

# Contrôle de la bioaccumulation des métaux par deux organismes modèles du milieu aquatique

Bastien Pellet, Catherine Gourlay\*, Emmanuelle Kuhn, Thomas Kermoal, Frédéric Nicolle, Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin

Cemagref. Unité de recherche Hydrosystèmes et Bioprocédés. Parc de Tourvoie, BP 44. 92163

Antony Cedex

\* catherine.gourlay@cemagref.fr

1. Contexte et objectifs.....	1
2. Influences de la température et de la concentration en calcium sur la bioaccumulation du cadmium chez <i>gammarus pulex</i> .....	2
2.1. Matériel et méthodes .....	2
2.1.1 Prélèvement des gammars, puis acclimatation .....	2
2.1.2 Exposition au cadmium dans des eaux de différentes concentrations en calcium.....	2
2.1.3 Exposition dans des eaux de différentes températures .....	3
2.1.4 Traitement des échantillons.....	4
2.1.5 Cadre de l'interprétation .....	5
2.2. Résultats .....	5
2.2.1 Influence du calcium sur l'accumulation du cadmium dans <i>Gammarus pulex</i> .....	5
2.2.2 Influence de la température sur l'accumulation du cadmium dans <i>G. pulex</i> . .....	7
3. Bioaccumulation du cadmium chez la moule zébrée .....	8
3.1. Matériels et méthodes.....	9
3.1.1 Prélèvement des dreissènes et maintien au laboratoire.....	9
3.1.2 Expérience préliminaire : dimensionnement des expériences de bioaccumulation.....	9
3.1.3 Cinétique de bioaccumulation du cadmium dissous.....	9
3.1.4 Dépuration du cadmium en conditions contrôlées .....	10
3.1.5 Prélèvements, traitements des échantillons, et mesures .....	10
3.2. Résultats. ....	11
3.2.1 Cinétiques de bioaccumulation du Cd en laboratoire.....	11
3.2.2 Dépuration du Cadmium par les moules zébrées. ....	13
3.3. Interprétation : détermination des constantes de toxico-cinétiques.....	13
4. Conclusions .....	14
5. Bibliographie.....	14

## 1. Contexte et objectifs

La mise en œuvre de la directive cadre européenne sur l'eau rend nécessaire d'établir un lien entre l'état écologique des milieux et la pression anthropique qu'ils subissent, en particulier du fait de rejets ou de pollution diffuse par les micro-contaminants. L'un des premiers signes de contamination « active » ou biodisponible, c'est à dire susceptible d'altérer certaines fonctions biologiques est la bioaccumulation des contaminants par les organismes. Cette bioaccumulation peut être évaluée en analysant les tissus biologiques d'organismes modèles prélevés sur site.

Il reste difficile d'établir des relations simples entre cette bioaccumulation observée et la contamination chimique du milieu. En effet, l'interprétation devrait prendre en compte non seulement la variabilité environnementale (modification de la biodisponibilité des contaminants selon la matrice organique, la situation hydrologique, la saison...), mais aussi la variabilité biologique. En effet, les traits de vie, les régimes alimentaires et enfin les métabolismes dépuratoires variés qui caractérisent des espèces différentes modulent la réponse biologique à l'exposition environnementale.

Une façon de prendre en compte ces éléments est d'étudier l'accumulation et la dépuration des espèces considérées, dans des milieux d'exposition de plus en plus proches de la réalité des milieux aquatiques. Cette approche permet en effet de déterminer les principaux facteurs biologiques et environnementaux qui modulent les mécanismes de bioaccumulation, puis de les modéliser afin de rendre interprétables les données obtenues in situ sur la contamination chimique et la bioaccumulation des organismes du milieu.

Dans le cadre de la phase 5 du PIREN-Seine, nous avons choisi de nous intéresser à deux espèces modèles complémentaires : le gammare (*Gammarus pulex*), crevette détritivore, et la dreissène, (*Dreissena polymorpha*), ou moule zébrée, un mollusque filtreur. Ces deux organismes sont présents dans les milieux aquatiques du bassin versant de la Seine. Le travail effectué en 2007 visait, pour ces deux organismes, à comprendre en laboratoire la toxico-cinétique du cadmium dissous en conditions contrôlées.

## **2. Influences de la température et de la concentration en calcium sur la bioaccumulation du cadmium chez *gammarus pulex***

Depuis, 2005, la bioaccumulation des métaux est étudiée chez *Gammarus pulex* au Cemagref d'Antony. Les protocoles d'exposition au laboratoire sont donc bien maîtrisés, de même que le formalisme d'interprétation des toxico-cinétiques d'accumulation au moyen du modèle biodynamique (Luoma et Rainbow, 2005). En 2006, nous avons pu montrer l'impact des matières organiques dissoutes sur la bioaccumulation, et la pertinence de la technique de gradient de Diffusion en couche Mince (DGT, Davison et Zhang, 1994) pour estimer le cadmium biodisponible.

En 2007, les travaux de laboratoire visaient à étudier l'influence d'autres paramètres physico-chimiques sur les cinétiques de bioaccumulation. Les concentrations en calcium et la température ont été étudiés (Kermaal, 2007).

### **2.1. Matériel et méthodes**

#### **2.1.1 Prélèvement des gammares, puis acclimatation**

Les gammares ont été prélevés début avril 2007 dans le Lieutel à la Bardelle, un ru en amont du bassin versant de la Seine. Le prélèvement est effectué avec un filet Surber (utilisé pour les IBGN) en remontant le courant. Les gammares sont triés par taille grâce à des tamis de tailles décroissantes. On récupère les gammares entre les tamis de 2,5mm et 2mm, i.e de taille adulte. Une détermination taxonomique sur 30 individus atteste que les gammares échantillonnées étaient bien tous de l'espèce *Gammarus pulex*. Les gammares prélevés ramenés au laboratoire, ont été répartis dans 3 aquariums en plastique remplis avec de l'eau du terrain filtrée (500 µm) et oxygénée, dans une étuve à environ 9°C. L'eau du premier bac a été progressivement remplacée par de l'eau à basse concentration en calcium (eau minérale de source Grand Barbier contenant 3,5mg/L de calcium). L'eau du second bac a été progressivement remplacée par de l'eau par de l'eau Montdor contenant 88 mg/L de calcium. Enfin l'eau du troisième bac a été progressivement remplacée par de l'eau Montdor dans laquelle a été rajouté du chlorure de calcium de façon à obtenir une concentration en calcium égale à 174 mg/L. Le renouvellement d'eau a été fait en 3 fois, en 7 jours (en remplaçant 1/3 du milieu la première fois, puis 2/3 puis l'intégralité de l'eau la dernière fois). Nous avons cessé de nourrir les gammares 5 jours avant le début de l'exposition.

#### **2.1.2 Exposition au cadmium dans des eaux de différentes concentrations en calcium**

##### Schéma expérimental

L'objectif de cette expérience est de mesurer des variations éventuelles d'influx de cadmium dans *Gammarus pulex* en fonction de la concentration en calcium du milieu d'exposition. Pour mesurer ces variations, nous avons effectué des expositions en conditions contrôlées en laboratoire dans des milieux contenant diverses concentrations en calcium et en cadmium pendant une durée de 48 heures.

Afin d'étudier l'influence de la concentration en calcium sur les influx d'accumulation de Cd, nous avons constitué 3 milieux ayant respectivement pour concentration en calcium 4,1mg/L, 96mg/L et 200mg/L (la composition de ces eaux est détaillée en annexe). Dans chacun de ces milieux, nous avons exposé les gammares à 4 concentrations en cadmium: 0 µg/L, 1 µg/L, 3 µg/L et 9 µg/L, soit 12 milieux d'exposition au total. Pour chacun de ces 12 milieux, nous avons choisi de faire 3 réplicats d'accumulation. Cela représente donc 36 béchers en plastiques d'une contenance d'environ 700 mL. Les gammares n'ont pas été nourris pendant l'exposition. La figure 10 synthétise les milieux d'exposition choisis :

*Tableau 1 : Schéma expérimental de l'expérience d'exposition de Gammarus pulex à diverses concentrations de cadmium et de calcium. Une croix symbolise un b cher d'exposition. L'expérience est réalisée en triplicats pour chaque couple (Ca ;Cd)*

		Concentration en cadmium (en µg/L)			
		0	1	3	9
Concentration en calcium (en mg/L)	4	x x x	x x x	x x x	x x x
	96	x x x	x x x	x x x	x x x
	200	x x x	x x x	x x x	x x x

#### Echantillonnage des gammares

Pour cette expérience, un prélèvement de gammares a été effectué à 12h, 24h, 36h et 48h. Un prélèvement a également été effectué dans les bacs d'acclimatation juste avant le début de l'exposition. Au moment du changement d'eau, l'eau et les gammares sont versés dans un plat en verre. 5 gammares par échantillon sont alors prélevés à l'aide d'un morceau de tamis. Ils sont placés dans un tube Eppendorf Reak CC PP HT d'une contenance de 1,5mL

#### Contrôle des concentrations en cadmium

L'eau a été renouvelée toutes les 12 heures. Un échantillon d'eau a été prélevé dans chaque b cher au début et à la fin de chaque période de 12h. Pour constituer un échantillon, 4,95mL d'eau sont prélevés et introduits dans un tube en polypropylène. On y ajoute ensuite 50µL d'acide supra pur 65% (Merck). Les échantillons sont conservés au froid jusqu'à analyse par spectrophotométrie à absorption atomique. Dans la mesure où les matières particulières dans l'eau sont supposées très faibles, nous assimilons cette mesure à celle du cadmium dissous.

#### Contrôle de la concentration en calcium

Aux temps 12h après changement d'eau et 36h avant changement d'eau, le calcium contenu dans un des trois réplicas pour chaque accumulation a été mesuré. Les concentrations en calcium ont été mesurées au moyen d'un chromatographe DIONEX DX-120.

#### Préparation et renouvellement des eaux d'exposition

Pour chaque milieu, l'intégralité de l'eau utilisée a été préparée en début d'expérience et stockée dans un jerrican en PVC propre. Les solutions de cadmium ont été obtenues par dilution d'une solution mère contenant 1g/L de cadmium. Cette solution mère a été obtenue par dissolution de sel de cadmium ( $CdN_2O_6 + 4(H_2O)$ ) dans de l'eau distillée. Les b chers ont été pré-exposés durant 24h avant le début de l'expérience, pour palier à une éventuelle adsorption du cadmium dissous sur leurs parois. L'expérience est réalisée en conditions semi-statiques dimensionnée pour que les variations des concentrations en métal restent négligeables (<5%, selon les cinétiques antérieurement observées à Ca = 99mg/L).

### **2.1.3 Exposition dans des eaux de différentes températures**

#### Milieux d'exposition

*Gammarus pulex* vit dans des eaux dont la température est comprise entre 2 et 17 degrés. Nous avons exposé des gammares   différentes concentrations de cadmium dans pièces thermostatées respectivement à 15,4 C, 11,2 C et 7,8 C. La même eau minérale a été utilisée dans tous les bacs.

Tableau 2: Schéma expérimental de l'expérience d'exposition de *Gammarus pulex* à diverses concentrations de cadmium et températures

		Concentration en cadmium en µg/L			
		0	0,5	2	8
Température d'exposition en °C	7,8		x	x	x
	11,2		x	x	x
	15,4	x	x	x	x

#### Acclimatation à l'eau minérale utilisée dans l'expérience

Les gammars prélevés, une fois ramenés au laboratoire, ont été répartis dans 3 bacs et placés dans une étuve à froid à une température d'environ 11°C. L'eau des bacs a été progressivement remplacée par l'eau minérale faiblement calcique utilisée pour l'exposition. Le renouvellement d'eau a été fait en 3 fois, sur 5 jours (cf. 2.4.2).

Le 5<sup>e</sup> jour, juste après le dernier changement d'eau, les bacs ont été placés dans les pièces thermostatées utilisées pour les expériences. L'eau des bacs a ainsi été mise en une douzaine d'heures à la température de la pièce. Ils ont été maintenus à cette température quelques heures avant le début des expériences. Nous avons cessé de nourrir les gammars 5 jours avant le début de l'exposition.

#### Echantillonnage des gammars

Dans chaque bac, nous avons choisi de prélever 3 échantillons de 5 gammars à 6h ; 12h ; 24h ; 48h. Les gammars sont prélevés directement dans les bacs avec un morceau de tamis. Ils ont ensuite été mis à baigner dans de l'eau du robinet pendant 1 à 3 minutes afin de les rincer et de désorber en partie le cadmium possiblement adsorbé. Puis les gammars ont été placés dans des "épuisettes" fabriquées à partir de tube Eppendorf Reak 1mL PP dont la base a été tranchée et remplacée par du tamis. Cette technique permet une évaporation plus rapide de l'eau adsorbée sur les gammars et contenue dans les gammars lors de leur passage à l'étuve.

#### Contrôles dans les eaux (Cd et T)

Trois prélèvements par bacs ont été effectués, aux heures 0, 24 et 48. La température a été suivie à l'aide de sondes de température Prosensor, avec une mesure toutes les 20 minutes pendant la totalité de l'expérience.

#### Préparation et renouvellement des milieux d'exposition

Le cadmium a été introduit à partir d'une solution mère contenant 1g/L de cadmium, elle-même constituée par dissolution de nitrate de cadmium dans de l'eau distillée. Nous avons mis les solutions d'exposition pendant 24h avant le début de l'expérience dans les bacs, puis nous avons renouvelé l'eau pour tenter de réduire l'adsorption sur les parois des bacs en cours d'expérience.

Dans cette expérience, il n'a pas été nécessaire de renouveler l'eau des bacs. En effet, chaque bac contenait environ 70 gammars. En première approximation, le volume d'eau filtré par jour par les gammars sera d'environ 210mL. Sur 48h, le cadmium présent dans un volume d'eau équivalent à environ 420mL sera accumulé par les gammars, ce qui représente une variation de moins de 5% du volume des bacs qui est de 15L.

#### **2.1.4 Traitement des échantillons**

Les échantillons d'eau sont acidifiées à pH 2 (par ajout d'1% en volume HNO<sub>3</sub>) puis analysés par spectroscopie par absorption atomique (SAA Spectraa 220, Varian four graphite, correction Zeeman).

Les échantillons de gammars sont séchés dans une étuve à 50°C pendant 3 à 7 jours. Ils sont ensuite transférés dans un dessiccateur pendant quelques dizaines de minutes. Puis les gammars sont introduits dans des tubes Sarsted 15mL préalablement pesés. Une fois remplis, les tubes sont de nouveaux pesés et la différence de poids avant et après introduction des gammars permet d'obtenir la masse sèche des gammars.

Les gammares sont ensuite minéralisés à froid, suivant le protocole :

jour 1: ajout de 50 µL/mg d'acide nitrique (65% supra pur Merck)

jour 2: ajout de 20 µL/mg de peroxyde d'hydrogène (30% supra pur Merck)

jour 7: ajout de 230 µL/mg d'eau milli-Q (ELGA résistivité > 17 MΩ.cm)

Les échantillons sont ensuite dilués pour contenir 10% d'acide. Les minéralisats sont analysés par spectroscopie par absorption atomique (SAA Spectraa 220, Varian four graphite, correction Zeeman). On déduit ensuite la concentration dans les gammares de la concentration mesurée dans le minéralisat.

### 2.1.5 Cadre de l'interprétation

L'équation du modèle biodynamique (Luoma et Rainbow, 2005) permet d'exprimer la concentration en cadmium bioaccumulé en fonction du temps pour des gammares initialement propres:

$$C_A(t) = \frac{k_u \cdot C_w + AE \cdot IR \cdot C_f}{k_e} (1 - e^{-k_e \cdot t})$$

En l'absence de nourriture, le terme  $AE \cdot IR \cdot C_f$  devient nul. En choisissant de mesurer la bioaccumulation sur des temps courts, on peut de nouveau simplifier l'équation en effectuant un développement limité au premier ordre. On trouve alors, dans la limite de  $t$  petit devant  $1/k_e$  :

$$C_A(t) = k_u \cdot C_w \cdot t$$

On voit qu'en théorie, et dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus, la courbe représentative de la concentration bioaccumulée en fonction du temps est une droite, dont la pente vaut  $k_u \cdot C_w$ . Ensuite, en traçant le produit  $k_u \cdot C_w$  (que nous appellerons par la suite influx de cadmium) en fonction de  $C_w$ , on obtient théoriquement une droite de pente  $k_u$ . C'est de cette manière que nous tenterons de déterminer  $k_u$  et de mesurer ses éventuelles variations avec les conditions physico-chimiques du milieu.

Les moyennes, les écart-types entre les réplicats, les pentes des régressions linéaires et les écart-types associés ont été calculés via les fonctions du logiciel Excel. Les intervalles d'erreur autour d'une valeur déduite d'un calcul de moyenne ou de régression linéaire ont été fixés à plus ou moins 2 écarts types.

## 2.2. Résultats

### 2.2.1 Influence du calcium sur l'accumulation du cadmium dans *Gammarus pulex*.

Influence de  $Ca^{2+}$  sur la bioaccumulation Cd par voie dissoute chez *Gammarus pulex*.

La Figure 1 montre que la contamination en cadmium des gammares exposés pendant 48h dans l'eau faiblement calcique est environ 8 fois supérieure à celle des gammares exposés en milieu fortement calcique. La cinétique de contamination est également modulée par la présence de calcium. Nous caractérisons cette cinétique par la constante  $k_u$  (en L/g.j), obtenue en normalisant les influx initiaux de Cd dans les gammares par la concentration d'exposition (Lacour, 2006). Cette constante représente la vitesse à laquelle le cadmium biodisponible contamine les gammares et est utilisée dans les modèles biodynamiques.

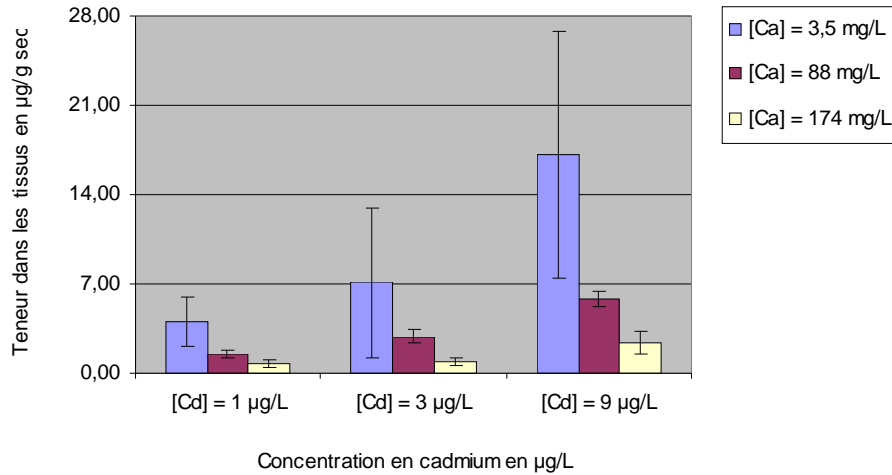


Figure 1. Teneurs en Cd dans les tissus des gammares au bout de 48h d'exposition à 1µg/L, 3 µg/L et 9 µg/L de Cd, dans des milieux de dureté variable.

Les résultats expérimentaux présentés sur la Figure 2 démontrent l'effet protecteur du calcium puisque la valeur de  $k_u$  mesurée (la pente dans le graphique Figure 2) décroît lorsque la concentration en calcium augmente. Les expériences menées permettent de quantifier l'influence de tels facteurs de contrôles géochimiques de l'eau d'exposition sur la valeur de  $k_u$ .  $k_u$  prend les valeurs respectives  $0.95 \pm 0.19$  (95%CI),  $0.30 \pm 0.08$  puis  $0.09 \pm 0.03$  lorsque le calcium augmente de 3.5 à 88 puis à 174 mg/L. La décroissance du  $k_u$  s'opère donc sur environ un ordre de grandeur quand le calcium passe d'un extrema à l'autre dans la plage de valeurs choisie. On peut interpréter cette diminution des comme résultant d'une compétition entre les ions  $Ca^{2+}$  et les ions  $Cd^{2+}$  au niveau de la membrane biologique.

Nous montrons donc qu'il est nécessaire de prendre en compte la concentration en calcium de l'eau pour interpréter correctement les données de contamination de gammares prélevés *in situ*.

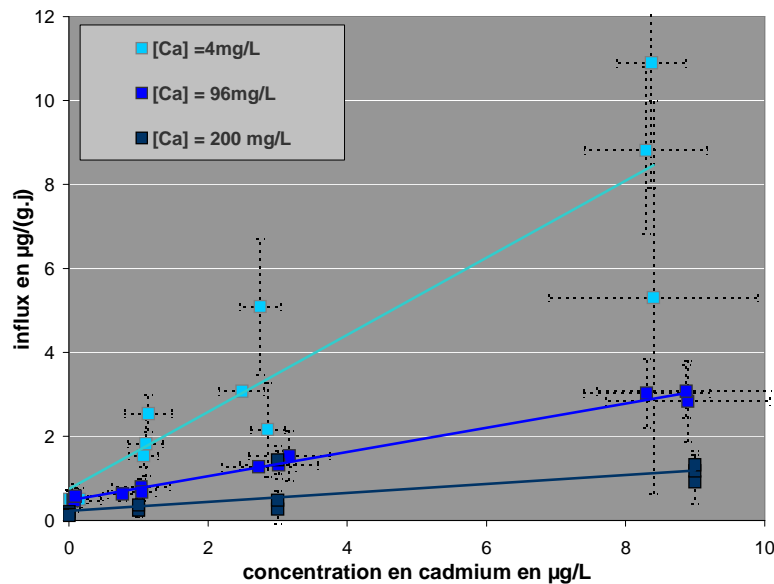


Figure 2. Influence de la teneur en calcium sur la cinétique de contamination  $k_u$  (pente des droites présentées)

### 2.2.2 Influence de la température sur l'accumulation du cadmium dans *G. pulex*.

#### Contrôles de l'expérience

Nous avons vérifié que les températures étaient stables au cours de l'expérience. En moyenne, dans la chambre froide, l'eau est à 7,8°C. Elle est à 11,2°C dans l'étuve à froid et à 15,4°C dans la salle thermostatée. La Figure 3 montre les concentrations en cadmium mesurées dans les milieux pendant l'expérience. Les variabilités représentées correspondent à une variabilité temporelle. On voit que les concentrations de cadmium mesurées sont proches des valeurs nominales.

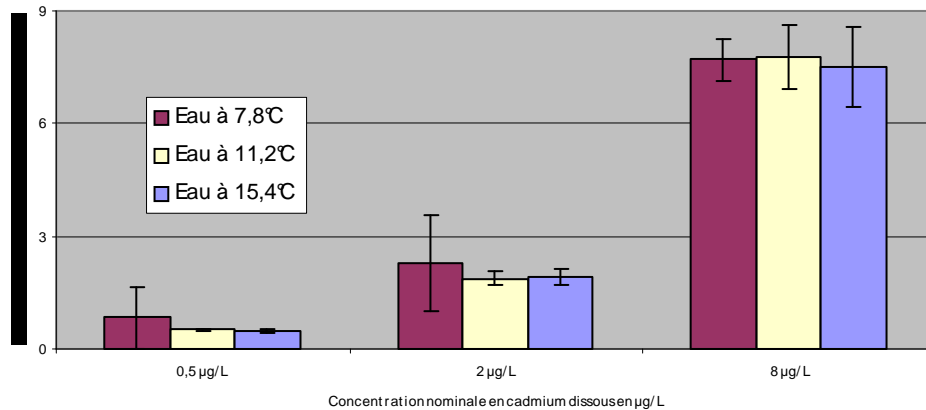


Figure 3: Concentrations en cadmium mesurées dans les milieux d'exposition

#### Bioaccumulations

La Figure 4 montre les cinétiques d'accumulation du cadmium dans les tissus des gammares exposés en fonction des conditions expérimentales. Les gammares du bac témoin n'ont pas accumulé significativement de cadmium. Dans les autres bacs, on observe une accumulation de cadmium par les gammares au cours du temps. La concentration en cadmium bioaccumulé croît avec la durée d'exposition et avec la concentration en cadmium dissous.

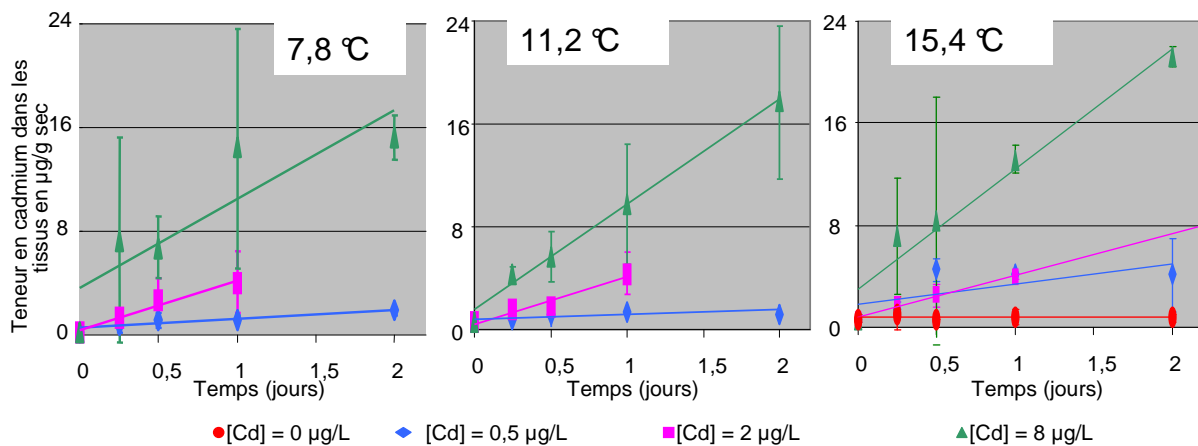


Figure 4: Bioaccumulation de cadmium par *G. pulex* en fonction de la durée d'exposition dans l'eau à 7,8°C, 11,2 °C et 15,4 °C.

#### Détermination des influx et de $k_u$

La Figure 5 présente les influx en fonction de la concentration calcique d'exposition. La régression linéaire correspondante permet de déduire  $k_u$  pour chacun des milieux d'exposition (Figure 6). Dans l'eau à 7,8°C, le  $k_u$  expérimental vaut 0,99 L/(g.j). Il vaut 0,56 L/(g.j) dans l'eau à 11,2°C et 0,90 L/(g.j) dans l'eau à 15,4°C. Les valeurs de  $k_u$  mesurées ne sont pas significativement différentes. On en déduit que des variations rapides de température n'influencent pas  $k_u$  significativement sur une durée courte.

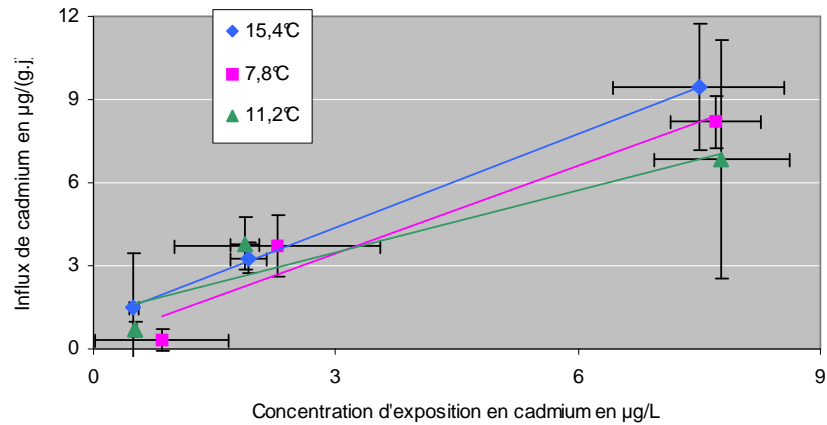


Figure 5: Influx de cadmium en fonction de la concentration en cadmium dans les 3 milieux d'exposition

Les résultats tendent à montrer que, dans le cadre du modèle biodynamique, la valeur de  $k_u$  n'a donc pas *a priori* à être ajustée sur la plage de températures 8°C – 15°C. Nos résultats ne peuvent cependant pas être directement étendus à des variations de température sur des durées longues. Par exemple des variations saisonnières pourraient avoir un effet significatif sur le métabolisme du gammare, et influencer son taux de filtration. Notons cependant que la gamme de température choisie correspond à des conditions de vie réalistes pour *Gammarus pulex* mais ne couvre pas toute gamme de température dans laquelle on peut le trouver, qui va de 2°C à 20°C.

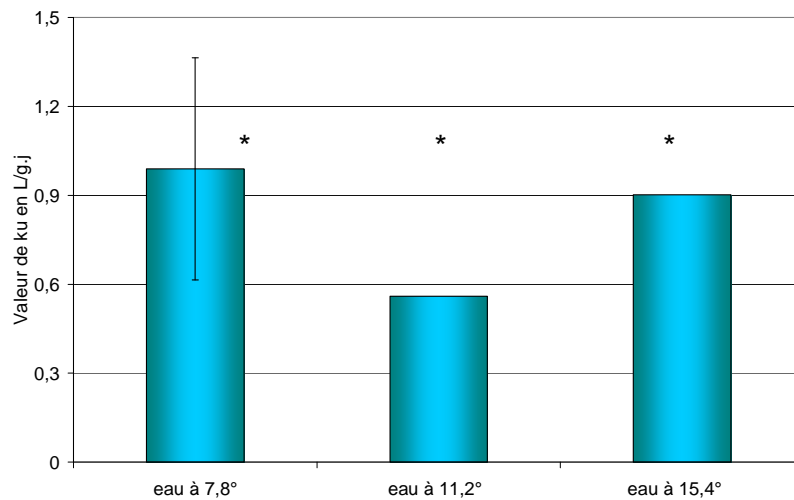


Figure 6: Influence de la température de l'eau d'exposition sur la constante  $k_u$ . \* désigne des expériences dont les modèles linéaires mènent à des constantes non statistiquement différentes (ANCOVA,  $p < 0,05$ ). La barre d'erreur indique un intervalle de confiance à 95%.

### 3. Bioaccumulation du cadmium chez la moule zébrée

L'étude de la dreissène comme organisme modèle a débuté en 2007 au Cemagref d'Antony. Les travaux réalisés cette année ont donc pour objectifs:

- de dimensionner des protocoles expérimentaux permettant d'étudier la bioaccumulation des métaux chez la dreissène,
- d'appliquer les protocoles à l'étude de la bioaccumulation du cadmium par voie dissoute en conditions contrôlées en laboratoire,



- d'appréhender l'importance de certains paramètres environnementaux tels que la composition et de l'eau, ou la biodisponibilité du métal labile (évalué par la technique DGT) sur la bioaccumulation du cadmium.

### 3.1. Matériels et méthodes

#### 3.1.1 Prélèvement des dreissènes et maintien au laboratoire

En collaboration avec l'équipe d'écotoxicologie de l'Université de Reims, les moules ont été prélevées le 21 mars 2007 à Commercy (Meuse), dans le canal de la Marne au Rhin. Les moules, prélevées à la main, sont classées par taille, en trois catégories : inférieures à 2.2 cm, entre 2.2 et 2.5 cm (classe de taille utilisée pour toutes les expériences de l'étude), plus de 2.5 cm. Elles sont transportées au laboratoire dans de l'eau du canal.

Au laboratoire, les moules sont acclimatées en renouvelant progressivement, sur quinze jours leur milieu par de l'eau d'exposition (eau de source ou eau du robinet). Elles sont stockées en chambre froide, à une température de 8°C. Elles sont nourries régulièrement par l'ajout de quelques millilitres d'une solution de micro-algues *Pseudokirchneriella subcapitata*.

#### 3.1.2 Expérience préliminaire : dimensionnement des expériences de bioaccumulation

Pour suivre la bioaccumulation au laboratoire, il est nécessaire que les concentrations en cadmium dans le milieu restent constantes au cours du temps. Cependant, l'accumulation dans les organismes est susceptible de faire baisser les teneurs dans le milieu. Une première expérience a donc été réalisée, au cours de laquelle l'évolution d'une concentration en cadmium initialement de 10 µg/L dans un bécher de 500mL d'eau du robinet a été suivie sur 24h, selon que 0, 2, 5, ou 10 moules y soient présentes (Figure 7).

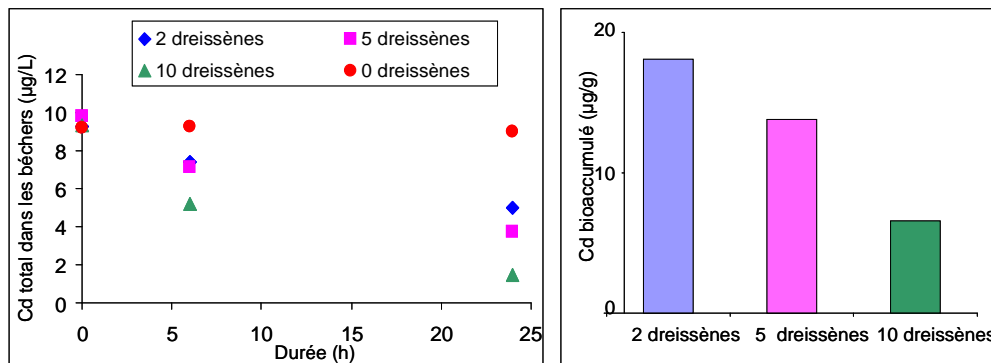


Figure 7 : Evolution de la concentration en cadmium dans des béchers et concentration en cadmium bioaccumulé après 24h d'exposition dans les dreissènes selon le nombre de moules dans le bécher.

Au bout de 24h, la concentration en cadmium a au moins diminué de moitié dans chacun des béchers contenant des moules, et a d'autant plus diminué que le nombre de moules présentes était élevé. La concentration en cadmium est restée constante dans le bécher ne contenant aucune dreissène. A partir de ces résultats, le choix a été fait d'exposer au maximum un organisme par litre de milieu, et de renouveler le milieu d'exposition toutes les 24h.

#### 3.1.3 Cinétique de bioaccumulation du cadmium dissous

Deux séries d'expérience de bioaccumulation ont été menées afin, d'une part de suivre la bioaccumulation du cadmium en fonction de la concentration en cadmium dissous et labile dans le milieu, et d'autre part d'étudier l'influence de la composition de l'eau sur la bioaccumulation en milieu minéral.

### Exposition n°1

Dans une première série d'expériences, cinq milieux d'exposition ont été testés : les moules ont été exposées en milieu minéral à des concentrations en cadmium de 0µg/L (témoin), 1 µg/L, 3 µg/L, 10µg/L et en milieu organique à 10µg/L de cadmium et 10mg/L d'acides humiques (Aldrich). L'eau utilisée est l'eau du robinet. Les moules ne sont pas nourries durant les expositions.

Pour chaque type d'exposition, 36 moules sont réparties dans 2 bacs contenant chacun 15 L de milieu. L'exposition dure 15 jours, pendant lesquels 11 prélèvements sont prévus (Figure 8). A chaque prélèvement, les milieux d'exposition sont renouvelés. Le détail de la préparation des milieux d'exposition est disponible dans Nicolle, 2007. A chaque prélèvement, trois organismes sont prélevés pour être mesurés individuellement. Des mesures de cadmium total dissous sont effectuées avant et après renouvellement des milieux. Des mesures de cadmium labile par la technique DGT sont effectuées aux jours 2 et 6 au sein de chacun des bacs d'exposition.

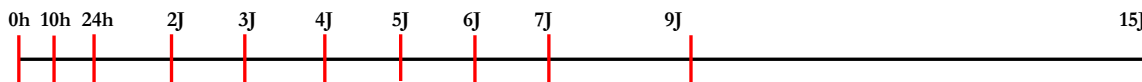


Figure 8. Organisation des prélèvements dans le temps pour l'expérience n°1.

### Exposition n°2

Au cours d'une seconde série d'expérience, vingt dreissènes sont exposées dans 15L de milieu à 10 µg/L de cadmium contenant, soit dans de l'eau du robinet, soit dans de l'eau de source (Source Montfras). L'exposition a lieu à 8°C. Quatre prélèvements sont prévus sur les 8 jours d'exposition (t=0, 1j, 2j, 8j). Les milieux d'expositions sont renouvelés aux jours 1 et 2. A chaque date de prélèvement, 5 dreissènes sont prélevées et analysées individuellement et des mesures de cadmium dissous total sont effectuées dans les milieux.

#### **3.1.4 Dépuration du cadmium en conditions contrôlées**

##### Pré-exposition au cadmium

Deux lots de 36 organismes ont été exposés pendant sept jours à respectivement, 5 et 15µg/L de Cadmium dans de l'eau du robinet. Tous les jours, le milieu est dopé en cadmium de façon à éviter la diminution du cadmium en solution due à l'accumulation dans les dreissènes : 1.75mL et 5.5mL de solution de cadmium à 10mg.L<sup>-1</sup> sont respectivement ajoutés dans les bacs à 5µg/L et 15µg/L. Chaque jour, une heure après le dopage, le milieu est échantillonné pour la mesure du cadmium dissous total. Les bacs sont stockés dans la chambre froide (8°C). Un dispositif de bullage permet d'oxygéner les milieux d'exposition en continu.

##### Protocole de dépuration

Pour étudier les cinétiques de dépuration, les deux lots de moules préalablement contaminées sont placées dans deux bacs contenant 15L d'eau du robinet, pendant quinze jours. Les bacs sont stockés à 8°C. Les moules sont nourries quotidiennement par l'ajout dans chaque bac de 10mL d'une solution de micro-algues *Pseudokirchneriella subcapitata* (non contaminées) de concentration 10<sup>7</sup> cell/mL. Onze prélèvements de triplicats de dreissènes sont effectués sur 15 jours d'expérience, suivant le même schéma que pour l'expérience n°1 de bioaccumulation (Figure 8). Afin de garder tout au long de l'expérience une concentration nulle en cadmium, l'eau est changée à chaque prélèvement. Des mesures de cadmium dissous total sont effectuées lors de tout renouvellement de milieux.

#### **3.1.5 Prélèvements, traitements des échantillons, et mesures**

##### Mesure du cadmium total dissous

Pour mesurer le cadmium total dissous dans les échantillons d'eau, 4.95 mL de milieu sont prélevés dans un tube en polypropylène dans lequel sont ajoutés 50µL d'acide nitrique supra pur 65 % (Merck). Les échantillons d'eau sont ensuite analysés au spectrophotomètre à absorption atomique (SAA Spectra 220, Varian four graphite, correction Zeeman).

### Mesure du cadmium labile par DGT

Afin de mesurer les concentrations en cadmium labile dans les milieux d'exposition, des DGT (Davison et Zhang, 1994) sont placées dans les bacs d'exposition aux jours 2 et 6 et laissées pendant 24 heures. La résine est ensuite éluée dans l'acide nitrique et l'éluat est mesuré AAS. La concentration de cadmium labile dans le milieu s'effectue ensuite par la formule suivante :

$$C_{DGT} = \frac{C_e \cdot V \cdot \Delta g}{D \cdot f_e \cdot \Delta t \cdot A \cdot 10^{-5}}$$

où  $C_e$  est la concentration mesurée dans l'éluat,  $V$  est le volume d'éluat,  $\Delta g$  l'épaisseur du gel de diffusion,  $\Delta t$  le temps d'exposition de la DGT,  $A$  la surface de contact du gel de diffusion,  $f_e$  le rendement d'éluat (pour le cadmium ce rendement est égal à 1),  $D$  le coefficient de diffusion du métal dans le gel.

### Prélèvement et traitement des moules

Pour chaque mesure de bioaccumulation, une moule est prélevée, et ouverte à l'aide d'un scalpel. Une fois ouverte, l'organisme est posé sur du papier absorbant pendant une quinzaine de secondes pour récupérer l'excédent d'eau. Chaque moule est ensuite pesée (ensemble coquille + tissus). Puis les tissus mous sont prélevés, pesés, et stockés dans un tube Ependorf dont on a coupé le couvercle, avant d'être mis pendant 24h à l'étuve à 60°C pour être séchés. Après le passage à l'étuve, les tubes Ependorf sont stockés dans un dessiccateur, jusqu'à ce que les tissus secs soient pesés à leur tour.

A partir des masses mesurées, deux indices de conditions sont calculés, qui permettent de suivre une éventuelle évolution de l'état de santé des dreissènes exposées, IC1 et IC2. L'état de santé d'une moule sera d'autant meilleur que IC1 sera faible, et que IC2 sera élevé.

$$IC_1 = \frac{\text{Masse tissus mouillés}}{\text{Masse tissus secs}} \quad IC_2 = \frac{\text{Masse tissus mouillés}}{\text{Masse tissus mouillés} + \text{masse coquille}}$$

Les échantillons de moules ont été traités par une minéralisation à froid (cf protocole de minéralisation des gammares). Les échantillons sont par la suite mesurés au spectrophotomètre à absorption atomique. Au cours de chaque série de mesures, la validité des concentrations mesurées est contrôlée grâce à un matériel de référence. La validité de la méthodologie de minéralisation a également été vérifiée par du matériel de référence certifié, des moules (ERM-CE 278). La concentration de cadmium bioaccumulé dans les moules, est exprimée en  $\mu\text{g/g}$  de matière sèche.

## **3.2. Résultats.**

### **3.2.1 Cinétiques de bioaccumulation du Cd en laboratoire.**

#### Indices de condition des organismes

Dans toutes les expériences de bioaccumulation, sur 138 organismes exposés, un cas de mortalité a été observé. Aucune évolution des indices de condition n'est observée au cours du temps, ni de variation selon la concentration en cadmium du milieu (Figure 9). Les dreissènes ont donc globalement gardé le même état de santé que celles de l'exposition témoin.

#### Contrôle de la contamination des milieux d'exposition

On observe une diminution des concentrations d'exposition sur 24h (Figure 10), phénomène contrôlé par les renouvellements réguliers de milieu. Cette diminution de la concentration en cadmium dissous s'explique par l'activité d'accumulation des moules, ce qui confirme la nécessité de renouveler les milieux tous les jours. Dans l'expérience n°2, entre le deuxième et le huitième jour, les milieux n'étant pas renouvelés, on observe une décroissance significative de ces concentrations. Cette décroissance est beaucoup plus marquée pour l'exposition en eau de source.

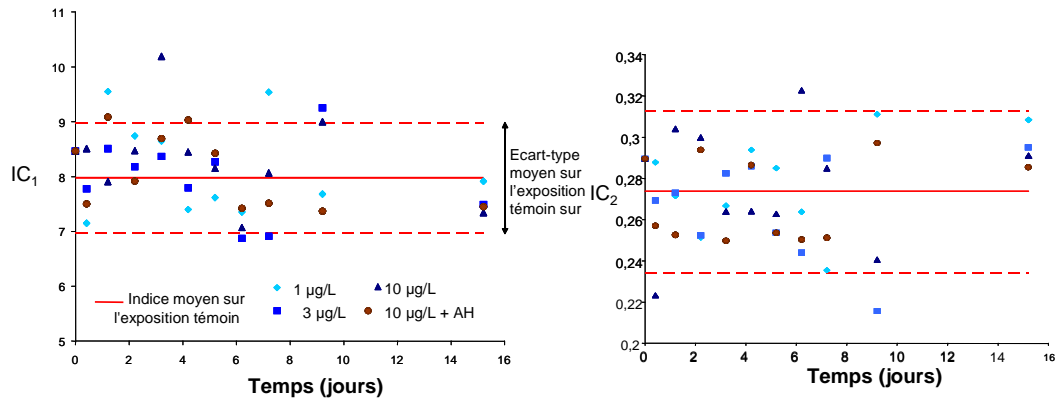


Figure 9: Evolution des indices de condition  $IC_1$  et  $IC_2$  au cours du temps dans les différents milieux pendant l'expérience de bioaccumulation n°1.

Dans les milieux minéraux, les mesures DGT de cadmium labile sont très proches des concentrations totales dissoutes (moins de 5% d'écart dans tous les cas), alors que le cadmium labile représente entre 70 et 76% du cadmium total dans le milieu contenant les acides humiques. On vérifie ici que les acides humiques complexent une partie du cadmium dissous, le rendant non disponible pour la DGT.

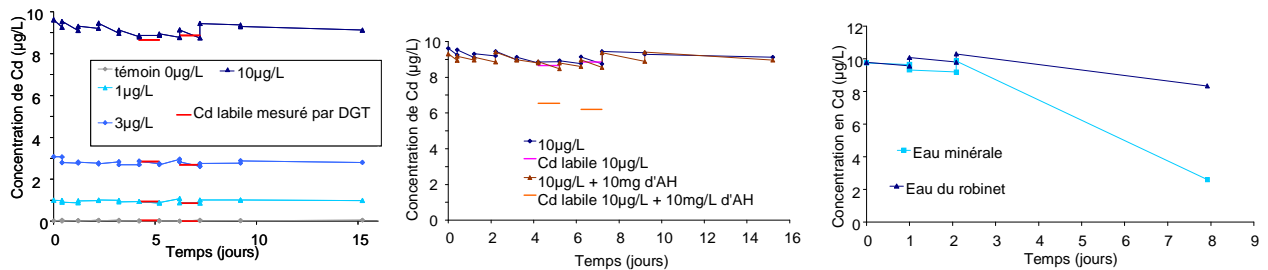


Figure 10: Concentrations en cadmium totales et labiles dans les milieux des différentes expériences de bioaccumulation

### Bioaccumulation du Cadmium dans les dreissènes

Les différentes expositions réalisées ont conduit à une accumulation significative de cadmium par les dreissènes. Les moules accumulent d'autant plus que leur milieu d'exposition est chargé en cadmium (Figure 11). De plus, la présence d'acides humiques dans un milieu composé d'eau de ville favorise la bioaccumulation (Figure 11).

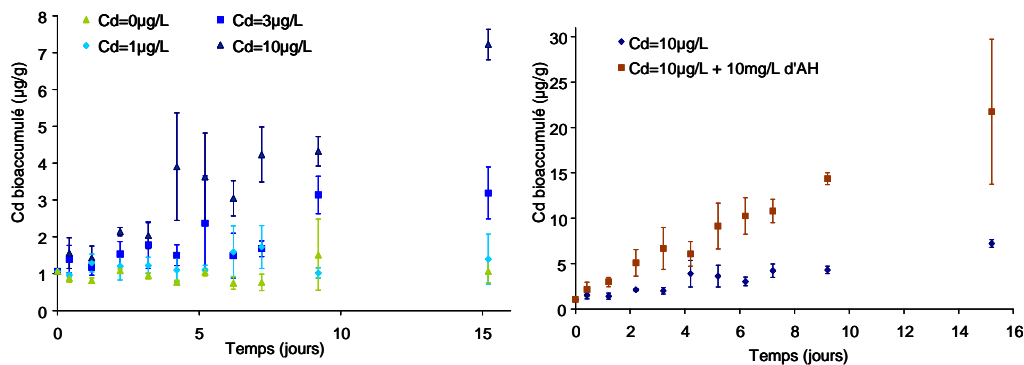


Figure 11. Concentrations de cadmium bioaccumulé dans les tissus des dreissènes en fonction du temps pour les différents niveaux et types d'exposition dans de l'eau du robinet. Chaque point représente la moyenne de trois répliqués et les écart-types associés.

On observe que les moules exposées dans l'eau de source accumulent plus de cadmium que celles exposées dans l'eau de ville (Figure 12). Il est possible que cette différence soit due à l'impact du chlore dans l'eau de ville sur le comportement des dreissènes qui pourrait induire une diminution de l'activité de filtration.

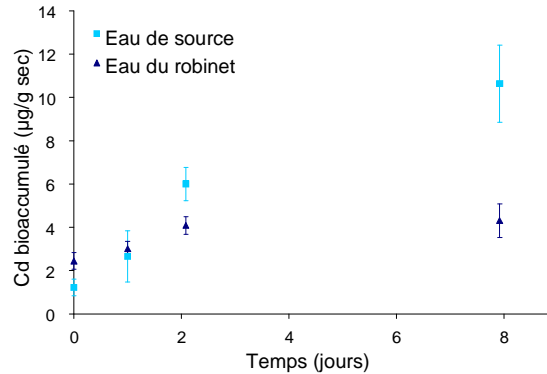


Figure 12. Concentrations de cadmium bioaccumulé dans les tissus des dreissènes en fonction du temps pour les expositions à 10µg/L de Cd en eau de source et eau du robinet. Chaque point représente la moyenne de cinq réplicats et les écart-types associés.

### 3.2.2 Dépuration du Cadmium par les moules zébrées.

Aucune des deux expériences réalisées n'a conduit à une dépuration significative de cadmium par les dreissènes sur 15 jours. Ce résultat est en cohérence avec la constante de dépuration du modèle biomodynamique estimées par Roditi et al (1999) de  $k_e = 0.011 \text{ jour}^{-1}$ . Selon cette estimation, il faudrait 63 jours pour que 50% du cadmium bioaccumulé disparaisse de l'organisme.

Ce résultat peut expliquer la valeur "plancher" de  $1\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  mesuré dans l'expérience témoin de 15 jours (Figure 11). Les moules collectées dans le canal de la Marne au Rhin avaient des concentrations en cadmium entre 0.6 et  $3.2\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Ces moules n'ont pas eu le temps de dépurer complètement malgré plus de trois semaines d'acclimatation. Ceci est confirmé par des concentrations bioaccumulées de l'ordre de  $2\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  à  $t=0$  pour les expositions de 8 jours, qui ont eu lieu 2 semaines après prélèvement des moules sur le terrain.

### 3.3. Interprétation : détermination des constantes de toxico-cinétiques

L'équation du premier ordre de toxico-cinétique (voir 2.1.5) appliquée aux expositions réalisées permet de déterminer la valeur de la constante d'accumulation par voie dissoute,  $k_u$ . Le facteur de croissance étant négligeable pendant la durée de l'expérience, et les moules n'étant pas nourries, l'équation générique du modèle biodynamique devient :

$$C_A(t) = \frac{k_u \cdot C_w}{k_e} (1 - e^{-k_e t})$$

Les résultats expérimentaux ont permis d'établir différentes constantes  $k_u$  (Tableau 3). Les détails de l'estimation de  $k_u$  sont disponibles dans Nicolle, 2007.

Tableau 3.  $k_u$  calculées en fonction du type d'exposition et écart-types associés. \* Pour le milieu organique, on a fait l'hypothèse que la concentration biodisponible était approchée par la technique DGT.

	Milieu	$k_u$ (L/g/j)
Expérience n°1	Eau du robinet seule	$0.045 \pm 0.004$
	Eau robinet, milieu organique	$0.21 \pm 0.016$ *
Expérience n°2	Eau du robinet	$0.08 \pm 0.012$
	Eau de source	$0.48 \pm 0.028$

Ces résultats montrent que la constante d'accumulation  $k_u$  n'est pas spécifique du couple dreissène-cadmium. Les conditions d'exposition semblent jouer un rôle important sur ce coefficient. Les variations correspondent dans les faits à des comportements distincts des dreissènes en fonction de leur milieu d'exposition.

## 4. Conclusions

On montre en laboratoire que la présence de calcium ralentit les cinétiques de contamination du gammare et diminue les niveaux de contamination obtenus à 48 heures. La température en revanche, ne semble pas influencer significativement la bioaccumulation du cadmium par le gammare dans une plage 7-16°C.

Néanmoins, les données cinétiques de laboratoire et la caractérisation de l'exposition en termes de métal dissous labile restent insuffisantes pour faire le lien entre la contamination du milieu et celle des organismes. La contamination par voie trophique ainsi que les processus de dépuraction restent à examiner au laboratoire de façon à permettre une interprétation plus fine des observations de contamination in situ.

La bioaccumulation du cadmium par les dreissènes a pu être observée en laboratoire dans de bonnes conditions. Deux observations montrent l'importance de la prise en compte du comportement des dreissènes pendant l'exposition : l'ajout d'acides humiques augmenterait la contamination, alors que l'on escompte une moindre biodisponibilité du cadmium; la contamination est plus importante lors d'une exposition en eau de source que lors d'une exposition en eau de ville. Dans ces deux cas, on suppose que c'est le comportement des dreissènes qui est modifié, soit pour filtrer plus d'eau chargée en matière organique, soit pour filtrer moins d'eau éventuellement chargée en chlore. Les cinétiques de dépuraction ont par ailleurs confirmé le très faible taux de dépuraction du cadmium par la dreissène.

L'approche biodynamique appliquée aux résultats des cinétiques de bioaccumulation a permis de déterminer plusieurs constantes d'accumulation  $k_u$  qui, selon le type d'exposition pouvaient varier d'un facteur 10. Cette première étude sur les toxico-cinétique des métaux dans la dreissène confirme la nécessité d'identifier les facteurs de contrôle de la bioaccumulation, qu'ils soient dus aux conditions environnementales (modification de la biodisponibilité, spéciation des contaminants dissous et particuliers...), au comportement de l'organisme (filtration, ingestion...), mais aussi aux interactions entre l'environnement et la physiologie de l'organisme.

## 5. Bibliographie

- Kermeol T. (2007) Variations des influx de cadmium par voie dissoute dans *Gammarus pulex* en fonction des caractéristiques physico-chimiques du milieu d'exposition, rapport de master "Sciences et Génie de l'Environnement", spécialité SAGE, ENPC – université Paris XII, 55 pages.
- Lacour, C. (2006). Interprétation de la bioaccumulation du cadmium par *Gammarus pulex* en fonction de la chimie du milieu. Créteil, Université Paris XII-val de marne: 45 pages.
- Luoma, S. N. and P. S. Rainbow (2005). "Why is Metal Bioaccumulation So Variable ? Biodynamics as a unifying concept." *Environmental science and technology* **39**: 1921-1931.
- Nicolle F. (2007) Biodisponibilité et bioaccumulation du cadmium dissous chez la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*), rapport de master "Sciences et Génie de l'Environnement", spécialité SAGE, ENPC – université Paris XII, 53 pages.
- Roditi et Fisher NS (1999). Rates and routes of trace element uptake in zebra mussels *Limnology and Oceanography* **44** : 1730-1749