transformed in more or less toxic or inert compounds through physico-chemical (*e.g.* pH, redox conditions, ionic force) and microbiological variations. These conditions are themselves under the effects of benthic macro-invertebrate activities *via* bioturbation processes. The main objective of this PhD was to determinate the influence of two benthic macroinvertebrate species (*Chironomus riparius* and *Tubifex tubifex*) on the distribution and the transfers of uranium within freshwater sediments. To reach this goal, laboratory experiments were performed in order to (i) assess the effects of uranium on benthic macroinvertebrates, more particularly on their bioturbation activity, (ii) determine the influence of these organisms on uranium behaviour through high resolution physico-chemical measurements (*e.g.* oxygen optodes, DET gel probes), and (iii) estimate the consequences of these interactions on pelagic organisms *via* genotoxicity measurements (micronuclei assay and molecular biomarkers analysis on *Xenopus laevis*). The results demonstrate that bioturbation intensity of macroinvertebrates can be affected in uranium-contaminated sediments, but the two species studied in this work show a relative tolerance. For high uranium concentrations (>100 times the geochemical background level), corresponding however to realistic concentrations in highly contaminated sites, *T. tubifex* worms are able to maintain a sufficient bioturbation activity that induces a high remobilization of uranium initially associated with sediments to the overlying water (factor 2 to 10). That represents therefore a potential risk for the remaining aquatic biocenosis. However, by testing this assumption on *X. laevis*, it was surprisingly noticed that the worms' behaviour can be modified in presence of this organism in the water column. The effect of bioturbation on uranium release from the sediments was thus altered conducting to lower uranium concentrations in the water column. Nevertheless, sediment-associated uranium, without the effect of bioturbation, induces negative effects on this pelagic organism.

Finally, this PhD work illustrates the interactions that can exist between aquatic organisms, sediment biogeochemistry and a metallic pollutant as uranium. The novel results obtained permit to view more precisely the consequences of uranium pollution in aquatic environment. More globally, this work will contribute to a better assessment of ecological risks in polluted aquatic ecosystems.