



HAL
open science

Facteurs de contrôle de la bioaccumulation de métaux traces (Cadmium et Cuivre) dans deux organismes modèles

Adeline Bourgeault, Bastien Pellet, Catherine Gourlay-Francé, Sophie Ayrault, Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin

► To cite this version:

Adeline Bourgeault, Bastien Pellet, Catherine Gourlay-Francé, Sophie Ayrault, Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin. Facteurs de contrôle de la bioaccumulation de métaux traces (Cadmium et Cuivre) dans deux organismes modèles. [Rapport de recherche] irstea. 2009, pp.16. hal-02592667

HAL Id: hal-02592667

<https://hal.inrae.fr/hal-02592667>

Submitted on 15 May 2020

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.

Facteurs de contrôle de la bioaccumulation de métaux traces (Cadmium et Cuivre) dans deux organismes modèles

Adeline Bourgeault^{1*}, Bastien Pellet¹, Catherine Gourlay-Francé¹, Sophie Ayrault², Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin¹

¹ UR Hydrosystèmes et Bioprocédés, Cemagref Antony

² LSCE, CEA-CNRS-UVSQ/IPSL, Gif sur Yvette

*adeline.bourgeault@cemagref.fr

1. Introduction	1
2. Influence de la composition de l'eau sur la bioaccumulation du cadmium chez <i>Dreissena polyorpha</i>	2
2.1. Matériels et méthodes.....	2
2.1.1 Prélèvement et acclimatation des dreissènes	2
2.1.2 Exposition en laboratoire.....	3
2.2. Résultats	4
2.2.1 Influence de la composition minérale du milieu	4
2.2.2 Influence de la matière organique	5
3. L'assimilation du Cu et du Cd par voie trophique chez <i>Gammarus pulex</i>	6
3.1. Contexte et objectif	6
3.2. Matériels et Méthodes	7
3.2.1 Principe de l'expérience	7
3.2.2 Dopage en isotopes stables des feuilles d'aulne.....	7
3.2.3 Conditions expérimentales	7
3.2.4 Préparation des échantillons	8
3.2.5 Analyse	8
3.2.6 Cadre d'interprétation	8
3.3. Résultats et discussion.....	10
3.3.1 Utilité de la technologie CCT	10
3.3.2 Contamination des matrices	11
3.3.3 Taux de nutrition des gammars	12
3.3.4 Efficacités d'assimilation par la méthode des ratios	12
3.3.5 Efficacité d'assimilation par la méthode du bilan de masse	13
4. Conclusion.....	14
5. Bibliographie.....	15

1. Introduction

Dans le cadre de la Directive Cadre Européenne il est nécessaire d'assurer un suivi de l'état chimique et écologique des systèmes aquatiques. Le suivi de l'état chimique des masses d'eau est réalisé grâce à des mesures ponctuelles de nombreux contaminants. Afin de rendre compte de l'état écologique, les efforts ont été orientés vers le développement d'outils biologiques de bioindication (IBGN). Néanmoins, ces outils ne répondent que très peu aux contaminations chimiques, en particulier aux perturbations liés aux micropolluants. Il est nécessaire de développer de nouveaux outils biologiques pour rendre compte de l'impact des micropolluants sur les organismes du milieu. Dans cette perspective, la bioaccumulation, (c'est-à-dire la quantité d'une substance donnée accumulée dans un organisme) constitue une réponse intéressante car elle est la première réponse biologique à la présence d'un contaminant. Le lien entre la présence d'un micropolluant et la teneur dans un organisme n'est cependant pas direct car il dépend de facteurs environnementaux, de la biodisponibilité des substances et aussi de la physiologie de l'organisme.

Au cours de la phase 5 du PIREN, nous nous intéressons aux facteurs qui contrôlent la bioaccumulation des métaux dans deux organismes aquatiques: un mollusque filtreur d'eau douce (*Dreissena polymorpha*) et une crevette détritivore (*Gammarus pulex*). Ainsi, des études sont menées en laboratoire afin de mieux comprendre les mécanismes d'accumulation des métaux à la fois par voie dissoute et trophique.

Les données toxico-cinétiques obtenues sont interprétées dans le cadre du modèle biodynamique (Luoma and Rainbow 2005) qui décrit de façon simple l'accumulation dans un organisme comme le résultat d'une accumulation par voie dissoute, une accumulation par voie trophique et un phénomène de dépuración. Ce modèle est utilisé afin d'évaluer l'importance relative des voies d'accumulation de contaminants (dissoute et/ou trophique), mais également afin de prédire la contamination d'un site par la mesure de la contamination des organismes qui y sont présents.

Ainsi, l'équation du modèle biodynamique relie la concentration dans les tissus à la concentration environnementale par l'équation suivante:

$$\frac{dC_w}{dt} = k_U \cdot C_d + AE \cdot IR \cdot C_p - (k_e + g) \cdot C_w$$

k_U : constante cinétique d'assimilation à partir de la voie dissoute (L/g ps/j)

AE: rendement d'assimilation (%)

IR: taux d'ingestion (g/g/j)

k_e : taux de dépuración (j^{-1})

g: taux de croissance (j^{-1})

C_w : concentration en contaminant dans l'organisme ($\mu\text{g/g}$)

C_d : concentration en contaminant biodisponible par voie dissoute ($\mu\text{g/L}$)

C_p : concentration en contaminant biodisponible par voie trophique ($\mu\text{g/g}$)

t: temps (j)

Les travaux développés dans le PIREN ont pour objectif de déterminer les paramètres du modèle ci-dessus et les facteurs qui les contrôlent. En 2007, les travaux réalisés sur les dreissènes avaient permis de dimensionner les protocoles à l'étude de la bioaccumulation du cadmium par voie dissoute. Les premiers résultats avaient montré l'importance de prendre en compte les conditions environnementales dans ces phénomènes de bioaccumulation (Pellet et al. 2008b). En 2008, nous nous sommes intéressés à l'influence des conditions environnementales sur l'accumulation du cadmium par voie dissoute (k_U). Pour le gammare, nous nous sommes focalisés en 2008 sur la détermination de l'efficacité d'assimilation par voie trophique (AE) du cadmium et du cuivre.

2. Influence de la composition de l'eau sur la bioaccumulation du cadmium chez *Dreissena polyorpha*

2.1. Matériels et méthodes

2.1.1 Prélèvement et acclimatation des dreissènes

Les moules sont prélevées dans le canal de la Meuse à Commercy. Elles sont calibrées (20-22 mm) puis acclimatées en laboratoire à 15°C avec un cycle jour/nuit 10h/14h. Pendant cette phase d'acclimatation, l'eau des bacs est progressivement remplacée par de l'eau d'exposition (eau de source Louise ou eau minérale Valvert). Les dreissènes sont nourries régulièrement de chlorelles en poudre à raison de 3,2 g/jour/1000 moules. De plus, l'eau des bacs est renouvelée lorsque les concentrations des

différentes formes de l'azote atteignent les valeurs seuils suivantes : NH₄ : 2 mg/L, NO₂ : 0,25 mg/L et NO₃ : 25 mg/L.

2.1.2 Exposition en laboratoire

Milieux d'exposition

Les dreissènes sont exposées au Cd (3µg/L) pendant 48h dans de l'eau de source. Elles ne sont pas nourries lors de l'exposition. Différents ajouts sont réalisés dans le milieu afin de faire varier la composition de l'eau: ajout de matière organique (acide humique Aldrich: HA) en différentes concentrations (0 à 50 mgHA/L), NaHCO₃, KCl, Ca(OH)₂, Zn.

Une solution mère d'acide humique est utilisée pour doper les milieux en matière organique. Cette solution (1g HA/L) est agité 24h puis filtrée sur un filtre de porosité 0,45 µm afin d'éliminer toute particule.

Les milieux sont renouvelés toutes les 24h et préalablement équilibrés avant l'exposition, ce qui permet d'obtenir une concentration en Cd relativement stable au cours de l'exposition ([Cd]=2,81 +/- 0,33 µg/L).

Prélèvements et traitement des échantillons

Des prélèvements d'eau sont effectués dans chacun des bacs à 0, 10, 24 et 48h afin d'analyser le pH, la température, les concentrations en ions majeurs, hydrogénocarbonates (TAC), Carbone organique dissous (COD), Cd et Zn.

Les échantillons d'eau sont acidifiés (HNO₃ 1%) puis analysés par spectrométrie (SAA Spectra 220, Varian four graphite, correction Zeeman). La concentration en hydrogénocarbonates est déterminée par titrage colorimétrique (BDH-titrage avec HCl 0,1N) et l'analyse des ions se fait par chromatographie ionique (Dionex DX-120).

Les dreissènes sont prélevées après 10, 24 et 48h d'exposition. Le tissu mou est désolidarisé de la coquille à l'aide d'un scalpel et le byssus est retiré. Le tissu est ensuite lyophilisé et minéralisé. La minéralisation est effectuée par Digi Prep; ce protocole comprend des ajouts successifs de HNO₃ et H₂O₂ ainsi que des phases de montée en température. Le minéralisat est ensuite analysé (SAA Spectra 220, Varian four graphite, correction Zeeman). Un matériel de référence (Mussel Tissue ERM-CE 278) est utilisé afin de s'assurer de la validité du protocole.

Mesure du taux de filtration

Afin d'évaluer l'activité ventilatoire des dreissènes le taux de filtration (FR) a été mesuré en parallèle des expositions, dans des milieux de composition identique.

La mesure est réalisée par l'utilisation d'algues *Selenastrum capricornutum*; elle est basée sur une analyse de la décroissance de particules dans un système clos en un temps fixé. Des contrôles sont effectués sans animaux afin de mesurer la décroissance éventuelle d'algues liée à des problèmes de sédimentation. La densité d'algues est mesurée par densité optique à 680 nm. FR est évalué par la relation suivante (Coughlan 1969):

$$FR = \frac{V}{n.t} \ln \frac{C_0}{C_T}$$

FR: taux de filtration (mL/moule/h)

V: volume d'exposition (mL)

n: nombre de moule

t: temps (h)

C: concentration en algue (cellules/mL)

Le taux de filtration a été estimé après 1h30 et 3h d'exposition de 5 dreissènes dans un bêcher de 500ml. La concentration initiale en algue (C₀) est de l'ordre de 1.10⁶ cellules/ml. Des essais ont montré que le temps d'exposition ne modifiait pas la valeur de FR.

Interprétation à l'aide du modèle biodynamique

En l'absence de nourriture et sur une durée d'exposition courte, la quantité de métal bioaccumulée dépend à la fois de la concentration dans le milieu, de l'efficacité d'absorption en phase dissoute (α) et de l'activité ventilatoire des dreissènes (FR) selon l'équation dérivée de l'Equation 1:

$$C_w = k_U \cdot C_d \cdot t = \alpha \cdot FR \cdot C_d \cdot t \text{ avec } k_U = \alpha \cdot FR$$

2.2. Résultats

2.2.1 Influence de la composition minérale du milieu

Le Tableau 1 donne la composition des différents milieux d'exposition.

Tableau 1: Composition des milieux d'exposition. Moyenne des concentrations au cours des 48h d'exposition

		Eau de source + HA	Eau de source	Eau de source + NaHCO ₃	Eau de source + KCl	Eau de source + Ca(OH) ₂	Eau de source + Zn
mg/L	[HA]	7,5	0	0	0	0	0
	[Na ⁺]	7,94	8,22	51,67	10,22	9,15	12,66
	[HCO ₃ ⁻]	370	375,15	439	375,15	375,15	375,15
	[K ⁺]	1,14	1,10	1,17	9,69	1,24	1,31
	[Ca ²⁺]	83,16	81,99	84,88	90,79	150,00	106,33
µg/L	[Zn]	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	85

Les cinétiques d'accumulation du cadmium obtenues permettent d'évaluer une constante d'assimilation par voie dissoute (k_U) selon les différents milieux (Figure 1).

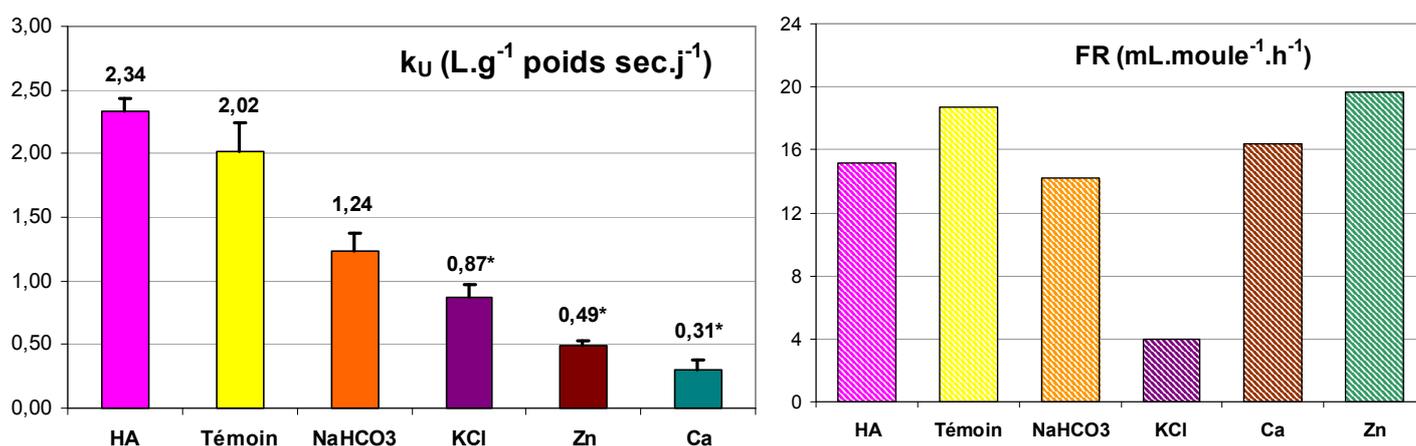


Figure 1: Constante cinétique d'assimilation k_U (L/g/j) et taux de filtration FR (mL/moule/h).
*: valeurs significativement différents du témoin (Z-test, $p \leq 0,05$).

Ces résultats permettent de distinguer plusieurs cas:

- Une baisse de la bioaccumulation de Cd due à une modification de l'activité ventilatoire. En effet l'ajout de KCl semble diminuer FR. Ce résultat serait en accord avec l'étude de Fisher

(1991), qui a montré que le potassium pouvait avoir un impact négatif sur la physiologie de la dreissène et plus précisément sur le mouvement des cils branchiaux et la structure de l'épithélium branchial.

- Une compétition métallique entre Cd/Zn au niveau des sites membranaires. Ce phénomène de compétition a été observé chez d'autres espèces comme *Anodonta cygnea* (Hemelraad *et al.* 1987), *Jordanella floridae* (Spehar *et al.* 1978), *Uca pugilator* (Shulman Weis 1980) ou *Daphnia magna* (Attar and Maly 1982). L'ajout de calcium.
- Une compétition cationique entre Cd/Ca. L'ajout de calcium entraîne une diminution du k_U d'environ 70%. Cette inhibition a été mise en évidence chez la daphnie (Tan and Wang 2008) et plus récemment chez le gammare (Pellet *et al.* 2008b).

2.2.2 Influence de la matière organique

Les mêmes expositions que précédemment ont été réalisées, c'est-à-dire une exposition courte de 48h en présence de Cd (3µg/L). La concentration en matière organique varie selon les bacs par ajout d'acide humique.

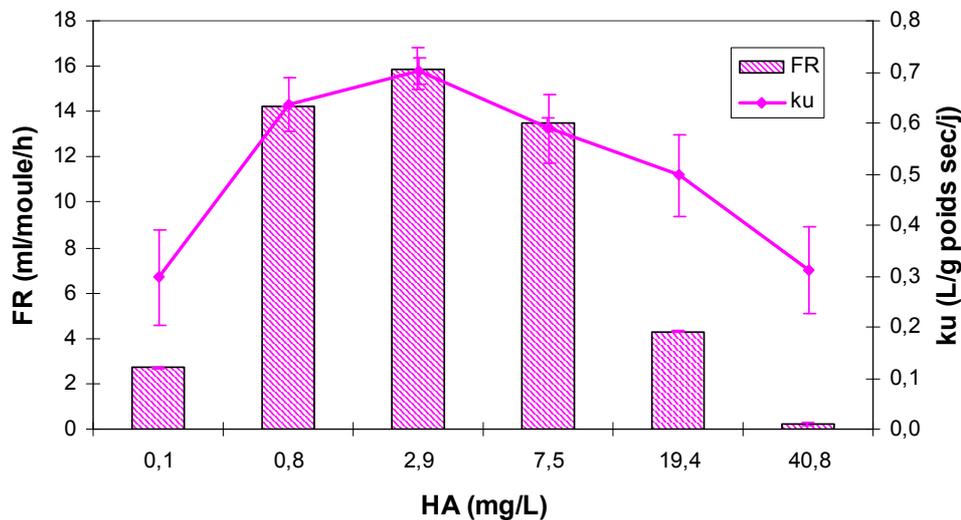


Figure 2: Taux de filtration et constante cinétique d'accumulation (k_U) en présence de matière organique (k_U : moyenne sur l'analyse individuelle de 3 individus +/- écart type)

La concentration en matière organique a un impact important sur l'accumulation du cadmium et sur le taux de filtration. Ces deux paramètres montrent un profil relativement similaire avec une augmentation entre 0 et 2,9 mgHA/L puis une diminution au-delà de 2,9 mgHA/L (Figure 2). Ces résultats sont en accord avec l'étude de Voets (2004) et Roditi (2000), c'est-à-dire une augmentation de k_U lors d'un ajout faible de MO et une diminution lors d'un ajout plus conséquent. Ceci montre l'importance d'étudier les facteurs contrôlant la bioaccumulation sur une plage de données étendue. En effet dans le cas des acides humiques selon la concentration testée les conclusions peuvent être totalement différentes.

En faisant l'hypothèse que le taux d'accumulation k_U peut être décomposé en deux termes selon: $k_U = \alpha \cdot FR$, les résultats de cette étude ont permis d'évaluer l'efficacité d'assimilation du Cd par voie dissoute (α). Les valeurs sont présentées sur la Figure 3. Elles sont de l'ordre de grandeur de celle estimée par Wang et Fisher (1997). Cela dit il est difficile de comparer précisément ces valeurs entre elles puisqu'elles dépendent largement de la méthode utilisée pour estimer FR.

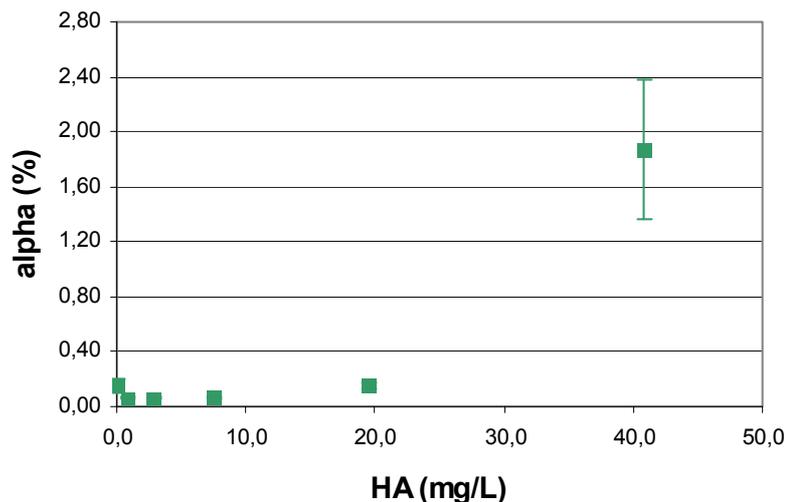


Figure 3: Efficacité d'assimilation par voie dissoute (α) du cadmium en fonction de la concentration en acides humique (HA) \pm écart type.

Les valeurs de α ne sont pas constantes. De plus une corrélation est observée entre l'activité ventilatoire et l'efficacité d'assimilation par voie dissoute ($R^2=0.9772$) (Figure 4). L'assimilation et les mécanismes de transport des métaux associés, pourraient donc être fonction de FR.

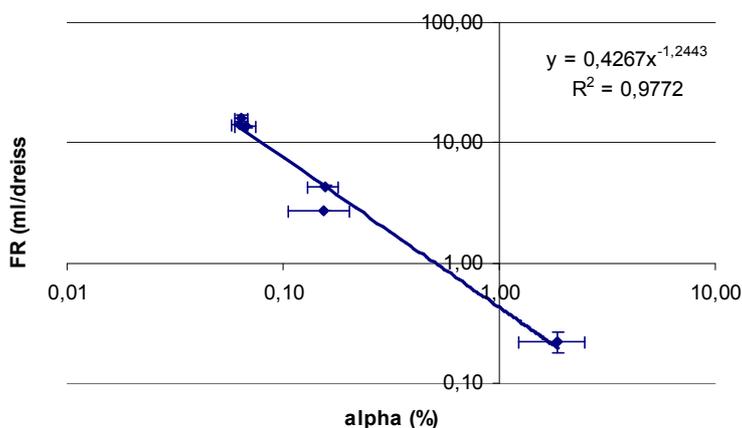


Figure 4: Corrélation entre α et FR

3. L'assimilation du Cu et du Cd par voie trophique chez *Gammarus pulex*

3.1. Contexte et objectif

Après avoir étudié les facteurs de contrôles de la bioaccumulation des métaux par voie dissoute chez *Gammarus pulex* en 2008, nous avons cherché à quantifier les apports par voie trophique. Les expériences préliminaires menées au Cemagref d'Antony en 2006 au cours du stage de master de Céline Lacour montrèrent que le Cd était bioaccumulé par cette voie (Lacour 2006). Aussi, nous avons cherché quelle proportion des métaux consommés via la nourriture était retenue par les gammarus, en utilisant une technique de double marquage de la nourriture en isotopes stables des métaux et en traceur inerte de la digestion. Le cadmium et le cuivre ont été sélectionnés pour cette étude.

3.2. Matériels et Méthodes

3.2.1 Principe de l'expérience

Le principe de l'expérience est de suivre le passage d'une contamination alimentaire ponctuelle, méthode du "pulse-chase feeding", adaptée de Calow (1972; Croteau *et al.* 2004). A cette fin, on a fait se nourrir des gammarès de feuilles d'aulnes contaminées avec des isotopes stables des métaux, et ces traceurs consommés, internalisés et déféqués ont été analysés. L'exposition doit en principe durer moins que la durée minimale de transit intestinal afin d'éviter toute réingestion de traceur déféqué. Nous avons estimé ce temps à 16 h en prenant en compte un temps de rétention digestive des gammarès de 72 h, estimée par Felten (à vue) et indiqué page 219 de sa thèse, (Felten 2003), et un ratio entre le temps de digestion et celui de sortie des premières fèces contaminées de 4,5, celui d'un gastéropode étudié par Croteau *et al.* (2007).

La digestion étant un processus qui ne conserve pas la masse de matériel ingéré, il est nécessaire de se rapporter à un traceur spécifique pour mener les comparaisons, en teneur ou en ratios isotopiques, entre l'alimentation et les fèces. Ce traceur est dit traceur inerte de digestion, il ne doit pas être assimilé par les organismes. Nous avons utilisé des isotopes stables des métaux, en abondance naturelle minoritaire, afin de pouvoir discriminer les surplus de métal nouvellement présents du fait de l'exposition générée par différence avec les métaux présents initialement dans les feuilles, les fèces et les gammarès. Le ^{65}Cu (abondance naturelle 31%), le ^{53}Cr (9,5%, traceur inerte de la digestion) et le ^{106}Cd (1,25%) ont été utilisés.

3.2.2 Dopage en isotopes stables des feuilles d'aulne

Une vingtaine de disques de feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*) de 2cm de diamètre ont été contaminés en surface en ^{53}Cr , ^{65}Cu et ^{106}Cd par un protocole chimique, cf figure 1. Les solutions mères utilisées pour ce dopage ont été préparées par diverses attaques acides de poudre d'oxyde de ces isotopes de puretés isotopiques supérieures à 90% (Eurisotope, Saclay, France). Les disques ont été ensuite rincés durant 72 heures, dans un bain de 3 L d'eau minérale constamment agité, afin qu'ils perdent la majeure partie de la fraction rapidement désorbable des traceurs.

3.2.3 Conditions expérimentales

De la nourriture contaminée a été proposée durant 7,5 heures à huit groupes de sept gammarès, phase dite d'exposition. Puis des disques non-contaminés ont été délivrés *ad libitum* durant 168h, phase dite de défécation. Dix aquariums de défécation ont été utilisés : huit répliqués expérimentaux sujets à la contamination trophique et deux contrôles négatifs, nourris durant toute l'expérience de nourriture non contaminée. Sur le modèle de Werner (2000), l'architecture des aquariums à deux étages, séparés par un tamis de 0,5 mm, a permis la collecte des fèces de gammarès (cf. Figure 5). L'eau des béciers (600mL) a été renouvelée en début de phase de défécation et une fois au cours de celle-ci. Les fèces ont été récoltées aux temps $t=12, 24, 36, 48, 72, 96,$ et 166 h à partir du début de la phase de défécation. La fraction dissoute de l'eau a été échantillonnée par filtration seringue à $0,45\ \mu\text{m}$ (Whatman filtre polyestersulfone) en début et fin de phase d'exposition puis à fréquence quotidienne durant la défécation. Les gammarès en fin d'expérience ont été sacrifiés pour l'analyse des métaux bioaccumulés.

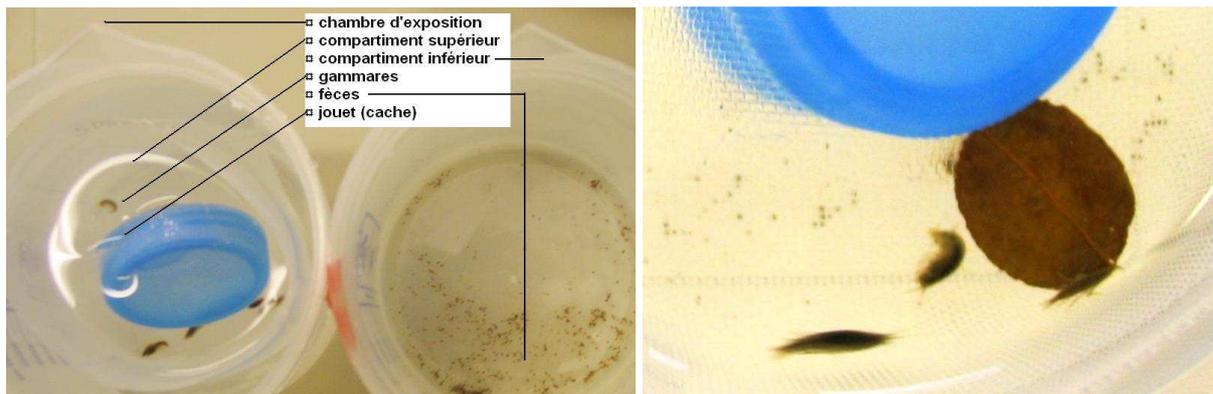


Figure 5: Photos d'une chambre d'exposition vue de dessus. Le compartiment supérieur fut placé dans un second béccher pour visualiser les fèces dans le fond de la chambre d'exposition. A droite, nutrition des gammares sur un disque de feuille et défécation dans le compartiment inférieur.

3.2.4 Préparation des échantillons

Les vaisselles non-consommables utilisées étaient en polypropylène ou en téflon et ont systématiquement été nettoyées à l'acide nitrique 1% puis rincées à l'eau ultrapure avant utilisation. Les fèces ont été recueillies sur filtre en téflon de 25mm, séchés et pesés suivant un protocole spécifique adapté aux analyses de traces de métaux dans des échantillons de faible poids (~ 0.01 g) et développé en 2007 au Cemagref d'Antony. Les prélèvements d'eau ont été acidifiés à 1%. Les restes non-consommés de disques feuilles contaminées et de feuilles non-contaminées, les fèces ainsi que les gammares ont été séchés, pesés poids sec et minéralisés par ajouts d'acide nitrique (au moins 50 μ L par mg sec de matériel organique) et de peroxyde d'hydrogène (au moins 20 μ L idem) de pureté adaptée à l'analyse des métaux traces.

3.2.5 Analyse

Les isotopes du Cr (de masse atomique 50,52 et 53), du Cd (106 et 114) et du Cu (65 et 63) et du Ge (72 et 74) ont été analysés en spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS, CCT-X Series, ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France) au Laboratoire des Sciences du Climat et l'Environnement. Aucun calcul de correction automatique d'interférences ne fut pris en compte. Le Ge (10 ou 15 ppb) a été ajouté dans tous les échantillons comme étalon interne servant à s'affranchir d'éventuelles variations de sensibilité de l'ICP-MS. La qualité de la préparation des échantillons et de l'analyse a été contrôlée en utilisant deux matériaux de référence certifiés: l'eau de rivière SRM 1640 (NIST, Gaithersburg, Maryland USA) et le tissu de moule ERM-CE 278 (IRMM, Brussels, Belgium). La mesure des isotopes du Cr en ICP-MS étant sujette à des interférences dans les matrices organiques, l'utilisation d'une cellule à collision (CCT) a été testée pour la mesure de l'ensemble des échantillons, comme recommandé par Hammer (2005). Les échantillons ont été analysés avec et sans CCT et les résultats obtenus sur les matériaux de référence ont été comparés.

3.2.6 Cadre d'interprétation

On s'attendait à ce que les traceurs métalliques des feuilles contaminées consommées en phase d'exposition se retrouvent pour partie internalisés dans les gammares, et pour partie dans les fèces, aux fuites possibles dans l'eau par excrétion liquide ou par désorption près. Nous avons cherché à mesurer les efficacités d'assimilation (AE), c'est à dire la proportion de traceurs ingérés ne se retrouvant pas dans les fèces marqués excrétés immédiatement après une courte exposition (Wang and Fisher 1999).

L'efficacité d'assimilation (AE) a été calculée, par la méthode des ratios, suivant la formule de l'Équation 1 :

$$AE = 1 - \frac{\frac{\chi_{fèces}^{65}}{\chi_{fèces}^{53}}}{\frac{\chi_{feuilles}^{65}}{\chi_{feuilles}^{53}}} \quad \text{Équation 1}$$

où χ^m_{indice} est l'intensité ICP-MS, en nombre de coups, à la masse m dans un échantillon de matrice spécifiée en indice, fèces ou feuilles contaminées. Sous l'hypothèse que les trois traceurs soient excrétés suivant une même cinétique d'excrétion, il est possible de mener le calcul avec les signaux sommés d'une partie des échantillons des fèces (ce qui a été fait puisque seul les fèces du premier prélèvement ont été sélectionnés); la méthode des ratio n'impose pas de récupérer intégralement les traceurs ingérés (Calow and Fletcher 1972).

Les AE ont été calculées aussi par la méthode du bilan de masse des traceurs en entrée et en sortie des systèmes digestifs des gammars. Cette méthode utilise le calcul des quantités de traceurs en surplus par rapport à la présence naturelle de métaux, notées $\Delta[^{53}\text{Cr}]$ en concentration et $M(\Delta^{53}\text{Cr})$ en masse, $\Delta[^{65}\text{Cu}]$ et $M(\Delta^{65}\text{Cu})$, $\Delta[^{106}\text{Cd}]$ et $M(\Delta^{106}\text{Cd})$. Les masses de traceurs (totales ou en surplus) ont été calculées en multipliant les concentrations par le coefficient de minéralisation de l'échantillon (en mL par mg poids sec).

Le surplus de traceur a été calculé en retranchant la masse de traceur présente initialement à la masse totale de traceur d'un échantillon. Cette dernière est elle-même déduite de la masse élémentaire (mesurée à partir d'un autre isotope que le traceur) multipliée par l'abondance relative du traceur. Le ^{114}Cd fut utilisé pour calculer le surplus de ^{106}Cd , le ^{63}Cu pour celui de ^{65}Cu et le ^{52}Cr pour celui du ^{53}Cr . Cette méthode suppose que la composition en autre isotopes du Cu, Cr et Cd que ceux utilisés pour le traçage de la digestion ne fut pas modifiée au cours de l'expérience. Le calcul du surplus de traceur dans chaque matrice nécessite de déterminer l'abondance isotopique relative du traceur suivi, tel que l'ICP-MS la mesure. Cette valeur a été, pour ^{53}Cr et ^{65}Cu très proche de l'abondance naturelle (ratios mesurés dans les solutions standards de calibration de l'ICP-MS). En l'absence de la composition isotopique totale de l'élément Cd dans ces solutions, l'abondance naturelle tabulée par Delaeter (1991) a été utilisée pour le calcul de $\Delta^{106}\text{Cd}$. En reprenant les notations de Croteau (2007) sur l'exemple du cuivre, le calcul de la concentration en surplus de traceur s'effectue donc selon l'Équation 2 :

$$\Delta[^{65}\text{Cu}]_e = p^{65} \left([^{65}\text{Cu}]_{\text{ICP-MS}} - [^{63}\text{Cu}]_{\text{ICP-MS}} \right) \quad \text{Équation 2}$$

où $\Delta[^{65}\text{Cu}]_e$ est la concentration en surplus de traceur ^{65}Cu dans l'échantillon en $\mu\text{g.L}^{-1}$, p^{65} est l'abondance relative du traceur, $[^{j}\text{Cu}]_{\text{ICP-MS}}$ est la concentration élémentaire déduite par la méthode analytique à partir du signal à la masse j .

Pour calculer le bilan de masse, il a été supposé que la masse de traceur entrante était la masse totale de traceur présente dans la quantité de feuilles contaminée consommée. Elle est notée $M(^{65}\text{Cu})_{\text{feuilles}}$, sur l'exemple du ^{65}Cu et exprimée en nanogramme. En revanche en sortie, les quantités de traceur en surplus ont été décomptées. La masse de traceur sortant du système a été calculée comme la somme des surplus de traceurs sommés dans l'ensemble des fèces excrétées dans la semaine suivant l'exposition (somme pour $1 < i < 7$ des $M(\Delta^{65}\text{Cu})_{\text{fèces},i}$) et des surplus de traceur dans les gammars en fin d'expérience, noté $M(\Delta^{65}\text{Cu})_{\text{org}}$, de sorte que le bilan de masse du traceur jX s'exprime par l'Équation 3

$$B(^jX) = \frac{M(\Delta^jX)_{\text{org}} + \sum_i M(\Delta^jX)_{\text{fèces},i}}{M(^jX)_{\text{feuilles}}} \quad \text{Équation 3}$$

Enfin, l'AE de l'élément X ($X=\text{Cd}$ ou Cu) a été estimée à partir du traceur jX par la méthode du bilan de masse selon l'équation 4:

$$AE(^jX) = 1 - \frac{\sum_i M(\Delta^jX)_{\text{fèces},i}}{M(^jX)_{\text{feuilles}}} \quad \text{Équation 4}$$

3.3. Résultats et discussion

3.3.1 Utilité de la technologie CCT

La Figure 6 présente les résultats des analyses ICP-MS de deux répliquats du matériau de référence. Le taux de recouvrement est le rapport entre la teneur mesurée et la teneur théorique de référence de chaque élément, exprimée pour chaque isotope en pourcentage. Cu et Cd furent mesurés convenablement avec ou sans CCT. Un seul répliquat fut surestimé en ^{106}Cd . Cette surestimation ne fut pas due à l'analyse mais à une contamination de l'acide de minéralisation pour une série d'échantillons – la dernière, estimée à $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ en ^{106}Cd et à $117 \mu\text{g.L}^{-1}$ en ^{65}Cu . En revanche, pour l'élément Cr la CCT modifie le profil isotopique des mesures. Cr fut analysé avec un taux de recouvrement égal quelque soit l'isotope utilisant la CCT, alors que ce n'est pas le cas sans la CCT. De plus, sans CCT, les mesures ne furent pas répétables en ^{53}Cr .

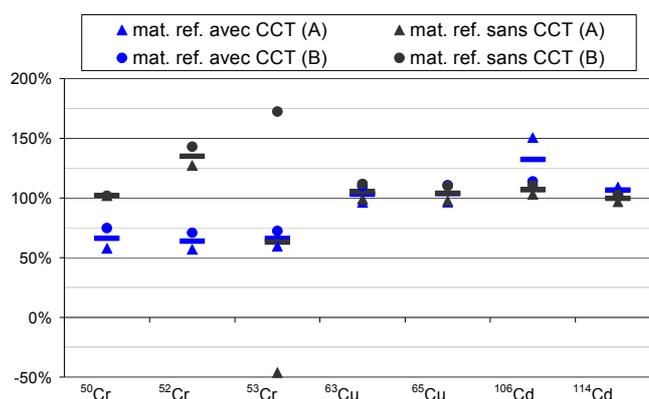


Figure 6: Comparaison de l'homogénéité du taux de recouvrement de la valeur certifiée des mesures des différents isotopes avec ou sans CCT (échantillons de tissus de moule ERM 278). Abrév. : mat. ref pour matériaux de référence. Les barres centrales représentent les moyennes des deux duplicatas A et B.

Les variations du taux de recouvrement entre isotopes du chrome quand il est analysé sans CCT furent interprétées comme une conséquence des interférences (spécifiques à chaque isotope). Avec CCT, le recouvrement des isotopes du chrome sont similaires, avec une sous-estimation de 30% par rapport à la teneur certifiée du matériau de référence en Cr. Ceci peut être expliqué par les différences entre les protocoles d'analyse aux différentes techniques d'analyse utilisées pour obtenir cette teneur:

- La teneur certifiée en métaux a été calculée sur une moyenne incluant des résultats d'analyse par la méthode de l'activation neutronique, seule technique à ne pas sous-estimer les teneurs en Cr dans les échantillons solides,
- Des minéralisations, à chaud et sous pression, plus poussées que celle utilisée ici ont été utilisées pour la certification du matériau de référence

Ces résultats montrent que l'utilisation d'une CCT a été adaptée à la mesure de traces isotopiques dans les matrices organiques et qu'elle a permis une réduction des interférences entachant la mesure des isotopes du Cr, ce qui est crucial dans notre méthodologie. Dans la suite, les résultats sont issus de mesures utilisant la CCT sans correction sur les concentrations mesurées des isotopes du chrome.

3.3.2 Contamination des matrices

Les feuilles consommées par les gammars ont été contaminées en ^{53}Cr , ^{65}Cu et en ^{106}Cd avec des facteurs de contamination par rapport aux feuilles non-contaminées respectivement de : 120 - 4,7 et 2915 (cf. Figure 7).

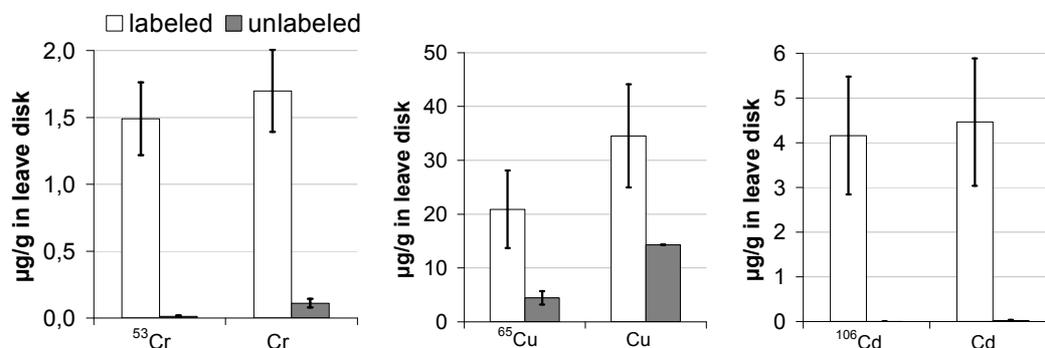


Figure 7: Contamination moyennes en ^{53}Cr , ^{65}Cu et ^{106}Cd et en Cr, Cu et Cd de la nourriture des gammars durant l'expérience : feuilles non-contaminées (unlabeled) et contaminées (labeled). En ordonnée : teneur en isotope ou en élément en $\mu\text{g.g}^{-1}$. Moyenne \pm SD (n=8).

Les surplus de traceur dans les gammars en fin d'expérience ont été, en ^{65}Cu de $19 \pm 5 \text{ ng.g}^{-1}$ (n=8), contre 6 dans les traitements contrôles, en ^{106}Cd de $3,9 \pm 2 \text{ ng.g}^{-1}$, contre 2 dans les contrôles, et en ^{53}Cr de $-0,02 \text{ ng.g}^{-1} \pm 0,06$ contre 0,03 dans les contrôles. Les gammars ont donc été contaminés significativement en ^{106}Cd et en ^{65}Cu mais non en ^{53}Cr en fin d'expérience. Les feuilles consommées, pourtant, étaient bien contaminées en ^{53}Cr . Nous avons donc vérifié *a posteriori* que Cr pouvait être utilisé comme traceur inerte de la digestion, c'est-à-dire qu'il n'a pas été assimilé par les gammars. Les surplus de traceur mesurés dans les contrôles négatifs furent attribués à la contamination de l'acide nitrique pour la dernière série d'échantillon évoquée ci-dessus.

Les fèces ont été contaminées ^{53}Cr , ^{65}Cu et en ^{106}Cd en durant les 24 premières heures de défécation et cette contamination a fortement décru entre les deux premiers temps échantillonnés. Une contamination résiduelle, de 1% à 3% du total déféqué, est apparue jusqu'à 48 heures en ^{53}Cr et en ^{106}Cd . A partir de la cinétique de sortie du ^{53}Cr , présentée Figure 8, le temps de rétention digestive est égal à 24 heures (temps mis aux invertébrés pour déféquer 90% du traceur inerte de digestion).

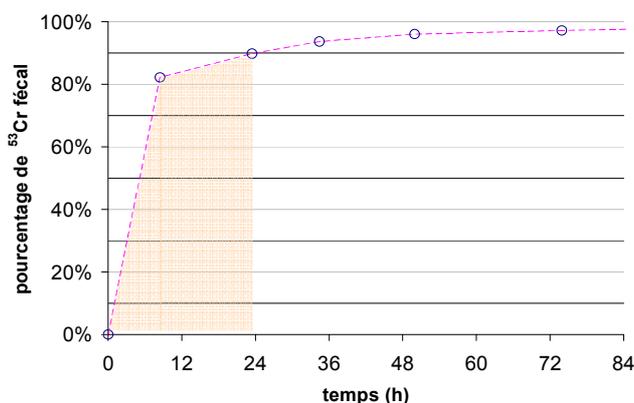


Figure 8: Cinétique d'excrétion du ^{53}Cr à partir du début de la phase de défécation. La zone colorée représente la durée avant que 90% du ^{53}Cr fut déféqué.

Ce temps fut trois fois inférieur à celui pris en compte initialement pour dimensionner la durée d'exposition. De ce fait, la fréquence d'échantillonnage en début d'expérience ne fut pas optimale. La contamination de la toute première série de fèces 1 h après la fin de l'exposition montra que l'essentiel de la défécation eut cours durant les 8 premières heures de l'expérience et que la durée minimale de transit intestinal fut inférieure à la durée de la phase d'exposition. Néanmoins, la réingestion de fèces contaminées fut improbable du fait de l'architecture à double fond des chambres de défécation.

Les concentrations en ^{53}Cr , ^{65}Cu et ^{106}Cd dans l'eau ont été respectivement de $1,5 \pm 1 - 275 \pm 123$ et $2,3 \pm 1 \text{ ng.L}^{-1}$ en début de phase d'exposition. Elles ont atteint les valeurs $1,1 \pm 2 - 352 \pm 114$ et $13 \pm 4 \text{ ng.L}^{-1}$ en fin de cette phase. La phase d'exposition s'est donc accompagné d'une augmentation significative en ^{106}Cd (t-test $p=1,7.10^{-4}$, $n=8$) mais non en ^{65}Cu ($p=0.21$, $n=8$), ni en ^{53}Cr dans l'eau. La variation de concentration de 11 ng.L^{-1} en ^{106}Cd observée dans l'eau pu provenir d'un lessivage des fèces ou bien des feuilles contaminées. Nous avons calculé à partir du taux de clarification par voie dissoute en Cd de *G. pulex* (Pellet *et al.* 2008a) que cette contamination de l'eau n'était susceptible d'induire qu'une bioaccumulation inférieure ou égale à 60 pg de ^{106}Cd par groupe de gammare. Ce surplus de ^{106}Cd est 70 inférieur à leur masse finale accumulée en ^{106}Cd , de sorte qu'on a pu considérer que les gammares ne ont été contaminés que par voie trophique lors de l'expérience.

3.3.3 Taux de nutrition des gammares

Puisque ^{53}Cr a bien été un traceur inerte de la digestion, la masse de feuilles consommée par les gammares de chaque réplicat a été calculée en rapportant la masse totale de ^{53}Cr fécaux à la contamination des feuilles contaminées. En moyenne, $10,4 \pm 4,6 \text{ mg}$ de feuilles (en poids sec) ont été consommés durant la phase de contamination. Cette consommation correspond à un taux de nutrition de $0,86 \pm 0,26 \text{ mg.mg}^{-1}.\text{j}^{-1}$, entre 2 et 4 fois supérieur à celui habituellement mesuré chez *G. pulex*, (Felten 2003). Ceci s'explique du fait que cette consommation a été mesurée durant les toutes premières heures de présence de nourriture, après une période de diète complète de 3 jours des gammares.

3.3.4 Efficacités d'assimilation par la méthode des ratios

Le ratio de $^{65}\text{Cu}:$ ^{53}Cr des feuilles contaminées a été de $26 \pm 5,7$ ($n=7$) et de $^{106}\text{Cd}:$ ^{53}Cr de $3,7 \pm 0,8$ ($n=7$). Un échantillon de feuilles n'a pas été pris en compte à cause d'un problème d'échantillonnage (seules les nervures furent échantillonnées et analysées car les gammares avaient consommé toutes les parties molles). La détermination de ces deux ratios dans les échantillons de fèces a nécessité une sélection des échantillons de fèces pris en compte et une prise en compte du bruit dans le signal brut fourni par l'ICP-MS. Seule la première série d'échantillon de fèces présente des intensités ICP-MS en ^{53}Cr dans les réplicats expérimentaux supérieure à deux fois celle des contrôles. La méthode des ratios a donc été appliquée en ne prenant en compte que cette série de fèces. De plus, dans les échantillons de fèces (mais pas dans ceux de feuilles contaminées), les intensités ICP-MS des contrôles n'ont pas été inférieures à 10 fois celle des réplicats expérimentaux en ^{53}Cr et en ^{65}Cu , comme on peut le constater dans la partie gauche du Tableau 2. Il fut donc soustrait aux intensités mesurées pour les trois isotopes la valeur minimale d'entre les deux contrôles non-contaminés, au préalable au calcul du ratio en $^{65}\text{Cu}:$ ^{53}Cr et $^{106}\text{Cd}:$ ^{53}Cr dans les fèces. Les AE de chaque réplicat en ^{65}Cu et en ^{106}Cd calculées par la méthode des ratios sont présentées dans le tableau 2. L'AE calculée pour le ^{65}Cu n'est pas statistiquement différente de zéro ($U=48$, $p=0.105$) alors que celle du ^{106}Cd l'est ($U=64$, $p=0,00015$).

Tableau 2: Calcul des AE du ^{65}Cu et du ^{106}Cd par la méthode des ratios

		Intensités ICP-MS pour les fèces			AE	
		^{53}Cr	^{65}Cu	^{106}Cd	^{65}Cu	^{106}Cd
Contrôles	1	9527	537953	292		
	2	13120	489758	299		
Réplicats	1	27860	1089152	46820	-0,26	0,33
	2	21502	1003782	27972	-0,85	0,43
	3	21110	820305	28745	-0,51	0,02
	4	35646	905219	15996	0,55	0,87
	5	27051	990640	42682	-0,32	0,30
	6	18925	640005	15549	0,36	0,44
	7	40011	1841096	74092	-0,70	0,35
	8	25463	1010879	44479	-0,02	0,40
moy					-22 %	39 %
SD					49 %	23%

Les six AE en cuivre négatives (sur huit) ne correspondent à aucun phénomène biologique. Pour autant, le ratio moyen $^{65}\text{Cu} : ^{53}\text{Cr}$ des fèces a été de 30 ± 11 , c'est à dire non statistiquement différent de celui des feuilles ($W=28$, $p=0.72$). Ainsi, l'enrichissement des fèces en ^{65}Cu par rapport au ^{53}Cr n'a été qu'apparent, dû au bruit autour de la mesure du ^{65}Cu des fèces.

3.3.5 Efficacité d'assimilation par la méthode du bilan de masse

Tableau 3: Calcul des bilans de masse (Equation 3) pour ^{65}Cu et ^{106}Cd dans les huit réplicats

		Vérification du bilan	
		^{65}Cu	^{106}Cd
Réplicats	1	152%	72%
	2	202%	69%
	3	195%	103%
	4	57%	34%
	5	175%	79%
	6	167%	67%
	7	122%	82%
	8	125%	63%
Moy*		149%	71%
SD		48%	19%

Les valeurs des bilans de masse sont comprises entre 34% et 202%, seule l'expérience 7 a mené à un bilan à 20% près équilibré en ^{65}Cu et en ^{106}Cd . En ^{65}Cu , tous les bilans sauf un ont été supérieurs à 120%. En ^{106}Cd , un test de Mann-Whitney montre que l'espérance des bilans de masse

est statistiquement inférieure à 100% ($U=56$, $p<0.011$). Prendre en compte le lessivage du ^{106}Cd dans l'eau, en supposant qu'il impliquait les traceurs fécaux et non ceux des feuilles, n'augmente pas suffisamment les bilans de masse en ^{106}Cd pour que leur espérance soit statistiquement égale à 100%.

Les efficacités d'assimilation calculées selon l'Equation 4 ont été égales à $-32\% \pm 42\%$ pour ^{65}Cu et de $38\% \pm 19\%$ pour ^{106}Cd . L'AE du ^{106}Cd est proche de celle obtenue par la méthode des ratios. Par surcroît, la figure 7 montre que les profils des AE en ^{106}Cd calculées par les deux méthodes pour chacun des réplicats sont similaires. Puisque les teneurs mesurées dans les fèces et dans les feuilles ont permis de mesurer des AE vraisemblables par l'Equation 4, nous sommes d'avis que la sous-estimation du bilan de masse en ^{106}Cd est liée à une sous-estimation de la teneur finale bioaccumulée dans les gammars. En ^{65}Cu , la somme de traceurs fécaux a été supérieure à celle de la nourriture, ce qui tend à montrer à minima que l'assimilation de ce traceur a été faible (bien que non-nulle puisque les gammars en fin d'expérience présentèrent un surplus ^{65}Cu bioaccumulé) et que les teneurs en cuivre des fèces et des feuilles ne peuvent pas mener à un calcul d'AE fiable. L'imprécision autour de l'AE du ^{65}Cu est trop importante pour pouvoir estimer l'AE à partir du bilan de masse.

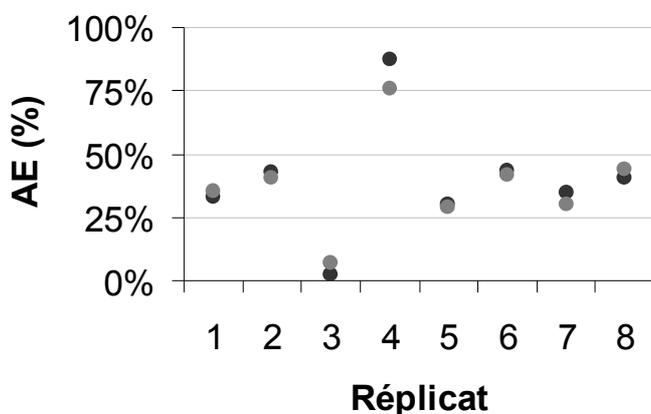


Figure 7 Comparaison des AE en ^{106}Cd calculées par la méthode des ratio (noir) et par la méthode du bilan de masse

Néanmoins, nous proposons une fenêtre d'estimation de l'AE du cuivre en analysant la bioaccumulation des gammars. Les cinétiques d'élimination du cuivre dans les gammars estuariens établies par Clason et al. montrèrent qu'ils l'éliminent avec une demi-vie d'environ 7 jours (Clason and Zauke 2000). Ainsi, un facteur correctif de +80%, de prise en compte de 5 jours d'élimination, a été appliqué afin d'obtenir une teneur corrigée à $t=48$ h. L'AE du cuivre a été estimée en rapportant cette teneur bioaccumulée à celle des feuilles contaminées, rapport qui est de $14\% \pm 7\%$.

La méthode du bilan de masse a donc permis une détermination d'AE des métaux chez *G. pulex*. Le succès de cette méthode n'a été que partiel puisque les surplus de traceurs ^{65}Cu n'ont pas été égaux en entrée et en sortie de digestion et n'ont pas permis d'aller plus loin qu'une estimation de l'AE. On retrouve, pour le Cd, l'adéquation entre les deux méthodes déjà observée par Croteau (2007).

4. Conclusion

Les résultats présentés ici ont montré que différents facteurs contrôlaient l'accumulation du cadmium: compétition métalliques, modification de l'activité ventilatoire, compétition cationique... Ainsi il semble capital de prendre en compte non seulement la concentration métallique mais également les paramètres environnementaux du milieu d'exposition lors d'étude de bioaccumulation.

L'expérience sur la voie trophique de contamination a ont permis de déterminer que l'efficacité d'assimilation du Cd chez le gommare se nourrissant de feuilles d'aulne contaminées en surface est de $40\% \pm 20\%$. Elle a mis en évidence une assimilation par voie trophique du cuivre plus faible que celle

du cadmium, avec une AE non nulle, estimée à moins de 20%. Un effort méthodologique important a été consacré à l'adaptation pour les gammars de la méthode du "pulse-chase feeding". La mesure des concentrations en Cr, dans le but de rechercher des surplus de traceur ^{53}Cr , bénéficie largement de la technologie CCT car celle-ci limite les interférences sur ^{52}Cr et ^{53}Cr . Le fait que le chrome ne soit pas assimilé par le gammare a été vérifié. Ce développement pourrait être prolongé et amélioré à la lumière des résultats actuels, sachant que le temps de rétention digestive fut de 24h et donc qu'un échantillonnage plus fréquent de 12h eut été justifié en début de phase d'excrétion.

5. Bibliographie

- Attar, E. N., and Maly, E. J. (1982). Acute toxicity of cadmium, zinc, and cadmium-zinc mixtures to *Daphnia magna*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 11, 291-296.
- Calow, P., and Fletcher, C. R. (1972). A new radiotracer technique involving ^{14}C and ^{51}Cr , for estimating the assimilation efficiencies of aquatic, primary consumers. *Oecologia* 9, 155-170.
- Clason, B., and Zauke, G. P. (2000). Bioaccumulation of trace metals in marine and estuarine amphipods: evaluation and verification of toxicokinetic models. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57, 1410-1422.
- Coughlan, J. (1969). The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Marine Biology* 2, 356-358.
- Croteau, M.-N., Luoma, S. N., and Pellet, B. (2007). Determining metal assimilation efficiency in aquatic invertebrates using enriched stable metal isotope tracers. *Aquat. Toxicol.* 83, 116-125.
- Croteau, M. N., Luoma, S. N., Topping, B. R., and Lopez, C. B. (2004). Stable metal isotopes reveal copper accumulation and less dynamics in the freshwater bivalve corbicula. *Environ. Sci. Technol.* 38, 5002-5009.
- Delaeter, J. R. (1991). Isotopic Compositions of the Elements 1989. *Pure Appl. Chem.* 63, 991-1002.
- Felten, V. (2003). Effets de l'acidification des ruisseaux vosgiens sur la biologie, l'écologie et l'écophysiologie de *Gammarus fossarum* Koch, 1835 (Crustacea Amphipoda) : approche intégrée à différents niveaux d'organisation. In *Sciences et Ingénierie des Ressources Procédés Produits Environnement*, p. 340. Metz University.
- Fisher, S. W., Stromberg, P., Bruner, K. A., and Boulet, L. (1991). Molluscicidal activity of potassium to the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*: Toxicity and mode of action. *Aquatic Toxicology* 20, 219-234.
- Hammer, D., Nicolas, M., and Andrey, D. (2005). Improved chromium determination in various food matrices using dynamic reaction cell ICP-MS. *At. Spectrosc.* 26, 203-208.
- Hemelraad, J., Kleinveld, H. A., and De Roos, A. M. (1987). Cadmium kinetics in freshwater clams. III. Effects of zinc on uptake and distribution of cadmium in *Anodonta cygnea*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 16, 95-101.
- Lacour, C. (2006). Interprétation de la bioaccumulation du cadmium par *Gammarus pulex* en fonction de la chimie du milieu, p. 45 pages. Université Paris XII-val de marne, Créteil.
- Luoma, S. N., and Rainbow, P. S. (2005). Why Is Metal Bioaccumulation So Variable? *Biodynamics as a Unifying Concept. Environmental Science & Technology* 39, 1921-1931.
- Pellet, B., Geffard, O., Kermaal, T., Lacour, C., Gourlay, C., and Tusseau-Vuillemin, M. H. (2008a). A model predicting waterborne Cd bioaccumulation in *Gammarus pulex*: the effects of dissolved organic ligands, calcium and temperature. *Environ. Toxicol. Chem.* Submitted Jan2008.
- Pellet, B., Gourlay, C., Kuhn, E., Kermaal, T., Nicolle, F., and Tusseau-Vuillemin, M.-H. (2008b). Contrôle de la bioaccumulation des métaux par deux organismes modèles du milieu aquatique. *Rapport d'activité du PIREN-Seine*.
- Roditi, H. A., Fisher, N. S., and Sanudo-Wilhelmy, S. A. (2000). Uptake of dissolved organic carbon and trace elements by zebra mussels. *Nature* 407, 78-80.
- Shulman Weis, J. (1980). Effect of zinc on regeneration in the fiddler crab *Uca pugnator* and its interactions with methylmercury and cadmium. *Marine Environmental Research* 3, 249-255.

- Spehar, R. L., Leonard, E. N., and Defoe, D. L. (1978). Chronic effects of cadmium and zinc mixture on flagfish, *Jordanella floridae*. *Trans. Am. Fish. Soc.* 107, 354-360.
- Tan, Q. G., and Wang, W. X. (2008). The influences of ambient and body calcium on cadmium and zinc accumulation in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1605-1613.
- Voets, J., Bervoets, L., and Blust, R. (2004). Cadmium Bioavailability and Accumulation in the Presence of Humic Acid to the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*. *Environmental Science and Technology* 38, 1003-1008.
- Wang, W. X., and Fisher, N. S. (1997). Modeling the influence of body size on trace element accumulation in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series* 161, 103-115.
- Wang, W. X., and Fisher, N. S. (1999). Assimilation efficiencies of chemical contaminants in aquatic invertebrates: A synthesis. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2034-2045.
- Werner, I. (2000). Faecal pellet production by Arctic under-ice amphipods - transfer of organic matter through the ice/water interface. *Hydrobiologia* 426, 89-96.