



N° d'ordre NNT : 2018LYSE1031

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 205
Ecole Doctorale Interdisciplinaires Sciences-Santé

Spécialité de doctorat : Ecophysiologie, Ecotoxicologie
Discipline : Biologie

Soutenue publiquement le 16/03/2018, par :
Mathilde PIGNERET

**Réponses écophysiologiques à une pollution
d'origine anthropique chez un organisme
sentinelle et conséquences sur le
fonctionnement des bassins d'infiltration**

Devant le jury composé de :

LIGNOT, Jehan-Hervé	PU, Université Montpellier	Rapporteur et Président
GERET, Florence	PU, INU Champollion	Rapporteuse
PARIS-PALACIOS, Séverine	MCU, Université Reims	Rapporteuse
WIEGAND, Claudia	PU, Université Rennes 1	Examinatrice
ROUSSEL, Damien	MCU, Université Lyon 1	Directeur de thèse
HERVANT, Frédéric	MCU, Université Lyon 1	Co-directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. le Professeur Frédéric FLEURY

Président du Conseil Académique

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Didier REVEL

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

Vice-président de la Commission Recherche

M. Fabrice VALLÉE

Directrice Générale des Services

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. X. PERROT

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

« Je ne voulais pas juste connaître les noms des choses.

Je me souviens vraiment de vouloir savoir comment tout cela fonctionne. »

Elizabeth Blackburn

REMERCIEMENTS

*Je tiens tout d'abord à adresser mes sincères remerciements à **Florence Géret**, **Séverine Paris-Palacios**, **Claudia Wiegand** et **Jehan-Hervé Lignot** pour le privilège qu'ils m'ont accordé en évaluant ce travail de thèse.*

*Je tiens également à exprimer toute ma gratitude envers mon directeur de thèse, **Frédéric Hervant** et mon co-directeur de thèse, **Damien Roussel**, qui m'ont soutenu et épauler tout au long de ces 3 années (et quelques mois de plus) de thèse !!!*

Et plus personnellement :

*Merci **Damien** pour m'avoir fait découvrir le joyeux monde des « mitochondriens » ;) et de votre patience lors des manip (l'activité mitochondriale de *L. hoffmeisteri* n'étant pas très rapide !)*

Fred, MERCI de m'avoir supporter (et le mot est faible !) durant le Master 2, le doctorat, et soutenue lors des périodes de stress, de doutes quant aux résultats obtenus, sur le sens de cette thèse etc. Bref, merci d'avoir cru en moi et m'avoir choisi comme « petite padawan » dès le Master 2.

*Un grand merci aux personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer pour mon 1^{er} article, qui m'ont permises de découvrir et d'acquérir de nouvelles compétences (**Florian Mermillod-Blondin**, **Laurence Volatier**, **Caroline Romestaing**, **Eric Maire** et **Jérôme Adrien**). Sans oublier **Ludovic Guillard** et ses innombrables tests pour avoir des mesures parfaites des dégagements de CO₂ et CH₄, encore merci !*

*Un ENOOOORME merci à **Margot Jacquy**, alias « la machine » pour m'avoir assisté dans tous les très nombreux dosages et tri de vers ! Nous avons formé un binôme de paillasse de choc !!! :) Un grand merci également à toute les personnes qui se sont initiés au tri de vers perdus au milieu des sédiments ainsi qu'aux stagiaires qui se sont greffées lors d'une brève période sur ce projet de recherche (**Estelle**, **Juliette**, **Marine** et **Alicia**)*

*Je tiens à remercier aussi l'**OTHU** pour son soutien financier afin de réaliser ces expérimentations ainsi qu'à **Laëtitia Bacot** pour m'avoir permis de participer aux séminaires OTHU et à Novatech (congrès qui restera certainement gravé dans les mémoires de plusieurs doctorants !)*

*Mes plus sincères remerciements à **Sylvie Barraud** (merci pour le mail de soutien d'avant-soutenance !), **Ghislain Lipeme-Kouyi**, et **Bernard Clément** pour avoir accepté de participer à mes comités de suivi de thèse et leurs conseils avisés quant aux expérimentations et résultats présentés.*

*Merci également à toutes les personnes de l'équipe **E3S** et du **LEHNA**, au sein desquels j'ai pu passé de joyeuses et enrichissantes années de thèse. Mention spéciale pour **Pierre Marmonier** qui face à des résultats démoralisants, trouvait toujours un mot pour que*

l'espoir renaisse :) ainsi que sa bonne humeur communicative et ses éclats de rire qui traversaient le couloir.

Et sans oublier de remercier très sincèrement toutes les personnes croisés au cours des ces années de thèse, qui ont fortement participer à la bonne ambiance chez les djeun's du labo !

*Parmi eux, je tiens à remercier tout particulièrement les personnes de notre trio infernal : **Jérémy** et **Nathanaëlle** pour leur amitié sans faille car je ne les ai pas épargné lors de mes moments de stress et de saute d'humeur, et plus particulièrement Jérém (tu mériterais clairement un prix pour avoir tenu aussi longtemps dans le même bureau). Merci à vous les amis pour tout ce que nous avons traversé dans ce labo (le meilleur comme le pire !) et pour l'impression de ce manuscrit, qui n'aurait pas été possible sans vous;)*

*Je tiens à remercier très chaleureusement **Valérian**, **Louise C.** et **Elodie** (même si vous faite partie d'un autre labo, on vous aime quand même <3), **Mylène**, **Arnaud**, **Jérôme**, **Ludovic**, **Laura**, **Baptiste**, **Mailys**, **Marion**, **Juliette**, **Louise B.** et sans oublier **Florian** (alias Floflo/binôme d'expérimentation animale), **Marine**, **Clémentine**, **Antoine** (Novatech team ^), **Nathalie** ainsi que les compagnons de soirées/apéros « scientifiques » ou pas : **Jaja**, **Maylis**, **Amandine** et tous les autres que je n'ai pas cité...*

*Une pensée également pour tous ceux qui ont quitté le navire en cours de route dont **Julia** (merci ma poule <3), **Ivan(ka)**, **Delphine**, **Hugo**, **Antonin**, **PAX** ... Merci pour toutes ces soirées animées et arrosées au Toï Toï, pots de thèse (plus ou moins oubliés passé une certaine heure de la nuit dans la rue Ste Catherine), de déjeuner au Domuss (+ Jerem qui pique dans mon assiette !), de pause gourmandes à 16h (avec vol de biscuits) et j'en passe !*

*Plus personnellement, je tiens à remercier affectueusement mes amis (**Bettina**, **Sophie**, **Juliette**, **Robin**, **Carlos**, **Jérôme**, **Clément**, **Ted**, **Kévin**, **Fou** et toute la **clique UFRAPSiennne...**) qui, malgré leurs tentatives plus ou moins réussies de compréhension de mon sujet ont toujours été là pour m'accompagner tout au long de mon parcours universitaire très riche en émotions et en soirées. Merci les coupains <3*

*Merci à aussi à **Mich Mich**, **Françoise**, **Robbie**, **Crevette**, **Mimi**, **Pépé Alain**...bref la « Couée » qui m'ont longuement questionner sur mon sujet de thèse (pas toujours très intéressant pour eux ou abstrait, la mito quoi ? la mitochondrie !) Merci aussi à **Bounty**, **Napoléon** (les siestes interminables sur mon bureau pendant les dernières semaines de rédaction...), **Nespresso**, **Kristal** et **Vulcane** pour les moments de décompression ;)*

*Et enfin, un immense merci (et encore ce n'est pas suffisant) à mes parents, **Sylvie** et **Jean-Claude** et ma famille pour leurs encouragements et soutien sans faille et sans lesquels je n'aurais pas pu réaliser mes études dans d'aussi bonnes conditions.*

RESUME

Les populations humaines sont exposées à de très nombreux polluants. Il apparaît donc essentiel d'évaluer la toxicité de ces molécules au sein des compartiments récepteurs. En milieu urbain, de nombreux polluants (principalement hydrocarbures et métaux lourds) s'accumulent sur les surfaces imperméables (routes, toitures, parkings, bâtiments...). Ils sont remis en suspension et drainés par les eaux de pluie jusque dans les bassins d'infiltration. Ces structures ont été construites afin de détoxifier les eaux de ruissellement, puis de les réinfiltrer dans les nappes phréatiques sous-jacentes. Ces molécules toxiques sont capturées et accumulées au niveau des sédiments fins constitutifs des bassins, où elles peuvent atteindre des concentrations très élevées. Malgré cette forte contrainte, quelques rares invertébrés vivent dans les sédiments pollués des bassins d'infiltration, ce qui sous-entend des adaptations métaboliques, physiologiques et/ou comportementales spécifiques. L'un des plus répandus est l'oligochète aquatique *Limnodrilus hoffmeisteri*. Ce ver tubificidé construit des galeries (activité de bioturbation) dans les sédiments où il favorise l'activité des microorganismes sur la minéralisation de la matière organique et le recyclage des nutriments. Cette espèce présente donc un rôle essentiel dans le fonctionnement des bassins d'infiltration, et donc sur la qualité de l'eau des nappes phréatiques. Elle est aujourd'hui considérée à la fois comme une espèce sentinelle de l'état de santé de son biotope et comme un ingénieur des écosystèmes.

Le premier objectif de ce travail de thèse a été de mettre en évidence les réponses écophysiologiques permettant à *L. hoffmeisteri* de survivre dans ces biotopes particulièrement anthropisés. Pour cela, nous avons exposé/élevé cet organisme pendant 1, 3 ou 6 mois dans des sédiments pollués issus de 3 bassins d'infiltration, en laboratoire. Nous avons ensuite analysé sur ce ver la survie, la consommation d'oxygène, l'état des réserves énergétiques, les concentrations de métaux lourds bioaccumulés, le stress oxydant engendré par les polluants (niveau de peroxydation lipidique) et enfin les mécanismes de protection associés (activités des principales enzymes antioxydantes). Les mêmes analyses ont été réalisées sur des vers élevés 1 à 6 mois dans un sédiment issu d'un milieu non urbanisé (sédiment témoin très peu pollué).

Le deuxième objectif a été de déterminer l'impact des polluants urbains sur les métabolismes aérobie et anaérobie chez *L. hoffmeisteri*. Pour cela, nous avons mesuré différents paramètres témoignant de l'activité mitochondriale (activités de la chaîne respiratoire mitochondriale et de l'ATP synthétase) ainsi que les concentrations des principaux produits terminaux du métabolisme anaérobie chez des vers exposés aux mêmes

sédiments (4) pollués ou témoin. Cette étude a démontré que les contaminants induisent une transition partielle du métabolisme aérobie vers les voies anaérobies suite à un dysfonctionnement mitochondrial, et a aussi révélé que certains produits terminaux du métabolisme anaérobie (succinate et propionate) constituent des marqueurs pertinents de la pollution urbaine.

Enfin, le troisième objectif de cette thèse a été d'évaluer l'impact d'une pollution d'origine anthropique sur l'activité d'ingénierie de *L. hoffmeisteri* (i.e. sur son rôle dans le fonctionnement des bassins d'infiltration). Pour cela, nous avons mesuré pendant 1 mois le comportement de fouissage de ce ver bioturbateur par tomographie aux rayons X dans des microcosmes contenant des sédiments pollués ou non. De plus, des mesures régulières des flux de nutriments, d'oxygène dissous, de CO₂ et de CH₄ au cours de l'expérimentation ont permis d'évaluer l'influence du taux de contamination sur le recyclage des nutriments dans nos systèmes expérimentaux. Ces mesures ont été effectuées à la fois dans des systèmes colonisés par *L. hoffmeisteri*, mais aussi dans des systèmes sans faune, afin de quantifier précisément le rôle de ces organismes ingénieurs.

Mots clés : pollution urbaine ; ver tubificidé ; écophysiologie ; métabolisme énergétique ; bassin d'infiltration ; anaérobiose ; stress oxydant

ABSTRACT

Human populations are exposed to numerous pollutants. It is now necessary to evaluate the toxicity of urban contaminants in receptor ecosystems. In anthropized areas, many pollutants (mainly hydrocarbons and heavy metals) accumulate on the impervious surfaces (roads, parks, buildings, rooftops...). During a rainfall event, these compounds are re-suspended and drained up to stormwater infiltration basins. These structures were built to detoxify and to infiltrate runoff water to underlying groundwater. Toxic compounds are captured and accumulated in the fine sediment layer of the infiltration basins, where their concentrations may achieve important concentrations. Despite this harsh constraint, a few invertebrates inhabit stormwater basin sediments and have developed specific metabolic, physiological and/or behavioural adaptations. One of the most spread is the oligochaeta *Limnodrilus hoffmeisteri*. This tubificid worm burrows galleries (bioturbation activity) in sediments where it enhances the organic matter mineralization and the nutrients recycling. This species has an essential role in the infiltration basin functioning and on groundwater quality. *L. hoffmeisteri* is considered both as a sentinel species of ecosystem health and an engineer species.

The first aim of this work was to highlight the ecophysiological responses that allow *L. hoffmeisteri* to survive in these harsh conditions. We exposed this organism during 1, 3 or 6 months to polluted sediments (from 3 infiltration basins), under laboratory conditions. Then, we measured the survival, the oxygen consumption, the energy body stores, the oxidative stress induced by urban pollutants (through the lipid peroxidation level), and the antioxidant defence mechanisms (the activity of the antioxidant enzymes) in *L. hoffmeisteri*. The same analyses were realized on worms incubated 1 to 6 months in a sediment from a non-urbanized environment (considered as a low-polluted/control sediment).

The second objective of the present work was to determine the impact of urban pollutants on aerobic and anaerobic metabolisms in *L. hoffmeisteri*. We measured several mitochondrial parameters (the mitochondrial respiratory chain activity and the ATP production rate) and anaerobic end product concentrations in worms exposed to the 4 same sediments (polluted or not). This study demonstrated that urban pollutants induced a shift from aerobic to the anaerobic metabolism, linked to a mitochondrial dysfunctioning. Moreover, this study also showed that two anaerobic end products (succinate and propionate) constitute relevant biomarkers of urban pollution.

Lastly, the third goal of this thesis was to evaluate the impact of an anthropic pollution on the engineering activity of *L. hoffmeisteri* (i.e. its role in the infiltration basin functioning). To this end, we measured during 1 month the burrowing activity of this tubificid worm using X-ray tomography, in microcosms containing slightly or highly polluted sediments. We measured nutrients fluxes, dissolved oxygen, CO₂ and CH₄ concentrations during the experiment to determine the influence of the pollution rate on nutrients recycling. These measurements were also realized in microcosms with or without worms, to quantify the functional role of engineer organisms.

Keywords: urban pollution; tubificid worm; ecophysiology; energy metabolism; stormwater basin; anaerobiosis; oxidative stress

TABLE DES MATIERES

Remerciements	4
Résumé	6
Abstract	8
Table des matières	10
Abréviations	12
Liste des figures	14
Liste des tableaux	16
Financement de ce travail.....	17
Introduction générale.....	19
Objectifs de la thèse et organisation du manuscrit.....	21
CHAPITRE I. Cadre conceptuel	
1. La pollution urbaine	28
1.1 Sources de contamination.....	28
1.2 Polluants majoritaires en ville	29
1.2.1 Les hydrocarbures	29
1.2.2 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)	29
1.2.3 Les métaux lourds	30
1.3 Autres polluants.....	31
1.4 Cocktail de polluants.....	31
1.5 Santé humaine et pollution urbaine.....	32
2. Impact des polluants urbains sur la balance oxydative et le métabolisme énergétique des organismes.....	32
2.1 Stress oxydant et pollution : perturbations de la balance oxydative	33
2.1.1 Les espèces réactives de l'oxygène	33
2.1.2 La peroxydation lipidique	34
2.1.3 Dégâts sur l'ADN et les protéines.....	35
2.2 Effets des polluants urbains sur le siège du métabolisme aérobie : la mitochondrie	36
2.2.1 Structure de la mitochondrie	36
2.2.2 Rôle et fonctionnement de la mitochondrie	37
2.2.3 Cible des polluants urbains	42
2.3 Impact sur le métabolisme aérobie - Les voies anaérobies	43
3. Principales réponses physiologiques à la pollution.....	45
3.1 Les réserves énergétiques.....	45
3.1.1 Le glycogène, une réserve facilement mobilisable	46
3.1.2 Les triglycérides, une réserve à haut rendement énergétique.....	47
3.1.3 Les protéines, réserves mobilisables lors de certains stress de longue durée.....	50
3.2 Les défenses anti-oxydantes non enzymatiques.....	51
3.2.1 Les métallothionéines, protéines piègeuses de métaux	52
3.2.2 Les vitamines.....	54
3.2.3 Le glutathion réduit (GSH)	55
3.3 Les anti-oxydants enzymatiques	55

3.3.1	Les superoxydes dismutases (SOD).....	55
3.3.2	Les catalases.....	56
3.3.3	Les glutathion peroxydases (GPx).....	56
3.3.4	Les glutathion réductases (GSR).....	56
3.3.5	Les glutathion-S-transférases (GST).....	57
3.4	Les cytochrome P450, enzymes clé du métabolisme des xénobiotiques.....	58
4.	Un réceptacle de la pollution urbaine : le bassin d'infiltration.....	59
4.1	Rôles des bassins d'infiltration.....	59
4.2	Fonctionnement des bassins d'infiltration.....	60
4.3	Les bassins d'infiltration : des hot-spot de pollution.....	61
4.4	Bassins d'infiltration utilisés au cours de cette thèse.....	62
4.5	Biodiversité au sein des bassins d'infiltration.....	64
5.	Un excellent modèle biologique : <i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	65
5.1	Un organisme ingénieur.....	65
5.2	Utilisation en écotoxicologie.....	67
6.	Justification du choix des biomarqueurs d'impact utilisés au cours de cette thèse.....	67
<u>CHAPITRE II. Impact des polluants urbains sur le rôle fonctionnel (lié à l'activité de bioturbation) chez <i>L. hoffmeisteri</i></u>		
1.	Introduction.....	72
2.	Urban pollution of sediments : Impacts on the physiology and burrowing activity of tubificid worms and consequences on biogeochemical processes (article 1).....	74
3.	Conclusion du chapitre 2.....	87
<u>CHAPITRE III. Impact des polluants urbains sur le rôle fonctionnel (lié à l'activité de bioturbation) chez <i>L. hoffmeisteri</i></u>		
1.	Introduction.....	90
2.	Metabolic parameters as biomarkers exposure to urban pollutants on an ecosystem engineer, the oligochaete <i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> (article 2).....	93
3.	Anaerobic end-products and mitochondrial parameters as physiological biomarkers to assess the impact of urban pollutants on a key bioturbator (article 3).....	111
4.	Conclusion du chapitre 3.....	130
<u>CHAPITRE IV. Discussion-conclusions & Perspectives</u>		
1.	Discussion – conclusion.....	134
1.1.	Impact de la pollution urbaine sur le comportement de <i>L. hoffmeisteri</i> et conséquences sur le fonctionnement d'un bassin d'infiltration.....	134
1.2.	Impact des polluants urbains sur la physiologie de <i>L. hoffmeisteri</i>	137
2.	Perspectives.....	144
<u>ANNEXES</u>		
	Annexes A.....	148
	Annexes B.....	151
<u>REFERENCES</u>		
		160

ABBREVIATIONS

ADP	adénosine-5'-diphosphate
Ag	argent
As	arsenic
ATP	adénosine triphosphate
ATPase	F ₀ -F ₁ ATP synthase
BAL	sédiment BALAN
Bi	bismuth
BOU	sédiment BOURBE
CaCl ₂	chlorure de calcium
CAT	enzyme catalase
CAT	enzyme catalase
Cd	cadmium
CH ₄	méthane
Co	cobalt
CO ₂	dioxyde de carbone
COX	cytochrome <i>c</i> oxidase
Cu	cuivre
Cys	cystéine
DHAP	dihydroxyacétone phosphate
DJ	sédiment DJANGO
DM	<i>dry mass</i>
e ⁻	électron libre
ETC	chaîne de transport des électrons (<i>Electron Transport Chain</i>)
ETM	éléments traces métalliques
FADH/FADH ₂	flavine adénine dinucléotide oxydée/réduite
FCCP	p-trifluorométhoxycarbonylcyanide phénylhydrazone
Fe ²⁺ /Fe ³⁺	fer oxydé/réduit
GPx	glutathion peroxidase
GSR	glutathion réductase
GSSG/GSH	glutathion oxydé/réduit
GST	glutathion S transférases
GTP	guanosine triphosphate
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
HAP(s)	Hydrocarbure(s) Aromatique(s) Polycyclique(s)
Hg	mercure
IUT	sédiment IUT
MDA	malondialdéhyde
Mg	magnésium
MIN	sédiment MINERVE
MTs	métallothionéines
NAD ⁺ /NADH/NADH ₂	nicotinamine adénine dinucléotide
NADPH, H ⁺ /NADP ⁺	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit/oxydé

NH ₄ ⁺	ion ammonium
NO ₂ ⁻	ion nitrite
NO ₃ ⁻	ion nitrate
O ₂ ^{•-}	anion superoxyde
OH [•]	radical hydroxyle
OH ⁻	ion hydroxyde
Pb	plomb
PEP	phosphoénolpyruvate
Pi	phosphate inorganique
Q	quinone
RCR	contrôle respiratoire (<i>Respiratory Control Ratio</i>)
ROS	espèces réactives de l'oxygène (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SOD	enzyme superoxyde dismutase
TBARS	acide thiobarbiturique (<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>)
TMPD	N,N,N',N' tétraméthyl-1,4-phenylènediamine
VDAC	canaux anioniques voltage-dépendant (<i>Voltage Dependant Anion Channel</i>)
Zn	zinc

LISTE DES FIGURES

Objectif de la thèse et organisation du manuscrit

Schéma de la problématique générale.....23

Schéma global des hypothèses.....26

Chapitre 1

Fig 1. La balance oxydative et les effets environnementaux.....34

Fig 2. Peroxydation lipidique et formation des produits secondaires35

Fig 3. Schéma de la structure d'une mitochondrie.....36

Fig 4. Schéma du cycle de Krebs.....38

Fig 5. Fonctionnement bioénergétique de la chaîne de transport d'électrons et du cycle de Krebs à partir d'une molécule de pyruvate.....40

Fig 6. Schéma descriptif des différents états du fonctionnement de la chaîne mitochondriale en fonction de l'ajout de différents inhibiteurs ou agents découplants42

Fig 7. Schéma des voies des métabolismes aérobie et anaérobie et productions d'ATP associées.....44

Fig 8. Les réactions de la glycolyse et de la néoglucogénèse.....49

Fig 9. Schéma des voies métaboliques permettant la formation d'ATP à partir des différentes réserves énergétiques et interconversion des substrats énergétiques51

Fig 10. Schéma d'une métallothionéine piégeant plusieurs molécules de cadmium.....53

Fig 11. Schéma de l'enchaînement de la prise en charge des ROS par les enzymes anti-oxydantes.....58

Fig 12. Relation entre l'imperméabilisation des sols et les différents modes d'évacuation des eaux pluviales.....60

Fig 13. Schéma d'un bassin d'infiltration et trajectoire de l'eau de ruissellement.....61

Fig 14. Photos des bassins d'infiltration où ont été prélevés les sédiments utilisés au cours de cette thèse.....64

Fig 15. Photographie de *Limnodrilus hoffmeisteri*.....66

Chapitre 2

Fig 1. Reconstructed two-dimensional transversal image (A) and tomographic intensities (B) of a selected section: gas-phase (a), sediment matrix (b), water-phase (c)78

Fig 2. Survival (A) and oxygen consumption (B), concentration of glycogen (C), triglycerides (D), proteins (E), MDA (F) and superoxide-dismutase activity (G) of *L. hoffmeisteri* after 0, 15 and 30 days exposed to each sediments.....80

Fig 3. Vertical distribution of the burrowing activity.....	82
Fig 4. Vertical profiles of dissolved oxygen in the three sediments with or without <i>L. hoffmeisteri</i>	82
Fig 5. Concentrations of nutrients (ammonium, nitrate + nitrite, dissolved organic carbon) measured in the water column for the three sediments with or without <i>L. hoffmeisteri</i>	83
Fig 6. CO ₂ and CH ₄ degassing rates from microcosms for the three sediments with or without <i>L. hoffmeisteri</i>	83

Chapitre 3

Fig A-1. Concentration of glycogen (a), triglycerides (b), proteins (c), concentration of MDA (d), superoxide dismutase activity (e) and catalase activity (f) of <i>L. hoffmeisteri</i> after 0, 1, 3 and 6 months exposed to each sediment	103
Fig A-2. The cytochrome c oxidase activity of <i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> after a 6-months exposure to each sediment	104
Fig B-1. Mitochondrial respiration (State 3 _{ADP}) (a) and FCCP-induced maximal oxygen consumption (State 3 _{FCCP}) (b) of <i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> after a 6-months exposure to each sediment.....	119
Fig B-2. ATP synthesis rate (J _{ATP}) (a) and ATP/O ratio (b) of <i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> after a 6-months exposure to each sediment.....	119
Fig B-3. Body concentrations of alanine (a) and lactate (b) in <i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> after 0, 1, 3 and 6 months of exposure to each sediment.....	121
Fig B-4. Body concentrations of succinate (a) and propionate (b) in <i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> after 0, 1, 3 and 6 months of exposure to each sediment.....	122

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1

Tableau 1. Rendements énergétiques des voies métaboliques aérobie et anaérobie45

Tableau 2. Concentrations en polluants urbains des sédiments des bassins d'infiltration utilisés au cours de cette thèse pour les expérimentations de long terme.....63

Tableau 3. Concentrations en polluants urbains des sédiments des bassins d'infiltration utilisés au cours de cette thèse pour les expérimentations de court terme.....64

Chapitre 2

Tableau 1. Physical and chemical characteristics of the three sediments77

Tableau 2. Density and geometric characteristics of water-filled porosity of the three sediments.....81

Chapitre 3

Tableau A-1. Physical and chemical characteristics of the four sediments99

Tableau B-1. Physical and chemical characteristics of the four sediments120

FINANCEMENT DE CE TRAVAIL

Ce travail de thèse a été financé par une bourse ministérielle de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Suite au concours de l'école doctorale EDISS. Les expérimentations réalisées au cours de cette thèse ont été financées dans le cadre de l'Observatoire de Terrain en Hydrologie Urbaine (OTHU, <http://www.graie.org/othu/>).

INTRODUCTION GENERALE

Les populations humaines sont confrontées à de nombreux contaminants comme les hydrocarbures, les métaux lourds, les résidus pharmaceutiques et les pesticides. Ces molécules sont issues de l'érosion naturelle des sols, mais surtout des activités anthropiques (secteur tertiaire, industries pétrochimiques, agrochimiques et pharmaceutiques...). L'exposition à ces polluants a/aura des répercussions sur la santé humaine. Ainsi, de récentes études ont montré l'incidence que peuvent avoir ces molécules sur l'apparition d'allergies (Obtułowicz et al., 2001 ; D'Amato et al., 2010), de cancers (Boffetta et al., 2006 ; Pestana et al., 2015) et de maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer et de Parkinson) (Kampa and Castanas, 2008 ; Block and Calderón-Garcidueñas, 2009 ; Moulton and Yang, 2012). De plus, de nombreuses autres études ont montré que de tels polluants constituent une menace pour l'environnement (et plus particulièrement pour les milieux aquatiques) et sont responsables de modifications/perturbations de la biodiversité (comme, par exemple, les féminisations observées chez des poissons suite à des expositions chroniques à des perturbateurs endocriniens ou chez des amphibiens avec un herbicide, l'atrazine) (Jobling et al., 1998 ; Hayes et al., 2002). De ce fait, les conséquences à long terme de cette contamination sur la santé humaine et environnementale sont désormais une préoccupation majeure pour de nombreux pays (OCDE, 2012). Face à ces modifications environnementales et à l'accumulation des contaminants dans les écosystèmes, des plans de surveillance des milieux menacés ont été mis en place pour mieux comprendre et appréhender les risques qui pèsent sur ces biotopes. Ainsi, de nombreux outils physico-chimiques ont été développés et sont de plus en plus souvent complétés par des approches plus « écosystémiques/écologiques/biologiques » via l'utilisation de biomarqueurs/marqueurs biologiques standardisés (Vasseur and Cossu-Leguille, 2003). En revanche, à cause de leur grande diversité dans les écosystèmes, le nombre de combinaisons de polluants (potentiellement synergiques) est devenu considérable, rendant indispensable l'étude de « cocktails de polluants » pour appréhender au mieux l'impact de cette multicontamination (Gauthier et al., 2014).

Les zones urbaines doivent faire face à deux problèmes d'ordre écologique : (1) une perturbation du cycle de l'eau, et (2) l'accumulation de polluants (sous la forme de cocktails) pouvant potentiellement s'infiltrer jusqu'aux aquifères souterrains. En effet, suite à un événement pluvieux, les nombreuses surfaces imperméables urbaines et périurbaines (routes,

trottoirs, parkings, bâtiments) limitent l'infiltration de l'eau dans les sols et ainsi réduisent la recharge naturelle des aquifères souterrains (nappe phréatique : importantes sources d'eau potable pour les populations avoisinantes) (Grebel et al., 2013). Pour pallier ce déficit d'infiltration naturelle, des ouvrages de recharge artificielle des nappes phréatiques ont été construits, dont les bassins d'infiltration (Marsalek and Chocat, 2002). En outre, les zones urbaines produisent et concentrent de nombreux polluants qui vont s'accumuler sur ces surfaces imperméables. Ces contaminants (principalement hydrocarbures et métaux lourds) sont ensuite drainés par les eaux de ruissellement jusqu'à ces ouvrages de recharge artificielle, qui constituent leurs exutoires et les écosystèmes où ils vont s'accumuler. Dans les sédiments constitutifs de ces systèmes d'infiltration vivent des organismes, qui doivent obligatoirement mettre en œuvre des réponses comportementales et/ou physiologiques pour supporter des concentrations en toxiques particulièrement élevées (Datry et al., 2013). De plus, certains de ces organismes sont considérés comme des ingénieurs des écosystèmes et possèdent un rôle majeur dans le fonctionnement de ces bassins. Ils peuvent ainsi avoir (1) une incidence (positive) sur le développement des communautés bactériennes responsables de la dépollution/détoxication partielle des eaux d'infiltrations, et (2) un impact sur l'infiltration de ces dernières via leur activité de creusement de galeries (Nogaro and Mermillod-Blondin, 2009). Ces organismes ingénieurs sont principalement des vers bioturbateurs tels que les oligochètes *Limnodrilus hoffmeisteri* et *Tubifex tubifex*. De ce fait, si les polluants impactent négativement le comportement et/ou la physiologie de ces vers, un dysfonctionnement des écosystèmes récepteurs des polluants urbains (i.e. les bassins d'infiltration) peut survenir et potentiellement conduire à un transfert de certains polluants vers la nappe phréatique, et au final représenter un risque sanitaire pour les populations humaines.

Le but de cette thèse a donc été d'évaluer l'impact d'un cocktail de polluants urbains sur le rôle fonctionnel et la physiologie d'un organisme ingénieur, avec une approche originale puisqu'intégrant des techniques et des concepts issus de l'écophysiologie, de l'écotoxicologie et de l'écologie fonctionnelle.

Objectifs de la thèse
&
Organisation du
manuscrit

Les objectifs de cette thèse ont été (1) d'évaluer les réponses écophysiological et comportementales présentées par un organisme à la fois modèle et ingénieur (l'oligochète bioturbateur *Limnodrilus hoffmeisteri*) face à une pollution d'origine anthropique, et (2) de mesurer les conséquences de cette contamination sur le fonctionnement d'un bassin d'infiltration (exutoire final du réseau d'eau pluviale). De plus, nous avons choisi de soumettre nos organismes non pas à une seule molécule ou à un nombre limité de polluants - comme cela est réalisé dans la grande majorité des études écotoxicologiques, mais plutôt à un cocktail de contaminants, car il s'agit d'un stress plus représentatif de ce que l'on observe dans les écosystèmes fortement anthropisés. Pour cela, nous avons réalisé des expérimentations en laboratoire, en exposant durant 1 à 6 mois des organismes « naïfs » (i.e. des animaux d'élevage n'ayant jamais subi de stress chimique) à différents sédiments pollués récoltés sur le terrain (dans trois bassins d'infiltration des eaux de ruissellement) ou à un sédiment comparativement très peu pollué (issu d'une lône du Rhône).

Ces expérimentations nous ont permis :

- de mesurer l'impact d'un cocktail de polluants urbains sur le rôle fonctionnel d'un organisme ingénieur (modifications de certains cycles biogéochimiques et de la porosité au sein du sédiment) et donc sur le fonctionnement d'un écosystème récepteur (dans notre cas, le bassin d'infiltration),
- d'appréhender les réponses mises en place par *L. hoffmeisteri* pour survivre dans un milieu extrêmement anthropisé, et ce à différentes échelles : (1) au niveau comportemental, au travers de l'évolution des activités locomotrice et de bioturbation (par tomographie aux rayons X), (2) au niveau physiologique (modifications du métabolisme énergétique, mécanismes de lutte contre le stress oxydant induit par les polluants), et enfin (3) au niveau subcellulaire au travers de l'évolution du métabolisme mitochondrial.

Nos expérimentations ont également rendu possible le développement de marqueurs originaux montrant l'impact de la pollution urbaine et permettant l'évaluation de l'état de santé des organismes (et donc indirectement/potentiellement de la qualité de leur milieu) ; ces informations d'ordre écophysiological concernent l'aspect « biotique » et sont parfaitement complémentaires des analyses physico-chimiques classiques d'évaluation de l'état de santé d'un biotope.

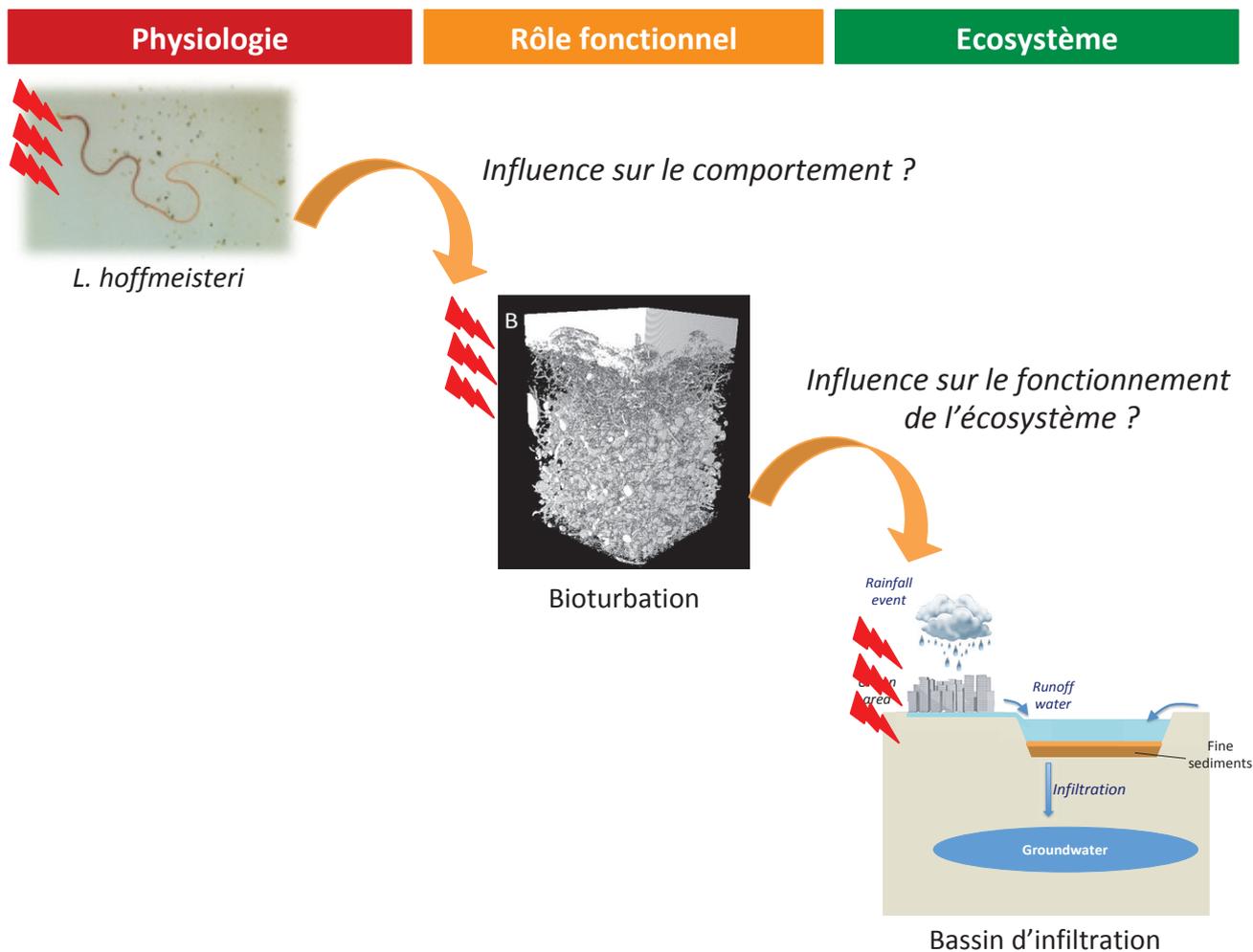


Schéma de la problématique générale

Le présent manuscrit est organisé en quatre chapitres intégrant trois articles scientifiques (1 publié, 1 soumis et 1 à soumettre) qui visent à répondre aux différents objectifs de la thèse.

Le **premier chapitre** présente le contexte scientifique dans lequel s'inscrit ce travail, sous la forme d'une synthèse bibliographique. La première partie aborde la thématique de la pollution urbaine, et en particulier les différentes sources de pollution (les molécules majoritairement rencontrées en milieu urbain, les cocktails formés par ces polluants, et les menaces qu'ils représentent pour la santé humaine). Une seconde partie s'attache à présenter les possibles impacts qu'entraîne une exposition à la pollution urbaine (stress oxydant et effets sur le métabolisme énergétique). Puis, une troisième partie présente les principales réponses physiologiques qui peuvent être mises en place par les organismes pour lutter contre les dégâts induits par un stress de type « pollution urbaine », en allant des mécanismes généralistes à des réponses spécifiques à certains types de polluants. Enfin, la dernière partie

de cette synthèse bibliographique présente le contexte d'application (les bassins d'infiltration) et le modèle biologique choisi pour la réalisation des expérimentations (l'oligochète bioturbateur *Limnodrilus hoffmeisteri*). L'accent sera mis sur le caractère « ingénieur » de cet organisme aquatique.

Le **second chapitre** s'intéressera **aux effets d'une exposition de courte durée** (1 mois) à des sédiments pollués issus de différents bassins d'infiltration, en laboratoire, sur *L. hoffmeisteri*. Nous chercherons plus précisément à mesurer (1) l'impact de ces contaminants sur la physiologie de *L. hoffmeisteri*, et (2) l'évolution du comportement de cet organisme ingénieur (activité de bioturbation) et ses conséquences sur les processus biogéochimiques se déroulant au sein des sédiments (article n°1, publié dans *Science of the Total Environment*). Nous émettons l'hypothèse que le cocktail de pollution urbaine génère un stress oxydant (et donc des dégâts oxydatifs tels que la peroxydation lipidique) chez notre modèle biologique, induisant ainsi la mise en place de mécanismes de défense spécifiques (principalement une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes) et se traduisant par une surconsommation des réserves énergétiques corporelles (en tant que carburants de ces mécanismes). Concernant le comportement de bioturbation, nous supposons que la présence de polluants urbains va modifier l'activité bioturbatrice des vers (i.e le nombre de galeries creusées). De ce fait, nous émettons aussi l'hypothèse que les cycles biogéochimiques vont être rapidement influencés par la modification de la réponse comportementale des vers tubificidés incubés dans des sédiments pollués.

Le **troisième chapitre** se focalisera sur **les effets d'une exposition de longue durée** (6 mois) à des sédiments pollués (issus des mêmes bassins d'infiltration), toujours sur *L. hoffmeisteri*.

Dans un premier temps (article n°2, en cours de rédaction), nous nous intéresserons à différents paramètres physiologiques (mécanismes de lutte contre le stress oxydant, niveau des dégâts oxydatifs, état des réserves énergétiques corporelles) ainsi que sur l'activité catalytique de la cytochrome c oxydase (enzyme clé du métabolisme aérobie et du métabolisme mitochondrial). Nous nous attendons (1) à une augmentation modérée et graduelle (en fonction du temps d'exposition) du stress oxydant chez les vers tubificidés exposés aux sédiments pollués, ce qui suggérerait la mise en place de mécanismes de défense (augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes permettant de limiter les dégâts provoqués par les radicaux libres), et (2) à une utilisation accrue des réserves énergétiques (en

tant que carburant de ces mécanismes de défense). De plus, nous supposons que l'activité de la cytochrome c oxydase diminuera également suite à l'exposition aux polluants urbains, ce qui réduirait significativement la production d'énergie (ATP).

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés aux effets à long terme d'une pollution urbaine sur les métabolismes énergétiques aérobie et anaérobie (article n°3, soumis à *Environmental Science and Pollution Research*). Nous émettons ici l'hypothèse que le stress « pollution » peut impacter à la fois le métabolisme aérobie et le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, et ainsi diminuer la production d'ATP. De ce fait, nous supposons que *L. hoffmeisteri* sera forcé d'utiliser les voies métaboliques anaérobies afin de compenser ce déficit énergétique (lié à une dépression du métabolisme aérobie) et de survivre dans ce milieu fortement pollué.

Enfin, nous suggérons que ces divers paramètres métaboliques peuvent être utilisés comme marqueurs de l'impact d'une pollution urbaine/d'un cocktail de polluants sur un invertébré.

Dans le **quatrième chapitre**, nous avons cherché à synthétiser les résultats présentés dans les précédents chapitres concernant les réponses écophysiologiques et comportementales développées par un organisme ingénieur soumis à une pollution d'origine anthropique et les conséquences sur les processus biogéochimiques qui se déroulent à l'interface eau-sédiment. Nous présenterons ensuite les perspectives qui permettraient d'améliorer/de compléter/d'élargir ce travail de recherche.

Balance oxydative

H₁ : Apparition de dégâts oxydatifs au niveau des lipides membranaires

H₂ : Défenses anti-oxydantes développées et efficaces

Métabolisme énergétique

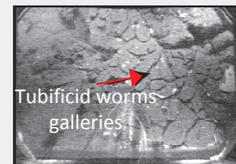
H₃ : Activité mitochondriale impactée
→ baisse de la production d'ATP



H₄ : Utilisation du métabolisme anaérobie

Rôle fonctionnel

H₁ : Modification de l'activité bioturbatrice ?



Influence sur écosystème

H₂ : Baisse de la stimulation des processus biogéochimiques?

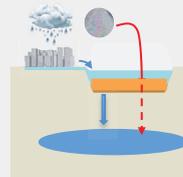


Schéma global des hypothèses

Chapitre I

Cadre conceptuel

1. La pollution urbaine

1.1 Sources de contamination

En milieu urbain, la majeure partie des polluants provient de l'atmosphère et est issue des activités anthropiques (principalement industries et transports). Plus ponctuellement, ces molécules peuvent présenter des origines naturelles (incendies de forêt, volcanisme, érosion des surfaces...). Lors d'événements pluvieux, l'eau qui traverse l'atmosphère se charge en ces divers polluants atmosphériques qui vont ainsi être rabattus au sol. Cet apport de pollution via les eaux de ruissellement (= eau de pluie qui ruisselle sur les sols) est important, car il représente entre 15% et 25% des apports totaux (Chocat, 1997). L'autre part de la pollution urbaine correspond à l'accumulation des contaminants (provenant surtout des activités industrielles et du transport routier) dans les sols lors des temps secs. Chocat (1997) a identifié six sources de pollution principales en milieu urbain. Tout d'abord, le secteur tertiaire (principalement les véhicules motorisés) constitue une source majeure de contaminants de type hydrocarbures, d'oxydes d'azote et de soufre, mais aussi de métaux lourds. Ces derniers proviennent de l'usure des pneus (zinc, cuivre et cadmium), des freins (cuivre, zinc et plomb), des pièces métalliques de carrosserie (plomb, cadmium) et des pots d'échappement (platine, palladium). L'usure des routes (goudron, marquage au sol) représente également une source de pollution indirecte, ainsi que les sels de déneigement (CaCl_2 , NaCl_2) utilisés en période hivernale. Les activités industrielles en bordure des zones urbaines peuvent participer à la pollution urbaine en fournissant des métaux lourds (Pb, Zn, Cd), des polluants organiques (solvants) ou des résidus pétroliers. La ville produit également un grand nombre de déchets organiques, mais aussi plastiques et métalliques. Ces déchets peuvent contaminer les eaux de ruissellement directement dans les bouches d'égout (= entrées du réseau d'eau pluviale) ou sur les surfaces urbaines (poubelles non étanches, rejets, nettoyage des sols urbains). Les chantiers sont également une source de pollution, car ils accélèrent l'érosion des sols (en plus du vent) et peuvent représenter une source importante de fines particules en suspension sur lesquelles vont s'adsorber des polluants comme les hydrocarbures. La présence d'animaux représente aussi une source majeure de matière organique, et les animaux domestiques peuvent également être responsables de la présence de résidus médicamenteux. Enfin, les végétaux utilisés pour l'aménagement urbain constituent une source majeure de matière carbonée plus ou moins biodégradable, mais aussi une source indirecte d'azote et de phosphate (engrais) et de produits phytosanitaires (pesticides, herbicides).

1.2 Polluants majoritaires en ville

En milieu urbain, les eaux pluviales sont contaminées majoritairement par des métaux lourds, des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et par d'autres hydrocarbures (Marsalek et al., 1999). Ces composés sont reconnus comme ayant des effets néfastes sur les organismes vivants (Directive UE, 2001) et font l'objet de surveillance par les organismes de qualité des eaux. Les organismes vivants sont exposés à ces contaminants par ingestion, inhalation ou contact direct. Ces polluants agissent sur la physiologie des organismes directement (métaux lourds) ou indirectement (exposition à des métabolites issus d'une biotransformation du contaminant initial (exemple des hydrocarbures, dont les HAPs).

1.2.1 Les hydrocarbures

Les hydrocarbures sont des molécules de formule chimique générale C_xH_y . Ils constituent les énergies fossiles, parmi lesquelles nous trouvons principalement le pétrole, le charbon ou les gaz naturels. Selon leur composition chimique, ils peuvent être répartis en 3 classes : les hydrocarbures saturés et insaturés, les hydrocarbures aromatiques (parmi lesquels on retrouve les HAPs) et les hydrocarbures lourds (Bertrand and Mille, 1989). Ces molécules peuvent être présentes sous plusieurs formes dans l'eau (dissoutes, complexées/adsorbées avec la matière organique en suspension, ou dissoute) les rendant plus ou moins biodisponibles. En raison de leur caractère hydrophobe, ils ont tendance à s'accumuler dans les couches de sédiments. Lorsque les organismes vont ingérer des hydrocarbures, ceux-ci vont plutôt s'accumuler dans les couches lipidiques tissulaires (Lacaze, 1980). Selon les capacités de métabolisation des organismes, les hydrocarbures peuvent être bioaccumulés ou bien biotransformés par des enzymes (qui vont les oxyder et ainsi les rendre plus hydrosolubles et donc plus facilement excrétables). Leur toxicité est liée aux métabolites produits lors de la biotransformation de l'hydrocarbure (Livingstone, 1998).

1.2.2 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)

Parmi les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), 17 sont suivis plus particulièrement depuis les années 80 (US EPA, 1991) car considérés comme représentatifs de l'ensemble des HAPs (cf. Annexe 1). Ils sont souvent considérés comme cancérigènes et/ou comme mutagènes. Ce sont des composés organiques dont la structure compte au moins deux cycles aromatiques (Wilson and Jones, 1993 ; Boxal, 2014 fiches HAPS et métaux) ; certains d'entre eux sont très volatils (naphtalène), mais on les retrouve généralement sous forme particulaire. Ils présentent également des propriétés hydrophobes (plus les HAPs possèdent de cycles aromatiques, plus ils sont lipophiles/hydrophobes) et vont donc chercher

à s'adsorber sur des de fines particules de matière organique en suspension (accumulées - comme ces contaminants - sur les sols urbains par temps sec). Les HAPs s'accumulent donc facilement dans les couches sédimentaires. Les organismes vivants peuvent assimiler ces contaminants, les accumuler dans les membranes lipidiques, puis les biotransformer (via l'action d'enzymes comme la cytochrome P450 : voir § 3.4) en métabolites plus hydrosolubles (et donc plus facilement excrétables). Ces métabolites secondaires (epoxides et dihydrodiols) sont parfois encore plus toxiques que la molécule initiale et peuvent générer d'importants dommages cellulaires (dégâts sur ADN, lipides et protéines) (Lyytikäinen et al., 2007 ; Meyer et al., 2013 ; Gauthier et al., 2014).

1.2.3 Les métaux lourds

Les métaux lourds, ou éléments-traces métalliques (ETM), sont des composés naturels présents à l'état de trace dans l'environnement. Les activités anthropiques peuvent augmenter leur concentration dans les écosystèmes et ainsi permettre de franchir leurs seuils de toxicité. Certains d'entre eux sont essentiels aux organismes vivants, car ils sont constitutifs d'enzymes comme la superoxyde dismutase (utilisation de Mn, Cu et Zn) ou de métalloprotéines transporteuses comme l'hémoglobine (fer) et l'hémocyanine (Cu). D'autres ETM, comme le cadmium (Cd) ou l'arsenic (As), sont dits « non-essentiels » et présentent des effets toxiques sur les organismes vivants à très faibles doses, notamment au niveau des mitochondries, siège de la production d'ATP (Byczkowki and Sorenson, 1984 ; Cannino et al., 2009). Les métaux lourds peuvent aussi impacter le fonctionnement d'enzymes « vitales », perturber la régulation ionique et être des catalyseurs pour la formation de ROS (Gauthier et al., 2014). Par exemple, le cuivre et le fer contribuent à la formation de radicaux libres via la réaction de Fenton, ce qui peut engendrer des dégâts au niveau cellulaire (Di Giulio and Meyer, 2008). En fonction des conditions du milieu (pH, espèce chimique pour certains métaux, présence d'autres métaux ou polluants), les ETM vont être plus ou moins bioassimilables (Boxal et al, 2014). Les métaux lourds contaminent les organismes, le plus souvent par ingestion, et ces molécules vont rentrer dans les cellules par simple diffusion. Les ETM ne pouvant pas être biotransformés, ils sont donc bioaccumulés dans les organismes (et vont devenir toxiques à partir d'une certaine concentration). Ils peuvent néanmoins être pris en charge par des protéines (les métallothionéines, cf. §3.2.1) qui vont les séquestrer avec de limiter leurs effets toxiques. Ces effets peuvent être bioamplifiés le long de la chaîne trophique (par transfert et augmentation des concentrations en ETM le long des différents maillons de la chaîne alimentaire).

1.3 Autres polluants

Les eaux pluviales sont également souvent contaminées par des pesticides (cf. §1.1), car ces polluants sont eux aussi lessivés sur les sols et drainés jusqu'aux exutoires du réseau d'eau pluviale. Ces composés sont aussi connus pour avoir des effets néfastes (cancérogènes et mutagènes) sur les organismes vivants, car ils sont métabolisables et peuvent ainsi conduire à la formation de résidus réactifs générant des dégâts cellulaires et physiologiques (Cochón et al., 2007 ; Samanta et al., 2014). Cependant, leurs effets à long terme sur les organismes aquatiques et terrestres restent relativement méconnus et sont actuellement largement débattus, comme dans le cas du glyphosate.

Des résidus pharmaceutiques (antibiotiques, résidus hospitaliers) peuvent aussi être retrouvés dans les eaux pluviales (cf. §1.1). Ces molécules, leurs effets dans l'environnement ainsi que leurs mécanismes d'action sont de plus en plus étudiés, car ces composés sont de plus en plus présents et peuvent présenter des effets toxiques pour les organismes. Par exemple, Pires et al. (2016) ont étudié les effets couplés d'un antiépileptique (le carbamazépine) et de la caféine sur le polychète *Hediste diversicolor* ; les résultats obtenus ont montré que ces deux composés (ensemble) impactaient ce ver (augmentation des dégâts oxydatifs et diminution de l'activité de la chaîne de transport d'électrons), alors qu'individuellement ces molécules avaient peu ou pas d'effet.

1.4 Cocktail de polluants

La plupart des études écotoxicologiques réalisées en laboratoire se limitent aux effets d'un seul - ou d'un très faible nombre de - polluant(s), à des concentrations plus ou moins réalistes (car souvent plus élevées que celles mesurées sur le terrain). Or, en milieu naturel, les organismes doivent faire face à une multitude de polluants, dont certains peuvent être présents à des concentrations très faibles, a priori inoffensives pour les organismes vivants. Or, ce cocktail de polluants peut avoir des effets différents des effets attendus pour les polluants composant ce mélange s'ils étaient considérés individuellement. Ainsi, Norwood et al. (2003) ont montré que l'effet d'un mélange de plusieurs métaux n'est pas juste une addition de la toxicité de ceux-ci, et donc qu'il est plus compliqué d'appréhender leur co-toxicité sur l'environnement. Ceci est encore plus incertain et complexe lorsque le cocktail de polluants est constitué de métaux et de HAPs, car la présence de plusieurs familles de polluants peut affecter le métabolisme et les processus de détoxification en amont et en aval du site d'action habituel d'un seul polluant (Gauthier et al., 2014). Au sein d'un cocktail, les

polluants peuvent présenter des effets additifs, antagonistes ou bien synergétiques (Babu et al., 2001). Ainsi, le nombre de combinaisons possibles (et donc les interactions entre polluants) est immense et ceci peut produire des effets (toxiques) inattendus.

Dans le cas de la pollution urbaine, les polluants lessivés sur les sols à la suite d'évènements pluvieux sont drainés via le réseau d'eau pluviale jusqu'à des exutoires où se concentre une multitude de polluants dont la majorité sont des métaux lourds, des hydrocarbures (dont des HAPs) (Marsalek 1999). C'est par exemple le cas avec les sédiments des bassins d'infiltration (cf. §4).

1.5 Santé humaine et pollution urbaine

L'intensification de l'urbanisation et de l'industrialisation conduit à une augmentation de la contamination des sols en milieu urbain, ce qui entraîne une baisse de la qualité de l'eau et de l'air. Cette altération peut avoir des conséquences sur la santé humaine telles que l'apparition de cancers, de déficiences rénales, des dommages neurologiques et/ou de maladies osseuses (Science Communication Unit, 2013). Ainsi, des études des effets des contaminants sur les organismes vivants sont nécessaires et représentent un enjeu majeur pour la santé humaine et environnementale pour les années futures.

2. Impact des polluants urbains sur la balance oxydative et le métabolisme énergétique des organismes

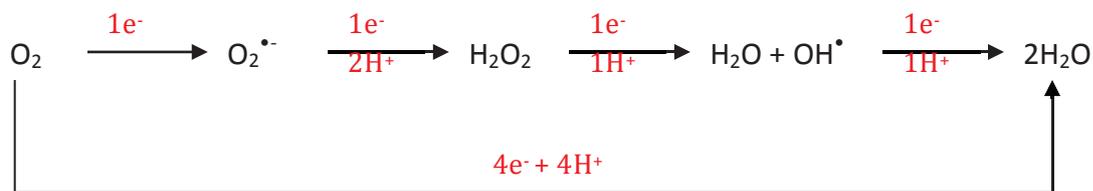
En milieu urbain, les nombreux polluants issus des activités anthropiques se retrouvent concentrés dans les sédiments des bassins d'infiltrations (voir §4). Très peu de taxons aquatiques vivent dans ces écosystèmes (Datry et al., 2003), ce qui suggère que les polluants pourraient avoir des effets délétères sur la physiologie de ces organismes (Livingstone, 2001). De nombreuses études ont montré que les polluants (HAPs, métaux lourds, hydrocarbures, pesticides) engendraient un stress oxydatif via une surproduction des *espèces réactives de l'oxygène* (Reactive Oxygen Species, ROS : voir chapitre 1 §2.1) causant de nombreux dégâts au niveau des protéines, des lipides et de l'ADN (Winston and Di Giulio, 1991 ; Livingstone, 2001 ; Valavanidis et al., 2006 ; Giron-Perez et al., 2013). Ces dégâts cellulaires sont susceptibles de perturber l'homéostasie des cellules ainsi que l'intégrité de leurs organites (dont la mitochondrie, site de production de l'énergie cellulaire) (Sokolova et al., 2005 ; Ortega et al, 2011). Mais, pour limiter ce stress oxydatif, certains organismes sont capables d'utiliser d'autres voies métaboliques moins liées à l'oxygène (donc moins génératrices de

ROS, mais aussi moins efficaces en termes d'énergie produite), parmi lesquelles les voies anaérobies sont les plus efficaces (Lauer et al., 2012).

2.1 Stress oxydant et pollution : perturbations de la balance oxydative

2.1.1 Les espèces réactives de l'oxygène

Les ROS (principalement les anions superoxyde $O_2^{\bullet -}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le radical hydroxyle OH^{\bullet}) comportent un nombre impair d'électrons sur leur couche externe, ce qui leur confère une grande instabilité (Storey, 1996). Pour y remédier, ils vont chercher à s'apparier avec les électrons des atomes voisins, qui perdront alors leur propriété (Turrens, 2003). En milieu aérobie, les organismes produisent tous, en respirant, des espèces réactives de l'oxygène. Ainsi, 1 à 5% de l' O_2 consommé échappe à la réduction terminale au niveau du complexe IV de la chaîne de transport des électrons de la membrane interne mitochondriale (Storey, 1996 ; Finkel et Holbrook, 2000) ; ces électrons « en fuite » vont alors réduire l' O_2 au niveau des complexes I et III où ils donnent naissance à des ROS (initialement $O_2^{\bullet -}$) (Turrens, 2003). Cependant, en conditions normales, la production de ROS est compensée par des systèmes de défense (impliquant ou non des enzymes), que nous détaillerons par la suite, pour *in fine* produire 2 molécules d'eau à partir d'une molécule de dioxygène (Valavanidis et al., 2006). Lors d'un stress engendré par un facteur extérieur (pollution, ischémie/reperfusion, radiation ionisante, rayonnement UV...) (Lesser et al., 1996 ; McCord, 2000 ; Lushchak, 2011), si ces mécanismes de défense sont dépassés, une surproduction de ROS est alors observée (cf. Fig.1) – en particulier d'anions superoxyde $O_2^{\bullet -}$, précurseurs de la plupart des ROS – selon la réaction en chaîne suivante :



Le radical hydroxyle OH^{\bullet} peut également être produit via la réaction de Fenton suivante (Storey, 1996) :



A chaque étape de cette chaîne de réaction, des enzymes anti-oxydantes vont agir pour diminuer la toxicité des radicaux libres produits (Barata et al., 2005 ; Lawniczak et al., 2013).

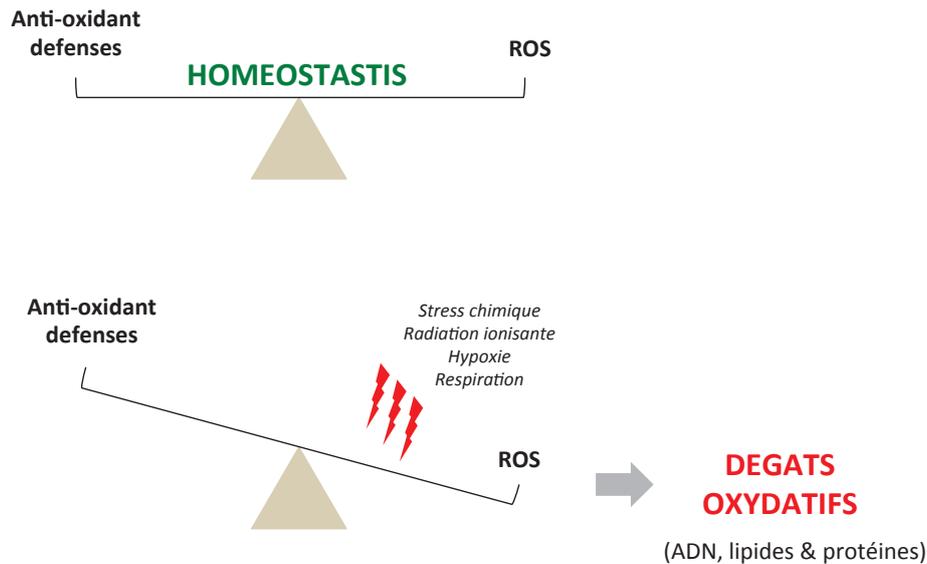


Figure 1. La balance oxydative et les effets environnementaux.

2.1.2 La peroxydation lipidique

La peroxydation des lipides correspond à la dégradation des lipides par oxydation, soit par des ROS (dans le cas qui nous intéresse ici), soit après catalyse par des enzymes. Les acides gras insaturés et (surtout) polyinsaturés y sont particulièrement sensibles, à cause de leur(s) double(s) liaison(s). La peroxydation lipidique entraîne souvent un dérèglement de l'homéostasie cellulaire. Par exemple, si elle agit au niveau des membranes phospholipidiques, la membrane devient plus rigide, perd en perméabilité et en intégrité (Nagasaka et al., 2004 ; Tai et al., 2010). La peroxydation lipidique est un enchaînement de plusieurs réactions (Marnett et al., 1999) (cf. Fig.2) :

- 1) l'initiation : $LH + OH^{\bullet} \text{ ou } R^{\bullet} \rightarrow L^{\bullet} + H_2O \text{ ou } RH$ (LH étant un acide gras polyinsaturé). Au cours cette phase, le radical libre retire un atome d'hydrogène au groupement méthylène (-CH₂-) d'un acide gras insaturé, qui devient alors instable (L[•]),
- 2) la propagation : $L^{\bullet} + O_2 \rightarrow LOO^{\bullet}$ puis $LH + LOO^{\bullet} \rightarrow L^{\bullet} + LOOH$ (LOOH étant un hydroperoxyde dont les produits de décomposition peuvent être des radicaux alkoxy (LO[•]), des aldéhydes (malondialdéhyde, 4-hydroxy-2-nonenal), des époxydes ou des alcools) ; la plupart de ces produits terminaux sont toxiques et/ou mutagènes.

La peroxydation lipidique peut également être initiée par des métaux (cuivre, chrome, nickel et cadmium) qui vont être catalysés via la réaction de Fenton et formé des radicaux OH[•] (Valavanidis et al., 2006).

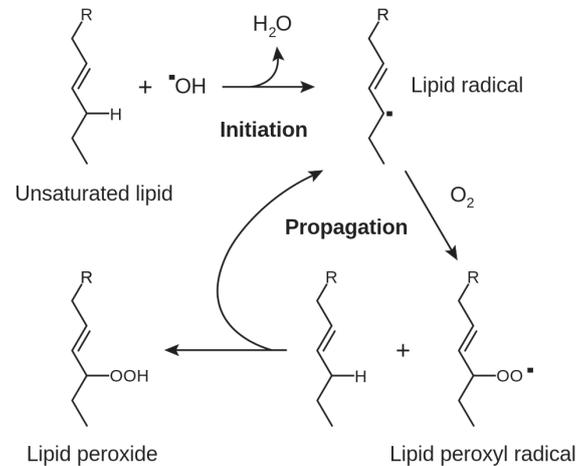


Figure 2. Peroxydation lipidique et formation des produits secondaires (adapté de Young and McEneny, 2001).

2.1.3 Dégâts sur l'ADN et les protéines

En plus des dégâts lipidiques, le stress oxydant engendre également des dommages au niveau de l'ADN et des protéines (Davies, 2000 ; Carrière et al., 2006).

Au niveau de l'ADN nucléaire, les dégâts oxydatifs peuvent conduire à l'apoptose (mort programmée de la cellule) (Davies, 2000). La présence de radicaux libres peut entraîner une oxydation des bases puriques et pyrimidiques dont les formes oxydées peuvent être responsables de l'apparition de mutations transversales des acides nucléiques (A-T vers C-G ou G-C vers T-A) (Kriston et al., 2011). Les radicaux libres peuvent également endommager - voire même de casser - les chaînes simples ou double brins d'ADN. L'oxydation des acides nucléiques conduit à des mutations des séquences codantes des gènes, à une inactivation des gènes ou encore à des aberrations chromosomiques (échanges de chromatides sœurs). Les mitochondries possèdent leur propre génome, mais ces organites produisent la majorité des radicaux libres ; de par cette proximité avec la source génératrice de ROS, l'ADN mitochondrial est donc une cible privilégiée des radicaux libres (Finkel et al., 2000).

Les protéines sont également la cible des radicaux libres puisqu'elles sont oxydées par ces derniers, ce qui va provoquer une fragmentation des acides aminés constitutifs, la formation de liaisons protéines-protéines ainsi que l'oxydation du squelette protéique conduisant à une perte de fonction (Stadtman et al., 2003). De plus, les mécanismes de dégradation protéique (= protéolytiques) peuvent être impactés par les ROS : les protéines

altérées s'accumulent alors dans la cellule et peuvent participer au développement de conditions pathologiques (Bertlett et Stadtman, 1997).

2.2 Effets des polluants urbains sur le siège du métabolisme aérobie : la mitochondrie

La mitochondrie est considérée comme le moteur de la cellule, puisque cet organe permet de produire de l'énergie chimique sous forme d'ATP (Osellame et al., 2012). Le nombre de mitochondries par cellule peut varier en fonction des tissus et des besoins énergétiques. Ainsi, les mitochondries sont en perpétuel mouvement dans la cellule et subissent des phénomènes de fusion ou de fission très régulés (Benard and Krabowski, 2009). Leur déplacement vers des zones demandeuses d'énergie est rendu possible par des protéines associées au cytosquelette. La mitochondrie est également considérée comme l'une des sources permanentes de production de ROS (cf. §2.1.1) de par le fonctionnement de la chaîne respiratoire, décrite dans le paragraphe suivant. Cependant, de façon contradictoire, elle est également une cible préférentielle des ROS, par exemple suite à un stress chimique (voir cf. §2.2.3).

2.2.1 Structure de la mitochondrie

Une mitochondrie présente deux compartiments distincts : la matrice au centre, et l'espace inter-mitochondrial en périphérie ; ils sont délimités par deux membranes (la membrane interne et la membrane externe) (cf. Fig.3).

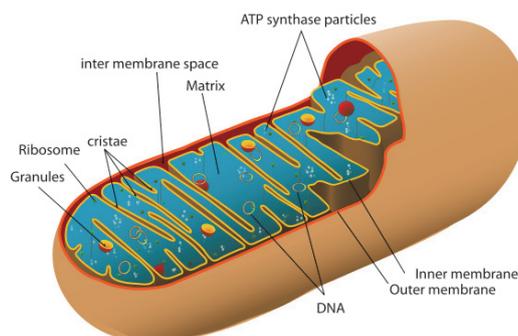


Figure 3. Schéma de la structure d'une mitochondrie.

La membrane mitochondriale externe est une bicouche lipidique composée de 50% de protéines et de 50% de lipides. Cette membrane est relativement perméable grâce à la présence de protéines transmembranaires (ou canaux protéiques) appelées VDAC (Voltage Dependant Anion Channel) qui permettent le passage de petites molécules (<10kDa : anions, cations, pyruvate, malate, ADP ou ATP) du cytosol vers l'espace intermembranaire (Blachly-

Dyson et Forte, 2001). Quant aux molécules de taille supérieure à 10 kDa, elles traverseront la membrane par transport actif via des translocases.

La membrane mitochondriale interne est principalement composée de protéines (80%) et de lipides (20%) qui participent à la régulation de l'activité mitochondriale. Elle forme des replis membranaires, appelés crêtes, au sein desquels sont enchâssés les complexes protéiques de la chaîne respiratoire responsables de la production d'ATP (la plupart des protéines constituant cette membrane mitochondriale interne se situent au niveau du système de production d'énergie). Au sein de la matrice mitochondriale se déroulent de nombreuses voies métaboliques comme le cycle de Krebs ou la β -oxydation (la matrice contient donc toutes les enzymes spécifiques à ces deux voies et permettant la formation de coenzymes réduits $\text{NADH}+\text{H}^+$ et FADH_2).

L'espace inter-mitochondrial (ou espace intermembranaire) est un compartiment étroit dont la composition est proche de celle du cytosol (Pratt and Cornelly, 2011).

2.2.2 Rôle et fonctionnement de la mitochondrie

La mitochondrie est le siège de nombreux processus métaboliques comme le cycle de Krebs, mais aussi de la phosphorylation de l'ATP via la chaîne respiratoire mitochondriale. Ces processus métaboliques font partie de la voie aérobie (voie la plus efficace en terme de production d'ATP (cf. Fig.7).

2.2.2.1 Cycle de Krebs

Le cycle de Krebs est situé au carrefour des métabolismes glucidique, lipidique et protéique. Il permet l'oxydation complète en CO_2 et H_2O de l'acétyl-coenzyme A (ou acétyl-CoA) issu du catabolisme du glucose et des acides gras. Il permet aussi l'oxydation de nombreux acides aminés dont le catabolisme conduit soit à la formation d'acide pyruvique (et donc d'acétyl-CoA), soit à la formation de divers intermédiaires du cycle de Krebs (acides succinique, fumarique et/ou oxaloacétique) (Murray et al., 2003).

Le pyruvate formé à la fin de la glycolyse entre dans la mitochondrie par diffusion grâce au transporteur pyruvate translocase (Bricker et al., 2012 ; Herzig et al., 2012). Il est ensuite décarboxylé en acétyl-CoA. Une succession de 10 réactions enzymatiques permet la formation de CO_2 et d' H_2O , de GTP (isoforme de l'ATP) et d'intermédiaires énergétiques (dont le NADH et le FADH_2) qui seront ensuite utilisés par la chaîne respiratoire mitochondriale (cf. Fig.4). Certaines de ces réactions enzymatiques sont irréversibles et constituent les points de contrôle des flux globaux du cycle de Krebs (citratesynthase, isocitrate déshydrogénase et α -cétoglutarate déshydrogénase). Le cycle de Krebs est

également régulé par la disponibilité des métabolites constituant le « point d'entrée » de ce cycle : l'acétyl-CoA et l'oxaloacétate.

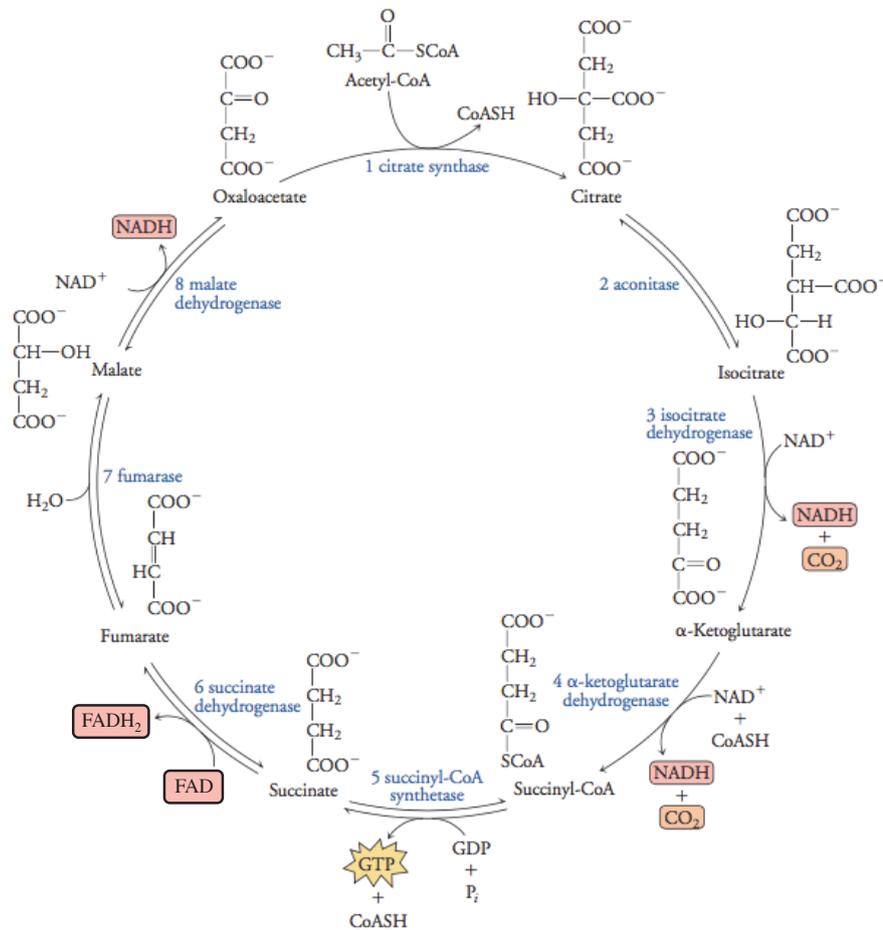


Figure 4. Schéma du cycle de Krebs (Pratt and Cornelly, 2014).

2.2.2.2 La chaîne respiratoire

2.2.2.2.1 Fonctionnement

Le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale s'articule autour d'un couplage entre la chaîne de transport d'électrons et la phosphorylation de l'ADP en ATP (cf. Fig.5). La chaîne respiratoire mitochondriale est constituée de quatre complexes protéiques (nommés complexes I à IV) au sein desquels transitent les électrons issus de l'oxydation des cofacteurs réduits (NADH+H⁺ et FADH₂). Ces complexes protéiques s'enchevêtrent au sein de la membrane interne mitochondriale. Les cofacteurs réduits, produits lors du cycle de Krebs, sont utilisés par la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, via leur don d'électrons aux complexes I et II afin de créer un flux de protons de la matrice mitochondriale

vers l'espace inter-membranaire. Le complexe I va oxyder le NADH et ainsi libérer 2 électrons (e^-) qui seront ensuite transmis au coenzyme Q. Lors de cette réaction d'oxydoréduction, l'énergie libérée va permettre le passage de 4 protons vers l'espace inter-membranaire (transfert de 2 protons H^+ par électron). Une seconde entrée est possible au niveau du complexe II grâce à l'oxydation du succinate en fumarate créant une molécule de $FADH_2$, ce qui permet le transfert de 2 électrons qui seront également transmis au coenzyme Q. Cette ré-oxydation du $FADH_2$ ne s'accompagne pas d'un mouvement de protons H^+ . Puis, le coenzyme Q va réduire le complexe III via le transfert des électrons. Le complexe III va ensuite être ré-oxydé et ainsi transférer ses électrons au complexe IV via le cytochrome c. Au cours du transfert d'un électron par le complexe III, ce dernier permet le passage de 2 protons H^+ vers l'espace inter-membranaire. Le complexe IV est le dernier de la chaîne respiratoire mitochondriale ; lors de sa ré-oxydation, il utilise l'oxygène comme accepteur final d'électrons et il le réduit en une molécule d'eau. Cette réaction s'accompagne du passage d'un proton H^+ par électron transféré.

Ainsi, la cascade d'oxydoréduction débute par l'oxydation d'un cofacteur $NADH+H^+$ ou $FADH_2$, respectivement au niveau des complexes I ou II, puis se transmet de complexe en complexe jusqu'à l'accepteur final d'électrons (O_2). Au cours de ces différentes réactions, le passage de protons vers l'espace inter-membranaire se produit sur 3 complexes dont la stœchiométrie est de $2H^+$ par électron transféré pour les complexes I et III et de $1H^+$ par électron transféré pour le complexe IV ; ce transfert de protons permet la création d'un gradient électrochimique (appelé aussi force proton-motrice). Cette force proton-motrice est ensuite dissipée par le complexe V (ATP-synthétase) pour former de l'ATP via la phosphorylation de l'ADP + Pi (phosphate inorganique). Ce dernier complexe mitochondrial s'articule en deux domaines : un moteur moléculaire rotatif (F_0) intégré dans la membrane interne mitochondriale, et le domaine F_1 (situé dans la matrice) qui contient les sites catalytiques de l'enzyme. Le site F_0 est constitué de plusieurs sous-unités (*a*, *b* et *c*) dont certaines (les sous-unités *c*) sont capables de fixer les protons. Le nombre de sous-unités *c* est variable selon les espèces : 8 chez les bovins (Watt et al. 2010) et 10 chez les levures (Stock et al., 1999). La fixation des protons va entraîner un mouvement rotatif de F_0 . Cette rotation va être transmise à F_1 grâce à un axe central constitué de 5 sous-unités (Boyer, 1997). Le domaine F_1 possède trois sites catalytiques qui vont utiliser la rotation pour produire tour à tour une molécule d'ATP. Donc, à chaque tour de F_0 , 3 molécules d'ATP sont produites (Osellame et al., 2012). Ainsi, le nombre de protons nécessaires pour former une molécule d'ATP dépend du nombre de sous-unités *c* de F_0 . Si le nombre de sous-unités *c* est

de 8, alors la stœchiométrie de l'ATP-synthétase est de 8 protons pour 3 ATP, soit $2,66H^+/ATP$. Les ATP sont formés dans la matrice mitochondriale et peuvent passer dans le cytosol de la cellule via le translocateur de nucléotides adényliques (ou ANT : Adenine Nucleotide Translocator) inséré dans la membrane mitochondriale interne (Liu and Chen, 2013). Cette protéine permet également le passage d'un ADP du cytosol vers la matrice mitochondriale pour assurer l'apport continu en ADP indispensable au processus d'oxydation phosphorylante (Kim et al., 2010). Le fonctionnement de l'ANT est couplé à l'échangeur de phosphate inorganique (Pi) qui s'accompagne d'un transfert un proton vers la matrice mitochondriale ; ceci élève la stœchiométrie H^+/ATP à 3,66 protons consommés pour 1 ATP formé et exporté vers le cytosol.

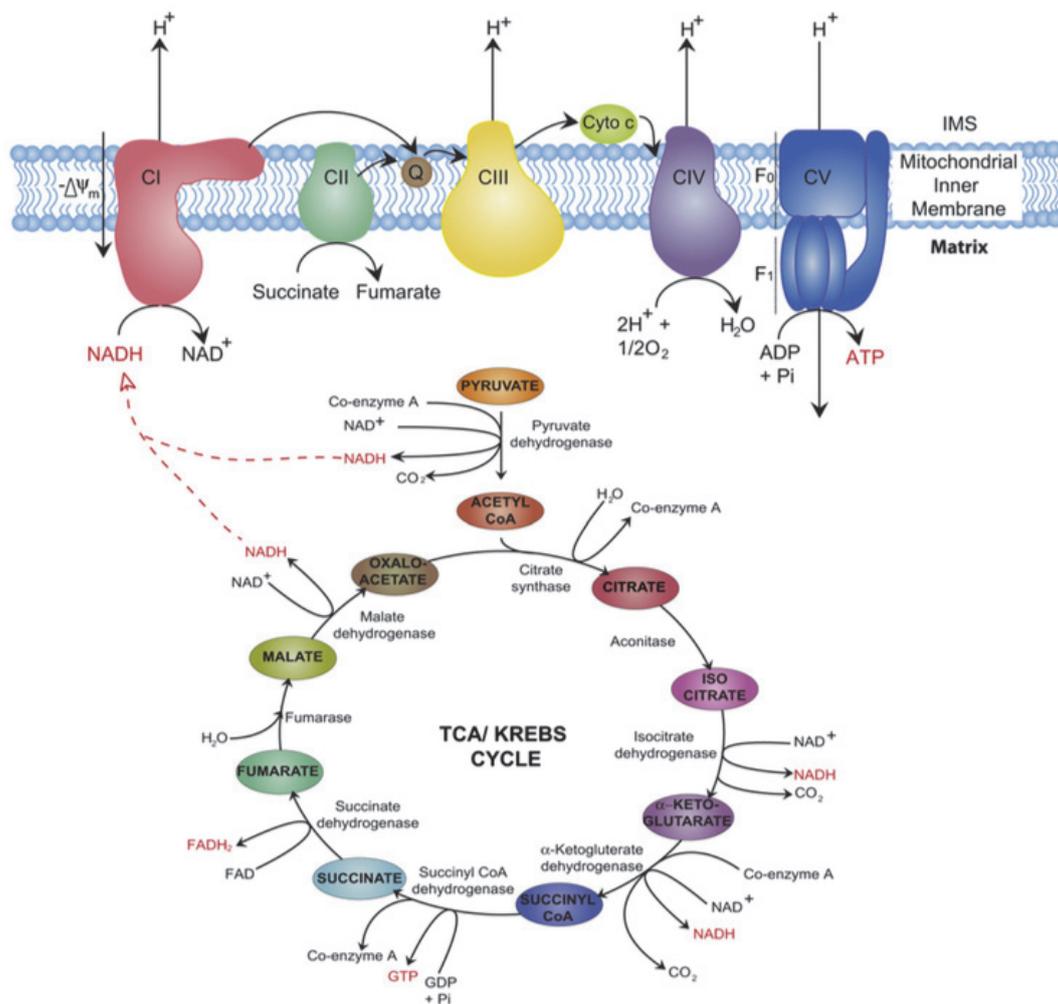


Figure 5. Fonctionnement bioénergétique de la chaîne de transport d'électrons et du cycle de Krebs à partir d'une molécule de pyruvate (Osellame et al., 2012).

2.2.2.2.2 *Activités de la chaîne respiratoire et efficacité mitochondriale*

L'activité des complexes protéiques constituant la chaîne respiratoire mitochondriale peut être mesurée sur des mitochondries isolées. Elle permet d'évaluer l'état de fonctionnement de la chaîne respiratoire (= source d'ATP) en fonction de l'ajout de différents substrats et/ou d'agents découplants (cf. Fig.6) (Brand and Nicholls, 2011). Pour cela, les mitochondries sont placées dans un milieu respiratoire additionné de substrats (pyruvate, malate, succinate ou proline selon l'espèce étudiée). Puis, l'ajout d'ADP permet de faire fonctionner la chaîne de transport d'électrons (oxydation des substrats) et l'ATP synthétase et de diminuer la force proton-motrice en « consommant » les protons accumulés dans l'espace inter-membranaire pour synthétiser l'ATP. Cet état correspond au fonctionnement phosphorylant (maximal) de la chaîne respiratoire mitochondriale (état 3_{ADP}). Ensuite, l'addition d'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthétase) permet de passer de l'état 3_{ADP} à l'état $4_{oligomycine}$, qui mesure une activité basale (minimale) de la chaîne respiratoire en absence de phosphorylation. Cet état respiratoire dépend de la perméabilité aux protons de la membrane interne mitochondriale, il peut donc être considéré comme un indice de l'activité de fuite des protons qui traversent passivement la membrane interne mitochondriale sans passer par l'ATP synthétase. Cet ajout d'oligomycine peut être suivi de l'addition de FCCP (carbonyl cyanide-p-trifluorométhoxyphénylhydrazone) qui va annuler la force proton-motrice et donc complètement découpler la chaîne de transport des électrons et l'ATP synthétase ; ceci permet d'atteindre l'état 3_{FCCP} , qui reflète le fonctionnement maximal de la chaîne de transport d'électrons (ETC). L'état 3_{FCCP} est contrôlé exclusivement par l'oxydation des substrats, et c'est à ce niveau que d'éventuels dysfonctionnements liés aux composants de la chaîne de transport d'électrons peuvent être détectés (inhibition des complexes protéiques, problème de transport des substrats). Il est ensuite possible d'ajouter de l'antimycine A afin de bloquer le complexe III, fermant ainsi tous les points d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire (complexes I et II). Enfin, l'ajout d'ascorbate et de TMPD (tétraméthyl-p-phénylènediamine : transporteur artificiel d'électrons) permet de relancer la consommation d'oxygène en donnant des électrons au complexe IV (= enzyme cytochrome c oxydase) via le cytochrome c.

Ainsi, à partir de ces diverses activités, deux paramètres peuvent être calculés et ainsi nous renseigner sur le comportement des mitochondries. Tout d'abord, il est possible de calculer un indice de contrôle respiratoire (RCR = Respiratory Control Ratio = état 3_{ADP} / état $4_{oligomycine}$), qui permet d'établir un diagnostic de l'« état de santé » des mitochondries isolées ; tout changement au niveau de la oxydation phosphorylante induira une modification

de la valeur du RCR. Ensuite, l'indice ATP/O (ou P/O) permet de mesurer l'efficacité mitochondriale, i.e. le nombre de molécules d'ATP produites pour un atome d'oxygène réduit.

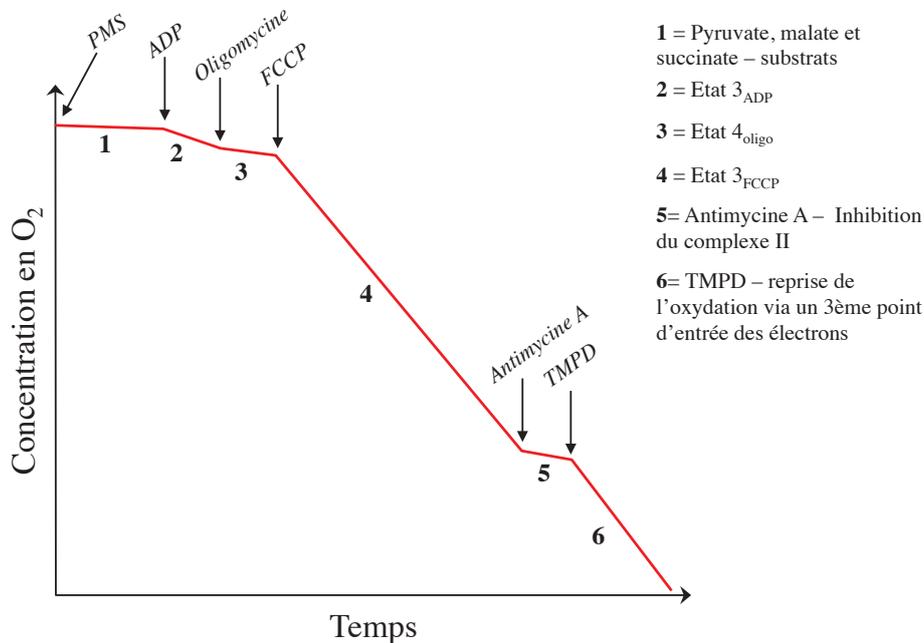


Figure 6. Schéma descriptif des différents états du fonctionnement de la chaîne mitochondriale en fonction de l'ajout de différents inhibiteurs ou agents découplants.

2.2.3 Cible des polluants urbains

Les membranes mitochondriales sont riches en lipides, ce qui facilite l'accumulation de composés lipophiles parmi lesquels nous trouvons des polluants comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) (Li et al., 2003 ; Xia et al., 2004). Les HAPs peuvent engendrer des modifications de la structure membranaire (i.e. de la perméabilité ionique) ou de la respiration (Gauthier et al., 2014), voire même des dysfonctionnements de la mitochondrie (Wang et al., 2004 ; Raftery et al., 2017). Une fois intégrés, les HAPs peuvent être métabolisés en composés encore plus hydrosolubles, plus réactifs et/ou plus toxiques pour la cellule, parmi lesquels des époxydes. Certains de ces intermédiaires peuvent induire la production de ROS, qui vont causer une peroxydation lipidique des membranes mitochondriales (Matson et al., 2008).

Certains métaux lourds non essentiels tels que le cadmium, le plomb, le mercure ou encore le manganèse vont également s'accumuler préférentiellement dans la mitochondrie en mimant le comportement des métaux essentiels (cuivre, zinc). Leur entrée est facilitée par la

présence de canaux calciques et par leur comportement chimique (la matrice mitochondriale étant chargée négative suite au pompage de protons lors de l'oxydation phosphorylante, elle va laisser rentrer passivement des molécules à charges positives comme les métaux lourds) (Meyer et al., 2013).

De plus, la présence de ces polluants peut aussi impacter/inhiber l'activité de certaines enzymes indispensables au fonctionnement mitochondrial comme celles du cycle de Krebs ou de la chaîne de transport d'électrons (Wang et al., 2004). D'après Ortega et al. (2011), le cadmium inhibe la succinate déshydrogénase, qui correspond au complexe II de la chaîne respiratoire et permet de relier le cycle de Krebs à la chaîne de transport d'électrons. La citrate synthase et l'isocitrate déshydrogénase (première et troisième étapes du cycle de Krebs) sont également très sensibles à la présence de cadmium, qui peut inhiber leur activité catalytique (Kurochkin et al., 2011). De nombreux métaux perturbent le fonctionnement des enzymes en se substituant ou en entrant en compétition avec le substrat au niveau des sites de liaison, ou bien de façon non compétitive en modifiant la conformation de l'enzyme et en la rendant inactive (Gauthier et al., 2014).

2.3 Impact sur le métabolisme aérobie - Les voies anaérobies

Lors de certains changements environnementaux (milieux devenant pauvres en oxygène : Hervant et al., 1995 ; 1996) ou d'un dysfonctionnement du métabolisme aérobie lié à un stress chimique (Uma Devi, 1996 ; Lauer et al., 2012), la production d'énergie (ATP) par les voies aérobies peut fortement baisser, voire s'arrêter. Face à un milieu désoxygéné ou à une pollution, les organismes aérobies peuvent alors utiliser totalement ou partiellement les voies anaérobies pour compenser ce déficit de production d'énergie, et ainsi maintenir l'homéostasie des processus physiologiques. Les voies anaérobies produisent moins d'ATP qu'en aérobie (cf. Fig.7 et Tableau 1), mais sont simples et rapides à mettre en place. La dernière molécule produite par une voie métabolique anaérobie se nomme *produit terminal*. La synthèse des produits terminaux permet surtout le maintien de la teneur en NAD^+ et donc le bon fonctionnement de la glycolyse et du cycle de Krebs. Cependant, une trop forte accumulation de ces produits terminaux dans certains tissus peut générer une acidose métabolique mettant en danger l'organisme.

La glycolyse anaérobie (= fermentation lactique) permet de produire 2 ATP et 2 molécules de pyruvate qui pourront ensuite être transformées en lactate (via la lactate déshydrogénase). D'autres organismes synthétisent à partir du pyruvate des produits

terminaux comme l'alanine, l'alanopine ou encore l'octopine, avec le même bilan énergétique que celui du lactate (Hochachka, 1977 ; Putzer et al. 1985) (cf. Fig.7).

Certains organismes résistants à l'hypoxie temporaire peuvent mettre en place des voies anaérobies présentant un meilleur rendement en termes de production d'ATP. Chez eux, la transformation du pyruvate en malate via un fonctionnement inversé du cycle de Krebs conduit à la formation de succinate et/ou de propionate (qui sont les produits terminaux) et permet de produire respectivement 4 et 6 ATP *in fine*. L'utilisation partielle de ces voies métaboliques permet à des invertébrés aquatiques de produire une quantité d'énergie suffisante pour le maintien de l'activité des fonctions vitales durant de longues périodes de manque d'oxygène, et donc de survivre en conditions défavorables (Hervant et al., 1999). De nombreuses espèces sont ainsi capables d'utiliser les voies anaérobies menant à la synthèse de succinate et de propionate, comme des espèces intertidales (*Mytilus edulis*, De Zwaan et al., 1995 ; *Arenicola marina*, Schroff and Zebe, 1980), des espèces souterraines (*Niphargus rhenorhodanensis* : Hervant et al., 1995), mais aussi des espèces vivant dans des sédiments (*Tubifex tubifex* : Seuß et al., 1982).

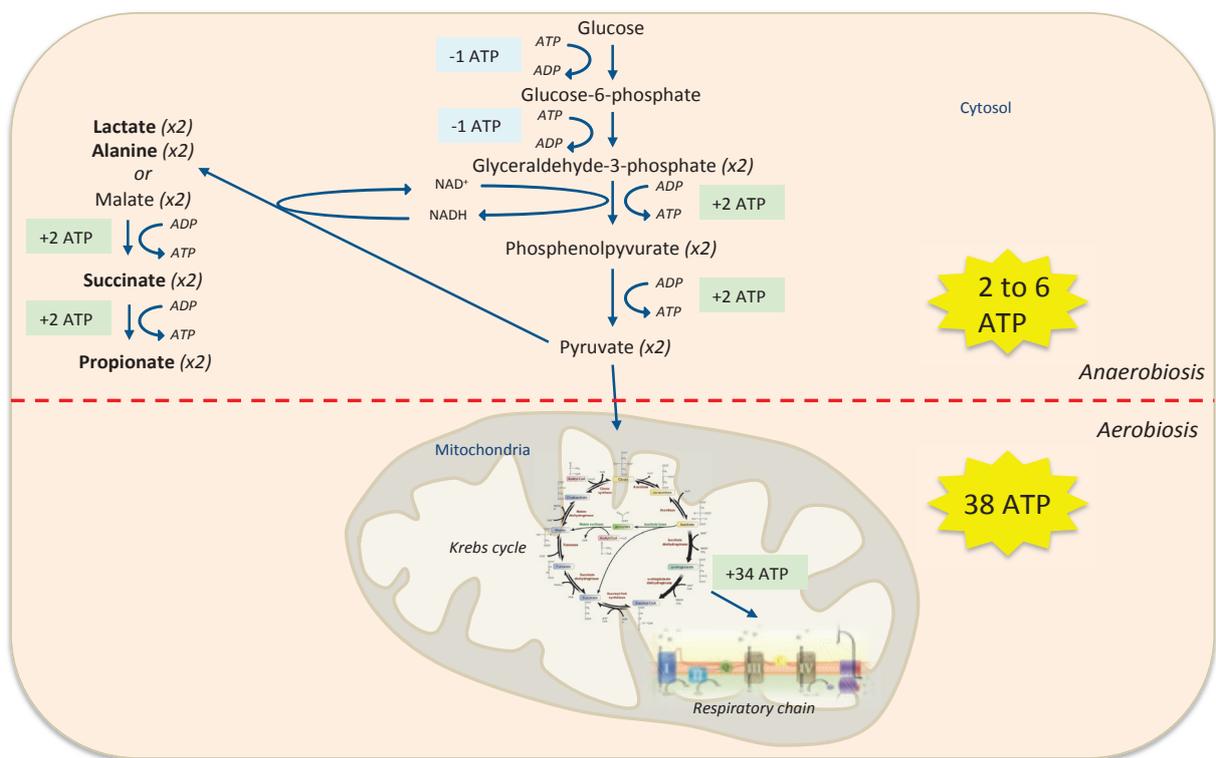


Figure 7. Schéma des voies des métabolismes aérobie et anaérobie et productions d'ATP associées.

Tableau 1. Rendements énergétiques des voies métaboliques aérobie et anaérobies.

	Produit terminal	Rendement (nombre d'ATP produits)
Aérobiose	<i>H₂O et CO₂</i>	38
Anaérobiose	<i>lactate</i>	2
	<i>alanine</i>	2
	<i>succinate</i>	4
	<i>propionate</i>	6

3. Principales réponses physiologiques à la pollution

Face aux dégâts potentiels engendrés par le stress oxydant aux niveaux cellulaire et mitochondrial (cf. §2), les organismes disposent de divers mécanismes leur permettant d'en limiter l'impact. Certains moyens de défenses sont de nature non-enzymatique, comme les métallothionéines, les vitamines ou le glutathion réduit (GSH), alors que d'autres sont purement enzymatiques, tels que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, les glutathion peroxidases (GPx), les glutathion réductases et transférases (GSR et GST). Ces enzymes ont pour objectif de diminuer/stopper la réactivité des composés radicalaires. D'autres enzymes, comme la cytochrome P450, sont spécifiques au métabolisme des xénobiotiques (qui consiste à biotransformer les composés xénobiotiques en métabolites plus hydrosolubles et donc plus facilement excrétables). Toutefois, la mise en place et le développement de ces défenses nécessitent une demande supplémentaire (et parfois forte) d'énergie (aux dépens de certains traits d'histoire de vie (parmi lesquels croissance et reproduction : Hochachka and Somero 2003). Cette augmentation de la demande énergétique sera comblée par une augmentation de la prise alimentaire (si possible) et/ou par la mobilisation des réserves énergétiques corporelles (glycogène, lipides et protéines), apportant des quantités variables d'énergie.

3.1 Les réserves énergétiques

Chaque organisme a besoin d'énergie - principalement sous forme d'ATP - pour maintenir le bon fonctionnement de son métabolisme basal, i.e. les besoins en énergie « incompressibles » lui permettant de survivre (Willmer et al., 2005). Pour fournir cette énergie chimique, plusieurs substrats énergétiques sont utilisés, parmi lesquels les acides aminés, les acides gras et le glucose, qui fourniront *in fine* de l'ATP via les voies

métaboliques intermédiaires et énergétiques (Pratt and Cornely, 2014). Un organisme considéré comme en bon état physiologique présente une balance énergétique positive, c'est-à-dire que son ratio « disponibilité énergétique/demande énergétique » est supérieur à 0 (Pratt and Cornely, 2014). Dans ce cas, l'organisme présente un bénéfice (= surplus énergétique) qu'il peut stocker sous forme de réserves énergétiques corporelles (principalement glycogène et/ou triglycérides) (Koop et al, 2008). En cas de stress (jeûne, stress chimique ou physique...), l'organisme peut utiliser ces réserves pour fournir l'énergie nécessaire à la mise en place de mécanismes de compensation (Le Gal et al., 1997). Ainsi, les réserves énergétiques peuvent être utilisées comme biomarqueurs précoces d'une perturbation environnementale (Lagadic et al., 2002). De plus, la littérature montre qu'il existe généralement une corrélation positive entre l'importance de ces réserves énergétiques et des traits d'histoires de vie comme la croissance et le succès reproducteur (Congdon et al., 2001 ; De Coen et Janssen, 2003). Les réserves corporelles peuvent donc être considérées comme des biomarqueurs prédictifs et pertinents de l'effet d'un stress (dont la pollution) sur la structure et la dynamique d'une population (Le Gal et al., 1997 ; Scott-Fordsmand and Weeks, 2000). La mesure des stocks d'énergie peut aussi permettre de déterminer la stratégie mise en place par un organisme pour faire face à une perturbation (Scott-Fordsmand and Weeks, 2000), car le choix du substrat énergétique utilisé est souvent lié à la réponse apportée par l'organisme, voire au stress lui-même (Holmstrump et al, 2010). D'après Thomasson et al. (2003), si un organisme est soumis à un stress chimique, il va réduire les coûts énergétiques des activités considérées comme non vitales afin de réallouer cette énergie vers des mécanismes d'excrétion, de détoxification ou encore de réparation cellulaire. En cas de contamination chimique, la mesure de l'état des réserves énergétiques fournit donc des informations complémentaires (i.e. une connaissance du pool d'énergie disponible) aux biomarqueurs de défenses ou de comportement (locomotion) classiques.

3.1.1 Le glycogène, une réserve facilement mobilisable

Le glycogène est un polysaccharide constitué de nombreuses molécules de glucose (jusqu'à 60000) liées entre elles par des liaisons glycosidiques gluc-1,4 et par des chaînes de glucose liées par des liaisons gluc-1,6. Il s'agit de la réserve énergétique la plus facilement et rapidement mobilisable chez les animaux, dont les invertébrés aquatiques (Koop et al., 2011).

Le glycogène est le plus souvent stocké sous forme de granules cytoplasmiques dans les fibres musculaires et les cellules hépatiques (Roach et al., 2012) (où, chez les invertébrés, dans les cellules ayant un rôle hépatique (Van Weel, 1974), comme le tissu chloragène chez

les Oligochètes (Fisher and Molnar, 1992)). Chez les mammifères, en fonction de l'état nutritionnel et de l'activité physique, le glycogène peut représenter jusqu'à 10% de la masse du foie et 2% de la masse musculaire. Il peut être transformé via la glycogénolyse pour libérer des molécules de glucose-1-phosphate sous l'action de l'enzyme glycogène phosphorylase (Willmer et al., 2005) (cf. Fig.8). Puis, le glucose-1-phosphate est transformé en glucose-6-phosphate par l'enzyme phosphoglucomutase avant d'être dégradé au cours de la glycolyse. Les formes phosphorylées du glucose ne peuvent pas circuler librement à l'extérieur des cellules ; c'est pourquoi le glucose-6-phosphate doit subir une dernière étape de déphosphorylation via l'enzyme glucose-6-phosphatase pour être libéré à l'extérieur d'une cellule. Notons que dans les muscles squelettiques, l'enzyme glucose-6-phosphatase est absente (Pratt and Cornely, 2014) ; ainsi, le glucose reste sous forme phosphorylée et est piégé dans les cellules.

Le glucose, via certaines voies métaboliques (glycolyse, cycle de Krebs et chaîne de transport des électrons/phosphorylation oxydative), permet la création d'énergie sous forme d'ATP, directement utilisable par la cellule (cf. Fig.9). Mais il peut également être utilisé par la voie des pentoses phosphates pour la formation de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), cofacteur utilisé lors de la synthèse d'acide gras et plus généralement dans les catalyses effectuées par les enzymes de la famille des oxydoréductases (Pratt and Cornely, 2014).

Le glycogène est une réserve généralement utilisée pour des besoins énergétiques à court ou moyen termes, puisque cette réserve est accumulée en quantité limitée. Le glycogène est principalement utilisé pour des activités locomotrices, respiratoires, des processus d'osmorégulation, de croissance et/ou de reproduction (Rosa and Nunes, 2003 ; Oliveira et al., 2004). Il s'agit également d'une réserve qui sera utilisée (fermentée) préférentiellement lors de passage en anaérobiose, car la glycogénolyse et la glycolyse ne nécessitent pas d'oxygène (Koop et al., 2011).

3.1.2 Les triglycérides, une réserve à haut rendement énergétique

On distingue deux types de lipides : les lipides structuraux et les lipides de réserve.

Les lipides structuraux participent à la composition de la membrane cellulaire, composée essentiellement de phospholipides et de cholestérol. Les phospholipides membranaires ne constituent pas un substrat de réserve, mais peuvent être partiellement utilisés en cas de jeûne prolongé (Cherel et al., 1992).

Les lipides de réserve sont principalement les triglycérides. Leur catabolisme apporte 6 à 8 fois plus d'énergie que le glycogène et les protéines (en incluant dans le calcul l'importante quantité d'eau liée, associée à la nature hydrophyle et au mode de stockage des triglycérides), permettant ainsi une plus forte libération d'énergie. Ils constituent donc la réserve corporelle la plus efficace en termes de rendement énergétique (De Coen and Janssen, 1997). Les triglycérides sont formés d'un glycérol dont les trois groupes hydroxyle (-OH) sont estérifiés par des acides gras. Ces trois acides gras peuvent différer pour une même molécule de triglycéride. Ils sont principalement stockés dans les adipocytes, mais aussi dans les cellules hépatiques et musculaires. Pour libérer de l'énergie, les triglycérides vont subir la lipolyse, qui consiste en une hydrolyse des triglycérides en glycérol et en acides gras ; ces derniers subissent ensuite une dernière étape de β -oxydation ou de cétogenèse. La β -oxydation permet la libération d'acétylCoA qui pourra entrer dans le cycle de Krebs et ainsi permettre la production d'ATP (cf. Fig.9). Quant au glycérol issu de la lipolyse, il peut également participer à la formation de glucose via la néoglucogenèse (Murray et al., 2003) ou être oxydé directement au niveau de la mitochondrie grâce à l'enzyme glycérol-3-phosphate déshydrogénase. Par ailleurs, les acides gras peuvent indirectement être utilisés par les organismes pour fournir l'énergie nécessaire à l'activité neuronale sous la forme de corps cétoniques (Alessandri et al., 2004). En effet, les acides gras issus de la lipolyse peuvent être transformés en corps cétoniques (directement utilisables par la cellule). La cétogenèse n'est généralement utilisée que lorsque les réserves glucidiques sont épuisées, pour fournir de l'énergie au cerveau et aux muscles (cardiaques) (Pratt and Cornely, 2014). On peut donc considérer les corps cétoniques comme un substrat de substitution du glucose. De plus, cette voie métabolique est privilégiée par les cellules hépatiques quand le cycle de Krebs n'est plus capable d'utiliser l'acétylCoA provenant de la β -oxydation, par exemple lors d'un jeûne sévère : l'oxaloacétate est dans ce cas mobilisé pour la néoglucogenèse et est donc indisponible pour permettre au cycle de Krebs de fonctionner correctement (Weil et al., 2005).

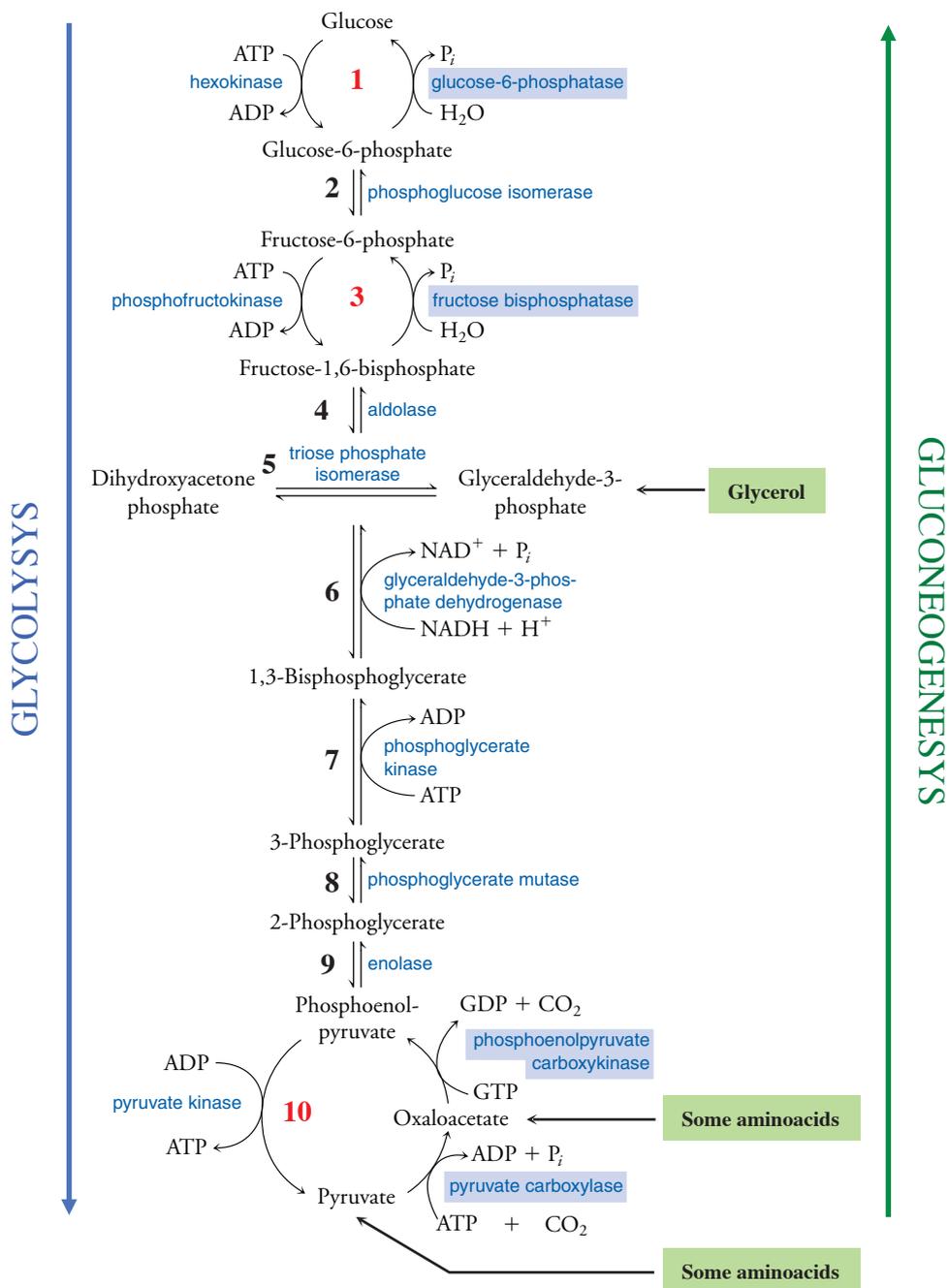


Figure 8. Les réactions de la glycolyse et de la néoglucogenèse (adapté de Pratt and Cornely p355, 2014). Les numéros de 1 à 10 indiquent les différentes étapes de la glycolyse. Les numéros en rouge correspondent aux étapes irréversibles de la glycolyse. Le surlignage violet correspond aux enzymes spécifiques de la néoglucogenèse, et le surlignage vert correspond aux substrats précurseurs de la néoglucogenèse autres que le pyruvate.

3.1.3 Les protéines, réserves mobilisables lors de certains stress de longue durée

Les protéines constituent l'un des matériaux de base de tous les constituants de l'organisme et assurent des fonctions essentielles et variées (enzymatiques, structurales, transport, contractiles). Les protéines enzymatiques sont largement majoritaires, mais elles ne constituent pas une réserve énergétique. On retrouve les protéines musculaires en abondance dans les muscles squelettiques (Le Maho, 1981). Leur rôle premier n'est pas de produire de l'énergie (De Coen et al., 1997), mais les protéines musculaires représentent une source potentielle d'énergie non négligeable et restent mobilisables en cas de stress majeur de longue durée (Durou et al., 2008). Les acides aminés constituent la forme circulante des protéines ; ceux-ci sont obtenus grâce à la protéolyse qui scinde la protéine en plusieurs acides aminés. De nombreux acides aminés sont glucoformateurs et, de ce fait, participent à la néoglucogénèse (Murray et al., 2003), alors que d'autres peuvent donner, plus ou moins directement, de l'acétylCoA qui produira de l'ATP via le cycle de Krebs et la chaîne de transport des électrons (*ETC = Electron Transport Chain*) (Murray et al., 2003).

La néoglucogénèse est une voie métabolique qui permet de former du glucose à partir de molécules non glucidiques, dont le glycérol formé suite à lipolyse, le lactate, ou encore certains acides aminés. Une grande majorité des acides aminés sont considérés comme glucoformateurs, à l'exception de la leucine (Pratt and Cornely, 2014). La néoglucogénèse est une voie anabolique à la glycolyse, elle utilise donc en sens inverse les 7 réactions réversibles de la glycolyse ; quant aux 3 réactions irréversibles de la glycolyse, elles sont contournées par des réactions spécifiques à la néoglucogénèse (cf. Fig.8). Le premier contournement consiste à former du phosphoénolpyruvate (PEP) à partir du pyruvate présent dans la matrice mitochondriale via la formation d'intermédiaires comme l'oxaloacétate puis le malate (exporté dans le cytosol grâce à des navettes) en utilisant 2 ATP et 2 GTP. Ensuite, la transformation du PEP en glucose-1,6-biphosphate utilise les réactions réversibles de la glycolyse. Puis, la transformation du fructose-1,6-biphosphate en fructose-6-phosphate (second contournement) est possible grâce à l'action de l'enzyme fructose 1,6-biphosphatase. Enfin, le troisième contournement consiste à transformer le glucose-6-phosphate en glucose via la glucose-6-phosphatase. La néoglucogénèse utilise comme précurseurs des acides aminés glucoformateurs (notamment lors d'un jeûne prolongé : Hervant et al., 1999) ; le squelette carboné de ces acides aminés glucoformateurs est transformé en pyruvate ou en l'un des intermédiaires du cycle de Krebs (α -cétoglutarate, succinyl-coA, fumarate et oxaloacétate). S'il y a formation de l'un de ces composés, le squelette carboné de l'acide aminé sortira au niveau du malate pour ensuite suivre la néoglucogénèse. De plus, le glycérol

issu de la lipolyse des lipides peut rejoindre la néoglucogénèse par l'intermédiaire de la dihydroxyacétone phosphate (DHAP) (cf. Fig.8). Lorsque les protéines musculaires sont consommées par la voie de la néoglucogénèse, l'organisme doit faire face à une fonte musculaire, et parfois à une accumulation de déchets azotés toxiques (résidus des acides aminés). La plupart des fonctions physiologiques (locomotion, ventilation, digestion, circulation...) seront impactées par cette fonte Si plus de 50% des protéines sont dégradées, ceci devient critique, voire mortel.

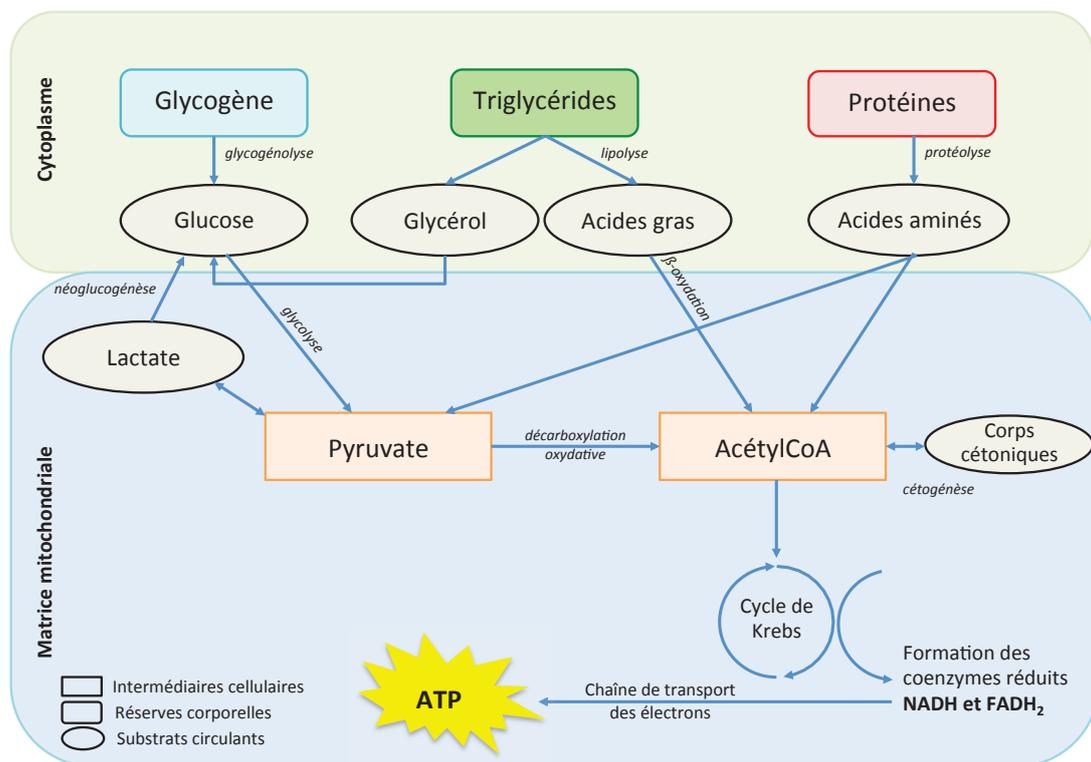


Figure 9. Schéma des voies métaboliques permettant la formation d'ATP à partir des différentes réserves énergétiques et interconversion des substrats énergétiques (d'après Pratt and Cornely, 2014).

3.2 Les défenses anti-oxydantes non enzymatiques

Afin de limiter les dégâts du stress oxydant (pouvant être induit par des polluants) sur les molécules et les structures cellulaires (cf. §2.1), les organismes ont développé des mécanismes de défense relativement variés (enzymatiques ou non) et plus moins spécialisés en fonction du mécanisme ou du composé générateur de radicaux libres (métaux, xénobiotiques...).

3.2.1 Les métallothionéines, protéines piègeuses de métaux

3.2.1.1 Structures et particularités des métallothionéines (MTs)

Les métallothionéines ont été isolées pour la première fois en 1957 par Margoshes et Vallee à partir du cortex rénal de cheval. Elles ont d'abord été décrites comme les responsables de l'accumulation de cadmium (Cd) dans les reins de mammifères en tant que ligands spécifiques à ce métal (« Cd binding proteins »). Leur rôle essentiel dans la régulation de la concentration en métaux essentiels chez les organismes fut révélé des années plus tard (Kägi, 1991). Les métallothionéines sont des protéines cytosoliques non-enzymatiques, de faible poids moléculaire, riches en cystéines (30%) et régulatrices de la teneur en métaux lourds essentiels tels que le cuivre et le zinc (Fowler et al., 1987 ; Mosleh, 2005). Elles sont présentes chez de nombreuses espèces, dont des invertébrés aquatiques tels que les mollusques (Khati et al, 2012 ; Peric et al., 2017), les crustacés (Wu et Chen, 2005 ; Geffard et al., 2007), les oligochètes - parmi lesquels *Limnodrilus hoffmeisteri* (Klerks and Bartholomew, 1991) ou encore les végétaux et procaryotes (Zhou et al, 1994). Leur synthèse est induite par la présence de métaux (notamment Cu, Zn et Cd). Les métallothionéines sont soumises à un polymorphisme génétique induisant de multiples isoformes permettant de les répartir dans plusieurs classes.

Nous distinguons aujourd'hui plusieurs classes de métallothionéines :

- Classe I (« MTs ») : protéines dont la structure primaire et la localisation des cystéines sont très proches de celles de la MT du rein de cheval (observées chez mammifères, poissons, crustacés et mollusques).
- Classe II (« MTs-like ») : protéines dont la teneur et la localisation des cystéines diffèrent de celles du cheval (échinodermes, levures).
- Classe III : protéines très différentes des métallothionéines des 2 précédentes classes, mais possédant des liaisons métal-thiols et des motifs dont la structure est du type (Glu-Cys)_n-Gly où n est compris entre 2 et 10. Cette classe contient les cadystines, les phytométallothionéines et les phytochélatines (Mason et Jenkins, 1995).

Les métallothionéines présentent toutes une conformation tétraédrique. Elles sont constituées de 2 parties appelées clusters α et β (cf. Fig10). Lors de la fixation d'un ion métallique, les 2 clusters se replient de façon réversible autour du métal, permettant ainsi sa séquestration. Le cluster α est constitué de 11 cystéines alors que le cluster β en comporte 9 (Stillman et al, 1995). De plus, ces 2 domaines semblent avoir des affinités différentes selon

les métaux et pourraient fixer différents ions métalliques sur une même molécule (Amiard et Cosson, 1997).

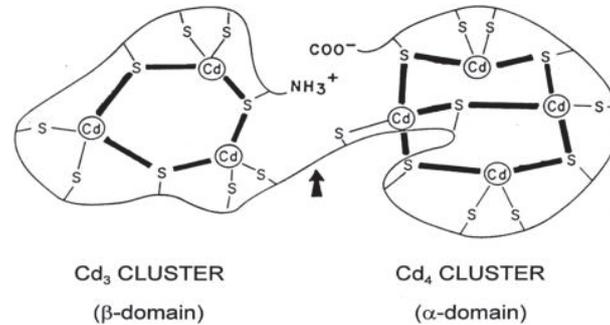


Figure 10. Schéma d'une métallothionéine piégeant plusieurs molécules de cadmium (Stillman, 1995).

Leurs particularités résident dans leur haute teneur en cystéines au sein de groupements thiol (-SH) (Amiard et al., 2006). De ce fait, elles présentent la capacité de former des liaisons covalentes avec des métaux lourds tels que le cuivre, le zinc, le cadmium et le mercure. Les métallothionéines sont capables de chélater simultanément un ou plusieurs atomes d'un même métal, mais également de créer des liaisons polymétalliques. La complexation avec un métal donné n'est pas statique, car elle peut être modifiée par la présence d'un autre métal ayant une affinité plus forte. Vàsak (1991) a établi *in vitro* une échelle des affinités métaux-métallothionéines :



Notons que sous l'action d'un pH faible (<2.5), la molécule métallique peut se dissocier de la métallothionéine.

3.2.1.2 Induction des MTs

La synthèse des métallothionéines est directement induite par une exposition/la présence de métaux (Roesijadi, 1992). Ainsi, lors d'une contamination métallique, la concentration en métallothionéines augmente significativement, d'où l'intérêt de ces protéines comme biomarqueurs d'exposition (Mosleh et al., 2004 ; Amiard et al., 2006). En outre, il faut noter qu'à partir d'une certaine concentration de métaux, l'expression des métallothionéines n'est plus dose-dépendante (Cheung et al., 2004). De plus, d'autres facteurs sont capables d'induire la production de métallothionéines (agents oxydants, composés pharmaceutiques, hormones, composés organiques aromatiques...).

3.2.1.3 Rôle des MTs

Les métallothionéines ont pour rôle de maintenir l'homéostasie de l'organisme en métaux essentiels (Cu et Zn). Elles peuvent stocker les métaux pour constituer des réserves intracellulaires, les métaux étant alors plus facilement et rapidement mobilisables pour les besoins enzymatiques et métaboliques (Mao et al., 2012). Face à des concentrations trop élevées en métaux essentiels ou en présence de métaux non essentiels (cadmium, plomb...), les métallothionéines jouent aussi un rôle de détoxification (Frayssé et al., 2006) via la fixation/chélation des métaux, les rendant alors non disponibles et les empêchant d'exercer leur potentiel toxique (Palmiter et al., 1998). Cependant, ce mécanisme de détoxification reste limité de par le nombre de groupements thiols disponibles sur les cystéines. Il a été couramment observé que les effets toxiques des métaux sont liés à ce débordement cellulaire/ cette limite (Geffard et al., 2002). Lors de leur entrée dans la cellule, les métaux non essentiels entrent en compétition avec les métaux essentiels pour se lier aux métallothionéines ; or, il semblerait que les affinités des métallothionéines *in vitro* soient plus fortes avec les métaux non essentiels qu'avec les métaux essentiels. La détoxification semble donc jouer un rôle prépondérant quant à la régulation homéostatique (Amiard et al., 2006).

Ces protéines possèdent également un rôle de protection contre les radiations ionisantes (Cai et al., 1999) et contre le stress oxydant (Rodriguez-Ortega et al., 2002 ; Valavanidis et al., 2006). Selon Ruttkay-Nedecky et al. (2013), les métallothionéines participent aussi à la protection contre le stress oxydant en « inactivant »/chélatant les radicaux hydroxyles et superoxydes.

3.2.2 Les vitamines

Plusieurs molécules non-enzymatiques assimilables par les organismes via l'alimentation, comme les vitamines et les caroténoïdes, présentent des propriétés anti-oxydantes (Lesser, 2006). L'acide ascorbique (ou vitamine C) est une molécule hydrosoluble ayant un rôle anti-oxydant en permettant de neutraliser les radicaux libres. La vitamine E (ou α -tocophérol) est une molécule anti-oxydante lipophile que l'on retrouve uniquement dans les bicouches lipidiques des membranes cellulaires. L'acide ascorbique permet de stopper la peroxydation lipidique via la réaction suivante :



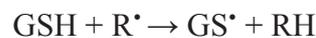
En se combinant avec un autre radical, le tocophérol (initialement porteur d'un radical tocophéryl) va former une espèce neutre/non réactive et donc limiter la peroxydation (Valavanidis et al., 2006). Ces deux molécules et le glutathion réduit (voir le paragraphe

suivant) agissent en synergie, car le radical tocophéryl peut être réduit par la vitamine C et le GSH et ainsi régénérer la vitamine E (Niki et al., 1984).

3.2.3 Le glutathion réduit (GSH)

Le glutathion réduit (ou g-L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine) est une molécule de faible poids moléculaire comportant des groupements thiol (-SH) capables de fixer des radicaux libres et de les détruire. Il est composé de 3 acides aminés : glutamate, cystéine et glycine. La formation de ce tripeptide nécessite 2 étapes utilisant chacune une molécule d'ATP (Meister et al., 1994). La première étape consiste à lier le glutamate et la cystéine grâce à l'enzyme γ -glutamyl ligase, pour former le γ -glutamate-cystéine. Ensuite, par l'action de l'enzyme glutathion synthase, la glycine est reliée au γ -glutamate-cystéine.

Le GSH est une défense non-enzymatique considérée comme le plus puissant antioxydant parmi les défenses non-enzymatiques. Il s'agit d'un composé abondant dans les cellules eucaryotes, dans lesquelles il est présent à 90% sous sa forme réduite (Meister et al., 1988). Le glutathion réduit joue un rôle dans la neutralisation des espèces radicalaires, car c'est grâce à ses groupements thiol (-SH) placés sur les résidus cystéinyl que le GSH est capable d'inactiver directement des espèces réactives. Cette « neutralisation » est rendue possible par un échange d'électrons selon la réaction suivante (DeLeve et Kaplowitz, 1991 ; Luperchio et al., 1996) :



Le glutathion réduit sert également de substrat donneur d'électrons dans plusieurs processus enzymatiques de défense antioxydants (glutathion peroxydases et glutathion transférases) (cf. §3.3.4 et § 3.3.6)

3.3 Les anti-oxydants enzymatiques

3.3.1 Les superoxydes dismutases (SOD)

Les superoxyde dismutases sont des métalloprotéines caractérisées par un atome de cuivre, de zinc et/ou de manganèse au sein de leur site actif. Elles possèdent une fonction catalytique de dismutation des anions superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) en eau et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (cf. Fig.11), afin de limiter la toxicité des anions $\text{O}_2^{\bullet-}$ au sein des cellules selon la réaction suivante (Turrens, 2006) :

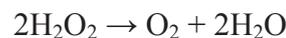


Ces enzymes sont produites de façon endogène dans les cellules, car elles ne traversent pas les membranes. Leur synthèse est induite par la présence d'anions $\text{O}_2^{\bullet-}$ dans la cellule, de façon à diminuer la concentration et la toxicité de ce ROS.

Il existe chez les eucaryotes deux types de superoxyde dismutase. La forme à cuivre-zinc (CuZnSOD ou SOD1) est localisée dans le cytosol des cellules, alors que la forme à manganèse (MnSOD ou SOD2) se situe dans la matrice mitochondriale (Lesser, 2006).

3.3.2 Les catalases

Les catalases sont des enzymes localisées dans les peroxysomes cellulaires. Elles sont constituées de 4 chaînes polypeptiques contenant chacune un hème (i.e. un cofacteur contenant un atome de métal) qui permettra la rupture de la liaison O-O de l'H₂O₂ pour former des molécules d'eau (cf. Fig.11). Ces enzymes neutralisent le peroxyde d'hydrogène en produisant de l'O₂ et des molécules d'eau selon la réaction suivante :



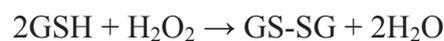
Cette réaction permet d'éviter/limiter la réaction d'Haber-Weiss (formation de radicaux hydroxyle à partir de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène en présence d'ions Fe²⁺ : Regoli and Giuliani, 2014) qui conduit à la formation de radicaux hydroxyle (OH[•]) très réactifs et toxiques (Halliwell and Gutteridge, 1984).

3.3.3 Les glutathion peroxydases (GPx)

Les glutathion peroxydases sont des enzymes formées de 4 sous-unités comprenant chacune une molécule de sélénium. Elles sont présentes sous deux formes : la forme sélénium-dépendante (SeGPX) et la forme sélénium-indépendante (IndSeGPx), que l'on retrouve toutes les deux dans les liquides extracellulaires, le cytosol des cellules et dans les mitochondries. Les glutathion peroxydases ne fonctionnent qu'en présence de glutathion réduit (GSH) qu'elles utilisent comme substrat pour la réduction de peroxydes organiques (cf. Fig.11) (Vasseur et Leguille, 2004) de type R-OOH en R-OH, afin de limiter leurs effets toxiques selon la réaction suivante (Mills, 1957) :



Cependant, seule la SeGPx est capable de détoxifier le peroxyde d'hydrogène en le réduisant en eau selon la réaction :



3.3.4 Les glutathion réductases (GSR)

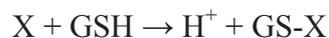
Les glutathion réductases constituent une famille d'enzymes permettant le recyclage en permanence du GSSG (gluthation oxydé) en GSH (gluthation réduit) (cf. Fig.11). Le glutathion se retrouve sous sa forme GSSG après avoir servi de substrat aux réactions catalysées par la GST et les GPx. La réaction au centre de ce recyclage est la suivante (Penninckx, 2000) :



Or, ce recyclage n'est possible (comme toute réaction enzymatique) que si les substrats sont présents en quantité suffisante. Ainsi, un déficit en NADPH ne permettrait pas la réduction du glutathion. De plus, la quantité de NADPH dépend elle-même de la réaction catalysée par la glucose-6 phosphate déshydrogénase (première enzyme de la voie des pentoses phosphates permettant l'oxydation du glucose-6-phosphate en 6-phosphoglucono- δ -lactone avec réduction concomitante d'une molécule de NADP^+ en NADPH (Kosower et Kosower, 1978).

3.3.5 Les glutathion-S-transférases (GST)

Les glutathion S-transférases (GST) sont une famille d'enzymes participant aux défenses anti-oxydantes dans le cadre du métabolisme des xénobiotiques (Hajime et al., 2005) et que l'on retrouve dans le cytosol des cellules de toutes les espèces vivantes (Hayes and Pulford, 1995), mais aussi dans les mitochondries et les microsomes hépatiques (Friedberg et al., 1979). Les GST servent à catalyser la conjugaison du groupement thiol du GSH aux centres électrophiles de molécules lipophiles ou de métaux (Habig et al., 1974), afin de former des produits finaux moins actifs et donc potentiellement moins toxiques, selon la réaction suivante :



L'implication de la GST dans les processus de détoxification/antioxydant intervient lors de la phase II du métabolisme des xénobiotiques (phase de conjugaison) qui consiste à catalyser un composé radicalaire (xénobiotique fonctionnalisé lors de la phase I de fonctionnalisation) en un produit de biotransformation plus facilement excrétable (Hellou et al., 2012).

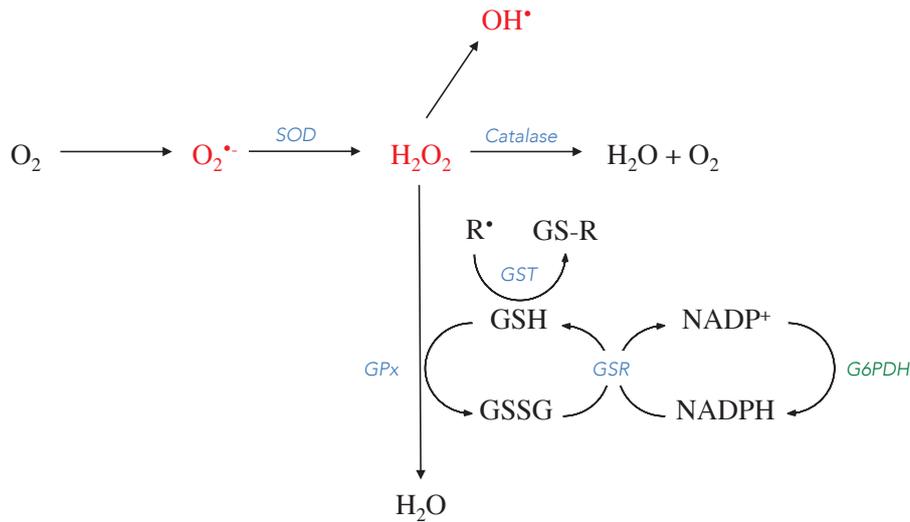


Figure 11. Schéma de l'enchaînement de la prise en charge des ROS (en rouge) par les enzymes anti-oxydantes (en bleu). R^{\bullet} est un composé radicalaire. La réduction du $NADP^+$ en $NADPH$ est réalisée par l'enzyme glucose 6 phosphate déshydrogénase (en vert). Le $NADPH$ est issu de la voie des pentoses phosphates.

3.4 Les cytochrome P450, enzymes clé du métabolisme des xénobiotiques

Les cytochromes P450 (CYPs) des familles 1, 2 et 3 sont des isoenzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques (substances exogènes telles que les médicaments et les hydrocarbures aromatiques polycycliques – HAP). Elles sont souvent utilisées comme biomarqueurs d'exposition aux polluants (Lee, 1998 ; Jorgensen et al., 2005 ; Thompson et al., 2010). Ces enzymes sont localisées au niveau de la membrane externe du réticulum endoplasmique ou dans les mitochondries (membrane interne, externe ou matrice) (Guéguen et al., 2006).

Il s'agit d'hémoprotéines dont les propriétés catalytiques dépendent de la nature de la partie protéique du cytochrome. De plus, pour devenir fonctionnelles, ces enzymes ont besoin d'électrons qui seront apportés par une enzyme (la NADP cytochromes P450 réductase si le cytochrome p450 est situé dans le réticulum endoplasmique, ou la ferrédoxine si le cytochrome P450 est dans la mitochondrie), suite à l'oxydation du $NADPH$.

Les composés organiques toxiques présentent très souvent des propriétés lipophiles et s'accumulent donc préférentiellement dans les réserves lipidiques des organismes et au niveau des membranes cellulaires (Backer and Weinstein, 1982 ; Livingstone, 2001 ; Raftery et al., 2017). Ainsi, ces enzymes ont pour objectif de rendre plus hydrosolubles les xénobiotiques, afin de faciliter leur excrétion par voie biliaire, rénale et/ou branchiale. Pour ce faire, deux étapes de transformation sont possibles : d'abord, une première phase de fonctionnalisation, appelée phase I, durant laquelle le substrat sera essentiellement oxydé par des cytochromes

P450, puis une seconde étape de conjugaison (phase II) au cours de laquelle une molécule très polaire est greffée par des enzymes comme la GST, afin de rendre le composé plus facilement excrétable (Lyytikäinen et al., 2007).

Cependant, en métabolisant les xénobiotiques, ces enzymes peuvent produire des métabolites réactifs et des ROS, avec potentiellement des effets cancérigènes et mutagènes lors de la phase de fonctionnalisation (Phase I) (Livingstone, 2001).

4. Un réceptacle de la pollution urbaine : le bassin d'infiltration

4.1 Rôles des bassins d'infiltration

Face à l'augmentation de la population mondiale, l'urbanisation ne cesse de s'accroître (Nations Unies, 2007). Cette croissance démographique provoque une perturbation du cycle de l'eau suite à l'imperméabilisation des sols (résultant de la construction d'infrastructures comme les routes, les immeubles, les parkings...). Cette hausse de l'imperméabilisation des sols urbains et périurbains entraîne deux conséquences en termes d'hydrologie : (1) une augmentation des volumes d'eau de ruissellement suite à un événement pluvial (pouvant être en partie responsable d'inondations urbaines), et (2) un déficit de la recharge/réalimentation en eau des nappes phréatiques suite à une diminution de la réinfiltration de l'eau de ruissellement (Ku et al., 1992 ; Niemczynowicz, 1999). Les nappes phréatiques représentent des réserves d'eau potable pour les populations urbaines (Griebler and Avramov, 2015) ; l'approvisionnement en eau de ces populations est réalisé par pompage, ce qui amplifie le déficit des nappes phréatiques. D'après la figure 12, l'infiltration des eaux pluviales (qui est le principal moteur de la recharge des nappes) dans un sol naturel est de 50%, le ruissellement est de 10% et les 40% restants sont évapotranspirés. Au niveau d'un sol fortement urbanisé (75 à 100% d'imperméabilisation), seulement 15% de l'eau sont infiltrés, 55% ruissellent et seulement 30% sont évapotranspirés (le faible taux de végétalisation en ville expliquant ce faible pourcentage). Ainsi, plus un sol est imperméabilisé, plus l'infiltration en direction de la nappe diminue et plus le ruissellement de surface augmente. Afin de pallier ce déficit de recharge des nappes phréatiques, les collectivités ont mis en place des systèmes de récupération/réinfiltration des eaux de ruissellement (= pluviales) dont l'exutoire final est souvent un bassin d'infiltration (Marsalek and Marsalek ; 1997 ; Marsalek and Chocat, 2002).

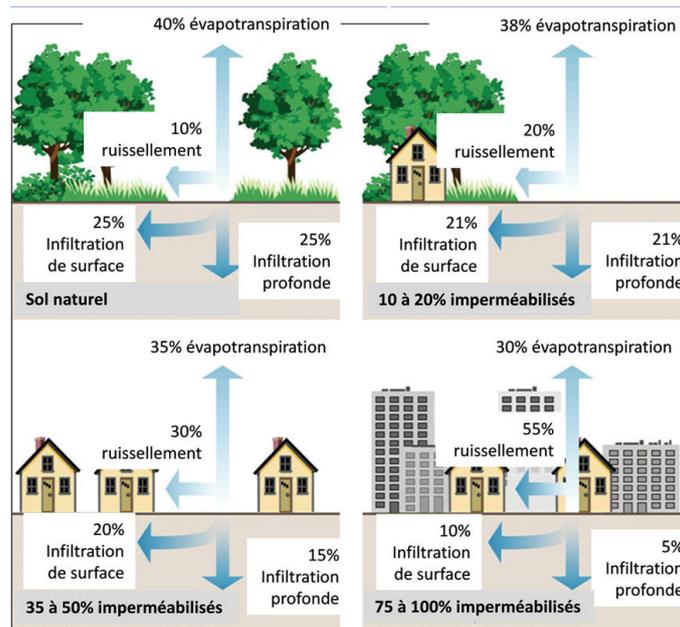


Figure 12. Relation entre l'imperméabilisation des sols et les différents modes d'évacuation des eaux pluviales (<http://www.graie.org/eaumelimelo/>).

4.2 Fonctionnement des bassins d'infiltration

Les bassins d'infiltration participent à la gestion des eaux pluviales (ou eaux de ruissellement). Ils présentent une grande capacité de stockage des eaux pluviales avant que celles-ci ne soient infiltrées en direction de la nappe phréatique sous-jacente. Ces structures permettent donc de contourner les problèmes liés à l'impact de l'urbanisation sur le cycle de l'eau (comme vu précédemment) : (1) de collecter les eaux de ruissellement suite à des événements pluvieux, (2) permettre une recharge « artificielle » des nappes phréatiques (recharge souvent limitée par l'imperméabilisation des sols en zone urbaine, (3) réduire l'impact de la pollution urbaine sur les milieux aquatiques (accumulation des polluants dans la fine couche sédimentaire des bassins d'infiltration) que nous détaillerons dans le paragraphe suivant. Parfois, des bassins de rétention sont construits en amont des bassins d'infiltration dans le but de décanter les matières en suspension et d'éviter le colmatage des bassins d'infiltration (Grebel et al., 2013). Ces bassins de rétention permettent également d'augmenter le volume de stockage des eaux pluviales et de limiter l'accumulation des polluants adsorbés aux particules fines de sédiment dans les bassins d'infiltration. Le fonctionnement du bassin d'infiltration se déroule selon un processus en plusieurs étapes (cf. Fig.13): (1) lors d'un événement pluvial, l'eau pluviale est accumulée sur les surfaces imperméables et est donc dans l'impossibilité d'être infiltrée dans les sols, (2) ces eaux de

ruissellement accumulées sont conduites via le réseau d'eau pluviale jusqu'aux bassins d'infiltration (qui est l'exutoire final du réseau d'eau pluviale), (3) le bassin d'infiltration recueille ces eaux de ruissellement chargées en particules sédimentaires (et en polluants drainés lors de l'acheminement jusqu'aux bassins d'infiltration) et permet leur réinfiltration jusqu'à la nappe phréatique. Ce processus permet ainsi la recharge en eau des nappes phréatiques. Lors de l'infiltration, l'eau de ruissellement va traverser différentes couches sédimentaires inhérentes aux caractéristiques du sol dans lequel est construit le bassin d'infiltration. Les bassins d'infiltration sont creusés directement dans le sol en place, qui présente toutefois une bonne connectivité hydraulique avec la nappe phréatique. Certains bassins sont laissés « au naturel » alors que d'autres sont végétalisés ou remplis d'une couche de matériaux drainants (sable, gravier ou galets). Le fonctionnement du bassin d'infiltration dépend donc en partie des caractéristiques du sol dans lequel il a été construit, mais également de la position de la nappe phréatique sous-jacente.

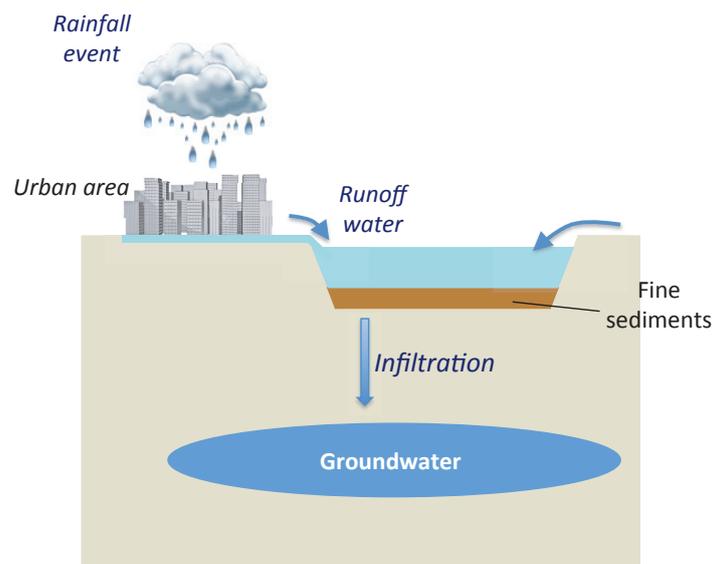


Figure 13. Schéma d'un bassin d'infiltration et trajectoire de l'eau de ruissellement.

4.3 Les bassins d'infiltration : des hot-spot de pollution

Durant leur acheminement jusqu'aux bassins d'infiltration, les eaux de ruissellement issues des zones urbaines et périurbaines lessivent les sols, solubilisent certains polluants et surtout drainent de fines particules de sédiments sur lesquelles sont adsorbés de nombreux contaminants issus des activités industrielles et anthropiques comme les HAPs, les métaux lourds et les hydrocarbures (Pitt et al., 1999 ; Grebel et al., 2013). Ces divers contaminants sont accumulés sur les sols lors des périodes de temps sec. Ainsi, les bassins d'infiltration

collectent tous ces contaminants et les accumulent au niveau des couches de sédiments fins. Ces sédiments deviennent donc des réservoirs de polluants, accumulés en « cocktail ». Comme vu précédemment (cf. §1.4), l'étude de ces cocktails de pollution reste relativement méconnue de par la complexité des effets que peuvent créer les polluants en fonction de leur association les uns avec les autres (effets synergiques, antagonistes, additifs), mais aussi selon les organismes étudiés et les paramètres physico-chimiques dans lesquels se déroulent les expérimentations. Ces propriétés font des sédiments des bassins d'infiltration un excellent support/modèle d'application dans le cadre d'une étude réaliste des effets de la pollution urbaine sur les milieux récepteurs.

En revanche, l'accumulation/la concentration de ces polluants dans les bassins d'infiltration permet de réduire les incidences de la pollution urbaine sur les milieux aquatiques tels que les rivières, et donc de permettre à la fois la gestion des eaux de ruissellement, mais aussi la pollution en milieu urbain, ce qui représente un enjeu important pour la protection de l'environnement.

4.4 Bassins d'infiltration utilisés au cours de cette thèse

Au cours de cette thèse, nous avons utilisé pour nos expérimentations en laboratoire des sédiments fortement pollués (3) (prélevés dans des bassins d'infiltration) et très peu pollués (2) (prélevés dans des zones très peu urbanisées et considérés comme des témoins).

Le premier sédiment témoin (BOURBRE) provient du lit d'une rivière (La Bourbre, Département de l'Ain). Il a été utilisé lors de l'expérimentation de courte durée (1 mois, publication n°1). Le deuxième sédiment témoin (BALAN) a été prélevé dans un bras mort (lône) du Rhône en amont de Lyon (Commune de Balan, Département de l'Ain). La matrice BALAN a été utilisée lors de l'expérimentation de longue durée (6 mois, publications 2 et 3). L'utilisation de sédiments « contrôle/très peu pollué » différents pour les expérimentations de courte (BOURBRE) et de longue (BALAN) durées se justifie par des raisons pratiques. Le sédiment BOURBRE est très facile à prélever en grande quantité, mais possède un taux de matière organique plus faible (<2%) que le sédiment BALAN (8%). Dans le cas de la matrice BOURBRE, cette quantité de matière organique sera parfaitement suffisante pour assurer l'alimentation des vers tubifidés pendant 1 mois (puisque nous ne notons pas de diminution significative du taux de matière organique en fin d'expérimentation de courte durée), mais elle sera insuffisante pour des durées supérieures à 3 mois (rendant possible le risque d'observer un jeûne alimentaire chez les vers). Le sédiment BALAN est nettement plus

difficile à prélever, mais il présente une teneur en matière organique suffisamment élevée pour assurer l'alimentation des vers pendant 6 mois.

Les trois sédiments pollués proviennent de trois bassins d'infiltration de la Métropole de Lyon (MINERVE, IUT et DJANGO : cf. Fig.14). Par contre, ils n'ont pas été prélevés au même moment pour les deux expérimentations (car ces matrices ne peuvent être conservées plus de quelques semaines sans modification de leur composition), et leurs teneurs en polluants seront donc sensiblement différentes (cf. Tableaux 2 et 3). Le bassin d'infiltration MINERVE collecte les eaux issues d'un parc de loisir et d'une grande zone commerciale, alors que le bassin DJANGO est situé au centre d'une zone industrielle. Quant au bassin d'infiltration IUT, il se situe en bordure du campus universitaire de Lyon 1 (uniquement scientifique) et d'un boulevard périphérique urbain très fréquenté (dont il collecte les eaux de ruissellement). Ces trois bassins d'infiltration possèdent donc des profils très différents, et leurs sédiments vont présenter des teneurs en polluants urbains non homogènes.

Ces cinq sédiments ont été analysés par le laboratoire (agrémenté) CARSO (cf. Annexe 2) afin de déterminer les concentrations en métaux lourds, en hydrocarbures et en HAPs, résumées dans le tableau suivant :

Tableau 2. Concentrations en polluants urbains des sédiments des bassins d'infiltration utilisés au cours de cette thèse pour les expérimentations de long terme.

Sédiments	Hydrocarbures totaux (mg/kg MS)	Métaux lourds (mg/kg MS)	HAP (µg/kg MS)
BALAN	178	74	621
MINERVE	3 348	1 820	3 066
IUT	1 067	1 158	14 923
DJANGO	7 743	3 043	3 899

Tableau 3. Concentrations en polluants urbains des sédiments des bassins d'infiltration utilisés au cours de cette thèse pour les expérimentations de court terme.

Sédiments	Hydrocarbures totaux (mg/kg MS)	Métaux lourds (mg/kg MS)	HAP (µg/kg MS)
BOURBRE	70	69	530
MINERVE	1468	1832	1494
DJANGO	2208	3351	1753



Minerve



IUT



Django-Reinhardt

Figure 14. Photos des bassins d'infiltration où ont été prélevés les sédiments utilisés au cours de cette thèse.

4.5 Biodiversité au sein des bassins d'infiltration

Les bassins d'infiltration représentent un milieu extrême pour les organismes, car ils présentent de très fortes concentrations en polluants (composés organiques – dont HAP - et métaux lourds) et des teneurs en oxygène qui peuvent être très faibles (proches de l'anoxie) (Datry et al., 2003). Ces potentielles conditions anoxiques dans les sédiments et l'eau des bassins d'infiltrations peuvent s'expliquer par la présence de fortes densités de microorganismes, favorisées par d'importantes teneurs en matière organique. En utilisant la matière organique comme substrat, les microorganismes consomment l'oxygène présent dans

le milieu pour les processus de nitrification/dénitrification (cycle biogéochimique de l'azote), rendant ce biotope potentiellement abiotique pour d'autres espèces (macroinvertébrés) (Nogaro et al., 2007).

Cependant, malgré ces conditions très défavorables, quelques rares taxons sont capables de vivre dans l'eau et les sédiments des bassins d'infiltration, ce qui sous-entend des adaptations métaboliques physiologiques et comportementales spécifiques (Datry et al., 2003). Parmi les espèces peuplant ces écosystèmes très contraignants, on retrouve principalement des oligochètes tubificidés et des ostracodes (*Eucyclops serrulatus*) (Datry et al., 2003).

5. Un excellent modèle biologique : *Limnodrilus hoffmeisteri*

5.1 Un organisme ingénieur

Au cours de cette thèse, nous avons choisi de travailler sur un annélide oligochète aquatique, *Limnodrilus hoffmeisteri* (Clarapède, 1862) (cf. Fig.15). Ce ver tubificidé est une espèce très ubiquiste que l'on retrouve parfois en très forte densité dans des zones très polluées et riches en matière organique (Chapman et al., 1982 ; Millward et al, 2001), dont les bassins d'infiltration. *L. hoffmeisteri* est un biotubateur qui creuse des galeries en forme de U dans les couches de sédiments fins et très faiblement oxygénés (Mermillod et al., 2003). Il appartient au groupe fonctionnel des « convoyeurs ascendants » comme *Tubifex tubifex* (Mermillod-Blondin et al., 2001) : il creuse des galeries en profondeur, ingère et digère les particules fines riches en matière organique de la zone anoxique et défèque des pelotes fécales (mucus + fèces) au niveau de l'interface eau-sédiment (zone oxygène) (Ciutat et al. 2006), créant ainsi un effet de bioadvection (Fisher et al., 1980). *L. hoffmeisteri* se nourrit des fines particules de sédiment, tout en creusant des galeries donc les parois sont tapissées et consolidées par le mucus qu'il sécrète. Il s'agit d'une espèce qui remanie le sédiment dans lequel il creuse ses galeries, ce qui facilite le développement de communautés microbiennes et les cycles biogéochimiques (cycle de l'azote et recyclage de la matière organique). Ce ver tubificidé est donc considéré comme une espèce ingénieur, car par son comportement de bioturbation il influence son milieu/écosystème (Jones et al., 1994). Dans certaines conditions, *L. hoffmeisteri* génère un important flux d'eau à l'intérieur de ses galeries ce qui va les oxygéner, favorisant ainsi le développement de communautés bactériennes aérobies (Reichardt, 1988) : en période de déficit en oxygène (cas très courant), ces vers remontent vers l'interface eau/sédiment et vont se mettre à faire des mouvements oscillatoires avec la

partie caudale de leur corps afin de renouveler l'eau (Guérin and Giani, 1996). De nombreuses études ont montré l'influence des organismes bioturbateurs sur le fonctionnement de l'interface eau-sédiment, sur les processus microbiologiques et biogéochimiques (Nogaro et al., 2007 ; Nogaro and Mermillod-Blondin, 2009), sur la croissance de macrophytes (Mermillod-Blondin and Lemoine, 2010), mais également sur la dynamique de polluants accumulés dans la couche sédimentaire des bassins d'infiltration (Mermillod-Blondin et al., 2005 ; Nogaro et al., 2009).

Concernant le cycle de vie de *L. hoffmeisteri*, deux stades peuvent être identifiés : les individus immatures et les individus sexuellement matures ; la présence d'un étui pénien en partie distale de l'organisme caractérise les individus matures. Ces vers sont hermaphrodites et possèdent une espérance de vie de 2 ans. D'après Kennedy (1966), ces vers acquièrent leur maturité sexuelle 7 mois après l'éclosion. Le cycle de vie de *L. hoffmeisteri* est très complexe et dépend de l'environnement. En effet, les individus de cette espèce peuvent redevenir immatures (en « digérant » leurs organes génitaux) après une phase de reproduction et/ou en fonction des conditions environnementales. Ils peuvent les régénérer par la suite si les conditions redeviennent favorables (Kennedy, 1966).

D'un point de vue écophysiological, *L. hoffmeisteri* est connu pour être résistant à de nombreuses contraintes environnementales (hypoxie de longue durée, anoxie, pollution, salinité, pH) (Chapman et al., 1982 ; Chapman and Brinkhurst, 1984). De plus, *L. hoffmeisteri* (tout comme *Tubifex tubifex*) est capable de passer très rapidement d'un métabolisme aérobie à un métabolisme anaérobie (Seuß et al., 1983 ; Putzer et al. 1985 ; Datry et al., 2003).



Figure 15. Photographie de *Limnodrilus hoffmeisteri*

5.2 Utilisation en écotoxicologie

Limnodrilus hoffmeisteri est souvent utilisé comme modèle biologique en écotoxicologie, car la bibliographie sur la sensibilité de ce ver aquatique aux polluants est relativement importante (Chapman, 1982). De plus, il s'agit d'un organisme utilisé à la fois en expérimentation de terrain et de laboratoire, car cette espèce est cosmopolite, facile à identifier et à élever (Rodriguez et al., 2006). En se nourrissant des particules fines sur lesquelles sont adsorbées les polluants, *L. hoffmeisteri* est en contact direct avec les contaminants, ce qui renforce la pertinence de son choix comme modèle biologique (Ciutat et al., 2006). Du point de vue fonctionnel/mécanique, il a également été montré que les vers tubificidés comme *Limnodrilus hoffmeisteri* et *Tubifex tubifex* déplacent les contaminants (HAPs, métaux lourds) associés aux particules sédimentaires par leur activité de bioturbation, et donc modifient les concentrations de ces molécules dans tous les compartiments de l'écosystème (colonne d'eau, eau interstitielle, sédiments) ; cette propriété joue probablement un rôle significatif sur la dynamique des polluants dans les écosystèmes.

Par ailleurs, la présence de certains polluants comme le benzo-a-pyrène peut impacter l'activité de bioturbation d'oligochète comme *Tubifex tubifex* (Mermillod-Blondin et al., 2013), et donc altérer le comportement « ingénieur » de cet organisme et ainsi tout le fonctionnement de son écosystème.

Toutes ces caractéristiques font de *L. hoffmeisteri* un excellent modèle dans le cadre d'une étude comme celle qui va être présentée dans la suite de ce manuscrit.

6. Justification du choix des biomarqueurs d'impact utilisés au cours de cette thèse

Les nombreuses études visant à mettre en évidence l'effet d'un ou plusieurs polluants sur les tissus isolés ou les organismes ont majoritairement utilisé des marqueurs de reprotoxicité, de génotoxicité et/ou de cytotoxicité (Eom et al., 2007 ; Lacaze et al. 2011 ; Devaux et al., 2015 ; Wigh et al., 2017 ; Aquilino et al., 2018). Mais plusieurs travaux récents ont montré que certains polluants perturbent le métabolisme énergétique (et de ce fait sont susceptibles de provoquer une transition vers le passage métabolisme anaérobie) (Lauer et al., 2012), le fonctionnement de la mitochondrie (Gradeja y Ortega et al., 2011 ; Kurochkin et al., 2011 ; Ji et al., 2016) et/ou induisent l'apparition d'un stress oxydant (Lushchak, 2011 ; Girón-Pérez et al., 2013). D'autres auteurs ont aussi montré que les contaminants peuvent

modifier le comportement d'un organisme ingénieur bioturbateur et donc son rôle fonctionnel au sein de l'écosystème (Lagauzère et al., 2009 ; Mermillod-Blondin et al., 2013). Ainsi, dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi une approche plus écophysiological - à la fois bioénergétique et fonctionnelle - en nous focalisant sur les effets d'un cocktail de polluants urbains sur l'activité de bioturbation, la balance oxydative et le métabolisme énergétique (et plus précisément sur la transition voies aérobies vers voies anaérobies). Dans ce but, nous avons mesuré plusieurs paramètres mitochondriaux considérés comme de bons marqueurs du métabolisme aérobie, les produits terminaux du métabolisme anaérobie, les principales réponses antioxydantes ainsi que les réserves énergétiques corporelles chez un organisme sentinelle (*Limnodrilus hoffmeisteri*) incubé ou non dans des sédiments pollués.

L'étude de la balance oxydative permet d'évaluer le niveau des dégâts oxydatifs générés par un stress chimique ainsi que l'intensité des mécanismes de défense associés (Lawniczak et al., 2013). Nous avons choisi de mesurer des marqueurs « classiques » et fiables (cf. Chapitre I §3.3), à savoir la concentration corporelle en MDA (qui nous indique le niveau de peroxydation des lipides dû à la présence éventuelle de radicaux libres suite à une pollution) ainsi que l'activité des trois principales enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase), dont le rôle est de limiter la formation de radicaux libres et donc les dégâts oxydatifs majeurs tels que la peroxydation lipidique.

Concernant le métabolisme énergétique, nous avons choisi d'évaluer les effets d'une exposition à une pollution urbaine sur les réserves énergétiques corporelles (glycogène et triglycérides), puisque ce sont ces macromolécules (*i.e.* ce carburant cellulaire) qui fournissent l'énergie nécessaire au développement et au maintien des défenses contre un stress, quel qu'il soit (cf. Chapitre I §3.1). De ce fait, elles correspondent à un facteur limitant pour survivre dans des conditions contraignantes, et leur taille peut nous indiquer les potentialités d'un organisme face à un stress donné.

L'étude de biomarqueurs du fonctionnement mitochondrial (*i.e.* le moteur cellulaire qui produit l'ATP indispensable au fonctionnement d'un organisme : homéostasie, réponse à un stress...) (cf. Chapitre I §2.2) nous permet de comprendre comment le métabolisme aérobie et la production d'ATP peuvent être impactés par la présence de polluants urbains, et donc si la production énergétique nécessaire à la lutte contre le stress chimique peut être limitée par la présence de ces mêmes polluants. La cytochrome c oxydase (complexe IV), dernière enzyme de la chaîne respiratoire mitochondriale, correspond parfaitement à cette définition, puisqu'elle a pour rôle de réduire l'oxygène en H₂O. De plus, le calcul du rapport ATP/O (= nombre de molécules d'ATP synthétisées par atome d'oxygène consommé au niveau de la

mitochondrie) permet d'évaluer la plasticité mitochondriale d'un organisme, dont le rôle potentiel est la compensation du déficit d'activité de la chaîne de transport d'électrons (ATP synthase) comme cela a pu être observé chez des oiseaux soumis à un stress thermique (froid) (Monternier et al., 2014).

La mesure des concentrations corporelles en produits terminaux du métabolisme anaérobie (lactate, alanine, succinate et propionate dans le cas des Annélides : Schöttler and Bennet, 1991 ; Datry et al. 2003) constitue un marqueur complètement nouveau et particulièrement intéressant/pertinent, puisqu'il permet de quantifier le niveau de perturbation du métabolisme aérobie généré par un stress chimique (cf. Chapitre I §2.3). En effet, cette information nous indique (1) si l'organisme soumis à un ou des contaminants effectue une transition partielle ou en totalité vers le métabolisme anaérobie, et (2) les voies de fermentation utilisées. Le rendement (en termes de production d'ATP) des voies anaérobies est toujours nettement plus faible que celui du métabolisme aérobie, mais certaines voies de fermentation (en particulier celles menant à l'accumulation de succinate et/ou de propionate) sont plus efficaces que la classique « glycolyse à lactate produit final » (Schöttler and Bennet, 1991 ; Hervant et al., 1996). Le passage en anaérobiose constitue aussi un moyen de limiter la production de radicaux libres en passant par des voies métaboliques, certes moins rentables en énergie, mais qui n'utilisent pas d'oxygène (précurseur des radicaux libres).

Chapitre II

Impact des polluants urbains
sur le rôle fonctionnel (lié à
l'activité de bioturbation) de
Limnodrilus hoffmeisteri

1. INTRODUCTION

Ce deuxième chapitre traitera de l'impact d'un cocktail de pollution urbaine (1) sur le rôle fonctionnel au sein du compartiment sédimentaire (facilitation du recyclage des nutriments, porosité), et (2) sur le comportement (activité de bioturbation) et la physiologie d'un organisme ingénieur, l'oligochète bioturbateur *Limnodrilus hoffmeisteri*.

En ville, l'intensification de l'urbanisation - et donc de l'imperméabilisation des sols - limite la réinfiltration de l'eau dans les nappes phréatiques (réservoirs d'eau potable, souvent localisés à proximité des zones urbaines) et, dans certains cas, leur recharge. Pour pallier ce problème, les communautés d'agglomérations ont mis en place des systèmes de collecte et d'infiltration des eaux de ruissellement comme les bassins d'infiltration (Marsalek and Chocat, 2002). Cependant, les eaux de ruissellement drainent les polluants accumulés sur les surfaces imperméables (principalement des métaux lourds et des hydrocarbures - dont HAPs) qui peuvent s'adsorber sur les particules fines en suspension puis être accumulés dans la couche de sédiments fins des bassins d'infiltration. Or, des invertébrés vivent dans cette couche de sédiments et jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement de ces ouvrages : par leur activité de bioturbation, ils aident à l'infiltration de l'eau de ruissellement, limitent le colmatage, stimulent les cycles biogéochimiques à l'interface eau-sédiment et influencent la colonisation/développement de communautés bactériennes essentielles au sein de leurs galeries, de leur tube digestif et de leurs fèces (Mermillod-Blondin et al., 2003 ; Mermillod-Blondin et al., 2005 ; Mermillod-Blondin et al., 2008). Ces organismes doivent également survivre/s'acclimater dans un milieu contenant de nombreux polluants (car issus de l'activité anthropique), parfois très concentrés, et donc mettre en place des réponses visant à limiter les dégâts causés par ces molécules aussi bien au niveau comportemental que physiologique (Landrum et al., 2004 ; Marmonier et al., 2013 ; Mermillod-Blondin et al., 2013). Ainsi, nous avons supposé que l'exposition d'un organisme bioturbateur et ingénieur à un cocktail de polluants urbains modifiait à la fois leur physiologie, mais également leur comportement (déplacements/creusement de galeries).

Dans ce chapitre, nous présenterons donc l'évolution du rôle fonctionnel, de l'activité de bioturbation et de quelques paramètres métaboliques (considérés comme de bons marqueurs d'impact) après exposition à des sédiments très pollués ou peu pollués, chez *L. hoffmeisteri*. A l'échelle de l'organisme, nous avons ainsi mesuré les effets d'un cocktail de polluants urbains sur : (1) la survie, (2) la physiologie, (3) le comportement (activité de

bioturbation). A l'échelle de l'écosystème récepteur des polluants, nous avons cherché à déterminer l'impact d'une contamination sur les processus biogéochimiques à l'interface eau-sédiment.

Pour répondre à ces différentes questions, nous avons mis en place des expériences en laboratoire : les vers tubificidés ont été élevés pendant un mois maximum (0, 15 et 30 jours) dans des sédiments pollués (métaux lourds et hydrocarbures, dont HAP) issus de deux bassins d'infiltration ou à un sédiment relativement peu pollué issu d'une rivière de l'Isère. A la fin de chaque temps d'exposition et pour chaque type de sédiment, nous avons mesuré la survie (par comptage des individus présents, après tamisage du sédiment) et l'évolution de différents paramètres physiologiques (activité de la principale enzyme antioxydante, teneur en lipides peroxydés/MDA, consommation d'oxygène et réserves énergétiques corporelles) pour valider l'hypothèse selon laquelle la présence de polluants a un impact sur la physiologie des organismes exposés et potentiellement sur leur comportement (creusement de galeries). Le niveau des réserves énergétiques (glycogène, protéines et triglycérides) et la consommation d'oxygène nous ont renseignés sur l'état de santé des organismes et sur le coût énergétique des mécanismes de défense mis en place. Les autres paramètres nous ont apporté des informations sur l'intensité du stress oxydant subi par les organismes soumis à des polluants urbains (teneur en MDA) et sur les mécanismes de défense mis en place (activité de l'enzyme SOD). En parallèle, des microcosmes sans vers ont été mis en place pour les mesures de l'activité de bioturbation et des flux de nutriments.

Afin de mesurer l'impact des polluants urbains sur l'activité de bioturbation après 30 jours d'exposition aux sédiments (pollués ou non pollués), le même design expérimental a été reproduit avec des microcosmes plus petits, adaptés pour le passage dans le tomographe. Ce scanner 3D nous a donc permis de quantifier le nombre de structures biogéniques (galeries), leur diamètre ainsi que leur distribution sur la hauteur de la colonne.

Enfin, nous avons cherché à déterminer l'impact des contaminants sur les processus biogéochimiques en mesurant sur les microcosmes les flux de nutriments (NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ et le DOC) et de gaz (CO_2 et CH_4) au sein des sédiments des bassins d'infiltration, en présence ou en absence de vers tubificidés (influence de leur rôle d'ingénieurs) et de polluants (sédiments pollués ou non pollués), durant 1 mois d'exposition.

2. Urban pollution of sediments : Impacts on the physiology and burrowing activity of tubificid worms and consequences on biogeochemical processes



Urban pollution of sediments: Impact on the physiology and burrowing activity of tubificid worms and consequences on biogeochemical processes



M. Pigneret ^{a,*}, F. Mermillod-Blondin ^a, L. Volatier ^a, C. Romestaing ^a, E. Maire ^b, J. Adrien ^b, L. Guillard ^a, D. Roussel ^a, F. Hervant ^a

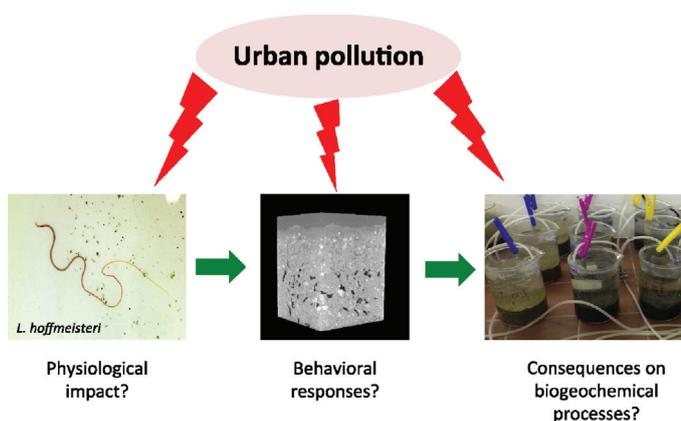
^a LEHNA, UMR CNRS 5023, Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, Université de Lyon, Université Lyon 1, ENTPE, 6 rue Raphael Dubois, 69622 Villeurbanne, France

^b MATEIS, UMR CNRS 5510, INSA de Lyon, 25 avenue Jean Capelle, 69621 Villeurbanne, France

HIGHLIGHTS

- We studied the impact of a cocktail of urban pollutants on *L. hoffmeisteri*.
- Tubificid worms were able to withstand the oxidative stress linked to heavy-metals.
- X-ray micro-tomography quantified the burrowing activity of worms in sediments.
- *L. hoffmeisteri* displayed an increased burrowing activity in the stormwater sediments.
- Worms stimulated biogeochemical processes whatever the pollution level.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 February 2016

Received in revised form 12 May 2016

Accepted 24 May 2016

Available online xxxx

Editor: D. Barcelo

Keywords:

Urban pollution

Physiological effects

Oxidative stress

Bioturbation

Limnodrilus hoffmeisteri

CT scan

ABSTRACT

In urban areas, infiltration basins are designed to manage stormwater runoff from impervious surfaces and allow the settling of associated pollutants. The sedimentary layer deposited at the surface of these structures is highly organic and multicontaminated (mainly heavy metals and hydrocarbons). Only few aquatic species are able to maintain permanent populations in such an extreme environment, including the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri*. Nevertheless, the impact of urban pollutants on these organisms and the resulting influence on infiltration basin functioning remain poorly studied. Thus, the aim of this study was to determine how polluted sediments could impact the survival, the physiology and the bioturbation activity of *L. hoffmeisteri* and thereby modify biogeochemical processes occurring at the water-sediment interface. To this end, we conducted laboratory incubations of worms, in polluted sediments from infiltration basins or slightly polluted sediments from a stream. Analyses were performed to evaluate physiological state and burrowing activity (X-ray micro-tomography) of worms and their influences on biogeochemical processes (nutrient fluxes, CO₂ and CH₄ degassing rates) during 30-day long experiments.

Our results showed that worms exhibited physiological responses to cope with high pollution levels, including a strong ability to withstand the oxidative stress linked to contamination with heavy metals. We also showed that

* Corresponding author.

E-mail address: mathilde.pigneret@univ-lyon1.fr (M. Pigneret).

the presence of urban pollutants significantly increased the burrowing activity of *L. hoffmeisteri*, demonstrating the sensitivity and the relevance of such a behavioural response as biomarker of sediment toxicity. In addition, we showed that X-ray micro-tomography was an adequate technique for accurate and non-invasive three-dimensional investigations of biogenic structures formed by bioturbators. The presence of worms induced stimulations of nutrient fluxes and organic matter recycling (between +100% and 200% of CO₂ degassing rate). Nevertheless, these stimulations were comparable within the three sediments, suggesting a low influence of urban contaminants on bioturbation-driven biogeochemical processes under our experimental conditions.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Urban areas host half of the world's population (up to 80% in most industrialized countries), and this proportion is predicted to increase strongly in the future (United Nations, 2007). One of the major landscape modifications associated with urbanization is an increase in impervious surface coverage (Arnold and Gibbons, 1996). The sealing of urban surfaces alters the natural water cycle by increasing stormwater runoff during rainfall events thereby generating urban flooding and reducing groundwater recharge (Ku et al., 1992; Niemczynowicz, 1999). Stormwater management practices have been developed for 30 years in many countries to limit surface runoff (Marsalek and Chocat, 2002; Hunt et al., 2010). These practices consist in collecting and pouring stormwater into rivers, ponds or infiltration basins (Marsalek and Marsalek, 1997; Barraud et al., 2002). However, urban stormwater is a major source of pollutants like heavy metals or hydrocarbons, which are often associated with suspended sediments (Pitt et al., 1999; Grebel et al., 2013). Consequently, these pollutants may dramatically alter the quality of the sedimentary compartment of ecosystems receiving stormwater from urban areas (riverbeds and infiltration basins). For example, Datry et al. (2003a) estimated that a total of 128 kg of hydrocarbons and 153 kg of heavy metals (Zn, Pb, Cu, Cr, Ni, and Cd) were retained in a small infiltration basin (750 m²) draining an urban catchment of 2.5 ha after 30 years of functioning. The pollutant characteristics of these stormwater sediments could strongly affect the biological functioning of water-sediment interfaces that constitute key compartments for organic matter processing and nutrient cycling (e.g., Covich et al., 2004). However, studies concerning the negative aspects of urban pollution on the functioning of water-sediment interfaces remain scarce (but see Nogaro et al., 2007).

Despite high pollutant concentrations, stormwater sediments are often colonised by invertebrate taxa adapted to life in hypoxic and polluted environments such as tubificid worms or chironomid larvae (Datry et al., 2003b; Nogaro et al., 2008). These macro-organisms are known to act as efficient ecosystem engineers through their bioturbation activities: they build and ventilate galleries/burrows in sediments, stimulating microbial activities, nutrient fluxes and organic matter processing at the water-sediment interface (Krantzberg, 1985; Mermillod-Blondin and Lemoine, 2010; Nogaro and Steinman, 2014). Nevertheless, the ability of these organisms to influence ecological processes in sediments can be decreased by the presence of pollutants (Lagauzère et al., 2009a). Indeed, sublethal concentrations of pollutants can significantly affect the burrowing activities of invertebrates in sediments (Keilty et al., 1988; Mulow et al., 2002; Landrum et al., 2004; Lagauzère et al., 2009b). For example, Landrum et al. (2004) measured a significant decrease in sediment reworking activity of the oligochaete *Lumbriculus variegatus* due to sediment pollution by polychlorinated biphenyl (PCB). More recently, Mermillod-Blondin et al. (2013) demonstrated that a pollution of sediments by a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) inhibits the burrowing activities of tubificid worms and their associated influence on sediment biogeochemistry (aerobic respiration and denitrification). Although these studies highlighted the need to assess the influence of sublethal concentrations of pollutants on bioturbation processes, they remained limited to experiments with one or two pure compounds without considering the

multi-contamination occurring in polluted sediments. This is more precisely the case in sediments from stormwater basins, polluted by a mixture of both metallic and organic compounds.

High levels of pollutants can also affect the physiology of organisms inhabiting infiltration basins (Marmonier et al., 2013). In such a harsh environment, aquatic invertebrates can respond by setting up costly defense mechanisms potentially leading to an increase in both energy reserves (glycogen, triglycerides and/or proteins) utilization rates and oxygen consumption, to fuel these responses. Moreover, recent studies have shown that numerous xenobiotics enhance oxidative stress in aquatic organisms and lead to the implementation of specific defense mechanisms, mainly the increase activity of antioxidant enzymes (see review in Winston, 1991 and Livingstone, 2001).

The aim of this study was to determine how a complex urban pollution of sediments could impact the survival, physiology and bioturbation activities of a worm species considered as a key bioturbator and the consequences of this pollution on biogeochemical processes (nutrient fluxes and organic matter mineralization) occurring at the water-sediment interface. We employed a factorial experimental approach in which the presence of the freshwater tubificid worm *Limnodrilus hoffmeisteri* (0 or 28,000 individuals per m²) and sediment treatments (3 sediments: two polluted sediments from stormwater infiltration basins and one stream sediment acting as control) were manipulated in microcosms kept under laboratory conditions. According to Datry et al. (2003b) who did not detect mortality in tubificid worms incubated 25 days in stormwater sediments, we did not expect that urban pollution of tested sediments would influence the survival of tubificid worms, but rather that they would exert a significant influence on their physiology. Thus, the impact of urban pollutants on a selection of physiological traits considered as pertinent metabolic biomarkers (oxygen consumption rate, body levels of glycogen, triglycerides and proteins: Marmonier et al., 2013) was investigated in worms incubated in stormwater and stream sediments. In addition, we tried to determine whether urban pollutants generate oxidative damages (through the level of lipid peroxidation, a major biomarker of oxidative injuries: Livingstone, 2001) and induce an efficient antioxidant response (through the catalytic activity of the major antioxidant enzyme, the enzyme superoxide dismutase: Winston, 1991) in worms incubated in stormwater sediments. The presence of pollutants would also influence the burrowing behaviour of worms as observed with earthworms in soils contaminated by heavy metals (Nahmani et al., 2005). Consequently, a change in burrowing activities would impair the ability of ecosystem engineers - tubificid worms - to influence sediment biogeochemistry, and therefore would affect the functioning of ecosystems receiving stormwater from urban areas. Thus, X-ray computed microtomography (μ CT) was used in this study to quantify the volume of galleries (so-called biogenic structures) formed by burrowing activities of worms within sediments. This technique allows for accurate and non-destructive observations of internal structures, and is well recognized as an efficient tool to provide three-dimensional images of gallery networks formed by bioturbator organisms in sedimentary environments (Michaud et al., 2003; Dufour et al., 2005; Rosenberg et al., 2007; Mazik et al., 2008; Bouchet et al., 2009). Finally, the influence of worms on biogeochemistry was evaluated by measuring the dynamics of N-NH₄⁺, N-NO_x (N-NO₃⁻ + N-NO₂⁻) and dissolved organic carbon

concentrations in the water column of each microcosm (Hunting et al., 2013; Bowen et al., 2014), and by quantifying CO₂ and CH₄ degassing rates from the three sediments (Boucher et al., 1994).

2. Material & methods

2.1. Sediment characteristics

We selected three sediments (2 stormwater sediments and 1 stream sediment) to test the influence of contrasted pollutant concentrations on the survival, physiology and ecosystem engineering activities of tubificid worms. The two stormwater sediments were collected in two infiltration basins (Django-Reinhardt - called DJ - and Minerve - called MIN - basins) located in industrialized and urbanized areas of the urban community of Lyon (Lyon Metropole, France; see Marmonier et al., 2013 for details concerning the infiltration basins) while the stream sediment was collected from the Bourbe stream (called BOU) (Isère, France). The three sediments were sieved (<1 mm) to (1) remove macrofauna naturally present in sediments, (2) to avoid the presence of unwanted materials (debris), and (3) for homogenisation before use in microcosms. The particle size distributions of these sieved sediments were determined by a laser diffraction granulometer (Mastersizer, 2000, Malvern Instrument, UK) according to Gette-Bouvarot et al. (2014) and were characterized by dominant fractions of coarse silt and fine sand for the three sediments (Table 1). Total organic carbon and total nitrogen concentrations were quantified by high-temperature

combustion of pre-acidified dry samples and subsequent measurement of CO₂ and N₂ by thermal conductivity using an elemental analyzer (FlashEA, Thermo Electron Corporation). These analyses showed that the two stormwater sediments were richer in total organic carbon (5×) and total nitrogen (more than 3×) than stream sediments (Table 1). Metals (Cd, Cu, Pb, and Zn) in sediments were extracted using microwave-assisted digestion with HNO₃ and HCl and analyzed by ICP-AES (Thermo Electron Maxim). PAH in sediments was analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detectors (Agilent 1100) following cold extraction with CCl₄. These contaminant analyses confirmed that stream sediments were characterized by low concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and heavy metals (Table 1). In comparison, higher concentrations of total hydrocarbons (20×), heavy metals (26×) and PAHs (2.8×) characterized the two stormwater sediments (Table 1). The concentrations of heavy metals (mainly Zn) were about twice higher in DJ basin than in MIN basin due to different urban area catchments (Marmonier et al., 2013).

2.2. Model organism

The worm *Limnodrilus hoffmeisteri* (Annelida, Tubificidae) was selected because it is tolerant to pollutants (Lotufo and Fleeger, 1996; Millward et al., 2001) and is recognized as a key bioturbator in freshwater sediments (McCall and Tevesz, 1982; Mermillod-Blondin et al., 2001; Shang et al., 2014). Indeed, this species is a common sediment feeder that creates biogenic structures in sediments and egests faecal pellets at the water-sediment interface (Matisoff et al., 1999; Shang et al., 2014). Specimens of *L. hoffmeisteri* (mean individual dry mass: 350–400 µg) used in our experiments were bought from a professional breeder (GREBIL, Arry, France). Before the experimentation, they were acclimated to sedimentary habitats in 100-L plastic tanks containing fine unpolluted sandy silt sediment from the Ain river (France) and normoxic water (50 L, bubbled with air near the water surface) during 7 days.

2.3. Experiment 1: survival and physiology of tubificid worms in the three sediment treatments

This experiment was carried out in microcosms consisting of 1-L glass beakers (internal diameter: 10.5 cm, height: 14 cm) filled with a 5-cm thick layer of sediment overlaid by 7 cm of synthetic water (96 mg L⁻¹ NaHCO₃, 39.4 mg L⁻¹ CaSO₄·2H₂O, 60 mg L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 4 mg L⁻¹ KCl, pH = 7.5; US EPA, 1991) saturated with dissolved oxygen by bubbling with air the upper part of the water column. A total of 18 beakers were used to test the three sediment treatments with 6 replicates per treatment (MIN, DJ, BOU). In each beaker, 240 individuals of *L. hoffmeisteri* were introduced at the start of the experiment (D0) to reach a density of 28,000 individuals per m². Experiments were conducted at 15 °C over 30 days, in the dark. Every 3–4 days, 1/3 of the volume of overlying water was renewed with synthetic water in each beaker. After 15 days of the experiment (D15), 9 beakers (3 replicated beakers per sediment treatment: MIN, DJ, BOU) were dismantled to collect all tubificid worms. The same procedure was done on day 30 (D30) with the 9 remaining beakers (3 replicated beakers per sediment treatment: MIN, DJ, BOU). All tubificid worms collected after 15 and 30 days were counted to determine the percentage of survival in the three sediment treatments. Afterwards, the surviving worms were separated into two groups (30 and 180 worms, respectively) for physiological analyses. In parallel, we collected tubificid worms at the start of the experiment 1 (D0 organisms) to determine their initial physiological state before sediment treatment. These D0 organisms were also separated in two groups for physiological analyses.

Worms from the first group (30 individuals from each beaker) were placed in filtered water from their original beakers (i.e. starved) during 48 h, to ensure that the digestive metabolism did not affect the

Table 1
Physical and chemical characteristics of the three sediments (mean ± SD, n = 3).

	Bourbe	Minerve	Django
Grain size distribution (%)			
Sand	40.5 ± 4.3	49.6 ± 6.5	57.8 ± 1.1
Silt	56.6 ± 4.1	48.7 ± 6.3	41.2 ± 1.1
Clay	2.9 ± 0.2	1.7 ± 0.2	1.0 ± 0.0
Organic matter composition (% sed. DM)			
Total Organic Carbon	1.91 ± 0.13	10.76 ± 0.23	14.35 ± 0.35
Total Nitrogen	0.156 ± 0.011	0.486 ± 0.009	0.828 ± 0.023
Pollutant contents			
Total hydrocarbons C10-C40 (mg kg ⁻¹ sed. DM)	70 ± 0.7	1468 ± 634	2208 ± 349
Heavy metals (mg kg ⁻¹ sed. DM)			
Cadmium	0.2 ± 0.1	1.1 ± 0.1	2.6 ± 0.2
Copper	14.7 ± 0.9	300.9 ± 2.6	305.6 ± 2.5
Lead	10.3 ± 0.4	117.2 ± 4.0	218.6 ± 0.5
Zinc	43.6 ± 0.7	1412.5 ± 8.6	2824.7 ± 5.7
Σ Heavy metals	68.7 ± 1.9	1831.6 ± 7.1	3351.4 ± 7.5
PAHs (µg kg ⁻¹ sed. DM)			
Acenaphthene	<10	<10	<10
Fluoranthene	82 ± 7	169 ± 59	191 ± 73
Benzo (b) fluoranthene	80 ± 4	226 ± 88	323 ± 114
Benzo (k) fluoranthene	23 ± 1	72 ± 26	107 ± 37
Benzo (a) pyrene	51 ± 1	122 ± 43	185 ± 50
Benzo (ghi) perylene	43 ± 4	277 ± 115	276 ± 91
Indeno (1,2,3 cd) pyrene	<10	<10	<10
Anthracene	<10	<10	<10
Acenaphthylene	<10	<10	<10
Chrysene	72 ± 1	195 ± 66	234 ± 75
Dibenzo (a,h) anthracene	<10	<10	<10
Fluorene	<10	<10	<10
Naphtalene	<10	<10	<10
Pyrene	79 ± 10	222 ± 111	210 ± 104
Phenanthrene	48 ± 1	141 ± 58	132 ± 62
2-methyl fluoranthene	<10	<10	<10
Benzo (a) anthracene	53 ± 3	72 ± 30	98 ± 36
Σ PAHs	530 ± 23	1494 ± 761	1753 ± 643

PAHs = polycyclic aromatic hydrocarbons, DM = dry mass.

metabolic rate (Plenet et al., 2000). Then, the oxygen consumption was measured on 3 batches of 10 worms (per beaker) using a high-precision respirometer (Micro-optode system, Unisense, Denmark), for each time (D0, D15, D30) and each sediment (MIN, DJ, BOU). The micro-respiration chambers were placed in a temperature-controlled water bath (Thermo, USA), at 15 °C. Measurements were corrected for microbial respiration in chambers using control measures performed without worms. After oxygen consumption measurements, batches of worms were freeze-dried and weighed (dry mass).

Animals from the second group (180 worms per beaker) were also placed in filtered water from their original beakers (i.e. starved) during 48 h, to avoid measuring the metabolic contents in the digestive bolus (sediment) in addition to metabolite contents in the whole animal (Renault et al., 2002). After digestion of the bolus, worms were frozen, dried and weighed (dry mass), then used for physiological measurements. For each beaker, 9 batches of 4 worms were used per measured physiological variables, i.e. glycogen, proteins, triglycerides, lipid peroxidation, and catalytic activity of superoxydase dismutase assays. Extraction and assays of glycogen, proteins and triglycerides were processed as described by Hervant et al. (1999) and Salin et al. (2010). Lipid peroxidation was measured as the amount of malondialdehyde (MDA) determined by the thiobarbituric acid reaction (TBARS), as described in Lawniczak et al. (2013). The activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD) was assayed according to Flohe and Otting (1984) and Lawniczak et al. (2013), and the results were given as U/mg dry mass, where one unit was defined as the quantity of enzyme that reduced 50% of oxidized cytochrome c. All assays were performed using a spectrophotometer (Aquamate, Thermo Scientific, U.S.A.). Enzymes, coenzymes and substrates were purchased from Boehringer (Mannheim, Germany) and Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

2.4. Experiment 2: burrowing behaviour of tubificid worms in the three sediment treatments

Experiments were carried out in bench-scale microcosms consisting in 120 mL plexiglas beakers specially designed to quantify biogenic structures (galleries) associated with sediment reworking by worms after a 30-days exposure. X-ray micro-tomography was used for quantitative 3D characterization of gallery networks: total volume, vertical distribution, average diameter and number of galleries per cm³ of sediment (see Salvo et al., 2003, for a comprehensive theoretical description of CT).

Twelve (4 beakers per sediment treatment: MIN, DJ, BOU) methacrylate beakers (diameter 4 cm) were filled with a 5-cm layer of sediments and 2 cm of synthetic water saturated with dissolved oxygen by bubbling with air. Thirty-five tubificid worms per beaker (density: 28,000 individuals per m²) were introduced in 9 beakers (3 replicates per treatment), the three remaining beakers acting as negative controls (no worms). Experiments were conducted at 15 °C in the dark.

After 30 days, all beakers were secured in a vertical position and scanned along their entire height using a laboratory tomograph (Phoenix V tome X, GE Sensing & Inspection Technology, U.S.A.) located at the MATEIS Laboratory (Institut National des Sciences Appliquées, Villeurbanne, France). Technical details and illustrations of this tomograph are given in Buffiere et al. (2010). Measurements were performed using an X-ray beam of 80 µA and 140 kV with an exposure time of 333 ms, each recorded image being an average of 3 images. The magnification was set to obtain a cubic voxel side dimension of 45 µm (extension of the term pixel in 3D imaging). The resulting reconstructed images exhibited a satisfactory contrast between the biogenic structures and the sediment matrix (Fig. 1A). For each sample, 1300 absorption radiographs were acquired over a 360 °C rotation for each scan and used to reconstruct a 3D digital image where each voxel represents the X-ray attenuation caused by variation in density at that point. This reconstruction was performed with Datos x2 software from Phoenix X-ray (GE Sensing & Inspection Technology, U.S.A.).

Image analyses were made using the ImageJ freeware (version 1.48) (Abràmoff et al., 2004). The brightness and contrast of each 3D image were automatically adjusted to the range of interest and the modified raw images (16 bits) were converted to display an 8-bit intensity image with a greyscale ranging from 0 (black) to 255 (white): dark colours correspond to low density volumes (low attenuation) and bright colours correspond to high density volumes (high attenuation). Images highlighted three grey levels that corresponded to the co-existence of two internal structures within the sediment matrix (light colours): water-filled porosities (grey) and air-filled porosities (black) (Fig. 1A, B). We applied the 3D median filter of ImageJ to remove noise prior to image segmentation through manual thresholding. This last step produced binary images, which enables the computation of the gallery network characteristics.

Three-dimensional quantitative analyses were performed on sub-volumes (stacks of 901 slices of 750 × 750 pixels) cropped in the centre of the scanned microcosms to avoid artefacts associated with edge effects and to remove the water column. As biogenic structures produced by fauna are filled with water (De Montety et al., 2003), we focused on the water-filled phase to examine the 3D characteristics of gallery networks. In contrast, the air-filled pores did not directly result from burrowing activities but from microbial activities (gas production), so they were not added to water-filled pores to characterize biogenic structures created by worms. The gallery networks were characterized using: (i) density variables (total volume and vertical distribution of the water filled phase associated with bioturbation) and (ii) geometrical variables (gallery number). The density of the water-filled phase was measured by calculating the proportion of voxels belonging to the water-filled phase. In a similar way, the vertical distribution of the water-filled porosity was determined using the ratio of voxels of interest on each slice along the vertical direction (Maire et al., 2007). Then, the density of water-filled pores induced by worm activities was obtained by the difference between treatments with worms and treatments

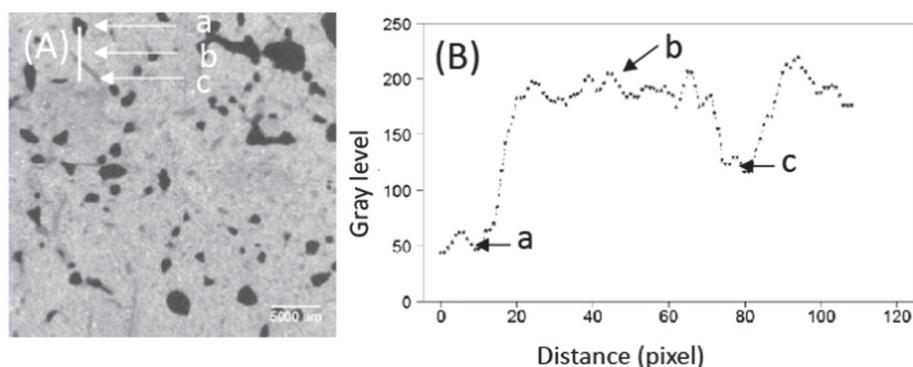


Fig. 1. Reconstructed two-dimensional transversal image (A) and tomographic intensities of a selected section (B): gas-phase (a), sediment matrix (b), water-phase (c).

without worms (negative controls). We used these negative controls to determine (i) the volume above which water-filled pores could be associated with biogenic structures and (ii) the sphericity below which water-filled pores could be associated with biogenic structures, pore sphericity being equal to 1 for a sphere and less for any other shape (Etiemble et al., 2014). These analyses showed that negative controls were characterized by small and spherical water-filled porosities. For example, the pore sphericity was always higher than 0.7 and the pore volume always less than 100 voxels (equivalent diameter of a spherical volume: 120 μm) in MIN and BOU sediments. Thus, the extraction of water-filled porosities characterized by large and non-spherical pores allowed us to perfectly identify and quantify biogenic structures produced by worms within sediments. A first algorithm was used to detect 3D clusters of connected voxels and to label each separate connected cluster. Then morphological parameters (volume, sphericity) of these labelled clusters were calculated (Maire et al., 2007). Two-dimensional images were also used to measure gallery diameters. These 2D analyses were manually performed on slices randomly selected within the 3D sub-volumes.

2.5. Experiment 3: nutrient and carbon fluxes induced by tubificid worms in the three sediment treatments

Experiments were carried out in microcosms identical to those used for the experiment 1. They consisted of 1-L glass beakers (internal diameter: 10.5 cm, height: 14 cm) filled with a 5 cm layer of sediment overlaid by 7 cm of synthetic water. A total of 18 beakers filled with sediments and synthetic water were used to obtain a factorial design coupling the presence of tubificid worms with the three sediment treatments. For each sediment treatment (MIN, DJ, BOU), six beakers were set up: 3 acted as negative controls (without worms) and 3 were inoculated with 240 tubificid worms (density: 28,000 individuals per m^2). During a 30-day experiment, the influence of worms on nutrient dynamics was evaluated by measuring the concentrations of N-NH_4^+ , N-NO_x ($\text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^-$) and dissolved organic carbon (DOC) in the water column of microcosms ($n = 18$ microcosms: 3 sediment treatments * 2 worm conditions * 3 replicates) every 3–4 days. Water samples (50 mL) from the beakers were filtered through Whatman GF/F filters (pore size: 0.7 μm ; Millipore, Billerica, MA, U.S.A.), then N-NH_4^+ and N-NO_x concentrations were measured following standard colorimetric methods (Grasshoff et al., 1983) by using an automatic analyzer (Easychem Plus, Systea, Anagni, Italy). For DOC measurements, water samples (50 mL) from the beakers were filtered through Whatman HAWP filters (pore size: 0.45 μm ; Millipore, Billerica, MA, U.S.A.) and acidified with 3 drops of HCl (35%). The DOC concentration in water samples was measured with a total carbon analyzer (multi N/C 3100, Analytik Jena, Jena, Germany) based on combustion at 900 °C after removal of dissolved inorganic C with HCl and CO_2 stripping under O_2 flow.

At the end of the experiment (D30), we measured the influences of tubificid worms on (i) the vertical profiles of dissolved oxygen in sediments and (ii) the CO_2 and CH_4 degassing rates from beakers. The vertical profiles of dissolved oxygen concentrations in sediments were determined in all beakers using an oxygen microsensors (tip diameter: 100 μm ; OXY100, Unisense, Denmark). The microsensors were inserted into the sediment column using a micromanipulator and data were collected every 0.5 mm from 0 to 6 mm below the water-sediment interface of each beaker. Three profiles were performed per microcosm to obtain a representative mean profile per system. For all beakers, CO_2 and CH_4 degassing rates were determined at the laboratory using a plexiglas chamber (14.5 cm internal diameter and 18 cm long) and a flow-through technique using an ultra-portable greenhouse gas analyzer (Los Gatos Research, Mountain View, U.S.A.). Each beaker was placed in the plexiglas chamber previously flushed with N_2 and sealed with a lid containing 2 ports connected to a peristaltic pump and to the greenhouse gas analyzer via gas-tight nylon tubing. The pump pulled ambient

air into the airspace of the chamber at a rate of 800 mL min^{-1} (equivalent to a turnover time of 3 min) and out through the gas analyzer. CO_2 and CH_4 degassing rates were calculated for each beaker as the increased concentrations during incubations of 30 min in the dark at 15 °C. Obtained degassing rates were considered as proxies of organic matter mineralization occurring in beakers, allowing a comparison of degradation processes among treatments.

2.6. Statistical analyses

The percentage of survival and measured physiological variables on tubificid worms were compared among sediment treatments and times using two-way analyses of variance (2-way ANOVA). If significance was detected, Tukey's HSD tests were performed to determine which sediment treatments and times differed. A two-way analysis of variance (2-way ANOVA) was performed to test the effect of depths and sediment treatments on the percentage of space occupied by burrow network. To determine the effect of depth, we considered 8 layers of 4.5 mm (H1 to H8) from the sediment surface to the bottom. A one-way analysis of variance (1-way ANOVA) was used to test the effect of sediments on the diameter of galleries. Tukey's HSD tests were performed to determine whether significant pairwise differences occurred between depths and/or sediments. For vertical profiles of dissolved oxygen performed at the end of the experiment, influences of sediment treatment, worm treatment and depths were tested using a 2-way repeated-measure ANOVA (2-way RM-ANOVA) using sediment treatment and worm treatment as main factors and depths as repeated factor. For N-NH_4^+ , N-NO_3^- and DOC concentrations in surface water, 2-way RM-ANOVA using sediment treatment (MIN, DJ, BOU) and worm treatment (with or without tubificid worms) as main factors and time (eight measurements during the course of the experiment were done after the start of the experiment (D0)) as repeated factor were run. If the treatment effect was significant, Tukey's HSD tests were performed to determine which treatments differed. The influences of sediment treatment and tubificid worms on CO_2 and CH_4 degassing rates (performed at the end of the experiment) were tested using a 2-way ANOVA. For all variables, the normality and the homoscedasticity of the residues set were verified using Shapiro-Wilk test and Levene's test, respectively. When necessary, data were log-transformed before statistical analysis to fit the assumptions of homoscedasticity and normality. All statistical analyses were performed using R (R™ Development Core Team). Significance for all statistical tests was accepted at $\alpha < 0.05$.

3. Results

3.1. Experiment 1: survival and physiology of tubificid worms in the three sediment treatments

3.1.1. Survival

We measured comparable survivals of tubificid worms (around 85% of initial density) after 15 and 30 days of exposure to the three sediments (Fig. 2A), except in DJ sediments where a significant decrease in survival with time was measured at D30 (65% of initial density, p -value < 0.001 for comparison between the numbers of living worms at D0 and D30).

3.1.2. Respirometry

We detected a significant influence of time on oxygen consumption (Fig. 2B, 2-way ANOVA, time effect, $p < 0.001$). After 15 days of exposure, the oxygen consumption of *L. hoffmeisteri* significantly increased in worms exposed to both stream and stormwater sediments (BOU: +450%; MIN: +359%; DJ: +596%; 2-way ANOVA, $p < 0.05$), then returned to the initial oxygen consumption (measured on day 0) after 30 days (Tukey's HSD tests, $p > 0.05$). We also detected a significant influence of sediment treatment (2-way ANOVA, sediment treatment,

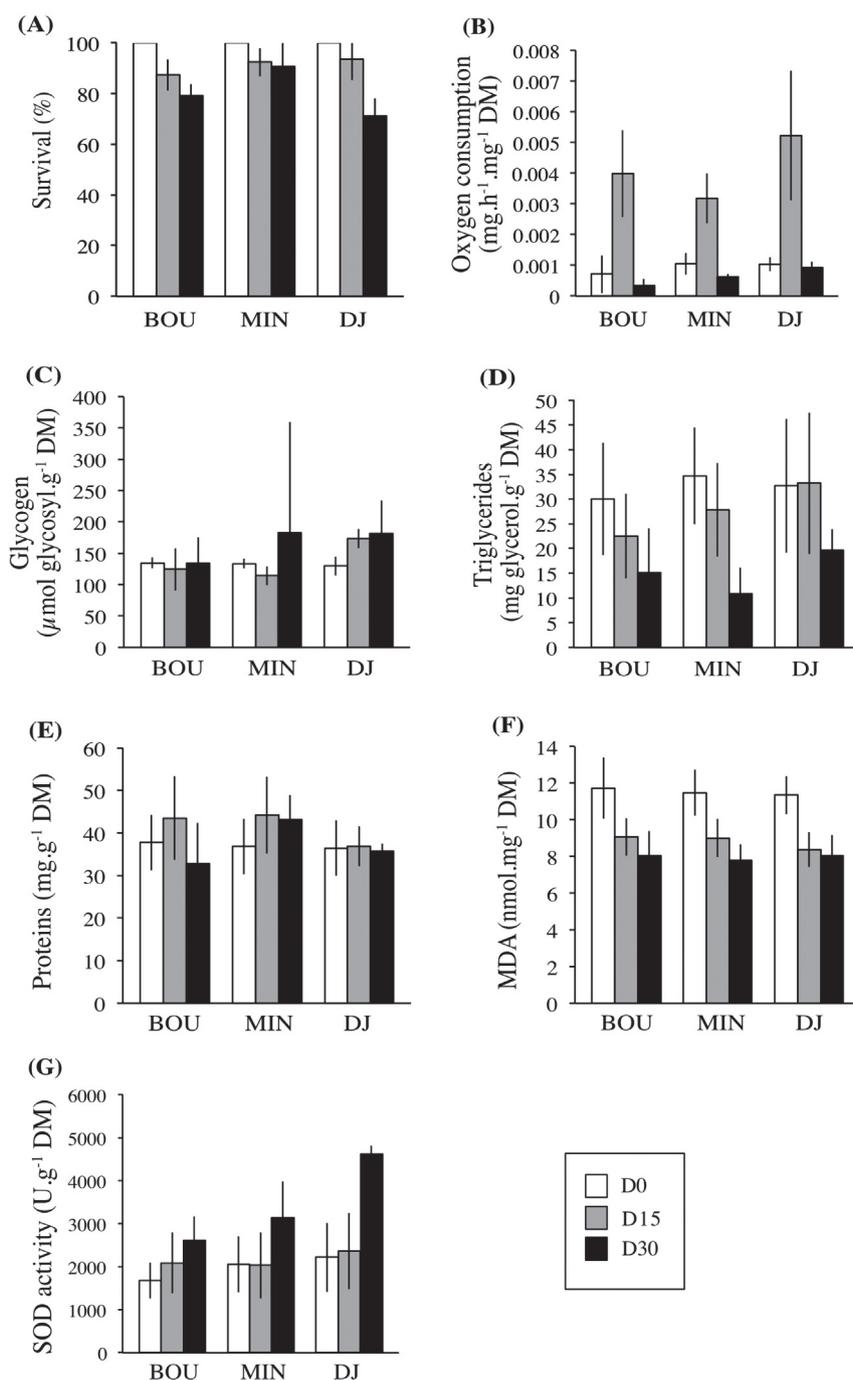


Fig. 2. Survival (A) and oxygen consumption (B), concentration of glycogen (C), triglycerides (D), proteins (E), MDA (F) and superoxide-dismutase activity (G) of *L. hoffmeisteri* after 0, 15 and 30 days exposed to each sediments. Data presented as means \pm S.D. (n = 9). BOU = Bourbe sediments, MIN = Minerve sediments and DJ = Django sediments.

$p < 0.01$) and “time * sediment” interaction (2-way ANOVA, “time * sediment” interaction, $p < 0.05$) on oxygen consumption due to the highest worm consumption measured on D15 in DJ sediments compared with the two other sediment treatments (Fig. 2B).

3.1.3. Energy body stores

No significant differences among sediment treatments and time were observed in the glycogen body concentration of worms (Fig. 2C, 2-way ANOVA, “time effect”, $p = 0.24$; “sediment treatment” effect, $p = 0.22$; “time \times sediment” interaction, $p = 0.49$). The concentration of triglycerides in *L. hoffmeisteri* significantly decreased with the exposure time to sediments (Fig. 2D, 2-way ANOVA, “time” effect, $p < 0.001$). This decrease in triglyceride body concentration was

especially observed after 30 days of exposure (when compared to organisms collected on D0: BOU: -51.8% ; MIN: -65.2% ; DJ: -37.2%). We did not detect a significant influence of sediment treatment (2-way ANOVA, $p = 0.19$) nor “time * sediment” interaction (2-way ANOVA, “time \times sediment” interaction, $p = 0.47$) on the concentration of triglycerides. No significant “time” effect and “sediment treatment” effect were detected on protein concentration in *L. hoffmeisteri* (Fig. 2E, 2-way ANOVA, “time” effect, $p = 0.35$; “sediment treatment” effect, $p = 0.09$; “time \times sediment” interaction, $p = 0.16$).

3.1.4. Oxidative stress

The TBARS level decreased significantly after 15 days of exposure, regardless of the sediment treatment (Fig. 2F, 2-way ANOVA, “time”

effect, $p < 2.10^{-16}$). Then, the TBARS level remained stable between 15 and 30 days of exposure. We detected no significant influence of sediment treatment (2-way ANOVA, “sediment treatment” effect, $p = 0.92$) and “time * sediment” interaction (2-way ANOVA, “time × sediment” interaction, $p = 0.32$) on the TBARS concentrations.

The catalytic activity of the enzyme SOD (Fig. 2G) significantly increased in worms after 30 days of exposure to sediments (2-way ANOVA, time effect, $p = 6.99.10^{-7}$). We also measured a significant influence of sediment treatment on SOD activity (2-way ANOVA, sediment treatment, $p < 0.01$). This sediment effect was probably associated with the high SOD activity measured in DJ sediments on D30 (+77 and +47% of SOD activity measured on D30 in DJ sediments compared with BOU and MIN sediments, respectively). This influence of sediment treatment was not dependent on time (2-way ANOVA, factors interaction, $p > 0.05$).

3.2. Experiment 2: burrowing behaviour of tubificid worms in the three sediment treatments

Water-filled porosity associated with burrowing activities was significantly influenced by sediment treatments (Table 2, 1-way ANOVA, $p < 0.05$) and was significantly higher in MIN sediments than in stream sediments (BOU) (Tukey's HSD, $p < 0.05$). Despite similar water-filled porosities associated with worm activities in DJ and BOU sediments (Tukey's HSD, $p = 0.309$), the number of pores associated with galleries was significantly lower in BOU sediments than in DJ sediments (Tukey's HSD, $p < 0.05$). More generally, our results highlighted significantly lower densities of galleries in the stream sediments (BOU) than in the two stormwater sediments (MIN, DJ). Despite these differences in gallery densities in BOU and DJ sediments, the lack of significant difference in water-filled porosity between these two sediments was due to 1.5 times lower mean gallery diameter in DJ sediments ($472 \pm 180 \mu\text{m}$) than in BOU sediments ($687 \pm 206 \mu\text{m}$). In comparison, mean gallery diameter measured in MIN sediments ($731 \pm 214 \mu\text{m}$) was comparable to those measured in BOU sediments.

The vertical distribution of burrowing activity exhibited similar trends with depth in all sediments, regardless of the sediment treatment (Fig. 3, 2-way ANOVA, “depth” effect, $p < 0.001$). Vertical profiles of water-filled porosity can be described as follows: (i) the water-filled porosity significantly decreased to a depth of 3 mm and 9 mm in stream and stormwater sediments, respectively, (ii) reached a peak at depths ranging from 9 to 18 mm depending on treatments, and (iii) progressively decreased up to a depth of 40 mm. Despite these similar patterns, the burrowing activities varied significantly among sediment treatments (2-way ANOVA, “sediment treatment” effect, $p < 0.001$) and were significantly higher in stormwater sediments than in stream sediments (Tukey's HSD tests, $p < 0.001$). Differences were more pronounced in the layers “0–5 mm” and “15–20 mm” (Fig. 3), where mean porosity values were around 1.5 times higher in the two stormwater sediments (DJ, MIN) than in stream sediments (BOU). For instance, in the layer “15–20 mm”, mean sediment porosity was $7.7 \pm 0.7\%$ in stormwater sediments while it averaged only $5.3 \pm$

Table 2

Density and geometric characteristics of water-filled porosity of the three sediments (3D analyses: mean \pm SD and $n = 3$, 2D analyses: mean \pm SD and $n = 15$).

Samples	3D analyses		2D analyses
	Water-filled porosity associated with bioturbation (%)	Number of biogenic structures ($\text{Nb} \cdot \text{cm}^{-3}$)	Diameter of biogenic structures (μm)
Bourbe	5.03 ± 0.51^a	12 ± 1.6^a	687 ± 206^a
Minerve	7.02 ± 0.16^b	23 ± 4.6^b	731 ± 214^a
Django	5.59 ± 0.51^a	23 ± 0.8^b	472 ± 180^a

Water-filled porosities are expressed in % of the total volume of a sample. Letters (a,b) indicate significant differences in pairwise comparisons between sediment treatments (Tukey's HSD tests; $p < 0.05$).

0.14% in stream sediments. Consequently, a significant interaction between depth and sediment treatments was detected in our experiment (2-way ANOVA, interaction “depth * sediment treatment”, $p < 0.001$).

3.3. Experiment 3: nutrient and carbon fluxes induced by tubificid worms in the three sediment treatments

3.3.1. Vertical profiles of dissolved O_2 in microcosms

For the three sediment treatments, sharp decreases in dissolved O_2 were observed with depth in sediments (Fig. 4, 2-way RM-ANOVA, “depth” effect, $p < 0.001$). Indeed, all sediments were anoxic ($[\text{O}_2] < 0.1 \text{ mg L}^{-1}$) below a depth of 3.5 mm. We did not detect a significant influence of tubificid worms on vertical profiles of dissolved O_2 although worms tended to decrease dissolved O_2 concentrations between 0.5 and 2.0 mm in DJ sediments (Fig. 4).

3.3.2. Dissolved inorganic nitrogen and dissolved organic carbon in the water column of microcosms

NH_4^+ and NO_x (nitrate + nitrite) concentrations measured in the water column of microcosms showed comparable variations with time for the 3 tested sediments (Fig. 5, 2-way RM-ANOVA, “time” effect, $p < 0.001$ for N-NH_4^+ and N-NO_x concentrations). Concentrations peaked during the first 10 days of the experiment, decreased on day 13 and increased again between day 20 and the end of the experiment (D30). Mean concentrations of NH_4^+ and NO_x in the water column were significantly influenced by the sediment treatment (2-way RM-ANOVA, “sediment treatment” effect, $p < 0.001$ for N-NH_4^+ and N-NO_x concentrations) due to higher concentrations of NH_4^+ in microcosms with DJ sediments and lower concentrations of NO_x in microcosms with MIN sediments (Tukey's HSD tests, $p < 0.05$). The occurrence of tubificid worms significantly increased NH_4^+ and NO_x concentrations in microcosms for all sediment treatments (Fig. 5, 2-way RM-ANOVA, worm effect, $p < 0.001$, Tukey's HSD tests, $p < 0.05$). For example, the highest ammonium concentrations measured in the water column were between 2- and 3-fold higher in microcosms containing worms compared with defaunated microcosms for each sediment treatment (Fig. 5). It is worth noting that the effects of tubificid worms on NH_4^+ and NO_x concentrations in the water column were not dependent on sediment treatment (2-way RM-ANOVA, interaction “sediment treatment * worms”, $p = 0.52$ and $p = 0.15$ for N-NH_4^+ and N-NO_x concentrations, respectively).

Concentrations of dissolved organic carbon (DOC) globally increased in the water column during the course of the experiment for the three sediment treatments (Fig. 5, 2-way RM-ANOVA, “time” effect, $p < 0.001$). DOC concentrations were significantly influenced by sediment treatments (2-way RM-ANOVA, “sediment treatment” effect, $p < 0.001$) with highest DOC concentrations measured in microcosms containing sediments from MIN basin followed by DJ sediments and then BOU sediments (Tukey's HSD tests for pair-wise comparisons of DOC concentrations between sediment treatments, $p < 0.01$ for all comparisons). As detected for inorganic dissolved nitrogen compounds, DOC concentrations in the water column were significantly increased by the activity of tubificid worms (Fig. 5, 2-way RM-ANOVA, worm effect, $p < 0.001$). However, the influence of worms depended on the sediment treatment (2-way RM-ANOVA, interaction “sediment treatment * worms”, $p < 0.05$), the effect of worms being less marked in microcosms with DJ sediments than in microcosms with other sediments (Fig. 5).

3.3.3. CO_2 and CH_4 degassing rates

The degassing rates of CO_2 from microcosms were comparable among tested sediments (Fig. 6, 2-way ANOVA, “sediment treatment” effect, $p = 0.91$). Tubificid worms increased by 2 or 3 this degassing rate (2-way ANOVA, “worm” effect, $p < 0.001$) without significant difference among sediment treatments (2-way ANOVA, interaction “sediment treatment * worm”, $p = 0.61$). Degassing rates of CH_4 were

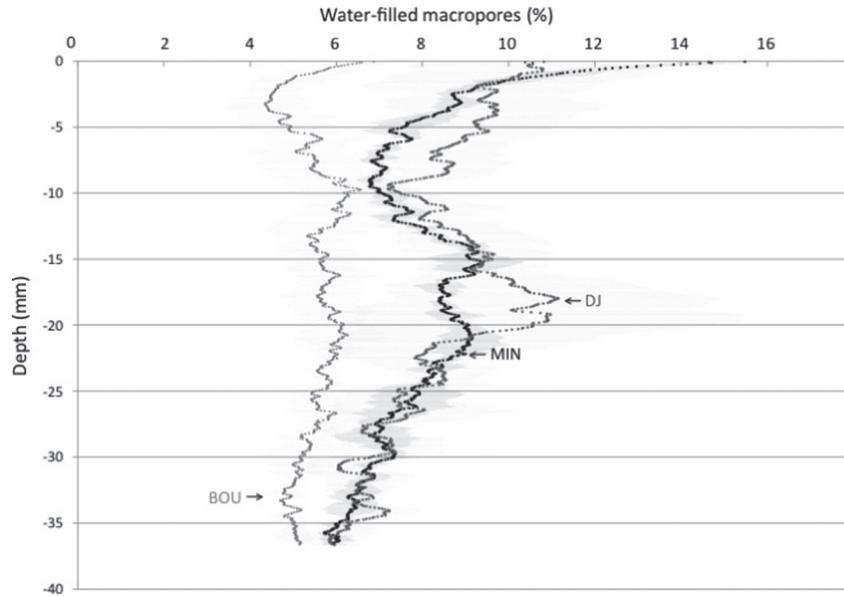


Fig 3. Vertical distribution of the burrowing activity. Data presented as means ± S.D. (n = 3). Error bars are indicated in dotted lines. BOU = Bourbe sediments, MIN = Minerve sediments and DJ = Django sediments.

more than 100-fold lower than those of CO₂ (Fig. 6) but the same pattern was observed with a significant and positive effect of worms (2-way ANOVA, worm effect, p < 0.05) and a low influence of sediment types (2-way ANOVA, “sediment treatment” effect, p > 0.05 and interaction “sediment treatment * worm”, p = 0.91) on CH₄ degassing rates.

4. Discussion

Contrary to our prediction, we detected a significantly lower percentage of survival of tubificid worms in DJ sediments than in the two other sediment treatments (MIN, BOU). This low survival of *L. hoffmeisteri* in DJ could be associated with a higher pollution in heavy metals, the PAHs concentrations being comparable in both stormwater sediments, MIN and DJ (Table 1). Indeed, it has been already shown that heavy metals could have major influences on the survival but also on the physiology of *L. hoffmeisteri* (Martinez-Tabche et al., 2000, 2001; Rodriguez et al., 2006; Oztetik et al., 2013). Therefore, the fact that concentrations of Cd, Pb and Zn were at least twice higher in DJ sediments than in MIN sediments (and more than 10-fold higher than in stream sediments, BOU) could explain the lower survival of *L. hoffmeisteri* in DJ sediments. This result contrasted with the works of Nogaro and Mermillod-Blondin (2009) showing high pollution tolerance of tubificid worms in DJ sediments (> 90% of survival for similar experiments of around one month) whereas pollutant concentrations were overall

higher than in the present study (see Table 1 in Nogaro and Mermillod-Blondin, 2009). Nevertheless, this discrepancy is not surprising because this previous study focused on the tubificid worm *Tubifex tubifex*, a worm species that is more tolerant than *L. hoffmeisteri* to heavy metals (Chapman, 1982; Meller et al., 1998).

The lower survival of tubificid worms in DJ sediments compared with other sediments was associated with a large increase in superoxide dismutase (SOD) activity, one of the main antioxidant enzymes (Winston, 1991; Storey, 1996). As the SOD catalytic activity is classically stimulated in response to an overshoot in ROS (reactive oxygen species) production (Winston and Di Giulio, 1991), the increase in SOD activity observed in the present study after exposure to DJ sediments was probably linked to an oxidative stress due to heavy metal pollution (Livingstone, 2001). This enzymatic response to heavy metals has been previously observed in the polychaete worm *Nereis diversicolor* (Sun and Zhou, 2008). Nevertheless, the action of the SOD was efficient enough to cause a reduction of oxidative damages (measured in this study through a biomarker specific to lipid peroxidation, the TBARS level: Fig. 2F) in worms incubated in stormwater sediments, despite the presence of high concentrations of heavy metals. This experiment clearly demonstrated that *L. hoffmeisteri* cope efficiently with oxidative stress due to heavy metal pollution. In contrast with these significant influences of sediment treatments on worm survival and SOD activity, triglyceride and TBARS worm body contents showed comparable declines

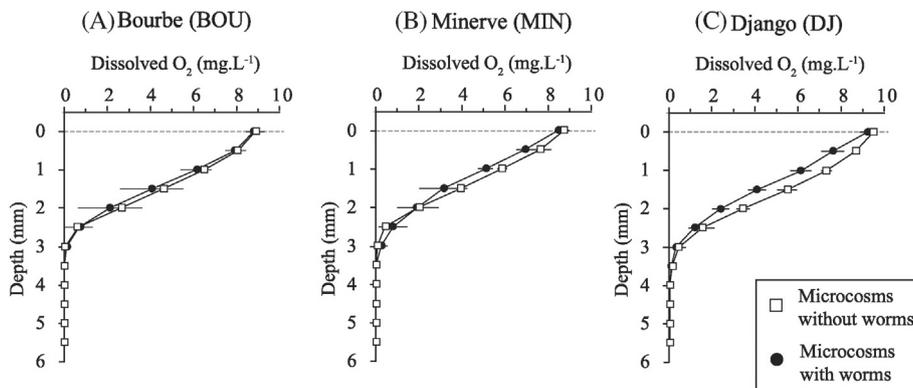


Fig 4. Vertical profiles of dissolved oxygen in the three sediments with or without *L. hoffmeisteri*. Data presented as means ± S.D. (n = 3).

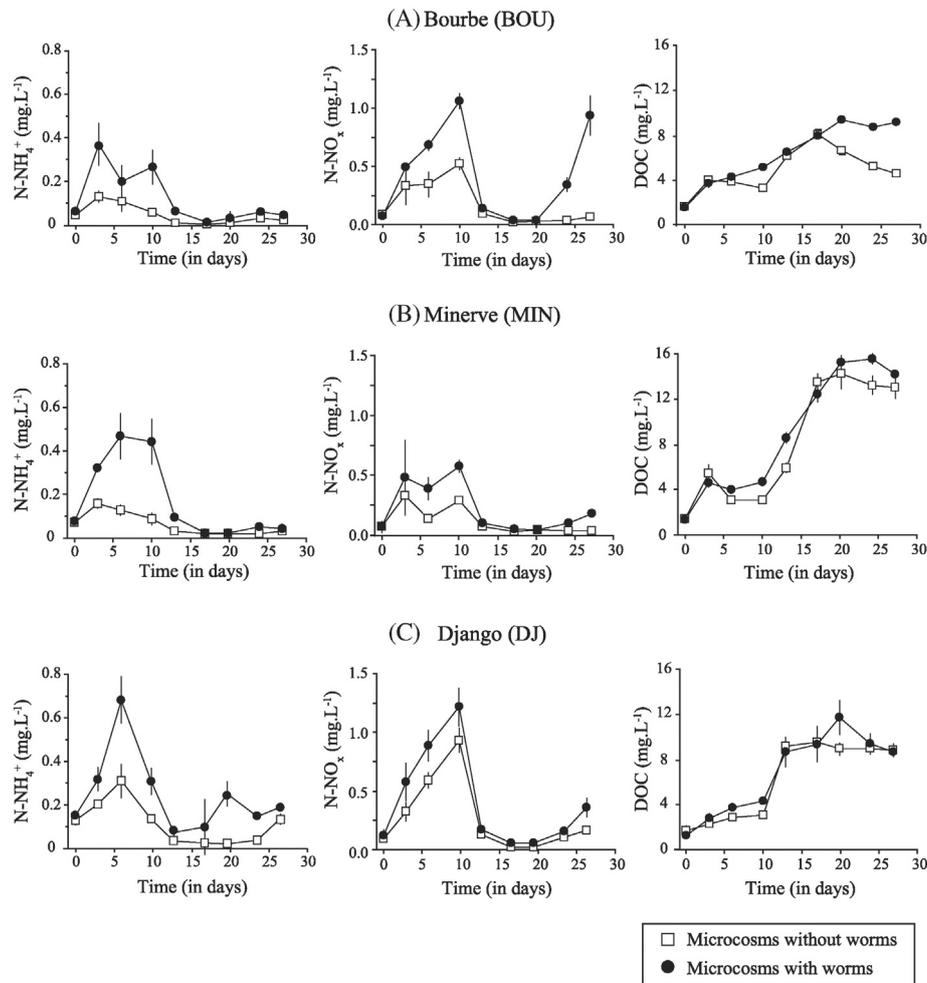


Fig 5. Concentrations of nutrients (ammonium, nitrate + nitrite, dissolved organic carbon) measured in the water column for the three sediments with or without *L. hoffmeisteri*. Data presented as means \pm S.D. (n = 3).

with time in the three sediments. These decreases were probably linked to a stress induced by worm transfer from breeding to experimental conditions (in microcosms). It is consistent with the sharp increase in oxygen consumption measured on day 15 for worms in all sediment treatments. Nevertheless, this overconsumption of dissolved oxygen was transient, as the metabolic rate returned to its initial value at day 30 in all sediment treatments, indicating a 15-day acclimation period for tubificid worms. This transient increase in metabolic rate was associated with an increased use of energy body stores, probably to fuel the costly mechanisms involved in this 15-day acclimation period. This increase in energy demand could impact fitness and/or burrowing activity (and therefore the functioning of stormwater infiltration

basins), but our study did not estimate the cost of such mechanisms (Hochachka and Somero, 2002). It is worth to note that this transient overshoot was the highest in the most polluted sediments (DJ), suggesting a higher stress in these sediments compared with the two others (MIN, BOU). Surprisingly, although glycogen is recognized as the most easily metabolisable energy store (Koop et al., 2011), only triglyceride content decreased in worms during the course of the experiment, in all sediment treatments. This use of triglyceride reserves was potentially linked to the strong energy demand of worms during the first 15 days of experiment, as this molecule produces a greater amount of energy than glycogen and proteins (Hochachka and Somero, 2002). These results also demonstrated that *L. hoffmeisteri* preferentially utilizes lipids in

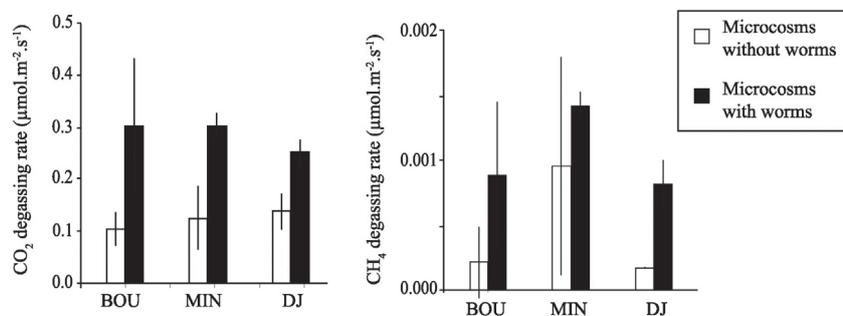


Fig 6. CO₂ and CH₄ degassing rates from microcosms for the three sediments with or without *L. hoffmeisteri*. Data presented as means \pm S.D. (n = 3). BOU = Bourbe sediments, MIN = Minerve sediments and DJ = Django sediments.

order to save both glycogen (one of the main fuels metabolized during oxygen deficiency in annelids: Schöttler and Bennet, 1991) and proteins (and therefore muscular mass). Hence, this species can successfully withstand the permanent hypoxic stress often associated with life in stormwater sediments (Nogaro and Mermillod-Blondin, 2009, and the present study) and does not suffer muscular loss, allowing the maintenance of a feeding activity (tubificid worms burrow and consume sediments at the same time).

CT-scan analyses showed a major difference in the geometrical characteristics of gallery networks between stormwater (MIN, DJ) and stream sediments (BOU). Indeed, burrowed stormwater sediments were characterized by more numerous galleries than burrowed stream ones, suggesting higher burrowing activities in stormwater sediments. Differences in burrowing activities between sediment treatments were not linked to the proportion of fine particles ingestible by worms as the three sediments exhibited substantial percentage of silt-clay particles (>40%). Therefore, we can conclude that the increased burrowing activities in the two stormwater sediments compared with stream sediments did not result from the physical characteristics of sediments but more likely from their chemical characteristics in terms of inorganic and organic compounds. In contrast, the gallery morphology (thickness) might have been influenced by differences in percentage of sand particles among sediments. As the thinnest galleries were observed in sediments characterized by the highest percentage of sand (DJ sediments), we supposed an effect of the sediment texture on the thickness but also the stability of galleries. Indeed, Rogaar (1980) reported significant changes in the shape and stability of galleries produced by tubificid worms depending on the percentages of sand and clay in sediments.

According to the study of Michaud et al. (2010) with the polychaete *Nephtys incisa*, burrowing activities of tubificid worms measured with CT-scan could have been due to a positive effect of sedimentary organic matter content on the burrowing activity. Indeed, the density of gallery networks was higher in both stormwater sediments - characterized by high organic matter contents (between 11 and 14% of total organic carbon, Table 1) - than in stream sediments (displaying lower contents of organic matter: 2% of total organic carbon, Table 1). Differences in burrowing behaviour between stormwater (MIN, DJ) and stream (BOU) sediments might have been also due to an escape behaviour of worms in the presence of pollutants. The increased number of galleries in stormwater sediments compared to stream sediments supported this second explanation as, in presence of pollutants, worms might have explored a greater volume of sediment in search of unpolluted areas. This was consistent with observations made on gallery systems of earthworms in polluted soils: in presence of pesticides, Capowiez et al. (2003) demonstrated that earthworms avoided reusing their galleries.

The vertical distribution of galleries between stormwater and stream sediments indicated that this “potential escape behaviour” of *L. hoffmeisteri* was especially observed at depths ranging from 15 to 20 mm because the volumes of galleries within this layer were higher in DJ and MIN sediments (1.5 times higher) than in stream sediments (BOU). These results are in accordance with several studies (Keilty et al., 1988; Ciutat et al., 2005) showing a preferential feeding zone of *L. hoffmeisteri* in the upper layer of sediments in presence of organic or inorganic pollutants. Lagauzère et al. (2009c) also reported a similar feeding zone with *T. tubifex* and suggested that increased burrowing activity in the feeding zone with pollutants reflected the obligation of worms to meet their energetic requirements by selectively feeding on less contaminated particles. We can suppose the same effect of pollutants in our experiment, i.e., an increase in the foraging activity of *L. hoffmeisteri* in its preferential feeding zone.

Despite significant differences in survival, physiological responses and burrowing activities of worms among sediments, we did not detect a significant influence of sediment treatment on the role of tubificid worms in biogeochemical processes. Indeed, the presence of tubificid worms produced a comparable stimulation of CO₂ degassing rates associated with the mineralization of organic carbon in all three sediment

treatments. We also observed the same results for inorganic nitrogen dynamics in the water column. Regardless of the sediment treatment, the presence of tubificid worms increased the mean concentrations of NH₄⁺ and NO_x (NO₂⁻ + NO₃⁻), these compounds being associated with the mineralization of organic matter (e.g., Mermillod-Blondin et al., 2008). DOC release to water column (associated with organic matter mineralization in Hunting et al., 2013) was the unique process which seemed influenced by the sediment * worms interaction, this process being less stimulated by tubificid worms in DJ sediments than in the two other sediments. However, this DOC dynamics were not linked with organic matter mineralization highlighted by CO₂ degassing rates. Overall, a comparable stimulation of organic matter mineralization by tubificid worms was measured in the three sediment treatments.

For nitrogen compounds, we observed a classic remineralization sequence in our experimental systems (with or without worms) with an initial rapid increase of NH₄⁺ concentration resulting from decomposition of the ambient organic matter present in sediments (Bowen et al., 2014). This increase in NH₄⁺ concentration was followed by a large increase in NO_x concentrations, linked to the nitrification of NH₄⁺. Following the first peaks in inorganic nitrogen, a NO_x decrease was observed and was probably associated with denitrification and/or assimilation by micro-organisms (Nogaro and Burgin, 2014). The second peak of NH₄⁺ and NO₃⁻ concentrations observed after 20 days in the experiment was more surprising because it did not follow a classical biogeochemical sequence. We can suppose that this second peak was associated with the production and ebullition of CH₄ bubbles produced in sediments during the experiment that were detected through CT-scan analyses (gas-filled porosity, Fig. 1). Indeed, ebullition of CH₄ has been recognized as a significant driver of water fluxes and associated dissolved solutes from porewater to water column (Klein, 2006; Cheng et al., 2014). However, further experiments are needed to verify this potential link between CH₄ ebullition and solute (dissolved nutrients in our case) fluxes under our experimental conditions.

Despite the multiple processes explaining the dynamics of organic matter and nutrients in our microcosms, the effects of tubificid worms on organic matter processing and N cycling were comparable in the three sediments. In contrast with the study of Ciutat and Boudou (2003), the influences of tubificid worms on water-sediment exchanges were not driven by gallery network density. This result suggests that bioirrigation (i.e., induction of water fluxes between pore water and surface water by worms: Mermillod-Blondin and Lemoine, 2010) was more important than gallery production itself for C and N cycling at the water-sediment interface of our microcosms. It is also worth noting that the higher mortality of tubificid worms measured in DJ stormwater sediments did not result in a lower effect of worms on nutrient cycling in this sediment. It appears that 150 tubificid worms (65% of living worms in DJ microcosms) were able to create a same effect as 200 worms (85% of living worms in MIN microcosms) in our experimental conditions, indicating a threshold effect of worm density on water-sediment exchanges. Such a threshold effect has been also observed by Nogaro et al. (2006) who demonstrated that a two-fold decrease of tubificid worm density did not affect their influence on both sediment reworking and sediment permeability.

5. Conclusion

To the best of our knowledge, this study was the first to combine lethal, physiological, behavioural and biogeochemical measurements to determine how a complex urban pollution could impair the ecological functioning of benthic ecosystems. It clearly showed that pollutants contained in stormwater sediments could affect the survival, the response to oxidative stress and the burrowing behaviour of the key bioturbator *L. hoffmeisteri*. Although a significant worm mortality in DJ sediments, tubificid worms seemed to exhibit the ability to withstand the oxidative stress linked to heavy-metal pollution. They also

preferentially used high-energy lipid stores (triglycerides) in order to save both muscular mass (proteins) and the main fermentable molecule (glycogen). These responses might be considered as an efficient strategy in a harsh environment associating permanent hypoxia and high levels of pollution. In contrast, other measured physiological biomarkers were not significantly affected by the exposure to polluted sediments, probably due to a too short time exposure.

Burrowing activity of tubificid worms appeared to be a promising behavioural biomarker of sediment toxicity. Indeed, our results showed that urban pollution significantly affected the burrowing activities of *L. hoffmeisteri* after a 30-day exposure with an enhanced total number of galleries associated with increased organic matter and pollutant contents. We also observed that pollutants modified the spatial distribution of galleries: worms concentrated their activities in their feeding zone. Therefore, the present study confirmed that X-ray micro-tomography is an adequate/efficient technique for accurate and non-invasive three-dimensional investigations of biogenic structures formed by small-size bioturbators, offering new opportunities for further investigations of burrowing activities in the fields of ecology and ecotoxicology. Nevertheless, both lethal and sublethal effects (physiological and behavioural) of urban pollutants on *L. hoffmeisteri* did not affect their influences on biogeochemical processes (organic matter processing and N cycling) at the water-sediment interface. We suppose that an experimental period of 1 month was probably too short for measuring all potential effects of pollutants on ecosystem functions through changes in animal activities. Therefore, further experiments need to examine how the long-term effects of pollutants on physiology and behaviour of worms modulate biogeochemical processes in stormwater sediments.

Acknowledgements

This study was conducted and funded within the framework of the experimental observatory for urban hydrology (OTHU, <http://www.graie.org/othu/>). We are indebted to M. Jacquy, J. Voisin, F. Vallier and A. Vienney for their most dedicated support with the field and laboratory work. We also wish to thank the referees for their constructive comments.

References

- Abbramoff, M.D., Magalhães, P.J., Ram, S.J., 2004. Image processing with ImageJ. *Biophoton. Int.* 11, 36–42.
- Arnold, C.L., Gibbons, C.J., 1996. Impervious surface coverage: the emergence of a key environmental indicator. *J. Am. Plan. Assoc.* 62, 243–258.
- Barraud, S., Gibert, J., Winiarski, T., Bertrand-Krajewski, J.L., 2002. Implementation of a monitoring system to measure impact of stormwater runoff infiltration. *Water Sci. Technol.* 45, 203–210.
- Boucher, G., Clavier, J., Garrigue, C., 1994. Oxygen and carbon dioxide fluxes at the water-sediment interface of a tropical lagoon. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 107, 85–193.
- Bouchet, V.M.P., Sauriau, P.G., Debenay, J.P., Mermillod-Blondin, F., Schmidt, S., Amiard, J.C., Dupas, B., 2009. Influence of the mode of macrofauna-mediated bioturbation on the vertical distribution of living benthic foraminifera: first insight from axial tomodesitometry. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 371, 20–33.
- Bowen, J.L., Babbitt, A.R., Kearns, P.J., Ward, B.B., 2014. Connecting the dots: linking nitrogen cycle gene expression to nitrogen fluxes in marine sediment mesocosms. *Front. Microbiol.* 5, 1–10.
- Buffiere, J.Y., Maire, E., Adrien, J., Masse, J.P., Boller, E., 2010. In situ experiments with X-ray tomography: an attractive tool for experimental mechanics. *Exp. Mech.* 50, 289–305.
- Capowiez, Y., Rault, M., Mazzia, C., Belzunces, L., 2003. Earthworm behaviour as a biomarker – a case study using imidacloprid. *Pedobiologia* 47, 542–547.
- Chapman, P.M., 1982. Relative tolerance of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. *Aquat. Toxicol.* 2, 47–61.
- Cheng, C.H., Huettel, M., Wildman, R.A., 2014. Ebullition-enhanced solute transport in coarse-grained sediments. *Limnol. Oceanogr.* 59, 1733–1748.
- 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., 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.
- Covich, A.P., Austen, M.C., Bärlocher, F., Chauvet, E., Cardinale, B.J., Biles, C.L., Inchausti, P., Dangles, O., Solan, M., Gessner, M.O., Stutzner, B., Moss, B., 2004. The role of biodiversity in the functioning of freshwater and marine benthic ecosystems. *Bioscience* 54, 767–765.
- Datry, T., Malard, F., Vitry, L., Hervant, F., Gibert, J., 2003a. Solute dynamics in the bed sediments of a stormwater infiltration basin. *J. Hydrol.* 273, 217–233.
- Datry, T., Hervant, F., Malard, F., Vitry, L., Gibert, J., 2003b. Dynamics and adaptive responses of invertebrates to suboxia in contaminated sediments of a stormwater infiltration basin. *Arch. Hydrobiol.* 156, 339–359.
- De Montety, L., Long, B., Desrosiers, G., Cremer, J.F., Locat, J., Stora, G., 2003. The use of computerized tomography in the study of sediments: influence of physical, chemical and biological parameters on the measurement of tomographic intensities. *Can. J. Earth Sci.* 40, 937–948.
- Dufour, S.C., Desrosiers, G., Long, B., Lajeunesse, P., Gagnoud, M., Labrie, J., 2005. A new method for three-dimensional visualization and quantification of biogenic structures in aquatic sediments using axial tomodesitometry. *Limnol. Oceanogr. Methods* 3, 372–380.
- Etiemble, A., Adrien, J., Maire, E., Idrissi, H., Reyter, D., Roué, L., 2014. 3D morphological analysis of copper foams as current collectors for Li-ion batteries by means of X-ray tomography. *Mater. Sci. Eng. B-Adv.* 187, 1–83.
- Flohe, L., Otting, F., 1984. Superoxide-dismutase assays. *Methods Enzymol.* 105, 93–104.
- Gette-Bouvarot, M., Mermillod-Blondin, F., Angullo-Jaramillo, R., Delolme, C., Lemoine, D., Lassabatere, L., Volatier, L., 2014. Coupling hydraulic and biological measurements highlights the key influence of algal biofilm on infiltration basin performance. *Ecology* 7, 950–964.
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K., 1983. *Methods of Seawater Analysis*. second ed. Verlag Chemie, Berlin.
- Grebel, J.E., Mohanty, S.K., Torkelson, A.A., Boehm, A.B., Higgins, C.P., Maxwell, R.M., Nelson, K.L., Sedlak, D.L., 2013. Engineered infiltration systems for urban stormwater reclamation. *Environ. Eng. Sci.* 30, 437–454.
- Hervant, F., Mathieu, J., Barre, H., 1999. Comparative study on the metabolic responses of subterranean and surface-dwelling amphipods to long-term starvation and subsequent refeeding. *J. Exp. Biol.* 202, 3587–3595.
- Hochachka, P.W., Somero, G.N., 2002. *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Hunt, W.F., Traver, R.G., Davis, A.P., Emerson, C.H., Collins, K.A., Stagge, J.H., 2010. Low impact development practices: designing to infiltrate in urban environments. In: Chang, N.B. (Ed.), *Effects of urbanization on groundwater: an engineering case-based approach for sustainable development*. American Society of Civil Engineers (ASCE), Reston, VA, pp. 308–343.
- Hunting, E.R., Mulder, C., Kraak, M.H.S., Breure, A.M., Admiraal, W., 2013. Effects of copper on invertebrate-sediment interactions. *Environ. Pollut.* 180, 131–135.
- Keilty, T.J., White, D.S., Landrum, P.F., 1988. Sublethal responses to endrin in sediment by *Limnodrilus hoffmeisteri* (Tubificidae), and in mixed-culture with *Stylodrilus heringianus* (Lumbriculidae). *Aquat. Toxicol.* 13, 227–249.
- Klein, S., 2006. Sediment pore water exchange and solute release during ebullition. *Mar. Chem.* 102, 60–71.
- Koop, J.H.E., Winkelmann, C., Becker, J., Hellmann, C., Ortmann, C., 2011. Physiological indicators of fitness in benthic invertebrates: a useful measure for ecological health assessment and experimental ecology. *Aquat. Ecol.* 45, 547–559.
- Krantzberg, G., 1985. The influence of bioturbation on physical, chemical and biological parameters in aquatic environments: a review. *Environ. Pollut.* 39, 99–122.
- Ku, H.F.H., Hagelin, N.W., Buxton, H.T., 1992. Effects of urban storm-runoff control on ground-water recharge in Nassau Country, New York. *Ground Water* 30, 507–514.
- Lagauzère, S., Boyer, P., Stora, G., Bonzom, J.M., 2009a. Effects of uranium-contaminated sediments on the bioturbation activity of *Chironomus riparius* larvae (Insecta, Diptera) and *Tubifex tubifex* worms (Annelida, Tubificidae). *Chemosphere* 76, 324–334.
- Lagauzère, S., Pischedda, L., Cuny, P., Gilbert, F., Stora, G., Bonzom, J.M., 2009b. Influence of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) and *Tubifex tubifex* (Annelida, Oligochaeta) on oxygen uptake by sediments. Consequences of uranium contamination. *Environ. Pollut.* 157, 1234–1242.
- Lagauzère, S., Terrail, R., Bonzom, J.M., 2009c. Ecotoxicity of uranium to *Tubifex tubifex* worms (Annelida, Clitellata, Tubificidae) exposed to contaminated sediment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 527–537.
- Landrum, P.F., Leppanen, M., Robinson, S.D., Gossiaux, D.C., Burton, G.A., Greenberg, M., Kukkonen, J.V., Eadie, B.J., Lansing, M.B., 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.
- Lawniczak, M., Romestaing, C., Roussel, D., Maazouzi, C., Renault, D., Hervant, F., 2013. Preventive antioxidant responses to extreme oxygen level fluctuation in a subterranean crustacean. *Comp. Biochem. Phys. A* 165, 299–303.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656–666.
- Lotufo, G.R., Fleeger, J.W., 1996. Toxicity of sediment-associated pyrene and phenanthrene to *Limnodrilus hoffmeisteri* (Oligochaeta: Tubificidae). *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1508–1516.
- Maire, E., Colombo, P., Adrien, J., Babout, L., Bassetto, L., 2007. Characterization of the morphology of cellular ceramics by 3D image processing of X-ray tomography. *J. Eur. Ceram. Soc.* 27, 1973–1981.
- Marmonier, P., Maazouzi, C., Foulquier, A., Navel, S., François, C., Hervant, F., Mermillod-Blondin, F., Vienney, A., Barraud, S., Togola, A., Piscart, C., 2013. The use of crustaceans as sentinel organisms to evaluate groundwater ecological quality. *Ecol. Eng.* 57, 118–132.
- Marsalek, J., Chocat, B., 2002. International report: stormwater management. *Water Sci. Technol.* 46, 1–17.
- Marsalek, J., Marsalek, P., 1997. Characteristics of sediments from a stormwater management pond. *Water Sci. Technol.* 36, 117–122.
- Martinez-Tabche, L., Cabrera, I.G., Olivan, L.G., Martinez, M.G., Faz, C.G., 2000. Toxic effects of zinc from trout farm sediments on ATP, protein, and hemoglobin concentrations of *Limnodrilus hoffmeisteri*. *Toxicol. Environ. Heal. A* 59, 575–583.

- Martinez-Tabche, L., Ortega, M.D.L.A.G., Mora, B.R., Faz, C.G., Lopez, E.L., Martinez, M.G., 2001. Hemoglobin concentration and acetylcholinesterase activity of oligochaetes in relation to lead concentration in spiked sediments from Ignacio Ramirez reservoir. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 76–83.
- Matisoff, G., Wang, X.S., McCall, P.L., 1999. Biological redistribution of lake sediments by tubificid oligochaetes: *Branchiura sowerbyi* and *Limnodrilus hoffmeisteri/Tubifex tubifex*. *J. Great Lakes Res.* 25, 205–219.
- Mazik, K., Curtis, N., Fagan, M.J., Taft, S., Elliott, M., 2008. Accurate quantification of the influence of benthic macro- and meio-fauna on the geometric properties of estuarine muds by micro computer tomography. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 354, 192–201.
- McCall, P.L., Tevesz, M.J.S., 1982. The effects of benthos on physical properties of freshwater sediments. In: McCall, P.L., Tevesz, M.J.S. (Eds.), *Animal-sediment Relations. The Biogenic Alteration of Sediments*. Plenum Press, New York, pp. 105–176.
- 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. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 39, 10–20.
- Mermillod-Blondin, F., Lemoine, D.G., 2010. Ecosystem engineering by tubificid worms stimulates macrophyte growth in poorly oxygenated wetland sediments. *Funct. Ecol.* 24, 444–453.
- Mermillod-Blondin, F., Gérino, M., Degrange, V., Lensi, R., Chassé, J.L., Rard, M., Châtelliers, M.C.D., 2001. Testing the functional redundancy of *Limnodrilus* and *Tubifex* (*Oligochaeta*, *Tubificidae*) in hyporheic sediments: an experimental study in microcosms. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 58, 1747–1759.
- Mermillod-Blondin, F., Nogaro, G., Vallier, F., Gibert, J., 2008. Laboratory study highlights the key influences of stormwater sediment thickness and bioturbation by tubificid worms on dynamics of nutrients and pollutants in stormwater retention systems. *Chemosphere* 72, 213–223.
- Mermillod-Blondin, F., Foulquier, A., Gilbert, F., Navel, S., Montuelle, B., Bellvert, F., Comte, G., Grossi, V., Fourel, F., Lecuyer, C., Simon, L., 2013. Benzo(a)pyrene inhibits the role of the bioturbator *Tubifex tubifex* in river sediment biogeochemistry. *Sci. Total Environ.* 450–451, 230–241.
- Michaud, E., Desrosiers, G., Long, B., de Montety, L., Crémer, J.F., Pelletier, E., Locat, J., Gilbert, F., Stora, G., 2003. Use of axial tomography to follow temporal changes of benthic communities in an unstable sedimentary environment (Baie des Ha! Ha!, Saguenay Fjord). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 285–286, 265–282.
- Michaud, E., Aller, R.C., Stora, G., 2010. Sedimentary organic matter distributions, burrowing activity, and biogeochemical cycling: natural patterns and experimental artifacts. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 90, 21–34.
- Millward, R.N., Fleeger, J.W., Reible, D.D., Keteles, K.A., Cunningham, B.P., Zhang, L., 2001. Pyrene bioaccumulation, effects of pyrene exposure on particle-size selection, and fecal pyrene content in the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri* (*Tubificidae*, *Oligochaeta*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1359–1366.
- Mulrow, S., Landrum, P.F., Robbins, J.A., 2002. Biological mixing responses to sublethal concentrations of DDT in sediments by *Heteromastus filiformis* using a ¹³⁷Cs marker layer technique. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 239, 181–191.
- Nahmani, J., Capowiez, Y., Lavelle, P., 2005. Effects of metal pollution on soil macroinvertebrate burrow systems. *Biol. Fertil. Soils* 42, 31–39.
- Niemczynowicz, J., 1999. Urban hydrology and water management – present and future challenges. *Urban Water J.* 1, 1–14.
- Nogaro, G., Burgin, A.J., 2014. Influence of bioturbation on denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) in freshwater sediments. *Biogeochemistry* 120, 279–294.
- Nogaro, G., Mermillod-Blondin, F., 2009. Stormwater sediment and bioturbation influences on hydraulic functioning, biogeochemical processes, and pollutant dynamics in laboratory infiltration systems. *Environ. Sci. Technol.* 43, 3632–3638.
- Nogaro, G., Steinman, A.D., 2014. Influence of ecosystem engineers on ecosystem processes is mediated by lake sediment properties. *Oikos* 123, 500–512.
- Nogaro, G., Mermillod-Blondin, F., Francois-Carcaillet, F., Gaudet, J.P., Lafont, M., Gibert, J., 2006. Invertebrate bioturbation can reduce the clogging of sediment: an experimental study using infiltration sediment columns. *Freshw. Biol.* 51, 1458–1473.
- Nogaro, G., Mermillod-Blondin, F., Montuelle, B., Boisson, J.C., 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.
- Nogaro, G., Mermillod-Blondin, F., Montuelle, B., Boisson, J.C., Gibert, J., 2008. Chironomid larvae stimulate biogeochemical and microbial processes in a riverbed covered with fine sediment. *Aquat. Sci.* 70, 156–168.
- Oztetik, E., Cicek, A., Arslan, N., 2013. Early antioxidative defence responses in the aquatic worms (*Limnodrilus sp.*) in Porsuk Creek in Eskisehir (Turkey). *Toxicol. Ind. Health* 29, 541–554.
- Pitt, R., Clark, S., Field, R., 1999. Groundwater contamination potential from stormwater infiltration practices. *Urban Water J.* 1, 217–236.
- Plenet, S., Hervant, F., Joly, P., 2000. Ecology of the hybridogenetic *Rana esculenta* complex: differential oxygen requirements of tadpoles. *Evol. Ecol.* 14, 13–23.
- Renault, D., Hervant, F., Vernon, P., 2002. Comparative study of the metabolic responses during food shortage and subsequent recovery at different temperatures in the adult lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Physiol. Entomol.* 27, 291–301.
- 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.
- Rogaar, H., 1980. The morphology of burrows structures made by tubificids. *Hydrobiologia* 71, 107–124.
- Rosenberg, R., Davey, E., Gunnarsson, J., Norling, K., Frank, M., 2007. Application of computer-aided tomography to visualize and quantify biogenic structures in marine sediments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 331 (23–24), 23–34.
- Salin, K., Voituron, Y., Mourin, J., Hervant, F., 2010. Cave colonization without fasting capacities: an example with the fish *Astyanax fasciatus mexicanus*. *Comp. Biochem. Phys. A* 156, 451–457.
- Salvo, L., Cloetens, P., Maire, E., Zabler, S., Blandin, J.J., Buffiere, J.Y., Ludwig, W., Boller, E., Bellet, D., Jossier, C., 2003. X-ray micro-tomography an attractive characterisation technique in materials science. *Nucl. Instrum. Meth. B* 200, 273–286.
- Schöttler, U., Bennet, E.M., 1991. Annelids. In: Bryant, C. (Ed.), *Metazoan Life Without Oxygen*. Chapman and Hall, London, pp. 165–185.
- Shang, J., Liao, Q., Zhang, L., Fan, C., 2014. The influence of different benthic fauna on inorganic nitrogen flux and denitrification in a large shallow hyper-eutrophic lake. *Fundam. Appl. Limnol.* 184, 101–108.
- Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 1715–1733.
- Sun, F., Zhou, Q., 2008. Oxidative stress biomarkers of the polychaete *Nereis diversicolor* exposed to cadmium and petroleum hydrocarbons. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70, 106–114.
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division, 2007. *World Population Prospects: The 2006 Revision, Highlights*. Working Paper No. ESA/P/WP.202. United Nations, New York.
- US EPA, 1991. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 4th ed. Report EPA/600/4-90/2, Environmental Protection Agency, Washington.
- Winston, G.W., 1991. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol. C* 100, 173–176.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137–161.

3. CONCLUSION DU CHAPITRE 2

Les principaux résultats obtenus après 1 mois d'incubation de *L. hoffmeisteri* à des sédiments pollués issus de bassins d'infiltration et contenant un cocktail de contaminants urbains sont :

- Le temps de survie de *L. hoffmeisteri* diminue lorsqu'il est exposé aux sédiments les plus concentrés en métaux lourds, mais ce ver présente tout de même une importante résistance à une pollution d'origine anthropique.
- La physiologie de *L. hoffmeisteri* est potentiellement impactée par la présence de polluants urbains : ces vers tubificidés doivent faire face à un stress oxydant, puisque nous avons observé une augmentation de l'activité de la SOD dont le rôle est de limiter le stress oxydant (ce qui est ici associé à une diminution du niveau de peroxydation lipidique).
- La mise en place de systèmes de défense antioxydants, comme la SOD, requiert une grande quantité d'énergie, presque exclusivement fournie par l'utilisation des triglycérides (molécule à haut rendement énergétique) épargnant ainsi les réserves de molécules fermentescibles (glycogène) et la masse musculaire (protéines).
- Le changement observé dans l'activité de bioturbation chez des vers tubificidés exposés aux sédiments des bassins d'infiltration peut être associé à un comportement d'évitement de la pollution.
- Une zone préférentielle de nourrissage (car présentant forte densité de galeries) est observée entre 15 et 20 mm de profondeur, ce qui peut s'expliquer par la recherche de particules moins contaminées lors de l'ingestion du sédiment.
- Les modifications physiologiques et comportementales observées chez *L. hoffmeisteri* ne semblent pas avoir d'effet sur le déroulement des processus biogéochimiques au sein du sédiment (cycle de l'azote et recyclage de la matière organique), qui restent toutefois stimulés par la présence des vers.

Chapitre III

Mise en évidence de
marqueurs métaboliques
d'une exposition de longue
durée à des polluants urbains
chez *L. hoffmeisteri*

1. INTRODUCTION

Le troisième chapitre de ma thèse traitera de l'impact à long terme d'un cocktail de polluants urbains sur :

- (1) des marqueurs physiologiques complémentaires de ceux déjà mis en évidence dans le chapitre 2,
- (2) sur les voies métaboliques productrices d'énergie.

Ces expérimentations ont à nouveau été réalisées sur l'oligochète *Limnodrilus hoffmeisteri*, et les polluants proviennent de sédiments collectés dans les mêmes bassins d'infiltration que ceux présentés dans le chapitre 2.

De nombreuses études se sont penchées sur les effets des polluants organiques et inorganiques sur les organismes vivants, cherchant à développer des biomarqueurs de pollution complémentaires des analyses physico-chimiques (Vasseur and Cossu-Leguille, 2003 ; Maestre et al., 2009 ; Boldina-Cosqueric et al, 2010 ; Garric et al., 2010). Or, la grande majorité de ces études s'est focalisée sur les effets d'un seul ou d'un faible nombre de contaminants, et ce en utilisant des périodes d'exposition relativement courtes. Ces travaux sont donc peu représentatifs de la réalité environnementale. En effet, au sein de nombreux écosystèmes anthropisés, les organismes sont soumis à de nombreux polluants (métaux, lourds, pesticides, HAPs...), dont les effets combinés/synergiques sont souvent difficiles à appréhender (Norwood et al., 2003). Plus précisément, les effets des contaminants peuvent varier en fonction de leur association avec d'autres polluants (effet cocktail), des conditions du milieu (principalement température, biodisponibilité et pH), et enfin le site d'action habituel d'un polluant peut changer lorsque celui-ci se retrouve en association au sein d'un cocktail de polluants (Gauthier et al., 2014). Enfin, les durées d'exposition peuvent être importantes (Van Brummelen, 1996 ; Jorge et al. 2013).

Pour pallier une partie de ce déficit de connaissances, nous avons donc cherché à évaluer les effets à long terme (6 mois) d'un cocktail de polluants urbains sur la physiologie de *Limnodrilus hoffmeisteri*, pour ainsi mettre en évidence des biomarqueurs métaboliques parfois complètement novateurs. Nous avons vu précédemment (chapitre 1) que les bassins d'infiltration étaient le réceptacle de nombreux contaminants urbains lessivés par les eaux de ruissellement. Les sédiments constitutifs de ces ouvrages correspondent donc à de très bons modèles dans le cadre d'une étude de ce type.

Dans ce chapitre, articulé autour de deux articles scientifiques en cours de publication, nous présenterons dans un premier temps les effets à long terme d'un cocktail de polluants urbains sur des paramètres/biomarqueurs physiologiques et biochimiques chez *L. hoffmeisteri* (article 1). Dans un second temps (article 2), nous évaluerons l'impact de ce même cocktail de contaminants sur les deux voies de production d'énergie (métabolismes aérobie et anaérobie), toujours chez *L. hoffmeisteri*.

Dans l'article 1, nous avons émis les hypothèses suivantes :

- (1) la présence de polluants urbains induit un stress oxydant conduisant à l'augmentation du taux de peroxydation lipidique (mesuré par la teneur corporelle en TBARS/MDA), proxy du stress oxydant sur les membranes biologiques,
- (2) les réserves énergétiques (glycogène, triglycérides et protéines) sont utilisées pour fournir l'énergie nécessaire à la mise en place et au fonctionnement de mécanismes de défenses contre le stress oxydant et/ou de réparation des dégâts oxydatifs,
- (3) l'activité de la SOD (une des principales enzymes antioxydantes) augmente avec la présence de polluants,
- (4) l'activité de la cytochrome c oxydase, enzyme clé du métabolisme aérobie, peut diminuer suite à l'exposition aux sédiments pollués.

Pour répondre à ces 4 questions, nous avons donc réalisé des expériences en laboratoire durant lesquelles le ver tubificidé *L. hoffmeisteri* a été exposé pendant 6 mois à des sédiments pollués provenant de différents bassins d'infiltration ou à un sédiment peu pollué issu d'une lône du Rhône. Tout au long de cette expérience (prélèvements après 0, 1, 3 et 6 mois d'exposition aux sédiments), nous avons mesuré les différents paramètres biochimiques, à l'exception de la cytochrome c oxydase dont l'activité n'a été mesurée qu'au terme des 6 mois d'exposition.

Le second article (§3) a pour objectif de déterminer les effets à long terme d'un cocktail de pollution urbaine sur les voies métaboliques productrices d'énergie : le métabolisme aérobie et les voies anaérobies. Nous avons donc cherché à vérifier les deux sous-hypothèses suivantes : (1) le métabolisme aérobie, et plus particulièrement la chaîne respiratoire mitochondriale, peut être impacté par certains polluants ce qui va obligatoirement induire une diminution de la production d'ATP, et (2) *L. hoffmeisteri* va chercher à compenser ce déficit énergétique (lié à une dépression des voies aérobies) en utilisant partiellement ou totalement les voies métaboliques anaérobies. Ainsi, nous devrions observer l'accumulation de certains

produits terminaux du métabolisme anaérobie (lactate, alanine, succinate et/ou propionate : Schöttler and Bennet, 1991 ; Datry et al., 2003) chez les vers incubés dans les sédiments pollués, ces 4 voies anaérobies ayant des rendements différents en termes de molécules d'ATP produites (Sokolova et al. 2012). Pour valider ces deux sous-hypothèses, nous avons réalisé cette expérience en laboratoire, en exposant *L. hoffmeisteri* à long terme (jusqu'à 6 mois) à des sédiments pollués provenant des bassins d'infiltration et à un sédiment relativement peu pollué issu d'une lône du Rhône. A la fin de cette exposition, plusieurs paramètres mitochondriaux, incluant la production d'ATP ont été mesurés (afin de vérifier l'existence d'une dépression des voies aérobies). De plus, les principaux produits terminaux du métabolisme anaérobie (lactate, alanine, succinate et propionate) ont été mesurés au cours de ces 6 mois d'exposition (0, 1, 3 et 6 mois), afin de vérifier l'entrée en fonction des voies anaérobies.

2. Metabolic parameters as biomarkers exposure to urban pollutants on an ecosystem engineer, the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri*.

Pigneret M., Roussel D., Mermillod-Blondin F., Volatier L. & Hervant F.

Article en preparation pour soumission dans Biomarkers courant 2018

Keywords: biomarkers, stormwater basin, mitochondria

I. INTRODUCTION

One of the major landscape modifications associated with urbanization is an important increase in impervious surface coverage (Arnold and Gibbons, 1996), altering the infiltration of runoff water during rainfall events, therefore reducing the groundwater recharge (Marsalek and Chocat, 2002). Consequently, stormwater management structures (mainly infiltration basins) were built to restore the water cycle in urban and periurban zones (Ku et al., 1992; Niemczynowicz et al., 1999, Hunt et al, 2010). But runoff water also drained numerous pollutants (mainly heavy metals, hydrocarbons, individual polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), and more rarely pesticides and pharmaceutical compounds), often associated with suspended sediments (Pitt et al., 1999; Grebel et al., 2013). These urban contaminants are accumulated in the sediment compartment of infiltration basins and dramatically alter its quality (Marsalek and Marsalek, 1997; Datry et al., 2003). The pollutant characteristics of stormwater sediments could strongly disturb the biological functioning of water-sediment interfaces that constitute key compartments for organic matter processing and nutrient cycling (e.g., Covich et al., 2004; Pigneret et al., 2016).

Despite high pollutant concentrations, stormwater sediments are often colonised by invertebrate taxa adapted to life in polluted environments such as tubificid worms or chironomid larvae (Datry et al., 2003; Nogaro et al., 2008). Among them, the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri* and *Tubifex tubifex* are well known to act as efficient ecosystem engineers through their bioturbation activities: they build and ventilate galleries/burrows in sediments, stimulating microbial activities, nutrient fluxes and organic matter processing at the water-sediment interface (Krantzberg, 1985; Mermillod-Blondin and Lemoine, 2010; Nogaro and Steinman, 2014). Nevertheless, the ability of these worms to influence ecological processes in sediments can be decreased by the presence of pollutants (Lagauzère et al.,

2009). Indeed, a few recent studies demonstrated that sublethal concentrations of pollutants significantly affect the functional role of ecosystem engineers in sediments (Mermillod-Blondin et al., 2013; Pigneret et al., 2016).

Environmental monitoring of stormwater infiltration basins is mainly based on the measurement of chemicals that are perceived to be relatively easy and inexpensive to analyze. These data are useful in predicting potential biological effects, but their major limitation is that toxicological parameters are practically always determined for individual substances, neglecting potential interactions between different contaminants (mainly metal-PAH mixtures in stormwater basins) in the environment (Gautier et al., 2014). In the case of infiltration basins in which chemical mixtures are present (including compounds that are difficult and/or expensive to analyze), it remains necessary to develop strategies that allow us to assess if the functioning of these structures is altered or not. According to Lam and Gray (2003), McKenzy et al. (2007) and Marmonier et al. (2013), physiological biomarkers are effective in revealing overall toxicity of complex mixtures, and therefore could help to fill this gap.

High levels of pollutants affect the physiology of organisms inhabiting infiltration basins (Marmonier et al., 2013). In such a harsh environment, aquatic invertebrates respond by setting up defence mechanisms (Pigneret et al., 2016). Therefore, we hypothesized that the ability to resist a toxicant may be costly in terms of energy, involving an increase in the use of energy reserves (glycogen, triglycerides and/or proteins), to fuel these responses. Moreover, some studies have shown that numerous xenobiotics enhance oxidative stress in aquatic organisms and lead to the implementation of specific defence mechanisms, mainly an increasing activity of antioxidant enzymes (review in Winston, 1991; Livingstone, 2001).

Thus, the impact of urban pollutants on a selection of physiological traits considered as pertinent metabolic biomarkers (the levels of energy body stores: Marmonier et al., 2013) was investigated in a model organism incubated in stormwater and stream sediments. In addition, we tried to determine whether a mixture of urban pollutants generate oxidative damages (through the level of lipid peroxidation, a major biomarker of oxidative injuries: Livingstone, 2001) and/or induce an antioxidant response (through the measure of the catalytic activities of the major antioxidant enzymes: Winston, 1991) in organisms incubated in heavily polluted or low-polluted sediments. In the present study, the annelid oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri* was chosen as a biological model. As a burrowing species, this common freshwater worm lives in close contact with sediments and pollutants (Ciutat et al., 2006). *L. hoffmeisteri* can,

therefore, be used as a pollution indicator with its facility to accumulate contaminants (for review, see Klerks and Bartholomew, 1991; Millward et al., 2001; Li et al., 2014).

The purpose of this study was to evaluate some defence and damage biomarkers of urban contaminants in the key bioturbator *L. hoffmeisteri* during a long-term incubation in multi-polluted sediments from stormwater infiltration basins. The experiments were conducted during 6 months under laboratory conditions. Tubificid worms were exposed, in microcosms, to 3 highly polluted sediments (from three different infiltration basins) or to one slightly polluted sediment (from a stream, considered as a control). According to Datry et al. (2003) and Pigneret et al. (2016) who did not detect mortality in tubificid worms incubated 25 and 30 days (respectively) in the same sediments, we did not expect that urban pollution of tested sediments would influence the survival of tubificid worms, but rather that contaminants would exert a significant influence on their physiology. To this end, we evaluated whether urban contaminants generated oxidative stress by assaying a common biomarker of lipid peroxidation (through the body level of malondialdehyde/MDA) and the catalytic activities of the main antioxidant enzymes (superoxide dismutase/SOD, catalase/CAT and glutathione peroxidase/GPx). We also studied if a mixture of urban pollutants impacted the energy both energy stores (through the body levels of glycogen, triglycerides and proteins) and/or the aerobic metabolism (through the activity of a key mitochondrial enzyme, the cytochrome oxidase/COX) in worms exposed 0, 1, 3 or 6 months to 3 polluted sediments (from 3 infiltration basins) or to one control sediments (from a river).

II. MATERIAL & METHODS

a. Model organism

The worm *Limnodrilus hoffmeisteri* (Annelida, Tubificidae) was selected because it is tolerant to pollutants (Lotufo and Fleeger 1996; Millward et al. 2001) and is recognized as a key bioturbator in freshwater sediments (Mc Call and Tevesz 1982; Mermillod-Blondin et al. 2001; Shang et al. 2014). Indeed, this species is a common sediment feeder that creates biogenic structures in sediments and egests faecal pellets at the water-sediment interface (Matisoff et al. 1999; Shang et al. 2014). Specimens of *L. hoffmeisteri* (mean individual dry mass: 350-400 µg) used in our experiments were bought from a professional breeder (GREBIL, Arry, France). Before the experimentation, they were acclimated to sedimentary habitats in 100-L plastic tanks containing fine unpolluted sandy silt sediment from the river

Ain (France) and normoxic water (50L, bubbled with air near the water surface) during 7 days.

b. Sediment characteristics

Four sediments (3 stormwater sediments and 1 stream sediment) were selected to test the influence of contrasted pollutant concentrations on the survival and physiology of tubificid worms *L. hoffmeisteri*. The control sediment (called BAL), collected from a blind channel of the Rhône river (Balan, France), was characterized by a low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and heavy metals (Table 1). In comparison, higher concentrations of total hydrocarbons (x 23 in comparison with BAL), heavy metals (x 27) and PAHs (x 12) characterized the three stormwater sediments (Table 1) collected in three infiltration basins (Django-Reinhardt, IUT and Minerve basins) located in industrialized and urbanized areas of the “Metropole de Lyon” conurbation (France; see Marmonier et al. (2013) for details concerning the infiltration basins). The concentration of PAHs (mainly pyrene) is about 4.5 times higher in IUT basin (called IUT) than in both Django-Reinhardt (called DJ) and Minerve (called MIN) basins, due to different urban area catchments (Marmonier et al., 2013). These three sediments were sieved (< 1 mm) and homogenized in the laboratory before use in microcosms. Physico-chemical characteristics of basin infiltration sediments were described in Pigneret et al. (2016).

c. Experimental design

The experimental design was realized as described in Pigneret et al. (2016) with four sediments (BAL, MIN, IUT and DJ) and four times of exposure to pollutants: one month (M1), three months (M3), six months (M6) and the initial control (M0). At the end of each time (1, 3 and 6 months), microcosms were dismantled and *L. hoffmeisteri* were recovered. Control worms (M0) were sampled directly in acclimation tanks.

The worms were exposed to the polluted sediments in tanks (which contained the different sediments BAL, MIN, IUT and DJ) with the same density (the density of 26,000 worms/m² corresponded to this found in field). Four tanks have been set up for each sediment (5 cm thick-layer sediment overlaid by 5 cm of synthetic water (96 mg.L⁻¹ NaHCO₃, 39.4 mg.L⁻¹ CaSO₄ + 2H₂O, 60 mg.L⁻¹ MgSO₄ + 7H₂O, 4 mg.L⁻¹ KCl, pH= 7.5: US EPA 1991) and, one tank of each condition was dismantled at each time point (M0, M1, M3 and M6). To measure physiological biomarkers, tubificid worms were collected at the start of the experiment (Control/M0 organisms: for determining their initial physiological state) and after

1, 3 and 6 months of exposition to polluted sediments. Then, they were placed in filtered water from their original tanks during 48h, to avoid measuring the metabolic contents in the digestive bolus (sediment) in addition to metabolite contents in the whole animal (Plénet et al., 2000; Renault et al., 2002; Pigneret et al. 2016). After this period, worms were separated into two groups. Organisms from the first group were freeze-dried and weighed (dry mass) prior to body stores, lipid peroxidation and antioxidant enzymes assays. The activity of cytochrome c oxidase was only measure after 6 months (M6) of exposure, for each sediment. The worms used for this measurement were weighed (fresh mass) before the assay of the cytochrome c oxidase (COX) activity.

d. Physiological indicators

i. *Energy body stores*

Body stores were measured on 9 batches of 6 worms for each time (M0, M1, M3, M6) and each sediment (BAL, MIN, IUT and DJ), for each energy body store (glycogen, triglycerides and proteins). Extraction and assays of glycogen, triglycerides and proteins were processed as described by Hervant et al. (1999) and Salin et al. (2010).

ii. *Oxidative stress and anti-oxidant defences*

Lipid peroxidation was measured as the amount of malondialdehyde (MDA) determined by the thiobarbituric acid reaction (TBARS), as described by Lawniczak et al. (2013). Each measure was realized in 9 replicates of 5 worms at M0, M1, M3, and M6 for each sediment (BAL, MIN, IUT, and DJ).

The total superoxide dismutase activity (Cu/ZnSOD and MnSOD) was assayed using a SOD assay kit (Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France). The activity of catalase (CAT) was assayed as described in Aebi (1984), using the decomposition of H₂O₂. GPx activity was determined according to Tappel (1978) by measuring the disappearance of NADPH at 340 nm with a reaction medium containing 0.25 mM glutathione (GSH), 0.12 mM NADPH, 1 U/mL glutathione reductase, and 10 mM sodium cyanide.

All assays were performed using a spectrophotometer (Aquamate, Thermoscientific, U.S.A.). Enzymes, co-enzymes and substrates were purchased from Boehringer (Mannheim, Germany) and Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

iii. *Cytochrome c oxidase*

The activity of the cytochrome c oxidase (COX) was measured in freshly isolated mitochondria from 500-pooled *L. hoffmeisteri* incubated 6 months in sediments, 4 independent mitochondrial isolation were done for each sediment (BAL, MIN, IUT and DJ).

The activity of cytochrome c oxidase was assayed by measuring respiration rate at 15°C, using a Clark electrode (Rank Brother Ltd, Cambridge, UK) placed in a closed and stirred glass chamber filled with air-saturated respiratory reaction medium (120 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 0.3% bovine serum albumin (w/v), 10 µM antimycin, 1 µg/mL oligomycin, 2 µM FCCP and 3 mM HEPES, pH 7.4). Then, 50 µmol.l⁻¹ N,N,N,N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) and 5 mmol.l⁻¹ ascorbate were added to start the reaction and the maximal respiration rate associated to the cytochrome c oxidase activity were recorded (Salin et al., 2012; Roussel et al., 2015).

iv. Isolation of mitochondria

Pools of 500 worms were homogenized with a Potter-Elvehjem homogenizer in 10 mL of ice-cold mitochondrial isolation buffer (600 mM mannitol, 20 mM Tris-maleate, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, pH 7.3 at 4°C) supplemented with 2% w/v bovine serum albumin. Worm homogenate was diluted 1/2 with 10 mL isolation buffer without bovine serum albumin, then centrifuged at 200 g for 3 min (4°C) to remove major debris. The resulting supernatant was centrifuged at 9000g (10 min, 4°C) to pellet mitochondria. The pellet was suspended in 800 µL of isolation buffer, then 20 mL of isolation buffer was added and the suspension centrifuged at 900g (10 min, 4°C). The resulting supernatant was filtered through cheesecloth and centrifuged at 9000g (10 min, 4°C). The pellet was suspended and gently homogenized in 100 µL of ice-cold isolation buffer. Protein concentration was spectrophotometrically measured at 540 nm using the Biuret method with bovine serum albumin as a standard.

Table A-1.

Physical and chemical characteristics of the four sediments (mean, n=1; *mean \pm sd, n=3)

	BALAN	MINERVE	IUT	DJANGO
Grain size distribution (%)				
Sand*	75.2 \pm 2.5	77.5 \pm 2.7	72.3 \pm 2.2	76.5 \pm 4.5
Silt*	24.2 \pm 2.4	22.0 \pm 2.6	27.1 \pm 2.2	22.9 \pm 4.3
Clay*	0.6 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.6 \pm 0.2
Organic matter composition (% sed. DM)				
Total Organic Carbon*	7.89 \pm 0.57	11.98 \pm 0.15	8.12 \pm 1.01	12.41 \pm 0.09
Total Nitrogen*	0.64 \pm 0.06	0.72 \pm 0.01	0.50 \pm 0.04	0.76 \pm 0.01
Pollutant contents				
Total hydrocarbons C10-C40 (mg.kg ⁻¹ sed) DM)	178	3348	1067	7743
Heavy metals (mg.kg ⁻¹ sed. DM)				
Cadmium	0.3	0.8	2.9	2.3
Copper	7.82	300	179.6	314.5
Lead	15	122	210.6	198.6
Zinc	50.6	1397	764.6	2528
Σ Heavy metals	73.72	1819.8	1157.7	3043.4
PAHs (μ g kg ⁻¹ sed. DM)				
Acenaphtylene	< 10	< 10	< 10	< 10
Fluoranthene	102	362	2314	551
Benzo (b) fluoranthene	84	368	1214	436
Benzo (k) fluoranthene	27	119	540	161
Benzo (a) pyrene	49	178	1145	263
Benzo (ghi) perylene	57	575	968	562
Indeno (1,2,3 cd) pyrene	47	319	981	385
Anthracene	13	21	189	23
Acenaphthene	< 10	< 10	215	< 10
Chrysene	72	278	1692	368
Dibenzo (a,h) anthracene	< 10	< 10	400	< 10
Fluorene	< 10	< 10	189	< 10
Naphtalene	< 10	< 10	< 10	< 10
Pyrene	83	501	2186	633
Phenanthrene	48	232	1789	325
2-methyl fluoranthene	< 10	< 10	< 10	< 10
Benzo (a) anthracene	39	113	1101	192
Σ PAHs	621	3066	14923	3899

PAHs = polycyclic aromatic hydrocarbons, DM = dry mass.

e. Statistical analysis

Results are presented as means \pm s.d. Data were log-transformed to homogenize variances when homoscedasticity and normality were not observed. To test the effect of sediment type and time exposure to pollutants, two-way analyses of variance (2-way ANOVA) were performed to test the effect of every parameter and the interaction between them. If significance was detected, Tukey's HSD tests were performed to determine which sediment treatments and times differed. For the cytochrome c oxidase (COX), Kruskal-Wallis tests were performed to test the effect of sediment treatments. If significance was observed, Dunn tests were performed for pairwise comparisons for detecting which sediment treatments differed after 6 months of exposure. All statistical analyses were performed with the software R (RTM Development Core Team). Significances for all statistical tests was accepted at $\alpha < 0.05$.

III. RESULTS

f. Physiological biomarkers

i. Energy body stores

The glycogen content of *L. hoffmeisteri* significantly decreased after 3 months (M3) of exposure to the sediments Balan (BAL), Minerve (MIN) and IUT (IUT) (Fig. A-1a: Tukey's HSD tests, $p < 0.05$) and remained stable up to 6 months (M6) (Tukey's HSD tests, $p > 0.05$). For the worms exposed to the sediment Django (DJ), the glycogen concentration significantly increased after one month (M1) (Tukey's HSD test, $p = 6.53 \cdot 10^{-4}$) and significantly decreased after 6 months (M6) (Tukey's HSD test, $p = 0.01$) compared to control worms (M0).

The concentration of triglycerides in *L. hoffmeisteri* significantly increased with the time exposure to sediments and with the type of sediments (Fig. A-1b, 2-way ANOVA, "time" effect $p < 2.2 \cdot 10^{-16}$; "sediment treatment" effect, $p < 2.2 \cdot 10^{-16}$; "time x sediment" interaction, $p = 2.03 \cdot 10^{-9}$). The increase in triglycerides body concentration was particularly observed after 1 month of exposure (M1) for the organisms exposed to DJ sediment (when compared to the organisms collected on M0: DJ: +394%) and 3 months of exposure for the sediments BAL and MIN (when compared to the organisms collected at M0: BAL: +243%; MIN: +98%; IUT: +446%). The concentrations stabilized up to 6 months of exposure for the organisms exposed to the sediments BAL, MIN and DJ, except for the worms exposed to the sediment IUT whose the triglycerides body content significantly decreased after 6 months of exposure (when compared to the organisms collected on M3: IUT: -51%). We noted that the increase in

triglycerides body content was more important for the worms exposed to the most polluted sediment (DJ) than the three others (BAL, MIN and IUT).

The protein concentration was influenced by both the time exposure to the sediment and the type of sediments (Fig. A-1c, 2-way ANOVA, “time” effect $p= 1.71.10^{-13}$; “sediment treatment” effect, $p<2.2.10^{-16}$; “time x sediment” interaction, $p= 1.17.10^{-6}$). But we detected a decrease in protein concentration for the worms exposed for 1 month (M1) to the sediments IUT and DJ (Tukey’s HSD test, $p<0.05$) and the protein concentrations were stable up to the end of the experiment (M6) (Tukey’s HSD test, $p<0.05$). No significant difference was observed for the organisms exposed to the sediments BAL and Min all along the experiment.

ii. *Oxidative stress and antioxidant defences*

The TBARS level in worms significantly increased after 3 months of exposure to sediments (Fig. A-1d, 2-way ANOVA, “time” effect $p<2.2.10^{-16}$) and was stable up to 6 months (M6) for all sediment types (Tukey’s HSD tests, $p>0.05$). We also measured a significant influence of the sediment treatment on the TBARS level (2-way ANOVA, “sediment treatment” effect, $p=1.41.10^{-4}$). We noted that this sediment effect was probably linked to the high concentration of TBARS of the worms exposed to the sediments MIN, IUT and DJ at M3 (+249% and +244% of TBARS level on M3 in IUT and DJ sediments compared to M0, respectively). The factors “time exposure” and “sediment treatment” were not independent (2-way ANOVA, factors interaction, $p=1.63.10^{-5}$).

The SOD activity significantly decreased after one month (M1) of exposure to the sediments TEM, IUT and DJ (Fig. A-1e, 2-way ANOVA, “time” effect $p=6.80.10^{-11}$). No change was observed for the organisms exposed to the sediment MIN whatever the time of exposure (Tukey’s HSD tests, $p>0.05$). This absence of change might partly explain the effect of the sediment treatment because no difference was observed in the decrease of the SOD activities between the three sediments TEM, IUT and DJ (Tukey’s HSD tests, $p>0.05$). The factors “time exposure” and “sediment treatment” were not independent (2-way ANOVA, factors interaction, $p=3.33.10^{-4}$).

The catalase activity significantly decreased with the time exposure to the sediment (Fig. A-1f, 2-way ANOVA, “time” effect $p<2.2.10^{-16}$). We observed this activity decrease for the worms exposed to the sediments TEM and IUT at M3 and stabilized up to the end of the experiment (when compared to the M0 organisms for each sediment treatment: Tukey’s HSD tests, $p<0.05$), whereas for the organisms exposed to sediment MIN and DJ, the decrease of the catalase activity was observed at M6 and M1 (then stabilized up to M6) (Tukey’s HSD

tests, $p > 0.05$), respectively. The sediment treatment influenced the catalase activity (2-way ANOVA, “sediment treatment” effect, $p = 9.09 \cdot 10^{-8}$). The factors “time exposure” and “sediment treatment” were not independent (2-way ANOVA, factors interaction, $p = 1.14 \cdot 10^{-6}$).

The GPx activity was not presented because we obtained some surprising negative results.

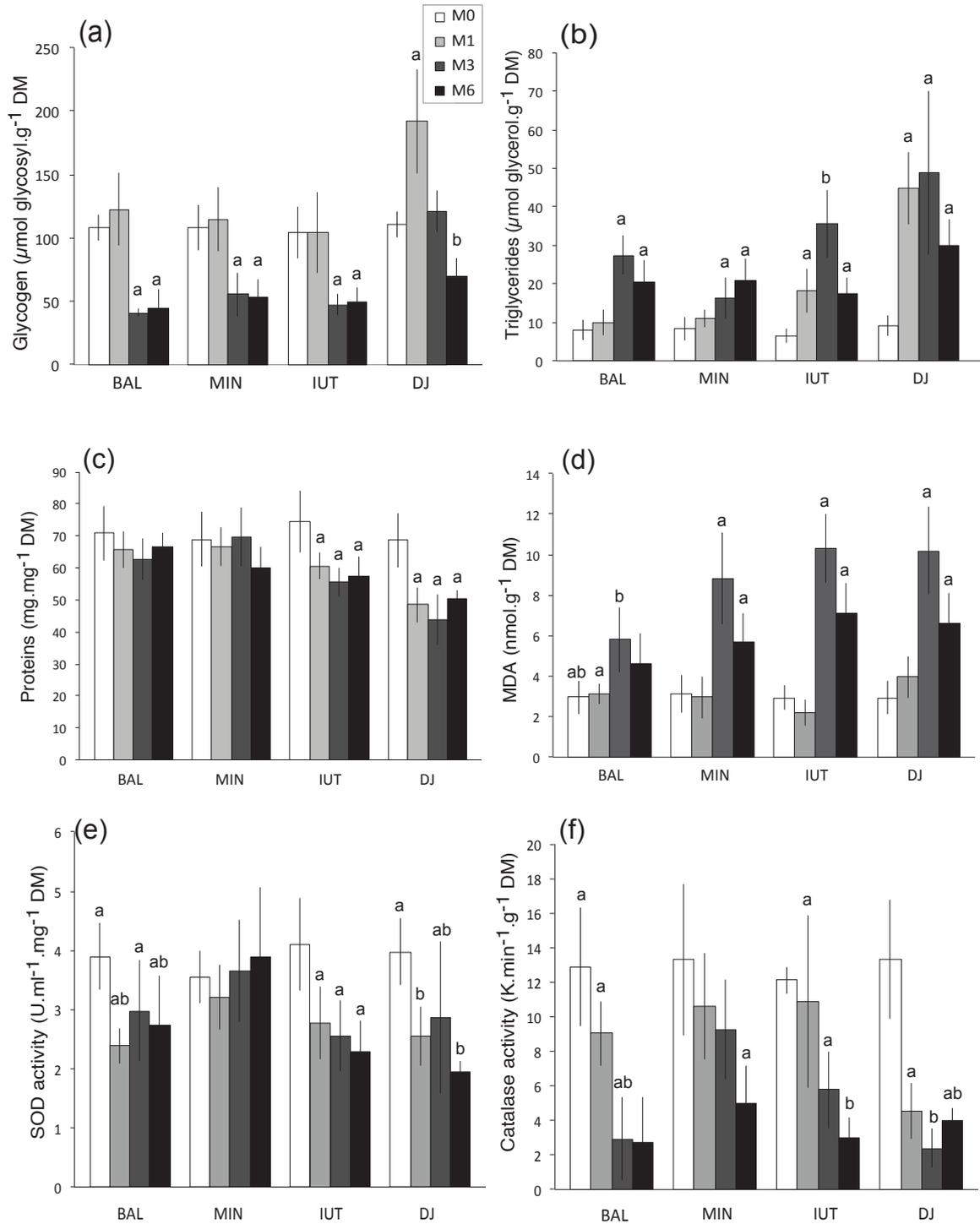


Fig. A-1 Concentration of glycogen (a), triglycerides (b), proteins (c), concentration of MDA (d), superoxide dismutase activity (e) and catalase activity (f) of *L. hoffmeisteri* after 0, 1, 3 and 6 months exposed to each sediments (compared to M0). Data presented as means \pm s.e.m. (n=9). BAL=Balan sediments, MIN=Minerve sediments, IUT= IUT sediments and DJ=Django sediments.

iii. Cytochrome c oxidase

The cytochrome c oxidase activity was not influenced by the sediment treatment after 6 months of exposure to each sediment (Fig. A-2, K-W test, $p=0.13$).

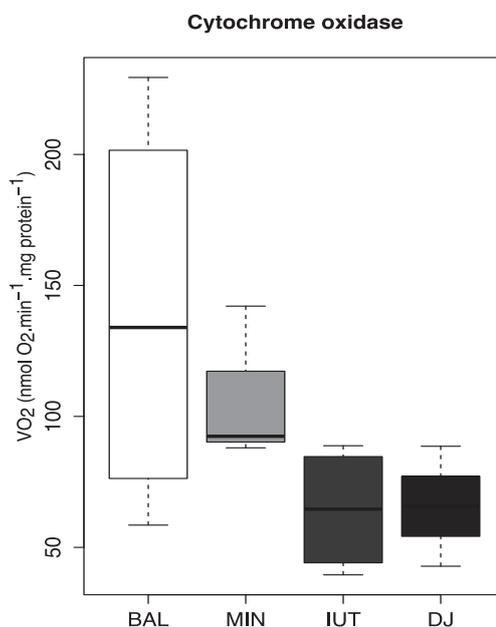


Fig. A-2 The cytochrome c oxidase activity of *Limnodrilus hoffmeisteri* after a 6-months exposure to each sediment (n=4; pool of 500 worms per n). BAL=Balan sediments, MIN=Minerve sediments, IUT= IUT sediments and DJ=Django sediments.

IV. DISCUSSION

Our results clearly demonstrated that a long-term exposure to a mixture of urban pollutants (sediments from stormwater basins MIN, IUT and DJ) induced an oxidative stress after 3 months. The exposure to pollutants induce a lipid peroxidation in the phospholipid bilayer of cellular membranes in worms. Thus, the increase in the body level of malondialdehyde (MDA) (i.e. the biological parameter demonstrating the existence of this peroxidation) could be used as a useful biomarker (of damages) of an urban multi-pollution (Pigneret et al., 2016). We also noted that this contaminant-induced oxidative stress was associated with the impairment of the main antioxidant enzymes (CAT, GPx and SOD: Di et al., 2017). For example, the SOD activity decreased during the time course of the experiment, whatever the sediment treatment. Interestingly, Maria and Bebianno (2011) have also shown that an exposure to a mixture of benzo(a)pyrene and copper inhibited the activity of the superoxide dismutase in *Mytilus galloprovincialis*. As catalase was also concerned by this

contaminant-induced inhibitory effect, we can hypothesized that urban pollution could affect the activity of the major antioxidant enzymes after different times of exposure depending on the type of sediment, as also shown by Arendarczyk et al. (2014) in another bioturbator oligochaete, *Tubifex tubifex*, after a cadmium-spiked sediment exposure. Unfortunately, we cannot demonstrate the responsibility of a single pollutant in particular, but we could suppose that urban pollutants have co-toxicity effects (Gauthier et al., 2014) leading to the decrease of the catalytic activities of both SOD and catalase. To date, these co-toxicity effects are not enough studied due to the complexity of potential interactions between pollutants (mainly metal-PAH mixtures: Gauthier et al., 2014).

We previously hypothesized that the ability to cope with urban toxicants can be costly in terms of energy, which would imply an increase in body stores (glycogen, triglycerides and/or proteins) utilization rates to fuel these responses. Our results shown that this assumption may hold true, but data nevertheless showed contrasted results. On the other hand, the different sediments (polluted or not) used during this experiment are very rich in organic matter, and could ensure this additional potential energy demand without overconsumption of body reserves (as *L. hoffmeisteri* is a sediment feeder). Surprisingly, triglycerides body stores progressively increased during the time course of the experiment. This increase was observed in worms incubated in both heavily and slightly polluted sediments, but was more pronounced for the most polluted ones (IUT and DJ). Fatty acids are catabolized through the β -oxidation pathway which is fully aerobic and includes mitochondrial steps. However, Lauer et al. (2012) and Pigneret et al. (article submitted in ESPR, 2018) clearly demonstrated in recent studies that urban contaminants (from the same polluted sediments) disrupted both aerobic metabolism and mitochondria functioning, forcing *L. hoffmeisteri* to shift from aerobic to anaerobic metabolism. This disruption, combined with a high availability of energy-rich food (sediments from stormwater basins), would explain both the lack of use and the subsequent accumulation of triglycerides in tubificid worms incubated in polluted sediments.

Proteins concentration did not change during the time course of this experiment, with the exception of the tubificid worms exposed to the most polluted sediment (DJ sediment). Proteins stores significantly decreased after 3 months in *L. hoffmeisteri* incubated in DJ sediment, and this could be explained by a significant use of some amino acids (after proteolysis) as fermentable compounds, to partly fuel the pollutant-induced anaerobic metabolism (Hervant et al. 1996, 1999). Proteins are generally the last store used to fuel defence mechanisms during stress, as this body store (i.e. the muscular mass) is essential for

numerous physiological functions, among them digestion, nutrition and locomotion (Pigneret et al., 2016; Ciutat et al., 2005). Therefore, the remarkable resistance to long-term multicontamination of this bioturbator worm may be partly explained by its ability to remain in prolonged states of protein-sparing.

Glycogen is well recognized as the most easily (and rapidly) metabolizable energy store (Koop et al., 2011). But, surprisingly, the glycogen concentration decreased for worms exposed 3 or 6 months, whatever the sediment. Unfortunately, these results cannot demonstrate that *L. hoffmeisteri* preferentially utilized glycogen during a long-term exposure to urban pollutants, in order to save proteins (and therefore muscular mass).

The activity of cytochrome c oxidase (COX) showed no change during the time course of the experiment, for all four used sediments. Nevertheless, we could observed a decreasing trend of the COX activity for the most polluted sediments (IUT and DJ), but this result was statistically not significant because of the few number of replicates (n=4). A mixture of urban pollutants did not impact this key (mitochondrial) enzyme of the aerobic metabolism, and therefore this metabolic parameter appears to be inappropriate as a biomarker of a long-term urban pollution.

V. CONCLUSION

A long-term exposure to a mixture of pollutants induced an oxidative stress and impacted the energy stores of the key bioturbator *L. hoffmeisteri*. Our study clearly demonstrated that some physiological parameters were influenced by the presence of urban contaminants and therefore could be used as biomarkers of a long-term urban pollution. Pollutants clearly generated oxidative damages, by inhibiting the catalytic activities of some key antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase). Moreover, the body levels of energy stores provided useful information on the strategy used to cope with a chemical stress, and proteins level constituted a pertinent biomarker of the impact of long-term exposure to urban pollutants. Hence, this species can successfully withstand the permanent chemical stress associated with life in stormwater sediments and does not suffer muscular loss, allowing the maintenance of both a feeding activity (tubificid worms burrow and consume sediments at the same time) and an escape behaviour (displayed by worms living in polluted sediments).

VI. ACKNOWLEDGMENTS

This study was conducted within the framework of the experimental observatory for urban hydrology (OTHU, <http://www.graie.org/othu/>). It was funded by the urban community of Lyon (Lyon Metropole) and the Rhône-Alpes-Auvergne Region. We are indebted to M. Jacquy, J. Voisin for their most dedicated support with the field and laboratory work. We also wish to thank the referees for their constructive comments.

VII. REFERENCES

- Aebi H (1984) Oxygen Radicals in Biological Systems. *Methods Enzymol* 105:121–126
- Arendarczyk A, Jakubowska A, Zgórska A, Grabińska-Sota E (2014) Toxic effects of cadmium-spiked sediments in *Tubifex tubifex*: enzyme biomarkers measurements. *Desalin Water Treat* 52: 3798–3803
- Arnold CL, Gibbons CJ (1996) Impervious surface coverage: the emergence of a key environmental indicator. *J Am Plan Assoc* 62: 243–258
- 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. *Ecotoxicol Environ Saf* 60: 237–246 . doi: 10.1016/j.ecoenv.2004.08.005
- 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
- Covich AP, Austen MC, Bärlocher F, Chauvet E, Cardinale BJ, Biles CL, Inchausti P, Dangles O, Solan M, Gessner MO, Stutzner B, Moss B (2004) The Role of Biodiversity in the Functioning of Freshwater and Marine Benthic Ecosystems. *Bioscience* 54: 767-765
- Datry T, Hervant F, Malard F, Vitry L, Gibert J (2003) Dynamics and adaptive responses of invertebrates to suboxia in contaminated sediments of a stormwater infiltration basin. *Arch Hydrobiol* 156: 339–359
- Gauthier PT, Norwood WP, Prepas EE, Pyle GG (2014) Metal-PAH mixtures in the aquatic environment: A review of co-toxic mechanisms leading to more-than-additive outcomes. *Aquat Toxicol* 154: 253–269
- Grebel JE, Mohanty SK, Torkelson AA, Boehm AB, Higgins CP, Maxwell RM, Nelson KL, Sedlak DL (2013) Engineered Infiltration Systems for Urban Stormwater Reclamation. *Environ Eng Sci* 30: 437–454

- Hervant F, Mathieu J, Barre H (1999) Comparative study on the metabolic responses of subterranean and surface-dwelling amphipods to long-term starvation and subsequent refeeding. *J Exp Biol* 202: 3587–3595
- Hunt WF, Traver RG, Davis AP, Emerson CH, Collins KA, Stagge JH (2010) Low impact development practices: designing to infiltrate in urban environments. In: Chang NB (Ed), *Effects of urbanization on groundwater: an engineering case-based approach for sustainable development*. American Society of Civil Engineers (ASCE), Reston, VA pp. 308–343.
- Klerks PL, Bartholomew PR (1991) Cadmium accumulation and detoxification in a Cd-resistant population of the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri*. *Aquat Toxicol* 19: 97–112
- Koop JHE, Winkelmann C, Becker J, Hellmann C, Ortmann C (2011) Physiological indicators of fitness in benthic invertebrates: a useful measure for ecological health assessment and experimental ecology. *Aquat Ecol* 45: 547–559
- Krantzberg G (1985) The influence of bioturbation on physical, chemical and biological parameters in aquatic environments: A review. *Environ. Pollut. Ser. A, Ecol. Biol.* 39: 99–122
- Ku HFH, Hagelin NW, Buxton HT (1992) Effects of urban storm-runoff control on groundwater recharge in Nassau Country, New York. *Ground Water* 30: 507–514
- Lagauzère S, Boyer P, Stora G, Bonzom JM (2009) Effects of uranium-contaminated sediments on the bioturbation activity of *Chironomus riparius* larvae (Insecta, Diptera) and *Tubifex tubifex* worms (Annelida, Tubificidae). *Chemosphere* 76: 324–34
- Lagauzère S, Terrail R, Bonzom JM (2009) Ecotoxicity of uranium to *Tubifex tubifex* worms (Annelida, Clitellata, Tubificidae) exposed to contaminated sediment. *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 527–37
- Lam KS, Gray JS (2003) The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Mar Pollut Bull* 46: 182–186
- Lauer MM, De Oliveira CB, Yano NLI, Bianchini A (2012) Copper effects on key metabolic enzymes and mitochondrial membrane potential in gills of the estuarine crab *Neohelice granulata* at different salinities. *Comp Biochem Physiol Part C* 156: 140–147
- Lawniczak M, Romestaing C, Roussel D, Maazouzi C, Renault D, Hervant F (2013) Preventive antioxidant responses to extreme oxygen level fluctuation in a subterranean crustacean. *Comp Biochem Physiol Part A* 165: 299–303
- Li F, Zeng X, Yu Y, et al (2014) A field study of the relationship between sulfide-bound metals and bioaccumulation by *Limnodrilus sp.* in a heavily polluted river. *Environ Monit Assess* 186:4935–4946
- Livingstone D. (2001) Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar Pollut Bull* 42:656–666

- Lotufo GR, Fleeger JW (1996) Toxicity of sediment-associated pyrene and phenanthrene to *Limnodrilus hoffmeisteri* (Oligochaeta: Tubificidae). *Environ Toxicol Chem* 15: 1508–1516
- Marmonier P, Maazouzi C, Foulquier A, Navel S, François C, Hervant F, Mermillod-Blondin F, Vienney A, Barraud S, Togola A, Piscart C (2013) The use of crustaceans as sentinel organisms to evaluate groundwater ecological quality. *Ecol Eng* 57: 118–132
- Marsalek J, Chocat B (2002) International report: Stormwater management. *WATER Sci Technol* 46: 1–17
- Marsalek J, Marsalek P (1997) Characteristics of sediments from a stormwater management pond. *Water Sci Technol* 36: 117–122
- McKenzie DJ, Garofalo E, Winter MJ, Ceradini S, Verweij F, Day N, Hayes R, van der Oost R, Butler PJ, Chipman JK and Taylor EW (2007) Complex physiological traits as biomarkers of the sub-lethal toxicological effects of pollutant exposure in fishes. *Phil Trans R Soc B* 362: 2043–2059
- Mermillod-Blondin F, Foulquier A, Gilbert F, Navel S, Montuelle B, Bellvert F, Comte G, Grossi V, Fourel F, Lecuyer C, Simon L (2013) Benzo(a)pyrene inhibits the role of the bioturbator *Tubifex tubifex* in river sediment biogeochemistry. *Sci Total Environ* 450–451: 230–41
- Mermillod-Blondin F, Lemoine D (2010) Ecosystem engineering by tubificid worms stimulates macrophyte growth in poorly oxygenated wetland sediments. *Funct Ecol* 24: 444–453
- Millward RN, Fleeger JW, Reible DD, Keteles KA, Cunningham BP, Zhang L (2001) Pyrene bioaccumulation, effects of pyrene exposure on particle-size selection, and fecal pyrene content in the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri* (Tubificidae, Oligochaeta). *Environ Toxicol Chem* 20: 1359–1366
- Niemczynowicz J, (1999) Urban hydrology and water management – present and future challenges. *UrbanWater J* 1: 1–14.
- Nogaro G, Mermillod-Blondin F, Montuelle B, Boisson JC, Gibert J (2008) Chironomid larvae stimulate biogeochemical and microbial processes in a riverbed covered with fine sediment. *Aquat Sci* 70: 156–168
- Nogaro G, Steinman AD (2014) Influence of ecosystem engineers on ecosystem processes is mediated by lake sediment properties. *Oikos* 123: 500–512
- Pigneret M, Mermillod-Blondin F, Volatier L, et al (2016) Urban pollution of sediments: Impact on the physiology and burrowing activity of tubificid worms and consequences on biogeochemical processes. *Sci Total Environ* 568: 196–207
- Pitt R, Clark S, Field R (1999) Groundwater contamination potential from stormwater infiltration practices. *Urban Water J* 1: 217–236

- Plenet S, Hervant F, Joly P (2000) Ecology of the hybridogenetic *Rana esculenta* complex: Differential oxygen requirements of tadpoles. *Evol Ecol* 14: 13–23
- Renault D, Hervant F, Vernon P (2002) Comparative study of the metabolic responses during food shortage and subsequent recovery at different temperatures in the adult lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Physiol Entomol* 27: 291–301
- Roussel D, Salin K, Dumet A, et al (2015) Oxidative phosphorylation efficiency, proton conductance and reactive oxygen species production of liver mitochondria correlates with body mass in frogs. *J Exp Biol* 218: 3222–3228
- Salin K, Luquet E, Rey B, et al (2012) Alteration of mitochondrial efficiency affects oxidative balance, development and growth in frog (*Rana temporaria*) tadpoles. *J Exp Biol* 215:863–869
- Salin K, Voituron Y, Mourin J, Hervant F (2010) Cave colonization without fasting capacities: an example with the fish *Astyanax fasciatus mexicanus*. *Comp Biochem Physiol Part A* 156: 451–457
- Tappel AL (1978) Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Methods Enzymol* 52: 506–513
- Winston G (1991) Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comp Biochem Physiol Part C* 100: 173–176

3. Anaerobic end-products and mitochondrial parameters as physiological biomarkers to assess the impact of urban pollutants on a key bioturbator.

Article soumis à Environmental Science and Pollution Research

Mathilde Pigneret^{1*}, Damien Roussel¹ and Frédéric Hervant¹

¹Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés (LEHNA), UMR CNRS 5023, Université de Lyon, Université Lyon 1, ENTPE, 6 rue Raphael Dubois, 69622 Villeurbanne, France

Abstract

The impact of long-term exposure (6 months) to highly or slightly polluted sediments on the energy metabolism of an ecosystem engineer (the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri*) was investigated in laboratory conditions. We evaluated some mitochondrial parameters (respiratory chain activity and ATP production rate) and the accumulation of anaerobic end products (lactate, alanine, succinate and propionate). The sediments were collected from stormwater infiltration basins and presented high levels of heavy metals and PAHs. These compounds had been drained by the runoff water on impervious surfaces of urban areas during rainfall events. A decrease in the activity of the mitochondrial electron transport chain was observed in worms exposed to the most polluted sediment. Urban contaminants disrupted both aerobic metabolism and mitochondrial functioning, forcing organisms to shift from aerobic to anaerobic metabolism (which is characteristic of a situation of functional hypoxia). Although *L. hoffmeisteri* is very tolerant to urban pollutants, long-term exposure to high concentrations can cause disruption in mitochondrial activity and therefore energy production. Finally, this study demonstrated that anaerobic end products could be used as biomarkers to evaluate the impact of a mixture of urban pollutants on invertebrates.

Keywords: urban pollution; anaerobic metabolism; mitochondria; biomarkers; metabolic shift; tubificid worms

1. INTRODUCTION

Numerous studies (mainly on fish and invertebrates) have demonstrated the influence of toxic stress on metabolic pathways (De Coen et al. 2001 and references therein; Giacomini et al. 2014 and references therein). In oxygen-dependent animals, the oxidative metabolism of carbohydrates is the main energy-generating pathways (Hochachka and Somero 2002), but pollutants have long been recognized as powerful disrupters of carbohydrate metabolism and, more broadly, of cell respiration (Gagnon and Holdway 1998; Grajeda y Ortega et al. 2011; Meyer et al. 2013; Giacomini et al. 2014). For example, alterations of glycolysis and/or of citric acid cycle functioning have been observed in several fishes living in polluted environments (review in Gagnon and Holdway 1998). Mitochondria are essential organelles, playing critical roles in numerous key processes (including ATP generation), but recent studies indicate that they are also targeted by environmental toxicants (review in Meyer et al. 2013). Thus, some pollutants, among which polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and heavy metals (mainly lead and cadmium), have been shown to preferentially accumulate in mitochondria because of the high lipid content of mitochondrial membranes (PAHs) or through calcium transporters (heavy metals) (Schaller et al. 2011; Gauthier et al. 2014). In the same way, metals (Cd, Cu, Zn, and Fe) affect the activity of iron-dependent mitochondrial enzymes (mainly succinate dehydrogenase and NADH-dehydrogenase) (Jorge et al. 2014). The reduction or induction of these catalytic activities alters both energy metabolism and cell respiration, thereby significantly decreasing ATP production rate (review in Grajeda y Ortega et al. 2011) with potential effects on survival, growth, activity, and/or reproduction. In addition, Lauer et al. (2012) reported a decrease in both the activity of key enzymes involved in both the energy metabolism and in the mitochondrial membrane potential in the estuarine crab *Neohelice granulata* exposed to a sublethal concentration of copper, which could lead to a reduced mitochondrial ATP production. Unfortunately, little attention has been paid to the impact of pollutants on ATP generation.

In urban areas, the high impervious surface coverage disturbs the infiltration of runoff water during rainfall events (Ku et al. 1992; Niemczynowicz 1999). Consequently, stormwater management structures - mainly infiltration basins - were built to collect runoff water and recharge groundwaters (Marsalek and Marsalek 1997; Marsalek and Chocat 2002). These structures are of great ecological importance because they permit to restore the water cycle in urban zones. But runoff water also drains numerous pollutants (mainly hydrocarbons and heavy metals). These contaminants are accumulated in the sediment compartment of infiltration/stormwater basins, altering its quality and impacting organisms living in this harsh

biotope (Pigneret et al. 2016). In particular, changes in physiology and burrowing activities impair the ability of ecosystem engineers - mainly tubificid/bioturbator worms - to influence sediment biogeochemistry, and therefore affect the functioning of ecosystems receiving stormwater from urban areas (Mermillod-Blondin et al. 2013; Pigneret et al. 2016). Among these organisms, the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri* is usually exposed to urban pollutants in infiltration basin sediments and is considered as a key bioturbator (Datry et al. 2003; Pigneret et al. 2016 and references therein). This aquatic worm is thought to have an excellent potential for the evaluation of pollutant toxicity (Grajeda y Ortega et al. 2011, and references therein). According to Datry et al. (2003b) and Pigneret et al. (2016) who did not detect mortality in tubificid worms incubated in stormwater sediments, we did not expect that urban pollution would influence the survival of tubificid worms, but rather that it would significantly impact their physiology.

In the present study, we studied the effect of a mixture of pollutants (mainly heavy metals and PAHs) on the energy metabolism of *L. hoffmeisteri*. We predicted that a long-term exposure to urban toxicants would disrupt both aerobic metabolism and mitochondrial functioning, resulting in a partial or a total transition to anaerobic metabolism. This hypothesis was tested by assessing the possible changes induced by polluted sediments on the level of the main anaerobic end products (lactate, alanine, succinate and propionate: Schöttler and Bennet 1991; Datry et al. 2003), mitochondrial respiration, ATP production rate, and mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency in *L. hoffmeisteri*. The experiments were conducted during 6 months under laboratory conditions, in microcosms. Tubificid worms were exposed to 3 polluted sediments (from 3 infiltration basins) and one slightly polluted sediment (from a stream) considered as a control.

2. MATERIAL & METHODS

1. Model organism

The worm *Limnodrilus hoffmeisteri* (Annelidae, Tubificidae) (Claparède, 1862) was selected because it is tolerant to pollutants (Lotufo and Fleeger 1996; Millward et al. 2001; Pigneret et al. 2016) and is recognized as a key bioturbator in freshwater sediments. This species is a common sediment feeder that creates biogenic structures in sediments and egests faecal pellets at the water-sediment interface (McCall and Tevesz 1982; Mermillod-Blondin et al. 2001; Ciutat et al. 2006; Shang et al. 2014). This behaviour influences ecosystem functioning (Mermillod-Blondin and Rosenberg 2006; Mermillod-Blondin and Lemoine 2010). Because of these characteristics, this tubificid worm was recognized as a pertinent

model organism (Pigneret et al. 2016). Specimens of *L. hoffmeisteri* (mean individual dry mass: 350-400 µg) used in our experiments were bought from a professional breeder (GREBIL, Arry, France). Before the experimentation, they were acclimated to sedimentary habitat in 100-L plastic tanks (“acclimation tanks”) containing fine slightly polluted sediment (25L) from the Ain river (Ain, France) and normoxic water (50L, bubbled with air near the water surface) during 15 days (see Pigneret et al. 2016 for details concerning the acclimation sediment).

2. Sediment characteristics

We selected four sediments (3 stormwater sediments and 1 stream sediment) to test the influence of contrasted pollutant concentrations on the survival and physiology of tubificid worms. The 3 polluted sediments were collected in three infiltration basins (Django-Reinhardt, IUT and Minerve basins) located in industrialized and urbanized areas of the “Metropole de Lyon” conurbation (France; see Marmonier et al. 2013 for details concerning these basins). The control sediment (called BAL) was collected from a blind channel of the Rhône River (Balan, France). All four sediments were sieved (maximum diameter: 1 mm) and homogenized in the laboratory, then their particle sizes distributions were determined using a laser diffraction granulometer (Mastersizer 2000, Malvern Instrument, UK) according to Gette-Bouvarot et al. (2014). Total organic carbon and nitrogen concentrations were quantified by high-temperature combustion of pre-acidified dry samples and subsequent measurement of CO₂ and N₂ by thermal conductometry using an element analyzer (FlashEA, Thermo Electron Corporation). These analyses showed that granulometry, total inorganic carbon and nitrogen were similar between all the sediments. Metals (Cu, Zn, Cd and Pb) in sediments were extracted using a microwave-assisted digestion with HNO₃ and HCl and analyzed by ICP-AES (Thermo Electron Maxim) (Pigneret et al. 2016). PAHs in sediments were analyzed using high-performance-liquid-chromatography (HPLC) with fluorescence detector (AGILENT 1100) following cold extraction with CCl₄ (Pigneret et al. 2016). These analyses showed that the concentration of PAHs (mainly pyrene) is about 4.5 times higher in IUT basin (called IUT) than in both Django-Reinhardt (called DJ) and Minerve (called MIN) basins, due to different urban area catchments (Marmonier et al. 2013). The control sediment (BAL) was characterized by a low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and heavy metals (Table 1). In comparison, higher concentrations of total hydrocarbons (BAL concentrations x 23), heavy metals (x 27) and PAHs (x 12) characterized the three stormwater sediments (see Table 1).

3. Experimental design

The experimental design was realized as described in Pigneret et al. (2016), with the 4 sediments (BAL, MIN, IUT and DJ) and 4 times of exposure to pollutants: one month (M1), 3 months (M3), 6 months (M6), and the initial control (M0). For metabolic and mitochondrial analyses, worms were exposed to the polluted (MIN, IUT or DJ) or slightly polluted (BAL) sediments in 80-L glass tanks (“incubation tanks”), with the density of 26,000 worms/m². Three incubation tanks were set up for each sediment. Each incubation tank was filled with a 5 cm-thick layer of sediment overlaid by 5 cm of synthetic water (96 mg.L⁻¹ NaHCO₃, 39.4 mg.L⁻¹ CaSO₄ + 2H₂O, 60 mg.L⁻¹ MgSO₄ + 7H₂O, 4 mg.L⁻¹ KCl, pH= 7.5: US EPA 1991) bubbled with air near the water surface. One incubation tank of each sediment was dismantled at each time point (M1, M3 and M6). To measure physiological indicators, tubificid worms were collected in the incubation tanks after 1, 3 or 6 months of exposition to polluted or low polluted sediments. Control (M0) organisms were sampled at the start of the experiment, directly in the acclimation tanks, in order to determine their initial physiological state. Then, the worms were placed in filtered water from their original tanks during 24h, to avoid measuring the metabolic contents in their digestive bolus (sediment) in addition to the metabolite content of the whole animal (Plénet et al. 2000; Renault et al. 2002; Pigneret et al. 2016). After this period, the worms were separated into two groups. Those of the first group were freeze-dried (Christ lyophilizator, ALPHA 1-4LD) and weighed (dry mass) prior to anaerobic end-products assays. Those of the second groups were directly used for the measurement of mitochondrial parameters.

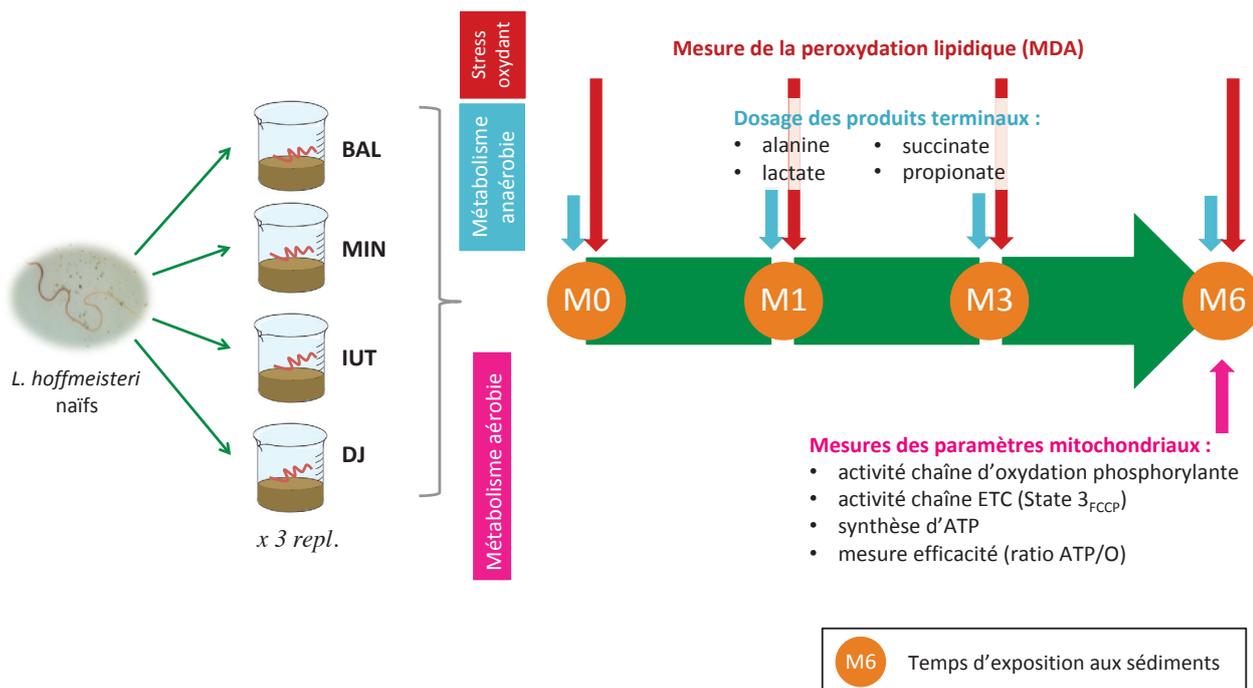


Schéma du design expérimental

4. Anaerobic end product assays

To measure alanine, succinate, propionate and lactate contents, pools of 6 freeze-dried worms were homogenised in 1 mL of ice-cold perchloric acid (0.33N) using an ultraturrax (Janke & Kunkel, IKA-WERK), as described by Hervant et al. (1995, 1997). All assays were performed using a spectrophotometer (Thermo Electron Corporation, AQUAMATE) at 25°C, using standard enzymatic methods as described by Bergmeyer (1985) and Hervant et al. (1995, 1997). Enzymes, coenzymes and substrates used for enzymatic assays were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, USA).

5. Mitochondrial parameters

i. Mitochondrial isolation

We collected (from the incubation tanks) 4 replicates of 500-pooled worms after 6 months of exposure to sediments (M6), for each sediment (BAL, MIN, IUT and DJ). Pools of 500 worms were homogenized with a Potter-Elvehjem homogenizer in 10 mL of ice-cold mitochondrial isolation buffer (600 mM mannitol, 20 mM Tris-maleate, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, pH 7.3 at 4°C) supplemented with 2% w/v bovine serum albumin. Worm homogenate was diluted 1/2 with 10 mL isolation buffer without bovine serum albumin, then centrifuged at 200 g for 3 min (4°C) to remove major debris. The resulting supernatant was centrifuged at 9000g (10 min, 4°C) to pellet mitochondria. The pellet was suspended in 800 µL of isolation buffer, then 20 mL of isolation buffer was added and the suspension centrifuged at 900g (10 min, 4°C). The resulting supernatant was filtered through cheesecloth and centrifuged at 9000g (10 min, 4°C). The pellet was suspended and gently homogenized in 100 µL of ice-cold isolation buffer. Protein concentration was spectrophotometrically measured at 540 nm using the Biuret method with bovine serum albumin as a standard.

ii. Mitochondrial respiration and ATP production rate

Oxygen consumption was measured at 20°C in respiratory buffer containing Mitochondrial oxygen consumption was measured using a Clark electrode (Rank Brother Ltd, Cambridge, UK) placed in a closed and stirred glass chamber (volume 530 µL). Whole worm mitochondria (0.5 mg/mL) were incubated in a respiratory buffer containing 120 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 0.3% bovine serum albumin (w/v) and 3 mM HEPES, pH 7.4. Pyruvate-malate (5 mmol.L⁻¹ pyruvate plus 2.5 mmol.L⁻¹ malate) and succinate (5 mmol.L⁻¹) were used as respiratory substrates. The active state of respiration (mitochondrial state 3_{ADP}) was determined after the addition of ADP (500 µmol.L⁻¹). The

uncoupled maximal respiration rate (state 3_{FCCP}) was initiated by the addition of 2 mM carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) in the presence of oligomycin (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency was determined by measuring ATP synthesis concurrently to oxygen consumption in a respirometry buffer supplemented with 20 mM glucose and 1.5 U/mL hexokinase as previously described for invertebrate mitochondria (Colinet et al., 2017). Briefly, a mixture of pyruvate/malate/succinate (5/2.5/5 mM) was used to initiate the oxygen consumption, then ADP (500 μM) was added to start state 3 respiration. Mitochondrial ATP synthesis was followed by assaying the glucose-6-phosphate accumulation in mitochondrial suspensions. After recording state 3 respiration rate, four 100 μL samples of mitochondrial suspension were withdrawn from the respiratory chamber at 2 min intervals and immediately quenched in 100 μL of perchloric acid solution containing 10% HClO_4 and 25 mM EDTA). After centrifugation of the denaturated protein and neutralization of resulting supernatants, the glucose-6-phosphate content of the samples was measured by spectrophotometry at 340 nm. The slope of the linear accumulation of glucose-6-phosphate over the sampling time interval (6 min) was used to calculate the rate of mitochondrial ATP synthesis as previously described (Colinet et al., 2017).

6. Statistical analysis

Results of the end-product concentrations are presented as means \pm S.E and results of mitochondrial parameters are presented as boxplots (no outlier was detected). Anaerobic end-product data were log-transformed to homogenize variances when homoscedasticity and normality were not observed. To test the effect of sediment treatment (the type of mixture of pollutants is different between the sediments) and time exposure to pollutants on the anaerobic end-product concentrations, two-way analyses of variance (2-way ANOVA) were performed to test the effect of each explanatory variables (sediment treatment; time of exposure) and the interaction between them (sediment treatment*time of exposure). If significance was detected, Tukey's HSD tests were performed to determine which sediment treatments and times differed between each anaerobic end-product concentrations. In view of the small number of replicates ($n=4$) during the mitochondrial experiments, Kruskal-Wallis tests (K-W) were performed to test the effect of the sediment treatments on mitochondrial parameters. If significance was detected, Wilcoxon tests were performed for pairwise comparisons to determine which sediment treatments differed after 6 months of exposure. All

statistical analyses were performed with the software R (RTM Development Core Team). Significance for all statistical tests was accepted at $\alpha < 0.05$.

3. RESULTS

There was a negligible mortality (<5%) of worms during the 6-months period of experiment in the pollutant-exposed groups (MIN, IUT and DJ) and in the control group (BAL). Therefore, all effects reported in the present study were considered to be sublethal.

1. Mitochondrial parameters

i. Oxygen consumption

Figures B-1 present the different respiratory parameters of mitochondria isolated from each batch of 500 worms and exposed to the four sediments (BAL, MIN, IUT and DJ). The phosphorylating respiration (State 3_{ADP}) (Fig B-1a) was significantly influenced by the sediment treatment (K-W test, $p = 3.96 \cdot 10^{-2}$). The value measured in worms exposed to the DJ sediment was significantly lower (-55%) than that of worms exposed to the BAL sediment (Wilcoxon test, BAL-DJ: $p = 2.85 \cdot 10^{-2}$).

The rate of FCCP-induced maximal oxygen consumption (Fig B-1b) in presence of FCCP (state 3_{FCCP}) was influenced by the sediment treatment (K-W test, $p = 2.57 \cdot 10^{-2}$). The value measured in worms exposed to DJ sediments was significantly lower than that of worms exposed to the BAL sediment (-68%) (Wilcoxon test, BAL-DJ: $p = 4.20 \cdot 10^{-2}$).

ii. ATP synthesis rate

The ATP synthesis rate (J_{ATP}) was not influenced by the sediment treatment (K-W test, $p = 5.08 \cdot 10^{-2}$) (Fig B-2a), but we can notice a trend to decrease in the ATP production rate as the p-value ($5.08 \cdot 10^{-2}$) is close to 0.05. We also noticed a trend to decrease in worms exposed to the DJ sediment (-54%) compared to worms exposed to the MIN sediment despite the statistical non-significance (Wilcoxon test, $p = 5.71 \cdot 10^{-2}$). The sediment treatment did not influence the ATP/O ratio (KW test, $p = 0.54$) (Fig 2b). By combining the present ATP synthesis rate values (J_{ATP}) and the corresponding state 3_{ADP} oxygen consumption (state 3_{ADP} in Fig. B-1a and B-2a), we can calculate the efficiency (ATP/O ratio) of mitochondrial oxidative phosphorylation activity. This coupling ATP/O value is of interest as it describes how much oxygen, and so how much nutrients, are needed to produce ATP, the cellular useable energy molecule that organisms ultimately allocate to their performances and survival. The sediment treatment did not influence the ATP/O ratio (KW test, $p = 0.54$) (Fig B-2b).

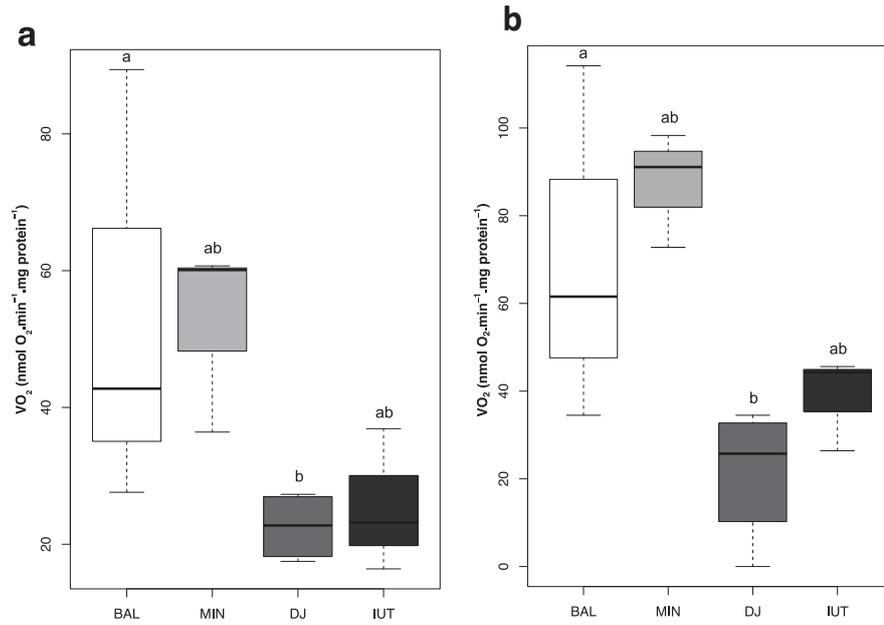


Fig B-1. Mitochondrial respiration (State 3_{ADP}) (a) and the decoupling maximum activity of the Electron Transport Chain (State 3_{FCCP}) (b) of *Limnodrilus hoffmeisteri* after a 6-months exposure to each sediment. BAL= Balan sediment, MIN= Minerve sediment, IUT= IUT sediment, and DJ= Django sediment ($n= 4$; pool of 500 worms per n).

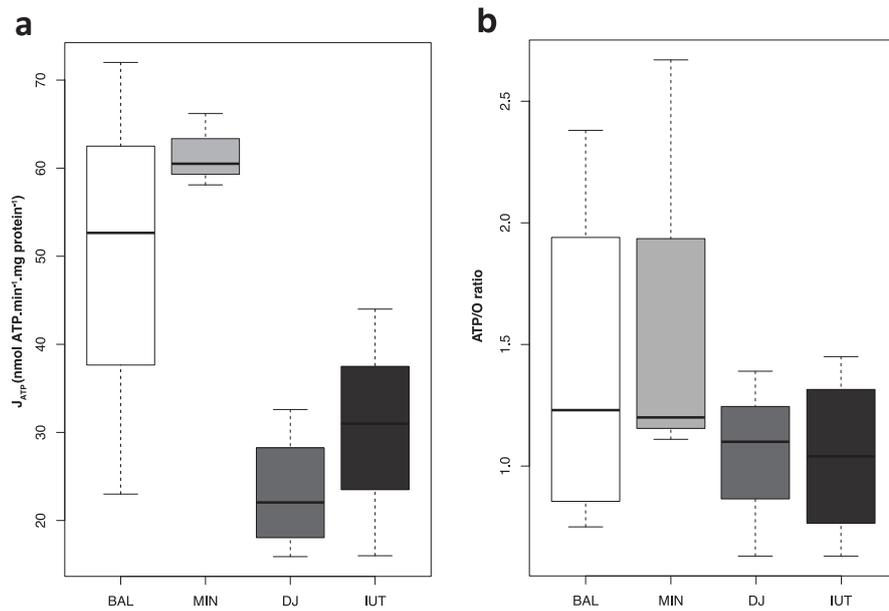


Fig B-2. ATP synthesis rate (J_{ATP}) (a) and ATP/O ratio (b) of *Limnodrilus hoffmeisteri* after a 6-months exposure to each sediment. BAL= Balan sediment, MIN= Minerve sediment, IUT= IUT sediment, and DJ= Django sediment ($n= 4$; pool of 500 worms per n).

Table B-1
Physical and chemical characteristics of the four sediments (mean, n=1; *mean \pm sd, n=3)

	BALAN	MINERVE	IUT	DJANGO
Grain size distribution (%)				
Sand*	75.2 \pm 2.5	77.5 \pm 2.7	72.3 \pm 2.2	76.5 \pm 4.5
Silt*	24.2 \pm 2.4	22.0 \pm 2.6	27.1 \pm 2.2	22.9 \pm 4.3
Clay*	0.6 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.6 \pm 0.2
Organic matter composition (% sed. DM)				
Total Organic Carbon*	7.89 \pm 0.57	11.98 \pm 0.15	8.12 \pm 1.01	12.41 \pm 0.09
Total Nitrogen*	0.64 \pm 0.06	0.72 \pm 0.01	0.50 \pm 0.04	0.76 \pm 0.01
Pollutant contents				
Total hydrocarbons C10-C40 (mg.kg ⁻¹ sed) DM)	178	3348	1067	7743
Heavy metals (mg.kg ⁻¹ sed. DM)				
Cadmium	0.3	0.8	2.9	2.3
Copper	7.82	300	179.6	314.5
Lead	15	122	210.6	198.6
Zinc	50.6	1397	764.6	2528
Σ Heavy metals	73.72	1819.8	1157.7	3043.4
PAHs (μ g kg ⁻¹ sed. DM)				
Acenaphthylene	< 10	< 10	< 10	< 10
Fluoranthene	102	362	2314	551
Benzo (b) fluoranthene	84	368	1214	436
Benzo (k) fluoranthene	27	119	540	161
Benzo (a) pyrene	49	178	1145	263
Benzo (ghi) perylene	57	575	968	562
Indeno (1,2,3 cd) pyrene	47	319	981	385
Anthracene	13	21	189	23
Acenaphthene	< 10	< 10	215	< 10
Chrysene	72	278	1692	368
Dibenzo (a,h) anthracene	< 10	< 10	400	< 10
Fluorene	< 10	< 10	189	< 10
Naphtalene	< 10	< 10	< 10	< 10
Pyrene	83	501	2186	633
Phenanthrene	48	232	1789	325
2-methyl fluoranthene	< 10	< 10	< 10	< 10
Benzo (a) anthracene	39	113	1101	192
Σ PAHs	621	3066	14923	3899

PAHs = polycyclic aromatic hydrocarbons. DM = dry mass.

2. Anaerobic end-products

The succinate body level of worms was also significantly influenced by both the time exposure and sediment treatments (Fig 3a, 2-way ANOVA, “time” effect $p= 1.23.10^{-7}$; “sediment treatment” effect, $p= 8.47.10^{-3}$; “time x sediment” interaction, $p= 3.83.10^{-2}$). The succinate concentration significantly increased after a 6-months exposure to polluted sediments (MIN, IUT and DJ) in *L. hoffmeisteri*.

The propionate body level of worms was significantly influenced by both the time exposure to the sediment and sediment treatments (Fig 3b, 2-way ANOVA, “time” effect $p= 2.13.10^{-9}$; “sediment treatment” effect, $p= 1.41.10^{-3}$; “time x sediment” interaction, $p= 2.04.10^{-2}$). The propionate concentration significantly increased after a 6-months exposure to polluted sediments (MIN, IUT and DJ) in *L. hoffmeisteri*.

The lactate body level of worms was not influenced by the time exposure to the sediment and sediment treatments (Fig 4a, 2-way ANOVA, “time” effect $p= 6.01.10^{-1}$; “sediment treatment” effect, $p= 8.22.10^{-1}$; “time x sediment” interaction, $p= 5.30.10^{-1}$).

The alanine body level of worms was not influenced by the time exposure to the sediment and sediment treatments (Fig 4b, 2-way ANOVA, “time” effect $p= 1.42.10^{-1}$; “sediment treatment” effect, $p= 8.06.10^{-1}$; “time x sediment” interaction, $p= 6.62.10^{-1}$).

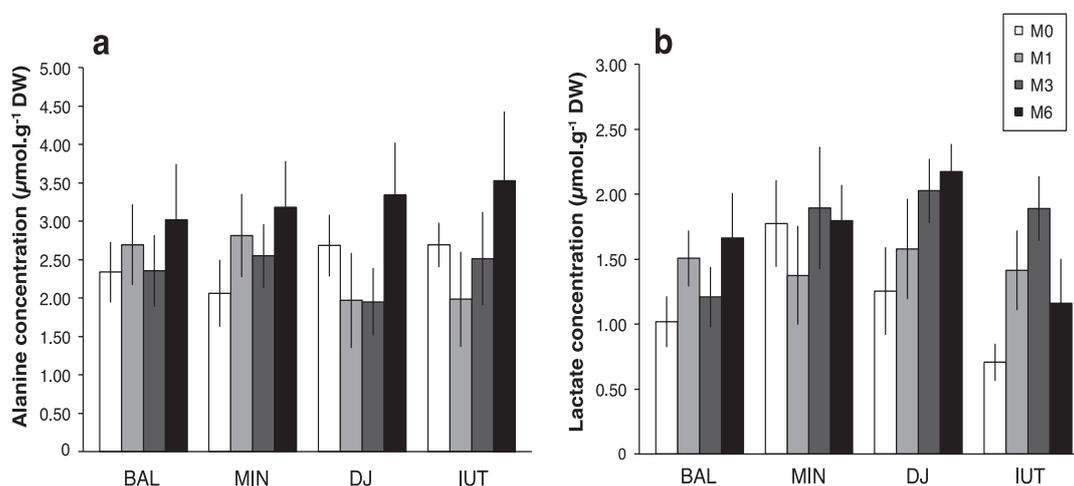


Figure B-3. Body concentrations of alanine (a) and lactate (b) in *Limnodrilus hoffmeisteri* after 0, 1, 3 and 6 months of exposure to each sediment. Data presented as means \pm s.e.m. ($n= 9$). BAL= Balan sediment, MIN= Minerve sediment, IUT= IUT sediment, and DJ= Django sediment.

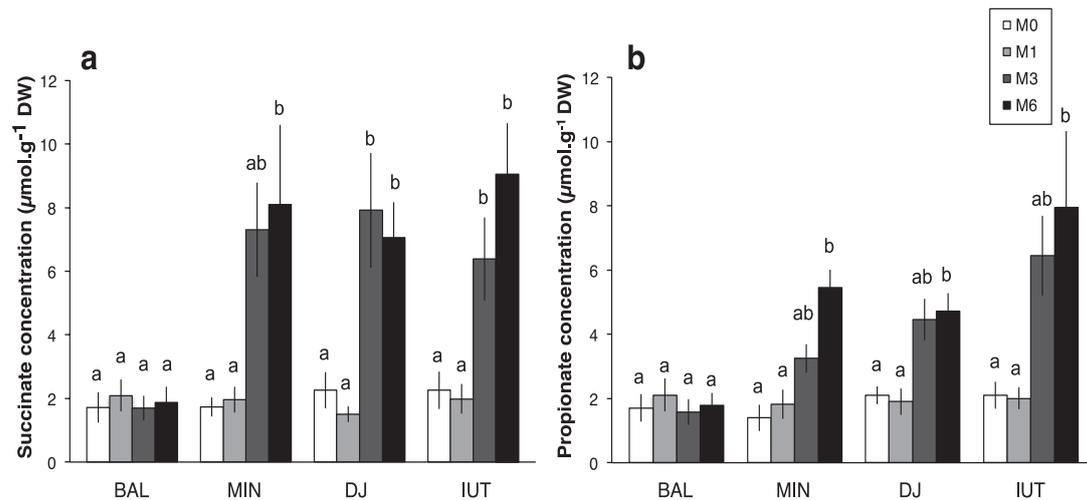


Figure B-4. Body concentrations of succinate (a) and propionate (b) in *Limnodrilus hoffmeisteri* after 0, 1, 3 and 6 months of exposure to each sediment. Data presented as means \pm s.e.m. ($n = 9$). BAL= Balan sediment, MIN= Minerve sediment, IUT= IUT sediment, and DJ= Django sediment.

4. DISCUSSION

In this study, we measured the effect of urban pollutants on the energy metabolism of an ecosystem engineer, the bioturbator oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri*. We hypothesized that a long-term exposure to a mixture of toxicants would disrupt both aerobic metabolism and mitochondrial functioning, resulting in a transition to anaerobic metabolism. This double hypothesis was tested by assessing the possible changes induced by pollutants on the level of the main anaerobic end products, mitochondrial respiration, ATP production rate, and mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency in *L. hoffmeisteri*. To this end, worms were exposed for 6 months, under laboratory conditions, to 3 polluted sediments and one slightly polluted sediment.

Impact of urban pollutants on mitochondrial functioning

A decrease in the whole mitochondrial oxidative phosphorylation activity was observed after 6 months in worms exposed to the most polluted sediments (stormwater basins IUT and DJ), resulting in a large decrease in oxygen consumption. The maximal activity of the electron transport chain, measured in the presence of FCCP (an uncoupling agent), was also negatively altered in worms exposed to the most polluted sediments (IUT and DJ). These results suggest that the mixture of contaminants found in those contaminated sediments altered the functioning of electron transport chain.

Other studies have also shown that metals and PAHs (mainly cadmium and benzo-(a)-pyrene) accumulate in and negatively affect mitochondrial functioning (Wang et al. 2004; Cannino et al. 2009; Kurochkin et al. 2011; Grajeda y Ortega et al. 2011; Meyer et al. 2013; Ji et al. 2016). Cadmium and PAHs are characterized by their lipophilic properties and therefore could accumulate in the mitochondrial compartment and/or in the mitochondria inner membrane (review in Meyer et al. 2013), potentially inducing a dysfunction in the respiratory chain. This property may partly explain the mitochondrial disturbance observed in the worms exposed to the most polluted sediments. Moreover, Li et al. (2003) stated that mitochondria are targeted by PAHs, as these compounds are very hydrophobic and are therefore attracted by lipid-rich membranes like those found in the mitochondria. One may suggest that lipophilic pollutants such as PAHs can interact with mitochondrial membranes and thus modify their functioning. Such structural modifications could create homeostasis disturbances related to fluidity changes in the mitochondrial membranes.

Some authors have demonstrated that a few urban pollutants affected the activity of the key enzymes involved in the aerobic metabolism (specific to glycolysis and Krebs cycle) (review in Meyer et al. 2013; Giacomini et al. 2014). Thus, Lauer et al. (2012) showed that an exposure to copper reduced hexokinase, pyruvate kinase, citrate synthase, and phosphofructokinase activities in the gills of *N. granulata*. Cadmium is also known to reduce the succinate dehydrogenase (a key enzyme of the Krebs cycle that links the mitochondrial respiratory chain to the citric acid cycle) activity in *L. hoffmeisteri* (Grajeda y Ortega et al. 2011). As a result, the inhibitory properties shown by urban contaminants on numerous key enzymes of aerobic metabolism could partly explain the depression of aerobic metabolism observed in the present study in the tubificid worm *L. hoffmeisteri*.

Transition to anaerobic metabolism induced by urban pollutants

Lauer et al. (2012) hypothesized that exposure of the euryhaline crab *N. granulata* to copper could lead to a physiological hypoxia and to a deficit in energy production. In the present study, a significant increase in the body concentrations of some anaerobic end-products (succinate and propionate) was observed after 3 months in worms exposed to polluted sediments, confirming the hypothesis of a malfunctioning of the aerobic metabolism, resulting in a transition to anaerobic metabolism. All these metabolic changes were induced by urban pollutants and were not observed in control worms. These findings demonstrate that exposure of the key bioturbator *L. hoffmeisteri* to urban contaminants leads to its increased

reliance upon anaerobic energy production, thus maintaining for it a sufficient ATP production.

Surprisingly, the body concentrations of lactate and alanine remained stable in individuals of *L. hoffmeisteri* incubated in polluted sediments, while these anaerobic end products were detected (in association with succinate and propionate) in the bioturbator oligochaete *Tubifex tubifex* after exposure to the polluted sediments from the same stormwater basins (Datry et al. 2003). Moreover, increased lactate dehydrogenase (LDH) activity or lactate accumulation following exposure to pollutants have been reported in a few aquatic invertebrates (Carvalho and Fernandes 2008; Lauer et al. 2012; Giacomini et al. 2014). The anaerobic pathway leading to lactate as an end product was clearly not used by *L. hoffmeisteri*.

Glycolysis yields two molecules of ATP. As the first stage of carbohydrate metabolism, it also generates 2 molecules of pyruvate, which under aerobic conditions are oxidized to acetyl-CoA and enter the Krebs cycle. When oxygen is not available, pyruvate is generally reduced to lactate through LDH (and/or to alanine through alanine dehydrogenase), thus recycling NAD^+ that can again be used by glycolysis (Nelson and Cox 2017). But some organisms optimize energy production by synthesizing other end-products leading to significant increases in ATP generation during physiological or environmental hypoxia. More precisely, lactate (or alanine) production results in the formation of 2 ATP/mole of glucose catabolized, but the production of succinate or propionate offers additional sites (1 or 2, respectively) for ATP production (Barret 1991; Schöttler and Bennet 1991). The present study clearly demonstrates that *L. hoffmeisteri* preferentially uses the most efficient (anaerobic) energy pathways to compensate for the mitochondrial dysfunction induced by urban pollutants, leading to a more than doubled ATP production.

Anaerobic energy production is always less efficient than its aerobic counterpart (Schöttler and Bennet 1991). Therefore, the shift from aerobic to anaerobic metabolism appeared to be clearly disadvantageous for worms submitted to polluted sediments. But this transition also limits the production of Reactive Oxygen Species (ROS, free radicals) in cells, and therefore could represent an efficient response for worms to counteract the increased oxidative stress induced by exposure to urban pollutants (Pigneret et al. 2016). Thus, we could hypothesize that the reduced energy requirements for fighting the oxidative stress might partially compensate for the decreased energy production in worms incubated in polluted sediments.

5. CONCLUSION

The present study demonstrates that urban polluted sediments displayed a variety of negative effects on both mitochondrial functioning and energy metabolism in the key bioturbator *L. hoffmeisteri*. But this worm was able to limit the pollution-induced physiological hypoxia by switching to anaerobic metabolism, in order to compensate for this reduction of energy supply. Though an increase in the concentrations of all main anaerobic end products was predicted, only succinate and propionate were detected after exposure to stormwater basin sediments, indicating that this worm responded to contamination with an efficient anaerobic metabolism. All these findings indicate that *L. hoffmeisteri* displays several adaptations for surviving a long-term pollution and high contaminant concentrations in heavily anthropized environments. In addition, data reported in the present study demonstrate that even though *L. hoffmeisteri* is very tolerant to urban pollutants, long-term exposures to high concentrations of urban pollutants can cause disruption in aerobic metabolism and therefore energy production. Lauer et al. (2014) showed similar results with the crab *N. granulata* exposed to an excessive concentration of copper.

Finally, this study clearly demonstrates that anaerobic end products could be used as biomarkers to evaluate the impact of a mixture of urban pollutants on invertebrates. The proposed set of biomarkers would be clearly useful to characterize both the level and duration of contamination. Further investigations are needed to elucidate the full potential of these compounds as warning signals of toxic stress.

6. ACKNOWLEDGMENTS

This study was conducted and funded within the framework of the Experimental Observatory for Urban Hydrology (OTHU; <http://www.graie.org/othu/>). The authors thank Prof. Eric Pattee (Université Lyon 1) for his assistance in correcting a first version of the manuscript.

7. REFERENCES

- Barret J (1991) Parasitic helminths. In: Bryant C (ed) Metazoan life without oxygen. Chapman and Hall, London, pp 146–164
- Bergmeyer, HU (1985) Methods of Enzymatic Analysis, vols VI-VIII (ed HU Bergmeyer). Weinheim, Basel: Verlag Chemie
- Cannino G, Ferruggia E, Luparello C, Rinaldi AM (2009) Cadmium and mitochondria. Mitochondrion 9:377–384
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2009.08.009>

Carvalho CS, Fernandes MN (2008) Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp Biochem Physiol Part C* 151, 437–442

<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.04.016>

Colinet H, Renault D, Roussel D (2017) Cold acclimation allows *Drosophila* flies to maintain mitochondrial functioning under cold stress. *Insect Biochem Mol Biol* 80: 52–60

Datry T, Hervant F, Malard F, Vitry L, Gibert J (2003) Dynamics and adaptive responses of invertebrates to suboxia in contaminated sediments of a stormwater infiltration basin. *Arch Hydrobiol* 156: 339–359

<https://doi.org/10.1127/0003-9136/2003/0156-0339>

De Coen WM, Janssen CR, Segner H (2001) The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing V. In vivo alterations in the carbohydrate metabolism of *Daphnia magna* exposed to sublethal concentrations of mercury and lindane. *Ecotoxicol Environ Saf* 48: 223–234

<https://doi.org/10.1006/eesa.2000.2009>

Gagnon MM, Holdway DA (1999) Metabolic enzyme activities in fish gills as biomarkers of exposure to petroleum hydrocarbons. *Ecotoxicol Environ Saf* 44: 92–99

<https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1804>

Gauthier PT, Norwood WP, Prepas EE, Pyle GG (2014) Metal-PAH mixtures in the aquatic environment: A review of co-toxic mechanisms leading to more-than-additive outcomes. *Aquat Toxicol* 154: 253–269

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.05.026>

Giacomin M, Jorge MB, Bianchini A (2014) Effects of copper exposure on the energy metabolism in juveniles of the marine clam *Mesodesma mactroides*. *Aquat Toxicol* 152: 30–37

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.03.025>

Grajeda y Ortega, MDLA, Ortiz Ordoñez E, Favari L, Shibayama M, Silva Olivares A, López López E (2011) Biochemical and Mitochondrial Changes Induced by Cd, Fe and Zn in *Limnodrillus hoffmeisteri*. *Int J Morphol* 29: 412–419

<https://doi.org/10.4067/S0717-95022011000200018>

Hervant F, Mathieu J, Barré H, Simon K, Pinon C (1997) Comparative study on the behavioral, ventilatory, and respiratory responses of hypogean and epigean crustaceans to long-term starvation and subsequent feeding. *Comp Biochem Physiol Part A* 118: 1277–1283

[https://doi.org/10.1016/S0300-9629\(97\)00047-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9629(97)00047-9)

Hervant F, Mathieu J, Garin D, Fréminet A (1995) Behavioral, ventilatory, and metabolic responses to severe hypoxia and subsequent recovery of the hypogean *Niphargus rhenorhodanensis* and the epigean *Gammarus fossarum* (Crustacea: Amphipoda). *Physiol Zool* 68: 223–244

<https://doi.org/10.1086/physzool.68.2.30166501>

Hochachka, PW, Somero, GN (2002) *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. Oxford University Press, Oxford

Ji X, Li Y, He J, Shah W, Xue X, Feng G, Zhang H, Gao M (2016) Depletion of mitochondrial enzyme system in liver, lung, brain, stomach and kidney induced by benzo(a)pyrene. *Environ Toxicol Pharmacol* 43: 83–93

<https://doi.org/doi: 10.1016/j.etap.2016.03.001>

Ku HFH, Hagelin NW, Buxton HT (1992) Effects of Urban Storm-Runoff Control on Ground-Water Recharge in Nassau Country, New York. *Ground Water* 30:5 07-514

<https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.1992.tb01526.x>

Kurochkin IO, Etzkorn M, Buchwalter D, Leamy L, Sokolova IM (2011) Top-down control analysis of the cadmium effects on molluscan mitochondria and the mechanisms of cadmium-induced mitochondrial dysfunction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300: R21–R31

<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00279.2010>

Lauer MM, De Oliveira CB, Yano NLI, Bianchini A (2012) Copper effects on key metabolic enzymes and mitochondrial membrane potential in gills of the estuarine crab *Neohelice granulata* at different salinities. *Comp Biochem Physiol Part C* 156: 140–147

<https://doi.org/ 10.1016/j.cbpc.2012.08.001>

Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel1 A (2003) Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* 111: 455–460

<https://doi.org/10.1289/ehp.6000>

Lotufo GR, Fleegeer JW (1996) Toxicity of sediment –associated pyrene and phenanthrene to *Limnodrilus hoffmeisteri* (Oligochaeta: Tubificidae). *Environ Toxicol Chem* 15: 1508

<https://doi.org/10.1002/etc.5620150912>

Marmonier P, Maazouzi C, Foulquier A, Navel S, François C, Hervant F, Mermillod-Blondin F, Vienney A, Barraud S, Togola A, Piscart C (2013) The use of crustaceans as sentinel organisms to evaluate groundwater ecological quality. *Ecol Eng* 57: 118–132

<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.04.009>

Marsalek J, Chocat B (2002) International report: Stormwater management. *Water Sci Technol* 46:1–17

Marsalek J, Marsalek P (1997) Characteristics of sediments from a stormwater management pond. *Water Sci Technol* 36: 117–122

[https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(97\)00610-0](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00610-0)

McCall PL, Tevesz MJS (1982) The effects of benthos on physical properties of freshwater sediments. In: McCall PL, Tevesz MJS (eds) *Animal-Sediment Relations: The Biogenic Alteration of Sediments*. Springer US, Boston, MA, pp 105–176

- Mermillod-Blondin F, Foulquier A, Gilbert F, Navel S, Montuelle B, Bellvert F, Comte G, Grossi V, Fourel F, Lecuyer C, Simon L (2013) Benzo(a)pyrene inhibits the role of the bioturbator *Tubifex tubifex* in river sediment biogeochemistry. *Sci Total Environ* 450–451: 230–41
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.013>
- Mermillod-Blondin F, Gérino M, Degrange V, Lensi R, Chassé JL, Rard M, Creuzé des Châtellier M (2001) Testing the functional redundancy of *Limnodrilus* and *Tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae) in hyporheic sediments: an experimental study in microcosms. *Can J Fish Aquat Sci* 58: 1747–1759
<https://doi.org/10.1139/cjfas-58-9-1747>
- Mermillod-Blondin F, Lemoine D (2010) Ecosystem engineering by tubificid worms stimulates macrophyte growth in poorly oxygenated wetland sediments. *Funct Ecol* 24: 444–453
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2009.01624.x>
- Mermillod-Blondin F, Rosenberg R (2006) Ecosystem engineering: the impact of bioturbation on biogeochemical processes in marine and freshwater benthic habitats. *Aquat Sci Across Boundaries* 68: 434–442
<https://doi.org/10.1007/s00027-006-0858-x>
- Meyer JN, Leung MCK, Rooney JP, Sandoel A, Hengartner MO, Kisby GE, Bess AS (2013) Mitochondria as a target of environmental toxicants. *Toxicol Sci* 134: 1–17
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kft102>
- Millward RN, Fleeger JW, Reible DD, Keteles AK, Cunningham BP, Zhang L (2001) Pyrene bioaccumulation, effects of pyrene exposure on particle-size selection, and fecal pyrene content in the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri* (Tubificidae, Oligochaeta). *Environ Toxicol Chem* 20: 1359–1366
<https://doi.org/10.1002/etc.5620200627>
- Nelson DL, Cox MM (2017) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 7th ed. WH Freeman editor 1328 pp
- Niemczynowicz J (1999) Urban hydrology and water management – present and future challenges. *Urban Water* 1:1–14
[https://doi.org/10.1016/S1462-0758\(99\)00009-6](https://doi.org/10.1016/S1462-0758(99)00009-6)
- Ortega M, Ordóñez E, Favari L, Shibayama M, Silva Olivares A, López López E (2011) Biochemical and mitochondrial changes induced by Cd, Fe and Zn in *Limnodrilus hoffmeisteri*. *Int J Morphol* 29: 412–419
<https://doi.org/10.4067/S0717-95022011000200018>
- Pigneret M, Mermillod-Blondin F, Volatier L, Romestaing C, Maire E, Adrien J, Guillard L, Roussel D, Hervant F (2016) Urban pollution of sediments: Impact on the physiology and burrowing activity of tubificid worms and consequences on biogeochemical processes. *Sci Total Environ* 568: 196–207
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.174>
- Plenet S (1995) Freshwater amphipods as biomonitors of metal pollution in surface and interstitial aquatic systems. *Freshw Biol* 33: 127–137

doi: 10.1111/j.1365-2427.1995.tb00393.x

Raftery TD, Jayasundara N, Di Giulio RT (2017) A bioenergetics assay for studying the effects of environmental stressors on mitochondrial function in vivo in zebrafish larvae. *Comp Biochem Physiol Part C* 192: 23–32

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.12.001>

Renault D, Hervant F, Vernon P (2002) Comparative study of the metabolic responses during food shortage and subsequent recovery at different temperatures in the adult lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Physiol Entomol* 27: 291–301

doi: 10.1046/j.1365-3032.2002.00299.x

Roussel D, Salin K, Dumet A, Romestaing C, Rey B, Voituron Y (2015) Oxidative phosphorylation efficiency, proton conductance and reactive oxygen species production of liver mitochondria correlate with body mass in frogs. *J Exp Biol* 218: 3222–3228

<https://doi.org/10.1242/jeb.126086>

Salin K, Luquet E, Rey B, Roussel D, Voituron Y (2012a) Alteration of mitochondrial efficiency affects oxidative balance, development and growth in frog (*Rana temporaria*) tadpoles. *J Exp Biol* 215: 863–869

<https://doi.org/10.1242/jeb.062745>

Salin K, Roussel D, Rey B, Voituron Y (2012b) David and Goliath: A Mitochondrial Coupling Problem? *J Exp Zool Part A* 317: 283–293

<https://doi.org/10.1002/jez.1722>

Schaller J, Brackhage C, Mkandawire M, Dudel EG (2011) Metal/metalloid accumulation/remobilization during aquatic litter decomposition in freshwater: a review. *Sci Total Environ* 409: 4891–4898

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.08.006>

Schöttler U, Bennet EM (1991) Annelids. In: Bryant C (ed) *Metazoan life without oxygen*. Chapman and Hall, London, pp 165–185

Shang J, Liao Q, Zhang L, Fan C (2014) The influence of different benthic fauna on inorganic nitrogen flux and denitrification in a large shallow hyper-eutrophic lake. *Fundam Appl Limnol* 184: 101–108

<https://doi.org/10.1127/1863-9135/2014/0431>

US EPA (1991) *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. 4th ed. Report EPA/600/4–90/2, Environmental Protection Agency, Washington.

Wang Y, Fang J, Leonard SS, Rao KMK (2004) Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 36: 1434–1443

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.03.01>

4. CONCLUSION DU CHAPITRE 3

Suite à l'exposition à long terme de l'oligochète *L. hoffmeisteri* (biotubateur clé) à des sédiments de bassins d'infiltration contenant un cocktail de polluants urbains, nous avons obtenu les principaux résultats suivants :

1 - Stress oxydant induit par les polluants :

- L'exposition aux sédiments des bassins d'infiltration provoque une augmentation significative de la teneur MDA/TBARS (marqueur des dégâts oxydatifs) et donc de la peroxydation lipidique chez *L. hoffmeisteri*, ce qui valide parfaitement l'hypothèse de l'induction d'un fort stress oxydant par les contaminants urbains.
- A la différence de ce qui est observé durant l'expérience de court terme (cf. Chapitre II), l'augmentation de ce stress oxydant n'est limitée par l'action de l'enzyme antioxydante SOD, dont l'activité catalytique pourrait être inhibée par la co-toxicité des polluants au sein du cocktail.
- Pour fournir l'énergie nécessaire aux mécanismes de défense contre les polluants, les vers utilisent préférentiellement le glycogène et parfois les protéines (chez ceux exposés aux sédiments les plus contaminés).

2 – Impact sur les voies aérobies et déclenchement du métabolisme anaérobie

- Les mitochondries isolées semblent impactées par les polluants urbains, puisque nous avons pu observer une diminution de l'activité globale de la chaîne respiratoire suite à une exposition de 6 mois à des sédiments issus de bassins d'infiltration.
- L'activité de la cytochrome c oxydase (enzyme clé du complexe IV de la chaîne de transport d'électrons) n'est pas modifiée par la présence des polluants urbains.
- Cet impact sur l'activité mitochondriale engendre potentiellement une tendance à la diminution de la production d'énergie (ATP) par les voies aérobies qui serait dans ce cas lié à une inhibition de l'activité de certains complexes de la chaîne de transport

d'électrons ou à une action en amont de ce système (au niveau des transporteurs de substrats et/ou des enzymes du cycle de Krebs).

- Pour compenser ce déficit énergétique, *L. hoffmeisteri* utilise les voies métaboliques anaérobies présentant le meilleur rendement énergétique (celles ayant le succinate et le propionate comme produits terminaux et permettant théoriquement la production de 4 ATP et 6 ATP pour une molécule de glucose fermentée, respectivement). Les concentrations de ces deux produits terminaux augmentent à partir de 3 mois d'exposition aux sédiments pollués.
- L'accumulation de triglycérides (réserve énergétique corporelle majeure) observée de façon inattendue au cours de l'expérience peut s'expliquer par cette dépression du métabolisme aérobie : la β -oxydation (transformation des lipides en pyruvate) n'est possible que si les voies oxydatives fonctionnent correctement.
- Les produits terminaux du métabolisme anaérobie observés chez *L. hoffmeisteri* (succinate et propionate) peuvent être considérés comme de bons biomarqueurs d'exposition à un stress chimique, de par leur réponse marquée et leur facilité de dosage.

Chapitre IV

Discussion-Conclusion & Perspectives

1. Discussion – conclusion

L'intensification de l'urbanisation entraîne une augmentation des surfaces imperméables (routes, parkings, trottoirs, bâtiments...) sur lesquelles s'accumule une multitude de polluants issus des activités anthropiques (métaux lourds, hydrocarbures...) (Grebel et al., 2013). Mais cette imperméabilisation limite fortement l'infiltration de l'eau de pluie dans les sols, ce qui perturbe le cycle de l'eau en empêchant le retour vers les aquifères souterrains (Niemczynowicz, 1999). C'est pourquoi les collectivités ont mis en place des structures de collecte et d'infiltration des eaux de ruissellement, qui sont principalement constituées par les bassins d'infiltration (Marsalek and Chocat, 2002). Cependant, ces structures sont également des réceptacles de la pollution urbaine, car ces molécules - extrêmement diversifiées - sont solubles ou s'adsorbent sur les particules de sédiments fins ; elles sont ainsi drainées par les eaux de ruissellement jusqu'à ces exutoires. A ce niveau, de nombreux polluants s'accumulent dans la couche de sédiments fins constitutifs des bassins d'infiltration. Dans ces sédiments vivent des invertébrés, tels que des vers tubificidés, qui doivent faire face à de très forts taux de pollution (Datry et al., 2003). Ainsi, ces organismes doivent obligatoirement mettre en place des réponses comportementales et/ou physiologiques pour survivre dans de telles conditions.

L'objectif général de cette thèse a été d'étudier l'impact d'un cocktail de polluants urbains :

- sur la physiologie et le comportement d'un organisme à la fois sentinelle et ingénieur, l'oligochète bioturbateur *Limnodrilus hoffmeisteri*,
- sur le fonctionnement d'un bassin d'infiltration (à l'interface eau-sédiment).

1.1. Impact de la pollution urbaine sur le comportement de *L. hoffmeisteri* et conséquences sur le fonctionnement d'un bassin d'infiltration

Les résultats (présentés dans le Chapitre 2) de l'expérimentation d'exposition de moyenne durée (1 mois) montrent que l'activité de creusement de galeries (bioturbation) de *L. hoffmeisteri* augmente dans les sédiments pollués (issus de bassins d'infiltration). En effet, nous avons observé que le nombre de structures biogéniques était plus important dans les sédiments contenant un cocktail de polluants urbains que dans le sédiment très peu pollué (témoin). Nous avons également noté une diminution du diamètre des galeries creusées dans

les sédiments les plus fortement pollués (DJ) ; ceci peut être dû en partie au plus fort pourcentage de sable (57.8%) dans ces sédiments qui peut entraîner un amincissement et une instabilité des galeries. En effet, la conformation et la stabilité des galeries peuvent dépendre des taux de sable et d'argile dans les sédiments (Rogaar, 1980). Malgré l'influence possible de la texture sédimentaire sur la morphologie des galeries, l'importance des caractéristiques chimiques, en termes de composés organiques et inorganiques, est très clairement à prendre en compte. Il a été montré par Michaud et al. (2010) que l'activité de creusement de galeries est positivement corrélée aux taux de matière organique contenue dans les sédiments. Les résultats de nos expérimentations vont dans ce sens, puisque les sédiments issus des bassins d'infiltration présentent à la fois un plus fort taux de matière organique (entre 11% et 14 % de matière organique totale) et un plus grand nombre de galeries creusées par les bioturbateurs que le sédiment peu pollué (2% de matière organique totale). Toutefois, cette augmentation de l'activité de fouissage observée chez les vers soumis aux polluants peut aussi être associée à un comportement d'évitement des toxiques. Les vers tubificidés chercheraient donc à fuir la pollution afin de trouver une zone moins contraignante. Ainsi, les vers seraient forcés d'explorer un plus grand volume de sédiment, ceci ayant mécaniquement pour conséquence une augmentation de leur activité de bioturbation dans les sédiments pollués. Capowiez et al. (2003) ont aussi observé cette augmentation d'activité chez des vers de terre (*Aporrectodea nocturna* et *Allolobophora icterica*) exposés à des herbicides, et l'ont expliqué par un « refus » des vers à réutiliser leurs galeries, les forçant ainsi à en créer de nouvelles. Dans une autre étude Capowiez et al. (2006) ont également pu observer que l'exposition de vers de terre (*Aporrectodea nocturna* et *Allolobophora icterica*) à un herbicide pouvait également modifier la longueur, l'horizontalité, la sinuosité, et le nombre de ramifications des galeries. La mesure de ces paramètres dans nos expérimentations aurait pu fournir des informations complémentaires concernant des effets de la pollution urbaine sur le réseau de galeries creusées par *L. hoffmeisteri*. Nous avons également observé une intensification de l'activité de fouissage entre 15 et 20 mm de profondeur pour les vers incubés dans les sédiments pollués des bassins d'infiltration, confortant alors l'hypothèse d'un comportement d'évitement de la pollution. Plusieurs études dans lesquelles *L. hoffmeisteri* était exposé à des polluants organiques ou inorganiques (Keilty et al., 1988 ; Ciutat et al., 2005) ont montré cette augmentation du volume de galeries dans cette zone dite « zone préférentielle de nourrissage ». Lagauzère et al. (2009), avance une hypothèse similaire pour le ver tubificidé *Tubifex tubifex* (qui présente une zone de nourrissage préférentielle identique à celle de *L. hoffmeisteri*) : celui-ci creuserait plus dans cette zone, car il est contraint de rechercher de

fines particules moins polluées. Cette ingestion de sédiment riche en matière organique leur permet aussi de continuer à obtenir le surplus d'énergie nécessaire aux mécanismes de défense contre les polluants urbains.

Les modifications qu'entraînent les polluants sur le comportement de *L. hoffmeisteri* peuvent avoir des conséquences sur le déroulement des processus biogéochimiques à l'interface eau-sédiment. En effet, ce ver tubificidé est un organisme ingénieur dont l'activité de bioturbation stimule, au sein des sédiments, le cycle de l'azote, la dégradation de la matière organique et le développement de bactéries jouant un rôle primordial sur la dépollution des eaux d'infiltration (Mermillod-Blondin et al. 2005 ; Nogaro et al., 2009 ; Taylor et al., 2015) (cf. Chapitre 1). Nos expérimentations ont confirmé le rôle « stimulateur » des vers tubificidés sur des processus biogéochimiques majeurs tels que le cycle de l'azote et sur la minéralisation de la matière organique, mais indépendamment de la présence de pollution. En effet, nous n'avons pas observé de différence entre sédiments fortement pollués et très peu pollués concernant les cycles biogéochimiques. Quel que soit le type de sédiment, le suivi des composés azotés montre un schéma classique (d'après Nogaro and Burgin, 2014) de reminéralisation : une nitrification initiale du NH_4^+ (traduit par une augmentation en NO_2^- et NO_3^- faisant suite une augmentation très rapide des concentrations en NH_4^+) suivie par une dénitrification (ou une assimilation) par les bactéries (correspondant à une diminution des concentrations en NO_2^- et NO_3^-). En outre et de façon plus surprenante, nous avons vu apparaître de nouveaux pics de nitrites et de nitrates à la fin de nos expérimentations (1 mois), qui peuvent s'expliquer par une importante sortie de bulles de CH_4 (ces bulles de méthane ont également pu être observées en tomographie, avec le CT-scan).

La minéralisation de la matière organique semble légèrement moins stimulée par les vers quand ceux-ci sont incubés dans les sédiments de Django ; ces résultats peuvent être expliqués par un plus fort taux de pollution dans les sédiments Django. Dans notre étude, la densité des galeries ne semble pas influencer sur le cycle de l'azote et sur le recyclage de la matière organique, contrairement à ce qu'ont pu montrer Ciutat and Boudou (2003). Si le flux d'eau créé dans ces galeries (i.e. la bioirrigation) a une influence significative sur les processus biogéochimiques, nous pouvons supposer qu'un flux créé par des vers qui ont fabriqué des galeries moins nombreuses mais plus stables serait équivalent à celui créé au sein d'un réseau de galeries plus nombreuses mais plus instables (car sédiment plus riche en sable).

1.2. Impact des polluants urbains sur la physiologie de *L. hoffmeisteri*

▪ Exposition de courte durée

Suite à une exposition de courte durée à un cocktail de polluants urbains (résultats présentés dans l'article 1), nous avons pu observer que plusieurs paramètres physiologiques majeurs de *L. hoffmeisteri* étaient modifiés.

De nombreuses études (revue dans Wu et al., 2014 ; Liu et al., 2016 ; Di et al., 2017) ont montré que la présence d'une multicontamination induit un stress oxydant, qui peut être estimé par le taux de peroxydation lipidique des membranes cellulaires (via la concentration en MDA/TBARS, composés résiduels issus de cette peroxydation). Or, les résultats de notre expérimentation indiquent plutôt une diminution du taux de peroxydation lipidique chez les vers incubés dans des sédiments fortement anthropisés. Ce résultat en apparence contradictoire sous-entend que ces organismes mettent très rapidement en place des mécanismes de défense antioxydants performants. Dans le cas de *L. hoffmeisteri*, la baisse de la concentration du marqueur des dégâts oxydatifs (MDA/TBARS) observée en milieu pollué est probablement due à une importante augmentation de l'activité de l'enzyme antioxydante superoxyde dismutase (SOD). De fait, l'activité de la SOD augmente significativement entre 15 et 30 jours pour les vers exposés aux sédiments présentant les plus fortes concentrations en métaux lourds. Sun and Zhou (2008) ont également pu constater une augmentation d'activité de cette enzyme chez le polychète marin *Nereis diversicolor* exposé à du cadmium et à des hydrocarbures pétroliers.

La mise en place et le fonctionnement de ces systèmes de défense contre le stress oxydant (et plus généralement contre les polluants) requièrent une grande quantité d'énergie qui peut être fournie par la matière organique ingérée lors de la bioturbation, mais aussi par les réserves énergétiques corporelles. La mobilisation de ces réserves peut être corrélée à la surconsommation d'O₂ transitoire observée chez les vers « pollués » (en début d'incubation), elle-même liée à la mise en place des premiers mécanismes de défense contre les toxiques. Nous observons ensuite un retour de la consommation d'O₂ à un niveau basal. Ces résultats semblent montrer que les mécanismes de défense mis en œuvre dans un premier temps sont très coûteux en énergie, puis que des dispositifs plus économiques sont ensuite utilisés, indiquant une possible acclimatation des vers. Les réserves corporelles en glycogène sont généralement les premières à être utilisées, suivies par une mobilisation des triglycérides, et enfin (en tout dernier recours) des protéines musculaires. Cependant, les stratégies

d'utilisation de ces réserves peuvent varier en fonction de l'espèce et du stress considéré. C'est par exemple le cas chez le crustacé souterrain *Niphargus rhenorhodanensis* (Hervant et al., 1999), chez qui les protéines sont rapidement utilisées lors d'un jeûne alimentaire de longue durée. Lors de notre étude, nous avons uniquement pu observer une utilisation des réserves en triglycérides chez les vers soumis à des polluants urbains, mais aussi (de façon plus surprenante) chez les vers témoins. La mobilisation préférentielle des réserves lipidiques peut s'expliquer par la forte demande énergétique liée à l'acclimatation des vers à leur nouvel environnement au cours des 15 premiers jours de l'expérimentation, et dans ce cas ce sont les triglycérides qui permettent de fournir la plus grande quantité d'énergie en comparaison du glycogène et des protéines (Koop et al., 2011). Mais les vers peuvent également utiliser préférentiellement les triglycérides dans le but d'épargner les réserves de glycogène, qui constitue la molécule principalement utilisée par les annélides en cas d'hypoxie environnementale (Schöttler and Bennett, 1991) ou de perturbation du métabolisme aérobie (Lauer et al., 2012). Nous détaillerons plus cet aspect métabolique dans le paragraphe suivant. Les réserves protéiques (principalement la masse musculaire de l'organisme) sont essentielles au maintien d'une activité de nourrissage/bioturbation, et seront, elles aussi, épargnées par une utilisation préférentielle des triglycérides. Une telle modification de l'allocation énergétique peut avoir des répercussions sur la fitness des organismes et/ou l'activité de fouissage, mais le coût de ces mécanismes n'a pas été estimé lors de cette expérimentation (Hochachka and Somero, 2002).

- **Exposition de longue durée**

Afin de nous rapprocher au plus près de la réalité des écosystèmes anthropisés, nous avons choisi de réaliser une expérimentation de plus longue durée en exposant *L. hoffmeisteri* aux 4 mêmes sédiments (contaminés ou non) que précédemment.

Les résultats présentés dans les articles 2 et 3 ont montré un impact des polluants sur la physiologie des vers tubificidés après 6 mois d'exposition. Nous avons ainsi pu observer un accroissement de la concentration en MDA (un marqueur des dégâts oxydatifs) à partir de 3 mois pour toutes les conditions, mais de façon plus prononcée chez les vers « contaminés » ; cette augmentation montre clairement que les polluants urbains induisent un stress oxydant après plusieurs mois d'incubation. Mais les organismes doivent absolument mettre en place des mécanismes de défenses ou de réparation pour limiter les dégâts oxydatifs (Turrens, 2003). Comme lors de l'expérimentation de courte durée, nous avons donc mesuré l'activité de l'enzyme antioxydante SOD. Contrairement à nos attentes, nous n'avons pas observé

d'accroissement de son activité, mais plutôt une inhibition. Les SOD constituent une famille d'enzymes incluant des ions métalliques jouant le rôle de cofacteurs (Zn, Cu, Mn). Les SOD peuvent être inhibées suite à une complexation de leurs cofacteurs métalliques avec certains polluants (HAPs ou métaux lourds) (Sharonov and Churilova, 1992 ; Maria and Bebianno, 2011). Cependant, le stress oxydant peut être limité par d'autres mécanismes ou molécules de défense, non mesurés dans cette étude (cytochromes P450, glutathion réduit... : chapitre 1 §3.3)

Ces mécanismes de défense nécessitent de grandes quantités d'énergie afin d'augmenter leur activité et/ou la concentration des molécules impliquées dans les tissus. Ces besoins énergétiques peuvent être fournis en partie par l'activité de nourrissage (matière organique ingérée durant la bioturbation), mais également au travers d'une utilisation accrue des réserves énergétiques corporelles (voir le chapitre précédent). De façon surprenante, nos résultats indiquent plutôt une augmentation des teneurs corporelles en triglycérides après 1 mois d'exposition aux sédiments les fortement concentrés en HAPs (IUT et Django), et ce malgré l'augmentation des dégâts liés au stress oxydant (MDA) observée chez ces vers. En parallèle, les réserves corporelles de glycogène diminuent de façon importante dès 3 mois d'exposition (à l'exception des vers incubés dans le sédiment Django, qui est le plus riche en matière organique). Enfin, nous observons une protéolyse chez les vers exposés aux sédiments les plus riches en HAPs (IUT et Django). Nous nous attendions plutôt à une mobilisation des triglycérides en réponse au stress chimique, puisque ces composés possèdent un meilleur rendement énergétique que le glycogène et les protéines et constituent de ce fait un bien meilleur carburant quand il s'agit d'alimenter des mécanismes de défense coûteux (Koop et al. 2011). Le glycogène et certains acides aminés constitutifs des protéines sont des molécules fermentescibles, qui à ce titre seront préférentiellement utilisées lors d'un épisode de manque d'oxygène. De plus, les protéines sont en général utilisées en dernier recours (Hervant et al., 1999), car la protéolyse diminue la masse musculaire et donc impacte les très nombreuses fonctions physiologiques impliquant des muscles ou une tunique musculaire (Le Maho, 1981). Dans le cas de *L. hoffmeisteri*, une importante protéolyse impactera obligatoirement l'activité de bioturbation, ce qui pourrait s'avérer catastrophique pour cet animal qui est obligé de creuser pour se nourrir. Les triglycérides sont des réserves qui sont métabolisées via la voie de la β -oxydation, uniquement en présence d'oxygène ; nous supposons donc que cette non-utilisation des triglycérides pourrait être la conséquence d'un dysfonctionnement du métabolisme aérobie suite à l'exposition au cocktail de polluants.

Plusieurs auteurs ont décrit l'impact des contaminants sur le fonctionnement de la mitochondrie, et plus largement sur du métabolisme aérobie, particulièrement au niveau de la chaîne de transport des électrons (ETC), des enzymes du cycle de Krebs et/ou des transporteurs de substrats (review in Meyer et al., 2013 ; Giacomini et al., 2014). D'autres études ont montré que les activités des enzymes du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire étaient modifiées par une exposition à des polluants retrouvés en milieu urbain tels que le cadmium ou le benzo-(a)-pyrène (Kurochkin et al., 2011 ; Oliveira et al., 2013 ; Ji et al., 2016). Nous avons également observé un dysfonctionnement du métabolisme aérobie au cours de notre étude de l'effet des contaminants sur la chaîne respiratoire mitochondriale (article soumis à ESPR). En effet, suite à une exposition de longue durée aux polluants urbains, nous avons observé une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire ainsi qu'une tendance à la diminution de la production d'ATP chez les vers exposés aux sédiments les plus concentrés en HAPs. Nos résultats nous permettent d'affirmer qu'il ne s'agit pas d'une diminution d'efficacité du bloc phosphorylant, puisque le ratio ATP/O ne semble pas être influencé par les polluants urbains. Ces diminutions d'activité paraissent plutôt être associées à un effet inhibiteur des polluants sur la chaîne de transport des électrons (ETC) et/ou en amont de celle-ci (transporteurs de substrats, enzymes du cycle de Krebs) (Grajeda y Ortega et al., 2011).

Lauer et al., (2012) ont émis l'hypothèse que l'exposition au cuivre du crabe *N. granulata* induisait une hypoxie fonctionnelle suite à l'inhibition de certaines enzymes du cycle de Krebs (notamment la citrate synthase), conduisant potentiellement à un déficit énergétique (car la production d'ATP baisserait fortement). Nous avons repris cette hypothèse d'une hypoxie fonctionnelle déclenchée par les polluants, en allant plus loin. Nous avons en effet supposé que les organismes soumis à un cocktail de contaminants urbains seraient forcés d'utiliser une voie métabolique non dépendante de l'oxygène pour compenser ce déficit énergétique. Nos résultats ont clairement mis en évidence une augmentation des concentrations corporelles de certains deux terminaux du métabolisme anaérobie (succinate et propionate) après 3 mois d'exposition chez les vers incubés dans les sédiments des bassins d'infiltration, confirmant l'hypothèse d'un dysfonctionnement du métabolisme aérobie lié à la présence de polluants urbains ayant pour conséquence une transition vers le métabolisme anaérobie. Les concentrations en lactate et en alanine sont restées inchangées durant notre expérimentation sur *L. hoffmeisteri* alors que Datry et al. (2003) avaient détecté ces produits terminaux en faible quantité chez *Tubifex tubifex* après exposition aux sédiments de ces

mêmes bassins d'infiltration. Nos résultats montrent clairement que *L. hoffmeisteri* utilise préférentiellement les voies anaérobies les plus rentables en termes de production d'ATP, à savoir la fermentation couplée du glucose (issu du glycogène) et de certains aminés menant à la production de succinate et de propionate et à synthèse d'ATP doublée ou triplée selon le produit terminal accumulé (Barret, 1991 ; Schöttler and Bennett, 1991). Toutefois, l'utilisation des voies anaérobies ne fournit pas autant d'énergie que le métabolisme aérobie et peut être considérée comme un désavantage. Malgré tout, cette transition métabolique présente l'avantage de diminuer la production de ROS (en diminuant significativement l'entrée de l'oxygène dans la cellule), et peut donc être perçue comme une réponse efficace pour limiter le stress oxydant lié aux polluants urbains.

- **Des réponses physiologiques différentes selon la durée d'exposition**

En tenant compte de l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse, nous observons que les réponses physiologiques mesurées chez *L. hoffmeisteri* divergent parfois fortement selon le temps d'exposition (1 ou 6 mois).

Ainsi, le stress oxydant est limité par l'activité croissante de l'enzyme SOD durant une incubation de courte durée (1 mois), alors que pendant une incubation de longue durée (6 mois), les dégâts oxydatifs ne cessent de croître suite à une probable inhibition de la SOD par les polluants urbains. De plus, la stratégie d'utilisation des réserves énergétiques diffère entre ces deux expérimentations. La non-utilisation des triglycérides lors d'un stress chimique long serait plutôt liée à un dysfonctionnement mitochondrial entraînant un passage en aérobiose et inhibant la β -oxydation (oxydation des acides gras issus de la dégradation des triglycérides). Cette transition vers un métabolisme anaérobie expliquerait donc l'utilisation préférentielle du glycogène et des acides aminés (issus d'une protéolyse), car il s'agit de molécules fermentescibles (cf chapitre 1 §2.3). Nous devons également noter que la plupart des réponses physiologiques marquées sont observées après 3 mois d'exposition aux sédiments, laissant supposer qu'une exposition à une pollution urbaine de seulement 1 mois ne permet pas d'établir des conclusions fiables concernant certaines réponses physiologiques - principalement liées à la balance oxydative - chez de *L. hoffmeisteri*.

La durée d'exposition de 1 mois aux sédiments représente le pas de temps commun à nos deux expérimentations (de courte et de longue durées), et nous avons pu observer des réponses différentes à 1 mois entre ces deux blocs de manipulations concernant le taux de

peroxydation lipidique, l'activité de la SOD et la stratégie d'allocation des réserves énergétiques corporelles. La réalisation de nos travaux a nécessité l'utilisation de sédiments pollués issus du terrain, et donc de composition variable dans le temps. Les analyses physico-chimiques de ces matrices ont révélé que les teneurs de HAPs étaient deux fois plus élevées dans les sédiments Minerve et Django utilisés lors de l'expérimentation de longue durée que dans les sédiments des mêmes bassins d'infiltration, mais prélevés pour l'étude de courte durée. Par contre, les concentrations en métaux lourds des sédiments utilisés au cours de nos deux expérimentations étaient similaires (cf. Tableaux 2 et 3). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que la variabilité des teneurs en HAPs des sédiments pollués pourrait en partie expliquer la variabilité des réponses écophysologiques observées chez *L. hoffmeisteri* entre nos deux expérimentations. Par ailleurs, nous avons mesuré dans les sédiments Minerve et Django la présence d'indéno-(1,2,3 cd)-pyrène ainsi que des concentrations en pyrène, phénanthrène, fluoranthène et de benzo-(ghi)-pérylène 1,5 à 2,5 fois supérieures aux teneurs rencontrées lors de l'expérimentation de courte durée. Nous pouvons ainsi supposer que les réponses observées chez *L. hoffmeisteri* lors de l'expérimentation de longue durée peuvent partiellement s'expliquer par des concentrations en HAP supérieures et/ou une plus grande diversité en HAP. Cependant, cela reste hypothétique, car nous ne sommes pas en mesure de savoir si ces différences physiologiques peuvent être expliquées par la présence de nouveaux HAPs au sein du cocktail de polluants ou par des concentrations plus fortes dans les sédiments utilisés lors de l'expérimentation de 6 mois, ou encore par l'association de ces deux caractéristiques. Les HAPs sont aussi connus pour leur capacité de complexation avec d'autres contaminants, pouvant ainsi engendrer des effets d'addition, de synergie, de potentialisation ou d'antagonisme. Warne and Hawker (1995) ont développé l'hypothèse de l'entonnoir (funnel hypothesis), qui prédit que dans des mélanges complexes de polluants, on observe le plus souvent un effet additif que synergétique entre les composés chimiques constitutifs, mais que cet effet reste toutefois dépendant de l'espèce étudiée, des polluants composant les mélanges, de leurs concentrations respectives et des conditions environnementales (principalement température et pH). D'autres expériences seront nécessaires pour combler cette lacune concernant l'éventuelle complexation des HAPs dans le cas des sédiments des bassins d'infiltration.

De façon surprenante, nous avons également pu observer, suite à nos expérimentations de longue durée, que certaines réponses physiologiques observées chez les vers « contrôles » soumis à une très faible pollution urbaine (= incubés dans le sédiment BALAN) présentaient

une tendance similaire (mais moins marquée) à celles observées chez les vers exposés à des sédiments fortement pollués. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence après 3 mois d'exposition aux sédiments que les vers « contrôles » et « pollués » montrent tous une diminution des réserves en glycogène et une accumulation de triglycérides. De plus, au niveau de la balance oxydative, nous avons mesuré une augmentation significative du taux de MDA, traduisant une augmentation des dégâts oxydatifs qui n'est pas compensée par l'action des enzymes antioxydantes SOD et catalase (dont les activités diminuent après 3 mois d'exposition aux sédiments). Ces réponses inattendues mesurées chez les vers « contrôles » laissent supposer qu'après 3 mois d'exposition, les très faibles concentrations en polluants contenus dans le sédiment témoin (BALAN) peuvent tout de même impacter la physiologie de *Limnodrilus hoffmeisteri*. De plus, nous ne pouvons exclure l'hypothèse de la présence d'autres polluants non recherchés/dosés dans le cadre de nos expériences (comme les pesticides) dans les sédiments « contrôles » qui pourraient avoir agi à de très faibles teneurs (concentrations subléthales : Leelaja and Rajini, 2013) et qui sont potentiellement capables de d'interagir avec certains constituants du cocktail de polluants urbains. L'utilisation de sédiments naturels totalement dénués de pollution aurait été plus pertinente dans le cadre de cette thèse, mais malheureusement ces sédiments sont devenus introuvables dans l'environnement. Nous avons envisagé dès le départ l'utilisation d'un sédiment artificiel (constitué de silice supplémentée en Tetramin©, comme Bertin et al. (2014) l'ont fait pour exposer des larves de *Chironomus riparius* à des composés perfluorés), mais *L. hoffmeisteri* est un oligochète bioturbateur et ce fait ses besoins sont plus « complexes » que ceux d'une larve de chironomidé. En effet, ce ver creuse des galeries dans des sédiments qu'il ingère et dont il tire son énergie. Un sédiment, pour lui convenir, doit contenir un fort pourcentage de particules fines (environ 63 µm) et une teneur élevée en matière organique très biotransformée (Ciutat et al., 2006). Ces caractéristiques en font un sédiment très difficile à reconstituer, sauf dans un macrocosme de grande dimension, en y regroupant sur une longue durée tous les organismes détritivores/saprophytes participant à la formation d'une matrice sédimentaire naturelle.

2. Perspectives

Dans cette partie, je proposerai plusieurs expérimentations qui permettraient de compléter et d'élargir mon travail de thèse, en prenant en compte le devenir (bioaccumulation et biotransformation) des polluants urbains à la fois au sein des organismes et des systèmes d'infiltration des eaux pluviales.

1 - Impact d'un cocktail de polluants sur la physiologie de *L. hoffmeisteri*

Afin de compléter le volet consacré aux réponses physiologiques, il serait pertinent de poursuivre notre analyse de l'induction du stress oxydant par les polluants en mesurant l'activité d'autres enzymes antioxydantes chez *L. hoffmeisteri*, en présence ou en l'absence de polluants, comme la catalase, la glutathion peroxidase (GPx). Nous pourrions aussi envisager de travailler sur des enzymes spécifiques au métabolisme des xénobiotiques, comme la cytochrome P450 et la glutathion transférase qui interviennent dans le processus de fonctionnalisation des contaminants (Jørgensen et al., 2005 ; Trisciani et al., 2012).

Au cours de cette thèse, nous avons cherché à quantifier l'impact des polluants urbains sur la chaîne respiratoire mitochondriale mitochondriale (cf. Article 2). Malheureusement, la mesure de l'activité du complexe mitochondrial IV (cytochrome c oxidase) n'a montré aucun effet significatif des contaminants. Les dosages des activités des complexes I, II et III sont donc à envisager de façon prioritaire, en particulier celle du complexe II (succinate déshydrogénase) qui lie le cycle de Krebs et l'ETC. De telles analyses nous permettraient de savoir quels sont les complexes mitochondriaux les plus inhibés par les contaminants, et à quel(s) niveau(x) leur action s'exerce.

De plus, de nombreux polluants présentent des propriétés lipophiles et s'accumulent préférentiellement dans les membranes phospholipidiques, pouvant créer une modification de la fluidité membranaire et ainsi impacter l'homéostasie cellulaire et la sensibilité des organismes aux contaminations (Korchowiec et al., 2008 ; Meyer et al. 2013). Ainsi, en exposant des vers aux différents sédiments utilisés au cours de cette thèse, nous pourrions observer les modifications des profils d'acides gras induites par les contaminants urbains chez *L. hoffmeisteri*, et ainsi déterminer si la présence de polluants peut diminuer le taux d'insaturation des acides gras membranaires et donc la fluidité de la membrane plasmique,

comme Gonzalez et al. (2013) ont pu l'observer chez le poisson *Carassius auratus auratus* exposé à un PCB (PCB-153).

2 - Devenir des polluants dans les organismes et au sein des sédiments

Des polluants tels que les HAPs et les métaux lourds, de par leurs propriétés hydrophobes, s'adsorbent sur les particules fines de matière organique, ce qui les rend « lessivables » par les eaux de pluie. Ils s'accumulent ensuite dans la couche de sédiment des bassins d'infiltration. Durant nos expérimentations, nous avons choisi d'utiliser comme modèle biologique un ver bioturbateur qui se nourrit de ces particules fines. De par ce mode de nutrition, la fraction biodisponible de polluants est maximisée et *L. hoffmeisteri* est directement et fortement exposé aux molécules, qu'il peut alors bioaccumuler puis potentiellement biotransformer/biodégrader. Ainsi, il serait pertinent de se pencher sur les capacités de bioaccumulation de *L. hoffmeisteri*, en mesurant la quantité de contaminants qu'il est capable de retenir dans ses tissus en conditions « naturelles ». Plusieurs études ont montré cette capacité de bioaccumulation chez des larves de chironomes (*Chironomus riparius*) exposées à des polluants organiques comme les composés perfluorés (Bertin et al., 2014). Les vers sont également capables de biotransformer certains de ces polluants via les voies métaboliques des xénobiotiques (Achazi et al., 1998 ; Jørgensen et al., 2005 ; Contardo-Jara and Wiegand, 2008). Les polluants organiques (HAPs) peuvent ainsi être segmentés en molécules plus petites, plus hydrosolubles (et donc plus facilement excrétables), mais souvent plus réactives/toxiques (Jørgensen et al., 2008 ; Schlenk et al., 2008). Cependant, les molécules issues de cette biotransformation restent relativement méconnues. Nous proposons donc d'évaluer les capacités de bioaccumulation/biodégradation de *L. hoffmeisteri* en mettant en place une expérimentation en microcosmes durant laquelle des vers seraient incubés pendant 15 jours dans des sédiments (pollués et non pollués), irradiés (afin de détruire tous les microorganismes) ou non irradiés, puis enrichis avec des HAPs marqués au ^{13}C . Pour se faire, il serait pertinent de choisir 3 HAPs marqués au ^{13}C (isotope stable) sur plusieurs carbones (pour que ce marquage soit retrouvé dans tous les métabolites secondaires) et présentant des caractéristiques de solubilité et de toxicité contrastées. Le naphtalène (toxicité faible, très soluble), le pyrène (toxicité modérée solubilité moyenne) et le benzo-a-pyrène (toxicité élevée, solubilité très faible) semblent être de bons candidats. En enrichissant de 10% (de la concentration « naturelle » de chaque HAP choisi) les microcosmes avec ces HAPs marqués, il serait donc possible, à la fin de l'expérimentation, d'identifier les produits de

biotransformation de ces HAPs grâce à un spectromètre de masse à ratio isotopique (IRMS) couplé à un spectromètre de masse (MS).

Le fait de travailler sur des sédiments irradiés (sans microorganismes) ou non nous permettrait de différencier l'activité de biotransformation des microorganismes vivant dans les sédiments de l'activité des vers (et de leur microfaune associée). En effet, les bactéries colonisant ce type de milieu présentent de grandes capacités de métabolisation des polluants (Juhász and Naidu, 2000). De plus, le développement de ces communautés bactériennes est influencé à la fois par la présence de vers et par celle des polluants (Mermillod-Blondin et al., 2013). Notre expérience permettrait donc de quantifier exactement l'influence d'un organisme ingénieur sur les processus de dégradation des contaminants.

ANNEXES

Annexes A

Tableau des 17 HAPs

Annexe 1. Les 17 HAPs présentant un risque pour l'Homme (tableau issu d'un rapport de l'INERIS, Leoz-Garziandia, 2000)

HAP	Log Kow (Coefficient de partage octanol-eau à 25°C d'après Huckins et al., 2006)	Toxicité	Cancérogénèse	Mutagenèse	Rapporté dans
Naphtalène	4,10	Modérée	Non confirmée		EPA-TSCA
Acénaphène	5,20	Modérée		Constatée	EPA-TSCA
Acénaphthylène	5,80	Modérée		Constatée	EPA-TSCA
Fluorène	6,20	Faible		Constatée	EPA-TSCA, IARC
Phénanthrène	6,40	Modérée		Constatée	EPA-TSCA, IARC
Anthracène	6,90	Modérée		Constatée	EPA-TSCA, IARC
Fluoranthène	5,20	Modérée	Non confirmée	Constatée *	EPA-TSCA, IARC
Pyrène	5,30	Modérée	Non confirmée	Constatée *	EPA-TSCA, IARC
Benzo[a]anthracène	5,76	Élevée	Confirmée	Constatée *	EPA-TSCA,

					IARC
Chrysène	5,60		Confirmée	Constatée *	EPA-TSCA, IARC
Benzo[<i>b</i>]fluoranthène	5,80		Confirmée	Constatée	IARC
Benzo[<i>k</i>]fluoranthène	6,20		Confirmée	Constatée	IARC
Benzo[<i>a</i>]pyrène	6,40	Élevée	Confirmée	Constatée *	EPA-TSCA, IARC
Indéno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrène	6,50		Confirmée	Constatée	EPA-TSCA, IARC
Benzo[<i>ghi</i>]pérylène	6,90		Non confirmée	Constatée	IARC
Dibenzo[<i>a,h</i>]anthracène	6,80	Élevée	Confirmée	Constatée *	EPA-TSCA, IARC

(*) Mutagène pour l'homme

IARC : Centre international de recherche sur le cancer (CIRC)

EPA-TSCA : Environmental Protection Agency-Toxic Substances Control Act

Annexes B

Analyses des sédiments Balan, Minerve, IUT et Django
réalisées par le laboratoire CARSO

Rapport d'analyse Page 1 / 2
Edité le : 09/04/2015

UCBL
M. Pierre MARMONIER

UMR CNRS 5023 - Bât Forel
43 bd du 11 novembre 1918
69622 VILLEURBANNE CEDEX

Le rapport établi ne concerne que les échantillons soumis à l'essai. Il comporte 2 pages.
La reproduction de ce rapport d'analyse n'est autorisée que sous la forme de fac-similé photographique intégral.
L'accréditation du COFRAC atteste de la compétence des laboratoires pour les seuls essais couverts par l'accréditation, identifiés par le symbole #.
Les paramètres sous-traités sont identifiés par (*).

Identification dossier :	LSE15-30047	Référence contrat :	LSEC13-3266
Identification échantillon :	LSE1503-39450-1		
Doc Adm Client :	Cde 4500286020		
Nature:	Sédiments		
Origine :	Témoin (Lône Balan)		
Dept et commune :	01 BALAN		
Prélèvement :	Prélevé le 20/03/2015 à 10h00 Réceptionné le 23/03/2015 Prélevé par le client UMR 5023 / Fred Hervant		

Les données concernant la réception, la conservation, le traitement analytique de l'échantillon et les incertitudes de mesure sont consultables au laboratoire. Pour déclarer, ou non, la conformité à la spécification, il n'a pas été tenu explicitement compte de l'incertitude associée au résultat.

Date de début d'analyse le 24/03/2015

Paramètres analytiques	Résultats	Unités	Méthodes	Normes	Limites de qualité	Références de qualité	COFRAC
Analyses physicochimiques							
<i>Préparation</i>							
Refus de tamisage à 2 mm	0.00	%	Séchage, tamisage	Méthodes internes			#
<i>Analyses physicochimiques de base</i>							
Indice hydrocarbures C10-C40	178	mg/kg MS	GC/FID après ASE	Méth.interne M_ST061 version 3			#
<i>Métaux</i>							
Minéralisation HCl/HNO3	-	-	Minéralisation aux micro-ondes	NF EN 13346 partie C			#
Cadmium total	0.3	mg/kg MS	ICP/MS après minéralisation eau régale	selon NF EN ISO 13346, NF EN ISO 17294-2			#
Cuivre total	7.82	mg/kg MS	ICP/MS après minéralisation eau régale	selon NF EN ISO 13346, NF EN ISO 17294-2			#
Plomb total	15.0	mg/kg MS	ICP/AES après minéralisation eau régale	selon NF EN ISO 13346 et NF EN ISO 11885			#

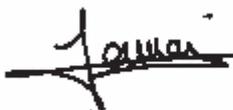
Doc Adm Client : Cde 4500286020

Paramètres analytiques	Résultats	Unités	Méthodes	Normes	Limites de qualité	Références de qualité	COFRAC
Zinc total	50.6	mg/kg MS	ICP/AES après minéralisation eau régale	selon NF EN ISO 13346 et NF EN ISO 11885			#
HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques							
HAP							
Acénaphthylène	17HAP < 10	µg/kg MS	HPLD/DAD après ASE	XP X 33-012			#
Fluoranthène	17HAP 102	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Benzo (b) fluoranthène	17HAP 84	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Benzo (k) fluoranthène	17HAP 27	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Benzo (a) pyrène	17HAP 49	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Benzo (ghi) pérylène	17HAP 57	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Indéno (1,2,3 cd) pyrène	17HAP 47	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Anthracène	17HAP 13	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Acénaphthène	17HAP < 10	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Chrysène	17HAP 72	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Dibenzo (a,h) anthracène	17HAP < 10	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Fluorène	17HAP < 10	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Naphtalène	17HAP < 10	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Pyrène	17HAP 83	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Phénanthrène	17HAP 48	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
2-méthyl fluoranthène	17HAP < 10	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Benzo (a) anthracène	17HAP 39	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#

17HAP

17 HAP DANS LES SEDIMENTS

Laure LAMAISSON
Responsable de laboratoire



Rapport d'analyse Page 1 / 2
Edité le : 09/04/2015

UCBL
M. Pierre MARMONIER

UMR CNRS 5023 - Bât Forel
43 bd du 11 novembre 1918
69622 VILLEURBANNE CEDEX

Le rapport établi ne concerne que les échantillons soumis à l'essai. Il comporte 2 pages.
La reproduction de ce rapport d'analyse n'est autorisée que sous la forme de fac-similé photographique intégral.
L'accréditation du COFRAC atteste de la compétence des laboratoires pour les seuls essais couverts par l'accréditation, identifiés par le symbole #.
Les paramètres sous-traités sont identifiés par (*).

Identification dossier :	LSE15-30047	Référence contrat :	LSEC13-3266
Identification échantillon :	LSE1503-39448-1		
Doc Adm Client :	Cde 4500286020		
Nature:	Sédiments		
Origine :	MIN (bassin Minerve)		
Dept et commune :	69 BRON		
Prélèvement :	Prélevé le 20/03/2015 à 10h00 Réceptionné le 23/03/2015 Prélevé par le client UMR 5023 / Fred Hervant		

Les données concernant la réception, la conservation, le traitement analytique de l'échantillon et les incertitudes de mesure sont consultables au laboratoire. Pour déclarer, ou non, la conformité à la spécification, il n'a pas été tenu explicitement compte de l'incertitude associée au résultat.

Date de début d'analyse le 24/03/2015

Paramètres analytiques	Résultats	Unités	Méthodes	Normes	Limites de qualité	Références de qualité	COFRAC
Analyses physicochimiques							
<i>Préparation</i>							
Refus de tamisage à 2 mm	0.00	%	Séchage, tamisage	Méthodes internes			#
<i>Analyses physicochimiques de base</i>							
Indice hydrocarbures C10-C40	3348	mg/kg MS	GC/FID après ASE	Méth.interne M_ST061 version 3			#
<i>Métaux</i>							
Minéralisation HCl/HNO3	-	-	Minéralisation aux micro-ondes	NF EN 13346 partie C			#
Cadmium total	0.8	mg/kg MS	ICP/MS après minéralisation eau régale	selon NF EN ISO 13346, NF EN ISO 17294-2			#
Cuivre total	300.0	mg/kg MS	ICP/AES après minéralisation eau régale	selon NF EN ISO 13346 et NF EN ISO 11885			#
Plomb total	122.0	mg/kg MS	ICP/AES après minéralisation eau régale	selon NF EN ISO 13346 et NF EN ISO 11885			#

Doc Adm Client : Cde 4500286020

Paramètres analytiques	Résultats	Unités	Méthodes	Normes	Limites de qualité	Références de qualité	COFRAC
Zinc total	1397.0	mg/kg MS	ICP/AES après minéralisation eau régale	selon NF EN ISO 13346 et NF EN ISO 11885			#
HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques							
HAP							
Acénaphthylène	17HAP	< 10	µg/kg MS	HPLD/DAD après ASE	XP X 33-012		#
Fluoranthène	17HAP	362	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012		#
Benzo (b) fluoranthène	17HAP	368	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012		#
Benzo (k) fluoranthène	17HAP	119	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012		#
Benzo (a) pyrène	17HAP	178	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012		#
Benzo (ghi) pérylène	17HAP	575	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012		#
Indéno (1,2,3 cd) pyrène	17HAP	319	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012		#
Anthracène	17HAP	21	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012		#
Acénaphthène	17HAP	< 10	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012		#
Chrysène	17HAP	278	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012		#
Dibenzo (a,h) anthracène	17HAP	< 10	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012		#
Fluorène	17HAP	< 10	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012		#
Naphtalène	17HAP	< 10	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012		#
Pyrène	17HAP	501	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012		#
Phénanthrène	17HAP	232	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012		#
2-méthyl fluoranthène	17HAP	< 10	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012		#
Benzo (a) anthracène	17HAP	113	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012		#

17HAP

17 HAP DANS LES SEDIMENTS

Laure LAMAISSON
Responsable de laboratoire



Rapport d'analyse Page 1 / 2
Edité le : 08/04/2015

UCBL
M. Pierre MARMONIER

UMR CNRS 5023 - Bât Forel
43 bd du 11 novembre 1918
69622 VILLEURBANNE CEDEX

Le rapport établi ne concerne que les échantillons soumis à l'essai. Il comporte 2 pages.
La reproduction de ce rapport d'analyse n'est autorisée que sous la forme de fac-similé photographique intégral.
L'accréditation du COFRAC atteste de la compétence des laboratoires pour les seuls essais couverts par l'accréditation, identifiés par le symbole #.
Les paramètres sous-traités sont identifiés par (*).

Identification dossier :	LSE15-30047	Référence contrat :	LSEC13-3266
Identification échantillon :	LSE1503-39449-1		
Doc Adm Client :	Cde 4500286020		
Nature:	Sédiments		
Origine :	IUT (bassin IUT)		
Dept et commune :	69 VILLEURBANNE		
Prélèvement :	Prélevé le 20/03/2015 à 10h00 Réceptionné le 23/03/2015 Prélevé par le client UMR 5023 / Fred Hervant		

Les données concernant la réception, la conservation, le traitement analytique de l'échantillon et les incertitudes de mesure sont consultables au laboratoire. Pour déclarer, ou non, la conformité à la spécification, il n'a pas été tenu explicitement compte de l'incertitude associée au résultat.

Date de début d'analyse le 24/03/2015

Paramètres analytiques	Résultats	Unités	Méthodes	Normes	Limites de qualité	Références de qualité	COFRAC
Analyses physicochimiques							
<i>Préparation</i>							
Refus de tamisage à 2 mm	0.00	%	Séchage, tamisage	Méthodes internes			#
<i>Analyses physicochimiques de base</i>							
Indice hydrocarbures C10-C40	1067	mg/kg MS	GC/FID après ASE	Méth.interne M_ST061 version 3			#
<i>Métaux</i>							
Minéralisation HCl/HNO3	-	-	Minéralisation aux micro-ondes	NF EN 13346 partie C			#
Cadmium total	2.9	mg/kg MS	ICP/AES après minéralisation eau régale	selon NF EN ISO 13346 et NF EN ISO 11885			#
Cuivre total	179.6	mg/kg MS	ICP/AES après minéralisation eau régale	selon NF EN ISO 13346 et NF EN ISO 11885			#
Plomb total	210.6	mg/kg MS	ICP/AES après minéralisation eau régale	selon NF EN ISO 13346 et NF EN ISO 11885			#

Doc Adm Client : Cde 4500286020

Paramètres analytiques	Résultats	Unités	Méthodes	Normes	Limites de qualité	Références de qualité	COFRAC
Zinc total	764.6	mg/kg MS	ICP/AES après minéralisation eau régale	selon NF EN ISO 13346 et NF EN ISO 11885			#
HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques							
HAP							
Acénaphthylène	17HAP < 10	µg/kg MS	HPLD/DAD après ASE	XP X 33-012			#
Fluoranthène	17HAP 2314	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Benzo (b) fluoranthène	17HAP 1214	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Benzo (k) fluoranthène	17HAP 540	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Benzo (a) pyrène	17HAP 1145	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Benzo (ghi) pérylène	17HAP 968	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Indéno (1,2,3 cd) pyrène	17HAP 981	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Anthracène	17HAP 189	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Acénaphthène	17HAP 215	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Chrysène	17HAP 1692	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Dibenzo (a,h) anthracène	17HAP 400	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Fluorène	17HAP 189	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Naphtalène	17HAP < 10	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Pyrène	17HAP 2186	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Phénanthrène	17HAP 1789	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
2-méthyl fluoranthène	17HAP < 10	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Benzo (a) anthracène	17HAP 1101	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#

17HAP

17 HAP DANS LES SEDIMENTS

Nadège LIGOT
Responsable Adjointe de Laboratoire



Rapport d'analyse Page 1 / 2
Edité le : 09/04/2015

UCBL
M. Pierre MARMONIER

UMR CNRS 5023 - Bât Forel
43 bd du 11 novembre 1918
69622 VILLEURBANNE CEDEX

Le rapport établi ne concerne que les échantillons soumis à l'essai. Il comporte 2 pages.
La reproduction de ce rapport d'analyse n'est autorisée que sous la forme de fac-similé photographique intégral.
L'accréditation du COFRAC atteste de la compétence des laboratoires pour les seuls essais couverts par l'accréditation, identifiés par le symbole #.
Les paramètres sous-traités sont identifiés par (*).

Identification dossier :	LSE15-30047	Référence contrat :	LSEC13-3266
Identification échantillon :	LSE1503-39447-1		
Doc Adm Client :	Cde 4500286020		
Nature:	Sédiments		
Origine :	DJ (bassin Django Reinhardt)		
Dept et commune :	69 CHASSIEU		
Prélèvement :	Prélevé le 20/03/2015 à 10h00 Réceptionné le 23/03/2015 Prélevé par le client UMR 5023 / Fred Hervant		

Les données concernant la réception, la conservation, le traitement analytique de l'échantillon et les incertitudes de mesure sont consultables au laboratoire. Pour déclarer, ou non, la conformité à la spécification, il n'a pas été tenu explicitement compte de l'incertitude associée au résultat.

Date de début d'analyse le 24/03/2015

Paramètres analytiques	Résultats	Unités	Méthodes	Normes	Limites de qualité	Références de qualité	COFRAC
Analyses physicochimiques							
<i>Préparation</i>							
Refus de tamisage à 2 mm	0.00	%	Séchage, tamisage	Méthodes internes			#
<i>Analyses physicochimiques de base</i>							
Indice hydrocarbures C10-C40	7743	mg/kg MS	GC/FID après ASE	Méth.interne M_ST061 version 3			#
<i>Métaux</i>							
Minéralisation HCl/HNO3	-	-	Minéralisation aux micro-ondes	NF EN 13346 partie C			#
Cadmium total	2.3	mg/kg MS	ICP/AES après minéralisation eau régale	selon NF EN ISO 13346 et NF EN ISO 11885			#
Cuivre total	314.5	mg/kg MS	ICP/AES après minéralisation eau régale	selon NF EN ISO 13346 et NF EN ISO 11885			#
Plomb total	198.6	mg/kg MS	ICP/AES après minéralisation eau régale	selon NF EN ISO 13346 et NF EN ISO 11885			#

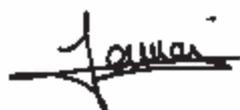
Doc Adm Client : Cde 4500286020

Paramètres analytiques	Résultats	Unités	Méthodes	Normes	Limites de qualité	Références de qualité	COFRAC
Zinc total	2528.0	mg/kg MS	ICP/AES après minéralisation eau régale	selon NF EN ISO 13346 et NF EN ISO 11885			#
HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques							
HAP							
Acénaphthylène	17HAP < 10	µg/kg MS	HPLD/DAD après ASE	XP X 33-012			#
Fluoranthène	17HAP 551	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Benzo (b) fluoranthène	17HAP 436	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Benzo (k) fluoranthène	17HAP 161	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Benzo (a) pyrène	17HAP 263	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Benzo (ghi) pérylène	17HAP 562	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Indéno (1,2,3 cd) pyrène	17HAP 385	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Anthracène	17HAP 23	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Acénaphthène	17HAP < 10	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Chrysène	17HAP 368	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Dibenzo (a,h) anthracène	17HAP < 10	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Fluorène	17HAP < 10	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Naphtalène	17HAP < 10	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Pyrène	17HAP 633	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Phénanthrène	17HAP 325	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
2-méthyl fluoranthène	17HAP < 10	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#
Benzo (a) anthracène	17HAP 192	µg/kg MS	HPLC/FLUO après ASE	XP X33-012			#

17HAP

17 HAP DANS LES SEDIMENTS

Laure LAMAISON
Responsable de laboratoire



REFERENCES

- Abràmoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ (2004) Image processing with ImageJ. *Biophoton. Int.* 11, 36–42.
- Achazi R., Flenner C, Livingstone D., et al (1998) Cytochrome P450 and dependent activities in unexposed and PAH-exposed terrestrial annelids. *Comp Biochem Physiol Part C* 121:339–350
- Aebi H (1984) Oxygen Radicals in Biological Systems. *Methods Enzymol* 105:121–126
- Alessandri J-M, Guesnet P, Vancassel S, et al (2004) Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reprod Nutr Dev* 44:509–538
- Amiard J-C, Amiard-Triquet C, Barka S, et al (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat Toxicol* 76:160–202
- Amiard JC, Cosson RP (1997) Les métallothionéines. Lagadic, L, Caquet, T, Amiard, J-C, Ramade, F, Masson (Eds), *Biomarqueurs en écotoxicologie - Aspects Fondam* Masson, Paris 53–66
- Aquilino M, Sánchez-Argüello P, Martínez-Guitarte JL (2018) Genotoxic effects of vinclozolin on the aquatic insect *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). *Environ Pollut* 232: 563–570
- Arendarczyk A, Jakubowska A, Zgórska A, Grabińska-Sota E (2014) Toxic effects of cadmium-spiked sediments in *Tubifex tubifex*: enzyme biomarkers measurements. *Desalin Water Treat* 52: 3798–3803
- Arnold, C.L., Gibbons, C.J., 1996. Impervious surface coverage: the emergence of a key environmental indicator. *J Am Plan Assoc* 62: 243–258.
- Babu TS, Marder JB, Tripuranthakam S, et al (2001) Synergistic effects of a photooxidized polycyclic aromatic hydrocarbon and copper on photosynthesis and plant growth: evidence that in vivo formation of reactive oxygen species is a mechanism of copper toxicity. *Environ Toxicol Chem* 20:1351–8
- Backer JM, Weinstein IB (1982) Interaction of benzo (a) pyrene and its dihydrodiol-epoxide derivative with nuclear and mitochondrial DNA in C3h10t½ cell cultures. *Cancer Res* 42:2764–2769
- Barata C, Varo I, Navarro JC, et al (2005) Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp Biochem Physiol Part C* 140:175–86
- Barraud S, Gibert J, Winiarski T, Bertrand-Krajewski JL, (2002) Implementation of a monitoring system to measure impact of stormwater runoff infiltration. *Water Sci Technol.* 45: 203–210.

- Barret, J (1991) Parasitic helminths. In: Bryant C (ed) Metazoan life without oxygen. Chapman and Hall, London, pp 146–164
- Benard G, Karbowski M (2009) Mitochondrial fusion and division: Regulation and role in cell viability. In: Seminars in cell & developmental biology. Elsevier, pp 365–374
- Bergmeyer, HU (1985) Methods of Enzymatic Analysis, vols VI-VIII (ed HU Bergmeyer). Weinheim, Basel: Verlag Chemie
- Berlett BS, Stadtman ER, Berlett BS, Stadtman ER (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272:20313–20316
- Bertin D, Ferrari BJD, Labadie P, et al (2014) Bioaccumulation of perfluoroalkyl compounds in midge (*Chironomus riparius*) larvae exposed to sediment. *Environ Pollut* 189:27–34
- Bertrand JC, Mille G (1989) Future of Exogenous Organic Matter. A Model: Hydrocarbons. *Microorg Ocean Ecosyst Masson*, Paris 343–385
- Blachly-Dyson E, Forte M (2001) VDAC channels. *IUBMB Life* 52:113–118
- Boldina-Cosquerie I, Amiard J-C, Amiard-Triquet C, et al (2010) Biochemical, physiological and behavioural markers in the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* as tools for the assessment of estuarine sediment quality. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:1733–41
- Boucher G, Clavier J, Garrigue C (1994) Oxygen and carbon dioxide fluxes at the water-sediment interface of a tropical lagoon. *Mar Ecol Prog Ser* 107: 85–193.
- Bouchet VMP, Sauriau PG, Debenay JP, Mermillod-Blondin, F, Schmidt S, Amiard JC, Dupas B, (2009) Influence of the mode of macrofauna-mediated bioturbation on the vertical distribution of living benthic foraminifera: first insight from axial tomodensitometry. *J Exp Mar Biol Ecol* 371: 20–33.
- Bowen JL, Babbitt AR, Kearns PJ, Ward BB (2014) Connecting the dots: linking nitrogen cycle gene expression to nitrogen fluxes in marine sediment mesocosms. *Front Microbiol* 5: 1–10.
- Boxall ABA (2014) *Global Climate Change and Environmental Toxicology*, Third Edit. Elsevier
- Boyer PD (1997) The ATP synthase - a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* 66:717–749
- Brand MD, Nicholls DG (2011) Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* 435:297–312
- Bricker DK, Taylor EB, Schell JC, et al (2013) A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, drosophila, and humans. 337:96–100
- Buffiere JY, Maire E, Adrien J, Masse JP, Boller E (2010) In situ experiments with X-ray tomography: an attractive tool for experimental mechanics. *Exp Mech* 50: 289–305.

- Byczkowski JZ, Sorenson JRJ (1984) Effects of metal compounds on mitochondrial function: A review. *Sci Total Environ* 37:133–162
- Cai L, Satoh M, Tohyama C, Cherian MG (1999) Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. *Toxicology* 132:85–98
- Cannino G, Ferruggia E, Luparello C, Rinaldi AM (2009) Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion* 9:377–384
- Capowiez 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 .
- Capowiez Y, Rault M, Mazzia C, Belzunces L (2003) Earthworm behaviour as a biomarker – a case study using imidacloprid. *Pedobiologia* 47: 542–547.
- Carrière A, Galinier A, Fernandez Y, et al (2006) Les espèces actives de l’oxygène: Le yin et le yang de la mitochondrie. *Medecine/Sciences* 22:47–53
- Carvalho CS, Fernandes MN (2008) Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp Biochem Physiol Part C* 151, 437–442
- Chapman PM, Brinkhurst RO (1984) Lethal and sublethal tolerances of aquatic oligochaetes with reference to their use as a biotic index of pollution. *Hydrobiologia* 115:139–144
- Chapman PM, Farrel MA, Brinkhurst RO (1982) Relative tolerance of selected aquatic oligochaetes to industrial pollutants and environmental factors. *Aquat Toxicol* 247:67
- Chapman PM, Farrell MA, Brinkhurst RO (1982) Effects of species interactions on the survival and respiration of *Limnodrilus hoffmeisteri* and *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae) exposed to various pollutants and environmental factors. *Water Res.* 16:1405–1408
- Cheng CH, Huettel M, Wildman RA (2014) Ebullition-enhanced solute transport in coarse-grained sediments. *Limnol Oceanogr* 59: 1733–1748.
- Cherel Y, Robin J-P, Heitz A, Calgari C, Le Maho Y (1992) Relationship between lipid availability and protein utilization during prolonged fasting. *J Comp Physiol Part B* 162(4): 305-313.
- Cheung APL, Lam TH-J, Chan KM (2004) Regulation of *Tilapia* metallothionein gene expression by heavy metal ions. *Mar Environ Res* 58:389–394
- Chocat B (1997) Encyclopédie de l’hydrologie urbaine et de l’assainissement., Editions T. Paris

- 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, 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.
- 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
- Cochón a C, Della Penna a B, Kristoff G, et al (2007) Differential effects of paraquat on oxidative stress parameters and polyamine levels in two freshwater invertebrates. *Ecotoxicol Environ Saf* 68:286–92
- Colinet H, Renault D, Roussel D (2017) Cold acclimation allows *Drosophila* flies to maintain mitochondrial functioning under cold stress. *Insect Biochem Mol Biol* 80: 52–60
- Congdon JD, Dunham AE, Hopkins WA, et al (2001) Resource allocation-based life histories: a conceptual basis for studies of ecological toxicology. *Environ Toxicol Chem* 20:1698–1703
- Contardo-Jara V, Wiegand C (2008) Biotransformation and antioxidant enzymes of *Lumbriculus variegatus* as biomarkers of contaminated sediment exposure. *Chemosphere* 70:1879–88
- Covich AP, Austen MC, Bärlocher F, Chauvet E, Cardinale BJ, Biles CL, Inchausti P, Dangles O, Solan M, Gessner MO, Statzner B, Moss B (2004) The role of biodiversity in the functioning of freshwater and marine benthic ecosystems. *Bioscience* 54: 767–765.
- Datry T, Hervant F, Malard F, Vitry L, Gibert J (2003) Dynamics and adaptive responses of invertebrates to suboxia in contaminated sediments of a stormwater infiltration basin. *Arch Hydrobiol* 156:339–359
- Datry T, Malard F, Vitry L, Hervant F, Gibert J (2003a) Solute dynamics in the bed sediments of a stormwater infiltration basin. *J Hydrol* 273: 217–233.
- Davies KJA (2000) Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 50:279–289
- De Coen WM, Janssen CR, Segner H (2001) The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing V. In vivo alterations in the carbohydrate metabolism of *Daphnia magna* exposed to sublethal concentrations of mercury and lindane. *Ecotoxicol Environ Saf* 48:223–234
- De Montety L, Long B, Desrosiers G, Cremer JF, Locat J, Stora G (2003) The use of computerized tomography in the study of sediments: influence of physical, chemical and biological parameters on the measurement of tomographic intensities. *Can J Earth Sci* 40: 937–948.

- De Zwaan A, Cortesi P, Cattani O (1995) Resistance of bivalves to anoxia as a response to pollution-induced environmental stress. *Sci Total Environ* 171:121–125
- DeLeve LD, Kaplowitz N (1991) Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 52:287–305
- Devaux A, Bony S, Plenet S, et al (2015) Field evidence of reproduction impairment through sperm DNA damage in the fish nase (*Chondrostoma nasus*) in anthropized hydrosystems. *Aquat Toxicol* 169: 113–122
- Di Giulio, R.T., Meyer JN (2008) Reactive oxygen species and oxidative stress. In: Di Giulio, R.T., Hinton DE (Eds) *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, New York, NY, pp 273–324
- Di S, Liu R, Cheng C, et al (2017) Biomarkers in *Tubifex tubifex* for the metalaxyl and metalaxyl-M toxicity assessment in artificial sediment. *Environ Sci Pollut Res* 24:3618–3625.
- Dufour SC, Desrosiers G., Long B, Lajeunesse P, Gagnoud M, Labrie J (2005) A new method for three-dimensional visualization and quantification of biogenic structures in aquatic sediments using axial tomodesitometry. *Limnol Oceanogr Methods* 3: 372–380.
- Durou C., Mouneyrac C., Pellerin J., Péry A., 2008. Conséquences des perturbations du métabolisme énergétique. Dans *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques*. Paris : Lavoisier. p. 273-289.
- Eom IC, Rast C, Veber AM, Vasseur P (2007) Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicol Environ Saf* 67: 190–205
- Etiemble A, Adrien J, Maire E, Idrissi H, Reyter D, Roué L (2014) 3D morphological analysis of copper foams as current collectors for Li-ion batteries by means of X-ray tomography. *Mater Sci Eng B-Adv* 187: 1–83.
- Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239–247
- Fischer E, Molnar L (1992) Environmental aspects of the chloragogenous tissue of earthworms. *Soil Biol Biochem* 24:1723–1727
- Fisher JB, Lick WJ, McCall PL, Robbins JA (1980) Vertical mixing of lake sediments by tubificid oligochaetes. *J Geophys Res Ocean* 85:3997–4006
- Flohe L, Otting F (1984) Superoxide-dismutase assays. *Methods Enzymol* 105: 93–104.
- Fowler BA, Hildebrand CE, Kojima Y, Webb M (1987) Nomenclature of metallothionein. In: *Metallothionein II*. Springer, pp 19–22
- Fraysse B, Geffard O, Berthet B, et al (2006) Importance of metallothioneins in the cadmium detoxification process in *Daphnia magna*. *Comp Biochem Physiol Part C* 144:286–293

- Friedberg T, Bentley P, Stasiecki P, et al (1979) The identification, solubilization, and characterization of microsome-associated glutathione S-transferases. *J Biol Chem* 254:12028–12033
- Gagnon MM, Holdway DA (1999) Metabolic enzyme activities in fish gills as biomarkers of exposure to petroleum hydrocarbons. *Ecotoxicol Environ Saf* 44:92–99
- Gagnon MM, Holdway DA (1999) Metabolic enzyme activities in fish gills as biomarkers of exposure to petroleum hydrocarbons. *Ecotoxicol Environ Saf* 44: 92–99
- Garric J, Morin S, Vincent-Hubert F (2010) Les biomarqueurs en écotoxicologie : définition, intérêt, limite, usage. *Sci Eau Territ* 1: 12–17
- Gauthier PT, Norwood WP, Prepas EE, Pyle GG (2014) Metal-PAH mixtures in the aquatic environment: A review of co-toxic mechanisms leading to more-than-additive outcomes. *Aquat Toxicol* 154:253–269
- Geffard A, Amiard JC, Amiard-Triquet C (2002) Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker: seasonal and intersite fluctuations. *Biomarkers* 7:123–137
- Geffard A, Quéau H, Dedourge O, et al (2007) Influence of biotic and abiotic factors on metallothionein level in *Gammarus pulex*. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 145:632–640
- Gette-Bouvarot M, Mermillod-Blondin F, Angullo-Jaramillo R, Delolme C, Lemoine D, Lassabatere L, Volatier L (2014) Coupling hydraulic and biological measurements highlights the key influence of algal biofilm on infiltration basin performance. *Ecohydrology* 7: 950–964.
- Giacomin M, Jorge MB, Bianchini A (2014) Effects of copper exposure on the energy metabolism in juveniles of the marine clam *Mesodesma mactroides*. *Aquat Toxicol* 152:30–37
- Girón-Pérez MI, Romero-Bañuelos C a, Toledo-Ibarra G a, et al (2013) Evaluation of pollution in Camichin estuary (Mexico): pro-oxidant and antioxidant response in oyster (*Crassostrea corteziensis*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 165:476–82
- Gonzalez A, Odjélé A, Weber JM (2013) PCB-153 and temperature cause restructuring of goldfish membranes: Homeoviscous response to a chemical fluidiser. *Aquat Toxicol* 144–145:11–18
- Grajeda y Ortega, MDLA, Ortiz Ordoñez E, Favari L, Shibayama M, Silva Olivares A, López López E (2011) Biochemical and Mitochondrial Changes Induced by Cd, Fe and Zn in *Limnodrillus hoffmeisteri*. *Int J Morphol* 29:412–419
- Grasshoff K, Ehrhardt M, Kremling K (1983) *Methods of Seawater Analysis*. second ed. Verlag Chemie, Berlin.

- Grebel JE, Mohanty SK, Torkelso Aa, Boehm AB, Higgins CP, Maxwell RM, Nelson KL, Sedlak DL (2013) Engineered infiltration systems for urban stormwater reclamation. *Environ Eng Sci* 30: 437–454.
- Griebler C, Avramov M (2015) Groundwater ecosystem services : a review. 34:355–367
- Guéguen Y, Mouzat K, Ferrari L, et al (2006) Les cytochromes P450: Métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. 64:535–548
- Guérin C, Giani N (1996) Analytical study of the locomotor and respiratory movements of tubificid worms by means of video recording. *Hydrobiologia* 333:63–69
- Habig W, Pabst M, Jakoby W (1974) Glutathione S-Transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130–7139
- Hajime O, Ozaki K and Yoshikawa H (2005) Identification of cytochrome P450 and glutathione-S-transferase genes preferentially expressed in chemosensory organs of the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus* L. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 8: 837–846.
- Halliwell B, Gutteridge Jm (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219:1
- Hayes JD, Pulford DJ (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part II. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30:521–600
- Hellou J (2011) Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. *Environ Sci Pollut Res* 18: 1–11
- Hervant F, Mathieu J, Barre H (1999) Comparative study on the metabolic responses of subterranean and surface-dwelling amphipods to long-term starvation and subsequent refeeding. *J Exp Biol* 202:3587–3595
- Hervant F, Mathieu J, Barré H, Simon K, Pinon C (1997) Comparative study on the behavioral, ventilatory, and respiratory responses of hypogean and epigean crustaceans to long-term starvation and subsequent feeding. *Comp Biochem Physiol Part A* 118:1277–1283
- Hervant F, Mathieu J, Garin D, Fréminet A (1995) Behavioral, ventilatory, and metabolic responses to severe hypoxia and subsequent recovery of the hypogean *Niphargus rhenorhodanensis* and the epigean *Gammarus fossarum* (Crustacea: Amphipoda). *Physiol Zool* 68:223–244
- Hervant F, Mathieu J, Garin D, Fréminet A (1996) Behavioral, ventilatory, and metabolic responses of the hypogean amphipod *Niphargus virei* and the epigean isopod *Asellus aquaticus* to severe hypoxia and subsequent recovery. *Physiol Zool* 69:1277–1300

- Hervant F, Mathieu, J, Barre H (1999) Comparative study on the metabolic responses of subterranean and surface-dwelling amphipods to long-term starvation and subsequent refeeding. *J Exp Biol* 202: 3587–3595.
- Herzig S, Raemy E, Montessuit S, et al (2012) Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier. *Science* 337:93–96
- Hochachka PW, Liggins GC, Qvist J, et al (1977) Pulmonary metabolism during diving: conditioning blood for the brain. *Science* 198:831–834
- Hochachka, PW, Somero, GN (2002) *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. Oxford University Press, Oxford
- Holmstrup M, Sørensen JG, Overgaard J, et al (2011) Body metal concentrations and glycogen reserves in earthworms (*Dendrobaena octaedra*) from contaminated and uncontaminated forest soil. *Environ Pollut* 159:190–197
- Huckins, JN, Petty JD, Booij, K (2006). *Monitors of organic chemicals in the environment: semipermeable membrane devices*. Springer Science & Business Media.
- Hunt WF, Traver RG, Davis AP, Emerson CH, Collins KA, Stagge JH (2010) Low impact development practices: designing to infiltrate in urban environments. In: Chang, N.B. (Ed.), *Effects of urbanization on groundwater: an engineering case-based approach for sustainable development*. American Society of Civil Engineers (ASCE), Reston, VA, pp. 308–343.
- Hunting ER, Mulder C, Kraak MHS, Breure AM, Admiraal W (2013) Effects of copper on invertebrate-sediment interactions. *Environ Pollut* 180: 131–135.
- Ji X, Li Y, He J, Shah W, Xue X, Feng G, Zhang H, Gao M (2016) Depletion of mitochondrial enzyme system in liver, lung, brain, stomach and kidney induced by benzo(a)pyrene. *Environ Toxicol Pharmacol* 43:83–93
- Jones CG, Lawton JH, Shachak M (1994) Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* 69:373–386
- Jorge MB, Loro VL, Bianchini A, et al (2013) Mortality, bioaccumulation and physiological responses in juvenile freshwater mussels (*Lampsilis siliquoidea*) chronically exposed to copper. *Aquat Toxicol* 126:137–147
- Jørgensen A, Glessing AMB, Rasmussen LJ, Andersen O (2005) Biotransformation of the polycyclic aromatic hydrocarbon pyrene in the marine polychaete *Nereis virens*. *Environ Toxicol Chem* 24:2796–2805
- Juhasz AL, Naidu R (2000) Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Int Biodeterior Biodegradation* 45:57–88
- Kägi JHR (1991) Overview of metallothionein. *Methods Enzymol* 205:613–626

- Keilty TJ, White DS, Landrum PF (1988) Sublethal responses to endrin in sediment by *Limnodrilus hoffmeisteri* (Tubificidae), and in mixed-culture with *Stylodrilus heringianus* (Lumbriculidae). *Aquat Toxicol* 13: 227–249.
- Kennedy CR (1966) The life history of *Limnodrilus hoffmeisteri* Clap. (Oligochaeta: Tubificidae) and its adaptive significance. *Oikos* 17:158–168
- Khati W, Ouali K, Mouneyrac C, Banaoui A (2012) Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use in biomonitoring. *Energy Procedia* 18:784–794
- Kim EH, Koh EH, Park J-Y, Lee K-U (2010) Adenine nucleotide translocator as a regulator of mitochondrial function: implication in the pathogenesis of metabolic syndrome. *Korean Diabetes J* 34:146–53
- Klein S (2006) Sediment pore water exchange and solute release during ebullition. *Mar Chem* 102: 60–71.
- Klerks PL, Bartholomew PR (1991) Cadmium accumulation and detoxification in a Cd-resistant population of the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri*. *Aquat Toxicol* 19:97–112
- Koop JHE, Schäffer M, Ortmann C, Winkelmann C (2008) Towards environmental assessment of river ecosystems by analyzing energy reserves of aquatic invertebrates. *Limnologia* 38:378–387
- Koop JHE, Winkelmann C, Becker J, Hellmann C, Ortmann C (2011) Physiological indicators of fitness in benthic invertebrates: a useful measure for ecological health assessment and experimental ecology. *Aquat Ecol* 45: 547–559.
- Korchowiec B, Corvis Y, Viitala T, et al (2008) Interfacial approach to polyaromatic hydrocarbon toxicity: phosphoglyceride and cholesterol monolayer response to phenantrene, anthracene, pyrene, chrysene, and benzo [a] pyrene. *J Phys Chem B* 112: 13518–13531
- Kosower NS, Kosower EM (1978) The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol* 54:109–160
- Krantzberg G (1985) The influence of bioturbation on physical, chemical and biological parameters in aquatic environments: a review. *Environ Pollut* 39: 99–122.
- Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG (2011) Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen* 711:193–201
- Ku HFH, Hagelin NW, Buxton HT (1992) Effects of Urban Storm-Runoff Control on Ground-Water Recharge in Nassau Country, New York. *Ground Water* 30:507-514
- Kurochkin IO, Etkorn M, Buchwalter D, Leamy L, Sokolova IM (2011) Top-down control analysis of the cadmium effects on molluscan mitochondria and the mechanisms of

- cadmium-induced mitochondrial dysfunction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300:R21–R31
- Lacaze E, Devaux A, Mons R, et al (2011) DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment. *Environ Pollut* 159: 1682–1691
- Lagadic L (2002) Biomarkers: useful tools for the monitoring of aquatic environments. *Rev Med Vet (Toulouse)* 153:581–588
- Lagauzère S, Boyer P, Stora G, Bonzom JM (2009) Effects of uranium-contaminated sediments on the bioturbation activity of *Chironomus riparius* larvae (Insecta, Diptera) and *Tubifex tubifex* worms (Annelida, Tubificidae). *Chemosphere* 76: 324–334.
- Lagauzère S, Pischedda L, Cuny P, Gilbert F, Stora G, Bonzom JM (2009b) Influence of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) and *Tubifex tubifex* (Annelida, Oligochaeta) on oxygen uptake by sediments. Consequences of uranium contamination. *Environ Pollut* 157: 1234–1242.
- Lagauzère S, Terrail R, Bonzom JM (2009) Ecotoxicity of uranium to *Tubifex tubifex* worms (Annelida, Clitellata, Tubificidae) exposed to contaminated sediment. *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 527–537.
- Lam KS, Gray JS (2003) The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Mar Pollut Bull* 46: 182–186
- Landrum PF, Leppanen M, Robinson SD, Gossiaux DC, Burton GA, Greenberg M, Kukkonen JV, Eadie BJ, Lansing MB (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.
- Lauer MM, De Oliveira CB, Yano NLI, Bianchini A (2012) Copper effects on key metabolic enzymes and mitochondrial membrane potential in gills of the estuarine crab *Neohelice granulata* at different salinities. *Comp Biochem Physiol Part C* 156:140–147
- Lawniczak M, Romestaing C, Roussel D, Maazouzi C, Renault D, Hervant F (2013) Preventive antioxidant responses to extreme oxygen level fluctuation in a subterranean crustacean. *Comp Biochem Physiol Part A* 165: 299–303.
- Le Gal Y, Lagadic L, Le Bras S, Caquet T (1997) Charge énergétique en adénylates (CEA) et autres biomarqueurs associés au métabolisme énergétique. *Biomarqueurs en écotoxicologie Asp Fondam Masson, Paris* 241–285
- Le Maho Y, Vu Van Kha H, Koubi H, et al (1981) Body composition, energy expenditure, and plasma metabolites in long-term fasting geese. *Am J Physiol Metab* 241:E342–E354
- Lee RF (1998) Annelid cytochrome P-450. *Comp Biochem Physiol Part C* 121:173–9

- Leelaja BC, Rajini PS (2013) Biochemical and physiological responses in *Caenorhabditis elegans* exposed to sublethal concentrations of the organophosphorus insecticide, monocrotophos. *Ecotoxicol Environ Saf* 94: 8–13
- Leoz-Garziandia E, Bocquet N, Marliere M, Lacroix G. Hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'air ambiant (HAP) (2000) Rapport Laboratoire central sur la surveillance de la qualité de l'air, INERIS DRC/AIRE – 00-23448 – ELe – n° 570 : 50 p.
- Lesser MP (1996) Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnol Oceanogr* 41:271–283
- Lesser MP (2006) Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annu Rev Physiol* 68:253–278
- Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nell A (2003) Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* 111:455–460
- Liu Y, Chen XJ (2013) Adenine nucleotide translocase, mitochondrial stress, and degenerative cell death. *Oxid Med Cell Longev* vol 2013
- Livingstone D (1998) The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: Quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comp Biochem Physiol Part A* 120:43–49
- Livingstone DR (2001) Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar Pollut Bull* 42: 656–666.
- Lotufo GR, Fleeger JW (1996) Toxicity of sediment-associated pyrene and phenanthrene to *Limnodrilus hoffmeisteri* (Oligochaeta: Tubificidae). *Environ Toxicol Chem* 15: 1508–1516.
- Luperchio S, Tamir S, Tannenbaum SR (1996) NO-induced oxidative stress and glutathione metabolism in rodent and human cells. *Free Radic Biol Med* 21:513–519
- Lushchak VI (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol* 101:13–30
- Lyytikäinen M, Pehkonen S, Akkanen J, et al (2007) Bioaccumulation and biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons during sediment tests with oligochaetes (*Lumbriculus variegatus*). *Environ Toxicol Chem* 26:2660–2666
- Maestre Z, Martinez-Madrid M, Rodriguez P (2009) Monitoring the sensitivity of the oligochaete *Tubifex tubifex* in laboratory cultures using three toxicants. *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 2083–9
- Maire E, Colombo P, Adrien J, Babout L, Biasetto L (2007) Characterization of the morphology of cellular ceramics by 3D image processing of X-ray tomography. *J Eur Ceram Soc* 27: 1973–1981.

- Mao H, Wang D-H, Yang W-X (2012) The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate. *Aquat Toxicol* 110:208–213
- Maria VL, Bebianno MJ (2011) Antioxidant and lipid peroxidation responses in *Mytilus galloprovincialis* exposed to mixtures of benzo(a)pyrene and copper. *Comp Biochem Physiol Part C* 154:56–63
- Marmonier P, Maazouzi C, Foulquier A, Navel S, François C, Hervant F, Mermillod-Blondin F, Vienney A, Barraud S, Togola A, Piscart C (2013) The use of crustaceans as sentinel organisms to evaluate groundwater ecological quality. *Ecol Eng* 57:118–132
- Marnett LJ (1999) Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* 424:83–95
- Marsalek J, Chocat B (2002) International report: Stormwater management. *Water Sci Technol* 46:1–17
- Marsalek J, Marsalek P (1997) Characteristics of sediments from a stormwater management pond. *Water Sci Technol* 36:117–122
- Marsalek J, Rochfort Q, Brownlee B, et al (1999) An exploratory study of urban runoff toxicity. *Water Sci Technol* 39:33–39
- Martinez-Tabche L, Cabrera IG, Oliván LG, Martínez MG, Faz CG (2000) Toxic effects of zinc from trout farm sediments on ATP, protein, and hemoglobin concentrations of *Limnodrilus hoffmeisteri*. *Toxicol Environ Heal A* 59: 575–583.
- Martinez-Tabche L, Ortega MDLAG, Mora BR, Faz CG, Lopez EL, Martínez MG (2001) Hemoglobin concentration and acetylcholinesterase activity of oligochaetes in relation to lead concentration in spiked sediments from Ignacio Ramirez reservoir. *Ecotoxicol Environ Saf* 49: 76–83.
- Mason AZ, Jenkins KD (1995) Metal detoxification in aquatic organisms. *Met Speciat Bioavailab Aquat Syst* 3:479–578
- Matisoff G, Wang XS, McCall PL (1999) Biological redistribution of lake sediments by tubificid oligochaetes: *Branchiura sowerbyi* and *Limnodrilus hoffmeisteri/Tubifex tubifex*. *J Great Lakes Res* 25: 205–219.
- Matson CW, Timme-Laragy AR, Di Giulio RT (2008) Fluoranthene, but not benzo [a] pyrene, interacts with hypoxia resulting in pericardial effusion and lordosis in developing zebrafish. *Chemosphere* 74:149–154
- Mazik K, Curtis N, Fagan MJ, Taft S, Elliott M (2008) Accurate quantification of the influence of benthic macro- and meio-fauna on the geometric properties of estuarine muds by micro computer tomography. *J Exp Mar Biol Ecol* 354: 192–201.
- McCall PL, Tevesz MJS (1982) The effects of benthos on physical properties of freshwater sediments. In: McCall PL, Tevesz MJS (eds) *Animal-Sediment Relations: The Biogenic Alteration of Sediments*. Springer US, Boston, MA, pp 105–176

- McCord JM (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 108:652–659
- McKenzie DJ, Garofalo E, Winter MJ, Ceradini S, Verweij F, Day N, Hayes R, van der Oost R, Butler PJ, Chipman JK and Taylor EW (2007) Complex physiological traits as biomarkers of the sub-lethal toxicological effects of pollutant exposure in fishes. *Phil Trans R Soc B* 362: 2043-2059
- Meister A (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 263:17205–17208
- Meister A (1994) Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res* 54:1969–1975
- 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. *Ecotoxicol Environ Saf* 39: 10–20.
- Mermillod-Blondin F, Foulquier A, Gilbert F, Navel S, Montuelle B, Bellvert F, Comte G, Grossi V, Fourel F, Lecuyer C, Simon L (2013) Benzo(a)pyrene inhibits the role of the bioturbator *Tubifex tubifex* in river sediment biogeochemistry. *Sci Total Environ* 450–451:230–41
- Mermillod-Blondin F, Gérino M, Degrange V, Lensi R, Chassé JL, Rard M, Creuzé des Châtellier M (2001) Testing the functional redundancy of *Limnodrilus* and *Tubifex* (*Oligochaeta*, *Tubificidae*) in hyporheic sediments: an experimental study in microcosms. *Can J Fish Aquat Sci* 58:1747–1759
- Mermillod-Blondin F, Lemoine DG (2010) Ecosystem engineering by tubificid worms stimulates macrophyte growth in poorly oxygenated wetland sediments. *Funct Ecol* 24: 444–453.
- 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, Nogaro G, Vallier F, Gibert J (2008) Laboratory study highlights the key influences of stormwater sediment thickness and bioturbation by tubificid worms on dynamics of nutrients and pollutants in stormwater retention systems. *Chemosphere* 72: 213–223.
- Mermillod-Blondin F, Rosenberg R (2006) Ecosystem engineering: the impact of bioturbation on biogeochemical processes in marine and freshwater benthic habitats. *Aquat Sci Across Boundaries* 68:434–442
- Meyer JN, Leung MCK, Rooney JP, Sendoel A, Hengartner MO, Kisby GE, Bess AS (2013) Mitochondria as a target of environmental toxicants. *Toxicol Sci* 134:1–17
- Michaud E, Aller RC, Stora G (2010) Sedimentary organic matter distributions, burrowing activity, and biogeochemical cycling: natural patterns and experimental artifacts. *Estuar Coast Shelf Sci* 90: 21–34.

- Michaud E, Desrosiers G, Long B, de Montety L, Crémer JF, Pelletier E, Locat J, Gilbert F, Stora G (2003) Use of axial tomography to follow temporal changes of benthic communities in an unstable sedimentary environment (Baie des Ha! Ha!, Saguenay Fjord). *J Exp Mar Biol Ecol* 285-286: 265–282.
- Mills GC (1957) Hemoglobin catabolism I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem* 229:189–197
- Millward RN, Fleeger JW, Reible DD, Keteles AK, Cunningham BP, Zhang L (2001) Pyrene bioaccumulation, effects of pyrene exposure on particle-size selection, and fecal pyrene content in the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri* (Tubificidae, Oligochaeta). *Environ Toxicol Chem* 20:1359–1366
- Mosleh YY, Paris-Palacios S, Arnoult F, et al (2004) Metallothionein induction in aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* exposed to herbicide isoproturon. *Environ Toxicol* 19:88–93
- Mosleh YY, Paris-Palacios S, Couderchet M, et al (2005) Metallothionein induction, antioxidative responses, glycogen and growth changes in *Tubifex tubifex* (Oligochaeta) exposed to the fungicide, fenhexamid. *Environ Pollut* 135:73–82
- Mulsow S, Landrum PF, Robbins JA (2002) Biological mixing responses to sublethal concentrations of DDT in sediments by *Heteromastus filiformis* using a ¹³⁷Cs marker layer technique. *Mar Ecol Prog Ser* 239: 181–191.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (2003) Catabolism of the carbon skeleton of amino acids. In: Harper's Illustrated Biochemistry, 26th edn, Mc GrawHill, pp 249-263
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (2003) Gluconeogenesis and control of the blood glucose. In: Harper's Illustrated Biochemistry, 26th edn, Mc GrawHill, pp 153-162
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (2014) The citric acid cycle: the central pathways of carbohydrates, lipid and amino acids metabolism. In: Harper's Illustrated Biochemistry, 30th edn, Mc GrawHill, pp 161-167
- Nagasaka R, Okamoto N, Ushio H (2004) Partial oxidative-stress perturbs membrane permeability and fluidity of fish nucleated red blood cells. *Comp Biochem Physiol PartC* 139:259–266
- Nahmani J, Capowicz Y, Lavelle P (2005) Effects of metal pollution on soil macroinvertebrate burrow systems. *Biol Fertil Soils* 42: 31–39.
- Nelson DL, Cox MM (2017) Lehninger Principles of Biochemistry, 7th ed. WH Freeman editor 1328 pp
- Niemczynowicz J (1999) Urban hydrology and water management – present and future challenges. *Urban Water* 1:1–14

- Niki E, Saito T, Kawakami A, Kamiya Y (1984) Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C. *J Biol Chem* 259:4177–4182
- Nogaro G, Burgin AJ (2014) Influence of bioturbation on denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) in freshwater sediments. *Biogeochemistry* 120: 279–294.
- Nogaro G, Mermillod-Blondin F (2009) Stormwater sediment and bioturbation influences on hydraulic functioning, biogeochemical processes, and pollutant dynamics in laboratory infiltration systems. *Environ Sci Technol* 43: 3632–3638.
- Nogaro G, Mermillod-Blondin F, Francois-Carcaillet F, Gaudet JP, Lafont M, Gibert J (2006) Invertebrate bioturbation can reduce the clogging of sediment: an experimental study using infiltration sediment columns. *Freshw Biol* 51: 1458–1473.
- Nogaro G, Mermillod-Blondin F, Montuelle B, Boisson JC, Gibert J (2008) Chironomid larvae stimulate biogeochemical and microbial processes in a riverbed covered with fine sediment. *Aquat Sci* 70: 156–168.
- 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.
- Nogaro G, Mermillod-Blondin F, Valett MH, et al (2009) Ecosystem engineering at the sediment-water interface: bioturbation and consumer-substrate interaction. *Oecologia* 161:125–38
- Nogaro G, Steinman AD (2014) Influence of ecosystem engineers on ecosystem processes is mediated by lake sediment properties. *Oikos* 123: 500–512.
- Norwood WP, Borgmann U, Dixon DG, Wallace A (2003) Effects of metal mixtures on aquatic biota: a review of observations and methods. *Hum Ecol Risk Assess* 9:795–811
- Oliveira GT, Rossi IC, Kucharski LC, Da Silva RSM (2004) Hepatopancreas gluconeogenesis and glycogen content during fasting in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. *Comp Biochem Physiol Part An* 137:383–390
- Oliveira M, Ribeiro A, Hylland K, Guilhermino L (2013) Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Ecol Indic* 34:641–647
- Ortega M, Ordonez E, Favari L, Shibayama M, Silva Olivares A, López López E (2011) Biochemical and mitochondrial changes induced by Cd, Fe and Zn in *Limnodrilus hoffmeisteri*. *Int J Morphol* 29:412–419
- Osellame LD, Blacker TS, Duchon MR (2012) Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 26:711–723

- Oztetik E, Cicek A, Arslan N (2013) Early antioxidative defence responses in the aquatic worms (*Limnodrilus sp.*) in Porsuk Creek in Eskisehir (Turkey). *Toxicol Ind Health* 29: 541–554.
- Palmiter RD (1998) The elusive function of metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci* 95:8428–8430
- Parlement européen et Conseil de l'Union Européenne (2001) Décision n°2455/2001/CE du Parlement européen et du Conseil du 20 novembre 2001 établissant la liste des substances prioritaires dans le domaine de l'eau et modifiant la directive 2000/60/CE. *J Off des Communautés Eur* du 15122001 (JO L 331/1) 3:5 p.
- Penninckx M (2000) A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme Microb Technol* 26:737–742
- Pigneret M, Mermillod-Blondin F, Volatier L, et al (2016) Urban pollution of sediments: Impact on the physiology and burrowing activity of tubificid worms and consequences on biogeochemical processes. *Sci Total Environ* 568: 196–207
- Pigneret M, Mermillod-Blondin F, Volatier L, Romestaing C, Maire E, Adrien J, Guillard L, Roussel D, Hervant F (2016) Urban pollution of sediments: Impact on the physiology and burrowing activity of tubificid worms and consequences on biogeochemical processes. *Sci Total Environ* 568:196–207
- Pires A, Almeida A, Calisto V, et al (2016) *Hediste diversicolor* as bioindicator of pharmaceutical pollution: Results from single and combined exposure to carbamazepine and caffeine. *Comp Biochem Physiol Part - C* 188:30–38
- Pitt R, Clark S, Field R (1999) Groundwater contamination potential from stormwater infiltration practices. *UrbanWater J* 1: 217–236.
- Plenet S (1995) Freshwater amphipods as biomonitors of metal pollution in surface and interstitial aquatic systems. *Freshw Biol* 33:127–137
- Plenet S, Hervant F, Joly P (2000) Ecology of the hybridogenetic *Rana esculenta* complex: differential oxygen requirements of tadpoles. *Evol Ecol* 14: 13–23.
- Pratt CW, Cornely K (2014) Glucose metabolism. In: *Essential Biochemistry*, 3th edn. Wiley, Hoboken, NJ, pp 338-369
- Pratt CW, Cornely K (2014) Nitrogen metabolism. In: *Essential Biochemistry*, 3th edn. Wiley, Hoboken, NJ, pp 475-508
- Pratt CW, Cornely K (2014) Oxidative Phosphorylation. In: *Essential Biochemistry*, 3th edn. Wiley, Hoboken, NJ, pp 394-419
- Pratt CW, Cornely K (2014) The citric acid cycle. In: *Essential Biochemistry*, 3th edn. Wiley, Hoboken, NJ, pp 370-393

- Putzer V, Gnaiger E, Lackner R (1985) Flexibility of anaerobic metabolism in aquatic oligochaetes (*Tubifex sp.*). Biochemical and calorimetric changes induced by a deproteinized hydrolysate of bovine blood. *Comp Biochem Physiol Part A Physiol* 82:965–970
- Raftery TD, Jayasundara N, Di Giulio RT (2017) A bioenergetics assay for studying the effects of environmental stressors on mitochondrial function in vivo in zebrafish larvae. *Comp Biochem Physiol Part C* 192:23–32
- Regoli F, Giuliani ME (2014) Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar Environ Res* 93:106–117
- Reichardt W (1988) impact of bioturbation by *Arenicola marina* on microbiological parameters in intertidal sediments. *Mar Ecol Prog Ser* 44:149–158
- Renault D, Hervant F, Vernon P (2002) Comparative study of the metabolic responses during food shortage and subsequent recovery at different temperatures in the adult lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Physiol Entomol* 27:291–301
- Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS (2012) Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem J* 441:763–787
- Rodriguez P, Arrate J, Martinez-Madrid M, Reynoldson TB, Schumacher V, Viguri J (2006) Toxicity of Santander Bay sediments to the euryhaline freshwater oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri*. *Hydrobiologia* 564: 157–169.
- Rodríguez-Ortega MJ, Alhama J, Funes V, et al (2002) Biochemical biomarkers of pollution in the clam *Chamaelea gallina* from South-Spanish littoral. *Environ Toxicol Chem* 21:542–549
- Roesijadi G (1992) Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat Toxicol* 22:81–114
- Rogaar H (1980) The morphology of burrows structures made by tubificids. *Hydrobiologia* 71: 107–124.
- Rosa R, Nunes ML (2003) Biochemical composition of deep-sea decapod crustaceans with two different benthic life strategies off the Portuguese south coast. *Deep Sea Res Part I Oceanogr Res Pap* 50:119–130
- Rosenberg R, Davey E, Gunnarsson J, Norling K, Frank M (2007) Application of computer-aided tomography to visualize and quantify biogenic structures in marine sediments. *Mar Ecol Prog Ser* 331: 23–34.
- Roussel D, Salin K, Dumet A, Romestaing C, Rey B, Voituron Y (2015) Oxidative phosphorylation efficiency, proton conductance and reactive oxygen species production of liver mitochondria correlates with body mass in frogs. *J Exp Biol* 218:3222–3228

- Salin K, Luquet E, Rey B, Roussel D, Voituron Y (2012a) Alteration of mitochondrial efficiency affects oxidative balance, development and growth in frog (*Rana temporaria*) tadpoles. *J Exp Biol* 215:863–869
- Salin K, Roussel D, Rey B, Voituron Y (2012b) David and Goliath: A Mitochondrial Coupling Problem? *J Exp Zool Part A* 317:283–293
- Salin K, Voituron Y, Mourin J, Hervant F (2010) Cave colonization without fasting capacities: an example with the fish *Astyanax fasciatus mexicanus*. *Comp Biochem Physiol A* 156: 451–457.
- Salvo L, Cloetens P, Maire E, Zabler S, Blandin JJ, Buffiere JY, Ludwig W, Boller E, Bellet D, Josserond C (2003) X-ray micro-tomography an attractive characterisation technique in materials science. *Nucl Instrum Meth B* 200: 273–286.
- Samanta P, Pal S, Mukherjee AK, Ghosh AR (2014) Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. *Ecotoxicol Environ Saf* 107:120–125
- Schaller J, Brackhage C, Mkandawire M, Dudel EG (2011) Metal/metalloid accumulation/remobilization during aquatic litter decomposition in freshwater: a review. *Sci Total Environ* 409:4891–8
- Schaller J, Brackhage C, Mkandawire M, Dudel EG (2011) Metal/metalloid accumulation/remobilization during aquatic litter decomposition in freshwater: a review. *Sci Total Environ* 409:4891–8
- Schlenk D, Celander M, Gallagher E, et al (2008) Biotransformation in Fishes. In: *The Toxicology of Fishes*. pp 153–234
- Schöttler U, Bennet EM (1991) Annelids. In: Bryant C (ed) *Metazoan life without oxygen*. Chapman and Hall, London, pp 165–185
- Schroff G, Zebe E (1980) The anaerobic formation of propionic acid in the mitochondria of the lugworm *Arenicola marina*. *J Comp Physiol Part B* 138:35–41
- Science Communication Unit, University of the West of England, Bristol (2013). *Science for Environment Policy In-depth Report: Soil Contamination: Impacts on Human Health*. Report produced for the European Commission DG Environment, September 2013.
- Scott-Fordsmand JJ, Weeks JM (2000) Biomarkers in earthworms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 165: 117–159
- Seuß J, Hipp E, Hoffmann KH (1983) Oxygen consumption, glycogen content and the accumulation of metabolites in *Tubifex* during aerobic-anaerobic shift and under progressing anoxia. *Comp. Biochem. Physiol Part A* 75:557–562

- Shang J, Liao Q, Zhang L, Fan C (2014) The influence of different benthic fauna on inorganic nitrogen flux and denitrification in a large shallow hyper-eutrophic lake. *Fundam Appl Limnol* 184: 101–108.
- Sharonov BP, Churilova I V (1992) Inactivation and oxidative modification of Cu, Zn superoxide dismutase by stimulated neutrophils: the appearance of new catalytically active structures. *Biochem Biophys Res Commun* 189:1129–1135
- Sokolova IM, Frederich M, Bagwe R, et al (2012) Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar Environ Res* 79:1–15
- Sokolova IM, Sokolov EP, Ponnappa KM (2005) Cadmium exposure affects mitochondrial bioenergetics and gene expression of key mitochondrial proteins in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Aquat Toxicol* 73:242–55
- Stadtman ER, Levine RL (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25:207–218
- Stillman MJ (1995) Metallothioneins. *Coord Chem Rev* 144:461–511
- Stock D, Leslie AGW, Walker JE (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* 286:1700–1705
- Storey KB (1996) Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz J Med Biol Res* 29: 1715–1733.
- Sun F, Zhou Q (2008) Oxidative stress biomarkers of the polychaete *Nereis diversicolor* exposed to cadmium and petroleum hydrocarbons. *Ecotoxicol Environ Saf* 70: 106–114.
- Tai WY, Yang YC, Lin HJ, et al (2010) Interplay between structure and fluidity of model lipid membranes under oxidative attack. *J Phys Chem B* 114:15642–15649
- Tappel AL (1978) Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *Methods Enzymol* 52: 506–513
- Taylor JD, Cunliffe M (2015) Polychaete burrows harbour distinct microbial communities in oil-contaminated coastal sediments. *Environ Microbiol Rep* 7: 606–613
- Thomasson MA, Johnson ML, Strömberg J-O, Gaten E (2003) Swimming capacity and pleopod beat rate as a function of sex, size and moult stage in Northern krill *Meganyctiphanes norvegica*. *Mar Ecol Prog Ser* 250:205–213
- Thompson ED, Burwinkel KE, Chava AK, et al (2010) Activity of Phase I and Phase II enzymes of the benzo[a]pyrene transformation pathway in zebrafish (*Danio rerio*) following waterborne exposure to arsenite. *Comp Biochem Physiol Part C* 152:371–378
- Trisciani A, Perra G, Caruso T, et al (2012) Phase I and II biotransformation enzymes and polycyclic aromatic hydrocarbons in the Mediterranean mussel (*Mytilus*

- galloprovincialis*, Lamarck, 1819) collected in front of an oil refinery. *Mar Environ Res* 79:29–36
- Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552:335–44
- Uma Devi V (1996) Bioaccumulation and metabolic effects of cadmium on marine fouling dressinid bivalve, *Mytilopsis sallei* (Recluz). *Arch Environ Contam Toxicol* 31:47–53
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2007) World Population Prospects: The 2006 Revision, Highlights. Working Paper No. ESA/P/WP.202.
- US EPA (1991) Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 4th ed. Report EPA/600/4–90/2, Environmental Protection Agency, Washington.
- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M (2006) Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf* 64:178–89
- Van Brummelen TC, Van Gestel CAM, Verweij RA (1996) Long-term toxicity of five polycyclic aromatic hydrocarbons for the terrestrial isopods *Oniscus Asellus* and *Porcellio Scaber*. *Environ Toxicol Chem* 15:1199–1210
- Van Weel PB (1974) “Hepatopancreas”? *Comp Biochem Physiol Part A* 47:1–9
- Vašák M, Overnell J, Good M (1987) Spectroscopic and Chemical Approaches to the Study of Metal-Thiolate Clusters in Metallothionein (MT). In: *Metallothionein II*. Springer, pp 179–189
- Vasseur P, Leguille C (2004) Defense systems of benthic invertebrates in response to environmental stressors. *Environ Toxicol* 19:433–6
- Wang Y, Fang J, Leonard SS, Rao KMK (2004) Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 36:1434–1443
- Warne MSJ, Hawker DW (1995) The number of components in a mixture determines whether synergistic and antagonistic or additive toxicity predominate: The funnel hypothesis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 31:23–28
- Watt IN, Montgomery MG, Runswick MJ, et al (2010) Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc Natl Acad Sci* 107:16823–16827
- Weil JH (2005) Cycle de Krebs. In: *Biochimie générale*, 10th ed, Dunod, Paris, pp313-340
- Wigh A, Geffard O, Abbaci K, et al (2017) *Gammarus fossarum* as a sensitive tool to reveal residual toxicity of treated wastewater effluents. *Sci Total Environ* 584–585: 1012–1021
- Willmer P, Stone G, Johnston I a. (2005) *Environmental physiology of animals*

- Wilson SC, Jones KC (1993) Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ Pollut* 81:229–249
- Winston GW (1991) Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comp Biochem Physiol C* 100: 173–176.
- Winston GW, Di Giulio RT (1991) Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat Toxicol* 19:137–161.
- Wu J-P, Chen H-C (2005) Metallothionein induction and heavy metal accumulation in white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to cadmium and zinc. *Comp Biochem Physiol Part C* 140:383–94
- Xia T, Korge P, Weiss JN, et al (2004) Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: Implications for ultrafine particle toxicity. *Environ Health Perspect* 112:1347–1358
- Young IS, McEneny J (2001) Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 29:358–62
- Zhou J, Goldsbrough PB (1994) Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6:875–884