



HAL
open science

Interactions “sol - vers de terre” et dynamique du mercure en Guyane française

Elodie Da Silva

► **To cite this version:**

Elodie Da Silva. Interactions “sol - vers de terre” et dynamique du mercure en Guyane française. Sciences de la Terre. Université Paris-Est, 2013. Français. NNT : 2013PEST1162 . tel-00944329

HAL Id: tel-00944329

<https://theses.hal.science/tel-00944329>

Submitted on 10 Feb 2014

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

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

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS EST
Ecole Doctorale Sciences, Ingénierie et Environnement

Spécialité

Sciences de l'Univers et de l'Environnement

Présentée par

Elodie DA SILVA

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Paris Est

Interactions « sol - vers de terre »
et dynamique du mercure en Guyane française

Soutenue le 18 décembre 2013 devant le jury composé de :

VANDENBULCKE Franck - Université de Lille 1
BROWN George G. - EMBRAPA Florestas, Brésil
DECAËNS Thibaud - Université de Rouen
GRIMALDI Catherine - INRA Rennes
GARNIER-ZARLI Evelyne - Université Paris Est Créteil
BOUSSERRHINE Noureddine - Université Paris Est Créteil

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse
CoDirecteur de thèse

A ceux qui m'ont transmis leur passion pour la science,

Pour les sciences de la vie,

Et la vie.

Remerciements

Mes remerciements vont en premier lieu à Evelyne Garnier-Zarli et Nouredine Bousserhine pour m'avoir guidée et encadrée dans mon travail de recherche jusqu'à la réalisation de ce manuscrit. Je les remercie pour leur confiance, leur patience, et leurs conseils indispensables à ma maturation scientifique.

Je voudrais remercier les membres du Jury pour avoir accepté de juger ce travail et pour leur enthousiasme. Merci à Georges G. Brown et Thibaud Decaëns d'avoir accepté la lourde tâche d'être mes rapporteurs. Merci à Catherine Grimaldi et Franck Vandembulcke qui ont accepté le rôle d'examineur.

Merci à Marie-Claire Gazeau et Denis Duhamel, directeurs de l'école doctorale SIE, pour m'avoir accordée une bourse de mobilité et une bourse pour l'inscription à un colloque, et merci à Brigitte David pour sa disponibilité, sa bonne humeur, et pour avoir toujours su répondre à mes questions.

Je remercie chaleureusement tous les membres de mon comité de thèse. Merci à Virginie Roy pour son aide précieuse en biologie moléculaire et son soutien au quotidien, ainsi que la découverte du monde du barcode ADN. Merci à Michel Grimaldi et à Emmanuel Lapied qui m'ont transmis leur passion pour les sols et les vers de terre tropicaux (respectivement !) et leur bonne humeur sur le terrain. Merci à Johanne Nahmani pour tous ses conseils, sa grande disponibilité et pour sa passion de la recherche.

Le prélèvement des échantillons et le tri manuel des vers de terre en Guyane auraient été impossibles sans l'aide de plusieurs personnes : merci à Emmanuel et Alex pour avoir creusé !!, à Michel Grimaldi qui m'a fait découvrir le site d'étude de la crique Combat et a échantillonné des quantités importantes de sol pour les microcosmes, Merci à Gilles, Nicolas, Michel Diouf, Mira, et tous ceux qui ont participé aux TSBF. Merci à Tchia, Joua et Bruno pour leur accueil au Quimbé Kio lors des deux séjours inoubliables à Cacao. Merci à Max Sarrazin pour son accueil à l'IRD de Cayenne, sa gentillesse, et les analyses des sols dans son laboratoire.

Merci à Samuel W. James, que j'ai rencontré lors du Workshop de taxinomie au Portugal, et qui a bien voulu collaborer pour l'identification des vers de terre dans le cadre de cette thèse.

Merci à tous les stagiaires qui ont participé à l'obtention des résultats de cette thèse : par ordre chronologique, merci à Ibrahim, Nacima, Mira, Rebecca, Florian, et Louis.

Un grand merci aux personnes d'IBIOS : à Philippe Mora pour son accueil dans l'équipe IBIOS, à Lise Dupont qui a bien voulu partager son bureau avec moi pendant ces trois années (et sa chambre pendant un colloque!) et qui a toujours été d'un soutien précieux, à Thomas Lerch et Manuel Blouin pour nos discussions et leur passion pour la science, à Vanessa Alphonse pour son optimisme et son aide, toujours dans la bonne humeur, à Alexandre Livet pour sa maîtrise de la DGGE et sa relecture finale du manuscrit, à Catherine Martin pour sa bonne humeur au quotidien et pour m'avoir aidée dans tous les processus administratifs que requièrent une thèse. Je tiens également à remercier toutes les autres personnes d'IBIOS permanentes ou non qui se reconnaîtront dans ce travail.

Je remercie mes collègues doctorants (bien que dans l'autre couloir !) qui avaient toujours un mot pour rire. Merci donc « aux garçons » : Ruben, Marien, et Ahmed. Merci à Amale pour nos échanges pendant ces trois années de thèse. Merci à Gaël et Charlene pour nos discussions que ce soit en colloque ou autour d'un café à l'UPEC ou à l'IRD. Merci encore une fois à Ruben pour son soutien depuis mon Master 1, et à Gaël pour ses nombreux conseils statistiques et sa passion pour les vers de terre. Mention spéciale pour Battle avec qui j'ai partagé cette dernière année, et qui m'a toujours aidée et encouragée.

Merci à tous mes amis (thésards ou non) qui m'ont rappelé qu'il n'y avait pas que la thèse dans la vie : Joe, Elise, Lys, Damien, Alex, Manu, Sarita, Anahide, Zépur, Laure ...et ceux que j'oublie ici. Avec un « special thanks » à Liliane et Lisa pour leur amitié depuis notre rencontre à Montréal, et en particulier les nombreux Skype de soutien pendant la rédaction de nos thèses respectives ! Et à Ryan pour ses English improvement !

Un grand merci à mon Daisuké pour son soutien et ses encouragements tout au long de ce travail (pas toujours facile !!!), et ses bons petits plats pour m'aider à garder la ligne.

Et enfin, merci à ma famille... où qu'ils soient. A mes parents et mon frère pour leur soutien sans limite, et en particulier à ma mère pour avoir prêté sa Senséo au labo! Merci à ma tante Olinda, mon oncle Jorge et leurs trois « monstres » pour leur bonne humeur.

Merci à vous tous d'avoir toujours cru en moi !

Résumé

Le mercure suscite beaucoup d'attention de par les conséquences sanitaires et environnementales qu'il engendre. Son impact est particulièrement important dans la région amazonienne et en Guyane française où les teneurs en mercure sont naturellement élevées dans les sols, et s'ajoutent celles liées aux activités d'orpaillage. Si l'impact du mercure dans les milieux aquatiques a été largement étudié, peu d'études ont évalué son impact dans les milieux terrestres, où il est préférentiellement stocké. Dans ce contexte, les interactions entre les vers de terre, organismes ingénieurs des sols, et le mercure ont été étudiées dans des sols tropicaux, avec comme objectifs : i) d'évaluer l'abondance et la diversité des vers de terre *in situ* en lien avec le mercure, ii) d'évaluer expérimentalement la résistance au mercure d'une espèce de ver tropical présente sur le site d'étude et iii) d'évaluer l'impact en microcosmes de l'activité des vers de terre sur la mobilité et la répartition du mercure dans les sols. Ces objectifs ont été appréhendés au travers de trois volets, avec comme matériel d'étude des sols naturels (oxisols et sols hydromorphes) et des vers de terre tropicaux provenant d'un site orpaillé, situé dans les environs de Cacao, en Guyane française.

Dans le premier volet, un échantillonnage standardisé des vers de terre (TSBF), a permis de proposer des espèces putatives (ou MOTUs) à partir de méthodologies de délimitation basées sur le barcode ADN. Ces MOTUs ont ensuite été identifiés morphologiquement, parmi lesquels *Pontoscolex corethrurus*, une espèce pantropicale considérée comme péregrine. De plus, les caractéristiques des sols et les teneurs en mercure ont été déterminés afin de tenter d'expliquer la distribution des vers sur le site étudié. *P. corethrurus* se retrouve exclusivement dans l'oxisol, qui contient les concentrations les plus élevées de mercure total.

Le second volet de ce travail a été consacré à l'étude de l'impact du mercure sur l'espèce tropicale *P. corethrurus*, à travers une approche écotoxicologique où le vers de terre a été exposé à différentes concentrations de mercure dans un oxisol dopé au laboratoire (HgCl_2). Les résultats obtenus ont confirmé la résistance de cette espèce à des concentrations de mercure allant jusqu'à $20 \mu\text{g g}^{-1}$ de sol et ont révélé sa forte capacité bioaccumulatrice.

Les résultats précédemment décrits ont ouvert la voie à un troisième volet où deux études en microcosmes se sont attachées à étudier l'impact des vers de terre sur la mobilité et la disponibilité du mercure (a) dans des conditions proches de celles observées en conditions naturelles (fond géochimique), et (b) en présence d'une forte concentration pouvant être rencontrée sur les sites orpaillés ($20 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ de sol). Les résultats obtenus ont montré que les vers de terre agissent sur la mobilité du mercure directement par modifications physico-chimiques des sols (augmentation du pH et COD) et indirectement par stimulation des communautés bactériennes totales du sol.

En conclusion, notre étude a montré que (1) *P. corethrurus* est une espèce résistante au mercure de par sa présence sur notre site d'étude et les résultats du test écotoxicologique mené au laboratoire, ce qui confirme l'idée d'un modèle tropical pour ce type d'étude ; (2) la bioaccumulation du mercure mesurée chez les vers de terre est importante et pourrait ainsi être responsable de l'entrée du mercure dans la chaîne trophique terrestre ; et (3) les vers de terre jouent un rôle dans la mobilité du mercure, modifiant sa répartition dans les sols et diminuant les conséquences environnementales liées à sa biodisponibilité.

Mots-clés : mercure, sol tropical, Guyane française, vers de terre, mobilité, disponibilité.

Abstract

Mercury is of major concern because of health and environmental problems that they cause. This toxic pollutant is particularly prevalent in tropical Amazonian regions and in French Guiana where soils are naturally rich in mercury and past and present gold mining activities occurred. While many studies have shown the impact of mercury in aquatic environments, to our knowledge only a few have focused on terrestrial ecosystems, where mercury is predominantly found.

This doctoral research examined the interactions between earthworms, which are soil engineers, and mercury in a tropical soil from French Guiana. The objectives of the research were to: i) evaluate *in situ* earthworm diversity and distribution in soils related to mercury concentrations, ii) experimentally evaluate the impact of mercury on a tropical earthworm species present in our study site, and iii) evaluate the impact of earthworms on mercury mobility and availability in different soils. In order to achieve these objectives, three studies were conducted using natural tropical soils (oxisols and hydromorphic soils) and tropical earthworms sampled in a small catchment basin located near Cacao, in French Guiana.

In the first part, earthworms were collected in the field using the standard TSBF method, and species delimitation was done based on DNA barcoding. Putative species were then morphologically identified, among them *Pontoscolex corethrurus*, a pantropical and peregrine species. Furthermore, soil characteristics and mercury concentrations were determined, and a first attempt was made to explain earthworm distribution in the field. *P. corethrurus* was found only in the oxisol, which contained highest mercury concentrations in the field.

In the second part, an ecotoxicological study was done using a natural tropical soil in order to assess the impact of mercury on the identified tropical species: *P. corethrurus*. The results showed that *P. corethrurus* can resist up to high mercury concentrations; it was not affected until 20 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil and showed high capacity of Hg bioaccumulation. These results were used for the third part of the thesis.

In the last part, two studies were conducted in controlled conditions in order to assess the impact of earthworms on mercury mobility and availability in soils. For these studies, conditions near natural conditions and also a high mercury concentration were applied to the soil (20 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil). Results showed the impact of earthworms on mercury mobility and availability through different mechanisms: directly, through soil modifications (increase of soil pH and DOC), and indirectly, through stimulation of the soil microbial population. Furthermore, results confirmed the high capacity of earthworms for mercury bioaccumulation.

In conclusion, we showed that (1) *P. corethrurus* is resistant to mercury, due to its presence in our field contaminated site and the results of the toxicity test done in the laboratory, thus confirming the use of a tropical species for these studies ; (2) mercury bioaccumulation measured in earthworms is important and thus could be responsible for its entry and biomagnification in the terrestrial food chain ; and (3) earthworms affect mercury mobility modifying its fractioning in soils and decreasing its availability.

Keywords: mercury, tropical soil, French Guiana, earthworms, mobility, availability.

Table des matières

Remerciements	i
Résumé	iii
Abstract	iv
Abréviations	x
Introduction générale.....	1
Chapitre I. Etat des connaissances	11
I-1. Le mercure dans l'environnement	13
I-1.1. Le mercure, élément trace métallique.....	13
I-1.2. Cycle biogéochimique du mercure.	14
I-1.3. Toxicité du mercure : impact sur les organismes vivants.....	18
I-1.4. Normes et réglementations pour l'utilisation du mercure dans le monde	24
I-2. Cas de la Guyane française : entre fixation et mobilité du mercure dans les sols.....	26
I-2.1. Le mercure en Guyane.....	26
I-2.2. La fixation du mercure dans les sols ferrallitiques	28
I-2.3. Evaluation de la mobilité et de la biodisponibilité dans les sols	30
I-2.4. Mobilité du mercure : influence des paramètres du sol.....	36
I-3. Les vers de terre : diversité et rôles dans les sols contaminés.....	38
I-3.1. Organismes ingénieurs du sol.....	38
I-3.2. Evaluation de la diversité des vers de terre	41
I-3.3. La diversité des vers de terre	54
I-3.4. Interactions entre les vers de terre et le mercure	59
Chapitre II. Matériels et méthodes	69
II-1. Description du site d'étude.....	71
II-1.1. La Guyane française : vaste département boisé	71

II-1.2. Importance du climat : rythmé par la saison des pluies.	72
II-1.3. Le site d'étude : la crique Combat	72
II-2. Echantillonnages	74
II-2.1. Campagnes et points de prélèvements	74
II-2.2. Echantillonnages des vers de terre	75
II-3. Analyses pour l'identification des vers de terre	77
II.3.1. Analyses moléculaires	77
II.3.2. Analyses morphologiques.....	82
II-4. Dispositifs expérimentaux pour l'étude des interactions « sol - vers de terre ».....	83
II-4.1. Etude de l'impact du mercure sur une espèce tropicale	83
II-4.2. Etude du rôle des vers de terre dans la mobilité du mercure.....	84
II-5. Analyses physico-chimiques des sols	88
II-5.1. Préparation des échantillons.....	88
II-5.2. Analyses pédologiques.....	88
II-5.3. Dosages du mercure	90
II-6 Analyses microbiologiques des sols.....	93
II-6.1. Diversité fonctionnelle des communautés microbiennes	93
II-6.2. Diversité génétique des communautés microbiennes.....	94
II.7 Analyses statistiques.....	97
II.7.1. Analyses pour les données de terrain	97
II.7.2. Analyses pour les données des dispositifs expérimentaux	97
Chapitre III. Mercure et diversité des vers de terre en Guyane française	99
Introduction	101
III-1. Diversité des vers échantillonnés sur le site de la Crique Combat	102
III-1.1. Délimitation des espèces des vers échantillonnés.....	102
III-1.2. Identification des vers par taxinomie morphologique	115
III-1.3. Synthèse des résultats : délimitation et identification des espèces	118

III-2. Lien entre diversité, densité des vers de terre et caractéristiques physico-chimiques des sols étudiés dans le bassin versant de la crique Combat	121
III-2.1. Analyses physico-chimiques des sols	121
III-2.2. Analyses du mercure	122
III-2.3. Propriétés des sols et répartition des vers de terre sur le terrain	124
Conclusions et perspectives	129
Projet de recherche : ANR INTERCONNECT (2012-2015).....	132
Chapitre IV. Impact du mercure sur un ver tropical endogé.....	137
Introduction	139
Résumé.....	140
Chapitre V. Vers de terre et mobilité du mercure	157
Introduction	159
V-1. Impact de <i>Pontoscolex corethrurus</i> sur la mobilité du mercure dans un oxisol guyanais (dopé ou non au laboratoire).	161
Résumé.....	161
V-2. Impact de <i>Pontoscolex corethrurus</i> et du mercure sur les communautés bactériennes de l'oxisol guyanais.....	181
Introduction	181
V-2.1. Les communautés bactériennes de l'oxisol guyanais (non dopé).....	182
V-2.2. Diversité fonctionnelle des communautés microbiennes de l'oxisol (dopé)	185
Conclusions et perspectives	186
V-3. Etude en climat tempéré : Impact d' <i>Eisenia andrei</i> sur la mobilité du mercure dans un sol tempéré de la région parisienne (dopé ou non au laboratoire).	187
Résumé.....	187
Chapitre VI. Discussion générale.....	207
Conclusion générale et perspectives	225
Références bibliographiques	233
Annexes.....	259

Annexe 1. Procédure GMYC	261
Annexe 2. Les substrats carbonés sur une plaque BIOLOG EcoPlate™	262
Annexe 3. Protocole DGGE	263
Annexe 4. Liste des 81 haplotypes utilisés pour la méthode GMYC.	265
Annexe 5. Identifications morphologiques des vers de terre de chaque MOTUs et commentaires par S.W. James.....	267
Annexe 6. Arbre BIONJ avec les vers de Cacao et ceux du projet Nouragues (2011-2012) basé sur le gène COI.....	268
Annexe 7. Test pour étude écotoxicologique avec <i>Eisenia andrei</i>	272
Annexe 8. Bourse SFE – Description du projet de terrain	273

Abréviations

AAS: Spectrométrie d’Absorption Atomique

ABGD: Automatic Barcode Gap Discovery

AWCD: Average Well Color Development

BAF: Facteur de BioAccumulation

BIN: Barcode Index Number

BOLD System: The Barcode of Life Data System

CCDB: Canadian Center for DNA Barcoding

CMB: Compagnie Minière Boulanger

COD: Carbone Organique Dissous

COI: Cytochrome Oxidase I

CROP: Clustering 16S rRNA for OTU Prediction

FAO: Food and Agriculture Organization

GMYC: General Mixed Yule-Coalescent

K2P: Kimura 2-Parameter

MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis

MOD: Matière Organique Dissoute

MOTUs: Unités Taxinomiques Opérationnelles Moléculaires

NJ: Neighbor-Joining

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

RESL: Refined Single Linkage

TSBF: Tropical Soil Biodiversity and Fertility

Introduction générale

Les éléments traces métalliques dans l'environnement : cas du mercure

Les émissions d'éléments traces métalliques (ETM) dans l'environnement ont considérablement augmenté depuis le début de l'ère industrielle. Dues aux retombées atmosphériques, les ETM peuvent se retrouver loin de leur source d'émission et s'accumuler dans les sols, les sédiments et les eaux. Ces ETM accumulés représentent un danger potentiel de pollution pouvant perturber l'équilibre biologique des écosystèmes. La prise de conscience des dangers que représentent les contaminations métalliques dans l'environnement a conduit au développement de programmes de recherche fondamentale et appliquée, avec pour objectifs la prédiction et l'évaluation des impacts environnementaux et sanitaires ETM et *in fine* l'assainissement des sites contaminés.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le mercure (Hg) est parmi les ETM les plus préoccupants. Contrairement à certains éléments indispensables à l'état de traces et toxiques à de fortes teneurs, le mercure ne présente aucun rôle biologique bénéfique connu. Cet élément est neurotoxique et sa présence impacte tous les organismes vivants. De plus, il peut être transformé en méthylmercure, sa forme la plus toxique, qui possède la capacité de s'accumuler dans les organismes (i.e. bioaccumulation) et de se concentrer le long des chaînes alimentaires (i.e. bioamplification). Plusieurs cas de contaminations humaines ont été rapportés, dont le plus connu est celui de Minamata au Japon (1956)¹ où du mercure provenant d'activités industrielles et rejeté dans la baie de Minamata a été transformé en sa forme méthylée dans la colonne d'eau (sous l'action d'une activité bactérienne). Ce méthylmercure s'est fortement concentré dans les chaînes alimentaires des poissons évoluant en aval des effluents pollués, empoisonnant et tuant des milliers d'habitants.

Malgré sa faible concentration dans la croûte terrestre, le mercure peut être émis dans l'environnement en quantités importantes par différentes sources naturelles ou anthropiques. L'utilisation importante du mercure par l'homme a très largement contribué à sa répartition globale dans l'environnement. Une fois émis, il persiste dans les écosystèmes où il circule, sous diverses formes chimiques, entre les milieux atmosphériques, aquatiques et terrestres (Anderson, 1979).

¹ Les représentants de 140 pays ont signé jeudi 10 octobre 2013, au Japon une convention sur l'usage et les émissions de mercure, baptisée « Convention Minamata », cette ville japonaise victime du pire empoisonnement dû à ce métal hautement toxique.

« Mercure en Guyane », un enjeu toujours d'actualité

Dans la région amazonienne, et en Guyane française en particulier, le mercure est omniprésent en raison de l'accumulation du mercure dans les sols depuis des millions d'années, et surtout de son utilisation intensive dans les activités d'orpaillage. Le problème du mercure en Guyane a été dévoilé par différentes études qui ont montré que les rejets de ce métal dans l'environnement étaient responsables de la contamination des populations des villages situées en aval des zones orpaillées (Godard *et al.*, 1997). Les populations Wayana, vivant essentiellement de la pêche courent ainsi un risque sanitaire élevé (Charlet & Boudou, 2002; Boudou *et al.*, 2006). Néanmoins, tant que le mercure reste fixé dans les sols, il n'est pas transféré vers les milieux aquatiques ; ce qui pourrait limiter les risques de contaminations pour les populations locales (Boudou *et al.*, 2006).

Quelque soit son origine, la majorité du mercure reste piégé dans les sols où il est peu mobile. Dans les sols ferrallitiques (représentant 85% des sols guyanais), les deux principales phases fixatrices du mercure sont les oxydes de fer et la matière organique. Cependant, bien que peu rapporté dans la littérature, tous les paramètres biotiques ou abiotiques contribuant à modifier la fixation et la spéciation du mercure dans les sols peuvent générer un flux important de cet élément dans les sols et vers les solutions du sol, les masses d'eau et les sédiments.

Maîtriser et prévenir tous les risques liés au mercure dans les sols et solution des sols passe donc obligatoirement par la compréhension des phénomènes régissant sa remobilisation et déterminant sa spéciation, ainsi que par l'évaluation de l'effet de ses différentes formes chimiques (inorganique et organique) sur le fonctionnement biologique du sol et par conséquent sur des communautés actrices de ce fonctionnement. Bien qu'il soit admis que la dynamique des éléments traces métalliques dans les sols tropicaux soit liée à celle de leurs phases porteuses, encore peu d'études se sont intéressées à cet aspect « dynamique » du mercure.

Le site de la Crique Combat, Guyane française

Le site de la Crique Combat, situé à une quinzaine de kilomètres du village de Cacao, en Guyane française, appartient à la Compagnie Minière Boulanger (CMB). Ce site a été étudié dans le cadre du programme de recherche CNRS « Mercure en Guyane » (2002-2007). Dans le cadre de la phase II de ce programme, l'impact de l'exploitation minière sur les flux de mercure dans différentes toposéquences de sol a été étudié dans le cadre d'un doctorat (Guedron, 2008). Ce travail a montré que les concentrations en mercure varient de 0.01 à 9.22 $\mu\text{g g}^{-1}$ allant des sols non contaminés aux sols de bas-fonds anciennement orpaillés. Mis à part les bas-fonds orpaillés (très remaniés), les concentrations diminuent avec la profondeur et le long de la toposéquence en allant des sols ferrallitiques de haut de pente aux sols hydromorphes de bas-fonds. De plus, il a été montré que les apports exogènes de mercure (i.e. dépôts atmosphériques liés aux activités anthropiques) étaient bien supérieurs aux apports lithogènes (i.e. altération des roches) dans les sols tropicaux situés près de sites d'orpaillage, comme la crique Leblond (Guedron *et al.*, 2006).

L'interaction entre le mercure et la composante microbienne de ces sols a été étudiée au laboratoire IBIOS dans le cadre d'un autre travail de thèse (Harris-Hellal, 2008). Outre le fait que le mercure soit principalement associé aux oxydes de fer et à la matière organique, cette étude a souligné l'importance des bactéries ferri-réductrices et leur impact sur la mobilité du mercure en conditions anaérobies et dans les différents types de sol du site étudié. Les résultats ont montré que ces bactéries jouaient un rôle important dans les sols contaminés au mercure, de par leur capacité à solubiliser le fer et ainsi libérer le mercure qui lui était associé modifiant donc la distribution de ce dernier (Harris-Hellal *et al.*, 2010).

Notre travail s'est appuyé sur ces différents travaux et avait pour objectif d'étudier un autre acteur potentiellement important dans la mobilité du mercure dans les sols de ce même site d'étude : le ver de terre. En effet, les vers de terre représentent la biomasse la plus importante des sols (Lavelle & Spain, 2001; Edwards, 2004) et sont considérés comme des organismes « ingénieurs » du sol (Jones *et al.*, 1994). Par ailleurs, si différentes études ont souligné le rôle des vers dans la mobilité des métaux en milieu tempéré, rares sont celles qui ont exploré cette capacité en milieu tropical. Encore plus rares sont celles qui se sont intéressées au mercure en particulier. Quelques auteurs laissent supposer ce rôle prépondérant des vers ; les mécanismes en jeu restent cependant à être mettre mis en évidence (Sizmur & Hodson, 2009).

Objectifs de recherche

Dans le contexte particulier du mercure en Guyane française, cette thèse s'est intéressée aux interactions qui existent entre les vers de terre, organismes « ingénieurs » dans les sols et le mercure, contaminant toxique présent dans les sols tropicaux. Ce travail avait pour objectif principal d'améliorer la compréhension de la dynamique du mercure dans les écosystèmes terrestres, en particulier dans les sols guyanais où les problèmes liés au mercure ont alerté les autorités françaises il y a plus de 20 ans et restent encore très préoccupants aujourd'hui.

Sur la base des connaissances dans les domaines de pollution des sols au mercure et suite au constat qu'encore peu d'études se sont intéressées à ce jour aux interactions entre les vers de terre et le mercure dans les sols tropicaux, notre projet de recherche portant sur ces interactions « sol- vers de terre » a été développé au laboratoire.

Dans un premier temps, cette thèse a eu pour but de répondre aux questions suivantes :

- Quelle est l'abondance et la biomasse des vers de terre sur le site de la Crique Combat en Guyane française ?
- Quelle est la diversité des vers de terre sur ce site et existe-t-il un lien entre cette diversité, leur densité et les paramètres du sol dont les teneurs et les formes de mercure ?

Hypothèses : Si la diversité des vers de terre sur le site est une donnée inconnue à ce jour, elle pourrait être cependant importante car la Guyane française est un « hot spot » de biodiversité (Pavlicek & Csuzdi, 2012). Les quantités de mercure présentes sur le site et leurs interactions avec les paramètres du sol (i.e. la biodisponibilité) pourraient influencer sur l'abondance, la biomasse et la diversité des vers de terre, et en conséquence sur leur distribution sur le site, comme observé pour d'autres ETM (Nahmani *et al.*, 2003).

Des études en microcosmes ont été menées en conditions contrôlées, afin de s'affranchir des nombreux paramètres biotiques et abiotiques qui existent sur le terrain. Suite aux résultats de l'évaluation de la diversité des vers de terre *in situ*, une espèce de vers et un type de sol ont été retenus: *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857)² et l'oxisol de haut de pente dans lequel cette espèce est présente. Ce ver est l'espèce la plus étudiée sous les tropiques de par sa répartition géographique pantropicale (Lavelle *et al.*, 1987; Lapied *et al.*, 2003). A ce jour peu d'études se sont intéressées à l'impact des polluants sur cette espèce, alors qu'elle est trouvée en grande quantité sur des sites anthropisés (Lavelle *et al.*, 1987; Marichal *et al.*, 2010).

² phylum Annelida ; classe Clitellata ; ordre Haplotaxida; famille Glossoscolecidae ; genre *Pontoscolex*

Afin d'évaluer l'impact du mercure sur *P. corethrurus*, une étude écotoxicologique a été menée en microcosmes dans le but de répondre aux questions suivantes :

- Quel est l'impact du mercure sur un ver de terre tropical endogé, présent sur le site d'étude ?
- Quelle est la capacité bioaccumulatrice du mercure de cette espèce ?

Hypothèses : L'impact du mercure sur *P. corethrurus* est évalué pour la première fois. Cette espèce étant présente dans des sites anthropisés (Lavelle *et al.*, 1987), elle pourrait être capable de se maintenir dans des sols pollués au mercure sans être affectée. Le caractère endogé de ce ver implique qu'il ingère une grande quantité de sol et l'accumulation du mercure dans ses tissus pourrait être importante (Ernst & Frey, 2007; Rieder *et al.*, 2011).

Suite à l'étude écotoxicologique, deux études ont été mises en place au laboratoire afin d'évaluer l'impact des vers de terre sur la dynamique du mercure avec les espèces *P. corethrurus* (Müller, 1857) et *Eisenia andrei* (Bouché, 1972)³ pour tenter de répondre aux questions suivantes :

- Quel est l'impact des vers sur la mobilité et la disponibilité du mercure dans les sols ?
- Quels mécanismes sont mis en jeu ? Modification directe des paramètres physico-chimiques des sols ou modification indirecte en agissant sur les communautés bactériennes des sols ?
- Quelle est leur capacité accumulatrice du mercure et comment varie-telle avec le niveau de contamination dans les sols ?

Hypothèses : De par leurs activités, les vers de terre modifient de nombreux paramètres biotiques et abiotiques dans les sols (Jones *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 2000). Dans les sols contaminés au mercure, l'impact des vers de terre sur ces paramètres n'a pratiquement pas été étudié (Rieder *et al.*, 2013) et reste complètement inconnu dans les sols tropicaux. De plus, les mécanismes par lesquels ils agissent n'ont pas été clairement démontrés jusqu'à ce jour. Les résultats pourraient être différents selon les espèces de vers de terre et les sols étudiés (e.g. vers et sol tempéré ou tropical) du fait de la spécificité physiologique des vers et de la variabilité des paramètres des sols. Enfin, la bioaccumulation du mercure devrait augmenter avec le temps passé dans les sols contaminés.

³ phylum : Annelida ; classe Clitellata ; sous-classe Oligochaeta ; famille : Lumbricidae; genre *Eisenia*

Afin d'aborder ces différents aspects, ce travail s'articule en différents chapitres :

- Le **Chapitre I** fait l'état des connaissances sur le mercure et les problématiques environnementales et sanitaires liées à son utilisation. La biogéochimie du mercure dans les sols y est développée. Enfin, les interactions entre le mercure et les vers de terre y sont également rapportées.

- Le **Chapitre II**, consacré à la présentation du matériel et méthodes, présente le site d'étude et détaille puis justifie le choix des méthodes d'échantillonnages sur le terrain ainsi que les expérimentations mises en place au laboratoire.

- Le **Chapitre III** constitue la première partie des résultats. Une analyse détaillée de l'évaluation de la diversité des vers de terre *in situ* y est présentée et une relation est faite avec les paramètres physico-chimiques des sols et les teneurs en mercure.

- Le **Chapitre IV** porte sur l'étude de l'impact du mercure sur un vers de terre tropical: *Pontoscolex corethrurus*. L'originalité de cette étude réside dans le choix de cette espèce pour une étude écotoxicologique dans un sol naturel tropical.

- Le **Chapitre V** est consacré à l'étude des relations entre les vers de terre et les composants du sol. Le rôle des vers de terre dans la dynamique du mercure constitue le point central. Dans ce chapitre, nous mettons la lumière sur le rôle des vers de terre dans la mobilité et la disponibilité du mercure et sur les mécanismes par lesquels ils agissent.

- Le **Chapitre VI** est une discussion générale des résultats obtenus dans le cadre de cette thèse et de ceux de la littérature.

- Ce manuscrit se termine par une **conclusion générale** rappelant l'essentiel des résultats obtenus et indiquant les différentes perspectives qu'ouvre ce travail de thèse.

Le chapitre III est rédigé en français et les chapitres IV et V sont présentés sous forme d'articles (en anglais). L'article du chapitre IV est en phase finale de rédaction pour être soumis à la revue *Environmental Pollution*. Les articles du chapitre V sont en préparation pour être soumis à *Applied Soil Ecology* et *Pedobiologia* respectivement.

Chapitre I
Etat des connaissances

I-1. Le mercure dans l'environnement

I-1.1. Le mercure, élément trace métallique

Les éléments traces et les éléments majeurs sont définis par rapport à leur abondance naturelle dans la croûte terrestre. Conventionnellement en sciences du sol, les éléments traces métalliques (ETM) sont les 68 éléments minéraux, constituants de la croûte terrestre, dont le pourcentage massique est inférieur à 0,1% (Baize, 1997). Parmi eux, le mercure est un élément chimique de symbole Hg.

Les concentrations en ETM présentes naturellement dans les sols constituent le fond géochimique. Ce dernier dépend à la fois des teneurs présentes dans les roches mères et des processus d'altération qui ont conduit à la formation du sol et qui ont pu lessiver ou concentrer les éléments (Robert, 1996). Les ETM dont le mercure ne représentent que 0,6% des éléments totaux dans les sols alors que les 12 éléments majeurs interviennent pour 99,4%. Les métaux les plus abondants dans la croûte terrestre sont l'aluminium et le fer (Tableau 1) (Baize, 1997). Comme le montre le Tableau 1, le mercure est présent dans la croûte terrestre en quantité infime. Sa présence en grande quantité est synonyme d'apport anthropique dans l'environnement.

Tableau 1 : Teneurs du fond géochimique des éléments majeurs et traces dans la croûte terrestre d'après Baize, 1997.

Eléments majeurs	%	Eléments traces	%
Oxygène	46,6	Fluor	0,07
Silicium	27,7	Chrome	0,02
Aluminium	8,1	Nickel	0,008
Fer	5	Zinc	0,0065
Calcium	3,63	Azote	0,0046
Sodium	2,8	Cuivre	0,0045
Potassium	2,5	Cobalt	0,0023
Magnésium	2	Plomb	0,0015
Titane	0,44	Iode	0,00003
Hydrogène	0,14	Cadmium	0,00002
Phosphore	0,11	Sélénium	0,000009
Manganèse	0,1	Mercure	0,000001

L'homme, par ses activités industrielles, agricoles et minières contribue à introduire des ETM dans les sols *via* l'apport de fertilisants (e.g. l'épandage de boues et lisiers) et de

produits phytosanitaires, et *via* les retombées atmosphériques (plomb des essences jusqu'en 1995, fumées d'usines...). Ces apports diffus d'ETM existent depuis des années, voire des siècles, et vont croissant en raison de l'augmentation des volumes et de la diversification des sources de pollution. Dans le cas du mercure, ses sources et ses émissions sont détaillées dans la partie I-1.2., en même temps que son cycle biogéochimique.

I-1.1.2. Propriétés du mercure

Le mercure a la particularité d'être le seul métal sous forme liquide dans les conditions normales de température et de pression. D'ailleurs, son symbole Hg provient du latin *hydrargyrum* qui signifie « argent liquide ». Ses principales caractéristiques physico-chimiques sont résumées dans le Tableau 2, ci-dessous.

Tableau 2. Principales caractéristiques physico-chimiques du mercure.

Symbole chimique	Hg
Numéro atomique	80
Masse atomique	200.69
Nombre d'isotopes	38
T° ébullition	356.62 °C
Différentes formes	Hg ⁰ , Hg ²⁺ , CH ₃ Hg

On retrouve le mercure dans tous les compartiments de l'environnement (air, eau, sol), où il peut être présent sous différentes formes chimiques. Il n'a aucun rôle bénéfique connu pour les êtres vivants. Selon l'OMS, le mercure est parmi les polluants les plus toxiques pour l'homme et l'environnement ; il a été récemment reconnu comme un contaminant majeur par la Commission Européenne (2006). Aussi plusieurs réglementations ont vu le jour afin de limiter son utilisation et de prévenir ses risques. Comprendre la répartition du mercure à l'échelle de la planète passe par la connaissance de ses sources (naturelles et anthropiques) et des transformations biogéochimiques (cycle biogéochimique) régissant sa spéciation et son transfert dans l'environnement.

I-1.2. Cycle biogéochimique du mercure.

Le cycle biogéochimique naturel du mercure est complexe. En effet, il existe une multitude d'échanges entre les différents compartiments de l'environnement : l'hydrosphère, l'atmosphère, la biosphère, les sols et les roches. De plus, le mercure existe sous différents

états physiques (solide, dissous, gazeux) et peut passer d'une forme chimique à une autre (organique, inorganique, oxydée, réduite). Enfin, cette complexité naturelle est accrue par certaines activités anthropiques qui modifient les flux et la distribution des différentes formes chimiques du mercure (Carmouze *et al.*, 2001).

I-1.2.1. Les sources et émissions naturelles

Le mercure est un constituant naturel de la croûte terrestre et peut être libéré dans l'environnement, notamment par les volcans sous forme de vapeur (Hg^0). L'altération des roches constitue également une source potentielle de mercure ; c'est pourquoi le mercure est naturellement présent dans les sols et constitue le fond géochimique. Ceci constitue la source primaire de mercure.

Après s'être déposé sur les continents et les océans, une bonne partie du mercure naturel se volatilise à nouveau, puis se redistribue sous une autre forme, aussi bien en milieu continental qu'océanique : ce sont les émissions secondaires de Hg. Ces réémissions se font à partir des sols (souvent par érosion éolienne), des plans d'eau, de la végétation et à cause des feux de forêt. Les émissions naturelles dans l'atmosphère sont estimées à 3000 t par an (Carmouze *et al.*, 2001).

Cependant, la répartition du mercure n'est pas homogène dans la croûte terrestre. Il se trouve naturellement concentré au niveau de certaines zones géologiques actives comme les zones de subduction, les failles et le long des limites de plaques tectoniques où les roches sont enrichies en mercure. De par leur répartition, ces régions sont appelées les « ceintures mercurifères » (Figure 1) (Carmouze *et al.*, 2001).

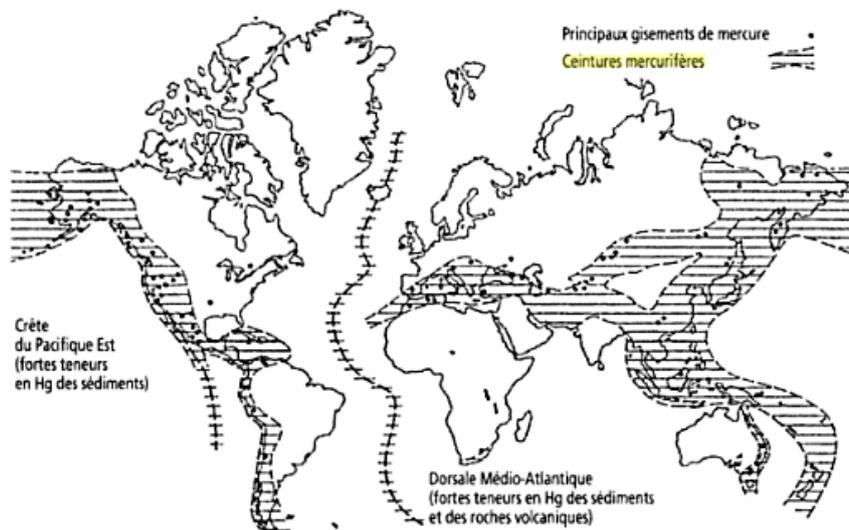


Figure 1 : Les ceintures mercurifères d'après Jonasson et Boyle, 1972.

I-1.2.2. Les sources et émissions anthropiques

Les sources et les émissions anthropiques de mercure sont nombreuses. Près de 80% de ces émissions proviennent des combustibles fossiles (surtout le charbon), des activités minières (notamment l'orpaillage), de la purification des minerais, et de l'incinération et du traitement des déchets solides. Les apports directs au sol sous forme de fertilisants et de fongicides sont responsables de 15% des émissions et environ 5% par des effluents industriels et/ou miniers. De plus, il existe une grande variété de sources diffuses liées aux piles usagées, aux thermomètres et à divers déchets et matériaux industriels (Carmouze *et al.*, 2001). Enfin, les sols mis à nu par certaines pratiques agricoles (feux de forêt et déboisements) sont soumis à l'érosion éolienne et entraînent l'augmentation d'aérosols enrichis en mercure (Lacerda *et al.*, 2004).

Dans l'atmosphère, les émissions anthropiques globales sont estimées à 3500 t par an (Nriagu, 1989). Etant donné sa pression de vapeur élevée et son temps de résidence dans l'atmosphère relativement long, le mercure est constamment redistribué par voie aérienne au gré de la circulation atmosphérique générale. De ce fait, sa distribution reste relativement homogène à l'échelle planétaire. Ainsi, on détecte le mercure à des concentrations supérieures au fond géochimique dans des régions très éloignées des ceintures mercurifères comme les régions nord-tempérées et boréales (Suède, Finlande,...) ainsi qu'en Arctique (Carmouze *et al.*, 2001; Mason *et al.*, 1994).

Depuis le début de l'ère industrielle, les émissions anthropiques ont fortement perturbé le cycle naturel du mercure. Actuellement, de par la forte dynamique biogéochimique de cet élément à l'échelle globale et malgré la réglementation sur l'utilisation et les émissions directes de mercure, la principale source dans l'environnement est la réémission de mercure anthropique déposé. Les émissions et les dépôts de mercure, ainsi que les concentrations dans l'air et les eaux de surfaces sont en moyennes trois fois supérieures à ceux de l'époque préindustrielle. **Tous les compartiments environnementaux ont été contaminés par le mercure provenant des activités humaines** (Mason *et al.*, 1994).

I-1.2.3. Importance des formes du mercure dans son cycle

Le mercure est un élément métallique particulièrement mobile. On peut le retrouver sous différentes formes chimiques, dont trois formes principales :

- Hg^0 : mercure élémentaire, volatile. Sa vapeur est incolore et inodore à température ambiante. Cette forme est issue du dégazage de la croûte terrestre et des océans.

La forme oxydée du mercure (Hg^{2+}) retombe sur les surfaces principalement via les dépôts humides : 40% retombent sur les surfaces océaniques et 60% sur les surfaces continentales. Dans les océans, la majeure partie du mercure est à nouveau réduite sous la forme Hg^0 et réémise dans l'atmosphère. Dans les lacs, le mercure peut également être exporté avec les sédiments sous forme particulaire. Des processus similaires sont observés dans les sols. Cependant, le stockage du mercure dans les sols est important et le retour dans l'atmosphère plus faible (Anderson, 1979). Le devenir du mercure dans les sols sera développé dans les paragraphes I-2.2. et I-2.4. de ce chapitre.

Le mercure peut être méthylié dans des conditions physico-chimiques précises. La méthylation du mercure peut être biotique ou abiotique (à dominance biotique) et les facteurs la gouvernant sont : la spéciation des métaux, les composés organiques et inorganiques, le pH, la température, mais également la teneur en sulfates et sulfures dans le milieu. La méthylation biotique du mercure a été décrite dans la colonne d'eau et dans les sols, faisant intervenir des bactéries sulfato-réductrices et ferri-réductrices, en général dans des conditions anaérobies (Fleming *et al.*, 2006; Kerin *et al.*, 2006).

I-1.3. Toxicité du mercure : impact sur les organismes vivants

I-1.3.1. Toxicité des ETM en général et du mercure en particulier

La toxicité aiguë d'un ETM pour un organisme dépend de plusieurs facteurs :

- sa forme chimique (spéciation),
- la façon dont il est absorbé (ingestion, inhalation...),
- le type d'organisme dans lequel il se trouve (plantes, animaux...),
- l'âge de l'organisme et son état de développement,
- son accumulation dans certains tissus, glandes ou organes de l'organisme.

La toxicité des ETM dépend également de plusieurs paramètres environnementaux modifiant leur spéciation en solution. Parmi ces paramètres, on peut citer notamment le pH dont une augmentation entraîne la précipitation des cations métalliques sous forme d'hydroxydes ou d'oxydes de métaux insolubles. Il en résulte une diminution de la toxicité car les précipités formés sont généralement moins disponibles et moins toxiques que les cations métalliques libres (Bliefert & Perraud, 2001).

Le mercure est particulièrement toxique sous toutes ses formes et dans tous ses états chimiques, mais la forme la plus toxique est le méthylmercure (MeHg). Cet élément est responsable de nombreuses conséquences néfastes sur les écosystèmes naturels et sur tous les organismes vivants : des microorganismes jusqu'aux animaux aquatiques et terrestres, impactant également l'homme de manière directe ou indirecte.

I-1.3.2. Toxicité du mercure vis-à-vis des écosystèmes

I-1.3.2.a. Microorganismes : impact et résistance

Il a été démontré que des concentrations élevées en ETM dans les sols affectent les communautés microbiennes de façon significative, ainsi que les processus écologiques associés (cycles C, N, et P entre autres) (Oliveira & Pampulha, 2006; Philippot *et al.*, 2008). Différentes études ont montré que la présence de mercure ionique (Hg^{2+}) affecte durablement l'activité et la structure des communautés bactériennes dans les sols tempérés agricoles (Ranjard, 1997; Müller *et al.*, 2002, 2001a; Rasmussen, 2001), forestiers (Frey & Rieder, 2013) et également dans les sols tropicaux (Harris-Hellal, 2008, 2009). Cependant, une résilience rapide de la diversité fonctionnelle de ces communautés a été observée dans l'étude de Harris-Hellal *et al.* (2009), montrant une capacité d'adaptation des communautés bactériennes dans les sols guyanais. Chez les bactéries, la forme Hg^{2+} est particulièrement toxique : elle se fixe aux groupements sulfhydriles de protéines membranaires et inhibe la synthèse de macromolécules. De plus, les ions mercuriques se fixent aux nucléotides et impactent les mécanismes de la transcription et de la traduction (Mathema *et al.*, 2011).

En réponse à cette toxicité, plusieurs souches bactériennes ont développé des systèmes de résistance au mercure (Osborn *et al.*, 1997). Les gènes responsables de cette résistance sont souvent regroupés en un opéron, appelé **l'opéron *mer***. Ce système génétique est le seul système bien connu parmi les systèmes bactériens de résistance métallique avec un taux important de transformations de sa cible toxique : le mercure (Mathema *et al.*, 2011). Ces mécanismes de résistance impliquent la transformation chimique du mercure par réduction, par méthylation ou déméthylation, conduisant à des formes moins toxiques et/ou plus volatiles que les groupements d'origine. En particulier, les gènes *mer A* et *mer B* de l'opéron *mer* codent pour la mercure réductase qui permet de réduire le mercure sous forme Hg^{2+} en Hg^0 et la mercure lyase qui hydrolyse la liaison entre mercure et composé organique (C-Hg) des composés organo-mercuriels comme le méthylmercure (Barkay *et al.*, 2003) (Figure 3).

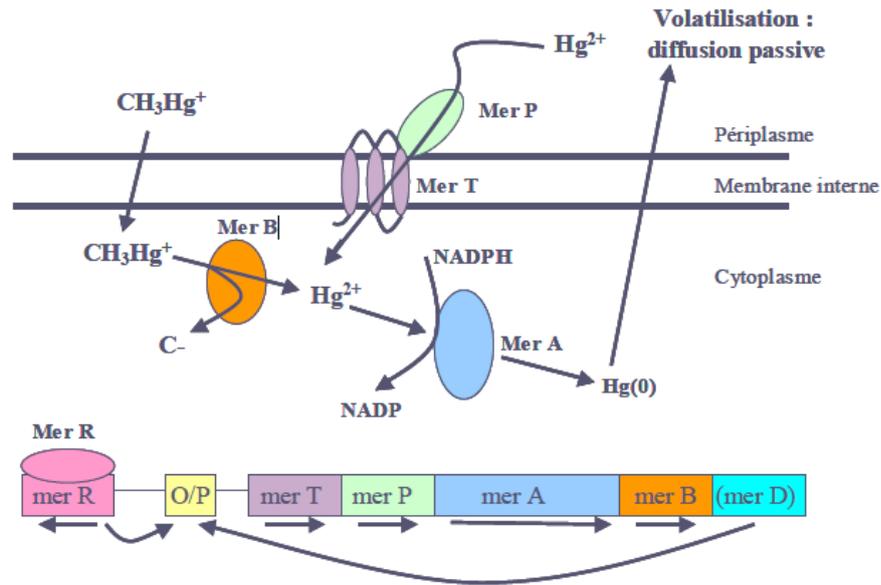


Figure 3. Schématisation et organisation type de l'opéron *mer*. *Mer A* : mercure réductase, réduction du Hg^{2+} en Hg^0 . *Mer B* : organomercure lyase, hydrolyse la liaison C-Hg. *Mer T* : transport du mercure dans la cellule. *Mer P* : transport du mercure périplasmique. *Mer R* : régulation de l'opéron, se fixe à l'ADN de l'opérateur (O) et inactive la transcription de l'opéron. *Mer D* : impliqué dans la régulation (schéma de Harris-Hellal, 2008).

L'intérêt des propriétés des gènes *mer* a été démontré depuis plus de 20 ans pour le traitement du mercure dans les eaux usées. A ce jour, différentes approches ont été utilisées, utilisant des opérons *mer* de souches bactériennes naturellement résistantes ou transformés afin d'éliminer le mercure dans les effluents industriels et l'environnement contaminé (Barkay *et al.*, 2003).

I-1.3.2.b. Plantes

Le transfert des ETM du sol vers les racines des plantes est lié à leur réactivité dans la matrice du sol, ainsi qu'à leur concentration et leur spéciation dans la solution du sol (Kabata-Pendias, 2001). Les plantes supérieures exposées au mercure voient plusieurs processus métaboliques affectés : diminution de la photosynthèse, de la transpiration, de l'absorption de l'eau, de la synthèse de chlorophylles et en conséquence, une diminution de la production primaire. De plus, le mercure accumulé dans les racines inhibe l'absorption de K^+ et de nutriments comme le magnésium (Boening, 2000; Kabata-Pendias, 2001).

La disponibilité du mercure organique ou inorganique du sol est faible pour les plantes. Le mercure a tendance à s'accumuler dans les racines ; les racines fonctionnent comme une barrière pour l'absorption du mercure. En conséquence, la translocation du mercure des racines vers les parties aériennes est presque nulle. Malgré des concentrations importantes de mercure dans le sol, elles restent faibles dans les plantes (Patra & Sharma,

2000). Dans des cultures comme le maïs, le mercure est stocké dans les racines, ce qui réduit les risques de contamination pour l'homme (Peralta-Videa *et al.*, 2009).

La source la plus importante de contamination dans l'agriculture concerne l'utilisation de composés mercuriels organiques pour l'enrobage des semences afin de prévenir les maladies liées aux champignons. Les problèmes liés au traitement des graines augmentent directement avec la proportion de composés mercuriels appliqués (Patra & Sharma, 2000). Ces traitements ont été à l'origine d'une tragédie en Irak dû à la consommation de graines d'orge et de blé traitées (Veiga & Baker, 2004).

I-1.3.2.c. Organismes aquatiques : impact et accumulation

L'impact du mercure sur la chaîne trophique aquatique a été étudiée des invertébrés aquatiques jusqu'aux poissons carnivores situés en fin de chaîne alimentaire. **Les poissons** sont les organismes les plus étudiés car ils **représentent la voie d'exposition la plus importante pour les humains** (SETAC, 2007). Dans le bassin amazonien en particulier, de nombreuses études se sont intéressées à cette problématique depuis les années 1990 car les populations locales consommant les poissons en fin de chaîne alimentaire se sont révélées être fortement contaminées par le MeHg (Carmouze *et al.*, 2001; Boudou *et al.*, 2006). En effet, il est préférentiellement accumulé dans les tissus musculaires des poissons, et ce tout au long de la chaîne trophique (Peralta-Videa *et al.*, 2009). La paroi intestinale des poissons est une barrière efficace au chlorure de mercure, mais est perméable au MeHg. Cette forme organique du mercure peut représenter jusqu'à 50% du mercure accumulé, dépassant largement les recommandations de l'OMS (Boening, 2000; Carmouze *et al.*, 2001).

Le méthylmercure est bioamplifié le long de la chaîne trophique. Ainsi, les poissons carnivores situés en fin de chaîne trophique, comme l'espadon et le thon, contiennent les concentrations de méthylmercure les plus importantes dans leurs tissus. Le transfert du MeHg dans les niveaux trophiques élevés de la chaîne trophique aquatique se fait presque entièrement par ingestion alimentaire. Cependant, l'accumulation du mercure *via* l'absorption directe de l'eau peut être importante pour certains organismes situés en bas de la chaîne trophique, comme le phytoplancton et le zooplancton. De plus, il est important de noter que la fraction de MeHg peut varier considérablement entre les différents niveaux trophiques. Des études sur différents organismes invertébrés aquatiques (moules, crabes, crevettes) rapportent des taux variant de 10% à plus de 90% du mercure total. Aussi, il est primordial de déterminer le taux de MeHg plutôt que le mercure total dans les échantillons biologiques afin d'évaluer les risques de toxicité (SETAC, 2007).

L'accumulation significative du mercure dans les organismes aquatiques a valu leur utilisation comme bioindicateurs de contamination du milieu aquatique par le mercure. Les poissons piscicoles servent d'indicateurs de contamination pour la consommation humaine, alors que les moules servent d'indicateurs de contamination des cours d'eau. Les variations de MeHg mesurées dans les organismes aquatiques reflètent les variations des processus affectant la méthylation bactérienne du mercure dans l'eau (SETAC, 2007).

I-1.3.2.d. Organismes terrestres : impact et accumulation dans la chaîne trophique

Peu d'études à ce jour se sont intéressées à l'impact du mercure sur les organismes terrestres. Certains invertébrés du sol (limaces, escargots, scarabées, vers de terre), ainsi que des oiseaux et des mammifères ont été étudiés (Boening, 2000). Tous ces organismes sont sensibles à des doses plus ou moins élevées de mercure et leur croissance se trouve affectée par la présence de mercure dans les sols. Des symptômes importants ont été observés tels que des lésions cérébrales et des perturbations des récepteurs moteurs et sensoriels en réponse à des ingestions quotidiennes de mercure à partir de 1 ppm, sous forme organique et/ou inorganique (Boening, 2000). De plus, **le mercure est préférentiellement accumulé sous sa forme méthylée** comme pour les organismes aquatiques décrits précédemment.

L'impact du mercure sur les vers de terre est développé dans le paragraphe I-3.4.1. En effet, ils représentent la biomasse la plus importante dans les sols et servent de nourriture pour des organismes supérieurs, comme les oiseaux et les taupes, d'où leur importance dans la chaîne trophique terrestre.

Concernant les oiseaux, des concentrations élevées en mercure ont été mesurées dans les zones où le MeHg est utilisé comme fongicides sur les graines (Rand, 1995). Chez ces organismes, le mercure est accumulé préférentiellement dans le foie et les reins et majoritairement sous forme de MeHg (Wolfe *et al.*, 1998; Boening, 2000). Une autre étude a montré que la concentration moyenne augmentait avec le niveau de réseau trophique de l'oiseau variant de 6 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ accumulés pour les végétariens à 40 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ pour les piscivores. Les oiseaux se nourrissant d'invertébrés ont accumulés des quantités de mercure intermédiaires (12 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$) (Zilioux *et al.*, 1993).

Le peu d'études publiées à ce jour ne permettent pas de fixer de seuil critique de contamination pour l'environnement terrestre. En effet, l'accumulation du mercure dans la chaîne trophique terrestre a été jusqu'à ce jour beaucoup moins étudiée que pour les milieux aquatiques. Pourtant, le mercure, qui est préférentiellement fixé dans le sol, est en contact permanent avec les organismes terrestres et pourrait entrer dans la chaîne alimentaire terrestre.

I-1.3.3. Toxicité du mercure vis-à-vis de l'homme

Le mercure est considéré par l'OMS comme l'un des dix produits chimiques extrêmement préoccupants pour la santé publique. La toxicité du mercure chez l'homme peut se manifester suite à différents modes d'exposition : (i) l'inhalation de vapeurs de mercure et (ii) l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés. L'inhalation des vapeurs a lieu majoritairement sur les chantiers d'orpaillage où les amalgames de mercure sont chauffés afin de récupérer l'or extrait. Le mercure chauffé se volatilise et regagne l'atmosphère sous forme de gaz Hg^0 . Le second cas concerne principalement les populations locales vivant près des cours d'eau et consommant les produits de la pêche contaminés au mercure (Veiga *et al.*, 1999; Ekino *et al.*, 2007; Bravo *et al.*, 2010). Les poissons carnivores en fin de chaîne alimentaire concentrent le plus de mercure dans leurs tissus (Boudou *et al.*, 2006).

La toxicité du mercure sous sa forme gazeuse (Hg^0) commence par les voies respiratoires, pour se solubiliser dans le plasma, le sang et l'hémoglobine. Via le sang, il atteint les reins, le cerveau et le système nerveux. Le risque chez les femmes enceintes est aussi présent car le mercure se déplace facilement au travers du placenta pour atteindre le fœtus. Même après la naissance les risques perdurent car le lait maternel peut également être contaminé.

Plusieurs cas de contamination de populations humaines ont été recensés dans le monde. Les plus tristement connus sont le drame de la Baie de Minamata au Japon dans la fin des années 1950, celui en Irak en 1972 pour des semences contaminées et celui qui se poursuit aujourd'hui dans la région amazonienne et notamment en Guyane, causant de nombreux symptômes et décès.

La contamination de la baie de Minamata, au Sud-Ouest du Japon sur l'île de Kyushu, est liée à une usine de fabrication d'acétaldéhyde dont l'une des étapes de la synthèse conduit à la génération de MeHg. Ce dernier a été rejeté directement dans la baie et s'est bioaccumulé dans les organismes aquatiques ($5 \text{ à } 37 \mu\text{g Hg g}^{-1}$). Les habitants de la baie qui ont consommé ces poissons, ont présenté des symptômes tels que la perte de l'audition, une réduction du champ visuel, une diminution de la sensibilité au toucher ou encore une perte de coordination au niveau des membres. Tous ces symptômes ont été déclarés comme étant la conséquence de l'intoxication au MeHg et sont regroupés sous l'appellation « maladie de Minamata » (Ekino *et al.*, 2007).

En Guyane française, plus de 50 % de la population vit au bord des fleuves, comme c'est le cas des amérindiens Wayanas qui habitent sur les bords du fleuve Maroni. Des études faites sur ces populations à partir de 1994 ont montré une intoxication au mercure en analysant les taux de mercure présents dans leur sang et leurs cheveux (Charlet & Boudou, 2002). Ces

habitants présentent des taux de mercure dans le sang de $11,4 \mu\text{g g}^{-1}$, dépassant largement les valeurs recommandées par l’OMS ($5 \mu\text{g g}^{-1}$). Il est important de noter que plus de 90 % de ce mercure est sous la forme organique (MeHg). De grandes quantités de poisson sont consommées par les Wayanas, et notamment des poissons carnivores situés en fin de chaîne trophique. L’intoxication de ces populations par le mercure est chronique, bien que les quantités quotidiennes de poisson ingérées ne soient pas aussi élevées que celles de Minamata au Japon.

De nos jours, la population humaine est exposée à trois différentes formes de mercure : les vapeurs de mercure émises par les amalgames dentaires, le MeHg naturellement bioaccumulé dans les poissons, et un composé d’éthylmercure, le thimerosal, qui est utilisé dans certains vaccins destinés aux enfants (Diez *et al.*, 2008).

I-1.4. Normes et réglementations pour l’utilisation du mercure dans le monde

Différentes normes ont été établies par des organismes gouvernementaux et non-gouvernementaux dans le but de protéger l’homme des effets néfastes du mercure et du méthylmercure en particulier. Il existe des normes pour les expositions aux vapeurs de mercure sur les lieux de travail, ainsi que des normes pour le niveau de méthylmercure dans les poissons (Dolbec, 2001).

En 1996, une limite d’exposition professionnelle a été fixée à $0,025 \text{ ng. m}^{-3}$ par l’ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists). Concernant la consommation de poissons, le niveau fixé aux Etats-Unis, au Canada et en France est de $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ pour le taux de méthylmercure dans la partie comestible de la plupart des poissons. Au Brésil, la même limite de concentration en mercure est fixée, en se basant sur une consommation hebdomadaire de 400 g de poisson. La fréquence de consommation de poisson est un facteur très important à considérer, notamment dans le bassin amazonien où la consommation est estimée à 200 g de poisson par jour (Dolbec, 2001).

Des seuils de contamination des populations et des recommandations sanitaires édités par l’OMS sont disponibles, mais de nombreux pays ne les appliquent pas, en particulier vis à vis de certaines catégories de populations exposées (Tableau 3).

Tableau 3 : Valeurs de référence des concentrations totales en Hg dans différents tissus humains (d'après WHO, 1990).

Milieus biologiques	Valeurs de référence
Sang	5 $\mu\text{g Hg L}^{-1}$
Urine	4 $\mu\text{g Hg L}^{-1}$
Cheveux	1-2 $\mu\text{g Hg kg}^{-1}$
Placenta	10 mg Hg kg^{-1}

La réglementation concernant l'utilisation, l'extraction et la commercialisation du mercure reste peu abondante et est, de plus, très inégalement respectée à travers le monde. En effet, le mercure est encore utilisé pour de nombreuses applications dont les plus connues sont la fabrication des piles et des thermomètres, les amalgames dentaires et l'extraction de l'or et de l'argent depuis des siècles (Nriagu, 1979; UNEP, 2005).

Dans l'Union Européenne, l'utilisation du mercure est réglementée, voire interdite. Les directives limitent de plus en plus la vente d'objets contenant du mercure depuis les années 2000, comme les thermomètres (interdits en 2009). Concernant les utilisations en dentisterie, il existe une interdiction du mercure seulement dans quelques pays comme la France, la Suède et le Danemark (UNEP, 2005).

L'utilisation du mercure pour l'exploitation aurifère est interdite depuis 2006 en France, au Brésil, en Chine et aux Philippines (UNEP, 2005). Cependant, de nombreuses exploitations illégales continuent de l'utiliser. L'activité minière aurifère illégale représente le plus lourd facteur de dégradation environnementale sur les écosystèmes de Guyane française, pourtant reconnus d'importance mondiale. Il s'agit également d'un fléau social, sanitaire et économique pour l'ensemble du territoire ; cette problématique perdure depuis plus d'une vingtaine d'années.

En 2009, le Conseil d'administration du Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE) a décidé d'élaborer un instrument juridiquement contraignant sur le mercure et le 19 janvier 2013 à Genève, plus de 140 pays sont arrivés à un accord. Ce texte, désormais baptisé « Convention de Minamata » en hommage aux victimes des pollutions par le mercure de la Baie de Minamata, vient d'être signé au Japon le 10 octobre 2013. Résultat de quatre années de négociations, cette convention constitue une réelle avancée dans la gestion de cette substance dangereuse, tant pour la santé humaine que pour l'environnement. Toutes les étapes du cycle de vie du mercure, de l'extraction minière en passant par le

commerce jusqu'au stockage en tant que déchet, y sont réglementées. De plus, l'OMS et l'organisation non gouvernementale *Health Care without Harm* se sont réunies début octobre 2013 pour lancer une initiative visant à éliminer le mercure de tous les dispositifs médicaux de mesure d'ici 2020.

D'importantes quantités de mercure sont déjà présentes dans les sols à travers le monde. Qu'il soit d'origine naturelle ou anthropique, le mercure est responsable de nombreux problèmes sanitaires et environnementaux. Cependant, sa toxicité est directement liée à sa mobilité et sa disponibilité dans les sols.

I-2. Cas de la Guyane française : entre fixation et mobilité du mercure dans les sols

I-2.1. Le mercure en Guyane

En Guyane française, les sources de mercure en Guyane sont multiples, et peuvent être d'origine naturelle ou anthropique. De plus, les sols guyanais présentent des caractéristiques particulières dues à leur situation géographique et au climat tropical.

I-2.1.1. Les sources de mercure en Guyane

Le bassin amazonien se trouve éloigné de la ceinture mercurifère. Ainsi, il présente des concentrations très faibles en Hg dans la roche mère de l'ordre de 4 à 6 ng.g⁻¹ en moyenne. Cependant, ces sols montrent de fortes concentrations en mercure dans les couches supérieures, jusqu'à dix fois supérieures à celles mesurées dans les sols tempérés. Ce fort enrichissement en mercure dans les sols du bassin amazonien est lié d'abord à l'érosion de la roche mère, mais surtout aux apports atmosphériques de mercure inorganique et à de fortes activités minières (légal ou non) pour l'extraction de l'or et de l'argent (Roulet & Grimaldi, 2001). En effet, une étude récente en Guyane française (Guedron *et al.*, 2006) a montré que **les apports de mercure exogénique sont largement supérieurs à ceux d'origine lithogénique**. Ce mercure est présent en grande quantité dans les sols du bassin amazonien soit sous la forme Hg⁰ soit sous la forme Hg(II), complexé aux oxydes de fer et d'aluminium.

Les activités d'orpaillage constituent une source additionnelle de mercure dans les cours d'eau, car suite à la déforestation elles conduisent à une forte dégradation des sols et l'arrivée de particules chargées en mercure dans le milieu aquatique. Par ailleurs, le mercure est utilisé pour l'orpaillage depuis l'époque coloniale pour sa capacité à amalgamer l'or et les mines abandonnées libèrent encore aujourd'hui des quantités importantes de ce métal dans les sols et les cours d'eau (Figure 4).



Figure 4 : Photographies du site d'étude dans la zone orpaillée par la Compagnie Minière Boulanger.

D'autres activités anthropiques sont susceptibles de remobiliser une partie du mercure contenu dans les sols forestiers lors des déboisements, dans la couverture végétale lors des incendies, et dans les sols néo-inondés dus à la construction de barrages hydroélectriques ou à la déviation des cours d'eau lors d'activités d'orpaillage (Roulet, 2001; Wasserman *et al.*, 2003).

I-2.1.2. Les sols ferrallitiques : caractéristiques de la Guyane française

La majeure partie de la Guyane appartient au bouclier guyanais ou « Plateau des Guyanes ». Il s'agit d'une formation géologique très ancienne, d'âge compris entre 2,5 et 1,9 milliards d'années. Les roches qui la constituent sont majoritairement granitiques. Les sols mis en place sont souvent de type ferrallitiques, et majoritairement recouverts de forêt tropicale humide (Boulet *et al.*, 1993). Le climat des zones tropicales accélère les phénomènes de pédogenèses tels que l'altération et l'érosion, dû aux fortes précipitations et aux températures élevées.

Dans cette région, les sols formés sont très altérés et profonds. Sur les plateaux et les versants on trouve des oxisols⁴, aussi appelés ferralsols⁵ ou sols ferrallitiques en France. Ces sols sont typiquement composés d'un horizon organique d'épaisseur variable et d'un horizon minéral plus ou moins profond, pouvant aller jusqu'à 30 mètres. Ces sols ont en général de bonnes propriétés physiques, mais leurs teneurs en nutriments est faible, ainsi que leur

⁴ Selon la classification américaine (USDA Soil Taxonomy). ⁵ Selon la FAO (WRB, 2006).

capacité de rétention de ces nutriments. Ils présentent notamment des problèmes de rétention du phosphate (WRB, 2006). Ils sont majoritairement composés d'argile (kaolinite néoformée) ainsi que d'oxydes de fer et d'aluminium, d'où leur couleur jaune ou rouge très caractéristique.

I-2.2. La fixation du mercure dans les sols ferrallitiques

Qu'il soit issu du fond géochimique ou d'activités d'orpaillage, le mercure se fixe sur les différents composants du sol, en fonction de leur nature, de leur abondance et des conditions physico-chimiques. Il est préférentiellement stocké dans les sols du fait de son affinité pour les différents sites de fixation présents dans les sols guyanais. Le mercure peut être présent dans deux configurations : une partie du mercure est présente sous forme libre, dans la solution du sol, mais la partie la plus importante est complexée ou adsorbée aux composants du sol. **Dans les sols ferrallitiques, le mercure peut se fixer aux oxydes de fer et d'aluminium, aux argiles et à la matière organique** (Wasserman *et al.*, 2003).

I-2.2.1. Interactions mercure-matière minérale

Les sols ferrallitiques sont particulièrement riches en oxydes de fer. Ces derniers jouent donc un rôle non négligeable dans la répartition du mercure dans les sols tropicaux (Roulet & Lucotte, 1995; Roulet *et al.*, 1998). Des concentrations importantes de Hg sont observées dans les sols tropicaux d'Amazonie dans les horizons enrichis en oxydes de fer (Carmouze *et al.*, 2001).

L'adsorption des cations métalliques sur les surfaces des oxydes de fer peut être spécifique ou non spécifique. L'adsorption spécifique implique directement une interaction avec des groupements hydroxyles déprotonés de la surface minérale. L'adsorption non spécifique implique quant à elle, la présence de molécules d'eau entre le cation adsorbé et les groupements fonctionnels de surface. Il est important de noter que le rayon ionique du mercure est de 0,11 nm et celui du fer de 0,06 nm, soit largement plus grand que celui du fer ; le mercure ne peut théoriquement pas être substitué dans le réseau cristallin des oxydes de fer.

Le mercure peut être remobilisé lors de la dissolution des oxydes de fer. Ces oxydes peuvent être solubilisés dans l'environnement par différents processus abiotiques et biotiques, notamment par les microorganismes en conditions réductrices. De plus, différentes études ont montré que les oxydes de fer amorphes offrent une grande surface spécifique pour l'adsorption des métaux et sont en même temps plus facilement solubilisés que les formes cristallisées (Harris-Hellal, 2008, 2010). Dans l'environnement, les oxydes de fer sont

rarement à l'état pur ; ils sont généralement substitués par d'autres cations métalliques tels que l'aluminium ou le manganèse dont les taux de substitution peuvent influencer les cinétiques de solubilisation des oxydes de fer qui les renferment.

I-2.2.2. Interactions mercure-matière organique

Dans les sols et les sédiments, **le mercure se lie avec la matière organique sous forme de complexes organiques très stables**. Il a une très forte affinité pour la matière organique (MO) en particulier pour les substances humiques due à son affinité pour les groupements sulfures (S) (Anderson, 1979; Neculita *et al.*, 2005). Quand les quantités de MO sont plus importantes en surface, les concentrations en mercure le sont également (Boszke *et al.*, 2008).

La fixation du mercure dans les sols se fait essentiellement sur les groupements SH réduits et particulièrement les thiols (Khwaja *et al.*, 2006). Les quantités de thiols de la MO susceptibles de fixer le mercure sont relativement faibles dans les sols (Ravichandran, 2004; Khwaja *et al.*, 2006; Skyllberg *et al.*, 2006). Dans les conditions naturelles avec de faibles teneurs en Hg, ces thiols sont cependant suffisants pour fixer le mercure. Les liaisons qui se forment entre les groupements S et le mercure sont de type covalent, sauf dans le cas de très fortes concentrations en mercure où des liaisons plus faibles peuvent se former. En effet, si la concentration en Hg augmente, on observe l'intervention de groupes O ou N avec cependant une affinité pour le mercure plus faible que celle de S (Skyllberg *et al.*, 2006). Le mercure peut donc être fixé aux substances humiques par des interactions fortes (qui correspondent aux interactions avec les groupements thiols organiques) et par des interactions plus faibles (correspondant à des interactions avec les groupes fonctionnels carboxyliques et phénoliques essentiellement).

Le mercure présent dans les sols ferrallitiques est donc adsorbé principalement sur deux phases fixatrices : les oxydes de fer et la matière organique. Tant que le mercure est fixé dans le sol, c'est-à-dire immobilisé, il ne présente que peu de danger. Cependant, s'il est mobilisé, et en particulier si sa disponibilité augmente, le mercure peut impacter les organismes vivants aussi bien dans les sols où il était stocké que dans les milieux aquatiques vers lesquels il peut être déplacé. Evaluer la mobilité et la disponibilité du mercure est donc très important.

I-2.3. Evaluation de la mobilité et de la biodisponibilité dans les sols

I-2.3.1. Comportement des ETM dans les sols : notions de mobilité et de biodisponibilité

Dans les sols, les éléments traces métalliques sont répartis au sein des constituants du sol. Ils peuvent être associés de différentes façons à 6 compartiments du sol (Figure 5):

- 1- Dans la solution du sol, sous une forme soluble, colloïdale ou particulaire ;
- 2- Associés aux surfaces des minéraux argileux et aux matières organiques, sous forme échangeable (cations ou anions) ;
- 3- Adsorbés sur les phases hydroxylées du fer, de l'aluminium et du manganèse ;
- 4- Complexés ou inclus dans les macro-molécules organiques ;
- 5- Inclus dans les réseaux cristallins des minéraux primaires et des constituants secondaires ;
- 6- Séquestrés dans les résidus végétaux ou animaux (jusqu'à leur minéralisation).

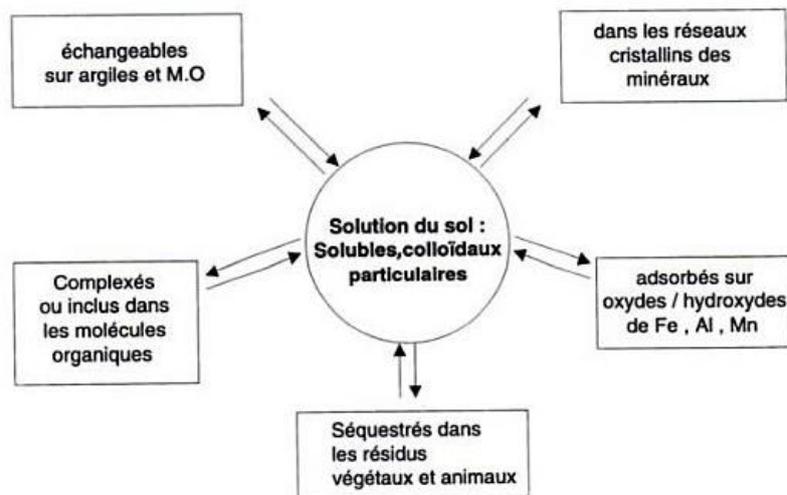


Figure 5. Différentes formes et localisations des éléments traces dans les sols (Baize, 1997).

La répartition d'un élément trace n'est pas figée, mais change en permanence au cours du temps. Les éléments sont mobiles et passent d'un compartiment à un autre sous l'influence de différents facteurs externes, comme la modification de pH, d'aération, de température, et d'humidité. Cette répartition dépend donc des conditions physico-chimiques du milieu, mais aussi de l'activité bactérienne des sols. En fonction des conditions environnementales, les ETM sont soit libérés soit immobilisés dans les sols. Par exemple, une acidification du milieu entraîne la dissolution des carbonates conduisant à une mobilité des ETM associés. Dans des

conditions réductrices, les sulfates transformés en sulfures s'associent aux ETM pour former des sulfures métalliques qui précipitent (Baize, 1997).

Par convention, le terme de « **mobilité** » désigne l'aptitude d'un élément à passer d'un compartiment du sol où il est retenu avec une certaine énergie, à un autre, où il est retenu avec une énergie moindre. La mobilité caractérise donc un potentiel de transfert. Au cours du temps, un élément peut passer successivement dans des compartiments d'énergie décroissante, jusqu'à se retrouver potentiellement dans la solution du sol. Une fois dans la solution du sol, les ETM peuvent impacter les organismes vivants.

I-2.3.2. Méthodes chimiques pour évaluer la disponibilité et la mobilité des ETM

Afin d'évaluer le devenir des ETM dans les sols et sédiments, des méthodes physiques (ou directes), et des méthodes chimiques (ou indirectes) sont utilisées. Dans le cas des méthodes physiques, la spéciation opérationnelle de l'élément considéré est abordée à partir de moyens analytiques non destructifs au sens où la structure contenant l'élément n'est pas modifiée. Dans le cas des méthodes chimiques, l'élément est sorti de son contexte structural par attaques chimiques et son analyse est indirecte dans la mesure où elle est réalisée dans la solution (Cornu & Clozel, 2000). Nous développerons uniquement la méthode chimique, car c'est celle que nous avons utilisée dans notre étude.

L'extraction chimique consiste à mettre en solution une fraction d'un ou de plusieurs éléments présents dans la phase solide du sol. Deux types de méthodes sont utilisés : l'extraction simple qui utilise un seul extractant et l'extraction séquentielle qui consiste à extraire, avec des réactifs de force croissante, les métaux contenus dans les phases solides des échantillons de sols étudiés.

Les méthodes d'extraction permettent de déterminer l'extractibilité, la biodisponibilité, et la répartition (ou spéciation opérationnelle) des ETM.

- L'extractibilité est la capacité des ETM à passer en solution. Elle dépend de la solution extractante (nature et concentration), des conditions opératoires (rapport sol/solution, durée et mode d'agitation), mais aussi de la matrice étudiée et de l'état de l'élément dans le sol.

- Dans le cas des sols, la biodisponibilité est définie par l'aptitude de cet élément à passer d'un compartiment quelconque du sol à un organisme donné. La fraction de métal biodisponible dans un sol n'est pas la même selon que l'on s'intéresse à une bactérie, une plante ou un ver de terre.

- Enfin, la répartition aussi appelée « spéciation opérationnelle » est la caractérisation de la répartition d'un élément dans les différents compartiments du sol (Lebourg *et al.*, 1996).

I-2.3.2.a. Les extractions simples

Différents types de solution d'extraction sont utilisés pour évaluer la fraction disponible des ETM: les complexants organiques, les solutions salines et l'eau déionisée (Ure *et al.*, 1995). Les complexants organiques sont utilisés pour quantifier les ETM échangeables, ceux complexés par la matière organique ainsi que ceux fixés sur les hydroxydes du sol (oxydes de Fe, de Mn et d'Al). L'EDTA (acide éthylène diamino-tétra-acétique) et le DTPA (acide diéthylène triamine-penta-acétique) sont les réactifs les plus utilisés pour évaluer la biodisponibilité du Cd, Zn, Ni, Cu et Pb. Le DTPA possède un pouvoir d'extraction plus faible que celui de l'EDTA mais plus fort que celui des solutions salines (Lebourg *et al.*, 1996).

L'extraction la plus simple est celle à l'eau déionisée ; elle a été utilisée pour simuler la mobilité des ETM dans les conditions naturelles par l'eau du sol. L'extraction des éléments métalliques par l'eau déionisée est sensée donner une bonne évaluation des risques de transfert de ces ETM dans les sols pollués (Lebourg *et al.*, 1996). Cependant, cette technique présente certains problèmes analytiques tels que de faibles concentrations dissoutes, ce qui nécessite le recours à des appareils de mesures ayant de très faibles limites de détection. L'extraction à l'eau est donc plus adaptée dans le cas de matrices fortement polluées. Dans les autres cas, les extractions par des solutions salines (CaCl_2 , NaNO_3 , NH_4NO_3 , etc.) dont la concentration varie généralement de 0,01 à 1 mol L^{-1} sont utilisées. Cette extraction se fait essentiellement par échange cationique, et permet d'estimer la fraction soluble et échangeable des éléments métalliques. Elle est utilisée dans différentes études pour évaluer la biodisponibilité des éléments dans les sols (Issaro *et al.*, 2009).

I-2.3.2.b. Les extractions séquentielles

Les méthodes d'extractions séquentielles ont été développées afin de déterminer la répartition des ETM dans les sols et les sédiments en fonction des propriétés oxydantes, réductrices, acido-solubles et échangeables des différentes phases. Ces méthodes sont basées sur l'utilisation successive de réactifs ayant des propriétés chimiques différentes afin de dissoudre successivement les diverses phases minérales et organiques du sol et de libérer les ETM associés. La plupart des méthodes font la distinction entre cinq fractions dont la dénomination correspond à la phase prépondérante ciblée par le réactif: la fraction « échangeable », la fraction « adsorbée et/ou liée aux carbonates », la fraction liée « aux matières organiques », les fractions liées « aux oxydes plus ou moins bien cristallisés » et la fraction « résiduelle » (Tessier *et al.*, 1979; Lebourg *et al.*, 1996).

Les fractions « échangeable » et « adsorbée et/ou liée aux carbonates » présentées ci-dessus sont classiquement réalisées respectivement en phase I et II des protocoles d'extractions séquentielles. Il n'en est pas de même des fractions « oxydables/ matières organiques » et « réductibles/oxydes plus ou moins bien cristallisés » qui, selon les protocoles, sont en phases III et IV ou en phases IV et III (Tessier *et al.*, 1979) respectivement. Dans ce qui suit, nous avons choisi de positionner l'extraction de la fraction « matières organiques » en phase III.

- La fraction échangeable (I) représente l'ensemble des ETM facilement désorbés par un sel neutre entraînant une modification de la composition du milieu. Les sels fréquemment employés sont l'acétate d'ammonium, de sodium et le chlorure de calcium.
- La fraction acido-soluble (II) correspond aux ETM liés aux carbonates et est donc sensible aux variations de pH. L'accès aux ETM liés à cette fraction est réalisé en utilisant un tampon acétate d'ammonium/acide acétique à pH 5.
- La fraction oxydable (III) représente les ETM liés aux matières organiques et sulfures. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), oxydant très fort, est généralement utilisé pour quantifier les ETM liés à cette fraction.
- La fraction réductible (IV) correspond aux ETM liés aux oxydes de fer et de manganèse, instables en conditions réductrices. Ces oxydes peuvent être détruits en partie par modification des conditions de pH et de potentiel d'oxydo-réduction (Eh) du milieu. Le réactif le plus couramment employé est le chlorhydrate d'hydroxylamine en milieu acide (NH_2OH/HCl).
- Enfin, la fraction résiduelle inclut tous les ETM ayant résisté aux étapes d'extraction précédentes. Elle est constituée des ETM piégés dans la matrice cristalline argileuse et dans les minéraux à réseau cristallin stable. Par conséquent, les ETM se trouvant dans cette fraction ont une faible réactivité et sont difficilement relargués dans les conditions naturelles. En général, les ETM de la fraction résiduelle sont quantifiés à l'aide d'un mélange d'acides forts, tels que l'acide fluorhydrique, nitrique et chlorhydrique (Cornu & Clozel, 2000; Gounou, 2008; Issaro *et al.*, 2009).

Les protocoles d'extractions sont nombreux, rendant les comparaisons entre les études existantes difficiles, et ce malgré les efforts de normalisation d'un protocole d'extraction séquentiel relativement simple qui pourrait servir de référence pour toute la communauté européenne dans le cadre du "Community Bureau of Reference" européen (BCR) (Ure *et al.*,

1993). Cependant, cette méthode d'extraction a également été améliorée et modifiée à différentes reprises car elle présente également des problèmes de reproductibilité et de réadsorption. Le problème d'uniformisation des protocoles d'extraction et leurs nombreuses modifications montrent bien que l'on ne peut sous-estimer la multiplicité des textures de sol rencontrées et leur importance dans les réactions chimiques imposées. Néanmoins, les extractions séquentielles continuent d'être utilisées, car elles sont suffisamment riches en informations pour permettre des diagnostics. Notamment, elles permettent d'avoir accès à des compartiments peu mobiles dans les conditions actuelles mais qui pourraient être mobilisés suite à une acidification par exemple (carbonates) (Cornu & Clozel, 2000).

La revue d' Issaro *et al.* (2009) résume différents protocoles d'extractions séquentielles adaptés au mercure. En effet, le mercure est un ETM qui requiert des précautions particulières pour son étude du fait de ses spécificités chimiques (entre autre sa volatilité). Les études référencées dans cette revue utilisent des réactifs et des méthodes d'extraction et de mesures différentes. Il est donc difficile de choisir une méthode en particulier pour évaluer la mobilité du mercure dans les sols. Le choix de la méthode doit donc se faire par rapport aux questions scientifiques posées initialement.

Les protocoles d'extractions séquentielles que l'on retrouve dans la littérature ont été développés pour les sols tempérés. Ils peuvent ne pas être adaptés pour les sols tropicaux qui contiennent en général de fortes teneurs en oxydes de Fe et de Mn. En effet, souvent les résultats ne sont pas cohérents car la dissolution des oxydes de Fe et de Mn est incomplète.

Un seul protocole parmi ceux adaptés au mercure propose d'étudier les fractions de mercure liées aux oxydes de fer amorphes et cristallins (Han *et al.*, 2006). Cependant, ce protocole cible également le mercure sous la forme de cinabre, une espèce minérale composée de sulfure de mercure (HgS) en plus de la fraction résiduelle.

L'étude de Silveira *et al.* (2006) est la seule à avoir développé un protocole d'extraction séquentielle adapté aux sols tropicaux, pour le Zn, Cu, Fe et Mn. Cette étude, bien que non adaptée au mercure, permet d'étudier la répartition de différents ETM pour les fractions liées aux oxydes de Mn, aux oxydes de Fe amorphes et aux oxydes de Fe cristallisés. De plus, elle a été comparée aux protocoles les plus utilisés, comme celui de Tessier *et al.* (1979) et a donné des résultats intéressants pour les sols tropicaux (Tableau 4).

Les deux protocoles ont été testés au laboratoire (Han *et al.*, 2006; Silveira *et al.*, 2006) et celui de Silveira *et al.* (2006) a été retenu pour son meilleur rendement d'extraction.

Tableau 4. Protocoles d'extractions séquentielles pour le Cu, Zn, Fe, et Mn (pour 1 g de sol).

Fraction	Solution	Conditions
Procédure 1: Tessier <i>et al.</i> (1979)		
I. Échangeable	8 ml 1M MgCl ₂ (pH 7)	1 h, température ambiante
II. Carbonates	8 ml 1M NaOAc (pH 5)	5 h, température ambiante
III. Oxydes de Fe et Mn	20 ml 0.04M NH ₂ OH/HCl dans 25% (v/v) HOAc	6 h, 96°C
IV. Matière Organique	3 ml 0.02M HNO ₃ + 5 ml 30% H ₂ O ₂ (pH 2)	3 h, 85°C
	5 ml 3.2M NH ₄ OAC dans 20% (v/v) HNO ₃ + 7 ml d'eau	20 min, température ambiante
V. Résiduelle	Digestion HNO ₃ -HCl (3050b)	
Procédure 2: Ahnstrom & Parker (1999)		
I. Soluble-échangeable	15 ml 0.1M Sr(NO ₃) ₂	2 h, température ambiante
II. Carbonates	30ml 1M NaOAc (pH 5)	5 h, température ambiante
III. Oxydable	5 ml NaOCl (pH 8.5)	30 min, 90–95°C
IV. Réductible	20 ml 0.2M acide oxalique + 0.2M NH ₄ oxalate + 0.1 M acide ascorbique (pH 3)	30 min, 90–95°C
V. Résiduelle	Digestion HNO ₃ -HCl (3050b)	
Procédure 3: Silveira <i>et al.</i> (2006)		
I. Soluble-échangeable	15 ml 0.1M CaCl ₂	2 h, température ambiante
II. Carbonates	30 ml 1M NaOAc (pH 5)	5 h, température ambiante
III. Matière Organique	5 ml NaOCl (pH 8.5)	30 min, 90–95°C
IV. Oxydes de Mn	30 ml 0.05M NH ₂ OH/HCl (pH 2)	30 min, température ambiante
V. Oxydes de Fe amorphes	30 ml 0.2M acide oxalique + 0.2M NH ₄ -oxalate (pH 3)	2 h, dans le noir
	40 ml 6M HCl	24 h, température ambiante
VII. Résiduelle	Digestion HNO ₃ -HCl (3050b)	

La mobilité du mercure peut être évaluée par extractions séquentielles à différents pas de temps. Ainsi, la fraction de mercure soluble et échangeable par exemple peut être déterminée dans les sols à différentes saisons, afin d'évaluer les risques de transfert du mercure des sols vers les milieux aquatiques. *In situ*, tous les facteurs susceptibles d'influencer les paramètres du sol peuvent modifier la mobilité du mercure.

I-2.4. Mobilité du mercure : influence des paramètres du sol

La capacité des différentes phases du sol à fixer le mercure dépend des conditions pédo-géochimiques de ces derniers. Cette capacité peut également changer d'un horizon à l'autre d'un même sol (Roulet, 2001). Cependant, **le mercure peut se retrouver mobile dans la solution du sol suite à divers processus biotiques et/ou abiotiques**. S'il est (bio)disponible, ce mercure peut être méthylié et bioaccumulé le long des chaînes trophiques.

Les propriétés physico-chimiques et l'activité biologique du sol sont les facteurs principaux influençant la mobilité, la répartition et donc la disponibilité et la toxicité des éléments traces métalliques. Dans les paragraphes suivants l'importance relative de ces paramètres est développée pour la mobilité ETM en général et le mercure en particulier.

I-2.4.1. Facteurs abiotiques : nature et teneurs en MO, en argiles et pH

Différentes études ont montré que la nature et les teneurs en argiles, en matière organique ainsi que le pH sont susceptibles d'influencer la mobilité des éléments traces métalliques et du mercure en particulier (Gabriel & Williamson, 2004).

Le taux d'argiles, ainsi que leur nature, joue un rôle important dans la mobilité. Ainsi un sol avec une composition riche en argile pourra mieux retenir les ETM par adsorption sur leurs surfaces spécifiques. La capacité de sorption des argiles pour le mercure dépend de leur nature. Cette capacité étant classée comme suit : illite > montmorillonite > kaolinite (Gabriel & Williamson, 2004). Les sols ferrallitiques sont particulièrement riches en argiles qui peuvent représenter jusqu'à 80% des éléments dans ces sols, mais le type d'argile dominant est la kaolinite. Dans la fraction fine, les oxydes cristallisés associés aux minéraux argileux semblent plus importants dans le contrôle de l'adsorption du mercure (Roulet & Grimaldi, 2001). Dans certains horizons, les argiles peuvent constituer la principale phase fixatrice du mercure. Aussi l'importance des argiles dans la fixation peut changer d'un horizon à un autre.

Dans les sols acides (cas des sols ferrallitiques), la matière organique est le meilleur adsorbant du mercure et des complexes mercure-acides humiques sont majoritairement formés (Carmouze *et al.*, 2001). En effet, l'étude d'Anderson (1970) a démontré que le seul adsorbant effectif du Hg dans les sols acides ($\text{pH} < 5$) est la matière organique, alors que ce sont les oxyhydroxydes et les minéraux argileux qui deviennent plus effectifs dans les sols plus neutres ($\text{pH} < 5,5-6$) (Roulet, 2001). La MO, et en particulier les substances humiques, joue donc un rôle primordial dans le cycle du mercure dans ces sols. La minéralisation de

cette matière organique conduit au relargage du mercure et d'autres éléments traces métalliques dans le milieu (Grybos *et al.*, 2007).

La matière organique dissoute (MOD), présente dans l'environnement aquatique et dans la solution du sol, interagit très fortement avec le mercure, affectant sa biodisponibilité dans l'eau. Dans de nombreuses eaux naturelles, il existe une corrélation positive entre les concentrations en Hg et MOD (Boening, 2000). De plus, la formation de complexes entre le Carbone Organique Dissous (COD) et les ETM est largement connue pour prévenir l'adsorption des ETM sur d'autres surfaces (Gabriel & Williamson, 2004).

Comme pour tous les ETM, l'adsorption du mercure diminue généralement avec la diminution du pH dû aux charges des surfaces des colloïdes qui sont pH-dépendantes (Gabriel & Williamson, 2004). Aussi on s'attend à ce que le mercure soit particulièrement mobile dans les sols ferrallitiques dont le pH est généralement compris entre 3 et 5 (Carmouze *et al.*, 2001). A des pH faibles, le Carbone Organique Dissous (COD) est moins chargé négativement, complexant moins le mercure, et le rendant ainsi plus disponible pour les organismes du sol comme les bactéries réductrices et méthylantes (Ravichandran, 2004).

Dans les sols ferrallitiques, on s'attend donc à ce que la matière organique joue un rôle prépondérant dans la mobilité du mercure. Dès lors, la dégradation de la MO ou sa modification par les organismes du sol semble être un mécanisme important à prendre en compte quand on s'intéresse à l'étude de la mobilité du mercure dans les sols tropicaux.

I-2.4.2. Facteurs biotiques : activité biologique des organismes du sol

Les organismes du sol peuvent modifier la mobilité des ETM car ils sont en contact permanent avec le sol.

De par leurs diverses activités (e.g. décomposition ou fragmentation), les micro-organismes tels que les bactéries et les champignons peuvent modifier différents paramètres physico-chimiques des sols (Brown *et al.*, 2000). Il existe des micro-organismes capables de mobiliser les ETM (i) par dissolution des phases porteuses des ETM comme les oxydes ou (ii) par désorption des ETM des sites échangeables des argiles ou de la matière organique par exemple. D'autres micro-organismes au contraire sont capables d'immobiliser les ETM par des mécanismes de précipitation des ETM sous forme de sulfures (Gadd, 2004).

L'activité des vers de terre a plus largement été étudiée car ils représentent la biomasse la plus importante dans les sols (Edwards, 2004). Les vers de terre peuvent modifier la mobilité des ETM dans les sols (Cu, Cd, Pb, Zn) par différents mécanismes : soit directement en modifiant les paramètres physico-chimiques du sol, soit indirectement en modifiant les communautés bactériennes du sol (Sizmur & Hodson, 2009). En effet, différentes études ont montré que **les vers de terre peuvent modifier de nombreux paramètres du sol** (Lavelle, 1988; Brown *et al.*, 2000; Lavelle & Spain, 2001; Lavelle & Lapied, 2003) :

- Ils transforment et décomposent la matière organique lors du passage du sol dans leur tube digestif ;
- Ils peuvent tamponner le pH du sol en sécrétant du mucus ;
- Et ils modifient l'aération ainsi que l'humidité du sol en construisant des galeries et en émettant des turricules en surface et en profondeur dans les sols.

De plus, les vers de terre modifient les communautés bactériennes des sols (Brown, 1995; Brown *et al.*, 2000). Par toutes ces modifications dans les sols, les vers peuvent impacter la mobilité des ETM et la stabilité de leurs phases porteuses.

L'activité des organismes du sol apparaît donc comme un élément indispensable à la compréhension de la dynamique des ETM dans le sol. Les vers de terre, par leur abondance et leurs nombreuses activités, sont particulièrement intéressants à étudier. Cependant, peu d'études à ce jour se sont intéressées au cas du mercure, c'est pourquoi ce travail de thèse se propose d'étudier les interactions entre les vers de terre et le mercure dans les sols.

I-3. Les vers de terre : diversité et rôles dans les sols contaminés

I-3.1. Organismes ingénieurs du sol

Les vers de terre appartiennent à la macrofaune du sol et sont considérés comme des **organismes « ingénieurs »**. Selon Jones *et al.* (1994), « les ingénieurs des écosystèmes sont des organismes qui influencent directement ou indirectement la disponibilité des ressources pour les autres organismes, à travers des modifications physiques et chimiques du milieu. »

Les vers de terre représentent une composante majeure de la macrofaune du sol dans la plupart des écosystèmes terrestres. Ils peuvent constituer jusqu'à 90% de la biomasse des invertébrés dans les sols. Leurs populations varient de quelques individus à plus de 1000 individus par mètre carré (Edwards, 2004). Dans les sols de forêt tropicale humide, ils peuvent représenter plus de 50% de la biomasse totale de la macrofaune (Fragoso & Lavelle, 1992).

Ils sont connus pour jouer un **rôle clé dans la modification physico-chimique et biologique des sols**. Ainsi, ils assurent de nombreuses fonctions dans les sols et sont à l'origine de nombreux services écosystémiques tels que l'incorporation de la matière organique dans les sols, le fonctionnement des cycles biogéochimiques, et le maintien de conditions physico-chimiques favorables pour les plantes et les autres organismes du sol, notamment les microorganismes (Brown *et al.*, 1999, 2000; Lavelle *et al.*, 1988, 1998, 2006; Blouin *et al.*, 2013).

Selon des critères morphologiques et comportementaux les vers de terre se répartissent en trois grandes **catégories écologiques** : les épigés, les anéciques et les endogés (Bouché, 1972) (Figure 6).

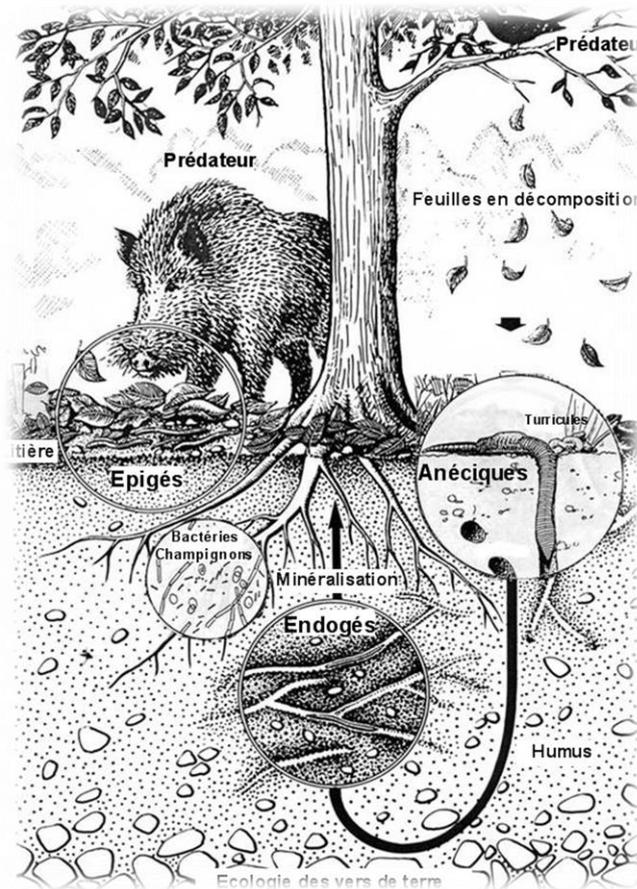


Figure 6. Gravure illustrant les trois catégories écologiques de vers de terre et leur sphère d'influence © INRA.

- Les espèces épigées vivent en surface dans les premiers centimètres du sol et dans les amas organiques (fumier, compost, litière de feuilles, écorce). Leur régime est à base de matière organique morte (fragments de végétaux, de champignons) ; ils sont saprophages. Ils

participent activement au fractionnement de la MO. Ces espèces, localisées en surface, sont particulièrement sensibles à la prédation, aux variations climatiques et aux facteurs anthropiques tels que la disparition des horizons organiques par le labour et l'usage des traitements phytosanitaires.

- Les espèces anéciques forment des galeries essentiellement verticales et permanentes dans le sol. Ils se nourrissent de matière organique en état de décomposition intermédiaire, à la surface du sol qu'ils enfouissent dans leur galerie. Ils sont géo-saprophages. Ils brassent et mélangent la matière organique et minérale. Ce sont généralement les vers les plus gros. Ces espèces, localisées sur toute la hauteur du profil de sol, sont sensibles aussi aux travaux mécaniques du sol et aux intrants.

- Les espèces endogées représentent le groupe le plus important. Les endogés vivent en permanence dans le sol où ils creusent des galeries temporaires horizontales très ramifiées. Ils ne sont en général pas pigmentés. Ils se nourrissent de sol plus ou moins riche en matière organique : ce sont des géophages. Cette classification a été précisée en fonction de la richesse en MO du milieu où le ver évolue : les oligohumiques vivent dans des milieux pauvres en MO, les polyhumiques dans des milieux riches en MO, et les mésohumiques dans des milieux intermédiaires. De plus, les endogés passent le plus de temps dans le sol et seraient donc susceptibles d'être le plus impactés par la contamination des sols.

Cette classification des vers de terre a été mise en place en milieu tempéré, et pourrait ne pas toujours s'appliquer aux milieux tropicaux. Les espèces épigées et endogées peuvent être notamment différenciées par leur pigmentation, cependant ce critère n'est pas applicable pour les espèces anéciques.

L'impact des vers sur le sol varie selon leur catégorie écologique. Les endogés et les anéciques sont les plus influents ; ils modifient les propriétés physico-chimique du sol créant ainsi une sphère d'influence particulière appelée drilosphère (Edwards & Bohlen, 1996). Les turricules (déjections des vers laissées en surface) et les parois des galeries constituent des microsites particuliers, et sont le siège de diverses réactions et processus physiques, chimiques et biologiques influençant ainsi le cycle biogéochimique de certains éléments majeurs tels que l'azote, le carbone, et le phosphore (Edwards, 2004) ...et la dynamique des ETM.

Les vers de terre sont présents dans tous les sols (tempérés ou tropicaux) et **leur diversité taxinomique** décrite, mais surtout estimée, **est très importante**. Cependant, à l'échelle mondiale, les sols des pays tropicaux présentent une richesse spécifique plus importante que ceux des régions tempérées de l'hémisphère Nord. Par exemple, au Brésil il existe plus de 300 espèces (Brown & James, 2006), alors qu'en France 97 seulement ont été recensées (Bouché, 1972). Cette différence de diversité est en partie expliquée par l'impact négatif des grandes glaciations du quaternaire sur la faune de l'hémisphère Nord.

Les vers de terre sont donc des acteurs importants dans les sols, où ils assurent de nombreuses fonctions. Il apparaît important de connaître et d'estimer leur diversité et leur comportement dans les sols, en particulier dans un contexte où les sols sont de plus en plus anthropisés et contaminés.

I-3.2. Evaluation de la diversité des vers de terre

I-3.2.1. Vers de terre : « espèce », « diversité » et taxinomie

L'évaluation de la diversité repose le plus souvent sur l'identification d'individus au niveau de l'espèce. Or plusieurs définitions de « l'espèce » existent. La définition la plus communément citée est celle du **concept biologique de l'espèce** énoncé par Mayr (1999): « les espèces sont des groupes de populations naturelles, effectivement ou potentiellement interfécondes, qui sont génétiquement isolées d'autres groupes similaires ». L'espèce est la plus grande unité de population au sein de laquelle le flux génétique est possible dans des conditions naturelles. Elle est l'unité de base communément utilisée dans les analyses en biogéographie, écologie, biologie évolutive et en biologie de la conservation (Camargo & Sites, 2013).

Chez les vers de terre, environ 3700 espèces ont été décrites à ce jour, ce qui représente une proportion significative des 6000 espèces estimées pour la biodiversité totale de ce groupe (Decaëns *et al.*, 2013). Cependant, les vers de terre appartiennent à un groupe dont la taxinomie est incomplète et difficile à compléter, et ce pour diverses raisons regroupées sous le terme « **taxonomic impediment** » (Decaëns *et al.*, 2006, 2008; Rougerie *et al.*, 2009). Cela tient au fait, entre autres, que les espèces manquantes, non décrites et non identifiées se trouvent pour la plupart dans des zones tropicales comme le bassin amazonien. De plus, de récentes découvertes suggèrent que la taxinomie actuelle connue du groupe des vers de terre n'est pas si précise qu'on le pensait initialement.

A ce jour, la taxinomie morphologique traditionnelle se voit utilement complétée par des outils moléculaires dans le but d'évaluer efficacement la diversité taxinomique des vers de terre dans les sols tempérés et tropicaux en particulier.

I-3.2.2. Taxinomie traditionnelle des vers de terre

La méthode traditionnelle d'identification des espèces de vers de terre est basée sur la morphologie. Cette méthode requiert des compétences en systématique. Or il y a peu de taxonomistes de vers de terre (Brown & Fragoso, 2007; Decaëns *et al.*, 2013). De plus, cette méthode est difficilement applicable due au manque de caractères morphologiques stables et facilement identifiables, ainsi qu'à la variabilité des caractères induite par l'environnement (Richard *et al.*, 2010). L'identification des espèces requiert l'observation de différents caractères externes tels que la position et la forme du prostomium et du clitellum (Figure 7), et l'observation de caractères internes de vers adultes tels que la position des cœurs ou d'autres organes sur les différents segments des vers (Figure 8) (Bouché, 1972).

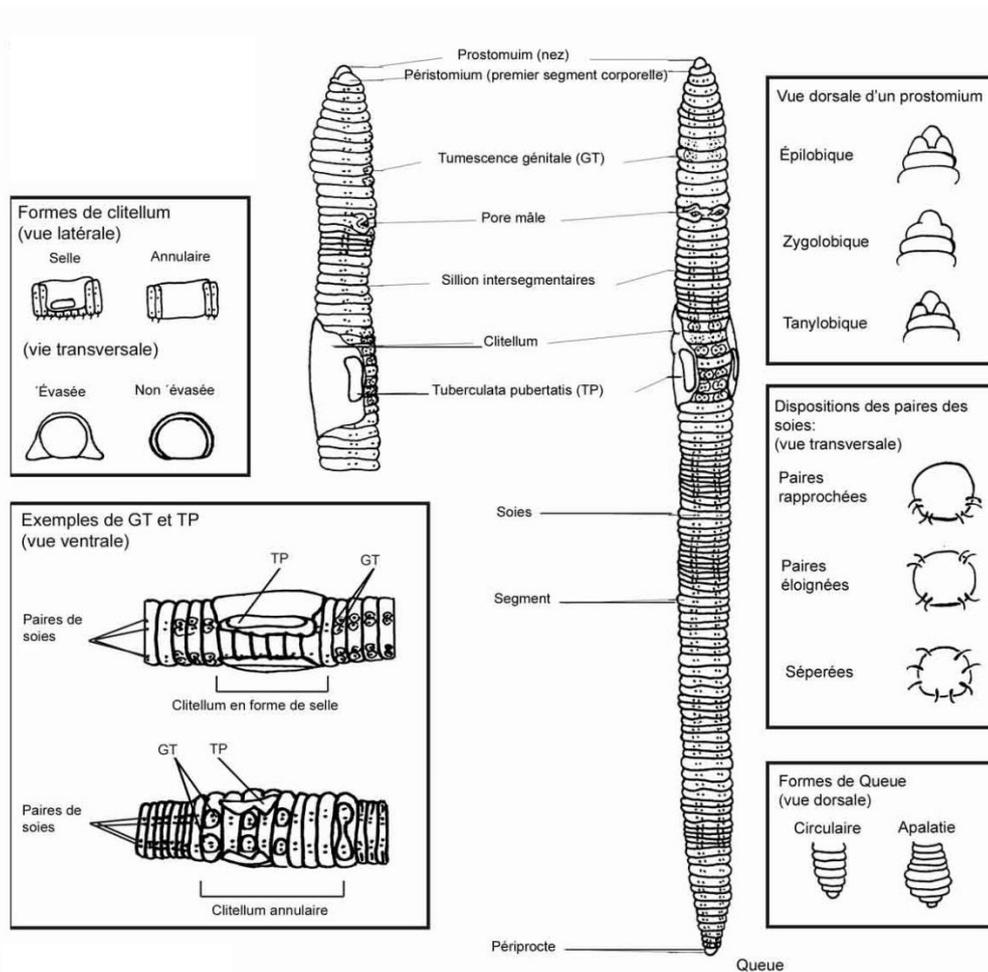


Figure 7. Schéma des caractères externes observables chez les vers de terre.

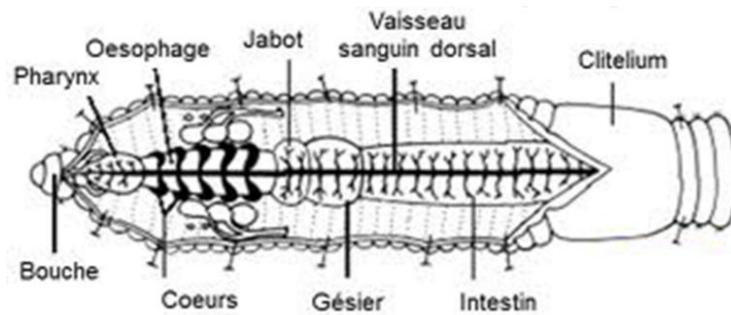


Figure 8. Schéma des caractères internes d'un ver de terre.

Le problème d'identification se pose alors pour les cocons et les juvéniles d'espèces proches qui sont souvent exclus des études de terrain, ainsi que les fragments qui peuvent être collectés dû aux méthodes d'échantillonnage manuelles (Richard *et al.*, 2010). L'utilisation exclusive de données morphologiques peut également sous-estimer le nombre d'espèces. En effet, certaines espèces différentes se ressemblent morphologiquement et ne peuvent être distinguées l'une de l'autre par ces caractères : on parle d'espèces cryptiques. Par exemple, l'étude de James *et al.*, (2010) a montré à l'aide des outils moléculaires que l'espèce *Lumbricus terrestris* est en réalité composée de deux espèces distinctes qui n'ont pas été distinguées dans la littérature : *L. terrestris* et *L. herculeus*.

Il apparaît évident que de nouvelles méthodes sont requises pour contrer ce déficit taxinomique et permettre une évaluation correcte de la diversité dans ce groupe. C'est pourquoi depuis le début des années 2000, des outils moléculaires ont été développés (Decaëns *et al.*, 2013).

I-3.2.3. Différentes méthodes pour la taxinomie moléculaire

I-3.2.3.a. Développement des outils moléculaires

- **Généralités**

Le travail de délimitation d'espèce se fait à l'interface de la génétique des populations traditionnelle et des analyses phylogénétiques. La délimitation des espèces est importante dans plusieurs domaines de la biologie, tels que la biologie de la conservation, la biologie évolutive et l'épidémiologie.

Récemment, ces domaines de recherche ont vu leur nombre de méthodes et d'outils moléculaires disponibles augmenter de façon importante, grâce notamment aux avancées dans le séquençage de l'ADN (Dupont, 2009; Carstens *et al.*, 2013). Pour le groupe des vers de terre en particulier, ces avancées ont permis d'accélérer la découverte de nouvelles espèces (Huang *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2009). De plus, les analyses ADN ont révélé l'existence d'espèces cryptiques chez les vers de terre (King *et al.*, 2008; James *et al.*, 2010; Dupont *et al.*, 2011). En combinant analyses ADN et morphologie pour délimiter les espèces de vers de terre, les études de Pérez-Losada *et al.*, (2005); Chang *et al.*, (2007); James *et al.*, (2010) ont bousculé la taxinomie traditionnelle en montrant que les critères de taille et de pigmentation du corps ne sont pas toujours fiables. Les outils moléculaires ont également permis de réintroduire les juvéniles et les cocons dans les études de biodiversité (Richard *et al.*, 2010).

- **Gène unique vs multiple loci**

Certaines études se basent sur un seul gène, alors que d'autres utilisent des méthodes multi-loci. Les analyses multi-loci sont plus robustes (Dupuis *et al.*, 2012), mais le séquençage de plusieurs gènes peut s'avérer fastidieux, surtout pour des groupes peu connus où peu de loci ont été caractérisés. Ces jeux de données multi-loci nécessitent des méthodes d'analyses spécifiques telles que l'approche bayésienne. Les reconstructions phylogénétiques sont permises par l'exploitation de logiciels qui analysent et utilisent une technique de simulation appelée Chaînes de Markov Monte Carlo (MCMC). Un des avantages de cette méthode est d'incorporer des sources diverses d'informations en ce qui concerne les délimitations d'espèces. Cependant, elle nécessite des prérequis concernant les populations, qui ne sont pas toujours disponibles (Leaché & Fujita, 2010; Yang & Rannala, 2010).

- **Différents gènes utilisés**

Différentes méthodes ont été développées pour la délimitation d'espèces, utilisant différents gènes. En effet, différents gènes présentent des taux d'évolution différents, comme c'est le cas des gènes nucléaires et mitochondriaux, et sont donc plus ou moins appropriés pour étudier différents niveaux taxinomiques. Les gènes nucléaires 18s et 28s ARNr, les gènes mitochondriaux 16s ARNr et les sous-unités 1 (COI) et 2 (COII) de la cytochrome oxydase c sont les plus utilisés et ont été sélectionnés selon les objectifs des études et les taxons étudiés (Blaxter, 2004). Pour un inventaire des insectes à Madagascar (Monaghan *et al.*, 2009) ou une étude de délimitation d'espèces à grande échelle des mollusques (Puillandre *et al.*, 2012), un gène nucléaire et un gène mitochondrial ont été sélectionnés : respectivement

les gènes 28s ARNr et COI. Chez les vers de terre en particulier, le gènes COI ainsi que les gènes nucléaires 18s et 28s ARNr sont les plus fréquemment utilisés (Chang *et al.*, 2009; Pérez-Losada *et al.*, 2009; James *et al.*, 2010; Richard *et al.*, 2010; James & Davidson, 2012).

A ce jour, le gène COI est le gène le plus utilisé. En effet, le gène COI est celui qui a évolué le plus rapidement et est pertinent pour les analyses de séquences au sein d'une espèce, d'un complexe d'espèces ou d'un genre si le genre étudié n'est pas trop diversifié (Chang & James, 2011).

I-3.2.3.b. Barcode ADN

- **Principe et choix du gène COI**

Le “DNA barcoding” aussi appelé “Barcode ADN” est une méthode moléculaire qui permet de délimiter les différentes espèces en se basant sur le séquençage d'un gène. En 2003, une région de 658 paires de bases du gène mitochondrial cytochrome oxydase I (COI) a été proposée comme un standard, afin de discriminer différentes espèces (Hebert *et al.*, 2003).

Le génome mitochondrial des animaux est une meilleure cible que le génome nucléaire en raison du manque d'introns, de son exposition limitée à la recombinaison et de son mode d'hérédité haploïde (Hebert *et al.*, 2003). De plus, ce gène présente un niveau de variabilité intéressant : les différences entre les séquences de ce gène, apparues par mutations au cours du temps, sont faibles entre les individus d'une même espèce et élevées entre des individus d'espèces différentes. Il est donc possible de discriminer des individus appartenant à différentes espèces dans un premier temps quand cela n'est pas possible morphologiquement.

Le gène COI est présent chez tous les animaux, et la comparaison des séquences est simple car les insertions et les délétions sont rares. Ce gène, défini comme le Barcode ADN par Hebert *et al.* (2003) a été utilisé entre autres pour identifier des espèces d'oiseaux, d'araignées, de collemboles, de lépidoptères, et de vers de terre (Rougerie *et al.*, 2009).

- **Utilisations du Barcode ADN**

Les avancées dans le domaine de la systématique moléculaire ont été marquées par l'initiative dès 2003, de « barcoder » la vie sur Terre (Hebert *et al.*, 2003, 2004). Le barcode ADN a initialement été développé afin de générer un nombre important de séquences ADN pour toutes les populations de toutes les espèces possibles, et en même temps d'alléger le travail d'identification des taxonomistes (Goldstein & DeSalle, 2011).

Aujourd'hui, les utilisations principales du Barcode ADN sont : (1) **l'identification de spécimens** inconnus par comparaison avec une base de données de référence, nommée BOLD (the Barcode Of Life Data System) et (2) **la délimitation d'espèces putatives** ou MOTUs (Unités Taxinomiques Opérationnelles Moléculaires) incluant l'identification de nouvelles espèces.

En taxinomie moléculaire, les individus ne peuvent pas toujours être regroupés selon leur appartenance à une « espèce », mais ils sont définis sous ce qu'on appelle MOTU. Une MOTU peut être définie par la similarité des séquences de deux individus selon un seuil fixé (Blaxter, 2004). L'utilisation du Barcode ADN pour définir des MOTUs ou pour définir l'évolution génétique des espèces est intéressante pour évaluer la richesse taxinomique des assemblages d'espèces de vers de terre ou d'autres groupes d'invertébrés du sol (Blaxter, 2004; Blaxter *et al.*, 2005; Rougerie *et al.*, 2009). **La définition de MOTUs repose sur l'approximation d'espèces**, bien qu'elle ne soit pas idéale. Cependant, l'utilisation du nombre de MOTUs représente une alternative intéressante, sinon la seule, pour les groupes peu étudiés et les zones géographiques encore peu explorées (Rougerie *et al.*, 2009).

Chez les vers de terre en particulier, le gène COI a déjà largement été utilisé pour l'identification de spécimens (Huang *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2009; James *et al.*, 2010; Richard *et al.*, 2010) et pour des études de phylogéographie ou de phylogénie couplé à d'autres gènes (Chang & James, 2011; Dupont *et al.*, 2012).

Le barcode ADN peut être utilisé dans une **démarche exploratoire**, c'est-à-dire en se basant sur aucun *a priori* en termes d'espèces ou de populations. Dans ce cas, les résultats obtenus avec le Barcode ADN peuvent être couplés avec des méthodes exploratoires. Cette approche constitue un moyen efficace pour proposer des hypothèses pour des groupes très diversifiés, comme les vers de terre, en particulier quand les caractères morphologiques sont connus pour être problématiques.

I-3.2.4. Délimitation d'espèces : méthodes exploratoires

Dans le cadre des méthodes de délimitation des espèces dites exploratoires, des jeux de données basés sur un seul gène sont analysés avec des outils bioinformatiques de délimitation d'espèces, tels que les méthodes Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) (Puillandre *et al.*, 2012) et General Mixed Yule-Coalescent (GMYC) (Pons *et al.*, 2006; Monaghan *et al.*, 2009). Les groupes définis peuvent être utilisés comme une première hypothèse d'espèces putatives ou MOTUs (Puillandre *et al.*, 2012).

I-3.2.4.a. Méthode ABGD

La méthode ABGD (<http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html>) est une procédure simple et rapide qui permet de subdiviser des jeux de données de séquences (dont le gène COI) en espèces putatives. Cette méthode utilise plusieurs seuils définis *a priori*, pour proposer différentes partitions de séquences en espèces putatives basées sur la distribution des distances génétiques calculées deux à deux (pairwise distances). Les distances génétiques peuvent être calculées selon différentes méthodes comme par exemple: *p*-distance, Kimura-2-Parameter (K2P), Jukes-Cantor distances ou Tajima-Nei (tn). Les valeurs définies *a priori* que peut modifier l'utilisateur sont : P, divergence maximale a priori de la diversité intra-spécifique et X, proxy de la largeur minimale de l'écart entre la diversité intra- et inter-spécifique (gap).

Dans la distribution des différences calculées deux à deux, entre les séquences, on peut donc observer un écart (« gap ») entre la diversité intraspécifique et interspécifique (Figure 9).

Cet écart a été nommé « **barcode gap** » et il peut être utilisé comme un seuil permettant la délimitation d'espèces putatives sous l'hypothèse que les individus à l'intérieur des espèces sont plus proches entre eux qu'entre espèces différentes.

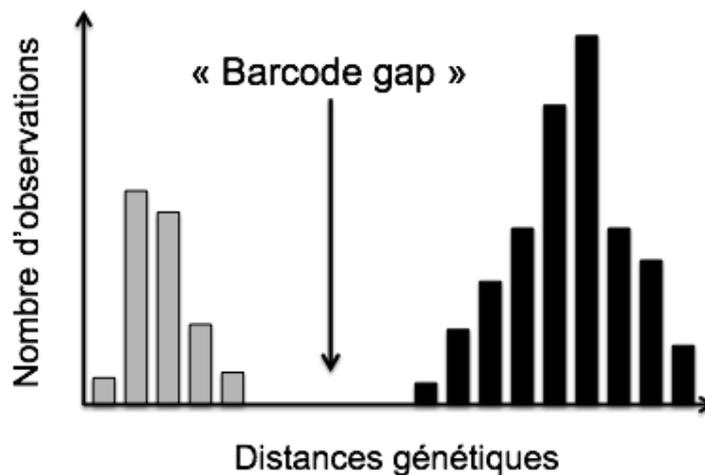


Figure 9. Illustration du “barcode gap”.

Distribution théorique des distances génétiques (K2P) intra- (en gris) et interspécifiques (en noir) dans une population contenant des individus appartenant à des espèces proches. Extrait de Decaëns *et al.*, 2013.

Cette méthode ne repose pas sur des propriétés spécifiques de la distribution. Un paramètre critiqué pour cette méthode ABGD est la divergence maximale de la diversité intra-spécifique p . Si ce paramètre est trop fort, la base de données entière sera considérée comme une seule espèce et au contraire si ce paramètre est trop faible, seules les séquences identiques seront considérées comme faisant partie de la même espèce.

Lorsque l'on peut évaluer l'efficacité de la méthode (i.e. lorsqu'on connaît la limite entre les espèces sur la base d'autres types de données comme la morphologie), une espèce est considérée délimitée avec succès quand ses membres appartiennent au même groupe prédit et auquel aucune autre séquence n'a été ajoutée. Le critère est très conservatif et rend donc l'interprétation des résultats simples. Plus le taux de spéciation est faible, plus la performance de la méthode est bonne (Puillandre *et al*, 2012).

I-3.2.4.b. Méthode GMYC

Comme la méthode ABGD, c'est un moyen d'accroître le taux d'exploration de la biodiversité. La méthode GMYC a été décrite par Pons *et al.* (2006) et Monaghan *et al.* (2009). Ce modèle a été proposé pour délimiter des espèces à partir de l'information génétique d'un seul locus. La méthode GMYC est basée sur une approche par coalescence et requiert avant tout la construction d'un arbre qui doit être ultramétrique (arbre phylogénique chronométrique dans lequel les longueurs des branches sont à peu près proportionnelles au temps) et qui ne reflète pas nécessairement la divergence réelle entre les espèces. Cette technique utilise donc cet arbre phylogénique préexistant pour déterminer le signal de transition de spéciation.

La méthode GMYC explore les différences dans le taux de branchement des lignées au niveau des espèces et populations, qui peuvent être visualisées comme un décrochement entre les taux lents et rapides d'évènements de branchement dans un graphe montrant les lignées en fonction du temps (« lineage-through-time plot ») (Figure 10).

La méthode optimise une position de seuil interspécifique et intraspécifique de telle sorte que les nœuds plus anciens que le seuil sont considérés comme des environnements de diversification (interspécifique) et les nœuds plus jeunes que le seuil, reflètent la coalescence à l'intérieur des espèces.

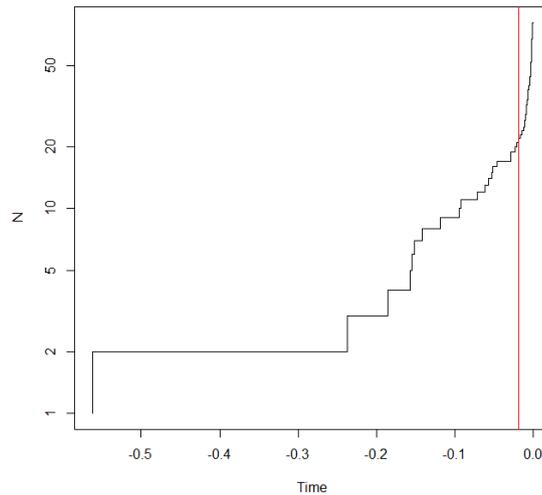


Figure 10. Lignées en fonction du temps (« lineage-through-time plot ») et représentation de l'augmentation soudaine entre les taux lents et rapides d'évènements de branchement, caractéristique de la limite entre la distance intra et interspécifique. La limite rouge représente le décrochement entre les taux lents et rapides d'évènements de branchement dans ce graphique.

Cette méthode propose des hypothèses alternatives de délimitation d'espèces ; elle est généralement considérée comme **une méthode efficace pour détecter les frontières d'espèces même si cela peut mener à une surestimation du nombre d'espèces**. La méthode GMYC est, en comparaison de la méthode ABGD, extrêmement lente et le calcul d'une seule partition peut prendre plusieurs mois pour un jeu de données de taille modeste (Puillandre *et al.*, 2012).

I-3.2.4.c. Méthode du seuil et « 4x rule »

La **méthode du seuil** est une technique ancienne, notamment en taxinomie microbienne, pour tenter d'assigner un individu à une espèce décrite, en fonction des données moléculaires déjà connues dans la littérature. Chez les vers de terre, différentes études ont montré que deux spécimens ou groupe de spécimens distants de moins de 9% peuvent être considérés comme appartenant à la même espèce et que deux spécimens ou groupe de spécimens distants de plus de 15% peuvent être considérés comme des espèces différentes (d'après la revue de Chang & James, 2011). L'intervalle entre 9% et 15% laisse place à des ambiguïtés qu'il est difficile d'interpréter. Plusieurs raisons entrent en compte, en l'occurrence la présence d'espèces cryptiques qui sont morphologiquement impossible à distinguer, même pour des experts (James *et al.*, 2010). Dans cette méthode, les distances entre espèces ont été établies dans le cas des vers par la méthode Kimura 2-Parameter (K2P).

En parallèle, la **méthode du « 4x rule »** a été développée par Birky *et al.* (2010, 2005) et a été récemment appliquée dans l'étude de Fernández *et al.* (2012). Comme la méthode du seuil, cette méthode consiste à comparer la diversité génétique intra- et inter-spécifique, mais celle-ci impose que la distance intra-spécifique soit 4 fois supérieure à la distance inter-spécifique, en utilisant le calcul de distances deux à deux (pairwise distance). Cependant, dans le complexe d'espèces *Aporrectodea caliginosa*, cette méthode n'a pu être appliquée que pour un seul clade car les distances intra-spécifiques étaient importantes (Fernández *et al.*, 2012). D'autres études chez les vers de terre sont nécessaires afin de valider ou non cette méthode.

I-3.2.4.d. BINs

Les BINs (Barcode Index Number) sont les unités taxinomiques définies dans l'outil BOLD. La méthode d'obtention des BINs est détaillée dans les travaux récents de Ratnasingham & Hebert (2013). Une nouvelle méthode : la méthode RESL (Refined Single Linkage) a été mise au point afin d'assigner un BIN à chaque groupe de séquences. Cette méthode semble donner des résultats fiables comparés aux autres méthodes de délimitations (ABGD, GMYC, CROP, jMOTU) et surtout les plus rapides. En effet, la méthode RESL a été développée pour traiter efficacement un très grand nombre de séquences. En plus d'un numéro, chaque BIN possède une page descriptive contenant entre autres des photographies et les noms de tous les spécimens déposés. Ces BINs permettent de regrouper les séquences obtenues avec des séquences déjà référencées qui pourrait appartenir à la même espèce.

I-3.2.5. Avantages et limites des méthodes moléculaires

I-3.2.5.a. Avantages des Barcodes ADN

L'utilisation des Barcodes ADN pour définir des espèces putatives présente un grand intérêt pour l'évaluation de la richesse taxinomique des espèces de vers de terre ou d'autres groupes d'invertébrés du sol. Les Barcodes ADN couplés à l'identification morphologique procurent une estimation précise de cette richesse taxinomique dans les études de biodiversité. Dans un futur proche, le développement d'une base de données complète permettra l'association de MOTUs (espèces putatives) aux noms d'espèces, en comparant les Barcodes ADN obtenus avec les bibliothèques de références (Decaëns *et al.*, 2013).

En résumé, **les avantages de cette méthode sont multiples** (Rougerie *et al.*, 2009; Richard *et al.*, 2010; Decaëns *et al.*, 2013) :

- ✓ c'est une méthode fiable et reproductible car un lien est maintenu entre un barcode et un spécimen donné ;

- ✓ son faible coût et sa rapidité en font une méthode de routine pour de nombreux spécimens par rapport à l'identification traditionnelle morphologique ;
- ✓ elle est accessible par tout le monde, partout où le séquençage est accessible ;
- ✓ cette méthode fonctionne pour tous les stades de développement des vers ainsi que pour tous les types de tissus des organismes étudiés.

I-3.2.5.b. Limites de l'utilisation d'un seul gène

De toutes les critiques, la plus redondante est que l'utilisation d'un seul marqueur mitochondrial (COI) ne peut être suffisante pour discriminer les espèces. Différentes mises en gardes ont été énoncées (Rubinoff & Holland, 2005; Will *et al.*, 2005; Decaëns *et al.*, 2013) concernant :

- la présence de potentiels faux négatifs, c'est-à-dire un même Barcode ADN pour deux différentes espèces dû à un temps de divergence court empêchant la fixation des substitutions ou à de possibles phénomènes d'introgession (c'est-à-dire un transfert de gènes d'une espèce vers le pool génétique d'une autre espèce, génétiquement assez proche pour qu'il puisse y avoir interfécondation) ;
- la présence de faux positifs, c'est-à-dire différents Barcode ADN pour des individus appartenant à la même espèce, due au polymorphisme ancestral ou également à des phénomènes d'introgession ;
- l'amplification de copies nucléaires non fonctionnelles ou pseudogènes, problème qui peut être contré par le contrôle systématique des séquences qui présenteraient des codons-stop ou une divergence non explicable autrement ;
- la difficulté de retracer l'histoire d'un gène et les différents événements de spéciation due au « incomplete lineage sorting » et aux endosymbiontes pour les gènes mitochondriaux. Le problème d' « incomplete lineage sorting » correspond au fait qu'un polymorphisme peut rester pendant des millions de générations dans une lignée.

I-3.2.5.c. Limites des méthodes exploratoires basées sur un seul gène

• **Limites pour ABGD, GMYC, distances K2P et BINs**

Les différentes méthodes exploratoires présentent en elles-mêmes aussi des limites. Souvent, plusieurs méthodes sont utilisées pour un même jeu de données : elles sont comparées dans le but de conforter les résultats obtenus pour la délimitation des espèces. Les méthodes ABGD et GMYC sont complémentaires et devraient être utilisées ensemble pour

augmenter la robustesse globale des partitions finales et pour confirmer ou non l'ensemble des hypothèses (Puillandre *et al.*, 2012).

La méthode de calcul de distance K2P est critiquée ; elle ne serait pas la méthode la plus adaptée dans la plupart des études, et ne donnerait pas de meilleurs résultats que la distance non corrigée (*p*-distance) (Srivathsan & Meier, 2012). Cependant, l'intérêt de cette méthode est de pouvoir comparer nos données avec celles de la littérature (Hebert *et al.*, 2003; Rougerie *et al.*, 2009; James *et al.*, 2010; Richard *et al.*, 2010) car de nombreuses études ont été réalisées avec la méthode K2P et ce, sur plusieurs années (Srivathsan & Meier, 2012).

La méthode du seuil est aussi critiquée pour fixer le seuil à partir duquel deux spécimens sont considérés comme appartenant à deux espèces différentes. Entre 9 et 15% de divergence, cette méthode laisse place à des ambiguïtés qui ne peuvent être résolues qu'en présence de données morphologiques. Cette méthode ne permet donc pas de distinguer des espèces proches, ce qui reste un challenge dans le travail de délimitation d'espèces (Chang & James, 2011).

L'assignation des BINs sous BOLD a également été critiquée. Selon les groupes étudiés, la proportion de BINs affichant des conflits avec la taxinomie, c'est-à-dire avec un BIN associé à plusieurs noms d'espèces, peut être très importante comme l'a montré Collins & Cruickshank (2012) pour le groupe des poissons. En effet, des identifications morphologiques différentes peuvent être faites par différents laboratoires travaillant pourtant sur les mêmes espèces. A ce jour, 46% des BINs ne sont pas assignés jusqu'au niveau de l'espèce et 8% au niveau d'une famille (Ratnasingham & Hebert, 2013).

- **Limites liées aux jeux de données**

D'autres limites peuvent être quant à elles liées au jeu de données, qui peut contenir un nombre important de singletons par exemple. En effet, la plupart des méthodes de délimitation d'espèces disponibles ne sont pas faites pour intégrer les phénomènes de rareté, tels que les espèces représentées par des singletons ou seulement quelques séquences (Jörger *et al.*, 2012).

L'échelle à laquelle est effectué l'échantillonnage a aussi son importance dans l'application globale des Barcodes ADN, comme le montrent les résultats de l'étude de Bergsten *et al.* (2012). La résolution des résultats diffère selon l'échelle de l'étude. En effet, plus l'échelle est grande (locale < régionale < globale), plus la diversité génétique intra-spécifique augmente et plus le succès d'identification des individus diminue. Ces limites

montrent la nécessité d'incorporer les informations géographiques aux études utilisant le Barcode ADN, quand elle sont disponibles, afin d'obtenir des taux d'identification équivalent à l'échelle globale et régionale (Bergsten *et al.*, 2012).

Ainsi, malgré les nombreux avantages du Barcode ADN, différentes limites ont été identifiées quant à l'utilisation d'un seul gène et de méthodes exploratoires basées sur un seul gène. C'est pourquoi récemment, des solutions alternatives ont été proposées dans la littérature afin d'améliorer les études de délimitation d'espèces.

I-3.2.5.d. Solutions alternatives

La meilleure solution pour surmonter les obstacles liés à la délimitation d'espèces avec un seul gène (surtout mitochondrial) est de combiner ce gène avec d'autres méthodes complémentaires tels que l'analyse de données génétiques et de non génétiques supplémentaires (Rougerie *et al.*, 2009).

- **Utilisation de plusieurs gènes**

En complément du gène mitochondrial COI choisi pour le Barcode ADN, d'autres gènes peuvent être utilisés : des gènes mitochondriaux (16s ARNr et COII) ou des gènes nucléaires (18s et 28s ARNr), comme présenté dans le paragraphe I-3.2.3.

Pour des complexes d'espèces, King *et al.* (2008) et Dupont *et al.* (2011) ont utilisés des marqueurs génétiques (AFLP et microsatellites respectivement) en complément du gène COI chez *Allolobophora chlorotica*.

- **Autres critères**

D'autres critères peuvent être pris en compte pour la délimitation d'espèces, en plus d'autres marqueurs génétiques, comme l'analyse morphologique, l'addition de caractères écologiques, éthologiques ou encore biogéographiques (Rougerie *et al.*, 2009), dans une approche appelée **taxinomie intégrative** (Will *et al.*, 2005; Decaëns *et al.*, 2013). En effet, les données génétiques seules ne sont pas suffisantes, et la délimitation d'espèces devrait être effectuée en considérant d'autres données non génétiques (Carstens *et al.*, 2013).

Plusieurs études ont également souligné la nécessité d'utiliser le Barcode ADN dans un cadre intégratif au lieu d'utiliser le Barcode ADN seul, afin d'obtenir un résultat plus complet et surtout plus réaliste quant à la délimitation d'espèces « réelles » biologiques (Rougerie *et al.*, 2009; Novo *et al.*, 2012).

La pratique courante d'une approche taxinomique intégrative permettrait d'accélérer les découvertes et la description de nouvelles espèces de vers de terre (Chang & James, 2011).

Notamment, les études de diversité appréhendées en Amérique du Sud par des méthodes moléculaires ne peuvent pas se passer de l'identification morphologique afin de donner un nom d'espèce aux individus étudiés (Brown *et al.*, 2013). Par ailleurs, l'étude de James *et al.*, 2010 souligne le besoin urgent de réévaluer le nombre d'espèces de vers de terre connues en combinant approches moléculaires et taxinomie classique.

L'évaluation de la diversité des vers de terre peut donc être appréhendée par différentes méthodes, de la taxinomie traditionnelle (i.e. morphologique) aux méthodes moléculaires tel que le Barcode ADN et les différentes méthodes de délimitation d'espèces basées sur un ou plusieurs gènes. Les méthodes peuvent être complémentaires.

Dans le cadre d'une approche exploratoire pour une étude écologique par exemple, les méthodes de délimitation d'espèces basées sur un gène tel que le gène COI restent tout de même efficaces et rapides pour obtenir un proxy de la diversité. Les données sont plus difficiles à obtenir dans le cadre d'une de taxinomie intégrative (échantillonnages, coûts, temps, et MOTUs pas bien connus dans le cas de la Guyane française).

I-3.3. La diversité des vers de terre

I-3.3.1. En Guyane française

La diversité taxinomique des vers de terre dans l'est de l'Amazonie est quasiment inconnue. Le premier registre des vers de terre de Guyane française (Cayenne) date d'Edmond Perrier en 1872 (Brown & Fragoso, 2007). Les échantillons ont été majoritairement collectés dans la première moitié du 20^{ème} siècle (Cernosvitov, 1934, 1935). D'autres échantillonnages ont été réalisés plus récemment par Emmanuel Lapied, Patrick Lavelle, Stephan Scheu et leurs collaborateurs (Brown & Fragoso, 2007; Lavelle & Lapied, 2003). Cependant, l'identification des vers de terre n'a pas été effectuée jusqu'au niveau de l'espèce, mis à part la description de quelques espèces disponibles dans de courts résumés de conférences sur le sujet (Lapied, 2000, 2004).

Tableau 5 : Liste des espèces de vers de terre rencontrées en Guyane française.

D'après Lavelle & Lapied, 2003; Brown & Fragoso, 2007a; Pavlicek & Csuzdi, 2012.

En orange: les espèces du genre *Martiodrilus* non décrites en 2007 (Brown & Fragoso, 2007a),**En vert:** les nouvelles espèces décrites en 2011 (Pavlicek & Csuzdi, 2012).**En violet:** les cinq espèces du genre *Pontoscolex* en Guyane française.

Espèces	Décrites par	Origine	Références
<i>Martiodrilus (Maipure) tenkatei</i>	Horst, 1887	Native	Cernostitov (1934, 1935); Csuzdi & Pavlicek (2011a)
<i>Martiodrilus (Botaria) dewynteri</i>	Csuzdi & Pavlicek (2011)	Native	Csuzdi & Pavlicek (2011a)
<i>Martiodrilus duodenarius</i>	Michaelsen, 1917	Native	Cernostitov (1934, 1935); Csuzdi & Pavlicek (2011a)
<i>Martiodrilus (Maipure) gaucheri</i>	Csuzdi & Pavlicek (2011)	Native	Csuzdi & Pavlicek (2011a)
<i>Martiodrilus (Botaria) helleri</i>	Michaelsen, 1918	Native	Csuzdi & Pavlicek (2011a)
<i>Martiodrilus</i> sp.nov.1, 2, 3, 4, 5,6	non décrites	Native	Lavelle & Lapied, 2003; E. Lapied (comm. pers.)
<i>Nouraguesia souadae</i>	Csuzdi & Pavlicek (2011)	Native	Csuzdi & Pavlicek (2011b)
<i>Nouraguesia parare</i>	Csuzdi & Pavlicek (2011)	Native	Csuzdi & Pavlicek (2011b)
<i>Pontoscolex (Meroscolex) guianicus</i>	Cernovitov, 1934	Native	Cernostitov (1934, 1935)
<i>Pontoscolex (Meroscolex) longissimus</i>	Cernovitov, 1934	Native	Cernostitov (1934, 1935)
<i>Pontoscolex (Pontoscolex) corethrurus</i>	Müller, 1857	Native	Cernostitov (1934, 1935); Perrier, 1872; Topoliantz (2002); Topoliantz & Ponge (2005)
<i>Pontoscolex (Pontoscolex) spiralis</i>	Borges & Moreno, 1990	Native?	E. Lapied (comm. pers.); Brown & Fragoso (2007)
<i>Pontoscolex</i> sp.nov.1	non décrite	Native?	Lavelle & Lapied, 2003
<i>Rhinodrilus gigas</i>	Perrier, 1872	Native	Perrier, 1872
<i>Rhinodrilus longus</i>	Cernovitov, 1934	Native	Cernostitov (1934, 1935)
<i>Rhinodrilus</i> sp.nov.1, sp.nov., sp.	non décrites	Native	Lavelle & Lapied, 2003; Cernostitov (1934, 1935)
<i>Righiodrilus</i> sp.nov.1, 2, 3	non décrites	Native	Lavelle & Lapied, 2003
<i>Drilocrius</i> sp.1, sp2	non décrites	Native	E. Lapied (comm. pers.)
<i>Dichogaster (Dt.) bolau</i>	Michaelsen, 1891	Exotique	Cernostitov (1934, 1935)
<i>Dichogaster (Dt.) modiglianii</i>	Rosa, 1896	Exotique	Cernostitov (1934, 1935)
<i>Eisenia fetida</i>	Savigny, 1826	Exotique	Cernostitov (1934, 1935)
<i>Dendrodrilus rubidus</i>	Savigny, 1826	Exotique	Cernostitov (1934, 1935)
<i>Eudrilus eugeniae</i>	Kinberg, 1867	Exotique	Michaelsen, 1900; Cernostitov (1934, 1935)
<i>Amyntas gracilis</i>	Kinberg, 1867	Exotique	Cernostitov (1934, 1935)
<i>Amyntas rodericensis</i>	Grube, 1879	Exotique	Cernostitov (1934, 1935)
<i>Metaphire houlleti</i>	Perrier, 1872	Exotique	Cernostitov (1934, 1935); Gates (1972)
<i>Polypheretima elongata</i>	Perrier, 1872	Exotique	Gates (1972)
<i>Thamnodrilus duodenarius</i>	Michaelsen, 1918	Exotique	Cernostitov (1934, 1935)

Selon Brown & Fragoso (2007), 33 espèces différentes auraient été échantillonnées en Guyane française, en intégrant toutes les espèces encore non décrites à ce moment-là (dont 21 spp. de la famille Glossoscolecidae et 10 espèces exotiques). Seulement 22 espèces décrites ont été enregistrées à ce jour, dont 40% sont des espèces exotiques/introduites en Guyane française (9 espèces exotiques /22) (Pavlicek & Csuzdi, 2012). La liste des espèces présentée dans le Tableau 5 a été mise à jour d'après Brown & Fragoso (2007) et Pavlicek & Csuzdi (2012). Le nombre d'espèces annoncé en 2007 n'est donc plus valable dans ce tableau car de nouvelles espèces ont été identifiées depuis (Csuzdi & Pavlicek, 2011a, 2011b).

Malgré le faible nombre de taxons décrits, la diversité taxinomique des vers de terre pourrait être très élevée, comme le montre la description de cinq espèces et d'un nouveau genre de vers de terre en 2011, échantillonnés dans la réserve naturelle des Nouragues (Csuzdi & Pavlicek, 2011a, 2011b).

La diversité taxinomique en forêt tropicale est considérablement sous-estimée en raison du manque d'études sur le terrain (Pavlicek & Csuzdi, 2012). Cette tendance devrait s'inverser dans les années à venir car de nombreux projets et campagnes d'évaluation moléculaire de la diversité des vers de terre (barcode et metabarcodes) en Guyane ont été financés récemment (projets ANR-Interconnect (2012-), CNRS-Nouragues (2011 et 2012), CEBA-Wormbank (2013-), CEBA-Diadema (2013-), APEGE-BCWormbank (2013-).

Dans la région des Guyanes, il existe huit espèces du genre *Pontoscolex* dont cinq sont présentes en Guyane Française (Tableau 6). L'importante diversité du genre montre qu'il pourrait bien être originaire de cette région du monde. On remarque cependant qu'une seule espèce est retrouvée dans plusieurs localités : *Pontoscolex corethrurus*.

Tableau 6. Diversité du genre *Pontoscolex* dans la région des Guyanes (d'après Brown & Fragoso, 2007a).

Espèces	Décrites par	Localité	Références
1 <i>Pontoscolex (Meroscolex) guianicus</i>	Cernosvitov, 1934	French Guiana	Cernostitov (1934, 1935)
2 <i>Pontoscolex (Meroscolex) longissimus</i>	Cernosvitov, 1934	French Guiana	Cernostitov (1934, 1935)
3 <i>Pontoscolex (Pontoscolex) corethrurus</i>	Müller, 1857	French Guiana, Guyana, Surinam	Cernostitov (1934, 1935); Perrier (1872); Topoliantz (2002); Topoliantz & Ponge (2005)
4 <i>Pontoscolex (Pontoscolex) spiralis</i>	Borges & Moreno, 1990	French Guiana	E. Lapiéd (comm. pers.)
5 <i>Pontoscolex</i> sp.nov.1	non described	French Guiana	Lavelle & Lapiéd (2003)
6 <i>Pontoscolex (Pontoscolex) hingstoni</i>	Stephenson, 1931	Guyana	Stephenson (1931b)
7 <i>Pontoscolex (Meroscolex) hoogmoedi</i>	Righi, 1969	Surinam	Righi (1969)
8 <i>Pontoscolex (Pontoscolex) vandersleeni</i>	Michaelsen, 1933	Surinam	Michaelsen (1933)

I-3.3.2. Cas de *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857)

***Pontoscolex corethrurus* est l'espèce la plus étudiée sous les tropiques** car c'est aussi la plus répandue (Figure 11). Cette espèce a souvent été identifiée par un unique caractère morphologique identifiable : l'arrangement des soies sur la partie caudale. Or cette caractéristique, également retrouvée chez d'autres espèces du genre *Pontoscolex*, a été à l'origine de mauvaises identifications (Moreno, 2004). Il est donc nécessaire de vérifier l'espèce utilisée au préalable de chaque étude, par exemple en utilisant le barcode ADN déjà référencé pour cette espèce.

Cette espèce est particulièrement étudiée pour son caractère invasif dans les tropiques, au détriment des espèces natives dans les sols perturbés par les activités anthropiques (Marichal *et al.*, 2010, 2012). En Amazonie, il envahit les zones anthropisées, mais aussi de nombreuses zones ailleurs sous les tropiques (Brown & Fragoso, 2007; Lavelle *et al.*, 1987; Rossi *et al.*, 2010) (Figure 11). Sa vaste répartition géographique est due à sa capacité à vivre dans des sols variés, où le pH, la teneur en matière organique ou la texture du sol diffèrent de son habitat originel (Lavelle *et al.*, 1987).

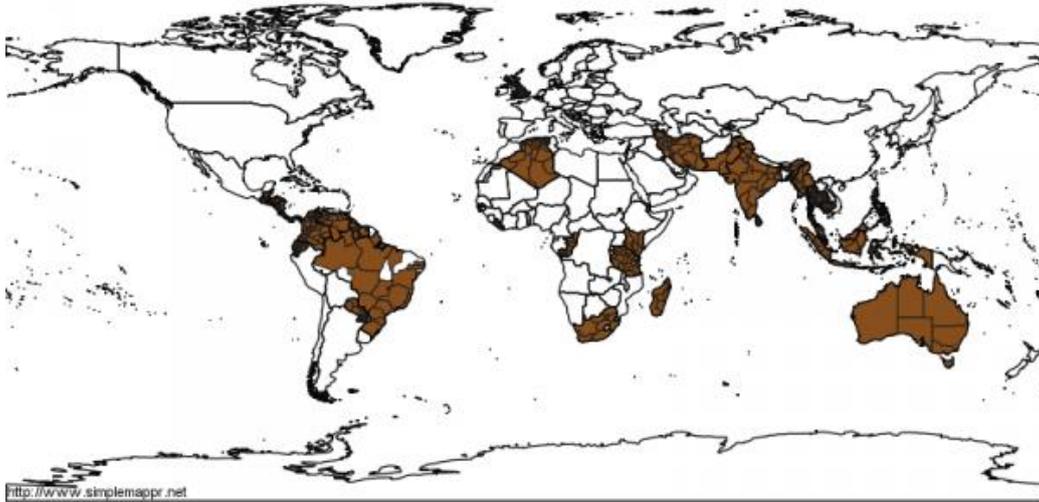


Figure 11 : Carte de la distribution de *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857).

P. corethrurus est un ver endogé géophage, entre polyhumique et mésohumique; on le retrouve majoritairement entre 0 et 10 cm, et jusqu'à 30 centimètres de profondeur dans le sol lors de périodes de sécheresse (Lavelle *et al.*, 1987). De plus, cette espèce possède un taux de fécondité élevé comparé aux autres espèces natives. En effet, il est capable de produire jusqu'à 118 cocons par adulte et par an dans les conditions optimales contre 1 à 43 cocons pour d'autres espèces tropicales (Barois *et al.*, 1999; Bhattacharjee & Chaudhuri, 2002). Sa reproduction s'effectue à une température comprise entre 23°C et 27°C. L'activité de ce ver dépend également de l'humidité du sol (Lavelle *et al.*, 1987).

Il peut avoir une action compactante dévastatrice sur les sols dans certaines conditions (Chauvel *et al.*, 1999). Cependant, l'action de cette espèce sur la structure du sol dépend de la teneur en matière organique de celui-ci (Hallaire *et al.*, 2000). Les études sur *P. corethrurus* se focalisent sur la transformation physique ou chimique du sol induite par cette espèce et ses effets sur la croissance des plantes, ainsi que leur résistance aux parasites (Brown *et al.*, 1999; Chauvel *et al.*, 1999; Lafont *et al.*, 2007; Chapuis-Lardy *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010).

Malgré les nombreuses études portant sur *P. corethrurus* et le fait que cette espèce est présente dans les sols anthropisés, encore peu d'études s'intéressent à l'impact de ce ver dans les sols contaminés. Dans le chapitre suivant, les interactions entre les vers de terre et les ETM sont discutées : l'impact des ETM sur les vers et celui des vers sur les ETM. De plus, les études où l'espèce *Pontoscolex corethrurus* a été utilisée sont détaillées, notamment pour des tests écotoxicologiques où l'intérêt croissant des chercheurs pour cette espèce est souligné.

I-3.4. Interactions entre les vers de terre et le mercure

3.4.1. Impact des ETM sur les vers de terre

L'impact des ETM sur les vers de terre est variable en fonction des espèces, du stade de développement, du mode de vie (lieu de vie et régime alimentaire) et de leur capacité d'adaptation face à la pollution. Ces effets varient également suivant la nature de l'élément trace métallique étudié, sa forme chimique et les propriétés du sol. Les ETM les plus étudiés sont le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le plomb (Pb) et le cadmium (Cd), mais le mercure reste encore peu étudié à ce jour aussi bien en milieu tempéré que tropical.

I-3.4.1.a. Etudes en conditions contrôlées

L'impact de différents éléments traces métalliques sur les vers de terre a été étudié au laboratoire, en conditions contrôlées. Les espèces épigées *Eisenia fetida* et *Eisenia andrei* ont été majoritairement étudiées car ce sont les espèces de vers modèles utilisées en **écotoxicologie** (Nahmani *et al.*, 2007a; OCDE, 2004). L'impact des ETM est généralement évalué sur la mortalité, la biomasse et la reproduction des vers de terre en utilisant des doses croissantes de polluants. Ces tests permettent d'en déduire des concentrations pour lesquelles 50% d'effet est observé (EC₅₀) pour la biomasse et la reproduction en général et la concentration létale pour 50% de la population (LC₅₀).

Encore peu d'études se sont intéressées à l'impact du mercure en particulier sur les vers de terre. En 1983, une étude s'est intéressée à l'impact du mercure (HgCl₂) sur l'espèce de vers *Octochaetus pattoni* et a montré une mortalité de tous les vers au bout de 10 jours avec 5 mg Hg kg⁻¹ sol (Abassi & Soni, 1983). Alors que la mortalité a augmenté au cours de l'expérimentation, les vers survivants se sont reproduits significativement plus que les vers témoins, mais aucune explication n'a été avancée. Dans une autre étude utilisant différentes concentrations de méthylmercure la mortalité de tous les vers de l'espèce *E. fetida* a été observée au bout de 12 semaines d'incubation avec 25 mg Hg kg⁻¹ sol (Beyer *et al.*, 1985). Cette étude est la seule à avoir utilisé le mercure sous forme de méthylmercure à ce jour.

Deux études plus récentes effectuées avec *Eisenia fetida* ont montré que plus le taux de mercure augmente dans les sols, plus la production de cocons et la présence de juvéniles diminuent (Lock *et al.*, 2001; Lapinski & Rosciszewska, 2008). A 18 µg de Hg g⁻¹ sol (ajouté sous forme de HgCl₂), *E. fetida* produit significativement moins de cocons que dans le sol témoin (Lock *et al.*, 2001). De plus, des vers pré-exposés à 22 µg de Hg g⁻¹ sol ont montré

une augmentation de la résistance des vers au mercure lors d'une exposition ultérieure (Gudbrandsen *et al.*, 2007).

Cependant, aucune étude à ce jour ne s'est intéressée à **l'impact du mercure sur les vers en milieu tropical** alors que cet élément est très présent dans ces environnements avec un impact sanitaire et environnemental largement rapportés (Figure 12).

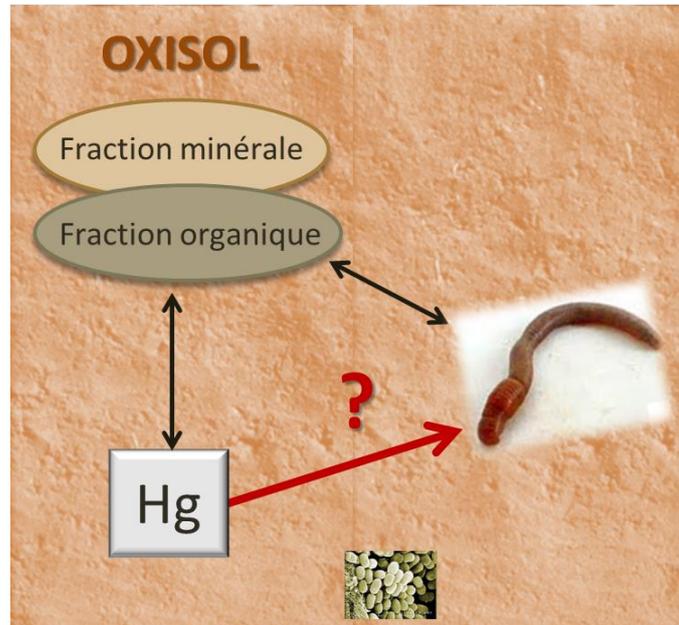


Figure 12 : Impact du mercure sur les vers de terre en milieu tropical?

Bien que le complexe d'espèces *Eisenia (fetida ou andrei)* soit utilisé dans les milieux tempérés, son utilisation pour des tests écotoxicologiques dans les sols tropicaux n'est pas représentative du milieu. En effet, ce sont des vers de litière qui ne sont pas ou présents dans ces sols, du notamment aux propriétés physico-chimiques particulières des sols tropicaux.

L'espèce tropicale *Pontoscolex corethrurus* semble être une bonne candidate pour des études écotoxicologiques en milieu tropical. En effet, c'est une espèce endogée géophage qui vit en contact permanent avec le sol et qui est présente dans les milieux tropicaux anthropisés. De plus, l'utilisation d'espèces parthénogénétiques présente des avantages pour les études de croissance et de reproduction car elles sont génétiquement uniformes (Lowe & Butt, 2007). L'utilisation de cette espèce pour des tests écotoxicologiques se développe actuellement, notamment au Brésil, et *Pontoscolex corethrurus* pourrait devenir une espèce modèle pour les études dans les sol tropicaux où elle est très présente (Römbke & Garcia, 2000; Buch *et al.*, 2011, 2013; Hernández-Castellanos *et al.*, 2013).

L'effet des ETM sur les vers de terre a été finement étudié en laboratoire, au travers d'études en microcosmes, en conditions contrôlées. Les études écotoxicologiques donnent une

bonne évaluation de la toxicité des ETM et de leurs effets sur la croissance et la reproduction des vers. Cependant, ces résultats obtenus en conditions contrôlées posent des problèmes d'extrapolation car ils ne représentent pas les situations réelles rencontrées sur le terrain.

I-3.4.1.b. Etudes sur le terrain : impact des ETM sur les communautés

Les vers de terre représentent des organismes modèles pour évaluer l'effet des ETM sur la macrofaune du sol via des études *in situ*. Les espèces de vers diffèrent de par leur préférence de niches écologiques, leur cycle de vie, et leur sensibilité aux polluants. De plus, ils sont présents dans de nombreux habitats et sont faciles à échantillonner sur le terrain (Spurgeon & Hopkin, 1999).

L'augmentation de la teneur en ETM au-delà d'un certain seuil réduit la densité des vers (Pizl & Josens, 1995; Nahmani *et al.*, 2003; Klok *et al.*, 2007) **et influe négativement sur leur croissance, leur développement sexuel et la production de cocons** (Spurgeon & Hopkin, 1996; Spurgeon & Hopkin, 1999). Spurgeon & Hopkin (1999) ont observé une réduction significative du taux de survie de quatre espèces pour des concentrations en zinc comprises entre 2000 et 3600 $\mu\text{g g}^{-1}$ sol. Des pertes significatives de poids ont de plus été observées à partir de 1200 $\mu\text{g Zn g}^{-1}$ sol. Un ratio important juvéniles/adultes a souvent été observé, suggérant un retard de maturation des vers de terre dans les sols contaminés (Klok *et al.*, 2007; Klok & Thissen, 2009). Cependant, des espèces comme *Lumbricus rubellus* et *Dendrodrilus rubidus* semblent être peu sensibles au stress métallique (Klok *et al.*, 2007; Spurgeon & Hopkin, 1999).

Bien que quelques études aient évalué l'impact des éléments traces métalliques sur les communautés de vers de terre en milieu tempéré, aucune étude à ce jour n'a évalué l'impact du mercure sur les vers *in situ* que ce soit en milieu tempéré ou tropical. Les données concernant l'effet de la pollution au mercure dans les sols sont encore récentes (Hinton & Veiga, 2002).

In situ, il existe de nombreux facteurs abiotiques et biotiques qui influencent l'abondance et la biomasse des espèces (Cortet *et al.*, 1999). Les **approches d'écologie du stress** ont été développées dans le but de discriminer les effets des polluants des autres facteurs de stress (e.g. température, humidité, pH) (Van Straalen, 2003; van Straalen & van Gestel, 2008). Cette approche est particulièrement utile dans le cas de pollutions diffuses. En effet, de nombreuses études se concentrent sur un gradient de pollution à partir d'une source locale, et les

paramètres écologiques sont alors estimés en fonction de la distance à la source. Cependant, dans le cas de pollutions diffuses, de nombreuses sources contribuent à une distribution irrégulière du polluant, qui interagit avec des concentrations existantes dans l'environnement. Dans ces cas particuliers, les effets des polluants sont difficiles à isoler car ils sont dissimulés par les paramètres environnementaux (Van Straalen, 2003). Dans cette approche, l'étude de Boivin *et al.* (2006) avait pour objectif de discriminer l'effet des métaux sur les communautés bactériennes des variations naturelles des sols. Les effets des métaux ont pu être filtrés de la variation totale grâce à des analyses multivariées.

I-3.4.2. Effets des vers de terre sur les ETM

I-3.4.2.a. Biodisponibilité et mobilité des ETM dans les sols

La revue de Sizmur & Hodson (2009) résume différentes études ayant rapporté l'action de différentes espèces de vers de terre sur la mobilité des ETM dans les sols. La majeure partie de ces études se sont intéressées à des métaux comme le Cu, Pb et le Zn. Le mercure reste cependant un élément peu abordé et encore moins dans les sols tropicaux.

- **Mécanismes en jeu**

De par leurs activités dans le sol, les vers de terre peuvent modifier la mobilité des ETM par différents mécanismes. Cependant, ces mécanismes restent encore peu démontrés, notamment leur importance relative. D'après différentes études, **les vers peuvent agir soit directement** en modifiant les paramètres physico-chimiques du sol (notamment le pH et le taux de carbone organique dissous (COD)), **soit indirectement** en modifiant les communautés de microorganismes présentes dans les sols (Sizmur & Hodson, 2009).

Les vers de terre affectent la distribution des métaux en redistribuant les hot-spots métalliques dans les sols (Zorn *et al.*, 2005), et en augmentant la disponibilité des métaux suite à la décomposition de la matière organique (Wen *et al.*, 2004). D'autre part, des études ont montré que les vers de terre avaient la capacité d'augmenter le pH du sol via leurs urines alcalines, ce qui pourrait limiter la mobilité des éléments métalliques. Le pH a en effet été décrit comme un des facteurs affectant l'adsorption ou la désorption des métaux mais aussi leur biodisponibilité (Van Gestel, 2008). Ils influencent également indirectement les flux de métaux par l'activation de microorganismes produisant des molécules acido-complexantes (Cheng & Wong, 2002; Wen *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2002). Dans l'étude de Wen *et al.* (2004) en particulier, l'action du ver *Eisenia fetida* a augmenté la mobilité des ETM dans les sols

parallèlement à l'augmentation du taux de COD en (1) décomposant la MO en composants plus petits et solubles et (2) en augmentant l'activité microbienne accompagnée de la production de métabolites carbonés dans la solution des sols.

- **Catégories écologiques des vers de terre**

Bien que des études aient été réalisées avec des vers appartenant aux trois catégories écologiques (épigés, endogés, anéciques), l'intérêt d'utiliser des vers appartenant aux différentes catégories pour des études similaires est discuté. D'après les résultats obtenus, **tous les vers semblent augmenter la disponibilité et la mobilité des ETM dans les sols** (Sizmur & Hodson, 2009). Cependant, les vers endogés semblent être les meilleurs candidats pour déterminer l'effet des vers sur la mobilité et la biodisponibilité des métaux. En effet, les endogés sont en contact permanent avec les sols, ce qui n'est pas le cas des vers épigés et des anéciques. L'inconvénient majeur est la difficulté de faire un élevage des vers endogés en laboratoire (Lowe & Butt, 2007).

Encore peu d'études se sont intéressées à l'impact des vers sur la dynamique des ETM **dans les sols tropicaux** contaminés. Cependant, deux études ont été publiées récemment utilisant l'espèce tropicale *Pontoscolex corethrurus* (Duarte *et al.*, 2012; Jusselme *et al.*, 2012). La première a montré que *P. corethrurus* améliore la phytoextraction du Pb par la plante *Lantana camara* dans des sols artificiellement dopés à 500 et 1000 $\mu\text{g Pb g}^{-1}$ de sol (Duarte *et al.*, 2012). L'étude de Duarte *et al.* (2012) qui a mesuré l'impact de *P. corethrurus* sur la disponibilité du plomb et du manganèse dans des sols naturellement contaminés, a montré que la fraction soluble et échangeable du Pb est significativement diminuée en présence de vers. Ces études ouvrent la voie à l'utilisation de *P. corethrurus* pour des études supplémentaires avec des sols contaminés. De plus, elles confortent l'idée de son intérêt pour les études en milieu tropical et en particulier pour étudier l'impact des vers de terre sur le mercure (Figure 13).

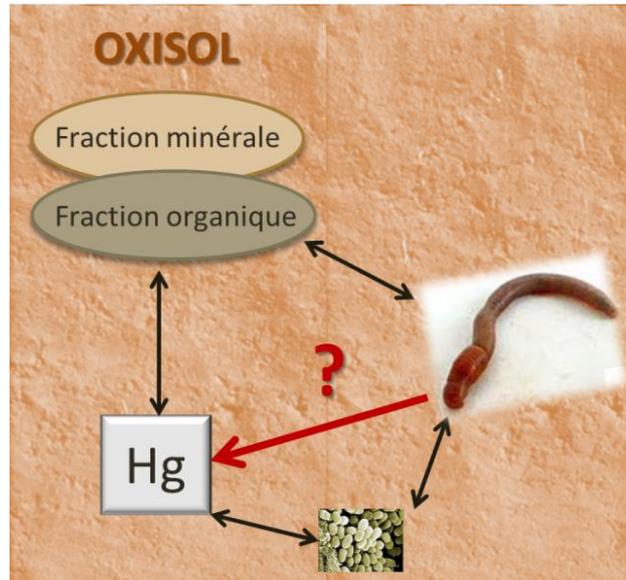


Figure 13. Impact des vers de terre sur la mobilité du mercure dans les sols tropicaux ?

L'effet des vers sur la mobilité des ETM dans les sols a bien été démontré, mais pour différents éléments, avec différentes espèces de vers et ce, dans différents sols avec des caractéristiques différentes. L'hétérogénéité des résultats obtenus peut en partie être liée aux différentes conditions expérimentales mises en place (la nature des sols, les espèces utilisées, l'élément trace métallique étudié, ainsi que la notion abordée). On peut cependant noter l'importance de continuer à développer ces études afin de mettre en évidence les mécanismes mis en jeu dans les sols contaminés. En particulier, la biodisponibilité des ETM est un facteur clé dans la prévention des risques associés. Par ailleurs, la capacité de bioaccumulation des ETM par les vers peut être utilisée dans le domaine de la bioindication de la pollution métallique dans les sols.

I-3.4.2.b. Biodisponibilité, bioaccumulation des ETM dans les vers et bioindication

- **Voies d'accumulation des ETM**

La capacité d'accumulation des vers de terre a été reconnue dans la littérature dès la fin du 19^{ème} siècle (Hopkin, 1989). Chez les vers de terre, les ETM s'accumulent notamment dans les tissus digestifs soit par voie orale après leur ingestion, soit par voie cutanée chez les vers de terre n'ayant pas de cuticule protectrice et vivant en contact permanent avec le sol (Hobbelen *et al.*, 2006). De nombreuses études ont permis d'identifier les paramètres dont dépend ce processus de bioconcentration : (i) l'espèce de ver et sa catégorie écologique, (ii) le type de métal et sa spéciation, (iii) les propriétés physiques et chimiques du sol, (iv) la saison

et (v) quand il s'agit d'une pollution diffuse, la distance à la source de contamination (Dai, 2004; Ernst, 2007, 2008; Nahmani *et al.*, 2009, 2007; Rieder *et al.*, 2011).

En introduisant les vers *E. fetida* dans du fumier et en observant la biodisponibilité, des expériences ont montré que la bioaccumulation des ETM dans les vers de terre dépendait fortement de l'élément étudié (Li *et al.*, 2010). Le mercure en particulier est accumulé de manière plus importante dans les tissus des vers endogés (Burton *et al.*, 2006; Ernst, 2007, 2008; Fu *et al.*, 2011; Rieder *et al.*, 2011).

Les ETM se trouvent accumulés dans des cellules appelées chloragocytes, qui tapissent le tube digestif des vers (Vijver *et al.*, 2004). Lors de la digestion, les déchets pouvant inclure les métaux comme le plomb ou le cadmium sont stockés dans les chloragocytes sous la forme de granules ou chloragosomes. Un chloragosome isolé possède des propriétés d'échange cationique et anionique qui lui permettent d'absorber et d'immobiliser certains éléments tels que le Pb. Le chloragosome joue donc un rôle primordial dans la concentration de certains éléments traces. L'élimination du Pb et du Cd peut être faite par les corps bruns ou par autotomie (Ablain, 2002).

Afin de prévenir la toxicité des ETM, un second mécanisme de séquestration cellulaire existe dans le cytoplasme, impliquant une protéine spécifique se fixant aux ETM : les métallothionéines. Ces molécules ont d'abord été étudiées chez les vers de terre en réponse au cadmium (Cd) (Brulle *et al.*, 2007, 2010, 2011), mais peuvent être induites par différents ions métalliques y compris le mercure. Le fait que les vers produisent ces métallothionéines pourrait expliquer leur capacité à accumuler des quantités très importantes de mercure sans sembler être affectés par sa toxicité (Vijver *et al.*, 2004). L'induction de métallothionéines joue donc un rôle important dans la tolérance des ETM.

L'étude de l'accumulation des métaux lourds dans les tissus des vers pourrait être un bon indicateur de disponibilité des métaux dans le sol (Conder & Lanno, 2000; Conder *et al.*, 2001; Lanno *et al.*, 2004; Oste *et al.*, 2001). En effet, les vers de terre semblent être de bons candidats pour servir d'indicateurs d'accumulation afin d'évaluer la biodisponibilité d'éléments traces métalliques dans les sols (Lanno *et al.*, 2004). Pour le mercure en particulier, différentes études ont montré l'intérêt d'utiliser les vers comme bioindicateurs sur des sites contaminés par des activités d'orpillage, notamment au Brésil (Hinton, 2002; Hinton & Veiga, 2002).

- **Mercure dans la chaîne alimentaire terrestre et bioindication**

Mesurer les ETM dans les vers de terre peut aussi être intéressant pour la protection de l'environnement car ils représentent une source importante de nourriture pour plusieurs vertébrés et invertébrés (comme les oiseaux par exemple) (Sandoval *et al.*, 2001). Le mercure, *via* sa bioaccumulation dans les vers de terre, pourrait entrer dans la chaîne trophique terrestre et contaminer *in fine* l'homme comme cela a été décrit dans les milieux aquatiques. Il y a donc deux paramètres importants à prendre en compte quand les vers sont utilisés en tant qu'indicateurs : (1) la concentration dans les vers donne une indication pour le risque secondaire de contamination des prédateurs des vers de terre et (2) le facteur de bioaccumulation (BAF) renseigne sur la biodisponibilité des ETM dans le sol (Karaca, 2011).

$$\text{BAF} = \frac{\text{concentration mesurée dans les vers } (\mu\text{gg}^{-1})}{\text{concentration mesurée dans le sol } (\mu\text{gg}^{-1})}$$

Pour les quantités de mercure total accumulées dans les vers de terre, le BAF représente souvent moins d'une fois les concentrations présentes dans le sol même si d'autres études ont montré que le BAF peut être supérieur à 10 (Burton *et al.*, 2006; Ernst *et al.*, 2008). Dans le cas du méthylmercure, le BAF s'est élevé à 175 à 249 pour l'espèce *Eisenia fetida* au bout de 28 jours d'incubation (Burton *et al.*, 2006). Dans l'étude de Burton *et al.* (2006), les BAF pour le MeHg étaient 75 à 300 fois plus important que ceux du mercure total dans les sols étudiés. La bioaccumulation du mercure est différente de celle du MeHg car cette forme chimique organique présente une affinité importante pour les lipides et est donc plus facilement bioaccumulé dans les tissus des organismes.

Enfin, il a été montré que la bioaccumulation la plus importante avait bien lieu dans les sols les plus contaminés (Burton *et al.*, 2006; Ernst *et al.*, 2008). Ainsi, les taux de mercure mesurés dans les vers pourraient renseigner sur le niveau de contamination dans les sols, tout en évaluant sa biodisponibilité. Cependant aucune étude à ce jour n'a porté sur l'accumulation du mercure chez des espèces de vers tropicaux.

Chapitre II

Matériels et méthodes

Introduction

Afin de répondre aux différents objectifs de cette thèse, une approche multidisciplinaire était nécessaire. Ce chapitre a pour objectifs de présenter et de justifier le choix des méthodes expérimentales utilisées. Certains volets ont nécessité la mise au point de nouvelles méthodes analytiques. Ces dernières sont développées et leur pertinence discutée. Les premiers volets de cette rubrique méthodologique sont consacrés au « volet terrain » de notre étude avec d'une part, la description du site d'étude en Guyane française et de ses caractéristiques pédoclimatiques et d'autre part, la justification des stratégies et méthodes d'échantillonnages des sols et des vers de terre utilisées dans les chapitres de résultats. La seconde partie de ce chapitre est dédiée aux « volets laboratoire » de cette thèse. En effet, les dispositifs expérimentaux mis en place afin d'étudier d'une part, l'impact du mercure sur un ver tropical endogé (chapitre IV) et d'autre part, le rôle des vers de terre dans la mobilité du mercure (chapitre V) y sont présentés. Sont également présentées les méthodes employées pour suivre l'activité des vers de terre, les propriétés physico-chimiques des sols et les techniques de quantification et /ou de répartition du mercure dans les sols et dans les vers de terre.

II-1. Description du site d'étude

II-1.1. La Guyane française : vaste département boisé

La Guyane française est un département français d'outre-mer (DOM) situé au nord-est de l'Amérique du Sud. Elle est délimitée au nord par l'Océan Atlantique, au sud et à l'est par le Brésil et à l'ouest par le Surinam. C'est le seul département d'outre-mer non insulaire, et également le département français le plus vaste avec une superficie de 83 534 km² (près de 8 fois supérieure à celle de la Gironde). Avec 239 450 habitants au 1^{er} janvier 2012, sa densité de population n'est que de 2,8 habitants par km², tandis que la densité moyenne en France est autour de 100 habitants par km² (Insee, 2012).

La Guyane française est également le département le plus boisé: 96% du territoire est couvert de forêt équatoriale. La forêt guyanaise est une forêt primaire à très haut niveau de biodiversité (hot-spot); elle reste parmi les plus riches et les moins fragmentées au monde. La moitié de la biodiversité française se trouve en Guyane: 29% des plantes, 55% des vertébrés supérieurs (mammifères, oiseaux, poissons...) et jusqu'à 92% des insectes. Ce qui fait de ce département l'un des plus riches au monde en matière de biodiversité tant animale que végétale (IUCN, 2003). Cette biodiversité est protégée par un parc national et six réserves naturelles.

II-1.2. Importance du climat : rythmé par la saison des pluies.

La Guyane française est située à proximité de l'équateur et est soumise à un climat de type équatorial humide. La température moyenne annuelle est de 26°C. L'humidité relative moyenne est élevée et comprise entre 80 et 90 % selon la saison. Les précipitations varient entre 1700 millimètres par an dans le Nord-Ouest et 3800 millimètres dans la région de Régina-Cacao. La pluviosité annuelle est de 3000 millimètres en moyenne sur la bande côtière de Kourou à Cayenne, alors qu'elle atteint 2500 millimètres sur les régions de l'intérieur. L'intensité des pluies est souvent forte (Météo France, 2012).

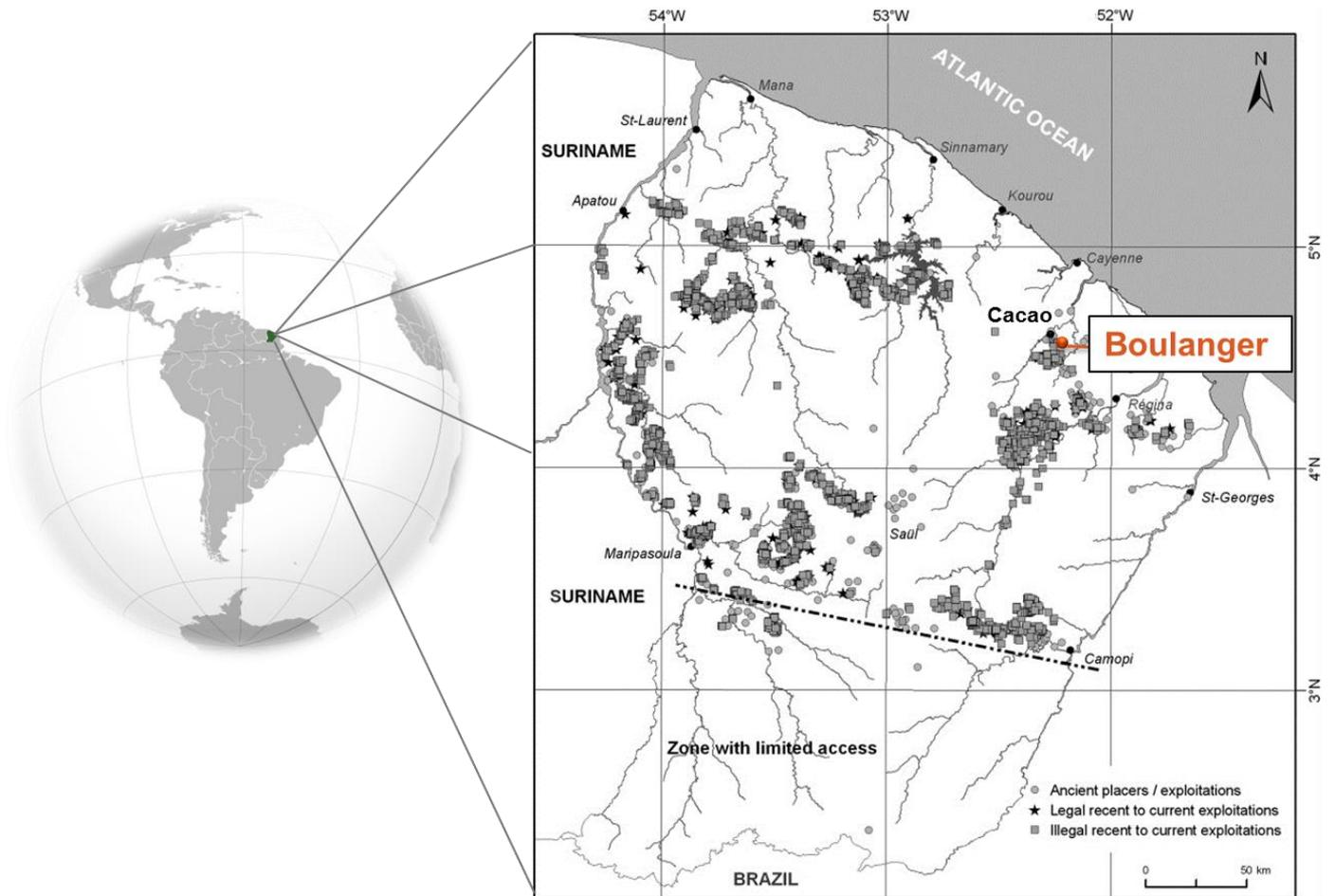
En Guyane française, les variations saisonnières sont rythmées par les passages alternés de la zone intertropicale de convergence (ZIC). Ce sont les précipitations qui définissent les saisons, qui sont au nombre de quatre : une petite saison des pluies se déroule de mi-novembre à fin janvier ; une petite saison sèche, appelée « le petit été de mars » de février à la mi-mars ; une deuxième saison des pluies, de fin mars à début juillet ; et enfin une saison sèche plus longue, de mi-juillet à mi-novembre (Météo France, 2012).

II-1.3. Le site d'étude : la crique Combat

Ce site d'étude est idéal pour étudier d'une part l'impact du mercure via les retombées atmosphériques sur les sols et d'autre part, l'impact des activités d'orpaillage dans les bas-fonds remaniés. L'avantage supplémentaire est que ce site est connu et a été caractérisé lors de la phase II du programme de recherche CNRS « Mercure en Guyane » dans le cadre de la thèse de Stéphane Guedron (Guedron, 2008) ainsi que celle de Jennifer Harris-Hellal dans notre laboratoire (Harris-Hellal, 2008). Les caractéristiques physico-chimiques, les concentrations en mercure ainsi que l'activité bactérienne des sols de différentes toposéquences ont été étudiées (Guedron *et al.*, 2009; Harris-Hellal *et al.*, 2010).

II-1.3.1. Description du bassin versant

La crique Combat se situe à environ quinze kilomètres du village de Cacao (4°35' N et 52°23' O) (Figure 1). C'est une petite crique forestière qui se jette dans la crique Boulanger en aval. L'ensemble du bassin est recouvert de forêt tropicale humide et reçoit en moyenne 4000 mm d'eau par an. L'ensemble du bassin versant a une étendue d'environ 1 km² et fait partie de la Concession de la Compagnie Minière de Boulanger (CMB). Les bas-fonds et surtout la partie la plus en aval du bassin versant ont été orpaillés pour la dernière fois vers le milieu du XX^{ème} siècle. Une nouvelle exploitation est actuellement en cours par la CMB depuis 2010.



Gold deposit map of French Guiana (Fig. 7 in Cassard et al., 2008)

Figure 1. Le site d'étude - Compagnie Minière Boulanger - près du village de Cacao, en Guyane française.



Figure 2. Photographies du site d'étude avec les sols hydromorphes de bas-fonds (à gauche) et l'oxisol (à droite).

II-1.3.2. Description des sols

La distribution des sols est typique de la région et fortement liée au relief. Les sols ferrallitiques sont les sols dominants sur le haut des pentes du site (Figure 2). Ce sont des sols bien drainés, riches en argiles et en oxydes de fer. Ils sont caractéristiques de la Guyane française. Dans les bas de pentes et dans les bas-fonds, le sol s'amincit sous l'effet de l'érosion, et s'accompagne d'une diminution des teneurs en argiles et en fer. Les sols deviennent hydromorphes et plus sableux en raison de la présence permanente d'une nappe.

Dans les sols ferrallitiques (représentant 85% des sols guyanais), les deux principales phases fixatrices du mercure sont les oxydes de fer et la matière organique (Roulet & Grimaldi, 2001; Wasserman *et al.*, 2003). Les sols hydromorphes présentent quant à eux des conditions hydriques particulières où les sols peuvent se retrouver en conditions d'anoxie, favorisant la méthylation du mercure par les bactéries (Fleming *et al.*, 2006; Kerin *et al.*, 2006).

II-2. Echantillonnages

II-2.1. Campagnes et points de prélèvements

L'échantillonnage du bassin versant a été réalisé en deux temps : une campagne de prospection en juin 2011, puis un échantillonnage complet des vers sur trois campagnes en 2012-2013 : la première fin novembre 2012, la deuxième en février 2013, et la dernière en juin 2013. Nous détaillerons ici le plan d'échantillonnage de la campagne de prospection, dont les résultats sont présentés dans le chapitre III. Les trois autres campagnes sont détaillées dans le projet de recherche (ANR INTERCONNECT).

La campagne de prospection a eu lieu à la fin de la grande saison des pluies, saison la plus propice à l'échantillonnage des vers de terre en Guyane française (Figure 3). Elle a servi à la reconnaissance du terrain, à la confirmation de l'état du site, des sols et des concentrations de mercure présentes suite à une nouvelle exploitation récente du site en 2010. De plus, un échantillonnage prospectif des vers de terre nous a permis d'évaluer pour la première fois leur diversité sur le site, et une banque de données intégrant taxinomie morphologique et moléculaire a été constituée.

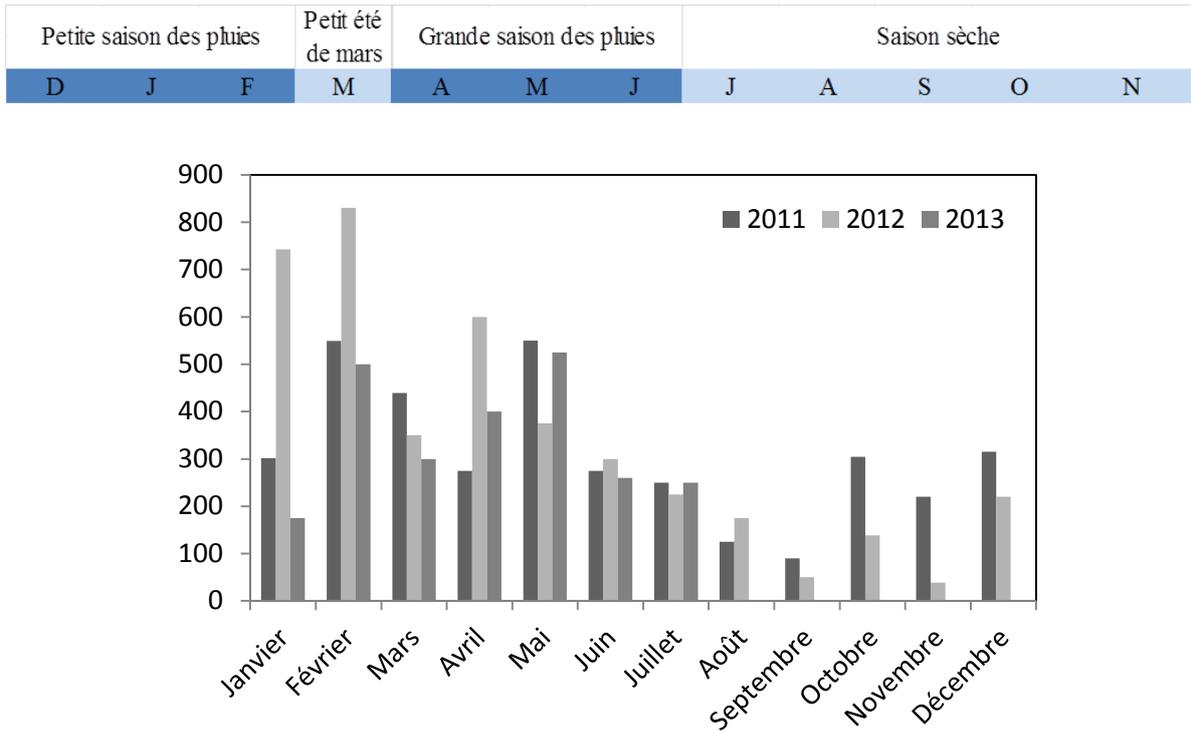


Figure 3. Diagramme de la pluviométrie dans la région de Cacao de 2010 à 2013 (Météo France, 2013).

II-2.2. Echantillonnage des vers de terre

L'échantillonnage des vers de terre a été effectué selon une méthode manuelle modifiée de la méthode « TSBF » (Tropical Soil Biology Fertility) développée par Anderson & Ingram (1993). Des monolithes de 25 x 25 cm ont été extraits sur une profondeur de 0 à 10 cm. En effet, en forêt tropicale, les vers de terre se répartissent verticalement dans les premiers 40 cm du sol, mais sont concentrés dans les 10 premiers centimètres (Fragoso & Lavelle, 1992), comme c'est le cas de *Pontoscolex corethrurus* (Lavelle *et al.*, 1987). La litière de chaque point a été préalablement triée, puis retirée. Le tri manuel de chaque monolithe de sol a été effectué dans les 6 heures après la collecte. Tous les vers de terre ont été conservés dans des piluliers contenant de l'éthanol absolu pour des analyses ADN.

Pour la campagne de prospection réalisée en juin 2011, deux types de sols ont été échantillonnés : un oxisol (oxisol I) et un sol hydromorphe (H). Pour chacun des sols, 10 points TSBF ont été prélevés selon deux transects de 5 TSBF distants entre eux de 5 mètres (Figures 4 et 5). De plus, un échantillonnage qualitatif a été effectué pour chacun des deux sols afin d'augmenter les chances de trouver des espèces différentes : des vers de terre ont été échantillonnés manuellement, autour des points TSBF et dans des microsites favorables à leur présence comme des buttes et près des souches d'arbres, riches en matière organique.

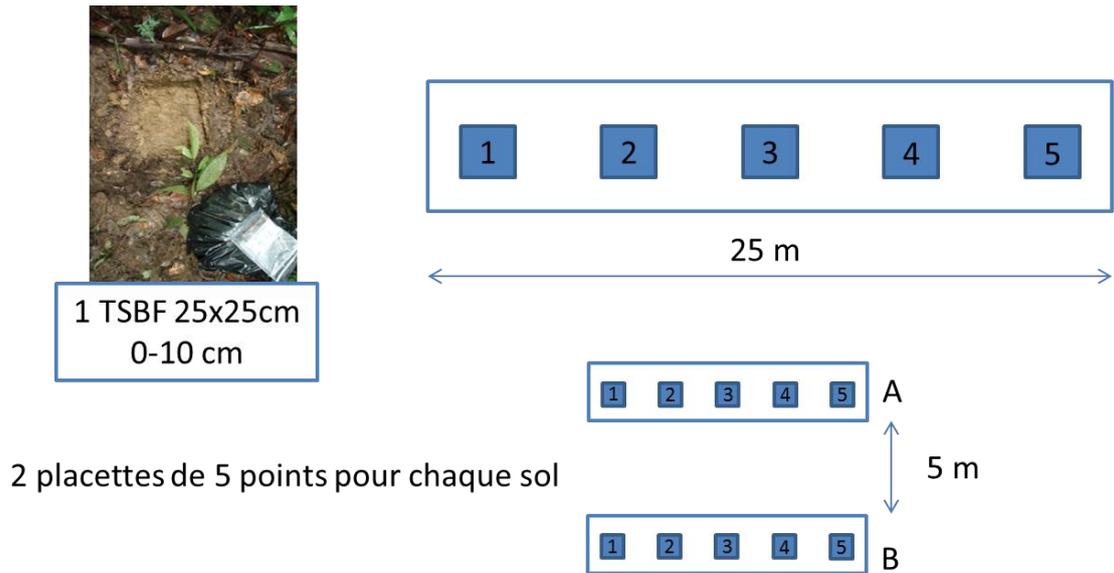
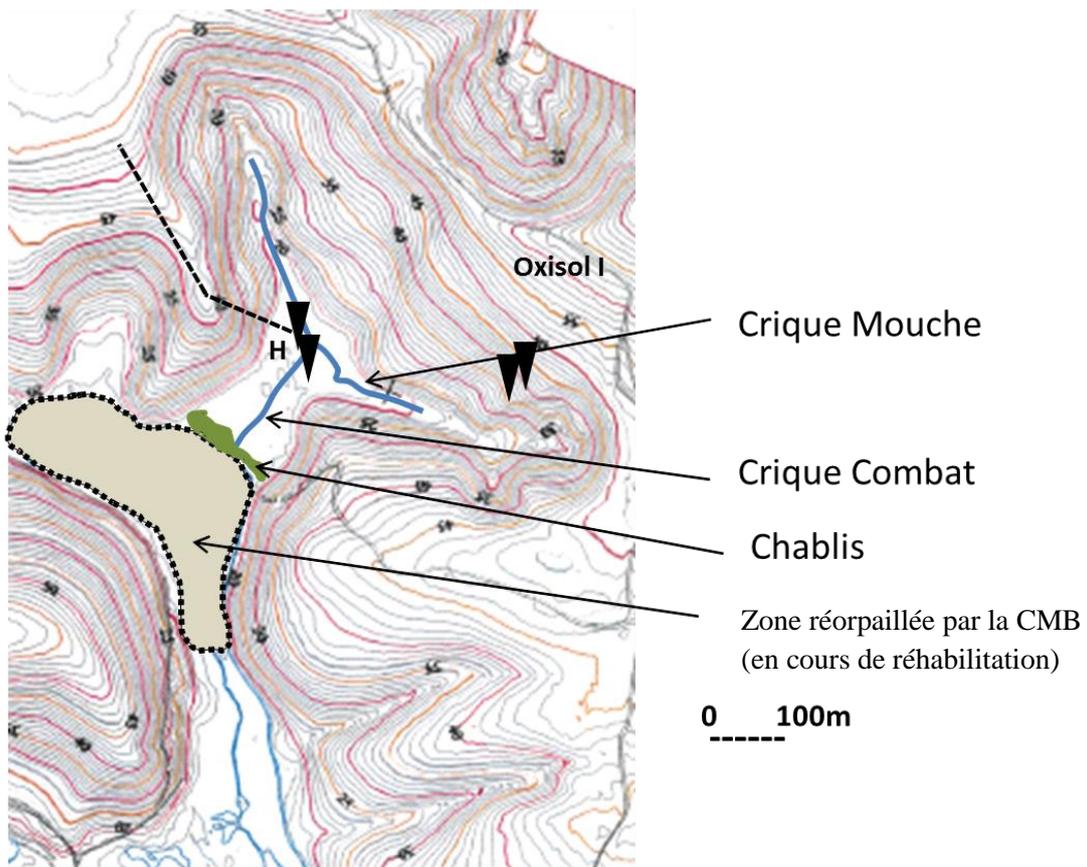


Figure 4. Plan d'échantillonnage des vers de terre selon la méthode TSBF (Anderson & Ingram, 1993).



2 x 10 TSBF échantillonnés en juin 2011: 4 placettes ▼ de 5 TSBF

Figure 5. Carte topographique du site d'étude et points d'échantillonnage. Pour l'oxisol (oxisol I) et le sol hydromorphe (H), les vers de terre ont été échantillonnés selon 2 placettes de 5 points TSBF chacune, soit 10 points TSBF pour chaque type de sol.

II-3. Analyses pour l'identification des vers de terre

Les vers de terre échantillonnés ont été analysés selon plusieurs approches. D'abord, les individus ont tous été analysés par une approche moléculaire, basée sur le séquençage d'un gène mitochondrial, qui a permis de les séparer en Unités Taxinomiques Opérationnelles Moléculaires (MOTUs). Ensuite, des individus appartenant aux différentes MOTUs ont été analysés par une approche taxinomique classique, basée sur les caractères morphologiques des vers.

Dans notre étude, l'approche moléculaire s'est révélée être indispensable car les vers en milieu tropical sont plus difficiles à identifier qu'en milieu tempéré. De plus, les vers collectés sur le terrain étaient majoritairement juvéniles, ce qui rend leur identification morphologique délicate.

II.3.1. Analyses moléculaires

II.3.1.1. Obtention des séquences ADN

Tous les vers de terre échantillonnés sur le site d'étude ont été analysés par l'approche de « DNA barcoding ». Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec le Centre Canadien pour le Barcode ADN (CCDB) à l'Université de Guelph, pour le projet BOLD System. Seule la première étape de préparation des vers a été effectuée au laboratoire de l'UPEC. L'extraction d'ADN ainsi que le séquençage ont été effectués au Canada.

Cependant, pour les vers de l'espèce *Pontoscolex corethrurus* collectés et conservés vivants pour les études au laboratoire, une vérification systématique de l'espèce a été effectuée au préalable à l'UPEC par l'analyse du même gène que le barcode : le gène COI. La méthode utilisée est décrite ci-après.

II.3.1.1.a. Préparation des vers

Chaque ver de terre a été préalablement individualisé, numéroté, pesé et photographié. La conservation des individus a été faite dans de l'alcool absolu et à 4°C pour limiter l'évaporation de l'éthanol.

II.3.1.1.b. Extraction de l'ADN total des vers de terre

Les extractions d'ADN génomique ont été réalisées individuellement à partir des tissus de vers de terre, à l'aide du kit Qiagen. Une attention particulière a été portée à l'élimination de toute trace de contenu digestif pouvant perturber les analyses moléculaires.

Les tissus des vers ont été prélevés délicatement sur la partie latérale de chaque individu préalablement nettoyé. Les parties antérieures au clitellum et la partie caudale présentant des caractères utiles à leur identification, n'ont pas été coupées. Pour chaque ver, les tissus ont été nettoyés à l'éthanol absolu puis transférés dans des tubes Eppendorf 1,5 ml propres. Ensuite, 180 µl de tampon ATL et 20 µl de protéinase K ont été ajoutés afin de dégrader les protéines. Les échantillons ont été mis à incuber à 56°C jusqu'à la lyse complète pendant une nuit, puis vortexés pendant 15 secondes afin de les homogénéiser. Puis 200 µl de tampon AL ont été ajoutés à l'échantillon et mélangés en vortexant. Ensuite, 200 µl d'éthanol absolu ont été ajoutés, et les tubes à nouveau vortexés afin de précipiter l'ADN. Le mélange (précipité blanc inclus) a été pipeté dans la colonne DNeasy Mini spin placée sur un Eppendorf de 2ml fourni. Les échantillons ont ensuite été centrifugés pendant 1 minute à 6000g (8000 RPM). L'ADN piégé dans la colonne DNeasy Mini spin a ensuite été purifié à deux reprises en ajoutant premièrement 500 µl de tampon AW1 et en centrifugeant 1 minute à 6000g, et deuxièmement en ajoutant 500 µl de tampon AW2 et en centrifugeant 3 minutes à 20000g afin de sécher la membrane. Enfin, la colonne est placée sur un nouveau tube Eppendorf 2 ml et 100 µl de tampon AE ont été ajoutés directement sur la colonne. Les échantillons sont laissés à température ambiante pendant 1 minute puis centrifugés 1 minute à 6000 g pour éluer l'ADN.

II.3.1.1.c. Amplification des séquences d'intérêt par PCR

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été utilisée pour amplifier les séquences du gène mitochondrial cytochrome oxydase I (COI) de vers de terre. Le couple d'amorces utilisé est LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') et HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Hebert *et al.*, 2003). Les réactions ont été réalisées dans un volume de 40 µl, composés de 23,2 µl d'eau MilliQ stérile, 8 µl de Colorless GoTaq® Flexi Buffer 5X, 4 µl de MgCl₂, 2 µl de dNTPs, 0,2 µl de GoTaq® Flexi Taq DNA polymérase, 0,8 µl de chaque amorce, et 1 µl environ d'ADN. Les conditions d'amplification sont les suivantes : une dénaturation initiale à 94°C pendant 3 min suivie de 40 cycles de (1) dénaturation à 94°C pendant 30 s, (2) hybridation à 50°C pendant 45 s, (3) élongation à 72°C pendant 1 min, et une élongation finale à 72°C pendant 10 min.

II.3.1.1.d. Séquençage

Pour les vers *P. corethrurus* identifiés au laboratoire, 30 µl de chacun des produits PCR ayant amplifié correctement (30 ng/µl) ont été placés dans un tube Eppendorf de 1.5 ml pour

envoi chez Beckman Coulter Genomics (UK) pour le séquençage du gène COI. Les séquences nous ont ensuite été directement envoyées par email.

II.3.1.1.e. Obtention des séquences via BOLD

BOLD Systems est une plateforme web qui fournit une base de données moléculaires et morphologiques en ligne. BOLD aide à l'acquisition, au stockage, à l'analyse et à la publication des enregistrements de Barcodes ADN. Les séquences des vers envoyés au CCDB ont été directement téléchargées à partir du site internet de BOLD Systems selon la procédure suivante :

- Connexion au site : www.boldsystems.org
- Sélection de l'outil « Workbench » et connexion sécurisée
- Connexion au projet « Earthworms of Cacao » (EWCA)
- Téléchargement de nos séquences de plus de 50 paires de bases

Sur la page dédiée au projet EWCA, 665 spécimens sont répertoriés, parmi lesquels 552 ont été séquencés avec succès pour le gène COI à ce jour (dont une plaque en cours de séquençage). Il s'agit de la totalité des échantillons collectés lors des quatre campagnes de terrain qui ont eu lieu dans le cadre de ma thèse.

Lors de la campagne de prospection, sur les 190 individus séquencés, **180 séquences ont été sélectionnées pour les analyses**. Les séquences ADN sont manquantes pour 10 individus.

II.3.1.2. Alignement des séquences et calcul des matrices

II.3.1.2.a. Alignement des séquences

Les électrophorégrammes des séquences du fragment du gène COI obtenus ont été vérifiés un par un grâce au logiciel BioEdit. Ce logiciel est un éditeur d'alignement de séquences multiples, qui peuvent être modifiées manuellement (Hall, 2007). Les séquences sont visualisées sous forme de nucléotides. Il faut vérifier si le bon code génétique est sélectionné par rapport au taxon que l'on étudie ; ici il s'agit du code génétique mitochondrial des invertébrés. L'absence de codons stop dans les séquences a également été vérifiée.

L'alignement des séquences a été effectué à l'aide de l'algorithme *clustalW* (Thompson *et al.*, 1994). De plus, les séquences au format Fasta ont été soumises à un BLAST sur GenBank (Benson *et al.*, 2013) et avec l'outil d'identification *via* BOLD system, afin de vérifier qu'il n'y ait pas d'erreurs dans les séquences ADN.

II.3.1.2.b. Obtention des matrices de distances

Une première comparaison entre les 180 séquences a été réalisée deux-à-deux (Pairwise Distance) selon le modèle Kimura à 2 paramètres (K2P) avec le logiciel MEGA 5.05 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura *et al.*, 2011). Une matrice conséquente est obtenue, dans laquelle sont indiquées les distances entre les spécimens deux-à-deux, en pourcentage. La matrice ainsi calculée est utilisée pour la délimitation des espèces putatives selon différentes méthodes : la méthode du seuil (Chang & James, 2011), la méthode ABGD (Puillandre *et al.*, 2012) et la méthode GMYC (Monaghan *et al.*, 2009), détaillées dans les paragraphes suivants.

II.3.1.3. Analyses: méthodes de délimitation exploratoires avec un seul gène

II.3.1.3.a. Affiliation des séquences : BINs

L’outil BOLD Systems permet de savoir si les échantillons prélevés et séquencés ont déjà été séquencés, voire identifiés, dans une précédente campagne de collecte de vers de terre, et ce par comparaison des séquences du gène COI. Pour cela, la procédure suivante a été appliquée :

- Sélection de l’outil « Sequence analysis »
- Sélection de l’outil « BIN discordance »

Cette procédure permet d’afficher toutes les séquences de la base de données BOLD Systems regroupées sous le même « BIN » (Barcode Index Number).

II.3.1.3.b. Méthode ABGD

La matrice de distances K2P obtenue précédemment a été utilisée comme entrée du logiciel, avec les paramètres par défaut ($X= 1.5$ et les résultats sont donnés avec P compris entre 0.001 et 0.1). Les matrices obtenues avec les méthodes TN (Tamura-Nei) et p (distance simple) ont également été utilisées avec les mêmes paramètres.

Les résultats ont été récupérés sous forme de graphiques indiquant les différentes partitions et d’arbres BIONJ (Neighbor-Joining) parenthésés montrant les différents MOTUs. L’arbre retenu a été ouvert sous MEGA 5.05 et enraciné avec la méthode du point moyen (enracinement au point équidistant des extrémités de l’arbre). L’arbre ainsi obtenu est enraciné avec MidPoint, car nous n’avons pas de groupe externe pour enraciner l’arbre.

II.3.1.3.c. Méthode GMYC

Pour la méthode GMYC, un fichier d'haplotypes a d'abord été généré avec le logiciel DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009) en tenant compte des données manquantes (N, ?). Ensuite, la procédure se réalise en trois étapes (voir procédure détaillée en Annexe 1) et nécessite de manipuler plusieurs logiciels. C'est une méthode d'analyse longue.

Un modèle de substitution nucléotidique adapté a été choisi avec les logiciels MrModeltest, MrMTGUI et PAUP en utilisant le critère AIC (Akaike information criterion). Le modèle sélectionné comme le « meilleur modèle » est le GTR+I+G (modèle de substitution "GTR" et le modèle d'hétérogénéité des sites "Gamma + Invariant Sites"). Un arbre ultramétrique a été obtenu avec le logiciel BEAST, version 1.4.7. (Drummond & Rambaut, 2007). La longueur des branches a été estimée par « relaxed lognormal clock » et par coalescence. Trois différents runs Monte Carlo Markov Chains (MCMC) ont été lancés pour 10×10^6 générations.

Une procédure GMYC de délimitation a ensuite été effectuée à partir de l'arbre ultramétrique généré. Le package SPLITS sous le logiciel R a été utilisé (<http://r-forge.r-project.org/projects/splits/>) et les analyses ont été faites avec des seuils simples et multiples. Seuls les résultats obtenus avec le seuil simple ont été présentés dans cette thèse.

II.3.1.3.d. Distances K2P consensus selon Chang & James (2011)

La méthode du seuil selon Chang & James, 2011 a été appliquée une fois les MOTUs délimités et mis en évidence sur l'arbre BIONJ. Ainsi, une matrice de distances deux-à-deux a été recalculée, toujours selon le modèle Kimura à 2 paramètres (K2P) mais cette fois-ci entre les groupes d'espèces délimités soit par la méthode ABGD soit par la méthode GMYC. La méthode du seuil a donc été appliquée sur ces matrices plutôt que sur le jeu de données total pour un résultat plus synthétique.

En fonction du seuil, on peut avoir une idée sur la délimitation d'espèces des spécimens testés selon les critères fixés par Chang & James (2011), à savoir :

- $d < 9\%$: spécimens de la même espèce
- $9\% < d < 15\%$: ambiguïté sur le statut
- $d > 15\%$: spécimens d'espèces différentes.

II.3.2. Analyses morphologiques

A posteriori des analyses moléculaires et du travail de délimitation d'espèces, des vers de terre de chaque MOTUs ont été identifiés morphologiquement. Au total, 29 individus ont été observés. Certains organismes juvéniles et/ou trop abimés n'ont pu être identifiés.

Pour identifier les différentes espèces de vers de terre, les caractères morphologiques utilisés par les taxonomistes sont multiples. Ce travail requiert des compétences spécifiques : il a été réalisé en collaboration avec le taxonomiste Samuel W. James (University of Iowa, Department of Biology, USA) et initié lors du « Earthworm taxonomy workshop », qui a eu lieu dans le cadre de l'International Oligochaete Taxonomy Meeting (IOTM 6th) les 28 et 29 avril 2013 au Portugal.

D'abord, les vers ont été différenciés selon leurs caractères externes : la pigmentation, la place et la taille du clitellum sur les segments du corps, ainsi que le nombre de soies et leur arrangement sur les différents segments. Ensuite, les caractères internes ont été observés après dissection des vers. Les différents organes sont détaillés et leur place dans les segments notés. Tous les caractères permettant d'identifier les différents vers au niveau de la famille, du genre voire de l'espèce ont été observés (Figure 6).

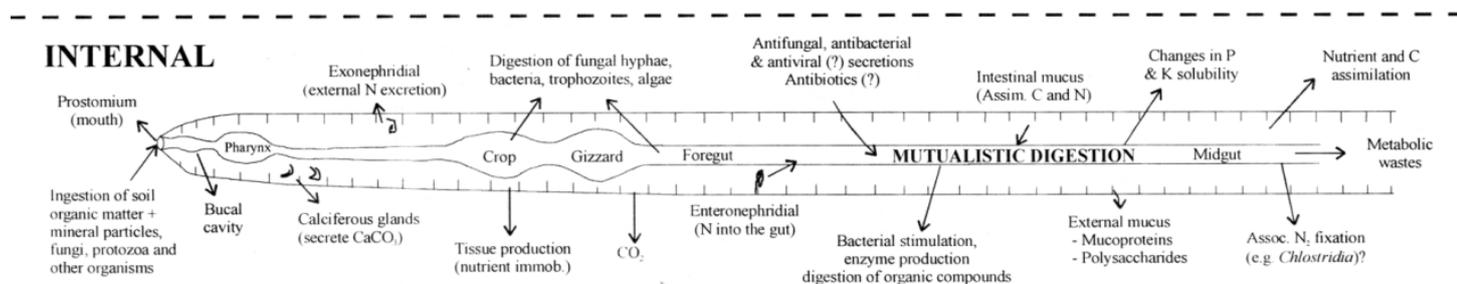


Figure 6. Schéma des caractères internes d'un ver de terre et de leurs fonctions (Brown *et al.*, 2000).

Ce travail de systématique nous a permis de donner un nom de genre pour chaque MOTU de la campagne de prospection des vers. Ici, les analyses moléculaires réalisées en amont nous ont permis de sélectionner les vers selon leur assignation à un MOTU et ainsi limiter le travail d'identification morphologique (i.e. nombre de vers à identifier morphologiquement). Ce travail a donc été effectué en deux étapes : 1) délimitation des espèces basée sur un seul gène, et 2) identification morphologique *a posteriori*.

II-4. Dispositifs expérimentaux pour l'étude des interactions « sol - vers de terre »

L'étude en microcosmes a pour but de mettre en évidence des mécanismes difficilement observables *in situ*, mais ne prétend pas reproduire à l'identique les conditions rencontrées sur le terrain. Les expérimentations menées en conditions contrôlées sont indispensables pour la compréhension des mécanismes mis en jeu dans les écosystèmes complexes, ici terrestres. L'interaction entre le mercure et les vers de terre a été étudiée au laboratoire en microcosmes avec comme objectifs d'évaluer (1) l'impact du mercure sur un ver tropical et (2) l'impact de l'activité des vers sur la mobilité du mercure dans un sol tropical et un sol tempéré. La mise en place de ces microcosmes et les analyses effectuées sont détaillées ci-après.

II-4.1. Etude de l'impact du mercure sur une espèce tropicale

Un test écotoxicologique a été mis en place afin d'étudier l'impact de différentes doses de mercure sur une espèce tropicale retrouvée sur notre site d'étude. Les espèces *Eisenia fetida* ou *Eisenia andrei* sont celles recommandées par la norme européenne (OCDE, 2004). Pourtant en milieu tropical et en Guyane française en particulier, *Eisenia* n'est pas une espèce représentative sur le terrain.

II-4.1.1. Choix et préparation du sol et des vers de terre

Le sol et les vers de terre choisis pour cette étude ont été échantillonnés sur le site d'étude. Le sol est un oxisol, échantillonné en haut de pente sur la toposéquence I à une profondeur de 0 à 20 cm.

Cette première étude porte sur l'espèce *Pontoscolex corethrurus*. C'est un ver tropical endogé, originaire du Plateau des Guyanes. C'est le ver le plus étudié de la région pour son caractère invasif dans les tropiques. Dans notre étude, il a été choisi pour sa présence et son endémisme en Guyane française et sur notre site d'étude. De plus, ce ver est relativement facile à échantillonner et à reconnaître (Buch *et al.*, 2011). La résistance de cette espèce à différentes doses de mercure a été évaluée en conditions contrôlées. En effet, aucune étude à ce jour ne s'est intéressée à l'impact du mercure sur cette espèce.

Suite au rapatriement des vers, un élevage a été mis en place au laboratoire pendant plusieurs mois dans des conditions contrôlées ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), afin que le poids et le stade de développement des vers soit homogène avant de commencer les expérimentations. Les vers de terre ont été maintenus dans leur sol d'origine (oxisol) et ont été nourris tous les mois avec du fumier de cheval.

II-4.1.2. Mise en place des microcosmes et conditions d'incubation

Les microcosmes mis en place contiennent 500 g d'oxisol (poids sec). Dans les pots plastiques (PP) utilisés, le sol a une hauteur de 5 cm avec un diamètre inférieur égal à 10 cm, et le diamètre supérieur égal à 15 cm. Une solution de chlorure de mercure (HgCl_2) a été préparée afin de doper les sols respectivement à 5, 10, 20, 50 et 100 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ sol. Des microcosmes témoins non dopés ont également été préparés : l'oxisol contient naturellement 0,336 $\mu\text{g Hg}$ par gramme de sol. Les sols ont été hydratés avec la solution de HgCl_2 à 70% de leur capacité de rétention d'eau (mesurée à 51% d'eau par rapport au poids sec) soit 240 g de solution pour 500 g de sol sec. Les vers de terre ont été introduits après 1 semaine de stabilisation des sols afin de laisser le mercure s'équilibrer dans les sols. Trois vers adultes ou sub-adultes *P. corethrurus* ont été introduits par microcosme (environ 1,2 g de biomasse). Les microcosmes ont été maintenus dans le noir dans une salle climatisée à $24 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant une durée totale de 56 jours (ISO, 1998). L'humidité a été ajustée par pesée une fois par semaine.

II-4.1.3. Paramètres suivis lors de l'étude écotoxicologique

La mortalité (%), la biomasse fraîche (g) (sans vider le tube digestif) et la reproduction des vers (nombre de cocons) ont été suivis après 7, 14, 21, 28 et 56 jours d'incubation dans les sols témoins et les sols contaminés avec différentes concentrations de mercure afin d'évaluer l'impact du mercure sur *Pontoscolex corethrurus*. Au bout de 56 jours, la bioaccumulation du mercure dans les vers a également été mesurée afin de connaître la capacité d'accumulation de cette espèce. Les résultats de cette étude sont présentés dans le chapitre IV.

II-4.2. Etude du rôle des vers de terre dans la mobilité du mercure

La mobilité du mercure a été étudiée lors d'expérimentations en microcosmes en conditions contrôlées (1) dans un sol tropical en présence d'une espèce de vers tropicale et (2) dans un sol tempéré en présence d'une espèce de vers tempéré. Les deux types de microcosmes ont été soumis dans le temps à un ensemble d'analyses : (i) analyse physico-chimique des sols, (ii) quantification du mercure dans les différentes fractions du sol et des turricules (extractions séquentielles), et (iii) bioaccumulation du mercure. Les résultats de ces deux études sont présentés dans les parties V-1 et V-3 du chapitre V.

II-4.2.1. Rôle de *Pontoscolex corethrurus* dans un sol tropical

II-4.2.1.a. Choix et préparation du sol et des vers de terre

Le sol et les vers de terre choisis pour cette étude sont les mêmes que pour le test écotoxicologique présenté précédemment : l'oxisol I échantillonné sur les 20 premiers centimètres du sol sur le site d'étude et l'espèce de ver *Pontoscolex corethrurus*. La partie superficielle du sol est celle qui accumule le plus de mercure et également celle où se trouvent les vers de terre sur le terrain (Roulet & Grimaldi, 2001; Guedron *et al.*, 2009).

II-4.2.1.b. Mise en place des microcosmes et conditions d'incubation

Deux conditions expérimentales ont été mises en place au laboratoire : (a) des conditions proches de celles rencontrées en conditions naturelles, et (b) en présence d'une forte concentration pouvant être rencontrée sur les sites orpaillés ($20 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ de sol), en présence ou non de vers de terre. Cette concentration de $20 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ de sol a été fixée suite aux résultats du test écotoxicologique car *P. corethrurus* n'est pas affecté à cette concentration de mercure que l'on peut cependant retrouver sur des sites d'orpaillage (Duraó *et al.*, 2009; Santos-Francés *et al.*, 2011).

Pour chaque traitement, 5 répliques et 4 dates de prélèvement ont été mis en place : 0, 30, 60 et 90 jours pour chaque traitement (4 traitements x 5 répliques x 4 dates = 80 microcosmes). Les microcosmes contiennent 500 g d'oxisol (poids sec). Dans les pots plastiques (PP) utilisés, le sol a une hauteur de 5 cm avec un diamètre inférieur égal à 10 cm, et le diamètre supérieur égal à 15 cm. Les sols ont été hydratés à 70% de leur capacité de rétention d'eau (mesurée à 51% d'eau par rapport au poids sec) soit avec 240 ml d'eau soit avec 240 ml de solution HgCl_2 . Les sols ont été homogénéisés, puis laissés s'équilibrer pendant une semaine avant l'ajout des vers de terre. Les microcosmes ont été maintenus dans le noir dans une salle climatisée à $24 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 90 jours au total. L'humidité des sols a été ajustée par pesée une fois par semaine.

II-4.2.1.c. Paramètres suivis lors de l'étude en milieu tropical

Différents paramètres ont été suivis au cours du temps: (i) paramètres physico-chimique du sol (pH et COD), (ii) concentrations du mercure dans les sols et dans les turricules (dosage du mercure total, soluble, et extractions séquentielles), (iii) bioaccumulation du mercure dans les vers, et (iv) diversité fonctionnelle et génétique des communautés bactériennes du sol (plaques ECOLOG® et DGGE).

Dans les microcosmes en présence de vers, ces analyses ont été effectuées au bout de 0, 30, 60 et 90 jours d'incubation, sur le sol non ingéré et sur les turricules des vers afin de mettre en évidence le rôle des vers dans la mobilité du mercure d'une part et sur la résilience bactérienne d'autre part.

II-4.2.2. Rôle d'*Eisenia andrei* dans un sol tempéré

Cette seconde étude a été mise en place au laboratoire avec le même objectif d'évaluer l'effet des vers sur la mobilité du mercure dans les sols. Cependant, nous avons voulu évaluer l'impact du ver *Eisenia andrei*, espèce modèle fréquemment utilisée dans les études écotoxicologiques (OCDE, 2004). Dans cette étude, un sol tempéré a été utilisé afin de travailler avec un sol où cette espèce peut se maintenir, ce qui n'est pas le cas de l'oxisol de notre site d'étude (voir Annexe 7).

II-4.2.2.a. Choix et préparation du sol et des vers de terre

Le sol utilisé pour constituer les microcosmes de cette étude a été échantillonné dans les 20 premiers centimètres d'un jardin biologique situé dans le département de Seine-et-Marne (77). L'espèce de ver utilisée est *Eisenia andrei*, espèce appartenant au complexe d'espèces *Eisenia*. Cette espèce est génétiquement uniforme (Cortet *et al.*, 1999), et constitue l'espèce de vers de référence recommandée pour les essais écotoxicologiques au laboratoire (OCDE, 2004), notamment pour son cycle de vie rapide et la facilité d'élevage. Des spécimens adultes ont été fournis par le Pr. Vandebulcke de l'Université de Lille 1. Ils ont une biomasse moyenne de 0,40 g et mesurent 3 à 4,5 cm. Ils ont été maintenus dans une chambre d'élevage à 20°C dans le noir pour une acclimatation jusqu'au lancement de l'expérimentation.

II-4.2.2.b. Mise en place des microcosmes et conditions d'incubation

L'expérimentation a été mise en place avec quatre traitements : sol seul (S), sol + vers (SV), sol dopé à 20 µg Hg g⁻¹ de sol (SM) et sol dopé à 20 µg Hg g⁻¹ de sol + vers (SMV), avec 3 répliques et 7 dates de prélèvement : 0, 3, 7, 14, 30, 60 et 90 jours pour chaque traitement. Soit 4 traitements x 3 répliques x 7 dates = 84 microcosmes (Figure 7).

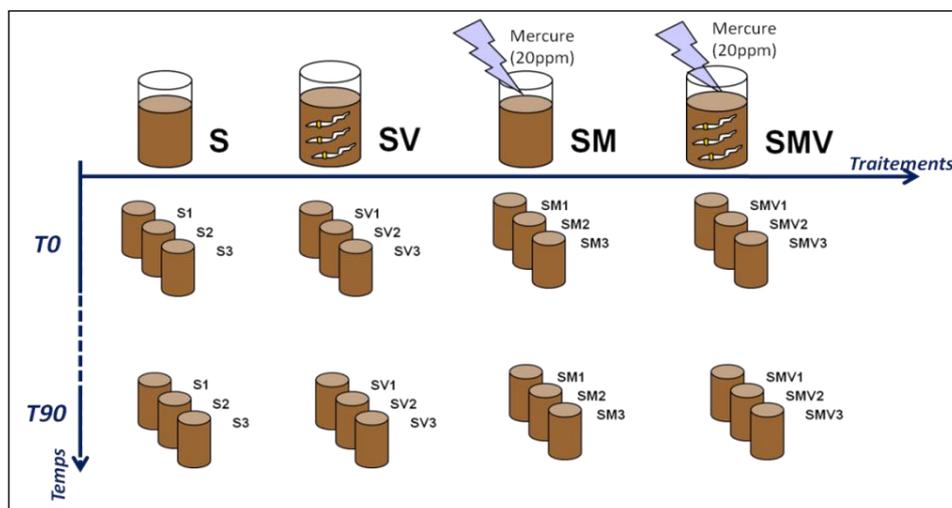


Figure 7. Schéma de la mise en place des microcosmes en conditions de climat tempéré.

Ces microcosmes ont été réalisés dans des pots en polypropylène (PP) de 300 ml dans lesquels ont été ajoutés 250 g de sol sec ramenés à 54% de leur capacité au champ. Pour les microcosmes contaminés au mercure, une solution de HgCl_2 a été ajoutée de manière à obtenir une concentration de $20 \mu\text{g g}^{-1}$ de sol. Les sols ont été homogénéisés, puis laissés s'équilibrer pendant deux jours. Ensuite, 6 vers de terre ont été inoculés (1,8-2 g de vers de terre par microcosme) dans la moitié des microcosmes. Les microcosmes ont été conservés à l'obscurité à 20°C pendant les 90 jours de l'expérimentation. L'humidité des sols a été ajustée par pesées une fois par semaine.

II-4.2.2.c. Paramètres suivis lors de l'étude en milieu tempéré

Différents paramètres ont été suivis au cours de cette étude: (i) concentrations de mercure dans les sols dopés ou non et en présence ou non de vers (dosage du mercure total, soluble, et extractions séquentielles), (ii) bioaccumulation du mercure dans les vers et (iii) pH du sol. Dans tous les microcosmes, ces analyses ont été effectuées dans le sol après homogénéisation, en présence ou non de vers de terre.

II-5. Analyses physico-chimiques des sols

II-5.1. Préparation des échantillons

Les échantillons de sol prélevés sur le terrain ont été séchés à l'air (25°C) puis homogénéisés et tamisés à 2 mm. C'est la fraction inférieure à 2 mm qui a été utilisée pour l'ensemble des analyses décrites. Les échantillons ainsi préparés ont été conservés en chambre froide à 4°C jusqu'à leur utilisation.

II-5.2. Analyses pédologiques

L'ensemble des analyses pédologiques ont été réalisées au laboratoire d'analyse des sols de l'IRD de Cayenne (Guyane française).

II-5.2.1. Granulométrie

La granulométrie a été déterminée sur la fraction inférieure à 2 mm et cinq classes de particules ont été distinguées selon la norme NF X 31-107 : argiles (< 2 µm), limons fins (2 à 20 µm), limons grossiers (20 à 50 µm), sables fins (0,050 à 0,200 mm) et sables grossiers (0,200 à 2 mm). Tamisages et prélèvements à la pipette Robinson ont été réalisés après destruction de la matière organique par l'eau oxygénée (H₂O₂) sur une prise d'essai d'environ 10 g. La dispersion finale a été réalisée par un court passage aux ultrasons après addition de dispersant [(NaPO₃)₆ + Na₂CO₃] et après avoir au préalable séparé les sables grossiers (> 0,200 mm) par tamisage.

II-5.2.2. Carbone et azote totaux

II-5.2.2.a. Carbone total

Le carbone organique total a été déterminé selon la norme NF ISO 10694, en g kg⁻¹ de sol. La méthode repose sur la transformation en dioxyde (CO₂) de la totalité du carbone organique présent dans l'échantillon. La réaction a été effectuée en portant l'échantillon analysé à environ 1000°C en présence d'oxygène. Après séparation chromatographique, la quantité de gaz carbonique a été quantifiée au moyen d'un catharomètre (conductibilité thermique).

II-5.2.2.b. Azote total

L'azote total du sol a été déterminé selon la norme NF ISO 13878, en g kg⁻¹ sol. La teneur en azote (organique et minéral) de l'échantillon a été déterminée en le chauffant à environ 1000°C en présence d'oxygène. Les produits de combustion ou décomposition ont été réduits en azote moléculaire (N₂). Les quantités de N₂ formées ont été dosées, après

séparation chromatographique, au moyen d'un catharomètre. La prise d'essai a été d'environ 50 mg d'échantillon broyé à 250 µm.

II-5.2.3. Carbone Organique Dissous

Pour chaque échantillon, le carbone organique dissous a été dosé selon le protocole suivant : 1 g de sol a été pesé et 10 ml d'eau MilliQ ont été ajoutés dans un tube Falcon de 15 ml. Pour chaque série d'analyse un blanc de mesure a été réalisé avec de l'eau MilliQ dans les mêmes conditions de préparation que les échantillons.

Les échantillons ont été agités pendant 24 heures à 40 RPM par agitation tournante. Ensuite, les tubes ont été centrifugés à 2486 g pendant 50 minutes afin de récupérer le surnageant. Le surnageant a été filtré sous vide à l'aide d'un filtre en verre de 0,7 µm pour éviter toute interaction avec le carbone et aucun relargage au niveau du filtre. Aux 10 ml de surnageant filtré, 28 ml d'eau MilliQ ont été ajoutés. De plus, 2 ml d'acide ortho-phosphorique (HPO₄, 85% RECTAPUR) ont été ajoutés afin de stopper toute activité biologique. Les échantillons ont été conservés en chambre froide à 4°C jusqu'à analyse. Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un TOC-mètre (Shimadzu). Préalablement, tout le matériel utilisé a été rincé avec de l'eau MilliQ puis de l'acide nitrique (HNO₃ 5%) et passés au four pendant 2 heures à 500°C afin d'éliminer toute trace de carbone organique.

II-5.2.4. pH

La mesure du pH de chaque échantillon de sol a été mesuré dans le surnageant à l'aide d'un pH-mètre (MetrOhm 744). Les échantillons de sol séchés ont été mis en suspension dans l'eau distillée dans un rapport 1/2,5 (volume/volume), agités pendant 30 minutes à 40 RPM puis mis au repos pendant 1 heure. L'électrode est calibrée avant chaque série d'analyse à l'aide de solutions tampons à pH 7 et pH 4 (pH cal, Schott Geräte).

II-5.2.5. Fer et aluminium total

Le fer et aluminium totaux des sols ont été dosés après mise en solution totale du sol par les acides fluorhydrique et perchlorique (HF-HClO₄). La prise d'essai a été de 0,250 g d'échantillon broyé à 250 µm. La procédure est décrite dans la norme NF X 31-147. Les mesures ont été effectuées en émission plasma en mode photonique (ICP-AES).

II-5.2.6. Humidité relative

Le sol de chaque point TSBF échantillonné a été prélevé en même temps que les vers de terre à chaque campagne d'échantillonnage. Le sol a été conservé au frais et rapatrié au laboratoire de l'UPEC. Pour déterminer l'humidité, environ 10 g de sol ont été pesés dans une

boite de Pétri en verre afin de déterminer le poids initial humide. Les sols ont ensuite été mis à sécher à l'étuve à 105°C pendant 48 heures, jusqu'à séchage complet de l'échantillon. L'humidité a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{Humidité (\%)} = 100 \times \frac{(\text{poids humide} - \text{poids sec})}{\text{poids sec}}$$

II-5.3. Dosages du mercure

Dans un premier temps, les concentrations totales du mercure ont été déterminées. Ensuite, une extraction à l'eau a été utilisée pour évaluer la mobilité du mercure proche des conditions naturelles (e.g. pluie). Enfin, un protocole d'extraction séquentielle nous a permis de mesurer la répartition du mercure dans les différentes fractions du sol (Silveira *et al.*, 2006). Toutes les concentrations en mercure ont été mesurées par spectrométrie d'absorption atomique (AAS).

II-5.3.1. Principe

Le mercure a été mesuré par absorption atomique à la longueur d'onde de 254 nm. L'analyse consiste en une minéralisation à sec où l'échantillon est porté à 550 °C et tous les produits de la décomposition sont transportés via un flux d'oxygène dans un tube catalytique où le mercure est transformé en Hg⁰ élémentaire qui va s'adsorber sur un piège en or. Le mercure ainsi piégé est réémis par chauffage du piège à 450°C et est quantifié par spectrométrie à absorption atomique. Des standards ont été utilisés comme contrôle : CMR 144 (3.14 ± 0.05 µg Hg g⁻¹ sol) et BCR 277 (0.128 ± 0.017 µg Hg g⁻¹).

II-5.3.2. Dosage du mercure total

II-5.3.2.a. Dosage du mercure total dans le sol

Les quantités de mercure total ont été analysées par AMA 254 (Automatic Mercury Analyser). Basé sur le principe de spectrométrie d'absorption atomique (AAS), cet appareil est spécialement conçu pour doser des concentrations faibles en mercure sur des échantillons solides ou liquides (limite de détection : 0,01 ng g⁻¹). Contrairement à d'autres méthodes de dosage, l'AMA ne nécessite pas de prétraitement des échantillons. Les échantillons solides ont été broyés manuellement à une taille inférieure à 100 µm, dans un mortier en agathe et homogénéisés. Environ 100 mg de solide ont été placés dans une nacelle en nickel et introduits dans l'appareil.

II-5.3.2.b. Dosage du mercure total dans les vers de terre

Différents protocoles existent afin de doser les métaux dans les tissus des vers de terre. La plupart proposent une minéralisation complète des vers dans divers acides purs à chaud (Burton *et al.*, 2006; Hobbelen *et al.*, 2006; Udovic & Lestan, 2007, 2010; Ernst *et al.*, 2008). Le mercure étant un métal qui se volatilise à des températures plus basses que les autres ETM, un protocole de dosage sur ver congelé puis lyophilisé a été choisi (Li *et al.*, 2010; Rieder *et al.*, 2013).

Tous les vers de terre analysés ont préalablement été nettoyés avec de l'eau, séchés avec du papier et pesés. Ils ont ensuite été mis sur du papier humide, dans des boîtes de Pétris pendant 72 heures. Le papier a été changé tous les jours pour éviter la coprophagie. L'objectif est de vider leur tube digestif du sol ingéré, afin de ne doser que le mercure accumulé dans leurs tissus. Ensuite, les vers ont été congelés à -20°C individuellement dans des tubes Eppendorf 2 ml et ensuite lyophilisés à l'aide d'un lyophilisateur pendant 48 heures. Avant analyse, les vers ont été pesés entiers individuellement puis ont été broyés manuellement dans un mortier en agathe jusqu'à obtenir une poudre homogène. Enfin, environ 100 mg ont été pesés dans une nacelle en nickel et analysés directement par AMA 254, comme un échantillon solide.

II-5.3.3. Extractions du mercure dans les sols

II-5.3.3.a. Mercure extrait dans l'eau

L'extraction à l'eau est l'extraction la plus simple, et est sensée donner une bonne évaluation des risques de transfert des ETM dans les sols pollués (Lebourg *et al.*, 1996). La méthode utilisée est celle employée par Rasmussen *et al.* (2000) dans leur étude de l'application de Biosensors Merlux au dosage du mercure dans les solutions du sol. 1 gramme de sol sec a été mis en suspension dans 10 ml d'eau MilliQ® et agité à 300 RPM pendant 15 minutes. Les suspensions ont ensuite été centrifugées à 12 000 RPM pendant 10 minutes. Le surnageant a été filtré à 0,45 µm avec des filtres Teflon PTFE (Minisart SRP 25, Sartorius) et le mercure dissous a été analysé avec l'AMA 254. En attente d'analyse, les échantillons étaient conservés dans des flacons Nalgène® en polypropylène, acidifiés avec de l'acide chlorhydrique HCl 37% jusqu'à pH 1. Afin de minimiser les contaminations, tout le processus d'extraction a été réalisé dans du flaconnage préalablement lavé à l'acide (bains d'acide nitrique HNO₃ à 5 %).

II-5.3.3.b. Extraction séquentielle du mercure

Il existe de nombreux protocoles d'extractions séquentielles dans la littérature ; la plupart sont basés sur celui de Tessier (1979). Ces extractions sont toujours soumises à de nombreuses controverses, notamment à cause des phénomènes de ré-adsorption. Nous avons néanmoins décidé d'employer un protocole d'extraction séquentielle, plutôt que différentes extractions simples en parallèle pour étudier la répartition du mercure dans les sols. De plus, la plupart des protocoles ne permettent pas de distinguer les ETM liés aux oxydes de fer de ceux liés aux oxydes de manganèse.

Suite à des recherches bibliographiques, le protocole adopté pour étudier la répartition du mercure dans les sols est celui de Silveira *et al.* (2006) (Tableau 1). C'est un protocole initialement mis en place pour étudier la répartition du Zn et du Pb dans les sols, mais avec une adaptation pour les sols tropicaux. Ce protocole est particulièrement intéressant car les sols tropicaux en général et les oxisols en particulier sont riches en oxydes de Fe et de Mn.

Tableau 1. Protocole de l'extraction séquentielle adopté pour l'étude du mercure dans les sols guyanais (Silveira *et al.*, 2006).

Etapes	Fractions	Réactifs	Conditions d'agitation
I	Soluble et échangeable	7,5 ml 0.1M CaCl ₂	2h, T°C ambiante
II	Absorbé aux surfaces	15 ml 1M NaOAc (pH 5)	5h, T°C ambiante
III	Matière Organique	5 ml NaOCl 15% Cl actif (pH 8.5)	30 min, 90-95°C
IV	Oxydes de Manganèse	15 ml 0.05M NH ₂ OH/HCl (pH 2)	30 min, T°C ambiante
V	Oxydes de fer amorphes	15 ml oxalate buffer (pH 3) (0.2M acide oxalique + 0.2M NH ₄ -oxalate)	2h, dans le noir
VI	Oxydes de fer cristallins	20 ml 6M HCl	24h, T°C ambiante
VII	Résiduelle	Culot séché	Directement à l'AMA

Le protocole de Silveira *et al.* (2006) a été comparé lors d'expérimentations au protocole de Han *et al.* (2006) qui est lui adapté au mercure. Les résultats obtenus lors de cette phase de mise au point ont montré que le premier donne les meilleurs rendements d'extractions pour les sols guyanais étudiés pendant cette thèse. Ce protocole a donc été retenu mais avec une légère modification. La fraction résiduelle est obtenue directement par analyses du mercure

total restant dans le culot (AMA 254) plutôt que par digestion à l'eau régale. Toutes les autres fractions ont été analysées selon le protocole original.

Après chaque extraction, le mélange est centrifugé à 1225 g pendant 10 minutes, et le surnageant est prélevé. Ensuite, le culot est lavé avec 5 ml de NaCl à 0.1 M, agité à la main et centrifugé à 1225g pendant 10 minutes. Le surnageant est prélevé et ajouté au surnageant préalablement pipeté. Ce volume est filtré avec des filtres PTFE avec une membrane de 0.45µm et acidifié avec du HCl 37% à pH 1 pour conservation (à 4°C) jusqu'au dosage à l'AMA. A chaque fois, les culots sont séchés pour les étapes d'extractions suivantes. A la fin de l'extraction, la fraction résiduelle est mesurée directement à l'AMA dans le culot séché.

II-6 Analyses microbiologiques des sols

II-6.1. Diversité fonctionnelle des communautés microbiennes

Les plaques Biolog ont été mises au point dans le but d'identifier des souches microbiennes dans le domaine médical. Ces plaques se composent de 96 substrats carbonés. Le profil d'utilisation de ces substrats par une souche ou genre microbien donné permet son identification en le comparant à une base de données. Cette utilisation initiale des plaques Biolog a été détournée pour étudier les profils de minéralisation de communautés microbiennes entières. Depuis, cette méthode est largement répandue pour la caractérisation de la diversité fonctionnelle de communautés microbiennes provenant de milieux très divers (Garland, 1996; Müller *et al.*, 2001a; Müller *et al.*, 2001b). Les plaques Biolog EcoPlate™, adaptées aux communautés microbiennes de milieux naturels, ont été utilisées dans ces recherches.

II-6.1.a. Principe et mise au point

Les plaques Biolog EcoPlate™ sont constituées de 31 substrats carbonés et d'un blanc, le tout répété 3 fois sur une plaque de 96 puits (Annexe 2). En plus du substrat, chaque puit comprend du chlorure de tétrazolium. La métabolisation du substrat, ou plutôt la formation de NADPH dans les puits, induit une coloration violette de par la réduction du chlorure de tétrazolium en formazan, et dont l'absorbance peut être mesurée à 595 nm. Chaque puit a été inoculé avec 150 µl de la suspension bactérienne du sol à étudier.

Différents paramètres de cette méthode ont été vérifiés pour évaluer leur efficacité lors de l'analyse de nos sols: (i) la préparation de la suspension du sol, (ii) la dilution adéquate de la suspension bactérienne et (iii) le temps d'incubation des plaques. La suspension du sol utilisée

dans notre étude a été préparée avec 1 g de sol dans 9 ml d'eau physiologique stérile (NaCl 0,9%), agitée pendant 30 minutes à 300 RPM puis centrifugée à 3000 RPM selon le protocole mis en place au laboratoire (Harris-Hellal, 2008). Cette suspension a été diluée au millième afin d'inoculer les plaques EcoPlate™. Après inoculation, les plaques ont été incubées à 30°C pendant 48 à 96 h puis l'absorbance à 595 nm a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à plaque (Dynex Osy MR). Le temps d'incubation retenu a été de 96 h dans cette thèse.

II-6.1.b. Analyse et exploitation des données

- Calcul de l'absorbance moyenne et transformation AWCD :

L'absorbance moyenne (aussi appelée AWCD pour Average Well Color Development) est calculée selon la formule suivante :

$$AWCD = \frac{[\sum(C - B)]}{n}$$

où C est l'absorbance mesurée pour chaque puit, B est l'absorbance du blanc, et n le nombre total de substrats ($n=31$) (Garland & Mills, 1991).

- Calcul de la diversité catabolique

La diversité catabolique est calculée en déterminant le nombre de puits positifs, définis par Garland (1997) comme étant positifs à partir d'une absorbance de 0,25 supérieure à la valeur du blanc (B). Le nombre de puits positifs est ensuite divisé par le nombre de puits ($n = 31$).

$$Diversité\ catabolique = \frac{\text{nombre de puits positifs}}{n}$$

II-6.2. Diversité génétique des communautés microbiennes

II-6.2.a. Principe de la DGGE

La DGGE est une méthode reproductible, rapide, peu chère et fiable pour réaliser le suivi de la dynamique des populations et de comparer la diversité des communautés bactériennes de divers environnements. A partir d'un extrait d'acide nucléique, une PCR est réalisée sur une région de l'ADNr 16S en utilisant un couple d'amorces dont l'une est associée à un GC-clamp. Après amplification, les fragments d'intérêt de même taille sont discriminés sur gel

d'électrophorèse acrylamide en fonction de leurs séquences. Lors de la migration les fragments se dénaturent progressivement en fonction de leur composition en liaisons G-C et A-T (les liaisons G-C étant plus stables que les liaisons A-T). L'importance de la dénaturation s'accompagne d'un ralentissement de la migration du fragment d'où la migration différentielle selon la composition en bases. Les séquences se dénaturent plus ou moins vite, le clamp GC est une courte séquence riche en liaison G-C et qui empêche la dénaturation totale du fragment au cours de la migration.

II-6.2.b. Protocole de la DGGE

La technique de la DGGE se déroule en 3 étapes : (1) l'extraction de l'ADN génomique total du sol, (2) une PCR (Polymerase Chain Reaction) ciblant l'ADNr 16S, et (3) un gel DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) pour séparer les fragments amplifiés. Les détails sont présentés dans l'Annexe 3.

- **Extraction de l'ADN génomique du sol**

L'extraction est réalisée en utilisant le kit MO BIO « PowerSoil™ DNA Isolation Kit » permettant une extraction optimale de l'ADN tout en minimisant la contamination par les acides humiques présents dans les sols. Un homogénéisateur de type Fastprep (MP Biomedicals) est utilisé pour lyser mécaniquement les cellules. La qualité des ADN extraits a été vérifiée par dépôt des produits d'extractions sur un gel d'agarose à 1%, coloré au SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) pour visualisation aux UV. Un marqueur de taille 100pb Invitrogen a été utilisé pour vérifier la présence d'une bande d'ADN génomique de haut poids moléculaire.

- **Amplification par PCR**

Après extraction de l'ADN, une PCR a été réalisée afin d'amplifier un fragment de l'ARN ribosomique 16S des bactéries totales du sol. Les amorces utilisées sont des amorces bactériennes universelles permettant l'amplification de toutes les bactéries présentes dans le sol : la 338F-GC (porte le GC clamp) et la 518R. La position de ces amorces (338 et 518 sur la séquence de référence *d'Escherichia coli*), nous permet donc d'obtenir des fragments amplifiés de 180 paires de bases. Le Master Mix (QIAGEN) qui contient l'enzyme, le tampon de réaction, le MgCl₂ et les quatre désoxyribonucléotides (dNTPs) et la Taq polymérase a été utilisé. Les concentrations ont été optimisées selon les recommandations du fournisseur avec : 2,5 unités de Taq DNA Polymerase, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µl de chaque dNTP, entre 0,5 et

0,6 µg d'ADN par réaction et 0,5 µM de chaque primer par réaction. Les extraits d'ADN ont été dilués au centième. Pour certains échantillons des volumes de PCR de 300µl et une concentration des produits PCR ont été nécessaires. Le programme de PCR utilisé est détaillé dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Programme de PCR utilisé pour la DGGE

Phases	Durée et température	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	2 minutes à 94°C	1
Dénaturation	30 secondes à 94°C	
Hybridation	1 minute à 60°C	37
Elongation	3 minutes à 72°C	
Elongation finale	15 minutes à 72°C	1

L'analyse du rendement des produits de PCR a été réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% avec du Sybr safe 1X (sous une tension de 100V pendant 40 minutes). 3µl de tampon de charge sont ajoutés à 3µL de produits de PCR. La quantification est réalisée avec ce gel et par l'intermédiaire du système d'imagerie Gel Doc associé au logiciel Quantity One (Biorad). En fonction de la qualité de la PCR, il a été parfois nécessaire de concentrer les produits afin de déposer une quantité suffisante de fragments d'intérêt et d'assurer ainsi une bonne lecture sur le gel de DGGE. La concentration des produits de PCR est réalisée avec de l'acétate de sodium 3M et de l'éthanol absolu (respectivement 1/10 et 3 volumes du volume du produit de PCR), après centrifugation le culot est lavé avec de l'éthanol à 70% et récupéré dans du ddH₂O stérile.

- **Migration des amplicons sur gel DGGE**

Le gel DGGE est préparé selon un gradient de dénaturant 40 % et 70% avec un mélangeur à pompe péristaltique. Après la polymérisation du gel, 15µl de tampon de charge sont mélangés à une quantité variable de produits de PCR en fonction de la concentration en ADN (minimum 600ng/ul). A la suite d'une première migration de 15 minutes à 20V, ce qui permet à l'ADN d'atteindre le fond des puits, la migration des produits de PCR est réalisée à 100V pendant 17h dans une cuve contenant du TAE à 1X. La révélation des bandes est réalisée avec du Sybr Safe 1X et du TAE 1X et la visualisation des bandes avec le système Gel Doc. L'analyse des bandes est effectuée à l'aide du logiciel Total Lab.

II.7 Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques des données ont été réalisées avec le logiciel R (R Development Core Team, 2008).

II.7.1. Analyses pour les données de terrain

Les données acquises sur le site d'étude (paramètres physico-chimiques du sol, concentrations de mercure et données sur les vers) ont été analysées à deux niveaux. Premièrement, une analyse en composante principale (ACP) a été effectuée afin de regarder l'influence des différents paramètres du sol (physico-chimiques, pédologiques et teneurs en mercure) sur l'abondance (n) et la biomasse (B, en g) des vers échantillonnés. Ensuite, des corrélations ont été testées entre les différentes variables mesurées pour expliquer la répartition du mercure et des vers dans les différents sols du terrain.

II.7.2. Analyses pour les données des dispositifs expérimentaux

Pour tous les dispositifs expérimentaux, l'effet des traitements « mercure » et « vers » a été testé d'abord séparément puis l'interaction entre ces deux facteurs a été testée par une analyse de variance (ANOVA) à 2 facteurs, suivi du test postHoc TukeyHSD. Au préalable, la normalité des données (test de Shapiro-Wilk) ainsi que l'homogénéité des variances (test de Bartlett) ont été testées. Dans les cas de données non normales, un test non paramétrique a été utilisé : le test de Kruskal-Wallis, suivi d'un test post-hoc (kruskalwallismc).

Chapitre III
Mercure et diversité des vers de terre en Guyane française

Introduction

Le bassin versant de de la Crique Combat, site de notre étude, appartient à la Compagnie minière Boulanger (CMB) et été étudié dans le cadre du programme de recherche CNRS « Mercure en Guyane » (2002-2007). Une des rares études biogéochimiques menées sur ce site a été réalisée dans notre laboratoire et a portée sur l'interaction entre le mercure et la composante microbienne des sols, ainsi que ses conséquences sur la mobilité du mercure (Harris-Hellal, 2008). Les résultats obtenus ont montré que les oxydes de fer constituent une phase porteuse du mercure majeure et qu'en solubilisant cette dernière en conditions anaérobies, les bactéries ferri-réductrices mobilisaient le mercure qui lui était associé (Harris-Hellal *et al.*, 2010). Suite à ces travaux, la question de la mobilisation du mercure associé à la seconde phase fixatrice du mercure dans ces sols, la matière organique, a été soulevée. Le rôle des vers de terre, organismes ingénieurs, dans la mobilisation du mercure associé à cette seconde phase et la modification des hots spots de ce contaminant ont été ainsi explorés. Toutes ces modifications pourraient influencer les communautés biologiques dans les sols et notamment celles des vers en impactant leur diversité et leur densité.

Les objectifs de cette première étude sont : (1) d'identifier les populations de vers de terre présentes sur le site de la Crique Combat et (2) d'évaluer l'impact du mercure sur leur distribution *in situ*.

Dans ce chapitre, nous présentons l'ensemble des résultats obtenus à partir de l'échantillonnage de prospection des vers de terre sur le site, dans l'oxisol I en haut de pente et le sol hydromorphe du bas-fond. Dans un premier temps, nous avons proposé des espèces putatives ou MOTUs à partir de méthodologies de délimitation basées sur le barcode ADN. Sans identifier les espèces, les différentes séquences obtenues peuvent être utilisées pour définir des unités opérationnelles ou MOTUS (Molecular Operational Taxonomic Units).

Différentes méthodes de délimitation d'espèces ont été utilisées et comparées. Ces MOTUs ont ensuite été identifiés morphologiquement. Par ailleurs, les caractéristiques physico-chimiques des deux sols étudiés ainsi que les teneurs en mercure ont été déterminées et leurs relations avec la distribution des vers de terre abordées.

III-1. Diversité des vers échantillonnés sur le site de la Crique Combat

III-1.1. Délimitation des espèces des vers échantillonnés

Dans le cadre de l'évaluation de la diversité spécifique des vers de terre du site de Cacao, les données du Barcode ADN obtenues suite à la mission prospective de juin 2011 pour le gène COI ont été utilisées dans une approche de délimitation moléculaire des espèces. Pour cela, différentes méthodes de délimitation dites exploratoires ont été utilisées afin de comparer les résultats et de proposer des MOTUs : les « Barcode Index Numbers » (BINs) (Ratnasingham & Hebert, 2013), ABGD (Puillandre *et al.*, 2012), GMYC (Monaghan *et al.*, 2009) et la méthode du seuil selon Chang & James (2011).

Au total, 190 vers ont été échantillonnés dont 24 adultes (avec un clitellum développé) et 166 juvéniles. Les barcodes ADN ont été obtenus pour 180 individus et appartiennent au projet BOLD « EWCA : EarthWorms of Cacao ». Les analyses ont été effectuées sur ce jeu de données, sauf pour la méthode GMYC pour laquelle un jeu de données réduit a été utilisé (i.e. seuls les haplotypes uniques ont été conservés, N = 81). Une fois aligné, le jeu de données complet comportait 654 paires de bases, sans codons stop, avec 490 sites comportant des données manquantes dû à 20 séquences courtes (< 500 pb), et 67 sites polymorphes (soit 164 sites sans données manquantes dont 97 sites conservés).

III-1.1.a. Affiliation des séquences BINs

Sous BOLD Systems, les séquences ont été délimitées en 17 BINs (Tableau 1). De plus, une seule espèce a pu être identifiée par comparaison avec les BINs existant dans la base de données BOLD et par BLAST sous Genbank : *Pontoscolex corethrurus* (Figure 1), soit un seul des BINs délimités sur le site. Cette espèce correspond au BIN **BOLD:AAF0317** et nos séquences sont 100% identiques à celle de GenBank JN036370.1 (score = 1158). Les autres séquences n'étaient pas identifiables car non connues des bases de données.

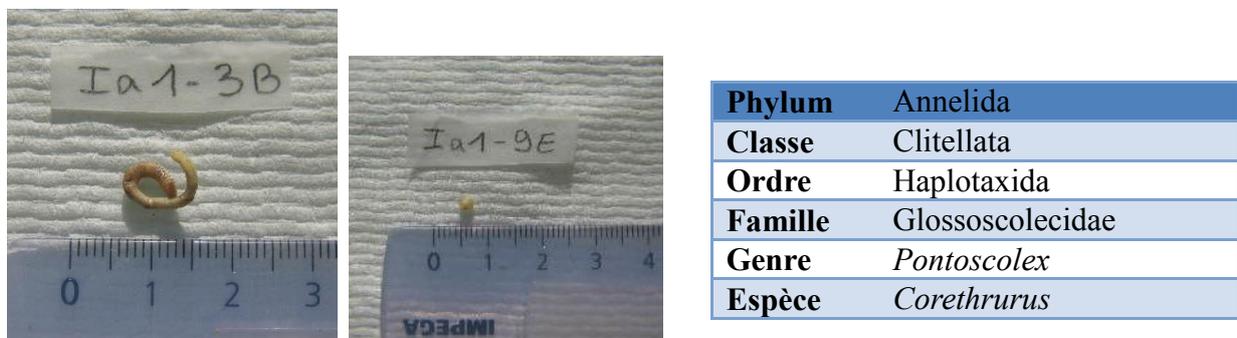


Figure 1. Photographies de *Pontoscolex corethrurus* (juvénile et cocon) et systématique détaillée de l'espèce.

Tableau 1. Affiliation des BINS aux séquences de vers sous BOLD Systems.

BIN	Membres BIN EWCA Juin 2011	Membres Totaux	Identification (BOLD)
BOLD:AAF0317	5	152	<i>Pontoscolex corethrurus</i> [63], <i>Pontoscolex</i> sp. [1]
BOLD:ABX1435	60	160	non identifié
BOLD:ABX1439	10	11	non identifié
BOLD:ABX1436	22	72	non identifié
BOLD:ABX1442	7	7	non identifié
BOLD:ABX1443	1	8	non identifié
BOLD:ABX1438	8	20	non identifié
BOLD:ABX1756	10	16	non identifié
BOLD:ABX1437	2	2	non identifié
BOLD:ABX1755	1	2	non identifié
BOLD:ABX1758	22	36	non identifié
BOLD:ABX1753	6	6	non identifié
BOLD:ABX1752	2	136	non identifié
BOLD:ABX1757	1	14	non identifié
BOLD:ABX1754	1	2	non identifié
BOLD:ABX1759	1	1	non identifié
BOLD:ABX1440	1	1	non identifié

III-1.1.b. Méthode ABGD : Barcode gap et arbre BIONJ

La matrice de distances deux à deux, calculée pour les 180 échantillons avec la méthode Kimura-2-Parameter (K2P), a servi d'entrée au logiciel ABGD. Les autres méthodes : méthodes Jukes-Cantor (JC69), Tajima-Nei (Tn) et le calcul de distance simple (p-distance) ont également été testées. Les différentes méthodes donnent les mêmes résultats ABGD qu'avec la méthode K2P. Nous avons donc choisi de conserver la méthode de calcul K2P qui est la plus utilisée et dont les résultats ont été confortés par d'autres méthodes.

La sortie du logiciel ABGD est présentée dans les Figures 2, 3 et 4. Sur l'histogramme de la Figure 2, on peut voir clairement deux modes, et entre ces deux modes, le barcode gap, situé entre les valeurs de distance de 0.05 et 0.20 environ. Les mêmes données sont représentées sur la Figure 3 comme des valeurs ordonnées où l'on peut localiser une augmentation soudaine de la pente (entre 0.05 et 0.20) à proximité du barcode gap. On remarque dès à présent qu'il y a peu de paires de séquences comprises dans l'intervalle 9-15%, intervalle ambiguë pour la délimitation des espèces selon Chang & James (2011).

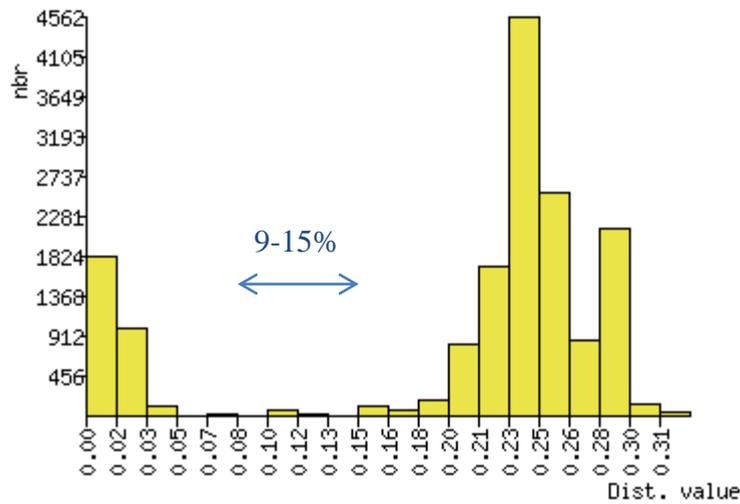


Figure 2. Sortie du logiciel ABGD représentée sous forme d'histogramme et indiquant deux modes de distributions ainsi que le barcode gap. En abscisse, les distances génétiques entre les séquences et en ordonnées le nombre de séquences concernées.

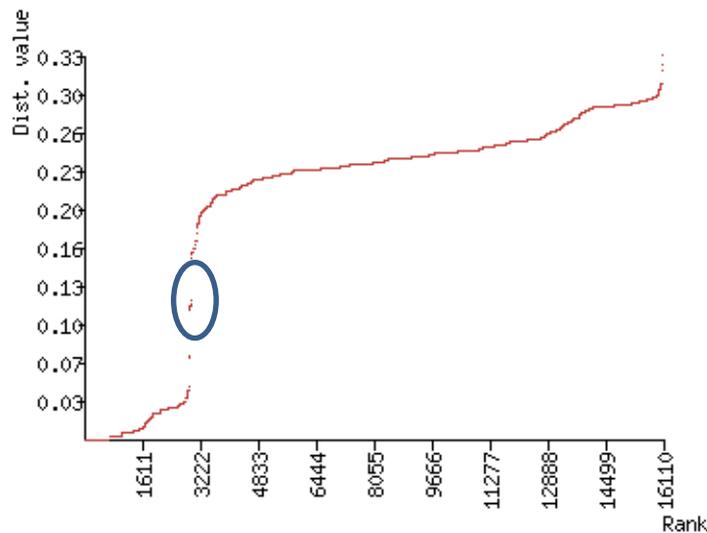


Figure 3. Sortie du logiciel ABGD représentée sous forme de graphique et montrant une augmentation de pente aux alentours du barcode gap.

Sur la Figure 4 sont indiquées les différentes partitions proposées par ABGD. Pour chaque valeur de P (prior intraspecific divergence), ABGD propose une partition correspondant à un nombre de groupes (correspondant à des MOTUs ou espèces putatives). ABGD nous propose 10 partitions différentes correspondant à 16 à 45 groupes (Figure 4).

Parmi les valeurs de P proposées par ABGD, la valeur retenue a été celle proposée par Puillandre *et al.* (2012), c'est-à-dire $P = 0.0129$, car c'est à cette valeur qu'il y aurait le plus de congruence avec les données morphologiques et écologiques selon la littérature. Cette valeur de P correspond à la partition de 18 MOTUs ou espèces putatives pour notre jeu de données. Les partitions proposées autour de cette valeur correspondent à 17 ($P = 0.021544$) et 18 ($P = 0.007743$) groupes.

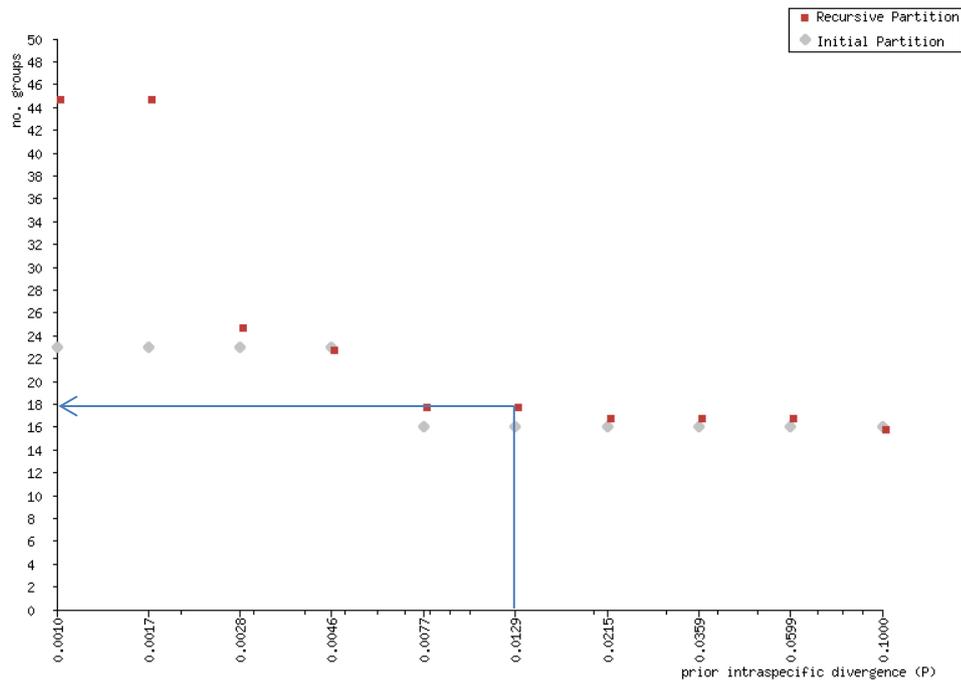
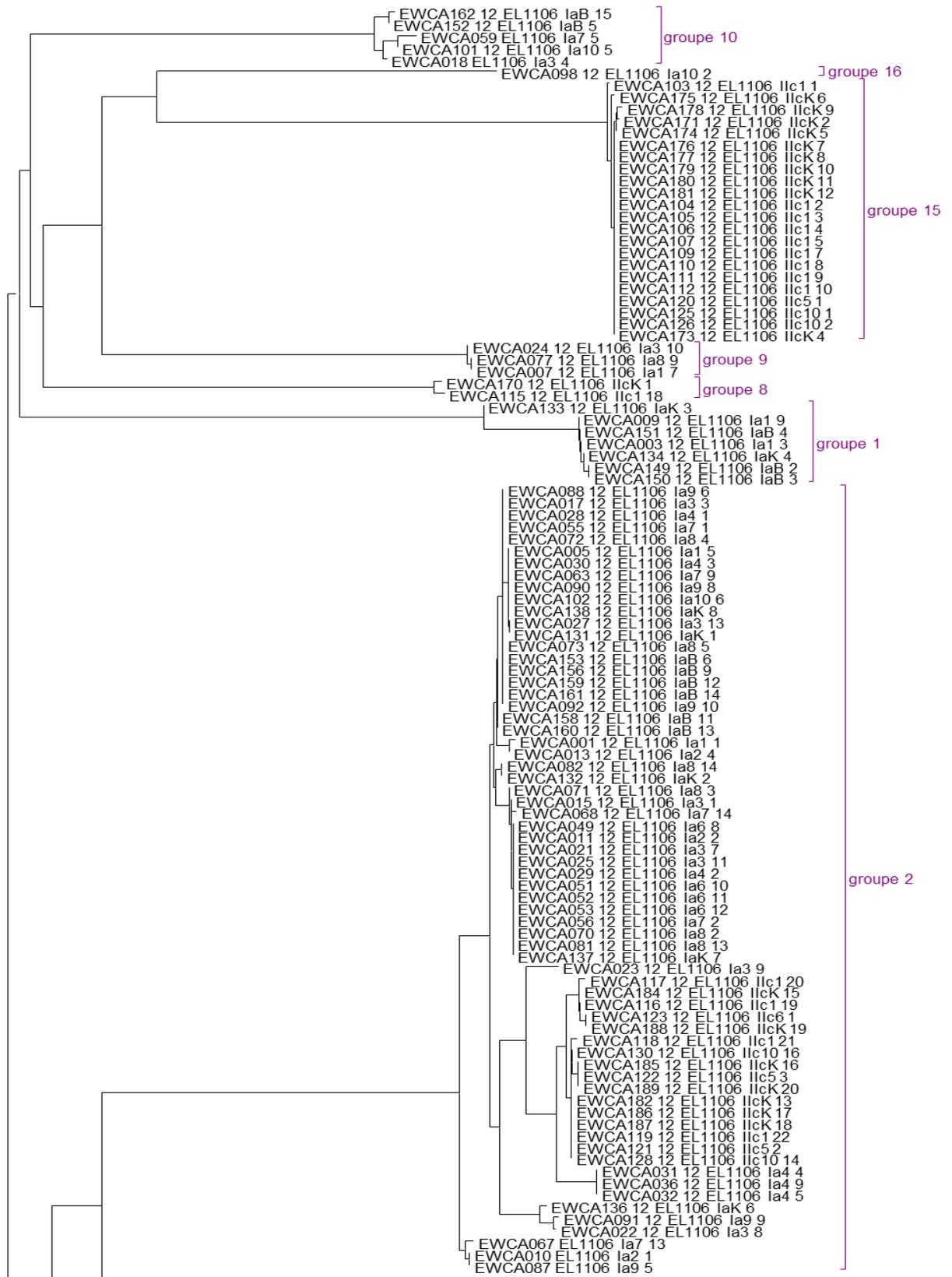


Figure 4 : Les partitions proposées par ABGD en fonction de la valeur de P (prior intraspecific divergence) retenue.

L'arbre BIONJ reconstruit par ABGD et montrant la répartition des 180 échantillons en ces 18 MOTUs, est présenté dans la Figure 5. Sur cet arbre, on peut voir le regroupement des individus appartenant au même MOTU dans un même clade, indiqué en violet sur la Figure 5. Sur cet arbre, le groupe 1 correspond au BIN BOLD:AAF0317, identifié au niveau de l'espèce comme *P. corethrurus*.



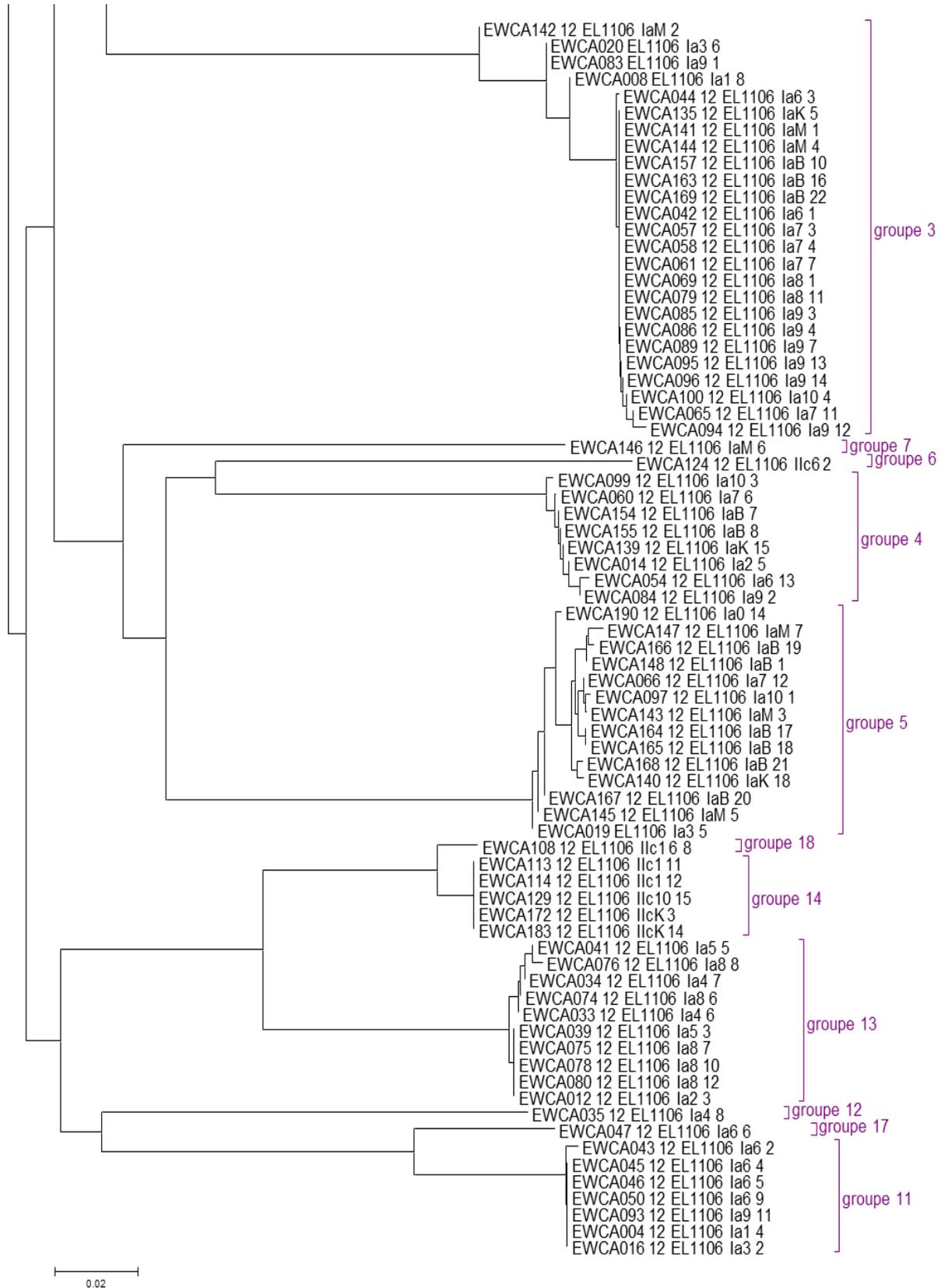


Figure 5. Arbre BIONJ reconstruit par ABGD avec le gène COI, méthode K2P, partition correspondant à $P=0.0129$.

On remarque que le nombre de spécimens par MOTU est très variable, allant de singletons à 66 individus (Tableau 2). Parmi les 18 MOTUs, on remarque la présence de 6 singletons : EWCA124 (groupe 6), 146 (groupe 7), 035 (groupe 12), 098 (groupe 16), 047 (groupe 17), et 108 (groupe 18).

groupe	N	groupe	N	Groupe	N
1	7	7	1	13	10
2	66	8	2	14	5
3	25	9	3	15	22
4	8	10	5	16	1
5	14	11	7	17	1
6	1	12	1	18	1

Tableau 2. Nombre de spécimens par MOTU délimités avec la méthode ABGD.

III-1.1.c. Méthode GMYC

La méthode GMYC a été utilisée en complément de la méthode ABGD, à titre comparatif. Un sous-jeu de données a été utilisé pour cette méthode. Les 180 séquences ADN ont été séparées en 81 haplotypes grâce au logiciel DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009) et ce sont ces 81 haplotypes qui ont donc été utilisés comme entrée pour GMYC. Les données manquantes ont été conservées pour générer ces haplotypes.

La limite rouge (Figure 6) représente le décrochement entre les taux lents et rapides d'évènements de branchement dans ce graphe montrant les lignées en fonction du temps (« lineage-through-time plot »).

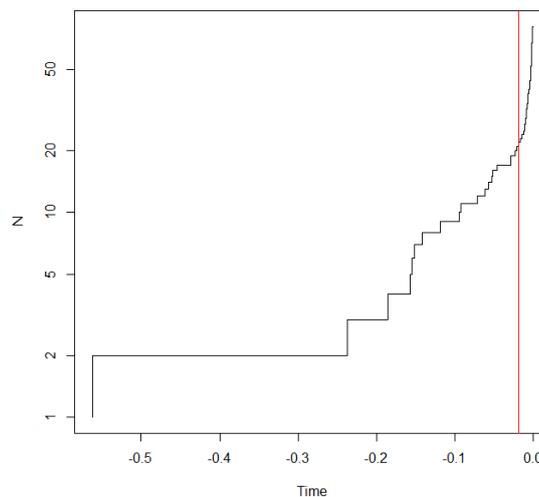


Figure 6. Lignées en fonction du temps (« lineage-through-time plot ») et représentation de l'augmentation soudaine entre les taux lents et rapides d'évènements de branchement, caractéristique de la limite entre la distance intra et interspécifique.

```

Result of GMYC species delimitation

method: single
likelihood of null model:      519.7301
maximum likelihood of GMYC model: 526.1385
likelihood ratio:             12.81681
result of LR test:            0.005049997**

number of ML clusters: 14
confidence interval: 5-22

number of ML entities: 21
confidence interval: 5-38

threshold time: -0.01795752
    
```

Figure 7. Résultats de la délimitation de MOTUs par la méthode GMYC.

Avec la méthode GMYC, 21 MOTUs au total ont été obtenus (nommés ML entities dans la sortie du logiciel, Figure 7). Dans le détail, 14 MOTUs composées d’au moins deux séquences (appelés clusters) et 7 singletons, c’est-à-dire 7 MOTUs représentées par une seule séquence (nombre de singletons = nombre d’entités ML – nombre de clusters, soit $21 - 14 = 7$) ont été obtenus.

L’arbre généré par la méthode GMYC, montrant la répartition des 81 haplotypes en ces 21 MOTUs est présenté dans la Figure 8. Sur cet arbre, les numéros des MOTUs délimités par la méthode ABGD ont été repris ici afin de pouvoir visualiser les différences obtenues avec les deux méthodes. La liste des 81 haplotypes est présentée en Annexe 4 de ce manuscrit.

Avec la méthode GMYC, deux MOTUs ont été subdivisées : les groupes 2 et 10 ; et deux autres MOTUs ont été regroupées : les groupes 14 et 18. Le groupe 2 en particulier a été divisé en 4 sous-groupes (notés groupes 2a, 2b, 2c et 2c sur la Figure 8) et le groupe 10 en deux sous-groupes (10a et 10b). Pour les autres groupes, la délimitation est la même que celle obtenue avec la méthode ABGD.

Au vu des résultats contradictoires, en particulier pour les groupes 2, 10, 14 et 18, il est intéressant de recalculer les distances K2P entre tous les groupes et les sous-groupes (2a-d et 10a-b) afin de confirmer ou non leur statut selon le seuil fixé par Chang & James (2011).

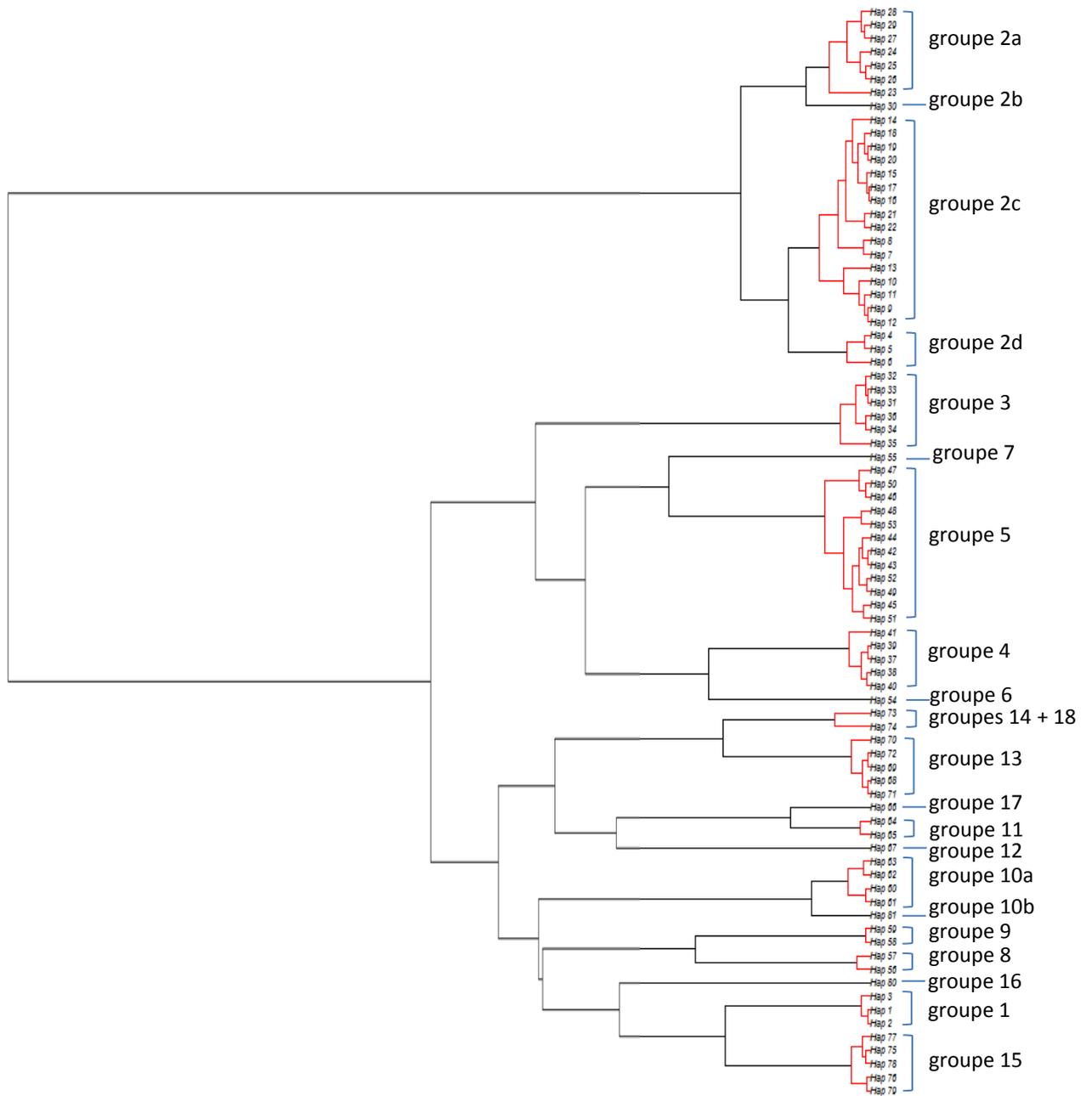


Figure 8. Arbre généré par la méthode GMYC basé sur le gène COI.

III-1.1.d. Distances K2P consensus selon Chang & James (2011)

La matrice de distances K2P deux-à-deux a été recalculée en fonction des MOTUs délimitées par les méthodes ABGD et GMYC, en prenant en compte hypothèse la moins conservatrice. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3. Sur cette matrice, on peut observer la distance génétique (%) entre MOTUs ainsi que les distances intra-MOTUs dans la diagonale de la matrice (en vert). Ces distances ont été calculées afin de confirmer ou non le statut des MOTUs selon le seuil fixé par Chang & James, (2011).

Tableau 3. Matrice représentant les distances K2P en % calculées entre les MOTUs pris deux-à-deux et entre chaque MOTU.

Dans la diagonale, « S » est noté pour les singletons.

Groupes	1	2a	2b	2c	2d	3	4	5	6	7	8	9	10a	10b	11	12	13	14	15	16	17	18	
1	0																						
2a	29	0.7																					
2b	27	2	S																				
2c	28	3	2	0.6																			
2d	27	3	3	2	2.1																		
3	27	24	24	23	22	0.1																	
4	32	25	24	23	24	23	0.1																
5	29	27	24	24	23	21	20	0.4															
6	30	27	26	26	25	23	19	20	S														
7	28	24	24	24	24	24	23	22	23	S													
8	23	24	23	24	24	26	29	23	29	26	0.4												
9	25	26	24	24	24	21	25	22	23	24	19	0											
10a	24	23	22	23	22	16	27	24	25	26	20	20	0.4										
10b	25	22	20	21	21	21	25	22	25	24	21	19	1	S									
11	25	26	26	25	25	27	28	23	24	29	23	24	24	24	0.09								
12	28	25	25	24	23	26	24	24	24	27	23	23	24	22	21	S							
13	27	24	24	25	23	24	24	24	25	27	26	21	22	22	23	22	0.2						
14	25	23	23	24	24	23	23	22	23	25	24	22	21	23	22	21	11	0					
15	22	29	29	29	27	25	28	24	26	25	23	20	21	23	29	29	24	26	0.04				
16	25	26	25	25	25	23	25	23	23	24	25	21	23	22	27	26	23	24	20	S			
17	25	26	25	25	25	27	27	22	25	26	24	23	22	23	7	22	24	23	27	28	S		
18	25	23	23	24	24	23	23	22	23	24	25	23	20	23	22	21	11	2	26	23	23	S	

Selon le seuil pris par Chang & James (2011), les groupes dont les distances sont supérieures à 15% (en noir dans le Tableau 3) représentent des espèces distinctes et les distances inférieures à 9% (en orange dans le Tableau 3) peuvent être considérés comme des espèces identiques. Pour les distances comprises entre 9% et 15% (en rouge dans le Tableau 3), les résultats sont difficilement interprétables. A ce stade, il est difficile de déterminer s'il s'agit de vers de terre appartenant à la même espèce ou non.

Parmi les 18 groupes délimités, les distances génétiques entre les groupes sont supérieures au seuil pour 11 groupes (groupes 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 15, 16), et leur statut d'espèce putative ainsi conforté.

Les distances génétiques sont de 2 à 3% entre les sous-groupes 2a, 2b, 2c et 2d, et seulement 1% entre les sous-groupes 10a et 10b. Ces distances sont très largement en dessous du seuil de 9%. Ces individus appartiendraient donc à deux espèces uniquement (groupes 2 et 10 délimités par la méthode ABGD) selon la méthode du seuil. Ces résultats sont en contradiction avec la méthode GMYC, mais confortent ceux obtenus avec la méthode ABGD ainsi que l'affiliation des BINs.

Les individus des groupes 14 et 18, délimités pas la méthode ABGD, pourraient quant à eux appartenir à une seule et même espèce d'après les faibles distances K2P (Tableau 3); il en est de même pour les groupes 11 et 17 dont la distance génétique est de 7%.

Le groupe 13 est distant génétiquement de 11% des groupes 14 et 18. Ce groupe se trouve dans l'intervalle ambigu de [9-15%] pour lequel on peut difficilement conclure (Chang & James, 2011).

III-1.1.e. Espèces putatives : comparaison des méthodes de délimitation

Le même nombre de MOTUs n'a pas été obtenu avec les différentes méthodes de délimitation d'espèces. D'après les méthodes ABGD et GMYC, les 180 séquences de vers de terre se répartissent en 18 ou 21 MOTUs respectivement. De plus, les BINs associés à ces séquences sont au nombre de 17. La divergence des résultats souligne bien ici l'intérêt et l'importance d'utiliser plusieurs méthodes de délimitation en parallèle. Afin de compléter les résultats, il a été utile de faire appel à la méthode du seuil (Chang & James, 2011) qui a permis de confirmer ou non le statut de différentes espèces putatives. Les résultats obtenus avec les différentes méthodes sont résumés dans le Tableau 4.

La méthode GMYC donne trois MOTUs supplémentaires, c'est-à-dire, trois espèces putatives de vers de terre en plus comparé à la méthode ABGD. Cependant, cette méthode a tendance à surestimer le nombre de MOTUs, comme le montrent deux études de délimitation d'espèces chez les vers de terre (Fernández *et al.*, 2012; Novo *et al.*, 2012). On remarque que les MOTUs subdivisées par cette méthode représenteraient une seule espèce putative selon ABGD et la méthode du seuil. De plus, les BINs affiliés sous BOLD concordent avec les résultats obtenus par ABGD (Tableau 4).

Tableau 4. Comparaison des méthodes utilisées pour la délimitation d'espèces putatives.

n vers	BIN	ABGD	GMYC	Seuil MOTUs
7	BOLD:AAF0317	groupe 1	groupe 1	> 15% vs groupes
66	BOLD:ABX1435	groupe 2	groupe 2a groupe 2b groupe 2c groupe 2d	<< 9% vs groupes 2a, 2b, 2c, et 2d
25	BOLD:ABX1436	groupe 3	groupe 3	> 15% vs groupes
8	BOLD:ABX1438	groupe 4	groupe 4	> 15% vs groupes
14	BOLD:ABX1756	groupe 5	groupe 5	> 15% vs groupes
1	BOLD:ABX1759	groupe 6	groupe 6	> 15% vs groupes
1	BOLD:ABX1757	groupe 7	groupe 7	> 15% vs groupes
2	BOLD:ABX1752	groupe 8	groupe 8	> 15% vs groupes
3	BOLD:ABX1437	groupe 9	groupe 9	> 15% vs groupes
5	BOLD:ABX1754	groupe 10	groupe 10a groupe 10b	<< 9% vs groupes 10a et 10b
7	BOLD:ABX1442	groupe 11	groupe 11	> 15% vs groupes
1	BOLD:ABX1440	groupe 12	groupe 12	> 15% vs groupes
10	BOLD:ABX1439	groupe 13	groupe 13	> 15% vs groupes
5	BOLD:ABX1753	groupe 14	groupe 14	[9-15%] vs groupe 13
22	BOLD:ABX1758	groupe 15	groupe 15	> 15% vs groupes
1	BOLD:ABX1755	groupe 16	groupe 16	> 15% vs groupes
1	BOLD:ABX1443	groupe 17	groupe 17	< 9% vs groupe 11
1	BOLD:ABX1753	groupe 18	avec groupe 14	[9-15%] vs groupe 13

Pour les MOTUs 2 et 10 qui se trouvaient subdivisés avec la méthode GMYC, la méthode du seuil nous a permis de confirmer les résultats obtenus avec la méthode ABGD : les groupes 2 et 10 représentent 2 MOTUs seulement et non 6 (<< 9% de divergence génétique intra-groupes).

Pour les groupes 14 et 18, la méthode du seuil nous a permis de trancher quant aux résultats contradictoires obtenus avec les méthodes ABGD et/ou GMYC. Les groupes 14 et 18 ont été regroupés avec la méthode GMYC et sont affiliés à un seul et même BIN (BOLD:ABX1753). La convergence des groupes 14 et 18 a été confirmée par la faible distance génétique K2P calculée (2%) (Tableaux 3 et 4).

Cependant, les résultats sont moins clairs pour les groupes 11 et 17. En effet, ces groupes sont bien séparés par les méthodes ABGD et GMYC ; de plus leurs séquences sont affiliées à deux BINs différents (Tableau 4). Cependant, la distance génétique calculée entre ces deux espèces est de 7% avec K2P (ainsi que les autres méthodes de calcul citées précédemment).

Ces deux espèces sont proches génétiquement (< 9%), mais pourraient tout de même être différentes, comme le suggèrent les différentes méthodes de délimitation. Même s'il est difficile de trancher quant au statut de ces deux groupes, à ce stade, nous avons considéré qu'il s'agissait de deux espèces différentes. Un jeu de données plus important nous permettrait de trancher (e.g. échantillonnage supplémentaire).

Dans cette étude, il n'y a eu que très peu de MOTUs se trouvant dans l'intervalle ambigu [9%-15%] pour lequel il est difficile de savoir s'il s'agit d'espèces bien distinctes ou, au contraire, similaires (Chang & James, 2011). Seul le groupe 13 est dans ce cas.

Les différentes méthodes utilisées sont complémentaires et exploratoires, et donnent des pistes indicatives sur la délimitation d'espèces putatives. Elles ont l'avantage de proposer des résultats concernant le nombre et la répartition des MOTUs assez simplement (un seul gène séquencé) et rapidement (pour la méthode ABGD). Cependant, elles présentent chacune leurs limites, notamment en ce qui concerne le taux de singletons, qui peut remettre sérieusement la crédibilité de l'utilisation de la méthode ABGD et GMYC en doute.

Selon Pons *et al.* (2006), il est important que le taux de singletons soit au maximum de 37% pour la méthode ABGD pour que les résultats soient interprétables, et jusqu'à 60% avec la méthode GMYC (Monaghan *et al.*, 2009). Avec les méthodes ABGD et GMYC, 6 singletons ont été délimités dans notre étude sur 18 MOTUs, soit 33% de singletons. Ainsi, nous sommes en accord avec les recommandations des taux de singletons.

En général peu de spécimens par espèce sont échantillonnés (2-3 spécimens/espèce) et l'échantillonnage est effectué dans une aire géographique restreinte. Il a été reconnu que ces deux facteurs exagèrent le « barcode gap » (Bergsten *et al.*, 2012 et les références citées dedans). De plus, il a été montré que la variation intra-spécifique augmente avec l'échelle géographique du à l'isolation par la distance et la structure phylogéographique (Bergsten *et al.*, 2012). Le nombre de spécimens par MOTUs ainsi que la régionalisation de l'échantillonnage sont donc des paramètres importants à prendre en compte dans l'analyse de délimitation d'espèces car ils influent sur les résultats ; l'échantillonnage des individus est donc fondamental. En perspectives, un échantillonnage des vers sud-américains à grande échelle, couplé au barcode ADN, est prévu dans plusieurs projets à venir dans le but de contrer ce problème de régionalisation.

Les trois méthodes utilisées en parallèles ne sont parfois pas suffisantes pour l'obtention de résultats fiables biologiquement en termes de définition des espèces car elles se basent sur un seul gène (COI). Des analyses morphologiques pourraient contribuer à éclaircir cette tentative de délimitation d'espèces, ainsi que d'autres données moléculaires (en particulier sur le génome nucléaire) ou écologiques. Par exemple, le séquençage d'un deuxième gène, tel que le gène nucléaire ARNr 28s pourrait confronter les MOTUs obtenues avec le gène COI dans une analyse phylogénétique tel que le proposent Puillandre *et al.* (2012b). De plus, des données écologiques telles que les données géographiques, la répartition sur le terrain, l'identification morphologique et des données supplémentaires comme la capacité de dispersion des individus, peuvent être utilisées dans une méta-analyse afin de confronter les MOTUs basées sur les données moléculaires. Cette approche fait partie d'une approche de taxinomie intégrative et permettrait de rapprocher les MOTUs délimitées à des espèces biologiques.

Notre étude était exploratoire et dans un premier temps, avait pour objectif d'estimer un proxy de la diversité dans le cadre d'une problématique écologique (pollution au mercure). Cette étude nécessiterait une approche de taxinomie intégrative si l'on souhaite par la suite entrer dans un aspect plus taxinomique.

Dans notre étude, les MOTUs délimitées grâce aux données du gène COI ont été identifiés a posteriori par une approche de taxinomie classique. L'objectif était de pouvoir lier chaque MOTU à un nom d'espèce de vers de terre, afin de compléter les bases de données pour les vers de terre de Guyane française.

III-1.2. Identification des vers par taxinomie morphologique

Suite au travail de délimitation d'espèces par les méthodes exploratoires ABGD et GMYC, quelques individus de chaque MOTUs ont soumis à une identification morphologique en collaboration avec le taxonomiste Samuel W. James. Ce travail a débuté lors du « Earthworm Taxonomy Workshop » donné par S.W. James auquel j'ai participé, dans le cadre de l'International Oligochaete Taxonomy Meeting (IOTM), les 27 et 28 avril 2013 au Portugal. [http://6thiotm.tomas-pavlicek-biologie.net/pages/taxonomy_workshop_en.php]

Les résultats des identifications sont rassemblés dans le Tableau 5. Un à 5 individus par MOTUs a été observé quand cela était possible. En effet, certains individus étaient trop abimés pour être identifiables, dû à l'échantillonnage manuel sur le terrain. De plus, la plupart

des vers de terre étaient des juvéniles, et ne présentaient pas de caractères permettant de les identifier au niveau de l'espèce.

Mis à part *Pontoscolex corethrurus* qui a pu être identifié jusqu'à l'espèce, les autres spécimens n'ont pu être identifiés qu'au niveau du genre. Certains spécimens ont été identifiés mais sans certitude (groupes 7, 9, 10, 12 et 16) et d'autres n'ont pas pu être identifiés soit car ils appartiennent à des genres inconnus (groupe 14) soit à cause de leur état de conservation et/ou de leur stade de développement comme mentionné plus tôt (groupes 8, 16, 17 et 18). Ces résultats montrent déjà la difficulté d'identification des espèces tropicales, même pour un spécialiste.

Tableau 5. Identifications taxinomique des vers de terre de chaque MOTUs (par S.W. James).

MOTUs ABGD	Individus identifiés	ID par S.W. James ⁵	ID Nouragues (MOTU)
groupe 1	EWCA133-IaK_3 EWCA134-IaK_4	<i>Pontoscolex corethrurus</i>	<i>Pontoscolex corethrurus</i> (26)
groupe 2	EWCA023-Ia3_9 EWCA186-IIcK_17 EWCA136-IaK_6 EWCA187-IIcK_18 EWCA031-Ia4_4	<i>Martiodrilus</i> sp. <i>Martiodrilus</i> sp. <i>Martiodrilus</i> sp. Non identifiable Non identifiable	<i>Martiodrilus</i> sp2 et sp4 (20 et 30)
groupe 3	EWCA135-IaK_5	<i>Martiodrilus</i> sp.	
groupe 4	EWCA139-IaK_15	<i>Urobenus</i> sp.	
groupe 5	EWCA143-IaM_3 EWCA145-IaM_5	<i>Martiodrilus</i> sp.	<i>Martiodrilus</i> sp2 (49)
groupe 5	EWCA140-IaK_18	<i>Martiodrilus</i> sp.	<i>Martiodrilus</i> sp3 (29)
groupe 6	EWCA124-IIc6_2	Non identifiable	<i>Nouraguesia</i> sp1 (28)
groupe 7	EWCA146-IaM_6	<i>Martiodrilus tenkatei</i> ?	<i>Martiodrilus tenkatei</i> ?(31)
groupe 8	EWCA170-IIcK_1	Non identifiable	
groupe 9	EWCA077-Ia8_9	Peut-être Enchytraeidae ⁶	
groupe 10	EWCA162-IaB_15	<i>Glossodrilus</i> ?	
groupe 11	EWCA043-Ia6_2	<i>Righiodrilus</i> sp.	
groupe 12	EWCA035-Ia4_8	Peut-être Enchytraeidae	
groupe 13	EWCA076-Ia8_8	<i>Glossodrilus</i>	
groupe 14	EWCA172-IIcK_3 EWCA183-IIcK_14	genre inconnu	
groupe 15	EWCA175-IIcK_6	<i>Pontoscolex</i> sp1	<i>Pontoscolex</i> sp1 (23)
groupe 16	EWCA098-Ia10_2	<i>Neogaster</i> (ou <i>Wegeneriona</i>)	<i>Neogaster</i> sp4 (9)
groupe 17	EWCA047-Ia 6_6	Non identifiable	
groupe 18	EWCA108-IIc1_6	Non identifiable	

⁵ Tous les genres appartiennent à la famille Glossoscolecidae sauf les genres *Neogaster* et *Wegeneriona* qui appartiennent à la famille Octochaetidae. ⁶ Famille des Enchytraeidae.

Plusieurs espèces putatives appartiendraient à différentes espèces du même genre *Martiodrilus* (groupes 2, 3, 5 et 7). Les autres MOTUs appartiennent à des genres différents, parmi lesquels certains sont déjà connus en Guyane française, comme *Nouraguesia* et *Righiodrilus*. Pour le groupe 6 en particulier, l'identification a été approximée grâce aux identifications déjà réalisées par S.W. James pour les vers échantillonnés dans les Nouragues (Guyane française). Un arbre BIONJ a été construit avec les deux jeux de données basés sur le gène COI afin de comparer la position des séquences des vers des deux sites et voir les espèces communes (Annexe 6). La dernière colonne du tableau résume les rapprochements qui ont pu être fait entre les identifications des vers de deux sites. Seules 5 MOTUs sont en commun sur les deux sites : *Pontoscolex corethrurus*, *Pontoscolex* sp1, *Nouraguesia* sp1, *Neogaster* sp4. Les autres MOTUs sont proches (*Martiodrilus*) mais on ne peut affirmer avec certitude qu'ils appartiennent bien au même MOTU.

Parmi les MOTUs identifiés à Cacao, il est intéressant de noter que le groupe 15 appartient au genre *Pontoscolex* mais à une espèce différente de *P. corethrurus* (groupe 1). Une observation minutieuse *a posteriori* des caractères externes au microscope a permis de les différencier morphologiquement (Figure 9). Les soies de la partie caudale du genre *Pontoscolex* sont très caractéristiques : elles sont très développées et réparties de manière irrégulière sur les segments (Moreno, 2004). Les spécimens du groupe 15 présentent toutefois des soies particulièrement crochues, différentes de celles de *P. corethrurus* et de celles décrites pour les différentes espèces de *Pontoscolex* (Moreno, 2004).

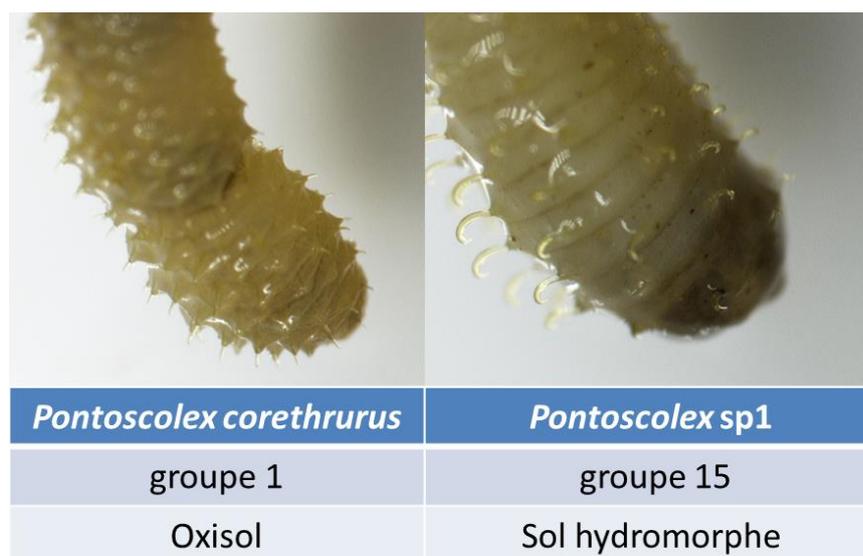


Figure 9. Comparaison des soies de la partie caudale des deux groupes du genre *Pontoscolex*. A gauche, *Pontoscolex corethrurus* (groupe 1) et à droite *Pontoscolex* sp2 (groupe 15). Observations faites au microscope relié à une caméra et un ordinateur.

Les résultats d'identification confortent pour la plupart ceux obtenus pour la délimitation des différentes espèces putatives car ces groupes appartiendraient à des genres différents (groupes 1, 4, 6, 7, 11, 13, 15 et 16). Cependant, pour les groupes 2 et 10, qui sont subdivisés par la méthode GMYC, un doute subsiste quant aux résultats. Pour le groupe 2 en particulier, l'identification de différents vers n'a pas permis d'affirmer qu'ils appartiendraient tous à la même espèce (voir commentaires pour les spécimens IIcK_17 et IIcK_18, Annexe 5). Un échantillonnage complémentaire permettrait de compléter ces résultats si d'autres spécimens (adultes) des mêmes espèces putatives sont échantillonnés et identifiés au niveau de l'espèce.

Enfin, pour les groupes 11 et 17, ainsi que pour les groupes 14 et 18, leur identification morphologique aurait pu permettre de statuer, si les spécimens des groupes 17 et 18 avaient pu être identifiés. Malheureusement, en plus d'être juvéniles, ces spécimens étaient en mauvais état/morceaux.

III-1.3. Synthèse des résultats : délimitation et identification des espèces

Pour cette étude, les différentes méthodes utilisées pour la délimitation d'espèces se sont montrées complémentaires. Leur utilisation en parallèle nous a permis d'affiner les résultats pour les MOTUs. En effet, leur statut a été conforté par l'ensemble des analyses. Seuls les groupes 2, 10, 11, 14, 17 et 18 ont donné des résultats divergents entre les méthodes. Tous les résultats de délimitation d'espèces sont résumés dans la Figure 10.

Pour les groupes 2 et 10, l'hypothèse la plus probable est qu'ils forment chacun une seule MOTU (selon méthodes du seuil et BINs). Quant aux groupes 14 et 18, ils ne formeraient qu'une seule et même espèce (selon méthodes GMYC, seuil et BINs). Pour les groupes 11 et 17, l'hypothèse la plus probable retenue à ce stade est qu'ils correspondent à deux espèces putatives distinctes. D'autres paramètres (génétiques et/ou écologiques) sont nécessaires afin de trancher définitivement quant à leur statut.

En terme d'identification des espèces, un seul MOTU a été formellement identifié taxinomiquement jusqu'à l'espèce : *Pontoscolex corethrurus*. Les autres MOTUs ont soit été identifiés jusqu'au genre, soit n'ont pu être identifiés (i) si l'état des spécimens était mauvais dû à l'échantillonnage manuel sur le terrain ou (ii) ou s'ils n'ont pas pu être affiliés à des genres connus.

Au final, nous avons retenu l'hypothèse que les spécimens échantillonnés lors de la campagne de prospection soient répartis en 17 MOTUs, soit 17 espèces putatives (Figure 10).

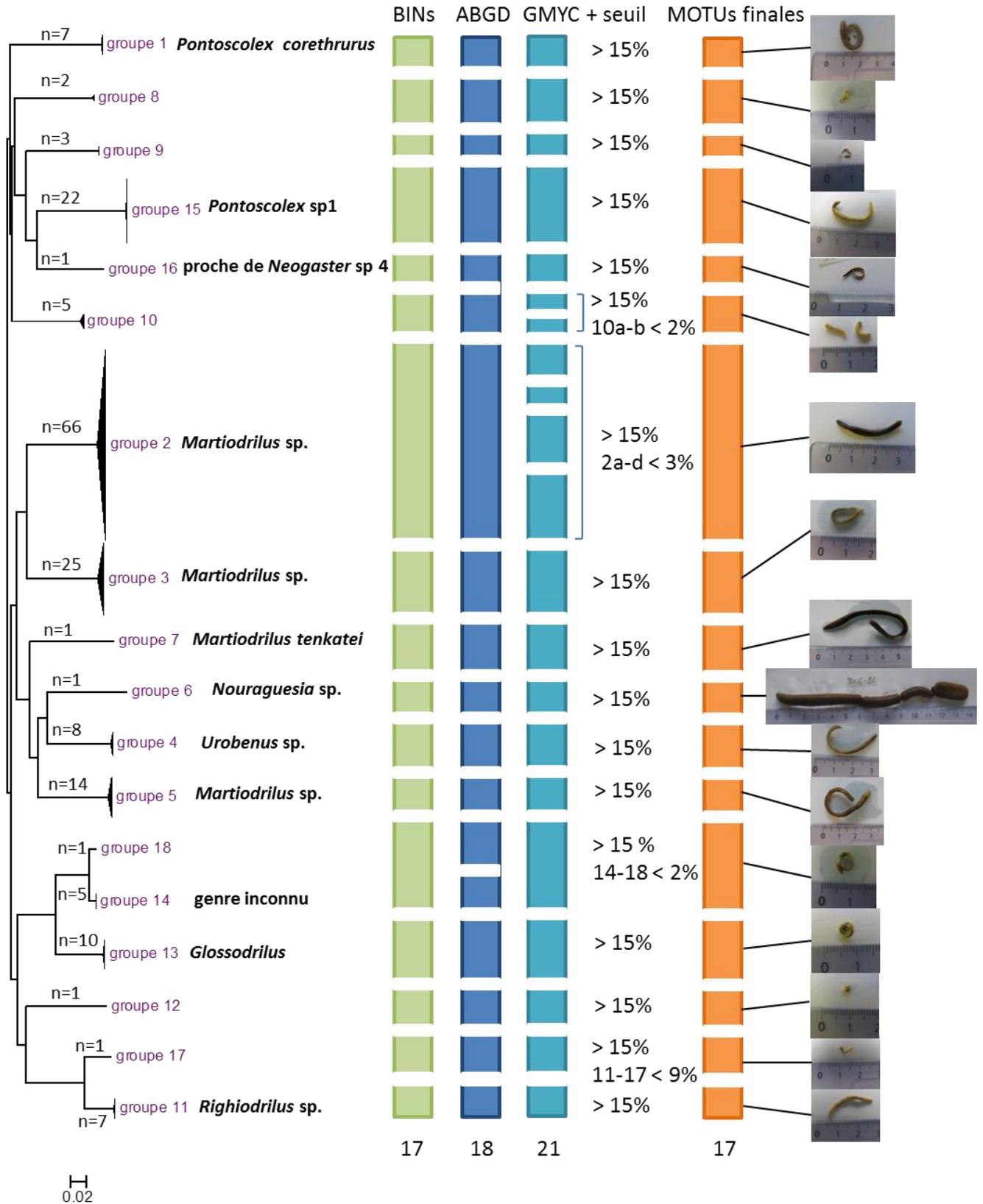


Figure 10. Résultats de délimitation d'espèce obtenus avec le gène COI.

Arbre BIONJ reconstruit par ABGD et annoté avec les identifications au genre réalisées par S.W. James. Comparaison avec les BINs (BOLD Systems) et la méthode GMYC. Des photographies des différents vers de terre illustrent les différents MOTUs.

P. corethrurus est une espèce pérégrine présente sous les tropiques. La retrouver sur un site anthropisé comme celui de Cacao n'est donc pas une surprise, d'autant plus que cette espèce serait originaire du Plateau des Guyanes (Righi, 1984). Il s'agit sûrement de l'espèce la plus décrite morphologiquement, ce qui facilite également son identification.

A ce jour, aucune donnée moléculaire sur les vers de terre guyanais n'est disponible sur BOLD mis à part les données récoltées à partir du site des Nouragues (projet CNRS Nouragues 2011-2012). Ces données nous ont toutefois permis de rapprocher quelques-uns de nos MOTUs à ceux des Nouragues et conforté leur identification. Le peu de MOTUs en communs sur les deux sites semble montrer un fort endémisme des vers en Guyane.

Le nombre de MOTUs peut être obtenu pour chaque site, mais le problème d'identification persiste encore même avec l'outil BOLD System v3. Le projet EWCA, initié avec cette thèse, vient en ce point alimenter la base de données en séquences COI pour les vers de Guyane française.

De plus, cette étude confirme bien que Barcode ADN et taxinomie traditionnelle sont complémentaires. L'identification morphologique permet de mettre un nom sur les spécimens appartenant à différentes MOTUs. Dans le cadre d'une approche taxinomie intégrative, tous les spécimens échantillonnés devraient être identifiés morphologiquement afin de pouvoir inclure ces données dans une méta-analyse de délimitation morphologique, approche qui n'a pas pu être réalisée ici du fait du grand nombre d'individus juvéniles et d'échantillons non exploitables morphologiquement. L'approche de taxinomie intégrative est particulièrement intéressante mais difficilement applicable dans les régions où la diversité est importante, où peu de vers ont encore été séquencés à ce jour, et dans les projets qui nécessitent d'obtenir rapidement des informations sur de gros jeux de données.

Le deuxième objectif de cette étude était de relier la diversité des vers échantillonnés aux conditions du milieu, le sol. Dans la deuxième partie de ce chapitre, le lien est fait entre la diversité des vers de terre et les caractéristiques physico-chimiques des deux types de sols échantillonnés. Seuls les vers de terre échantillonnés par la méthode TSBF sont étudiés dans cette partie. Les vers échantillonnés de manière qualitative ont été exclus, afin de pouvoir estimer l'abondance et la biomasse des vers selon un protocole normalisé (TSBF).

III-2. Lien entre diversité, densité des vers de terre et caractéristiques physico-chimiques des sols étudiés dans le bassin versant de la crique Combat

III-2.1. Analyses physico-chimiques des sols

Les deux types de sol étudiés : un oxisol de haut de pente et un sol hydromorphe de bas-fonds ont été échantillonnés (0-10 cm) à chaque point TBSF des vers et analysés selon les protocoles détaillés dans le chapitre II-5., en collaboration avec le laboratoire LAMA de l'IRD de Cayenne. Les résultats des analyses sont présentés dans les Tableaux 6 et 7.

Tableau 6. Analyses physico-chimiques de l'oxisol I et du sol hydromorphe pour la campagne de juin 2011 (n = 5 ± SD).

Sol (0-10 cm)	Argiles %	Limons %	Sables %	pH H ₂ O	pH KCl	Fe g/kg	Al mg/kg
oxisol I	78,2 ± 0,9	7,6 ± 0,8	14,2 ± 1,3	4,0 ± 0,04	3,7 ± 0,08	102,1 ± 4,6	132,0 ± 13,0
sol hydromorphe	35,7 ± 3,3	47,1 ± 6,9	17,2 ± 7,9	4,28 ± 0,2	3,84 ± 0,2	22,3 ± 9,2	24,0 ± 1,8

Tableau 7. Analyses physico-chimiques de l'oxisol I et du sol hydromorphe pour la campagne de juin 2011 (n = 5 ± SD). L'humidité correspond à l'humidité du sol sur le terrain au moment de l'échantillonnage.

Sol (0-10 cm)	N total %	C total %	C/N	S total %	CEC méq%	Humidité %
oxisol I	0,39 ± 0,05	5,4 ± 0,9	13,5 ± 0,9	0,03 ± 0,01	22,9 ± 3,6	51,1 ± 9,8
sol hydromorphe	0,70 ± 0,38	12,2 ± 8,2	17,2 ± 6,9	0,08 ± 0,07	30,4 ± 15,7	489,5 ± 301,8

Les résultats obtenus sont caractéristiques des deux types de sol étudiés. L'oxisol est riche en argiles, en fer et en aluminium, alors que le sol hydromorphe contient presque autant d'argiles que de limons (Tableau 6). Les données granulométriques des sols nous ont permis de les situer sur le triangle des textures. Ainsi, l'oxisol du haut de pente est argileux et le sol hydromorphe du bas-fond est argilo-limoneux. De plus, le pH des deux sols est acide (environ 4). Ces résultats confortent ceux précédemment obtenus sur le site de la Crique Combat (Guedron, 2008; Harris-Hellal, 2008). En effet, les sols s'appauvrissent en argiles, en fer et en aluminium le long de la toposéquence par transport sous forme particulaire et/ou dissolution dans les nappes. L'effet inverse est observé pour les limons qui sont accumulés dans les bas-fonds et liés à l'altération des minéraux de la roche (Harris-Hellal, 2008).

Les résultats du Tableau 7 montrent que les horizons de surface des deux sols possèdent des quantités de carbone total supérieures à 5% avec un rapport C/N d'environ 15, indiquant une bonne minéralisation de la matière organique. Le sol hydromorphe contient toutefois plus de C et de N totaux que l'oxisol, soulignant les plus faibles teneurs en nutriments des oxisols

(WRB, 2006). Au moment de l'échantillonnage (saison des pluies), l'oxisol contenait 50% d'eau et le bas-fond était complètement gorgé d'eau. Ces conditions hydriques sont favorables à une accumulation de la matière organique dans le sol hydromorphe à cause des conditions d'anaérobie qui ralentissent sa décomposition (Roulet & Grimaldi, 2001).

Les fortes teneurs en fer, en argiles et en carbone mesurées dans les sols guyanais peuvent affecter la fixation et en conséquence la mobilité du mercure dans ces sols, tout comme le pH et les conditions hydriques du milieu. En effet, des complexes peuvent se former entre le mercure et les différents constituants des sols (Roulet & Lucotte, 1995; Guedron *et al.*, 2009).

III-2.2. Analyses du mercure

Toutes les analyses de mercure ont été effectuées au laboratoire selon les méthodes décrites dans le chapitre II. La Figure 11 représente les concentrations en mercure total (A), sa fraction disponible (B), et les différentes fractions du mercure réparties au sein des constituants du sol (C).

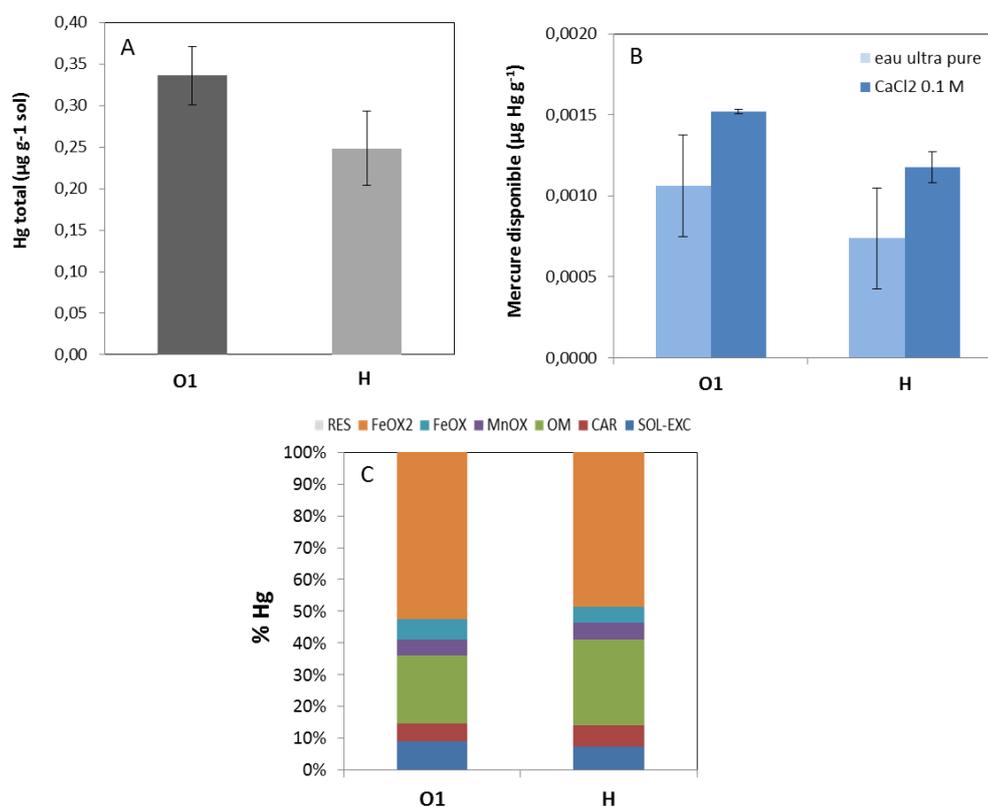


Figure 11. Concentrations du mercure total (A), du mercure disponible (B) et répartition du mercure (C) dans l'oxisol (O1) et le sol hydromorphe (H) (n= 2 à 5, moyennes \pm écart-type).
 SOL-EXC – soluble et échangeable; CAR – carbonates; OM –matière organique; MNOx – oxydes de Mn; FEOX1 – oxydes de Fe amorphes; FEOX2 – oxydes de Fe cristallins.

L'oxisol contient des concentrations en mercure total plus importantes que le sol hydromorphe. Ils contiennent respectivement 0.336 et 0.248 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ sol (Figure 11A). Ces valeurs sont en accord avec les valeurs relevées en Guyane française (Roulet & Grimaldi, 2001) et celles précédemment mesurées sur le site de la Crique Combat (Guedron, 2008; Harris-Hellal, 2008). La concentration plus importante de mercure dans les oxisols avait déjà été observée sur le site en lien avec les teneurs en fer total et en argiles (Harris-Hellal, 2008). Cependant, la mesure des concentrations totales ne suffit pas pour évaluer les risques liés au mercure, car elle ne renseigne pas sur la fraction qui peut potentiellement impacter les organismes (Harmsen, 2007).

La fraction du mercure disponible a été évaluée par une extraction à l'eau et une extraction au CaCl_2 (0.1M). Les résultats montrent que cette fraction représente moins de 1% des teneurs totales dans les deux types de sols. Elle semble plus importante dans l'oxisol (Figure 11B), mais rapportée aux concentrations de mercure total, cette fraction est comparable pour les deux sols et sa concentration est d'environ 1 ng Hg g^{-1} de sol. Même à des concentrations très faibles, le mercure pourrait impacter les organismes, surtout s'il est méthylé dans les conditions d'anoxie qui existent dans les bas-fonds.

Il est intéressant de noter que la répartition du mercure est également très proche dans les deux sols (Figure 11C). La matière organique et les oxydes de fer représentent les deux phases principales fixatrices du mercure sur notre site d'étude (Roulet *et al.*, 1998), représentant plus de 20% et 50% des concentrations de mercure évaluées par extraction séquentielle (Silveira *et al.*, 2006). Cependant, le sol hydromorphe contenant plus de carbone total a en conséquence plus de mercure lié à la matière organique (OM, en vert) ; par contre, l'oxisol, beaucoup plus riche en fer, contient des quantités de mercure lié aux oxydes de fer amorphes et cristallisés plus importantes (FeOX, en bleu et FeOX2 en orange).

Tant que le mercure est fixé à ces phases dans l'oxisol et dans le sol hydromorphe, il est peu disponible et sa toxicité limitée (Gabriel & Williamson, 2004). L'activité biologique et en particulier bactérienne dans les sols est la plus importante dans les horizons de surface, où s'accumule le mercure (Harris-Hellal, 2008; Harris-Hellal *et al.*, 2010). Dans ces horizons, la matière organique peut ainsi être dégradée par les organismes du sol, et le fer solubilisé par les bactéries ferri-réductrices (Harris-Hellal *et al.*, 2010). Le mercure associé se retrouve alors mobilisé et pourra être méthylé par ces mêmes bactéries présentes dans les bas-fonds (Kerin *et al.*, 2006).

III-2.3. Propriétés des sols et répartition des vers de terre sur le terrain

L'échantillonnage des vers par TSBF a permis d'évaluer l'abondance (N) et la biomasse (B) totales des vers présents sur le site, ainsi que d'estimer la répartition des vers selon les espèces putatives délimitées dans la première partie du chapitre. Les valeurs moyennes de n et B pour les 10 TSBF sont présentées pour chaque sol dans le Tableau 8.

Tableau 8. Abondance et biomasse moyennes des vers de terre en comparaison dans les deux types de sols échantillonnés (n=10, moyennes \pm écart-type). Les lettres différentes en colonne signifient un effet significatif du type de sol sur les vers ($p < 0.05$, Kruskal wallis).

par m ²	Juvéniles		Adultes		Total	
	N	B (g)	N	B (g)	N	B (g)
Sol (0-10 cm)						
Oxisol	34,8 \pm 1,6 a	1,5 \pm 0,1 a	5,6 \pm 0,6 a	3,0 \pm 0,8 a	40,4 \pm 15,6 a	4,5 \pm 7,5 a
Sol hydromorphe	15,6 \pm 3,1 b	0,6 \pm 0,1 b	1,6 \pm 0,3 a	2,8 \pm 0,8 a	17,2 \pm 31,8 b	3,4 \pm 8,0 b

L'abondance et la biomasse moyennes des vers est plus importante dans l'oxisol. Ce sol contient cependant plus de mercure total que le sol hydromorphe. D'autres facteurs que la teneur en mercure total dans les sols étudiés doivent influencer la répartition des vers sur le terrain. Parmi ces facteurs, les différentes répartitions du mercure dans les deux sols et les différentes formes chimiques de mercure (plus ou moins toxiques) peuvent être citées. En effet, la rétention du mercure sur les surfaces minérales et sur la matière organique est très importante. Cependant, la capacité de chacun des constituants à fixer le mercure dépend des conditions pédogéochimiques dans les différents types de sol (Roulet & Grimaldi, 2001). Ces conditions sont de plus particulièrement favorables à la méthylation du mercure dans les bas-fonds, forme la plus toxique du mercure pour tous les organismes y compris les vers de terre. La présence de méthylmercure pourrait donc impacter les vers de terre dans les sols hydromorphes.

Les quantités de nutriments disponibles dans les sols peuvent également influencer la répartition des vers *in situ* (Lavelle & Spain, 2001). Les sols tropicaux sont particulièrement concernés par les déficiences en nutriments lié à l'érosion et à la lixiviation intenses dus aux conditions climatiques intenses sur de longs périodes de temps (i.e. sur des millions d'années). Les vers de terre sont également sensibles à la qualité de la litière (Edwards, 2004).

Par ailleurs, bien que l'échantillonnage ait été effectué en saison des pluies, saison la plus propice pour les vers, la proportion de juvéniles échantillonnés était beaucoup plus importante que celle des adultes.

La Figure 12 représente l'abondance et la biomasse totales des vers échantillonnés, en fonction cette fois des espèces putatives délimitées précédemment. Les espèces putatives 14 et 18 sont considérées ici comme une seule espèce. De plus, l'espèce putative 7 n'est pas présentée car ce groupe n'a été échantillonné que qualitativement. Ce sont donc **16 espèces putatives** qui ont été échantillonnées par la méthode TSBF.

Parmi toutes les espèces putatives échantillonnées, **5 espèces putatives** sont retrouvées **dans le sol hydromorphe et 12 dans l'oxisol** (Figure 12A). L'oxisol renferme donc une diversité spécifique plus importante que dans le sol hydromorphe. De plus, 4 espèces putatives de vers de terre se retrouvent exclusivement dans le sol hydromorphe (groupes 6, 8, 14+18, et 15) et 11 exclusivement dans l'oxisol (groupes 1, 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 16 et 17). Il est intéressant de noter que le groupe 2 est présent dans les deux types de sol ; il est toutefois présent de manière plus abondante dans l'oxisol (Figure 12C).

L'écart entre la biomasse totale entre les deux sols est moins important que pour l'abondance. La biomasse totale du groupe 5 est la plus importante dans l'oxisol, alors que c'est le groupe 6 dans le sol hydromorphe (Figure 12B). On remarque que cela est dû à quelques individus présentant une biomasse importante (Figures 12C et 12D).

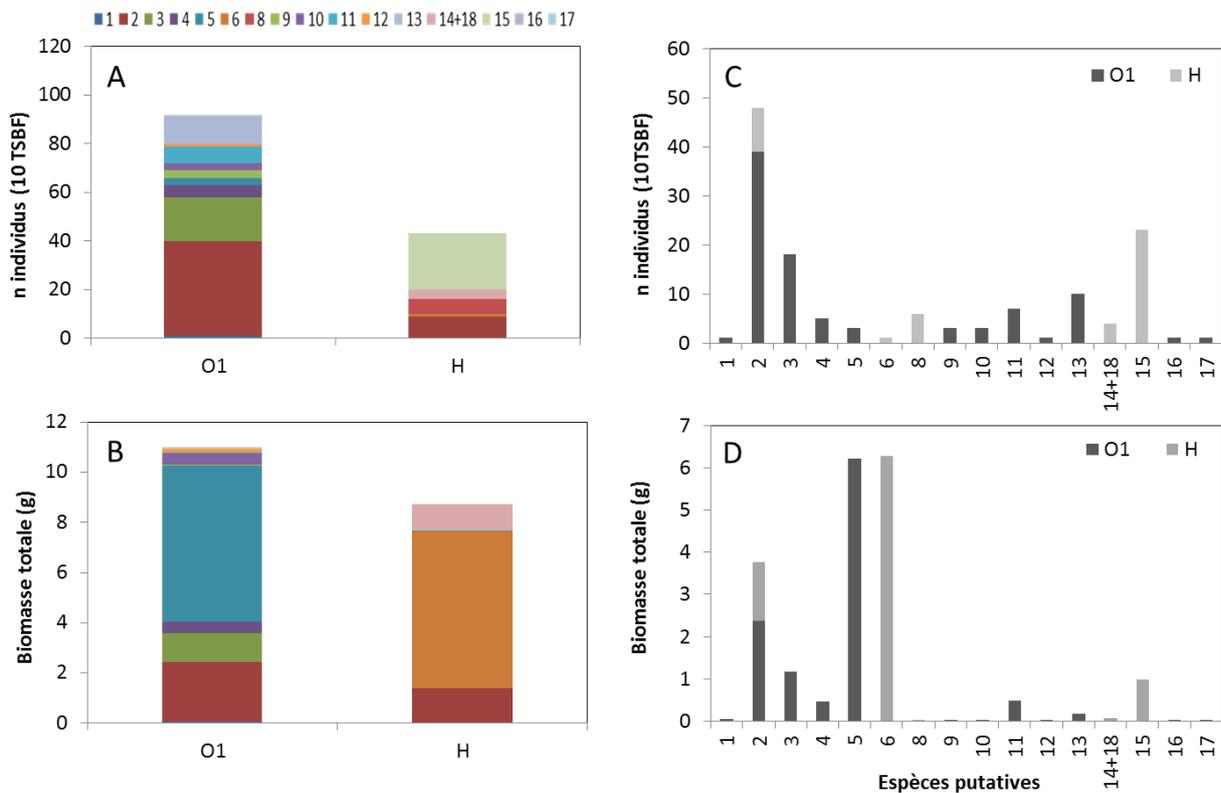


Figure 12. Abondance (A) et biomasse (C) totales des différentes espèces cumulées (A et C) et des espèces putatives présentées séparément (B et D) pour chaque type de sol : oxisol I (O1) et sol hydromorphe (H).

Afin de visualiser quels sont les paramètres du sol qui influencent le plus la répartition des vers sur le site étudié, une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée avec toutes les variables mesurées dans les deux sols (Figure 13).

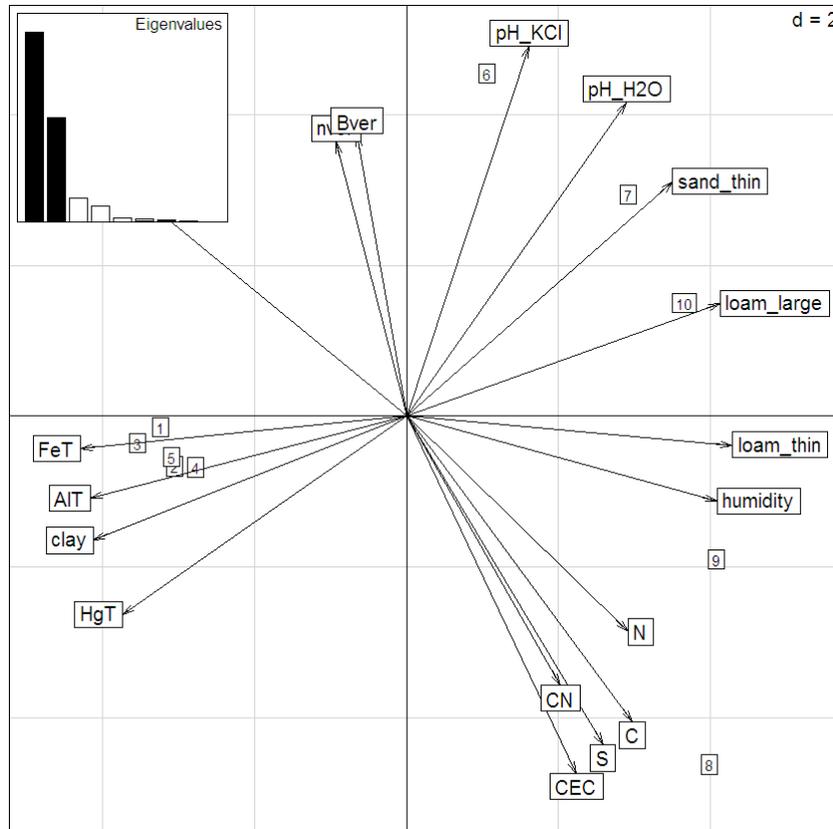


Figure 13. Projection des variables mesurées lors de la campagne d'échantillonnage de juin 2011 sur les axes 1 et 2 par l'analyse ACP.

Variabes : HgT – Hg total, clay – argiles, FeT –fer total, AIT – aluminium total, Bver – biomasse totale, nver – abondance totale, pH_KCl et pH_H₂O – mesures de pH, sand_thin et sand_large – sables fins et grossiers, loam_thin et loam_large – limons fins et grossiers, humidity – humidité, C, N et S – teneurs totales en C, N et S, CN – rapport C/N.

La Figure 13 représente la projection des variables sur les deux composantes principales de l'analyse par ACP. Les axes 1 et 2 représentent 54 et 30 % de la variabilité respectivement. L'axe 1 est expliqué principalement par les teneurs en carbone, en azote et le pH, et l'axe 2 par les composantes texturales des sols, le fer et l'aluminium. Sur cette figure, les variables « nver » et « Bver » correspondent respectivement à l'abondance et à la biomasse totale des vers. Ces variables « vers » sont négativement corrélés aux valeurs de C, N, C/N, S, et à la CEC.

La variable « mercure total » (HgT) est corrélée au fer total (FeT), à l'aluminium total (AlT) et aux teneurs en argiles (clay) dans les deux sols guyanais. Le mercure ne semble pas corrélé ici aux teneurs de carbone. Ces résultats confirment bien ce que l'on connaît déjà sur la fixation du mercure dans les sols tropicaux. Le mercure déposé à la surface des sols peut être adsorbé sur les surfaces minérales (i. e. oxydes de fer et argiles) (Roulet & Grimaldi, 2001; Guedron, 2008; Harris-Hellal, 2008).

La répartition des vers sur le terrain ne semble pas ici corrélée aux quantités de mercure total (HgT). La mesure des concentrations totales des ETM est cependant insuffisante pour évaluer leur impact sur les vers de terre, dû aux nombreux paramètres biotiques et abiotiques qui existent sur le terrain. Il est donc nécessaire d'évaluer la biodisponibilité afin de comprendre l'exposition réelle des organismes aux ETM (Lanno *et al.*, 2004).

Les données des extractions chimiques (simples et séquentielles) pourraient peut-être expliquer la répartition des vers sur le site. Bien que de telles extractions aient été effectuées, ces données n'étaient pas suffisantes dans cette étude pour être intégrées dans une ACP pour les deux sols (n=2). Des analyses complémentaires permettraient d'affiner ces résultats. Dans le cas du mercure, ces données sont d'autant plus essentielles que le mercure mobilisé peut être méthylé et s'accumuler dans les chaînes trophiques (Boudou & Ribeyre, 1997), et dans les vers de terre (Ernst *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Rieder *et al.*, 2011).

Bien que la répartition globale des vers ne soit pas liée aux concentrations de mercure total, plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la répartition des vers dans les différents types de sol. La plupart des espèces putatives sont retrouvées préférentiellement sur un type de sol (Figure 12) ; il semblerait donc que la répartition des vers soit spécifique pour chaque espèce putative. Certaines espèces ont besoin d'éléments précis pour leur développement, ce qui peut expliquer le fait qu'elles ne peuvent proliférer dans d'autres conditions (Lukkari *et al.*, 2004). La quantité de nutriments dans les sols peut être un facteur limitant pour les vers de terre et les autres invertébrés du sol, en particulier la matière organique et les quantités de N et P associées (Barois *et al.*, 1999; Edwards, 2004). Les populations de vers de terre peuvent de plus être influencées par les autres organismes du sol dont l'activité peut affecter les conditions du milieu et les ressources en nourriture (prédation et/ou compétition). Enfin, les paramètres abiotiques tels que la température, l'humidité, et le pH sont fondamentaux pour expliquer la présence ou non de certaines espèces sur le terrain selon leur sensibilité (Edwards, 2004).

Afin de visualiser les paramètres du sol influençant le plus la répartition des vers de chaque MOTU, une nouvelle analyse en composante principale (ACP) a été réalisée avec ces données. La Figure 14 représente la projection des variables sur les deux composantes principales de l'analyse par ACP avec l'abondance des vers pour chaque MOTU. Les axes 1 et 2 représentent 43 et 22 % de la variabilité respectivement. Comme pour la Figure 13, l'axe 1 est expliqué principalement par les teneurs en carbone, en azote et le pH, et l'axe 2 par les composantes texturales des sols, le fer et l'aluminium. Sur cette Figure, les variables « m1 » à « m17 » correspondent à l'abondance (n) de chaque MOTU avec les mêmes numéros de MOTUs délimités dans la première partie de cette étude.

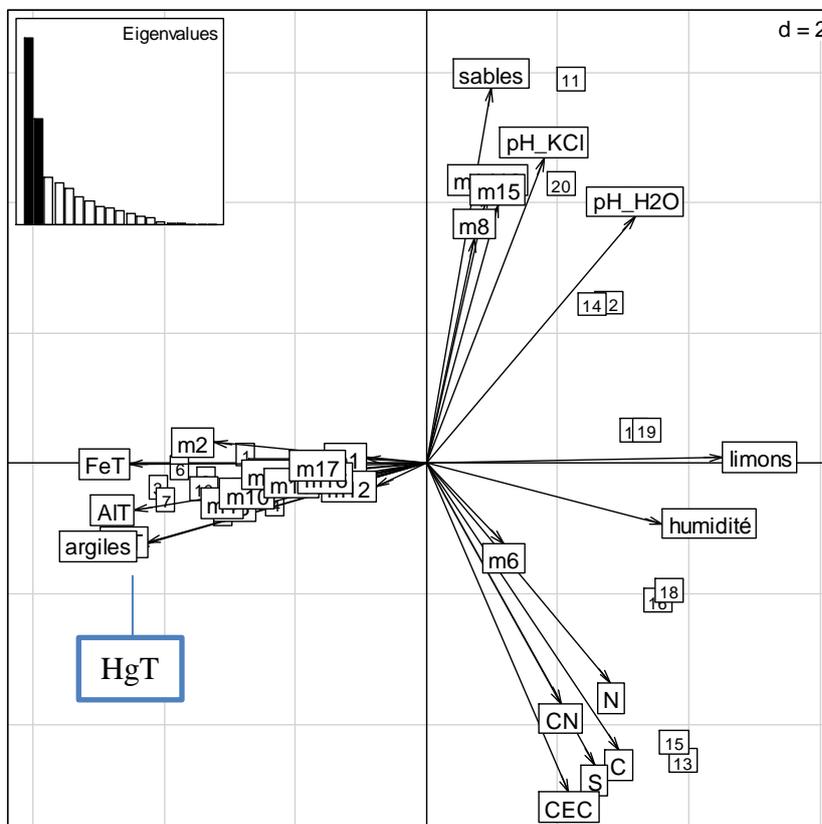


Figure 14. Projection des variables mesurées lors de la campagne d'échantillonnage de juin 2011 sur les axes 1 et 2 par l'analyse ACP.

Les variables « m1 » à « m17 » correspondent aux MOTUs délimités sur le site d'étude.

Variables : HgT – Hg total, clay – argiles, FeT –fer total, AIT – aluminium total, Bver – biomasse totale, nver – abondance totale, pH_KCl et pH_H2O – mesures de pH, sand_thin et sand_large – sables fins et grossiers, loam_thin et loam_large – limons fins et grossiers, humidity – humidité, C, N et S – teneurs totales en C, N et S, CN – rapport C/N.

L'ACP montre que l'abondance de chaque MOTU est corrélé ou non à différents paramètres du sol et les paramètres sont regroupés en trois clusters différents. La MOTU 6 (m6) est la seule corrélée aux teneurs de C, N et de S dans ces sols. Les MOTUs 8, 15 et 14+18 sont quant à elles regroupés et corrélés au pH du sol (H₂O et KCl) et aux quantités de sables des sols. On remarque que ces 4 MOTUs sont retrouvés exclusivement dans le sol hydromorphe de bas-fonds, et que dans ces conditions hydriques particulières, ce sont les paramètres chimiques qui semblent les plus importants. Toutes les autres MOTUs ont été échantillonnées dans l'oxisol ; elles se retrouvent plutôt au centre de l'analyse ce qui signifie qu'elles sont peu influencées par les paramètres des sols. Ces MOTUs sont toutes groupées vers les variables fer total (FeT), aluminium total (AlT), les teneurs en argiles et en mercure total (HgT).

Les concentrations en mercure total (HgT) étant corrélées à celles du fer, de l'aluminium et des argiles, les MOTUs de l'oxisol sont positivement corrélés aux teneurs de mercure. Cependant il n'est pas possible à ce stade de différencier l'effet du mercure des autres paramètres.

Différents paramètres pourraient expliquer le nombre important de MOTUs présents dans l'oxisol et leur corrélation avec ces paramètres physico-chimiques particuliers (Fe, Al et argiles). On peut citer d'abord la faible disponibilité du mercure dans les milieux oxydés, où les oxydes de fer sont stables. Ensuite, les formes chimiques du mercure pourraient être moins toxiques dans ce sol bien drainé que dans les bas-fonds hydromorphes. Enfin, les vers pourraient présenter une relative adaptation au mercure car l'accumulation du mercure dans les sols guyanais se fait depuis des millions d'années.

Conclusions et perspectives

En général, les effets potentiels des contaminants sur les vers de terre et plus généralement sur les organismes du sol sont difficiles à vérifier *in situ* (Chapman & Wang, 2000; Chapman *et al.*, 2002; Klok & Kraak, 2008). Il existe une multitude de paramètres biotiques et abiotiques qui influencent simultanément la présence et l'abondance des espèces. Sur un site contaminé, l'absence d'une espèce donnée n'est pas forcément liée à la toxicité des contaminants (Chapman *et al.*, 2002). Afin de s'affranchir des contraintes liées aux études *in situ*, une analyse simultanée de tous les facteurs environnementaux mesurés est nécessaire afin de différencier les effets liés à la contamination des sols de ceux liés aux autres facteurs environnementaux (Van Straalen, 2003; van Straalen & van Gestel, 2008; Loos *et al.*, 2010).

Dans ce sens, des études ont été menées afin d'évaluer l'impact de différents contaminants sur les organismes du sol (van Straalen, 2002; Khalil *et al.*, 2009; Kools *et al.*, 2009; Loos *et al.*, 2010).

En Guyane française, la présence de mercure dans les sols tropicaux étudiés ne peut être ignorée et en conséquence sa possible influence sur l'abondance, la biomasse et la diversité des vers de terre présents. Les concentrations de mercure présentes dans les sols et en particulier sa fraction disponible peuvent impacter directement les vers de terre. Probablement, seules les espèces les plus résistantes peuvent être trouvées dans ces niches écologiques particulières comme les sols des bas-fonds. Un des mécanismes de résistance mis en évidence dans les sols contaminés est la sélection de nourriture par les vers (Depta *et al.*, 1999), qui varie selon les différentes catégories écologiques (Ernst *et al.*, 2008).

La sensibilité des vers de terre aux polluants est variable et peut être expliquée par (1) les différences écologiques des différentes espèces et leur habitudes alimentaires (i.e. catégories écologiques), et (2) les caractéristiques physiologiques spécifiques à chaque espèce. Par exemple, dans les sols contaminés du Nord de la France, *Aporrectodea caliginosa* semble être un bon indicateur car son abondance diminue quand la pollution des sols augmente (Nahmani *et al.*, 2003). La présence d'éléments traces métalliques a également causé la disparition des espèces endogées et une réduction de la densité des espèces épigées (Nahmani *et al.*, 2003). L'étude récente de Pérès *et al.* (2011) n'a cependant pas pu relier l'abondance des vers mesurée sur le terrain aux niveaux de contaminations métalliques, que ce soit pour les concentrations totales ou pour la fraction disponible mesurées. Lanno *et al.* (2004) recommandent que la disponibilité soit évaluée en même temps par des méthodes chimiques (extractions) et biologiques (bioaccumulation).

Dans notre étude, l'abondance ainsi que la diversité des vers de terre était plus importantes dans l'oxisol que dans le sol hydromorphe du bas-fond. Néanmoins, il est très intéressant de souligner la présence de vers de terre dans ce dernier, en particulier quand on sait que le mercure est méthylé préférentiellement dans des conditions d'anoxie telles qu'elles existent dans de telles conditions hydriques. Dans le sol hydromorphe, on peut donc potentiellement trouver des concentrations de méthylmercure plus importantes, responsables d'une plus grande toxicité de cet élément. Des analyses de méthylmercure sont nécessaires dans ces sols afin de vérifier ces hypothèses.

Les limites de cette étude doivent également être prises en compte. En effet, cette étude ne comporte que peu de points d'échantillonnage, sur une seule saison, ainsi qu'une seule méthode de collecte (manuelle). De plus, un seul gène a été étudié : le gène COI. Les analyses ADN d'autres gènes en plus du gène COI pourraient affiner les résultats pour le groupe 2 et confirmer ceux obtenus pour tous les autres groupes. Des données moléculaires supplémentaires seront bientôt disponibles sur toute la Guyane française (différents projets en cours), avec lesquelles nos données pourront être comparées. En plus des données génétiques, des analyses morphologiques sur tous les spécimens de chaque MOTU délimité pourraient être réalisées. Dans le cadre de taxinomie intégrative, d'autres critères tels que la pigmentation des vers pourraient être pris en compte dans des études futures.

Tout ceci peut jouer sur le fait que les espèces délimitées ne soient pas tout à fait représentatives de la diversité et de la répartition réelle des vers de terre dans ces milieux. Ces résultats ont cependant le mérite d'être les premiers obtenus sur le site de la Compagnie Minière (CMB), près de Cacao et ouvrent des perspectives intéressantes quant à l'étude de la diversité des vers de terre sur un site impacté par le mercure en Guyane française.

Suite à cette première étude exploratoire, un échantillonnage plus important (3 sols x 3 placettes x 5 TSBF) a été effectué sur le même site, et sur plusieurs saisons (début de la petite saison des pluies, fin de la petite saison des pluies et grande saison des pluies), avec pour objectif principal d'évaluer l'impact du mercure sur la répartition des vers de terre *in situ*. Ce travail fait partie de l'ANR INTERCONNECT et est présenté sous forme d'un projet de recherche (à la page suivante). L'ANR ayant commencée après la thèse, ce travail exploratoire a permis de fixer les méthodes d'échantillonnages et d'analyses des vers de terre, ainsi que de constituer une banque de séquences COI des vers présents sur le site de Cacao.

Ce travail de terrain a permis de choisir une espèce de ver en particulier pour des expérimentations au laboratoire en conditions contrôlées. En effet, une seule espèce sur le site d'étude a pu être formellement identifiée : *Pontoscolex corethrurus*. C'est cette espèce endogée tropicale qui a été utilisée pour une étude écotoxicologique dans le but de tester sa résistance au mercure dans l'oxisol 1 où elle a été échantillonnée (chapitre IV), ainsi que pour une étude d'impact sur la mobilité du mercure (chapitre V).

Projet de recherche : ANR INTERCONNECT (2012-2015)



La diversité des vers de terre *in situ* dans différents sols contaminés au mercure.

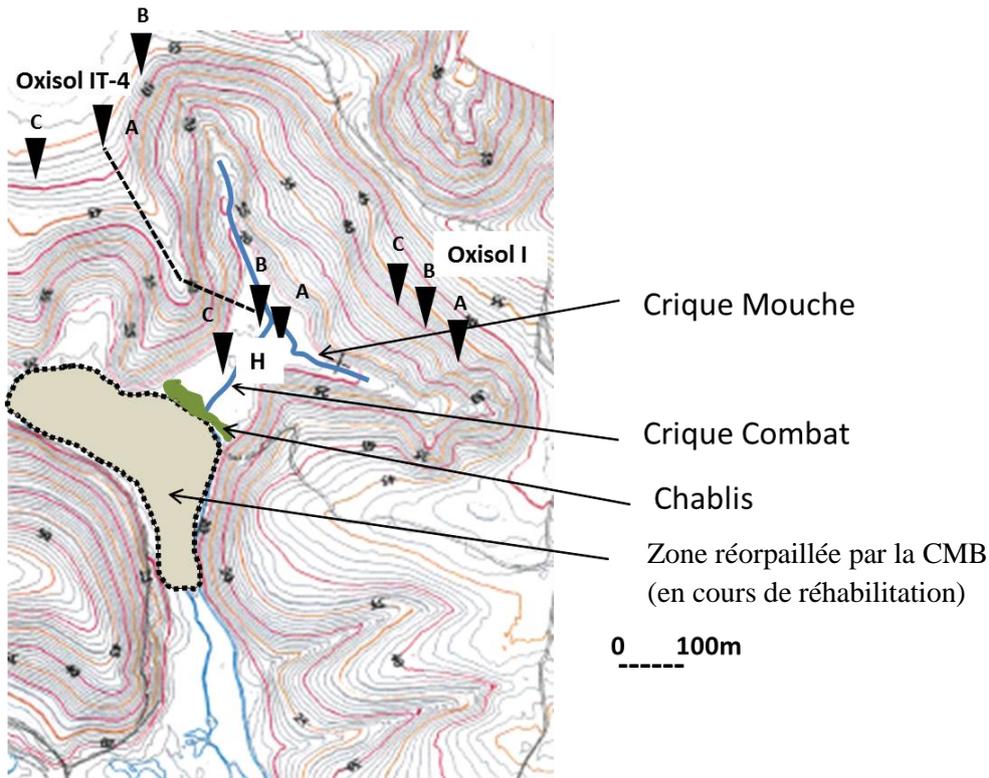
Introduction

Suite au travail préliminaire effectué dans cette thèse, une étude sur la diversité des vers a été développée sur le site de Cacao dans le cadre de l'ANR INTERCONNECT qui a débutée en 2012. Le travail de délimitation d'espèces suite à la première campagne d'échantillonnage a permis d'évaluer la diversité des vers de terre sur le site. Afin de lier cette diversité aux paramètres du sol et en particulier aux teneurs de mercure présentes sur deux types de sols en Guyane française, un échantillonnage complet a été effectué à différentes saisons. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact du mercure sur la diversité et la répartition des vers de terre *in situ*.

Matériels et méthodes

Trois campagnes de terrain nous ont permis d'échantillonner les vers à différentes saisons sur l'année 2012-2013. L'échantillonnage de la fin novembre 2012 correspond à la fin de la saison sèche et au tout début de la saison des pluies. En février 2013, la saison des pluies se termine et les sols sont très humides. Enfin en juin 2013, l'échantillonnage est à nouveau en fin de grande saison des pluies. L'échantillonnage des vers a été effectué selon un protocole normalisé : la méthode TSBF (Anderson & Ingram, 1993). Deux oxisols situés sur différents versants du bassin et avec des teneurs en mercure différentes, ainsi que dans les bas-fonds hydromorphes ont été échantillonnés afin d'évaluer la densité et la diversité des vers présents.

A chaque campagne d'échantillonnage, et pour chacun des trois sols étudiés, 3 placettes de 5 monolithes chacune ont été prélevées, soit 15 monolithes par sol et 45 monolithes au total pour chaque campagne. Chaque placette (notée A, B et C) est distante de la suivante d'environ 60 mètres. Les 5 monolithes de chaque placette sont distants entre eux de 5 mètres (Figures 1 et 2). De plus, le sol de chaque point a été collecté afin d'effectuer des analyses physico-chimiques, de déterminer l'humidité au moment de l'échantillonnage, ainsi que mesurer les concentrations de mercure total, soluble et sa répartition dans les différentes phases du sol. Les méthodes analytiques utilisées dans ce projet sont les mêmes que celles détaillées dans le chapitre II.



45 TSBF échantillonnés en nov-décembre 2012 et février 2013
: 9 placettes ▼ de 5 TSBF

Figure 1 : Carte topographique du site d'étude de la Crique Combat et points d'échantillonnage. H = sol hydromorphe. Chaque placette est notée A, B et C.

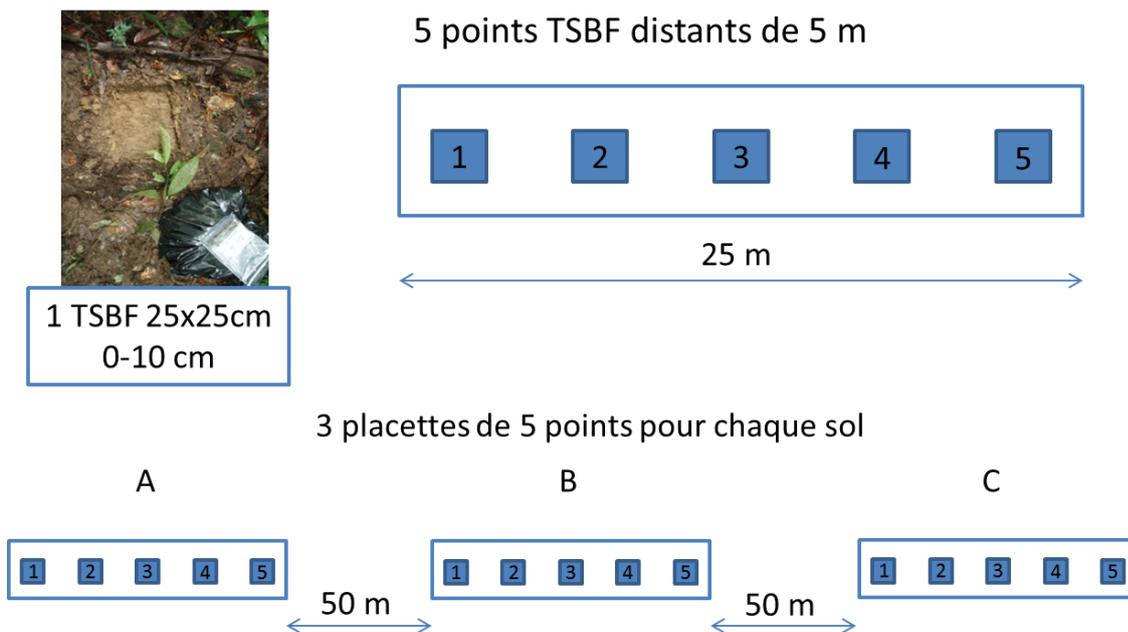


Figure 2 : Schéma de l'échantillonnage « TSBF » des vers de terre et du sol associé.

Les analyses statistiques prévues avec l'ensemble des résultats seront effectuées avec le logiciel R (R Development Core Team, 2008). Des corrélations et des analyses en composante principale (ACP) seront effectuées avec les données physico-chimiques des sols (humidité, pH, C, N, granulométrie, Fe, Al), les analyses de mercure (total, soluble et répartition) et les données sur les vers (densité, biomasse et diversité) telles que proposées dans les approches d'écologie du stress (Van Straalen, 2003; van Straalen & van Gestel, 2008).

Résultats et valorisation attendus

1. Abondance et diversité des vers de terre différentes dans deux oxisols ayant des propriétés physico-chimiques identiques mais des concentrations en mercure total différentes.
2. Diversité des vers de terre différente dans deux conditions hydriques contrastées sur le site : deux oxisols bien drainés et un sol hydromorphe de bas-fonds, conditions ayant un impact sur la mobilité du mercure sur le site.
3. Evaluation de la diversité des vers de terre sur le site à différentes saisons, avec trois campagnes d'échantillonnage sur une année.
4. Evaluation des changements de mobilité du mercure sur le site par des mesures des teneurs en mercure sur le site à chaque campagne d'échantillonnage.

Chapitre IV
Impact du mercure sur un ver tropical endogé

Introduction

Dans les sols ferrallitiques guyanais, le mercure est généralement fixé sur différents composants du sol et majoritairement sur la matière organique et les oxydes de fer. Cependant, les phénomènes de pédogénèse ainsi que les activités anthropiques (e.g. orpaillage, déforestation, industries) peuvent conduire à l'altération et au remaniement des sols, facilitant la mobilisation du mercure du sol vers les cours d'eau. Ce mercure rendu disponible constituerait le substrat pour la méthylation, catalysée par des bactéries ferri- et sulfato-réductrices en condition anaérobies (Fleming *et al.*, 2006; Kerin *et al.*, 2006) avec des risques d'accumulation de méthylmercure dans la chaîne trophique (Boudou & Ribeyre, 1997).

Le mercure, élément toxique, est susceptible de perturber le fonctionnement de la faune et de la microflore du sol et d'induire des perturbations dans le déroulement des cycles biogéochimiques majeurs tels que ceux du carbone, d'azote ou du phosphore. Si différents auteurs se sont accordés sur l'importance des quantités de mercure disponible pour les organismes du sol dans ces perturbations (Edwards *et al.*, 1998; Hinton & Veiga, 2002), très peu ont tenté d'évaluer ces quantités sur les vers de terre, organismes ingénieurs du sol (Lock *et al.*, 2001; Lapinski & Rosciszewska, 2008). Enfin, la majorité des études portant sur l'impact du mercure sur les vers de terre a été réalisée avec l'espèce modèle *Eisenia fetida*. De plus, les sols utilisés pour ces études sont soit des sols artificiels soit des sols des régions tempérées, et aucune ne s'est intéressée aux sols tropicaux où la problématique mercure est une réalité et une préoccupation environnementale de premier plan, en particulier en Guyane française.

Dans ce contexte, l'objectif de ce chapitre a été d'évaluer l'impact d'un apport de mercure exogène sur une espèce de vers tropicale : *Pontoscolex corethrurus*, espèce endogée présente sur notre site d'étude. Les sols utilisés proviennent du site d'étude : site de la Crique Combat, situé près du village de Cacao en Guyane française (voir chapitre II). Les quantités de mercure ajoutées sont des quantités que l'on peut retrouver dans l'environnement, en particulier près de sites miniers (Durao *et al.*, 2009; Guedron *et al.*, 2009; Santos-Francés *et al.*, 2011).

Résumé

Le mercure figure parmi les polluants les plus dangereux du à sa toxicité et à sa bioaccumulation dans les chaînes trophiques. Dans les forêts tropicales amazoniennes, les activités anthropiques telles que les activités minières (orpaillage) et les combustions de charbon ont augmenté les concentrations de mercure dans les sols, modifié sa mobilisation et induit des contaminations locales importantes. Afin d'évaluer les risques liés à ces contaminations pour les organismes du sol, l'accumulation et les effets toxiques du mercure ont été déterminés sur le ver de terre tropical *Pontoscolex corethrurus* pendant 56 jours. Le test de toxicité a été mis en place avec un sol tropical naturel (oxisol) dopé au mercure sous forme HgCl_2 (de 5 à 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ sol) en conditions contrôlées. Alors que les quantités de mercure accumulées dans les vers de terre ont augmenté avec les concentrations de mercure dans le sol, la mortalité, la biomasse et la production de cocons ont été affectées uniquement aux concentrations les plus importantes (50 et 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ sol). Ces résultats ont confirmé la tolérance de *P. corethrurus*.

Mots-clés: mercure, toxicité, bioaccumulation, sol tropical, Guyane française, *Pontoscolex corethrurus*.

Article 1

Article en phase finale de rédaction pour soumission à *Environmental Pollution*

Toxicity of mercury to the earthworm *Pontoscolex corethrurus*
in a tropical soil of French Guiana

Elodie Da Silva¹, Johanne Nahmani², Emmanuel Lapied³, Vanessa Alphonse¹, Evelyne Garnier-Zarli¹, Nouredine Bousserhine¹

¹ Equipe Interactions BIOlogique dans les Sols, UMR BIOEMCO. Université Paris Est Créteil, 61 Avenue du Général de Gaulle, 94010 Créteil cedex, France.

² Centre de Recherche en Ecologie Fonctionnelle et Evolution (CEFE), Montpellier, France.

³ Norwegian University of Life Sciences (UMB), Bioforsk, Soil and Environment, Norway.

*Corresponding author:

Elodie da Silva

UMR BIOEMCO, Equipe IBIOS, Université Paris Est Créteil, 61 Avenue du Général de Gaulle, 94010 Créteil cedex, France.

Email: elodie.da-silva@u-pec.fr

Tél: + 33 6 17 63 30 17

Abstract

Mercury is one of the most hazardous environmental pollutants due to its toxicity and bioaccumulation in the trophic chains. In the Amazonian tropical forests, human activities especially gold mining and coal burning, has increased the levels of mercury in soil, modified its mobilization and locally induced acute contamination. In order to evaluate the threat of such contamination for soil organisms, accumulation and toxic effects of mercury on the geophagous tropical earthworm *Pontoscolex corethrurus* was assessed during 56 days. The toxicity test was done using a natural tropical soil amended with HgCl₂ (from 5 to 100 µg g⁻¹ soil) under controlled conditions. While Hg body burden exponentially increased with the increasing Hg concentration in soil, mortality, growth and cocoon production were affected only at the highest concentrations (50 and 100 µg g⁻¹ soil), confirming the very broad tolerance of this species.

Keywords: mercury, toxicity, bioaccumulation, tropical soil, French Guiana, *Pontoscolex corethrurus*.

1. Introduction

Mercury is considered as one of the top ten chemicals of major public health concern by WHO due to its toxicity and bioaccumulation in the trophic chains (Boening, 2000; UNEP, 2013). Human activities, especially gold mining and coal burning, has increased the mercury contamination of terrestrial environments (Anderson, 1979; Nriagu, 1989; Wasserman et al., 2003). In the Amazonian tropical forests, where gold mining activities locally induced acute mercury contamination, Hg concentrations ranged from 20 ng Hg g⁻¹ soil to more than 500 µg Hg g⁻¹ soil, from naturally rich Hg soils to highly contaminated sites (Roulet and Grimaldi, 2001; Durao et al., 2009; Santos-Francés et al., 2011).

The impact of mercury has been more extensively studied in the aquatic ecosystems where bioaccumulation in fish species and biomagnification along the aquatic food chains had been shown in several works, leading to environmental and health damages (Grimaldi et al., 2001; Charlet and Boudou, 2002). Indeed, local populations are intoxicated through their consumption of fish, in particular carnivorous or piscivorous species which can accumulate high mercury concentrations, exceeding the safety level of 0.5 µg Hg g⁻¹ (fresh wt) (Roulet and Grimaldi, 2001; Boudou et al., 2006). To date, the impact of mercury in soils have been less studied (Harris-Hellal et al., 2009) although they represent the most important sinks and therefore sources of mercury in the environment (Anderson, 1979).

To assess the threat of metal contamination to biota, experiments were carried out under controlled conditions using fauna such as earthworms in laboratory bioassays. Because of their relatively large biomass (Edwards, 2004), earthworms provide a significant food source for many species of predators, making them a potential route for metal contamination out of the soil and into higher organisms (Hopkin, 1989; Karaca, 2011). In terrestrial ecosystems, ecotoxicological studies have mostly focused on toxic compounds such as Cd, Cu, Zn, Pb concerning soil fauna (Nahmani et al., 2007b), but much less on mercury (Hg) which is widely present in tropical soils.

Furthermore, studies have been carried out on a limited number of earthworm's species, mainly *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* (Bouché, 1972) (Spurgeon et al., 2003; Nahmani et al., 2007a, 2007b). Indeed, these epigeic species from the complex *Eisenia* are model organisms in the international toxicity tests (Nahmani et al., 2007a, 2007b). While these epigeic species have been chosen as model organisms in the international toxicity tests, their relevance remain questionable as they are uncommon in the natural environment (Lowe and Butt, 2007; Kuperman et al., 2009).

The endogeic earthworm *Pontoscolex corethrus* is native to the Guyana Shield in Amazonia (Righi, 1984) but mostly found in disturbed land (Lavelle et al., 1987). This parthenogenetic species might offer a more relevant alternative in tropical areas than the current use of species such as *E. fetida* or *andrei* for ecotoxicological tests (Buch et al., 2011, 2013). For this purpose, the life cycle of *P. corethrus* in the Tropical Artificial Soil (TAS) has been studied (Buch et al., 2011), and this species has already been used for one pesticide toxicity test in TAS (Buch et al., 2013) and remediation study (Hernández-Castellanos et al., 2013). Furthermore, this species is commonly found in the field in French Guiana, and thus can be affected by mercury soil contaminations.

The aim of the present study was to assess the impact of different mercury concentrations on mortality, body weight and cocoon production of the tropical earthworm *P. corethrus* in a Guyanese soil. Furthermore, the Hg bioaccumulation in earthworm tissues was measured at the end of the experiment. To our knowledge, no previous study has focused on the impact of mercury on this species and its bioaccumulation.

2. Materials and methods

2.1. Test soil

The soil used for the test was an oxisol, a characteristic tropical soil representing 85% of soils in French Guiana. It contains high contents of mercury from atmospheric deposits generated by naturally sources and by local gold mining activities.

The soil was sampled in a forested site, located in the catchment basin of the Combat creek, which flows into the Boulanger River, 10 km from the village of Cacao in French Guiana (4°35'N, 52°23'O). This soil was sampled at depths of between 0 and 20 cm.

The soil was air-dried and sieved using a 2 mm sieve prior to the experiment. Granulometric analysis was determined according to the ISO NF X 31-107 standard protocol. Total soil organic C (NF ISO 10694), N (NF ISO 13878), iron and aluminium (NF X 31-147) were measured. Soil pH (soil/H₂O ratio 1:2.5) was also determined.

2.2. Test species

Pontoscolex corethrus was selected as model species in our investigations due to its pantropical distribution including our study site, its biogeographical origin from the Guyana shield and its geophagous character (Righi, 1984; Lavelle et al., 1987). Earthworms were sampled at Cacao and kept in their natural soil in the laboratory at 24 ± 1°C during one month until the experiment began. Before the toxicity test, the species identification was confirmed

for some specimen (n=10) through DNA analysis to avoid potential confusions with morphological similar distinct taxa as well as genetic variations within the species (Moreno, 2004). Earthworms for the experiments were sub-adults with a mean weight of 0.37 ± 0.07 grams. Before the test, acclimatization of earthworms was performed in the oxisol for 48h in 2L plastic boxes.

2.3. Toxicity test

Mercury (II) was added to the soil as aqueous solutions of chloride salt (HgCl_2 , Merck, Darmstadt, Germany; pro analysis). Soil was spiked with five Hg concentrations: 5, 10, 20, 50 and 100 mg Hg kg^{-1} soil dry wt (three replicates per concentration). These concentrations are assumed to be environmentally realistic and had been measured in the field near gold mining contaminated sites in French Guiana, Brazil or Venezuela by several authors (Guedron et al., 2009; Hinton and Veiga, 2009; Santos-Francés et al., 2011).

Soil moisture was adjusted to 70% of the water holding capacity (i.e., 51% H_2O on soil dry weight basis). After one week of soil stabilization, three *P. corethrurus* specimens were weighed and placed in 1L plastic boxes filled with 500 g (dry weight control) of contaminated soil. Before inoculation, there were no statistically significant differences in the body weights of the worms between treatments. According to Lavelle et al. (1987), 500 g of soil is sufficient for a 3 month-experiment for three *P. corethrurus* specimens. Consequently no additional food was provided throughout the duration of the experiment and thus mercury fractioning in the natural soil was not affected. Other earthworms, such as *E. fetida*, live on the soil surface and are more dependent on organic material application for survival than endogeic species like *P. corethrurus*.

During exposure, all test vessels were kept in the dark, *P. corethrurus* being an endogeic species (Duarte et al., 2012; Buch et al., 2013), and at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (Lavelle et al., 1987; García and Fragoso, 2003). Soil moisture content was adjusted twice a week by replenishing weight loss with the appropriate amount of deionized water.

After 7, 14, 21, and 28 days, earthworms were weighed, dead animals were counted and removed, and the remaining individuals re-incubated in their respective boxes. After 56 days, earthworms were weighted and cocoons were counted. Morphological and behavioral alterations such as light reaction were recorded, when observed.

2.4. Mercury analyses in soil and earthworms

Total mercury concentrations in soil samples were determined directly by thermal decomposition atomic absorption spectrometry after gold amalgamation using an Automatic Mercury Analyzer (AMA 254, Courtage Analyses, France), detection limit 0.01 ng. Samples were crushed in an agate mortar to $< 100 \mu\text{m}$ and about 100 mg were then placed in the AMA 254. Concentrations obtained for repeated analyses of certified reference sediment were within the range of Hg concentration given for the certified reference sediment BCR 277 ($0.128 \pm 0.017 \mu\text{g kg}^{-1}$).

At the end of the experiment (56 days), earthworms were washed with distilled water and placed into Petri dishes with moist paper for 72h for depuration. Papers were changed daily in order to prevent coprophagy. After 3 days, when no more soil was found in the papers, earthworms were frozen at -20°C and then freeze-dried. Dried worms were crushed and analyzed directly with AMA 254 as described above.

In this study, the BioAccumulation Factor (BAF) was calculated as the ratio of the total Hg concentration in earthworms (in $\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt) to the total soil Hg content (in $\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt) and was used to assess the efficiency of Hg accumulation by earthworms.

2.5. Statistical analysis

Differences between treatments were assessed by the non parametric Kruskal-wallis test followed by a post hoc test (kruskalmc), to detect significant differences between the control soil and all the tested mercury concentrations, at $p < 0.05$ level. The analyses were performed using the R software (R Development Core Team, 2008).

3. Results

3.1. Test soil and mercury concentrations

Characteristics of the soil used for the toxicity test are summarized in Table 1. The soil was an oxisol characteristic from French Guiana. This soil was very rich in clay, up to 75 %, with quantities of silt and sand ranging from 5 to 15 %. The texture triangle defines it as a clay soil c. It contained high contents of Fe-oxides and low pH ($\text{pH} = 3.98 \pm 0.04$). However, *P. corethrurus* exhibits a high tolerance to soil physico-chemical characteristics (Lavelle et al., 1987).

Mercury concentration in the test soil was $0.336 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ (Table 2). This concentration is in the range of concentrations usually found in oxisols from French Guiana (0.250- 0.500

$\mu\text{g Hg g}^{-1}$) and is mainly due to atmospheric deposition of mercury on the soil surface (Roulet and Grimaldi, 2001). Amazonian soils have been accumulating atmospheric mercury for several millions of years and thus register natural background levels of Hg up to ten times those found in temperate soils (Carmouze et al., 2001).

Table 1. Physico-chemical characteristics of the oxisol sampled in French Guiana for the toxicity test.

Oxisol characteristics	
Sand %	14.2 ± 1.3
Clay %	78.2 ± 0.9
pH H ₂ O	3.98 ± 0.04
C total %	5.3 ± 0.9
N total %	0.39 ± 0.05
CEC %	22.9 ± 3.6
Fe g kg ⁻¹	102 ± 4
Al mg kg ⁻¹	131 ± 13

Table 2. Mercury concentrations measured in the spiked-soils and in earthworms.

Total Hg $\mu\text{g g}^{-1}$	
soil 0	0.33 ± 0.03
soil 5	4.84 ± 0.11
soil 10	9.30 ± 0.35
soil 20	18.87 ± 0.79
soil 50	47.50 ± 1.12
soil 100	96.22 ± 1.04
earthworms T0	2.30 ± 0.33

3.2. Earthworm mortality

No mortality occurred at 0, 5, 10 and 20 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ during the 56 day-experiment. Only one specimen per microcosm died at 50 and 100 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ at 28 days. At day 56, mortality occurred for earthworms inoculated in the two highest contaminated soils, and was significantly higher at 100 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$.

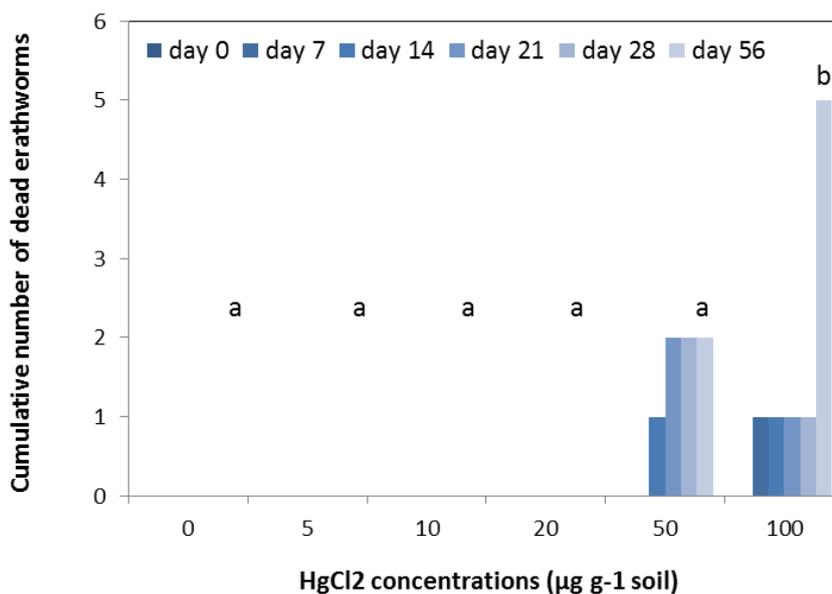


Figure 1. Cumulative number of *Pontoscolex corethrurus* dead individuals in controlled conditions with five concentrations of HgCl₂ (5, 10, 20, 50, 100 µg Hg g⁻¹ soil) and control soil (0.336 µg Hg g⁻¹ soil). Values labeled with the same letter are not significantly different at the 5% level (Kruskal-wallis).

3.3. Earthworm growth

In all treatments, earthworms grew up except at 100 µg Hg g⁻¹ soil. At 50 µg Hg g⁻¹, a delay in the increase of the earthworm's body mass was observed compared to the control soil. However, after 56 days, no significant difference was found between biomasses of earthworms inoculated in soils at 0, 5, 10, 20 and 50 µg Hg g⁻¹ soil (Figure 2). At the highest concentration, all the surviving worms were very thin and lost their clitellum, although no lesions or alterations were externally observed.

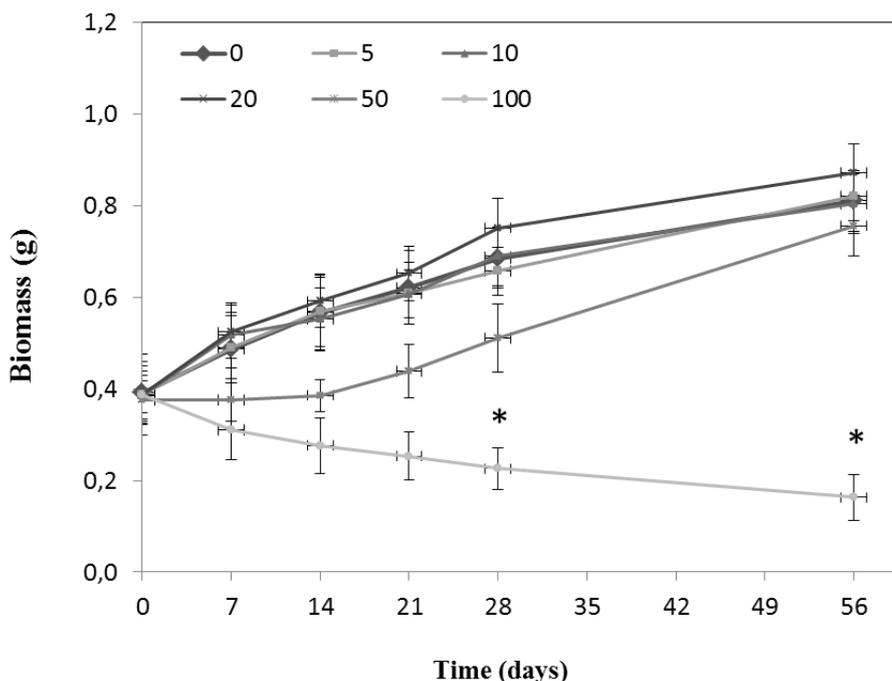


Figure 2. Growth of *Pontoscolex corethrurus* in controlled conditions with five concentrations of HgCl_2 (5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil) and control soil (0.336 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil). Values are mean and standard deviations ($n=3$). * Significantly different compared to the control ($p < 0.005$, Kruskal-wallis).

3.4. Cocoon production and biomass

Cocoon production started after 28 days of incubation. At day 56, the mean number and biomass of cocoons produced by earthworms inoculated in soils spiked at 0, 5, 10 and 20 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ was 4.3 ± 2.3 and no significant difference was found between these treatments (Table 3). At contrast, no reproduction occurred in soils spiked at 50 and 100 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ dry wt.

Table 3. Number and biomass of cocoons produced after 56 days in controlled conditions with five concentrations of HgCl_2 (5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil) and control soil (0.336 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil). Values are means and standard deviations ($n=3$). Values labeled with the same letter are not significantly different at the 5% level (Kruskal-wallis).

HgCl_2	Cocoons produced (n)	Biomass (g)
0	4.0 ± 1.0 a	0.032 ± 0.003 a
5	6.3 ± 2.1 a	0.032 ± 0.003 a
10	2.3 ± 1.5 a	0.032 ± 0.002 a
20	4.7 ± 3.1 a	0.033 ± 0.004 a
50	0 b	0 b
100	0 b	0 b

3.5. Mercury bioaccumulation in earthworms

Before the experiment, mean mercury concentration in earthworms was $2.30 \pm 0.33 \mu\text{g Hg g}^{-1}$. After 56 of incubation, earthworms inoculated in soils at 5, 10, 20, 50 and $100 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil accumulated 23, 71, 205, 719, 2160 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ dw respectively. Significant higher accumulation was found for earthworms exposed at $100 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ (Figure 3A). BAF values showed that bioaccumulation was directly linked to the mercury concentration in the soil, with higher BAFs in soils spiked with more mercury (Figure 3B). *P. corethrurus* accumulated around 7 and 20 times the mercury present in the 10 and $100 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ spiked-soils respectively.

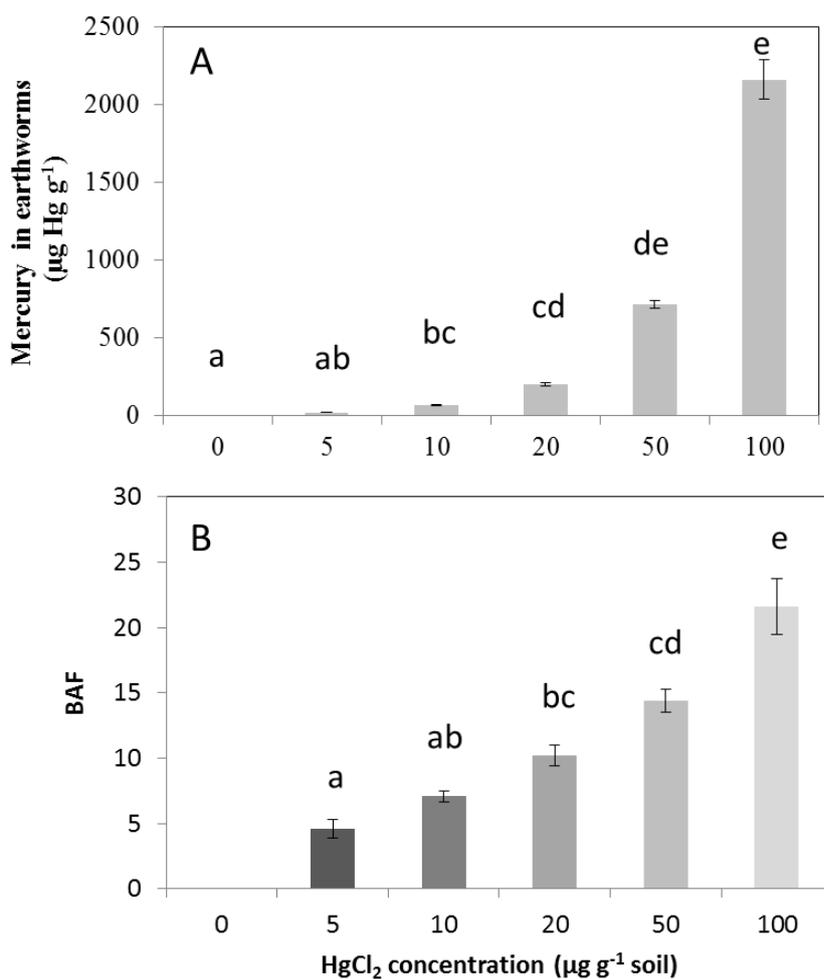


Figure 3. Mercury bioaccumulation in *Pontoscolex corethrurus* (A) and the Bioaccumulation factor (BAF) (B) in controlled conditions with five concentrations of HgCl_2 (5, 10, 20, 50, $100 \mu\text{g g}^{-1}$ soil) and control ($0.336 \mu\text{g g}^{-1}$ soil) after 56 days of inoculation. Values are means and standard deviations ($n=3$). Values labeled with the same letter are not significantly different at the 5% level (Kruskal-wallis).

4. Discussion

4.1. Test soil and mercury concentrations

In this experiment, the pH of the test soil was very low ($\text{pH} = 3.98 \pm 0.04$). However, *P. corethrurus* can be found in soils with pH ranging from 4 to 7.5 (Lavelle et al., 1987; Buch et al., 2011). Furthermore, mercury availability is known to be more important in soils with low pH as measured in this experiment (Roulet and Grimaldi, 2001; Gabriel and Williamson, 2004). Consequently, the toxicity of mercury could have been amplified in this test.

Mercury concentrations selected for this experiment were chosen according to realistic concentrations measured on the field, particularly around gold mining sites where concentrations can reach up to $500 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil (Duraó et al., 2009; Hinton and Veiga, 2009; Santos-Francés et al., 2011).

4.2. Earthworm mortality

In our experiment and after 56 days of inoculation, *P. corethrurus* showed significant mortality only at the highest concentration of mercury ($100 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil dry wt). However, this result cannot be extrapolated in a realistic way to the natural environment because of the short time of exposure of this experiment as well as the artificial conditions of the test.

In a previous study using the model species *Eisenia fetida*, no mortality occurred at the same highest test concentration ($100 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil dry wt) (Lock et al., 2001). However, this test was conducted for 21 days only, using the OECD artificial soil. In our study, mercury was added to a natural soil and its low pH could have enhanced the impact measured on *P. corethrurus* mortality.

Furthermore, pre-exposure of *E. fetida* earthworms to mercury contaminated soil caused a significant increase in their mercury tolerance. When pre-exposed to $22 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil, earthworms had a LC_{50} of $545 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil compared to a much lower LC_{50} value of $170 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil for the non pre-exposed earthworms (Gudbrandsen et al., 2007). These results confirm that special attention should be taken when using field-collected earthworms for ecotoxicological tests because of their unknown history of exposure to contaminants (Garcia, 2004; Lowe and Butt, 2007; Buch et al., 2013). However, if the main objective is to re-create field conditions, the use of earthworms that have a prior exposure history has been recommended. Indeed, it seems that earthworms will adapt to their environment over time (Sizmur and Hodson, 2009). In our experiment, *P. corethrurus* was sampled in the field and was thus exposed to $0.336 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ along its life history which could have increased its tolerance to mercury.

In order to compare the sensibility of *P. corethrurus* with the earthworm model *Eisenia andrei*, we conducted the same test with the same conditions (data not shown). However, *E. andrei* quickly lost weight in the control soil. We concluded that this natural tropical soil was unsuitable for this species, probably because of the acidic pH, as it was previously noticed by Garcia et al. (2008) and/or the low organic matter content.

4.3. Earthworm growth

In this study, no loss of body weight was observed in the control soil, although no food was added during the experiment to ensure that observations made were due to the activity of the earthworms rather than the incorporation of organic matter (Sizmur et al., 2011). The organic carbon available in these soils was sufficient for the earthworms to grow, compared to their initial body weight. Being a geophagous polyhumic endogeic species, *P. corethrurus* has a relatively high organic matter assimilation efficiency, allowing it to survive even in poor soils (Lavelle et al., 1987). However, when used in Tropical Artificial Soil (TAS), *P. corethrurus* needed incorporation of organic matter in order to survive and gain weight (Buch et al., 2011). Thus, the use of natural soils for toxicity test seems more relevant when this test is conducted with *P. corethrurus*.

Up to mercury concentrations of 20 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil, no effect on growth was found in our study, showing a relatively high capacity of *P. corethrurus* to live in such contaminated soils. Interestingly, earthworms demonstrated a capacity to adapt over time to the concentration of 50 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil. Indeed, at this concentration, the average weight measured was the same as in the control soil after 56 days. For *E. fetida*, a significant loss of weight occurred at lower mercury concentrations: from 6 to the highest tested concentration of 10 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ of cattle manure (Lapinski and Rosciszewska, 2008). However due to the different earthworms' species and soils used in the studies, it remains difficult to compare our results with the literature.

4.4. Cocoon production and biomass

The impact of mercury on earthworms' reproduction has been reported by Lock et al. (2001) and Gudbrandsen et al. (2007), after 21 days in the OECD artificial soil and 4 weeks in a sandy soil from Norway respectively. The first work observed that cocoon production of *E. fetida* ceased at 56 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil, whereas the second work found the same effect at only 22 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil. The EC_{50} was very similar for both studies: 9.16 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ dw (Lock et al., 2001) and 9.2 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ dw (Gudbrandsen et al., 2007) although soils used for the

experiments were different. These results confirmed that reproduction is more sensitive to mercury contamination than survival, as observed with *P. corethrurus*.

In our study, *P. corethrurus* produced cocoons up to 20 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil. Interestingly, at the concentration of 50 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ dw, earthworms were able to gain weight (Figure 2) but not to produce cocoons. Their resources seem to have been used for survival rather than reproduction.

Only few cocoons were produced in our study in comparison with the Lavelle et al.'s work (1987), including within the control soil. Generally, *P. corethrurus* is able to produce from 17 to 118 cocoons per adult per year (Bhattacharjee and Chaudhuri, 2002). These results could be explained by the large plasticity of *P. corethrurus* in growth rates, reproduction and size, which vary according to their original site (Buch et al., 2011). Cocoon biomasses observed in this study (0.032 g) were included within the range reported in the literature (0.021–0.078 g) (Lavelle et al., 1987; Hamoui, 1991; Bhattacharjee and Chaudhuri, 2002; Garcia and Fragoso, 2002; García et al., 2003; Buch et al., 2011).

4.5. Mercury bioaccumulation in earthworms

While only few studies have reported the impact of mercury on mortality, biomass and reproduction in earthworms, some recent works focused on the mercury accumulation in earthworm tissues (Burton et al., 2006; Ernst and Frey, 2007; Ernst et al., 2008; Rieder et al., 2011). It has been shown that mercury is primarily accumulated from the soil (Ernst and Frey, 2007) and that endogeic species, feeding mainly on soil, efficiently accumulate Metallic Trace Elements (MTEs) from soil (Dai, 2004; Hobbelen et al., 2006; Ernst et al., 2008; Suthar et al., 2008; Rieder et al., 2011).

In our study, the results show a high capacity of *P. corethrurus* to accumulate mercury in amended soils, and even in the natural field soil. Even in slightly contaminated soils, the accumulation of mercury in *E. fetida* has been shown to be linearly correlated to the concentration found in the soil (Lapinski and Rosciszewska, 2008). The same trend was observed in the present study with *P. corethrurus* (Figure 3A).

Bioaccumulation of metals is a useful tool when assessing mercury bioavailability in soils (Hinton and Veiga, 2002, 2009). The sequestration of mercury in earthworms' tissues could explain the resistance of *P. corethrurus* in contaminated soils. Indeed, high concentrations of mercury were measured in this study (Figure 3A), while low effects were observed in terms of mortality and biomass loss.

Unlike during the accumulation of Cu and Zn, which are MTEs performing some biological functions in the body, no saturation of mercury in earthworms' tissues was measured (Spurgeon and Hopkin, 1999c). Taking into account its high toxicity, the important mercury accumulation in earthworms can potentially lead to a serious danger to the organisms of the next level of the trophic chain in the tropics. Furthermore, it has been shown that mercury is preferentially accumulated as methylmercury, the most toxic form (Burton et al., 2006; Rieder et al., 2011). As already started for the aquatic trophic chains, further studies need to focus on the risks linked to the entry of mercury in the terrestrial chains and its transformation into organic forms (e.g. methylmercury) as it has been shown to occur in earthworms' gut (Rieder et al., 2013).

5. Conclusions

Earthworm biomass and cocoon reproduction were more informative than mortality in this study. Mortality, growth and cocoon production were affected only at the highest concentrations, confirming the very broad tolerance of *P. corethrurus* to environmental conditions such as mercury contamination. This species having a pantropical distribution in the tropics, it could be considered as a more relevant model than *Eisenia* for metals and other toxic compounds testing, such as pesticides, in the tropical areas.

Biomass and cocoon production of *P. corethrurus* was not affected by mercury until the concentration of 20 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil. These levels of contamination can be found in mercury-contaminated sites, in the Amazonian region particularly. In addition and in order to compare the sensibility of *P. corethrurus* to mercury, further experiments should be conducted using other tropical species (Garcia, 2004; De Silva and Van Gestel, 2009a, 2009b; Buch et al., 2011, 2013).

Furthermore, as *P. corethrurus* has been shown to accumulate high concentrations of mercury, special attention should be given to a possible entry of this pollutant in the terrestrial food chain in the tropics. Mercury is preferentially accumulated as methylmercury, and further studies need to focus on the risks linked to its transformation into the most toxic form, as methylation can occur in the gut of earthworms.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Michel Grimaldi for its collaboration in sample collection and Max Sarrazin from the IRD Cayenne for soil analyses.

Chapitre V
Vers de terre et mobilité du mercure

Introduction

Dans les sols ferrallitiques tropicaux, les oxydes de fer et la matière organique constituent les phases principales fixatrices du mercure, régissant sa dynamique et sa répartition. Lors de l'évolution naturelle des sols, de la déforestation et du remaniement des sols pour un usage agricole ou minier (orpaillage), les teneurs en mercure du sol diminuent parallèlement à celles du fer (Lacerda *et al.*, 2004). La mobilisation de ce mercure et son transport vers des environnements anoxiques favorables à sa méthylation constituent un problème environnemental de taille. Le rôle des bactéries ferri-réductrices dans cette mobilisation *via* la dissolution des oxydes de fer en conditions réductrices a été démontré récemment dans notre laboratoire (Harris-Hellal, 2008; Harris-Hellal *et al.*, 2010).

Bien qu'il ne fasse aucun doute que la dynamique de la matière organique influence celle du mercure dans les sols tropicaux acides ($\text{pH} < 5$) comme ceux de notre site (Roulet & Grimaldi, 2001), ce volet n'a pas été abordé à ce jour. Plus encore, aucune étude à notre connaissance ne s'est intéressée au rôle des vers de terre dans la mobilité du mercure dans ces environnements. Pourtant, ces organismes ingénieurs du sol (Jones *et al.*, 1994) peuvent modifier la dynamique de la matière organique du sol (Brown *et al.*, 2000) et sont donc susceptibles de modifier directement ou indirectement la mobilité du mercure associé.

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce chapitre était d'évaluer l'impact des vers de terre sur la matière organique des sols (e.g.) et ses conséquences sur la mobilité du mercure. Les mécanismes impliqués dans cette mobilisation constituent également un objectif à atteindre. En effet, différents auteurs ont rapporté que les vers peuvent agir sur la mobilité des ETM soit directement en modifiant les caractéristiques du sol qu'ils ingèrent, soit indirectement *via* les communautés bactériennes du sol (Sizmur & Hodson, 2009).

Afin d'atteindre ces objectifs, deux études ont été réalisées en microcosmes sur un sol tropical et un autre tempéré dans deux conditions expérimentales différentes: (1) en conditions de contamination naturelle (fond géochimique) et (2) en ajoutant du mercure au laboratoire ($20 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ sol) afin de mimer les conditions d'une pollution ponctuelle importante telles que pourraient causer les activités d'orpaillage. La concentration de $20 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ sol a été choisie suite au test écotoxicologique avec *Pontoscolex corethrurus* qui a montré que les vers ne sont pas affectés à cette concentration (voir chapitre IV), et d'après la littérature et des tests préliminaires pour l'espèce *Eisenia andrei* (Lock *et al.*, 2001).

Ce chapitre est organisé en trois volets. Les deux premiers volets visent à étudier le rôle de *Pontoscolex corethrurus* dans la mobilité du mercure en Guyane française. Le premier volet est sous forme d'article qui sera soumis prochainement à la revue *Applied Soil Ecology*. Le second volet est dédié à l'étude des communautés bactériennes dans l'oxisol guyanais en réponse à l'activité de *P. corethrurus* et au mercure ($20 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ sol) ; ce volet est rédigé en français. Enfin, le troisième volet a été consacré à l'étude du rôle du ver modèle *Eisenia andrei* sur la mobilité du mercure, mais cette fois dans un sol de la région parisienne (sol tempéré). Ce dernier volet est présenté sous forme d'un article en préparation pour être soumis à la revue *Pedobiologia*.

V-1. Impact de *Pontoscolex corethrurus* sur la mobilité du mercure dans un oxisol guyanais (dopé ou non au laboratoire).

Résumé

Dans la région amazonienne et en particulier en Guyane française, les sols contiennent des quantités importantes de mercure dû d'une part aux quantités accumulés depuis des millions d'années par dépôts atmosphérique, et d'autre part aux activités minières comme l'orpaillage. Le mercure est parmi les polluants les plus toxiques dont l'impact dépend de sa spéciation et sa disponibilité. Il est donc primordial d'identifier les paramètres biotiques et abiotiques qui contrôlent la mobilité du mercure dans le but d'évaluer sa toxicité pour les organismes.

Alors que différentes études se sont intéressées à l'impact des vers de terre sur la disponibilité des éléments traces métalliques (ETM), cette étude est la première à avoir étudié l'impact d'un ver de terre tropical sur la disponibilité du mercure. Les objectifs de cette étude étaient (i) d'évaluer les modifications de la mobilité et de la répartition du mercure induite par les activités des vers de terre et le passage du sol dans leur tube digestif dans un sol naturellement contaminé et un sol dopé au laboratoire incubé pendant 90 jours, et (ii) de déterminer la capacité de bioaccumulation du mercure de *Pontoscolex corethrurus*.

Le sol utilisé est un oxisol échantillonné dans un petit bassin versant en Guyane française où ont eu lieu des activités d'orpaillage. Une expérimentation en microcosmes a été mise en place sur trois mois. Le mercure total, sa disponibilité et sa répartition ont été mesurées dans les différentes phases du sol et des turricules des vers de terre. Le pH et le taux de COD ont également été mesurés dans ces mêmes échantillons. Par ailleurs, la bioaccumulation du mercure dans les tissus de *P. corethrurus* a été suivie dans le temps.

Les résultats ont montré que *P. corethrurus* peut influencer la dynamique du mercure en diminuant les fractions les plus mobiles dans les sols et en augmentant la fraction liée aux oxydes de fer. Après 90 jours, des quantités de mercure 10 fois supérieures à celles du sol ont été mesurées dans les tissus des vers.

Ce travail a montré que les paramètres biologiques, telle que l'activité des vers, sont importants pour l'évaluation du mercure disponible. Enfin, l'utilisation d'une espèce de ver dominante en milieu tropical comme modèle semble pertinente pour ces études.

Article 2

Article en préparation pour la revue *Applied Soil Ecology*

**Impact of a tropical endogeic earthworm on mercury mobility and
availability in a soil from French Guiana**

Co-auteurs par ordre alphabétique:

Elodie Da Silva^{1*}

Noureddine Bousserrhine¹, Michel Grimaldi², Emmanuel Lapied³, Johanne Nahmani⁴,
Virginie Roy¹

¹ UMR BIOEMCO, Equipe IBIOS, Université Paris Est Créteil, France.

² UMR BIOEMCO, Equipe TRANSFERT, IRD, France.

³ Bioforsk, Norwegian Institute for Agricultural and Environmental Research.

⁴ Centre de Recherche en Ecologie Fonctionnelle et Evolution (CEFE-CNRS), France.

*Corresponding author:

Elodie Da Silva

UMR BIOEMCO, Equipe IBIOS, Université Paris Est Créteil, 61 Avenue du Général de
Gaulle, 94010 Créteil cedex, France.

Email: elodie.da-silva@u-pec.fr

Tel: + 33 1 45 17 16 64

Abstract

Soils in the Amazon region, particularly in French Guiana, contain high concentrations of mercury (Hg), mainly due to atmospheric deposition and gold mining activities. Mercury is one of the most hazardous environmental pollutants and its impact depends on its speciation and availability. In order to prevent its toxic effects on organisms, it is important to identify biotic and abiotic parameters that control mercury mobility in soils.

While many studies focus on the role of earthworms on metal availability, our study is the first that investigates the role of tropical earthworms on soil mercury mobility. The aims of the present study were (i) to evaluate the modification of Hg availability and partition induced by earthworm activities and gut processes in amended versus field-contaminated soils and (ii) to determine the bioaccumulation of mercury in *Pontoscolex corethrurus*.

The studied soil was sampled in French Guiana, where past and modern gold mining activities have occurred. A 3-month microcosm experiment was done in order to test the effect of *P. corethrurus* on mercury availability in a field soil and a spiked soil. Total, available and partitioning of mercury were measured in the casts produced by *P. corethrurus* and in both the control soil and the bulk earthworm-inhabited soil. Bioaccumulation of Hg in earthworm tissues was also determined.

Results suggested that *P. corethrurus* influenced mercury dynamics by decreasing the more available mercury fractions in the soils (soluble) and by increasing the amount of mercury bound to Fe oxides. Furthermore, Hg accumulated in *P. corethrurus* tissues was 10 times higher than the concentration in soils after 90 days.

The work showed that biological parameters, such as earthworm activity are important for Hg bioavailability evaluation. Furthermore, the work highlights the relevance of the use of a dominant tropical earthworm species as a biological model for mercury eco-dynamics studies.

Keywords: mercury, availability, bioaccumulation, tropical soil, *Pontoscolex corethrurus*, French Guiana.

1. Introduction

Mercury is one of the most hazardous environmental pollutants because of its toxicity and accumulation in trophic chains (Wolfe et al., 1998; Veiga et al., 1999). In the Amazon region, soils contain high concentrations of mercury (Hg), mainly due to atmospheric deposition and gold mining activities (Anderson, 1979; Mason et al., 1994). The impact of mercury has been more extensively studied in aquatic ecosystems where bioaccumulation in fish species and biomagnification along the aquatic food chains lead to environmental and health damages (Grimaldi et al., 2001; Charlet and Boudou, 2002). Although soils represent the most important sinks and therefore sources of mercury in the environment (Anderson, 1979), they have been less studied. Few studies have focused on the impact of mercury in soil organisms and its entry in the terrestrial food chain (Ernst et al., 2008).

Because of their relatively large biomass (Edwards, 2004), earthworms provide a significant food source for many species of predators, making them a potential route for metal contamination out of the soil and into higher organisms (Hopkin, 1989; Karaca, 2011). Thus, it is important to determine the bioaccumulation of mercury in such organisms.

Earthworms burrow in the soil and create casts that are chemically, biologically and physically different from the surrounding soil (Edwards, 2004). As they can be found in soils containing elevated levels of metals and metalloids (Spurgeon and Hopkin, 1996a; Vijver et al., 2007), the process of cast production and/or earthworm bioturbation may also contribute to the redistribution of contaminants in soil profiles (Zorn et al., 2005).

In order to properly assess the risks posed by metals contamination of soil to the environment, it is necessary to better understand how soil biota influences the mobility, partitioning and speciation of this metal in contaminated soils. It is known that toxicity risks linked to metals depend on speciation and availability rather than on total concentrations of the studied metals (Harmsen, 2007). Concerning mercury, transformation to its most toxic form (i.e. methylmercury) can occur when mercury (Hg^{2+}) is available for specific bacteria such as sulfato-reducing and iron-reducing bacteria (Kerin et al., 2006). It is thus particularly important to determine mercury availability as well as its partition among soil fractions in order to prevent its release in aquatic systems and its methylation. Sequential extractions, in which extractants of increasing strength are applied to the soil, are inexpensive methods that allow assessment of metal concentrations in different organic and mineral soil fractions (Tessier et al., 1979). These methods have been successfully used to estimate heavy metal bioavailability to earthworms (Kizilkaya, 2004; Becquer et al., 2005; Udovic et al., 2007).

The role of earthworms on metal availability was assessed in many studies (Sizmur and Hodson, 2009). The results showed that earthworms generally increase the mobility and availability of metals (Cd, Cu, Pb, Zn) in soils (Ma et al., 2002; Yu et al., 2005; Wang et al., 2006). However, some of the studies also found that they can decrease metal availability (Liu et al., 2005; Zorn et al., 2005; Li et al., 2009) by decreasing the soluble and exchangeable fraction and increasing the fractions bound to organic matter and/or Fe oxides. The mechanisms by which earthworms impact metal mobility and availability are unclear. They may involve changes in pH, dissolved organic carbon (DOC) and microbial populations (Sizmur and Hodson, 2009). Earthworms can increase the metal availability in soil by decreasing the soil pH (Kizilkaya, 2004).

The described studies were all carried out in the temperate region, mainly using the epigeic earthworm species *E. fetida* as biological model. Only one study has focused on the tropical region using the endogeic earthworm species *Pontoscolex corethrurus* for Pb and Mn (Duarte et al., 2012). However, no study has focused on mercury in temperate or tropical regions.

The aims of the present study were (i) to evaluate the modification of Hg availability and partition induced by earthworm activities and gut processes in amended versus field-contaminated soil incubated for 90 days, and (ii) to determine the bioaccumulation of mercury in *Pontoscolex corethrurus*. To our knowledge, this study is the first to investigate the role of a common tropical endogeic earthworm on soil mercury mobilization and its bioaccumulation kinetics over 90 days.

2. Materials and methods

2.1. Study site and soil sampling

The study site is located in the catchment basin of the Combat creek, which flows into the Boulanger River, 10 km from the village of Cacao in French Guiana (4°35'N, 52°23'O). The soil used for the study was an oxisol characteristic of the site, and represents 85% of soils in French Guiana. It contains high contents of mercury from atmospheric deposits generated by naturally sources and by local gold mining activities. This soil was sampled at depths of between 0 and 20 cm, with mercury accumulation naturally occurring at soil surface (Roulet and Grimaldi, 2001).

Physico-chemical analyses were done at the IRD Cayenne, except mercury analyses. Granulometric analysis was determined according to the ISO NF X 31-107 standard. Total soil organic C and total N were determined according to the NF ISO 10694 and NF ISO 13878 standards respectively. Total iron and aluminium concentrations were determined according to the method described in the NF X 31-147 method. Soil pH (soil/H₂O ratio 1:2.5) was measured using a pH meter (MetrOhm 744).

2.2. Earthworm species

Pontoscolex corethrurus was chosen for its biogeographical origin from the Guyana shield, its pantropical distribution and its geophagous character (Righi, 1984; Lavelle et al., 1987). This species was present in the oxisol from our study site. Earthworms were collected from the surface soil (0-20cm) and kept in their natural soil in the laboratory at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ for three months for adaptation. Before the experiment, earthworms were left on moist paper for 48h in order to empty their gut. Furthermore, the species identification was confirmed for some specimen (n=10) through DNA barcoding analysis (Hebert et al., 2003) to avoid potential confusion with morphologically similar but distinct taxa as well as genetic variations within the species (Moreno, 2004).

2.3. Experimental procedure

The test soil was air-dried and sieved at 2 mm prior to the experiment. Microcosms were then formed by dividing the previously homogenized soil into 500 g portions and placed in 2L plastic boxes. Soils were then brought to 70% of their water holding capacity (50%, v/w). Control soils only received ultra-pure water while amended soils received ultra-pure water containing dissolved mercuric chloride (HgCl₂) to obtain a final concentration of 20 µg Hg g⁻¹ soil. This concentration had been previously tested in an ecotoxicological test with *P. corethrurus* to ensure no negative effect on earthworms during the experiment (Da Silva et al., unpublished data, 2013).

The soil was left for stabilization one week before earthworm's inoculation. In half of the microcosms, three *P. corethrurus* earthworms were inoculated, representing 1 to 1.2 g of biomass. Microcosms were incubated at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (Lavelle et al., 1987) for 90 days in the dark (Duarte et al., 2012; Buch et al., 2013). Soil humidity was kept during the entire experiment.

Twenty microcosms were harvested (five replicate of each treatment) and analyzed after 0, 30, 60 and 90 days. In microcosms containing earthworms, casts and bulk soil were separated using a 4 mm sieving. Casts were easily distinguishable from the bulk soil as they

were more compact and had a smoother surface compared to natural sieved soil aggregates, as observed by Duarte et al. (2012).

2.4. Total concentrations of Hg in control soils, earthworm castings and earthworms

Total mercury concentrations in soil samples were determined directly by thermal decomposition atomic absorption spectrometry after gold amalgamation using an Automatic Mercury Analyzer (AMA 254, Courtage Analyses, France), with detection limit of 0.01 ng. Samples were crushed in an agate mortar to $< 100 \mu\text{m}$ and about 100 mg were then placed in the AMA 254. Concentrations obtained for repeated analyses of certified reference sediment were within the range of Hg concentration given for the certified reference sediment BCR 277 ($0.128 \pm 0.017 \mu\text{g g}^{-1}$).

At each date of the experiment, earthworms were washed with distilled water and placed into Petri dishes with moist paper for 72h for depuration. Papers were changed daily in order to prevent coprophagy. After 3 days, earthworms were frozen at -20°C and then freeze-dried. Dried worms were crushed and analyzed directly with AMA 254 as described above.

In this study, the BioAccumulation Factor (BAF) was used to estimate the bioavailability of Hg in the earthworms whether the mercury was added in the laboratory or not. The BAF was calculated as the ratio of the total Hg concentration in earthworms (in $\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt) to the total soil Hg content (in $\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt) (Sandoval et al., 2001).

2.5. Soluble mercury

Mercury availability was estimated according to Rasmussen et al. (2000). Briefly, 1 g of each soil replicate was suspended in 10 ml of ultra-pure water and agitated at 300 rpm for 30 min. The suspensions were then centrifuged at 4 000 rpm and the supernatants filtered at 0.45 μm with Teflon filters (Minisart SRP 25, Sartorius). Then, 200 μL of extracted supernatants were analyzed for mercury content with AMA 254. All liquid samples were previously filtered (0.45 μm Teflon filters, Minisart SRP 25, Sartorius) and acidified to pH 1 (HCl, 37% Suprapur).

2.6. Mercury partitioning in soil

A seven-step sequential extraction procedure was used to define the partition of Hg in the oxisol. Mercury bound to common minerals in tropical soils, such as Mn and Fe oxides was included in this procedure (Silveira et al., 2006). The main operative conditions of the procedure are reported in Table 1.

Table 1. Sequential extraction procedure for Hg partitioning analyses (modified from Silveira et al., 2006).

Fraction	Extractor	Soil:solution (g:mL)	Extraction conditions
Soluble and exchangeable (EXCH)	0.1M CaCl ₂	1:15	Stirring for 2h, room temperature
Carbonates (CAR)	1M NaOAc (pH 5)	1:30	Stirring for 5h, room temperature
Organic matter (OM)	5% NaOCl (pH 8.5)	1 :10	Water-bath for 30 min, 90-95°C
Mn oxides (MNOX)	0.05M NH ₂ OH/HCl (pH 2)	1 :30	Stirring for 30 min, room temperature
Poor crystalline Fe oxides (FEOX1)	0.2 M oxalate buffer (pH 3)	1 :30	Stirring for 2h, in the dark
Crystalline Fe oxides (FEOX2)	6M HCl	1 :40	Stirring for 24h, room temperature
Residual (RES)	-	-	None. Direct analysis by AMA 254

The sequential extraction procedure was performed using 0.5 g of soil sample in a 30 mL polypropylene centrifuge tube. After each extraction, the suspension was centrifuged at 1230 RPM for 10 minutes. The residue was washed with 5 ml of NaCl 0.1M and added to the supernatant. The supernatant was used for analytical determinations, whereas the residue was dried at room temperature prior to the next extraction step.

2.7. Dissolved organic carbon and pH determination

Water extractions were performed by shaking 1 g of fresh samples (control soil, bulk soil or casts) mixed with 10 mL of MilliQ water for 24 h at room temperature on an overhead shaker. The soil slurry was then centrifuged for 40 min at 3000 g and subsequently vacuum-filtered through a 0.45 mm membrane filter (Millipore Stericup systems). Dissolved organic carbon (DOC) concentrations in the water extracts were measured with a Shimadzu TOC-500 apparatus (Shimadzu, Kyoto, Japan). Soil pH was measured in soil suspension obtained by shaking 1 g of soil in water (soil/H₂O ratio 1:2.5) for 1 hour and then by using a pH meter (MetrOhm 744).

2.8. Statistical analysis

Normality of data and equal variance between treatments was tested using the Shapiro test and Bartlett's test respectively. Because of non-normality of data, differences between treatments (control soil, bulk soil and casts) in each soil were assessed by the Kruskal-wallis non parametric test. The post hoc test (kruskalmc) was used to identify significant differences between individual means ($p < 0.05$). Linear correlation (non-parametric Spearman) was employed to analyse relationships between soil characteristics and Hg concentrations. The R software (R Development Core Team, 2008) was used for all statistical analysis.

3. Results

3.1. Test soil and total Hg concentrations in soils and casts

The field soil is an oxisol, characteristic of French Guiana. This soil is very rich in clay, up to 75 %, with quantities of silt and sand ranging from 5 to 15 % (Table 2). The texture triangle defines it as a clay soil. It has a very low pH ($\text{pH} = 3.98 \pm 0.04$) and contains high contents of Fe-oxides.

Table 2. Mean chemical characteristics of the soil used for earthworm experiments (n=5, mean \pm SD).

Sand %	Clay %	pH H ₂ O	C total %	N total %	CEC %	Fe g kg ⁻¹	Al mg kg ⁻¹	Total Hg $\mu\text{g g}^{-1}$
14.2 \pm 1.3	78.2 \pm 0.9	3.98 \pm 0.04	5.3 \pm 0.9	0.39 \pm 0.05	22.9 \pm 3.6	102 \pm 4	131 \pm 13	0.336 \pm 0.01

The total mercury concentration of this field soil is $0.336 \pm 0.01 \mu\text{g Hg g}^{-1}$. This concentration is in the range of concentrations usually found in oxisols from French Guiana ($0.250\text{-}0.500 \mu\text{g Hg g}^{-1}$) and is mainly due to atmospheric deposition of mercury on the soil surface (Roulet and Grimaldi, 2001). This soil was also chemically amended with $20 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ in this experiment. The total Hg concentrations of soils are shown in Table 3.

Table 3. Total mean concentrations of Hg ($\mu\text{g g}^{-1}$ sol dw) in the control soil, bulk earthworm-inhabited soil and casts of *Pontoscolex corethrurus* after incubation for 0, 30, 60 and 90 days in the field and spiked soils (n=5, mean \pm SD). Numbers followed by different letters indicate significant differences between means using the post hoc kruskalmc at $p < 0.05$. Lower case letters correspond to comparison between cast vs. bulk vs. control soil) and capital letters correspond to the comparison between times of the experiment.

Field soil			
Time (days)	Soil	Bulk	Casts
0	0.344 \pm 0.007 aA	0.344 \pm 0.007 aA	0.344 \pm 0.007 aA
30	0.336 \pm 0.009 aA	0.346 \pm 0.010 aA	0.363 \pm 0.017 bA
60	0.335 \pm 0.013 aA	0.319 \pm 0.013 aA	0.332 \pm 0.015 aA
90	0.337 \pm 0.007 aA	0.325 \pm 0.009 aA	0.345 \pm 0.010 aA
Spiked soil			
Time (days)	Soil	Bulk	Casts
0	19.8 \pm 1.8 aA	19.8 \pm 1.8 aA	19.8 \pm 1.8 aA
30	19.4 \pm 0.9 aA	18.2 \pm 1.7 aA	21.3 \pm 1.0 aA
60	19.8 \pm 1.6 aA	18.1 \pm 2.6 aA	21.1 \pm 0.6 aA
90	19.8 \pm 1.7 aA	14.3 \pm 0.3 bA	22.2 \pm 2.0 aA

Total means of Hg concentrations were in agreement with expected concentrations. The field soil contained $0.336 \pm 0.02 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil dw in the control and bulk earthworm-inhabited soil, and $0.336 \pm 0.10 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil dw in the casts. The oxisol spiked at $20 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil dw had total Hg concentrations of $20 \pm 1 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil dw (Table 3).

In the field soil, a significant higher Hg total concentration was measured in the casts after 30 days only ($p < 0.05$). At other times of the experiment, total Hg concentrations in the casts were not statistically different from the control soil ($p > 0.05$).

In the spiked soil, the general trend was a decrease of total Hg in the bulk soil and an increase in the casts. After 90 days, there was significantly less mercury in the bulk soil ($14.3 \pm 0.3 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil dw) ($p < 0.05$) than in the control soil and casts.

3.2. Mobility and partitioning of mercury in soils and casts

The results of water extractable Hg showed that only low Hg amounts are available in these soils (Figure 1). The soluble Hg fraction represented 2 to 5% of total Hg concentrations in the field soil (i.e. $0.336 \mu\text{g g}^{-1}$) ranging from 2.8 to $26.5 \text{ ng Hg g}^{-1}$ soil. In the spiked soil, the soluble fractions ranged from 0.3 to 1% of the total Hg concentration (i.e. $20 \mu\text{g g}^{-1}$), from 24.4 to $227.2 \text{ ng Hg g}^{-1}$ soil. Furthermore, the availability of the amended Hg decreased with time, almost 10 fold over 90 days of soil incubation (Figure 1B).

In the field soil, concentrations of water extractable Hg in earthworm casts and in the bulk earthworm-inhabited soil were significantly lower in comparison to the control soil after 90 days (Figure 1A). After the passage of soil through the gut of earthworms, the soluble Hg fraction decreased from 7.9 to 4.4% of soil total Hg concentrations. The same trend was observed after 30 and 60 days but it was not significant.

In the spiked soil, significant higher Hg concentrations were measured in the casts in comparison with the control soil after 60 and 90 days ($p < 0.05$) (Figure 1B). The soluble Hg fraction increased from 1.2 % in the control soil to 3.1-3.8% in the casts (% of the Hg total concentrations). These results showed that earthworms can decrease Hg availability in the field soil while they can increase its availability in the spiked soil. In both field and spiked soils, Hg is probably bound differently to the different soil constituents.

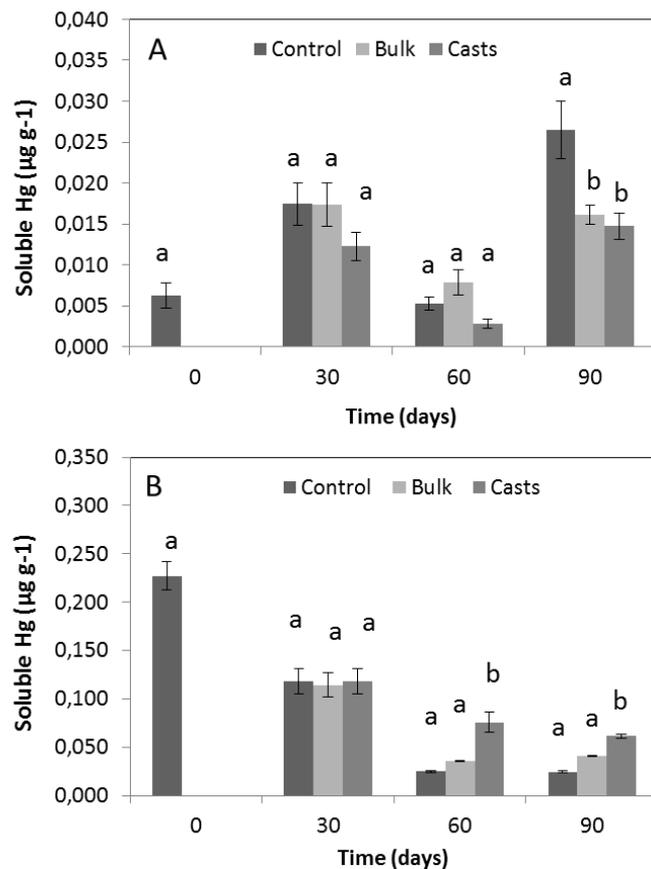


Figure 1. Water extractable Hg in the control soil, bulk earthworm-inhabited soil and casts of *Pontoscolex corethrurus* after incubation for 30, 60 and 90 days in a field soil (A) and a spiked soil (B). n=5, error bars represent standard errors of the mean. Different letters indicate significant differences between means (Kruskal-wallis, $p < 0.05$).

The determination of Hg fractions showed that organic matter (OM) and Fe oxides (FEOX1 and FEOX2) were the most important Hg fractions in both field and spiked soils (Table 4 and Table 5). In the field soil, these fractions represented 3-10% for the Hg OM and 71-86% for crystalline Fe oxides (FEOX2) (Table 4). The OM Hg fraction accounted for 9.1-33.9% and the FEOX2 Hg fraction for 48-85% in the spiked soil (Table 5).

Different results were obtained when comparing the casts and the control soil among the field and spiked soils, at different times of the experiment. In the field soil, the soluble-exchangeable (EXC), the organic matter (OM) and the Mn oxides (MNOX) Hg fractions were lower in casts than in the control and bulk soils after 30 days, while the amorphous Fe oxides (FEOX1) Hg fraction was significantly higher ($p < 0.05$). After 60 days, EXC and FEOX1 Hg fractions were significantly higher in the casts and bulk earthworm-inhabited soils than in the control soil ($p < 0.05$).

Table 4. Partition of Hg (in percentages of the Hg content determined in all seven soil fractions) in the control soil, bulk earthworm-inhabited soil and casts of *Pontoscolex corethrurus* after incubation for 0, 30, 60 and 90 days in the field contaminated soil (n=5).

Time (days)	Field soil	EXC	CAR	MO	MNOX	FEOX1	FEOX2	RES
0	Soil	1.91 aA	5.06 aA	3.58 aA	1.41 aA	3.04 aA	84.51 aA	0.50 aA
	Soil	2.29 aA	2.63 aAB	4.89 aA	3.32 aA	3.26 aA	83.29 aA	0.33 aA
30	Bulk	1.08 bcA	4.49 aA	3.07 aA	1.89 bA	8.67 bA	80.43 aA	0.38 aA
	Casts	1.68 acA	3.75 aA	2.69 bA	1.73 bA	8.65 bA	81.01 aA	0.48 aA
60	Soil	0.49 aA	1.17 aB	5.21 aA	2.18 aA	4.09 aA	86.21 aA	0.66 aA
	Bulk	0.88 bA	2.01 aA	4.22 aA	1.59 aA	11.20 bA	79.60 aA	0.49 aA
	Casts	0.79 bA	1.11 aB	5.01 aA	1.42 aA	12.54 bA	78.64 aA	0.51 aA
90	Soil	1.66 aA	1.74 aB	7.17 aA	10.39 aB	5.90 aA	72.14 aA	1.01 aA
	Bulk	1.32 aA	1.80 aB	5.78 bA	10.84 aB	4.57 aB	74.77 aA	0.92 aA
	Casts	1.25 aA	1.41 bB	10.99 aA	11.49 aB	3.00 aB	70.94 aA	0.94 aA

EXC - soluble and exchangeable; CAR – carbonates; OM – organic matter; MNOx – Mn oxides; FEOX1 – poor crystalline Fe oxides; FEOX2 – crystalline Fe oxides; RES – residual. Numbers followed by different letters indicate significant differences between means using the post hoc kruskalmc at $p < 0.05$. Lower case letters correspond to comparison between cast vs. bulk vs. control soil) and capital letters correspond to the comparison between times of the experiment.

Table 5. Partition of Hg (in percentages of the Hg content determined in all seven soil fractions) in the control soil, bulk earthworm-inhabited soil and casts of *Pontoscolex corethrurus* after incubation for 0, 30, 60 and 90 days in the spiked soil ($20 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ sol) (n=5).

Time (days)	Spiked soil	EXC	CAR	MO	MNOX	FEOX1	FEOX2	RES
0	Soil	4.01 aA	3.56 aAB	33.91 aA	3.02 aA	2.90 aA	48.38 aA	4.22 aA
	Soil	0.27 aA	1.46 aB	19.54 aB	1.04 aA	0.84 aB	71.75 aB	5.11 aA
30	Bulk	0.43 aA	1.06 aB	31.16 bB	2.43 bA	1.11 aB	59.30 aB	4.53 aA
	Casts	0.34 aA	0.93 aB	33.77 bB	1.72 aA	1.83 bB	57.59 aB	3.82 aA
60	Soil	0.14 aA	0.70 aB	13.83 aB	0.81 aA	0.97 aB	80.16 aB	3.39 aA
	Bulk	0.14 aB	0.73 aB	16.06 aB	1.39 aA	0.98 aB	77.64 aB	3.07 aA
	Casts	0.12 aA	0.63 aB	15.66 aB	1.16 aA	0.66 aB	78.12 aB	3.66 aA
90	Soil	0.12 aA	0.61 aBC	24.72 aC	1.25 aA	0.63 aC	69.20 aB	3.47 aA
	Bulk	0.13 aB	0.71 aBC	15.89 aC	0.98 aA	0.53 aC	79.43 aB	2.33 aA
	Casts	0.09 aB	0.57 aBC	9.11 bC	1.15 aA	0.42 aC	85.40 aC	3.26 aA

EXC – soluble and exchangeable; CAR – carbonates; OM – organic matter; MNOx – Mn oxides; FEOX1 – poor crystalline Fe oxides; FEOX2 – crystalline Fe oxides; RES – residual. Numbers followed by different letters indicate significant differences between means using the post hoc kruskalmc at $p < 0.05$. Lower case letters correspond to comparison between cast vs. bulk vs. control soil) and capital letters correspond to the comparison between times of the experiment.

In the spiked soil, the organic matter (OM) and the amorphous Fe oxides (FEOX1) Hg fractions were significantly higher in the casts than in control and bulk soils ($p < 0.05$). The participation of OM Hg fraction in the soil total concentrations increased from 19.5 % in the control soil to 33.8% in the casts and from 0.84% in the control soil to 1.83% in the casts for the FEOX1 Hg fraction. After 60 days and 90 days of incubation, casts were not significantly different from the other treatments except for the significant decrease of the OM Hg fraction at 90 days ($p < 0.05$).

3.3. pH and DOC in soils and casts

Soil pH (H_2O) and dissolved organic carbon (DOC) were significantly higher in *P. corethrus* casts in comparison with the control soil (Table 6). The bulk earthworm-inhabited soil showed intermediate soil pH and DOC contents. The same trend was observed for both field and spiked soil.

Earthworm activity increased pH of all soils from 0.2 to 0.3 units ($p < 0.05$). In the field soil, earthworms increased DOC more than 2 fold after 90 days, from 32 mg L^{-1} in the control soil to 75 mg L^{-1} in the casts.

Table 6. Soil pH (H_2O) and dissolved organic carbon (DOC) of control soil, bulk earthworm-inhabited soil and casts of *Pontoscolex corethrus* after incubation for 0, 30, 60 and 90 days in the field soil (0.336 Hg g^{-1} soil) and the spiked soil ($20 \text{ } \mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil) ($n=5$, mean \pm SD). Numbers followed by different letters indicate significant differences between treatments using the post hoc kruskalmc, at $p < 0.05$.

Time (days)	Treatment	Field soil	Spiked soil	Field soil	Spiked soil
		Soil pH (H_2O)	Soil pH (H_2O)	DOC (mg L^{-1})	DOC (mg L^{-1})
0	Control	3.3 ± 0.05 a	4.8 ± 0.09 c	43.9 ± 2.54 a	48.0 ± 7.89 a
	Control	3.2 ± 0.04 a	4.9 ± 0.08 c	39.9 ± 2.90 a	46.5 ± 2.14 a
30	Bulk	3.2 ± 0.04 a	5.0 ± 0.04 cd	51.4 ± 3.07 ab	47.8 ± 2.14 b
	Casts	3.4 ± 0.05 b	5.1 ± 0.02 d	60.9 ± 9.80 b	49.8 ± 1.20 b
	Control	3.2 ± 0.02 a	4.9 ± 0.06 c	35.4 ± 3.93 a	43.3 ± 3.11 a
60	Bulk	3.0 ± 0.04 a	5.1 ± 0.03 cd	51.9 ± 3.21 ab	51.9 ± 4.55 b
	Casts	3.1 ± 0.12 a	5.2 ± 0.04 d	58.5 ± 5.96 b	54.2 ± 2.58 b
	Control	3.0 ± 0.09 a	4.9 ± 0.04 c	32.0 ± 4.08 c	41.2 ± 3.13 a
90	Bulk	3.2 ± 0.07 b	5.1 ± 0.01 cd	60.3 ± 5.06 cd	56.9 ± 3.65 b
	Casts	3.2 ± 0.06 b	5.2 ± 0.02 d	74.9 ± 5.59 d	62.4 ± 4.29 b

3.4. Mercury concentrations in earthworm tissues

In our study, no mortality occurred in either soils (field soil vs. spiked soil) and earthworms gained weight throughout the test period. *P. corethrurus* was not affected by the mercury addition of 20 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil as expected; this concentration had been previously tested (Da Silva et al., unpublished data, 2013).

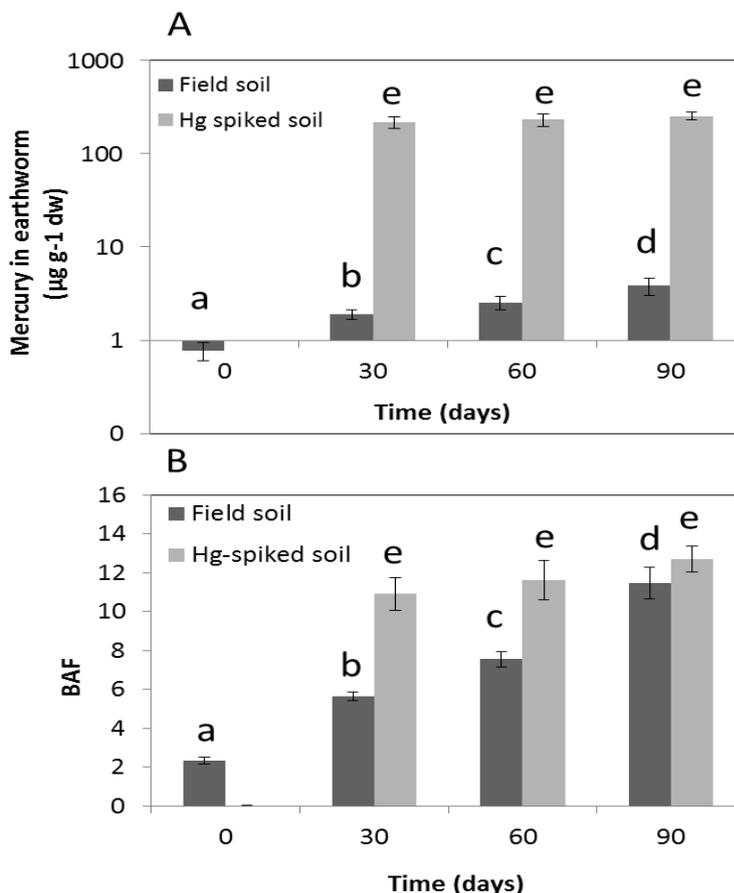


Figure 1. Hg concentrations in *Pontoscolex corethrurus* tissues (log) (A) and BioAccumulation Factor (BAF) (B), (n=10 to 15, mean \pm SD). Bars with different letters indicate treatments that are significantly different from one another ($p < 0.05$).

Bioaccumulation occurred over time in the field soil, ranging from 0.78 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ dw at the beginning of the experiment to 3.85 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ dw after 90 days (Figure 1A). Accumulation showed a linear trend with almost 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ accumulated per month.

In spiked soils, Hg concentrations were already very high in earthworms after 30 days (218 $\mu\text{g g}^{-1}$ dw). Although earthworms exhibited an initial period of rapid Hg uptake in the first 30 days, it was followed by a slower uptake reaching an apparent steady state after 90 days ($p > 0.05$). Hg concentrations in earthworm tissues were 232 and 254 $\mu\text{g g}^{-1}$ dw after 60 and 90 days respectively.

BioAccumulation factor (BAF) revealed a high Hg transfer from soils to earthworm tissues (Figure 1B). At the beginning of the experiment, the BAF was on average 2 for all the earthworms. After 90 days, the BAF was 12 in the field soil, meaning that earthworms accumulated 10 times the Hg from the soil in this period of time. In the spiked soil, the BAF ranged from 11 to 12 after 30 and 90 days respectively, showing evidence for earthworm tissues saturation (Figure 1B).

4. Discussion

4.1. Total mercury concentrations in soils and casts

In our study, although total Hg concentrations tended to be higher in earthworm casts, no significant difference with the control soil was observed (Table 3). However, in the literature only a few studies measured total metal contents in earthworm casts compared to the surrounding soil (Kizilkaya, 2004; Li et al., 2009; Zhang et al., 2009; Duarte et al., 2012). While some studies reported an increase of total Zn and Cu concentrations in casts (Kizilkaya, 2004; Li et al., 2009; Teršič and Gosar, 2012), one study showed that there was no effect of the soil passage through *P. corethrurus* gut on total Pb concentration (Duarte et al., 2012) and two studies found a trend for lower total Hg contents in casts compared with surrounding soil in the field (Zhang et al., 2009; Teršič and Gosar, 2012). These results are slightly different than ours, but finding less Hg in casts from the field is beneficial in order to reduce diffusion of Hg from earthworm casts to other substrates. Lower Hg contents could be linked to an important uptake of Hg through earthworms gut and bioaccumulation in earthworm tissues as observed in our study and many others (Burton et al., 2006; Ernst et al., 2008; Zhang et al., 2009; Rieder et al., 2011).

In addition, bacterial activities could be responsible for the significant decrease of total Hg concentrations observed in our study in the bulk earthworm-inhabited soil. Indeed, some resistant bacteria are able to volatilize mercury (Hg^0) (Mathema et al., 2011). Such activities could have been increased in the bulk earthworm-inhabited soil through the contact with the casts in microcosms, as suggested by the significant increase of DOC also observed.

4.2. Mobility and partitioning of mercury in soils and casts

In our study, Hg availability (i.e. soluble fraction) was decreased in earthworm casts in the field soil, while it was increased in the spiked soil. Our results highlighted a different behavior of *P. corethrurus* in the field and Hg spiked soil. The same trend has been previously observed in the literature. Indeed, several authors reported an increase in metal availability (Cd, Pb and Zn) in spiked soils using chemical extractions due to *Phretima* earthworm activity (Cheng et al., 2005; Yu et al., 2005; Wang et al., 2006). However Zorn et al. (2005) showed evidence that *Aporrectodea caliginosa* can decrease the availability of Zn in a 10-year aged amended soil. These results confirm that earthworms can affect differently metal mobility depending on whether the soil is naturally contaminated or chemically amended.

Furthermore, metal availability can be differently affected by earthworms from different functional groups (i.e. epigeic, anecic and endogeic). Endogeic species are probably best suited for determining the effect of earthworm activity on metal availability changes in soils (Sizmur and Hodson, 2009), however, they have been less used in such studies (probably because they are not commercially available). Species of the *Aporrectodea* genus have been found to decrease metal available concentrations in amended soils (Lukkari et al., 2006). In addition, a study showed that *Pontoscolex corethrurus* could decrease the more available forms of Pb (Duarte et al., 2012), which is consistent with our results.

Few studies have examined field soil and spiked soil simultaneously. However in the field, soil organisms like earthworms affect soils during the aging process after a pollution event has occurred. In our study the bioavailable fraction concentration was altered by the aging processes in the Hg spiked soil (Figure 1B and Table 5). Indeed, the toxicity of metals can decrease with time even if there is no change in the total concentration, because metals are gradually adsorbed to soil particles, thus decreasing the bioavailable fraction (Fujii and Kaneko, 2009). Metals in laboratory amended soils often behave differently to those in field-contaminated soils due to differing residence times of the metals and thus cannot be compared. Consequently, these differences may alter the role of earthworms in the bioavailability of metals in soils (Cheng and Wong, 2002).

The changes observed in Hg availability in soils could be linked to changes in Hg partitioning. Indeed, a significant reduction of the OM Hg fraction was measured in the casts compared to the control soil after 30 days and after 90 days for the field soil and the spiked soil respectively. The digestion of organic compounds occurring through the passage of soil in

gut of earthworm could solubilize forms of Hg previously associated to organic matter, as found in studies for Pb (Becquer et al., 2005; Duarte et al., 2012). The physico-chemical conditions of the earthworm gut, which include anoxia and high concentrations of organic substrates, appear to favor microbial activity (Drake and Horn, 2007). These gut conditions can thus stimulate the degradation of ingested organic matter (Brown et al., 2000) resulting in the mobilization of the specifically adsorbed Hg. Furthermore, anoxia conditions found in earthworm gut are particularly important for Hg because they provide suitable conditions for the methylation of inorganic-Hg, its most toxic and easily accumulated form (Hinton and Veiga, 2002; Rieder et al., 2013).

In earthworm gut, available Hg can possibly be readsorbed in more stable soil forms, such as in the Fe and Mn oxides. In our study, a significant increase in Hg concentrations was observed in the poor crystalline/amorphous Fe oxides (FEOX1) in casts of the field soil, and the same trend was observed for crystalline Fe oxides (FEOX2) in the spiked soil (Tables 4 and 5). Interestingly, Duarte et al. (2012) studied the impact of the same earthworm species in Pb and Mn, and obtained comparable results. Significant changes in total Fe and various Fe forms have been observed due to gut passage through *P. corethrurus* and an increase in amorphous Fe oxides (Bartz et al., 2010). According to Bartz et al. (2010), this increase was due to the transformation of available Fe after gut passage. Anoxia and increased pH found in *P. corethrurus* gut (Barois and Lavelle, 1986) could stimulate iron-reducing bacteria that could be responsible for Fe availability in earthworm gut by solubilizing Fe. This hypothesis has yet to be tested in further experiments.

In addition, *Pontoscolex corethrurus* earthworms had a prior exposure history in the field. It is known that they can adapt to their environment over time, and consequently their impact on metal chemistry may change with time (Lowe and Butt, 2007; Sizmur and Hodson, 2009). This could therefore explain the differences of Hg fractions observed at different times of the experiment. Furthermore, organic matter (OM) and Fe oxides (FEOX1 and FEOX2) are soil fractions that can easily be modified by many abiotic and biotic parameters and particularly by soil organism activities (i.e. earthworm and bacteria).

4.3 pH and DOC in soils and casts

Physical and chemical characteristics affecting metal partition, such as DOC and pH, have been proposed to be measured in earthworm casts in order to better understand the mechanisms at stake (Sizmur and Hodson, 2009). An increase of soil pH generally results in a decrease of Hg availability (Gabriel and Williamson, 2004).

In our study, soil pH and DOC were altered significantly by the transit through the earthworm gut, and were both found to increase in casts (Table 6). These changes of DOC and pH were correlated to Hg availability. Soil pH was correlated to the Hg soluble fraction ($r^2 = 0.39$, $p < 0.01$) and to the Hg EXC fraction ($r^2 = 0.62$, $p < 0.01$). DOC was correlated to the Hg soluble fraction ($r^2 = 0.12$, $p < 0.05$), to the Hg EXC fraction ($r^2 = 0.40$, $p < 0.01$) and to the OM Hg fraction ($r^2 = 0.35$, $p < 0.01$).

Even though mercury in soil solutions is assumed to be bound mainly to DOC (de Vries et al., 2007), soil pH was further correlated to the more mobile Hg fractions (soluble and exchangeable) in the field soil of this study. It is well established that soil pH is a key factor affecting the adsorption-desorption behaviors and hence bioavailability of heavy metals in soil (Gabriel and Williamson, 2004). Furthermore, it has been shown that earthworm activity mostly increases soil pH which is due to excretion of calcium compounds into the environment by calciferous glands and their alkaline urine (Cheng and Wong, 2002). The greater solubility of Hg in casts compared with control or bulk soil (Figure 1B) could be explained by the higher concentration of DOC in the casts than in the control and bulk soil (Table 6) as Hg binds strongly to organic complexes in solution (Ravichandran, 2004). In addition, complexation with DOC generally limits the amount of mercury available for uptake by methylating bacteria (Barkay et al., 1997).

4.4. Mercury concentrations in earthworm tissues

In our study, mercury bioaccumulation in *P. corethrurus* was important and increased over time reaching a BAF of 12 after 90 days. No mortality was observed and earthworms gained weight throughout the test period in both soils. Together, these results suggest that earthworms could accumulate Hg as long as they are in contact with it. Our study is the first that investigated Hg bioaccumulation in *P. corethrurus*. Many studies focused on Hg bioaccumulation but with different temperate species and found BAF ranging from 1 to 15. In the field, BAF of 15 was found for endogeic species such as *Aporrectodea rosea* et *Octolasion cyaneum* (Ernst et al., 2008). Endogeic species has been shown to accumulate more Hg than epigeic and anecic species in temperate regions (Ernst et al., 2008; Rieder et al., 2011). Further studies need to be carried out in order to compare Hg accumulation of *P. corethrurus* (endogeic) with epigeic and anecic tropical species.

In Cd polluted soils earthworms can accumulate metals in their tissues and survive by metal detoxification which involve binding and storage of the metals in metallothionein (Brulle et al., 2007; Liang et al., 2011). Such mechanisms may be involved in response to

mercury pollution since high Hg concentrations have been measured in earthworms (Burton et al., 2006).

Methylmercury was not measured in the present study; however results from the literature suggested that MeHg is easily accumulated in earthworm tissues. Indeed, BAF for MeHg varied from 175 and 249 (Burton et al., 2006; Zhang et al., 2009; Rieder et al., 2011). Methylation of mercury is known to occur in anaerobic soil conditions where sulfato- and iron-reducing bacteria can transform inorganic Hg (Fleming et al., 2006; Kerin et al., 2006). Recently, it has been shown that methylation could also occurred in earthworm gut where the presence of sulfato-reducing bacteria has been observed (Rieder et al., 2013). Consequently, the transformation of inorganic-Hg to the much more toxic form (MeHg) may not only occur under anaerobic soil conditions, but also in the anaerobic guts of earthworms inhabiting aerobic soil environments.

5. Conclusions

These results showed that the gut of earthworms (*P. corethrurus*) induced changes in Hg partition in the tropical soil under study. The earthworms redistributed Hg ingested towards less mobile and bioavailable forms in the natural soil by increasing Hg contents bound to amorphous Fe oxides. These effects are environmentally desirable, as the soluble and exchangeable Hg fractions are more bioavailable and can be easily leached to the groundwater and subsequently methylated by sulfate-reducing bacteria. Further investigation is needed to ascertain whether other tropical earthworm species have the similar effects on mercury redistribution.

More importantly, further work is needed to investigate the mechanisms for those significant changes in Hg availability in order to reduce the environmental risks of Hg in the earthworm casts. Also, interactions between earthworms and soil bacteria communities could participate to such changes and should be studied with a special focus in mercury resistant bacteria which can modify mercury speciation.

High Hg contents were measured in earthworm tissues, even in the natural soil containing $0.336 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil. Risks for the entry of mercury in the terrestrial food chain are therefore important in tropical areas where *P. corethrurus* is peregrine.

As bioaccumulation in earthworm tissues has been shown to be an important route for mercury in soils, it could hereafter be used for *in situ* biomonitoring.

V-2. Impact de *Pontoscolex corethrurus* et du mercure sur les communautés bactériennes de l'oxisol guyanais

Introduction

Dans les sols guyanais contenant des teneurs élevées en mercure, différentes interactions sont probables entre les microorganismes et ce métal. Le mercure peut agir sur les communautés microbiennes et donc sur le déroulement des cycles biogéochimiques majeurs (C, N, P) (Rasmussen & Sørensen, 2001; Müller *et al.*, 2002). Le mercure peut d'autre part être transformé par certaines bactéries résistantes (e.g. méthylation, réduction) ou être remobilisé par d'autres bactéries agissant sur ses phases porteuses principales (e.g. réduction des oxydes de fer) (Fleming *et al.*, 2006; Kerin *et al.*, 2006).

Les communautés bactériennes peuvent être modifiées par les vers de terre lors du passage dans leur tube digestif (Brown, 1995; Brown *et al.*, 2000). Les vers de terre pourraient ainsi indirectement modifier les formes du mercure et/ou modifier la mobilité du mercure dans les sols *via* le changement des communautés bactériennes. Cependant, l'effet des vers de terre sur les communautés bactériennes a été très peu étudié à ce jour dans les sols contaminés au mercure (Rieder *et al.*, 2013).

Dans cette deuxième partie du chapitre V, nous nous sommes intéressés aux communautés bactériennes présentes dans l'oxisol de la crique Combat, précédemment étudié. Une étude des communautés bactériennes de l'oxisol I a été réalisée sur la même période de trois mois, en réponse à l'activité des vers de terre : (1) dans l'oxisol I non dopé et (2) dans l'oxisol dopé à 20 µg Hg g⁻¹ sol.

Dans un premier temps, un dénombrement des bactéries cultivables totales a été effectué dans l'oxisol non dopé en présence ou non de vers de terre. Afin de caractériser ces communautés, nous avons ensuite étudié leur structure génétique par la méthode DGGE. Dans un deuxième temps, la diversité fonctionnelle des communautés bactériennes a été évaluée dans l'oxisol dopé à 20 µg Hg g⁻¹ sol afin d'évaluer l'impact de l'ajout ponctuel de mercure ainsi que la résilience des communautés bactériennes en présence ou en absence des vers de terre.

Les communautés bactériennes pouvant influencer quantitativement et qualitativement la composition des sols et leur conditions physico-chimique (teneur et nature du carbone, des oxydes de fer, du mercure, le pH...), il est important d'évaluer leur diversité génétique, mais aussi leur diversité fonctionnelle. Seuls les résultats et une brève description des méthodes utilisées sont présentés ici. La méthodologie détaillée est présentée dans le chapitre II.

V-2.1. Les communautés bactériennes de l'oxisol guyanais (non dopé)

V-2.1.1. Dénombrement des bactéries cultivables totales

Les bactéries totales cultivables ont été dénombrées par culture sur le milieu PCA (Plate Count Agar) au bout de 72h d'incubation à 28°C. Lors de l'expérimentation en microcosmes présentée dans le chapitre V-1, le sol témoin (sans vers de terre) ainsi que les turricules des vers et le sol non ingéré environnant ont été mis en suspension dans de l'eau physiologique afin d'extraire les bactéries des échantillons. Si l'effet des vers sur les communautés bactériennes est bien connu dans les sols, il est intéressant de le vérifier dans les sols contaminés. Les résultats du dénombrement sont présentés dans la Figure 1 ci-dessous.

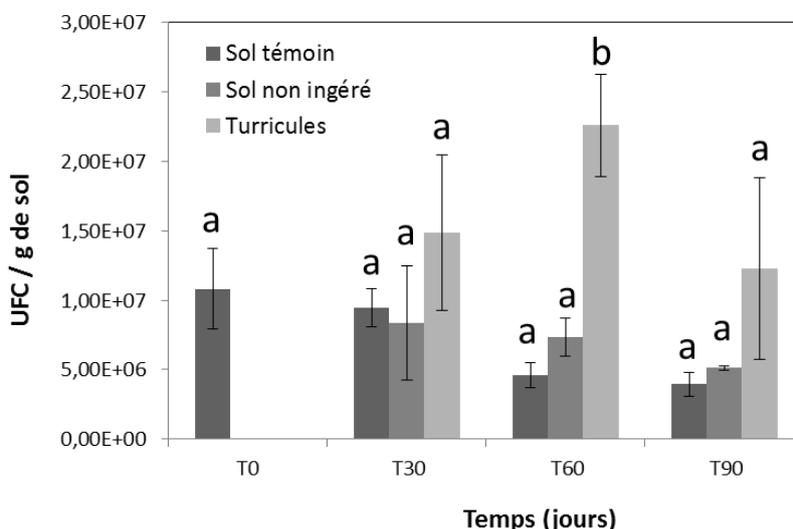


Figure 1. Dénombrement des bactéries totales cultivables de l'oxisol I lors de l'incubation des microcosmes sur trois mois (0, 30, 60 et 90 jours), en présence ou non de vers de terre. Les lettres différentes représentent des différences significatives entre les traitements ($p < 0.05$, Kruskal-wallis).

Bien que cette technique ne permette de dénombrer que les bactéries cultivables, il est intéressant de comparer le sol témoin avec les turricules afin de mettre en évidence l'effet des vers. Le dénombrement des bactéries totales a mis en évidence une abondance significativement plus importante dans les turricules en comparaison avec le sol témoin au bout de 60 jours (T60). Pour les autres dates, il n'y a pas de différence significative mais les mêmes tendances ont été observées. Des résultats comparables ont été obtenus dans l'étude de Wen *et al.* (2004) avec *Eisenia fetida* dans cinq sols contaminés (Cd, Cu Pb, Zn).

De plus, le sol non ingéré présente une abondance bactérienne intermédiaire (T60 et T90). Les turricules déposés en surface ou en profondeur dans les microcosmes sont en contact avec le sol non ingéré par les vers et semblent l'affecter en activant certaines bactéries.

Nous avons montré que les vers peuvent affecter l'abondance des bactéries totales cultivables. Il est intéressant de voir si la structure des communautés bactériennes est affectée par l'activité des vers dans ce sol caractéristique de Guyane française.

V-2.1.2. Structure génétique des communautés bactériennes

La structure génétique des communautés microbiennes des sols a été étudiée par la méthode DGGE (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis) afin d'évaluer la diversité génétique initiale des espèces bactériennes dans l'oxisol I et de mesurer l'effet des vers.

La méthode est décrite dans le point II-6.2. En bref, l'ADN total a été extrait des sols à l'aide d'un kit (Power soil DNA, MoBio), quantifié par Nanodrop (BioRad) et amplifié par PCR (Polymerase Chain Reaction) avec des amorces bactérienne universelles (338f et 518r) ciblant la région V3 de l'ADNr 16S. L'ADN ainsi amplifié a migré sur gel dénaturant (30-60 %) pendant six heures à 150 volts. Les gels ont été révélés et analysés avec l'ensemble Gel doc/Quantity one (BioRad). Les résultats des analyses DGGE sont présentés dans la Figure 2 et Figure 3.

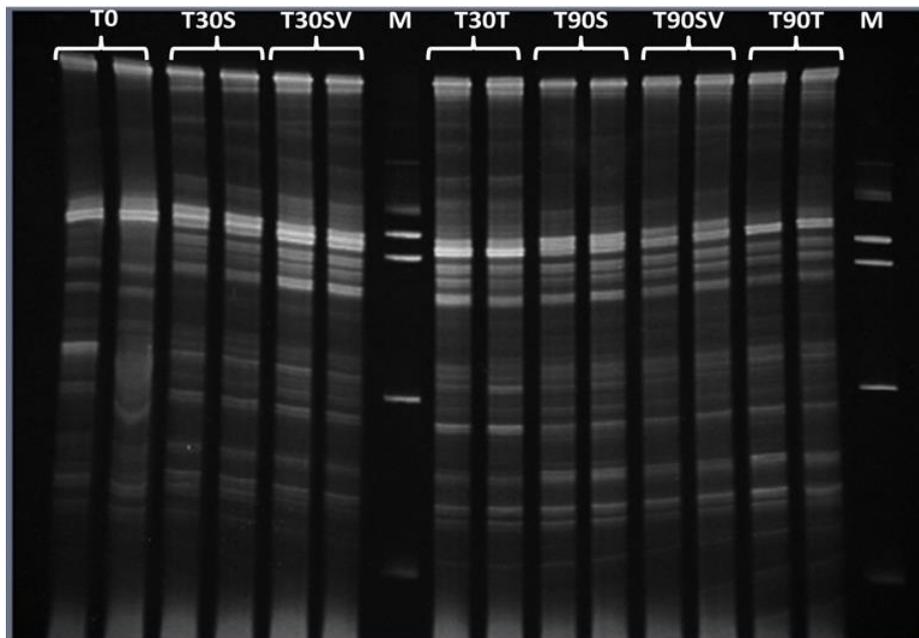


Figure 2. Photographie du gel DGGE gel DGGE ADNr 16 S pour les 3 dates T₀, T₃₀, et T₉₀, et avec 2 répétitions à chaque date. (S = sol témoin, SV = sol non ingéré, T = turricules, et M = marqueur de taille).

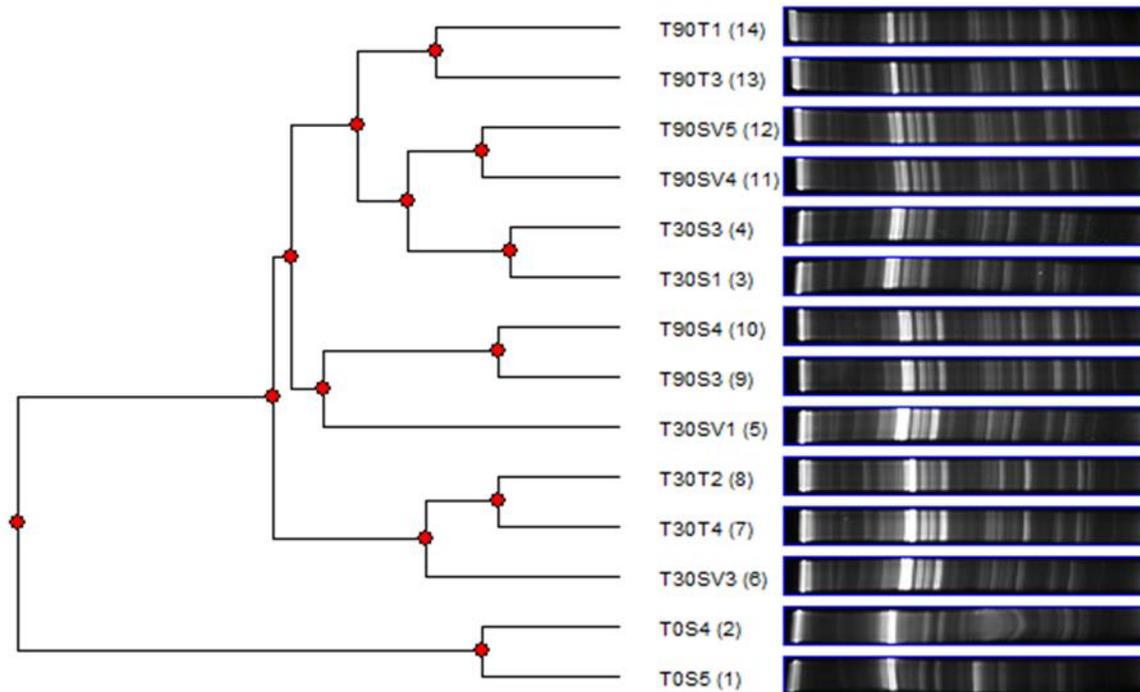


Figure 3. Dendrogramme UPGMA-ADNr 16S reconstruit sur la base d'une matrice de similitudes calculée avec le coefficient de Dice-Sorensen (présence/absence des bandes) représentant les similitudes entre les différents traitements appliqués à l'oxisol ; S = sol témoin, SV = sol non ingéré, T = turricules.

L'UPGMA ou Unweight Pair Group Method with Arithmetic mean est une méthode agglomérative qui regroupe les séquences les plus proches ; elle a été réalisée grâce au logiciel Total Lab. L'analyse du gel DGGE a montré que globalement les structures génétiques différaient entre les oxisols selon le traitement : sol témoin (S), sol non ingéré (SV) et les turricules (T). A chaque date, les communautés bactériennes des turricules sont différenciées de celles des sols témoins ; elles sont bien séparées sur le dendrogramme. Certaines bandes apparaissent et d'autres apparaissent ; de plus, l'intensité des bandes varient entre T30 et T90 montrant un changement de communautés également en fonction du temps d'incubation des vers dans les microcosmes. Ces résultats confirment l'effet des vers sur la structure des communautés bactériennes totales.

L'effet de *P. corethrurus* a également été observé sur les communautés des bactéries totales et dénitrifiantes (*nirK* et *nosZ*) dans un sol ferrallitique (Chapuis-Lardy *et al.*, 2010). Cette étude a montré que la structure génétique des communautés de bactéries totales et dénitrifiantes étaient modifiées dans les turricules.

Des analyses complémentaires ont été effectuées pendant cette thèse, en ciblant les gènes *mer A* et *mer B* de l'opéron *mer* (Barkay *et al.*, 2003). L'effet des vers sur les bactéries résistantes au mercure n'a pas été étudié à ce jour, alors qu'il est primordial de savoir si les

vers sélectionneraient ce type de bactéries, capables de volatiliser (*mer A* : réductase) ou de méthyler le mercure ionique (*mer B* : lyase). L'ADN total extrait des différents microcosmes n'a cependant pas pu être amplifié avec les amorces spécifiques des gènes de résistance (*mer A* et *mer B*). Les conditions dans lesquelles l'amplification a été effectuée peuvent ne pas être optimales. De plus, les souches résistantes au mercure peuvent ne pas posséder les gènes *mer A* ou *mer B*, sachant que la résistance bactérienne au mercure ne se fait pas uniquement via l'opéron *mer*.

Dans l'oxisol non dopé, il a été montré que les vers de terre affectent l'abondance totale des bactéries cultivables et aussi qu'ils modifient la structure des communautés bactériennes totales, probablement en sélectionnent certaines bactéries.

V-2.2. Diversité fonctionnelle des communautés microbiennes de l'oxisol (dopé)

La diversité fonctionnelle a été étudiée par analyse des profils de minéralisation de substrats carbonés dans des plaques BIOLOG Ecoplate™ afin de déterminer (1) les variations temporelles des différentes capacités métaboliques suite à une contamination ponctuelle importante (20 µg Hg g⁻¹ sol) et (2) l'effet des vers sur la résilience bactérienne suite à cette contamination.

A chaque date d'analyse (0, 30, 60 et 90 jours), les plaques BIOLOG ont été inoculées avec des suspensions de sol (diluées à 10⁻³) provenant de l'oxisol dopé en présence ou en absence de vers de terre. Après 96 heures d'incubation à 28°C, les plaques ont été lues au spectrophotomètre à 595 nm. L'AWCD (Average Well Color Development) et la diversité fonctionnelle ont été calculés et les résultats sont présentés dans la Figure 4.

L'AWCD représente l'activité moyenne des communautés bactériennes. On remarque que cette activité est significativement plus importante dans les turricules des vers et le sol non ingéré à 60 et 90 jours d'incubation comparé au sol témoin (p<0.05). Les résultats obtenus pour la diversité catabolique sont proches de ceux de l'AWCD et confirment que les vers de terre ont un effet significatif sur la diversité fonctionnelle bactérienne au bout de 90 jours.

Ces résultats indiquent une résilience plus rapide de la diversité fonctionnelle des communautés bactériennes en présence des vers. Cependant, un impact durable du mercure est observé. En effet, l'AWCD est plus faible que la valeur initiale (T0), même après 90 jours. En modifiant le mercure disponible dans les sols, l'activité des vers peut également contribuer à l'impact négatif du mercure observé.

Traitement Oxisol dopé	Temps (jours)	AWCD	Diversité catabolique
Sol témoin	0	0.56 ± 0.10 a	0.47 ± 0.12 a
Sol témoin	30	0.30 ± 0.04 b	0.21 ± 0.07 b
Sol non ingéré	30	0.33 ± 0.03 b	0.27 ± 0.04 b
Turricule	30	0.40 ± 0.11 b	0.27 ± 0.05 b
Sol témoin	60	0.32 ± 0.05 b	0.23 ± 0.02 b
Sol non ingéré	60	0.36 ± 0.06 c	0.26 ± 0.08 b
Turricule	60	0.45 ± 0.05 c	0.34 ± 0.07 ba
Sol témoin	90	0.31 ± 0.01 b	0.21 ± 0.03 b
Sol non ingéré	90	0.34 ± 0.08 c	0.23 ± 0.08 b
Turricule	90	0.41 ± 0.04 c	0.37 ± 0.08 ca

Figure 4. Diversité fonctionnelle des communautés bactériennes dans l'oxisol I dopé à 20 µg Hg g⁻¹ évaluée par les plaques BIOLOG, en calculant l'AWCD (Average Well Color Developemnt) et la diversité catabolique (Garland, 1997). Les lettres différentes représentent des différences significatives entre les traitements dans une même colonne (p-value < 0.05).

Conclusions et perspectives

L'impact des vers sur l'abondance, la structure génétique et la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes de l'oxisol I de la crique Combat, dopé ou non au laboratoire a été étudié. Une abondance plus importante des bactéries totales cultivables a été observée dans les turricules. Les résultats des analyses DGGE ont révélé un changement de structure des communautés microbiennes du sol en présence des vers de terre dès 30 jours et également à 90 jours. De plus, l'utilisation des plaques BIOLOG Ecoplate™ a montré l'impact des vers sur la diversité fonctionnelle globale des communautés bactériennes à travers le calcul de l'AWCD et de la diversité catabolique (Garland, 1997). Ces résultats sont en accord avec la littérature concernant l'effet des vers dans les sols en général (Brown, 1995; Brown *et al.*, 2000). Nous avons montré ici que l'effet des vers est également important dans les sols contaminés au mercure.

Si ces résultats montrent que les communautés bactériennes sont différentes dans l'oxisol, et ce d'un point de vue fonctionnel et moléculaire, des études supplémentaires en ciblant des gènes fonctionnels comme cela a été commencé avec les gènes *mer* pourraient ouvrir de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes qui influencent la mobilité du mercure.

V-3. Etude en climat tempéré :

Impact d'*Eisenia andrei* sur la mobilité du mercure dans un sol tempéré de la région parisienne (dopé ou non au laboratoire).

Résumé

Les activités anthropiques peuvent induire des modifications des propriétés physico-chimiques des sols et impacter la diversité ainsi que la structure des communautés des organismes. Le mercure est un polluant particulièrement préoccupant pour l'homme et pour l'environnement. Dans les sols, il peut impacter les organismes impliqués dans le fonctionnement du sol, les cycles biogéochimiques, et le recyclage du carbone. La toxicité du mercure dépend de sa spéciation et de sa disponibilité, propriétés elles-mêmes sous le contrôle des paramètres physico-chimiques des sols et de l'activité des micro- et macroorganismes. Cependant, peu d'études à ce jour se sont intéressées à l'impact des vers de terre sur la mobilisation du mercure dans les sols contaminés.

Les objectifs de cette étude étaient de déterminer (i) le rôle d'*Eisenia andrei* sur la disponibilité et la répartition du mercure entre les différentes phases du sol, et (ii) la cinétique de bioaccumulation du mercure dans les vers inoculés soit dans un sol naturel soit un sol dopé au laboratoire.

Une expérience en microcosmes a été mise en place selon quatre traitements: le sol témoin (S), le sol dopé au mercure (SM), le sol témoin en présence de vers (SE) et le sol dopé en présence de vers (SME). A différentes dates (0, 3, 8, 14, 30, 60 et 90 jours), les concentrations en mercure total, soluble et sa répartition dans les phases sols ont été mesurées. La bioaccumulation du mercure dans les tissus des vers a également été mesurée à ces mêmes dates.

Nos résultats ont montré que (i) *Eisenia andrei* peut modifier la disponibilité du mercure, notamment en diminuant les fractions soluble et soluble-échangeable (EXC), et (ii) cette espèce peut accumuler des concentrations importantes de mercure dans ses tissus. Les vers de terre semblent être responsables d'une diminution de la mobilité du mercure dans les sols, et en conséquence des risques liés à sa toxicité.

Mots-clés: mercure, disponibilité, bioaccumulation, *Eisenia andrei*.

Article 3

Article en préparation et à soumettre à la revue *Pedobiologia*

**Impact of *Eisenia andrei* on Hg partitioning and bioavailability
in a field and freshly spiked temperate soil**

Elodie Da Silva^{1*}, Nacima Sadi¹, Vanessa Alphonse¹ and Noureddine Bousserhine¹

¹ UMR BIOEMCO, équipe IBIOS, Université Paris Est Créteil, France.

*Corresponding author:

Elodie da Silva

UMR BIOEMCO, Equipe IBIOS, Université Paris Est Créteil, 61 Avenue du Général de
Gaulle, 94010 Créteil cedex, France.

Email: elodie.da-silva@u-pec.fr

Tél: + 33 1 45 17 16 64

Abstract

Anthropogenic pollutions can lead to modifications in soil physico-chemical properties and can affect the diversity and activities of soil organisms. Mercury is of major environmental concern, especially in soils where organisms are involved in soil functioning, bio-geochemical cycles and carbon turn-over. Mercury toxicity depends on its speciation and bioavailability, properties themselves under the control of soils physico-chemical properties and the direct or indirect action of soil micro- and macro-organisms. However, little information is available concerning earthworms' activity and their impact on soil mercury mobilization in contaminated soils.

Our study aims to assess (1) the role of the earthworm *Eisenia andrei* on the availability and partitioning of mercury and (2) the bioaccumulation kinetics of mercury in earthworm tissues in a field and spiked soils.

An experiment was conducted in microcosms with four treatments: the control soil (S), the soil + mercury (spiked soil) (SM), the soil + earthworms (SE) and the soil + mercury + earthworms (SME). At different times (0, 3, 8, 14, 30, 60 and 90 days), total mercury, mercury availability, and its partitioning in the soil were measured. Furthermore, mercury bioaccumulation in *E. andrei* was assessed at each date.

Our results showed that (i) *Eisenia andrei* can modify Hg availability by decreasing the soluble and exchangeable fractions and (ii) that this earthworm species can accumulate high contents of mercury in their tissues. Earthworms seem to be responsible for a decrease in Hg mobility and availability in soils, thus decreasing the risks associated to Hg toxicity.

Keywords: mercury, availability, bioaccumulation, *Eisenia andrei*.

Introduction

Mercury (Hg) is one of the most hazardous environmental pollutants because of its toxicity and accumulation in trophic chains. It has been classified by the World Health Organization (WHO) as one of the top ten pollution priorities. In temperate regions, industrial activities are the main emission sources of this metal and contribute to the increase of its concentration in many soils throughout the world (Anderson, 1979; Nriagu, 1989; Pacyna et al., 2006). Some studies showed a positive correlation between atmospheric mercury concentrations and soil Hg contents (Lacerda, 2003; Guedron et al., 2006). However, while mercury emissions have decreased since the 1980s in the United States and in Canada, in many North American ecosystems soil mercury concentrations have increased continuously (Roulet et al., 1999; Pacyna et al., 2006).

Because of dramatic population contaminations that have occurred, such as the case of Minamata in Japan in the early 1960s (Ekino et al., 2007), mercury risks for human health are relatively well known. Many studies have focused on aquatic ecosystems because of the human contamination that can occur through fish consumption (Charlet and Boudou, 2002; Bravo et al., 2010). Soils have been less studied to date, although they represent the most important sinks and therefore sources of mercury in the environment (Anderson, 1979). It is therefore a priority to understand mechanisms that can lead to mercury transfers from soil to water and groundwater.

Soil contains a rich diversity of flora and fauna, many of which are known to contribute to the biogeochemical cycling of elements (e.g. C, N, and P). Earthworms are the most important soil ecosystem engineers because of their important biomass (Edwards, 2004) and their numerous soil activities (Lavelle, 1988). They are known to influence soil properties in a number of ways ranging from improved aeration, drainage and increased microbial activities to the increase in organic matter degradation and nutrient availability (Edwards and Bohlen, 1996; Lavelle and Spain, 2001). It is therefore important to consider earthworms and its influence on Hg partitioning in contaminated soils.

To assess risks to soil biota, the determination of total mercury concentration is not sufficient because only a small fraction is bioavailable and may impact the soil ecosystem (Sheppard et al., 1992). Bioavailability can either be assessed by analyzing earthworm bioaccumulation in bioassays or by different chemical extractions such as water extraction or sequential extractions (Conder et al., 2001). These methods have been successfully used to estimate heavy metal bioavailability to earthworms (Kizilkaya, 2004; Becquer et al., 2005).

Many studies showed that earthworms influence the partitioning and bioavailability of metals in contaminated soils, and thus their mobility (Hobbelen et al., 2006; Sizmur and Hodson, 2009). The epigeic standard toxicity test earthworm *Eisenia fetida* has been widely used to determine the effect of earthworm activity on metal (Cu, Cd, Pb, Zn) extractability by chemicals (Wen et al., 2004; Liu et al., 2005; Udovic et al., 2007; Fujii and Kaneko, 2009). To our knowledge, the impact of earthworms on Hg availability and mobility has not been studied to date.

This study aims to (i) measure the impact of a species model (*Eisenia andrei*) on Hg mobility and partitioning, and (ii) determine the bioaccumulation of earthworms that have never been exposed to mercury contaminated soils. This study was carried out in a temperate field soil or the same field soil freshly spiked with inorganic mercury (HgCl₂).

Materials and methods

Soil samples and earthworm species

Soil samples were collected in April 2011 at a depth of 0 to 20 cm within a representative field in the Parisian region, in the department of Seine-et-Marne, France. No chemicals were utilized to fertilize this soil.

Chemical and textural characteristics of the soil are shown in Table 1. Granulometric analysis was determined according to the ISO NF X 31-107 standard. Soil pH (soil/H₂O ratio 1:2.5) was measured using a pH meter (MetrOhm 744). Organic matter in the soil (%) was determined by loss of ignition (LOI), by heating of the dried soils at 500°C for 8 hours.

Table 1. Soil physico-chemical characteristics. (n=3 ± SD).

Sand %	Clay %	pH (H ₂ O)	OM %	Organic C g kg ⁻¹	Total Hg (µg g ⁻¹)
50.1 ± 1.2	23.6 ± 0.5	7.7 ± 0.1	5.6 ± 0.6	62.85 ± 2.9	0.136 ± 0.006

The earthworm species selected was *Eisenia andrei* because of its use as a biological model in ecotoxicological studies (OCDE, 2004). The earthworms came from the earthworm breeding of a laboratory of Lille and were given by F. Vandenbulcke. The mean weight of earthworms was 0.40 g and the mean length was 4.5 cm. They were kept in a dark chamber at 20°C for acclimation during the experiment preparation. Before their inoculation in the

microcosms, earthworms were placed into Petri dishes with moist paper for 48h in order to empty their gut. Papers were changed daily in order to prevent coprophagy. Only fully clitellate earthworms were used for the microcosm experiment.

Experimental design and microcosm set up

This study was carried out in two conditions using (1) a field soil and (2) the same soil spiked with mercury chloride (HgCl_2) in the laboratory. Each microcosm series was conducted in presence or absence of *E. andrei* earthworms.

The test soil was air-dried and sieved using a 2 mm sieve prior to the experiment. Microcosms were formed by dividing the previously homogenized soil into 250 g portions and placed in plastic boxes. Soils were then brought to 54% of their water holding capacity. Control soils only received ultra-pure water, while in spiked soils a solution of dissolved mercury chloride (HgCl_2) was added in order to obtain the final concentration of $20 \mu\text{g g}^{-1}$ soil. The soil was then left two days for stabilization before earthworm's inoculation. In half of the microcosms, 6 earthworms were inoculated representing 1.8 to 2 g of biomass. The microcosms were incubated in the dark at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ for 90 days and soil humidity was maintained during the entire experiment.

Analyses were performed after 0, 3, 8, 14, 30, 60 and 90 days in each series of microcosms: the field soil (S), the spiked soil (SM), the field soil + earthworms (SE) and the spiked soil + earthworms (SME). At each date, twelve microcosms were harvested (triplicates of each treatment) and soils were homogenized and analyzed for mercury (total, soluble, partition), pH and bioaccumulation in earthworm tissues.

Total Hg concentrations in soils

Total mercury concentrations in soil samples were determined directly by thermal decomposition atomic absorption spectrometry after gold amalgamation using an Automatic Mercury Analyzer (AMA 254, Courtage Analyses, France), detection limit 0.01 ng. Samples were crushed in an agate mortar to $< 100 \mu\text{m}$ and about 100 mg were then placed in the AMA 254. Concentrations obtained for repeated analyses of certified reference sediment were within the range of Hg concentration given for the certified reference materiel CRM 144R ($3.14 \pm 0.05 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil).

Soluble mercury

Mercury availability was estimated by a water extraction according to Rasmussen et al. (2000). Briefly, 1 g of each soil replicate was suspended in 10 ml of ultra-pure water and agitated at 300 rpm for 30 min. The suspensions were then centrifuged at 4 000 rpm and the supernatants filtered at 0.45 µm with Teflon filters (Minisart SRP 25, Sartorius). Then, 200 µL of extracted supernatants were analyzed for mercury content with AMA 254. All liquid samples were previously filtered (0.45 µm Teflon filters, Minisart SRP 25, Sartorius) and acidified to pH 1 (HCl, 37% Suprapur).

Mercury partitioning in the different soil constituents

A seven-step sequential extraction procedure was used to define the partition of Hg in the soil. The procedure is based on Silveira et al. (2006). Table 2 reports the reagents solution and main operative conditions of the seven extraction steps. The sequential extraction procedure was performed using 0.5 g of soil sample in a 30 mL polypropylene centrifuge tube. After reaction with the appropriate reagent of each step, the mixture was centrifuged in order to separate the supernatant and the residue. The residue was washed with 5 ml of NaCl 0.1M and added to the supernatant. The supernatant was used for analytical determinations, whereas the residue was dried at room temperature prior to the next extraction step.

Table 2. Sequential extraction procedure for Hg partition (modified from Silveira et al., 2006).

Soil fraction (abbreviation)	Extractant	Volume	Conditions
1— Soluble and exchangeable (EXC)	0.1M CaCl ₂	7,5 ml	2h, room temperature
2— Surface adsorbed (ADS)	1M NaOAc (pH 5)	15 ml	5h, room temperature
3—Bound to Organic matter (OM)	NaOCl (pH 8.5)	5 ml	30 min, 90-95°C
4—Bound to Mn oxides (MNOX)	0.05M NH ₂ OH/HCl (pH 2)	15 ml	30 min, room temperature
5—Bound to amorphous Fe oxides (FEOX1)	0.2 M oxalate buffer (pH 3)	15 ml	2h, in the dark
6—Bound to crystalline Fe oxides (FEOX2)	6M HCl	20 ml	24h, room temperature
7— Residual (RES)	Air dried	-	Direct by AMA 254

Mercury analysis in earthworms and BioAccumulation Factor (BAF)

At each date, the earthworms were washed with distilled water and placed into Petri dishes with moist paper for 72h for depuration. Papers were changed daily. After 3 days, the earthworms were frozen at -20°C and then freeze-dried. The dried worms were crushed and analyzed directly with AMA 254 as described above.

In this study, the BioAccumulation Factor (BAF) was used to estimate the bioavailability of Hg in the earthworms when mercury was added in the laboratory and when it was not. The BAF was calculated as the ratio of the total Hg concentration in earthworms (in $\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt) to the total soil Hg content (in $\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt).

Statistical analyses

Normality of data and equal variance between treatments was tested using the Shapiro test and Bartlett's test respectively. Because of non-normality of data, differences between treatments (control soil, bulk soil and casts) in each soil were assessed by the Kruskal-wallis non parametric test. The post hoc test (kruskalmc) was used to identify significant differences between individual means ($p < 0.05$). The R software (R Development Core Team, 2008) was used for all statistical analysis.

Results

Total mercury concentrations

The field soil contained $0.136 \pm 0.006 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil dw and its content decreased over time (Table 3). Hg concentrations were significantly lower after 60 and 90 days of incubation in the earthworm-inhabited field soil ($p < 0.05$). No significant differences were observed in presence or absence of earthworms ($p > 0.05$).

Table 3. Total mercury concentrations of the field soil (S) and the spiked soil (SM), with and without the presence of *Eisenia andrei* (E). Means and standard error (n=3). Numbers followed by different letters indicate significant differences between means using the post hoc kruskalmc at $p < 0.05$. Lower case letters correspond to comparison between times of the experiment and capital letters correspond to the comparison between earthworm-free soil and earthworms inhabited soil in the field soil and in the spiked soil.

Total Hg Time (days)	Field soil		Spiked soil	
	S	SE	SM	SME
0	0.145 \pm 0.018 aA	0.145 \pm 0.018 aA	16.53 \pm 0.72 aA	16.53 \pm 0.72 aA
3	0.114 \pm 0.011 abA	0.116 \pm 0.006 abA	14.27 \pm 1.34 aA	15.40 \pm 1.14 aA
8	0.113 \pm 0.004 abA	0.109 \pm 0.002 abA	19.27 \pm 0.59 aA	19.11 \pm 0.34 aA
14	0.115 \pm 0.008 abA	0.126 \pm 0.014 abA	17.56 \pm 0.83 aA	17.94 \pm 0.20 aA
30	0.112 \pm 0.012 abA	0.120 \pm 0.009 abA	19.20 \pm 0.72 aA	18.22 \pm 0.98 aA
60	0.110 \pm 0.002 bcA	0.103 \pm 0.006 bcA	18.14 \pm 1.23 aA	16.45 \pm 0.90 aA
90	0.100 \pm 0.002 bcA	0.102 \pm 0.006 bcA	17.98 \pm 0.67 aA	17.98 \pm 0.85 aA

For the soil spiked with $20 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil dw, total Hg concentrations varied over time between 14 and $19 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ but the same trend was observed in the presence or absence of earthworms. No effect of earthworms on total Hg concentrations was measured in this spiked soil ($p > 0.05$).

Mercury availability

The results of water extractable Hg showed that only low Hg amounts are available in the studied soils (Figure 1). The soluble Hg fraction represented 0.2 to 7.6% of total Hg concentrations in the field soil ranging from 2 to 28 ng Hg g^{-1} soil at different times of the experiment. In the spiked soil, the soluble fractions ranged from 0.4 to 1.3% of the total Hg concentration from 7 to 250 ng Hg g^{-1} soil.

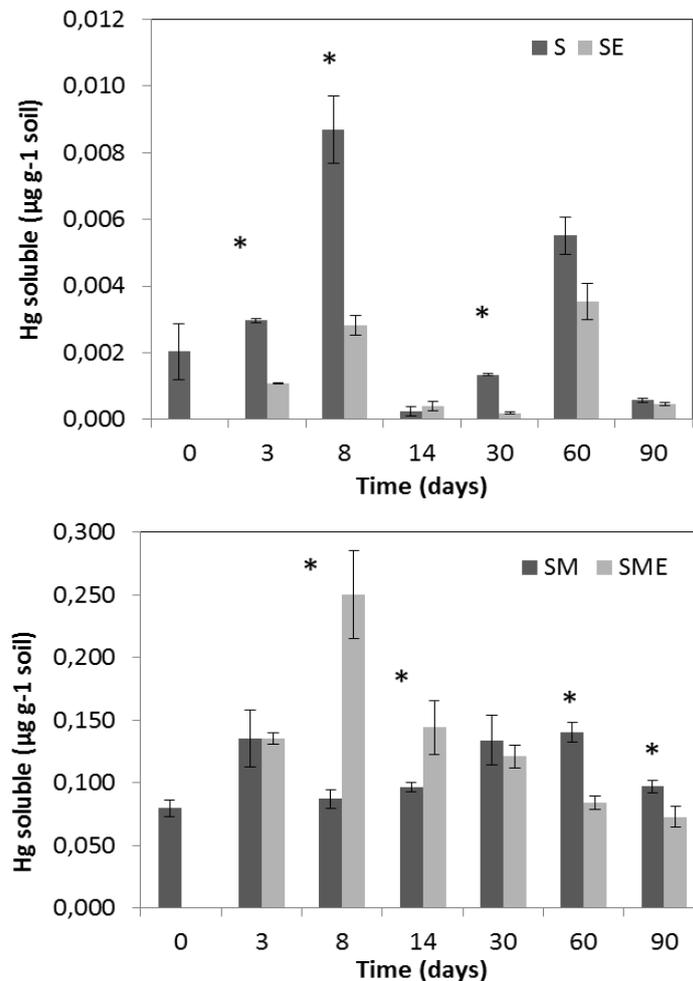


Figure 1. Soluble mercury concentrations in comparison in the earthworm-free soil and the earthworm-inhabited soil (A) in the field soil and (B) in the spiked soil. $n=3$, errors bars represent standard errors of the mean. * = significant difference between the earthworm-free soil (S and SM) and the earthworm-inhabited soil (SE and SME), ($p < 0.05$).

The concentrations of Hg water extractable were significantly lower in the earthworm-inhabited soil than in the earthworm-free field soil after 3, 8 and 30 days of soil incubation (Figure 1A). The same trend was also observed at the other dates, although it was not significant ($p > 0.05$). In the spiked soil, a significant difference was observed in presence and absence of earthworms ($P < 0.01$). After 8 and 14 days, soluble Hg was significantly higher in the earthworm-inhabited soil, while it was significantly lower after 60 and 90 days. The impact of *E. andrei* on Hg soluble fractions changed during the experiment.

Mercury partitioning

The determination of Hg fractions showed that organic matter (OM) and crystalline Fe oxides (FEOX2) were the most important Hg fractions in both field and spiked soils (Figure 2). In the field soil, these fractions represented 20-48% for the Hg OM and 26-56% for crystalline Fe oxides (FEOX2) (Figure 2A). The OM Hg fraction accounted for 40-52% and the FEOX2 Hg fraction for 31-47% in the spiked soil (Figure 2B).

Different results were obtained in comparison in the casts and in the control soil among the field and spiked soils, at different times of the experiment. In the field soil, the soluble-exchangeable (EXC), the carbonate (CAR), the organic matter (OM) and the Mn oxides (MNOX) Hg fractions were progressively decreased during the experiment, while the crystalline Fe oxides (FEOX2) Hg fraction tended to increase. The same trend was observed in presence and in absence of earthworms. Moreover, no significant effect of earthworms was observed ($p > 0.05$).

In the spiked soil, the concentrations of Hg decreased progressively in the soluble-exchangeable fraction (SOL-EXC), the carbonate (CAR), the organic matter (OM) and the Mn oxides (MNOX) fractions and were transferred to the further immobile fraction: the crystalline Fe oxides fraction (FEOX2). This trend was more pronounced in the presence of earthworms, although it was not significant ($p > 0.05$).

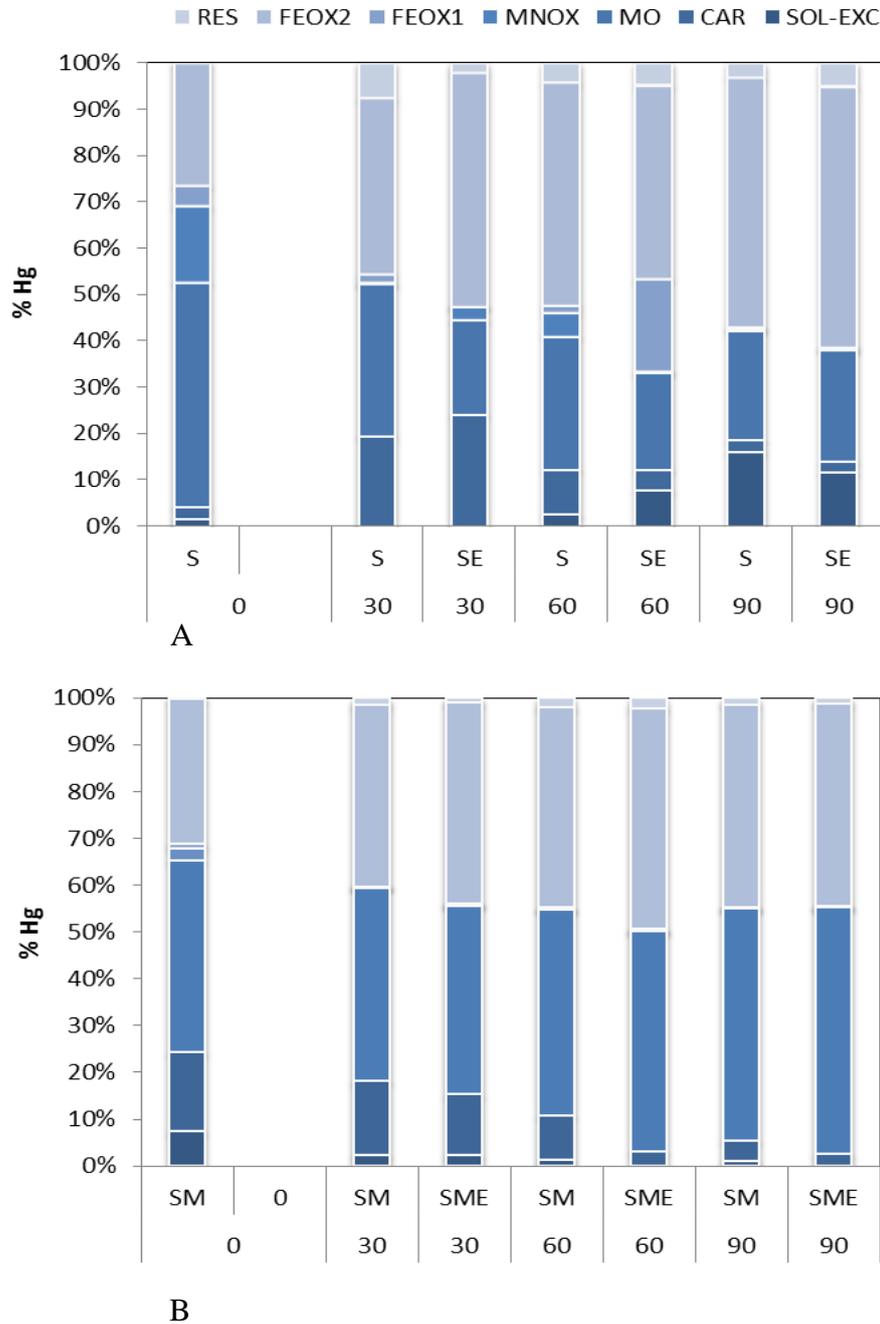


Figure 2. Percentage of Hg abundance in the soluble-exchangeable (SOL-EXC), carbonate (CAR), organic matter (OM), Mn oxides (MNOX), poor crystalline Fe oxides (FEOX1), crystalline Fe oxides (FEOX2) and residual (RES) fractions of earthworm-free control soil and earthworm inhabited soil (A) in the field soil (S) and (B) in the spiked soil (SM), n=3.

Determination of soil pH

Soil pH ranged from 7.7 to 7.2 in the field soil and from 7.8 to 7.1 in the spiked soil. A significant decrease of soil pH was observed in soils in the presence or absence of earthworms.

The soil pH measured was lower in the earthworm inhabited soil than in the earthworm-free soil (Table 4). Soil pH was significantly reduced by earthworms after 60 and 90 days in the field soil and after 30, 60 and 90 days for the spiked soil ($p < 0.05$). The same trend was observed in the other times of the experiment although it was not significant. The decrease of soil pH was on average 0.2 pH units.

Table 4. Soil pH (H₂O) of earthworm-free control soil and earthworm inhabited soil (A) in the field soil (S) and (B) in the spiked soil (SM), (n=3 ± SE). Numbers followed by different letters indicate significant differences between means using the post hoc kruskalmc at $p < 0.05$. Lower case letters correspond to comparison between times of the experiment and capital letters correspond to the comparison between earthworm-free soil and earthworms inhabited soil in the field soil and in the spiked soil.

Soil pH Time (days)	Field soil		Spiked soil	
	S	SE	SM	SME
0	7.7 ± 0.01 aA	7.7 ± 0.01 aA	7.8 ± 0.01 aA	7.8 ± 0.01 aA
3	7.7 ± 0.05 abA	7.7 ± 0.06 aA	7.6 ± 0.06 aA	7.7 ± 0.06 aA
8	7.8 ± 0.01 abA	7.7 ± 0.06 aA	7.7 ± 0.02 aA	7.6 ± 0.02 aB
14	7.7 ± 0.10 abA	7.6 ± 0.01 aA	7.7 ± 0.06 aA	7.6 ± 0.03 aA
30	7.6 ± 0.03 abA	7.6 ± 0.05 aA	7.5 ± 0.02 aA	7.4 ± 0.04 aB
60	7.9 ± 0.02 abA	7.4 ± 0.05 aB	7.5 ± 0.01 aA	7.3 ± 0.06 aB
90	7.5 ± 0.03 bcA	7.2 ± 0.04 bB	7.3 ± 0.01 aA	7.1 ± 0.03 aB

Mercury analyses in earthworms

Hg accumulation significantly increased with time in the field soil, ranging from 0.17 at the beginning of the experiment to 1.20 µg Hg g⁻¹ dw after 90 days (Figure 3A).

In the spiked soil, Hg concentrations were already 10 times higher in earthworms after 3 days (41.6 µg g⁻¹ dw) compared to the field soil (0.36 µg g⁻¹ dw) (Figure 3B). Although earthworms exhibited an initial period of rapid Hg uptake in the first 60 days, it was followed by a slower uptake reaching an apparent steady state (around 500 µg g⁻¹ dw) after 90 days ($p > 0.05$).

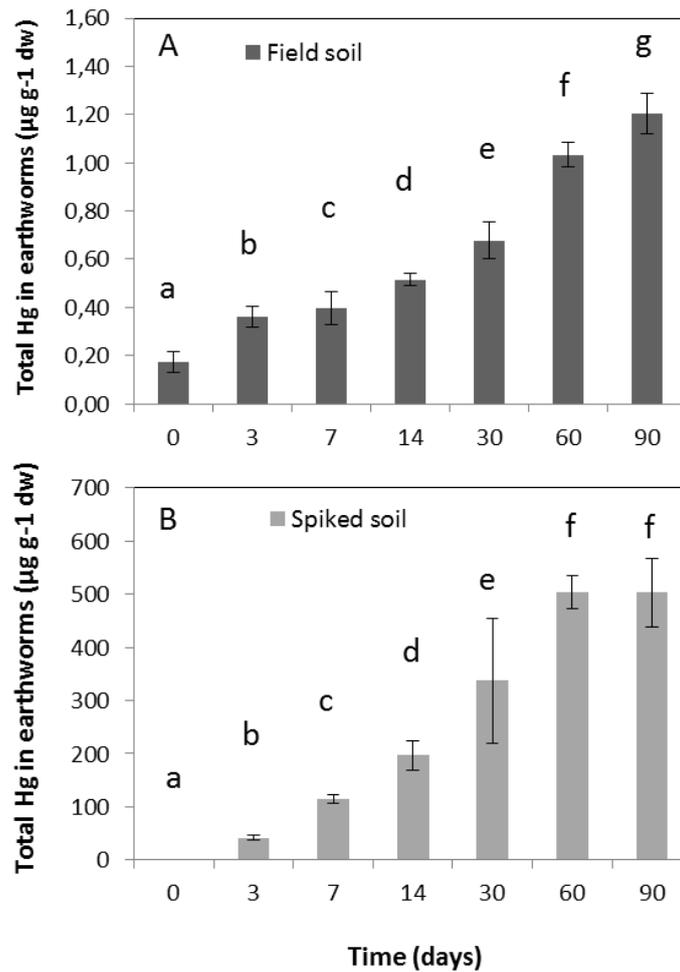


Figure 3. Mercury bioaccumulation kinetics in earthworm tissues of *Eisenia andrei* in the field studied soil (A) and in the spiked soil (B), (n=12, mean ± SE). Different letters indicate significant differences between the mean mercury levels at different times in the experiment.

The earthworms accumulated high Hg contents in the spiked soil and in the field soil (Figure 3), resulting in high BioAccumulation Factors (BAF) (Figure 4). BAFs revealed a high Hg transfer from the field soil to earthworm tissues.

At the beginning of the experiment, the BAF was already 1.2 and it increased up to 11.8 meaning that earthworms accumulated 10 times the Hg from the soil in 90 days. In the spiked soil, the BAF ranged from 11 after 14 days to 30 after 60 days of incubation. Between 60 and 90 days, the earthworms did not accumulate more mercury in their tissues.

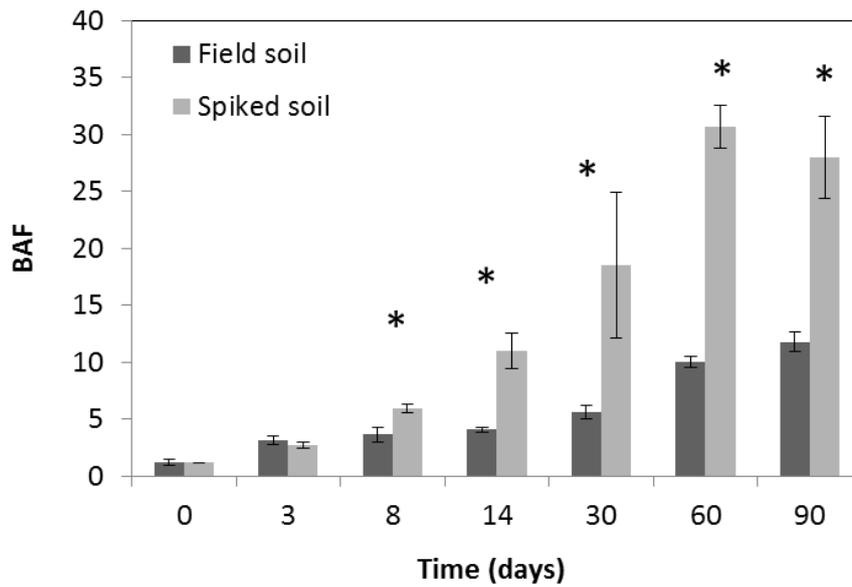


Figure 4. BioAccumulation Factor (BAF) in comparison in the field and spiked soils (n=3, mean \pm SE).

* Means significantly different between the soils ($p < 0.05$).

Discussion

Total mercury concentrations

In our study, total Hg concentrations in soils were not significantly different in the presence or absence of earthworms. However, in the literature two studies showed that total Hg contents in casts compared with surrounding soil in the field tended to be lower (Zhang et al., 2009; Teršič and Gosar, 2012). These results are different with ours and could be explained by casts aging differences in the different studies. In our study, casts were not separated from the surrounding soil and collected only after different times of the experiment, thus only a diluted effect of the earthworms could have been observed. In the field, the age of collected casts cannot be known as in Teršič and Gosar, (2012), however casts were freshly collected during earthworm depuration in the other study (Zhang et al., 2009).

Mercury availability and mobility

The concentrations of water extractable Hg were variable over time in soils in the presence or absence of earthworms. Because very small amounts of Hg were measured, the variables were actually also small. These variations could therefore be due to other biotic parameters, such as bacterial activities. This was also advanced by Sizmur et al. (2009) which

suggested that some of the added mercury was adsorbed in the soil particles in the early days, and that bacteria degrading organic matter then released mercury in soil solution. An important release of Hg has been observed after 8 days of soil incubation that could therefore be explained by bacterial activities.

In our study, Hg availability (i.e. soluble fraction) was significantly decreased by earthworms in the field soil. In the spiked soil, an initial increase of soluble Hg (days 8 and 14) was followed by the same significant decrease in the presence of earthworms. Initially, Hg was more available in the freshly spiked soil than in the field soil as also observed by Fujii and Kaneko (2009). These results suggest that important concentrations of available Hg could have affected earthworm activity at the beginning of the experiment.

Several authors reported an increase in metal availability, assessed via chemical extractions, in spiked soils due to earthworm activity (Cheng et al., 2005; Yu et al., 2005; Wang et al., 2006). However, two studies showed evidence suggesting that *Aporrectodea caliginosa* can decrease the availability of Zn in a 10-year aged amended soil or in a Cu spiked soil respectively (Zorn et al., 2005; Lukkari et al., 2006). The latest results are in agreement with our results as we observed a decrease of Hg availability by *E. andrei*.

Another explanation for the effect of earthworms on bioavailability is the modification of soil pH measured during the experiment. Indeed, mercury adsorption to mineral and organic surfaces is mainly dictated by soil pH. Some studies have suggested that earthworms can increase the metal availability in soil by decreasing the soil pH (Kizilkaya, 2004; Yu et al., 2005). However, while earthworms decreased the pH during this experiment, a decrease of Hg availability was measured. This indicates that the alteration of pH is not the only mechanism for the increasing effect that earthworms appeared to have on metal availability.

The decrease in soil pH was measured in all soils, even in the earthworm-free soils of this study, suggesting that others soil activities such as bacteria activities could have occurred during the experiment. Earthworms could also impact the mobility of metal through the activation of microorganisms producing acido-complexing substances capable of dissolving metals and/or their carrier phases (Cheng and Wong, 2002, Ma et al., 2003; Yin et al., 2003; Wen et al., 2004), and potentially leading to the decrease of pH observed.

In the temperate soil under study, Hg was mainly bound to the organic matter and crystalline Fe oxides. Such results for Hg have been reported by Guedron et al. (2009) which showed that mercury added to the soil is finely associated with organic complexes and/or Fe

oxides forming stable complexes through bindings between the carbon layer and the surface mineral. Hg concentrations in the different fractions were little changed by gut passage and when it occurred, the effects were variable. The general trend observed in our study was more a decrease for the soluble-exchangeable (EXC), the carbonate (CAR), the organic matter (OM) and the Mn oxides (MNOX) Hg fractions. The crystalline Fe oxides (FEOX2) Hg fraction tended to increase. In the literature, many studies showed that earthworms (*Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris*) mobilized the organic matter/oxidisable metal bound fraction (Kizilkaya, 2004; Wen et al., 2004). Consequently, an increase of more mobile fractions was mostly shown in these studies (i.e. water extractable, exchangeable and carbonate bound metals).

In temperate regions, no other study reported an increase of the Fe oxides fractions as we did in this study. In earthworm gut, available Hg can possibly readsorbed in more stable soil forms, such as in the Fe and Mn oxides. In tropical regions, studies using *Pontoscolex corethrurus* earthworm species observed a significant increase in Pb and Hg Fe iron fractions (Duarte et al., 2012; Da Silva et al., unpublished data, 2013). Significant changes in total Fe and various Fe forms have been observed due to gut passage through *P. corethrurus* and an increase in amorphous Fe oxides (Bartz, Carlos, et al., 2010). According to Bartz et al. (2010), this increase was due to the transformation of available Fe after gut passage. Anoxia and increased pH found in *P. corethrurus* gut (Barois and Lavelle, 1986) could stimulate iron-reducing bacteria that could be responsible for Fe availability in earthworm gut by solubilizing Fe. This hypothesis has yet to be tested in temperate regions.

Mercury accumulation in earthworms

No mortality occurred during the experiment in soils (field soil vs. spiked soil) and earthworms did not lose weight during the test period. *Eisenia andrei* had enough food resources in the soils as no food was added to the soil during the experiment. Furthermore, they seemed not to be affected by the addition of mercury to the soil ($20 \mu\text{g}$ of Hg g^{-1}) as no behavioral and morphological alterations were observed. These results were expected since previous tests were done in our laboratory and a study with *E. fetida* found no negative effect of mercury until $100 \mu\text{g g}^{-1}$ (Lock et al., 2001).

Mercury bioaccumulation in *Eisenia andrei* was important and increased over time, suggesting that earthworms could accumulate Hg as long as they are in contact with it. In the field soil, earthworms accumulated $1.2 \mu\text{g g}^{-1}$ soil dw after 90 days, as observed by Burton et al. (2006) with *Eisenia fetida* in a field polluted soil. However, in the spiked soil, Hg

saturation was observed after 60 days of earthworm inoculation. *Eisenia andrei* earthworms did not accumulate more than 500 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil. To our knowledge, such important concentration has never been reported in the literature.

In our study, BAF was 12 in the field soil and 28 in the spiked soil after 90 days of incubation. Such high accumulation factors could explain the decrease of soluble Hg fractions observed in our study.

Many studies focused on Hg bioaccumulation with different temperate species and found BAF ranging from 1 to 15. In the field, BAF of 15 was found for endogeic species such as *Aporrectodea rosea* et *Octolasion cyaneum* (Ernst et al., 2008). BAF ranging from 0.4 to 4.7 have been calculated for *E. fetida* and *L. terrestris* in Hg contaminated soils (Edwards et al., 1998; Hinton and Veiga, 2002; Burton et al., 2006). Although we found higher BAF in the present study with a test duration of 90 days, others studies were carried on for 35 days. After 30 days, BAF of 5 and 15 were found for the field and spiked soil respectively.

In addition, results from the literature suggested that MeHg is easily accumulated in earthworm tissues. Indeed, BAF for MeHg varied from 175 and 249 (Burton et al., 2006; Zhang et al., 2009; Rieder et al., 2011). Methylation of mercury is known to occur in anaerobic soil conditions where sulfato- and iron-reducing bacteria can transform inorganic Hg (Fleming et al., 2006; Kerin et al., 2006). Recently, it has been shown that methylation could also occurred in earthworm gut where the presence of sulfato-reducing bacteria has been evidenced (Rieder et al., 2013). Consequently, the transformation of inorganic-Hg to the much more toxic form (MeHg) may not only occur under anaerobic soil conditions, but also in the anaerobic guts of earthworms inhabiting aerobic soil environments.

Conclusions

We showed in this study that earthworms (*Eisenia andrei*) decreased the availability of Hg in the soils. The effect was clearer in the field soil, although the impact was observed in the spiked soil after 60 days of incubation.

In addition to earthworm activity, aging of the metal contaminated soils also affected mobility of the metals: metals became more tightly bound to the soil with time. These results indicate that in mercury contaminated soils, the importance of earthworms in decreasing metal mobility increases with increasing exposure time. However, this issue needs further long-term experiments.

The important Hg bioaccumulation measured in earthworms may also contribute to the decrease in the available Hg and soluble-exchangeable fractions in both field and spiked soils. Furthermore, for risk assessment, the use of field soils contaminated with Hg over an extended period of time (i.e., naturally aged soil) should give a better estimate of mercury bioaccumulation than soils freshly spiked with mercury.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Franck Vandenbulcke for providing *Eisenia andrei* earthworms from its breeding of the University of Lille and Alexandre Livet for the soil sampling.

Chapitre VI
Discussion générale

Ce travail de thèse est une étude pluridisciplinaire (biologie moléculaire, écotoxicologie, biogéochimie, microbiologie) dans laquelle l'impact du mercure dans les écosystèmes terrestres a été évalué sous l'angle de l'écologie du sol et des interactions sol-vers de terre. L'impact du mercure sur la diversité des vers de terre et sa toxicité vis-à-vis de ces derniers ont été évalués dans les deux premiers volets de cette thèse, respectivement *in situ* puis en conditions contrôlées au laboratoire. Ensuite, l'impact des vers de terre sur la mobilité du mercure dans un sol tropical et tempéré a été évalué lors de deux études en microcosmes avec deux espèces de vers représentatives de ces milieux, *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1957) et *Eisenia andrei* (Bouché, 1972).

Dans ce chapitre, les résultats obtenus sont discutés et comparés à la littérature. Les méthodes utilisées ainsi que leurs intérêts et/ou limites sont également discutés.

VI-1. Impact du mercure et des autres éléments traces métalliques (ETM) sur les organismes du sol

Il est reconnu que la contamination des sols par les éléments traces métalliques (ETM) induit des perturbations dans les processus biologiques impliqués dans les grands cycles biogéochimiques (C, N, P) en affectant la diversité et l'activité des organismes du sol. Evaluer l'impact du mercure et des ETM sur les organismes du sol (en particulier sur les vers de terre, organismes ingénieurs du sol) est donc fondamental afin de comprendre et de prédire leur impact sur l'environnement.

VI-1.1. Evaluation de l'impact du mercure et des autres ETM *in situ*

Sur le site d'étude de la Crique Combat, les vers de terre ont été échantillonnés selon la méthode normalisée Tropical Soil Biology Fertility (TSBF), modifiée d'après Anderson & Ingram (1993). La norme ISO n°23611-1 recommande l'utilisation de deux méthodes pour la collecte de vers de terre: une méthode manuelle et une méthode d'extraction au formol (Rombke, 2007). Notre site d'étude se trouvant dans une forêt primaire en Guyane française, nous avons toutefois choisi de ne pas utiliser de formol car c'est un produit cancérigène qui a des effets négatifs sur la faune et la flore (Bartlett *et al.*, 2010). De plus, le formol ne peut pas toujours être utilisé, notamment quand le site n'est pas très accessible ou que les propriétaires s'y opposent (Spurgeon & Hopkin, 1999). Les différentes méthodes d'échantillonnage des vers présentant chacune des biais. Quand elle est utilisée seule, la méthode manuelle a tendance à sous-estimer le nombre de vers de terres de petite taille, de juvéniles et de cocons

et au contraire à favoriser les vers épigés (Bartlett *et al.*, 2010). Bien que ce soit une méthode destructive et relativement longue à mettre en place, la méthode manuelle reste parmi les méthodes les plus efficaces et reste à ce jour encore la plus utilisée sur le terrain (Rombke, 2007).

L'impact des ETM (dont le mercure) sur les vers peut être évalué à différents niveaux : au niveau des communautés totales en mesurant l'abondance et la biomasse ou plus spécifiquement en identifiant les espèces pour déterminer la structure fonctionnelle des communautés (Cortet *et al.*, 1999).

En Europe et en particulier en France, les espèces de vers sont relativement bien connues (Bouché, 1972) et les vers sont généralement identifiés par taxinomie traditionnelle (i.e. morphologique). L'impact des ETM sur la richesse spécifique, la dominance de certaines espèces ou catégories écologiques, et la biodiversité peuvent ainsi être facilement évalués (Nahmani & Rossi, 2003; Nahmani *et al.*, 2003; Pérès *et al.*, 2011; Spurgeon & Hopkin, 1996, 1999). Cependant, la diversité des vers est moins connue en milieu tropical et en particulier en Amérique du Sud comparé au milieu tempéré (Brown & Fragoso, 2007b; Pavlicek & Csuzdi, 2012). De plus, les espèces sont difficilement identifiables pour des non spécialistes, en particulier quand les clés d'identification sont insuffisamment décrites.

Sur notre site, les abondances et les biomasses moyennes ont d'abord été mesurées car ce sont les paramètres les plus simples à mesurer quant à l'impact des ETM sur les communautés de vers. De plus, ils ne requièrent aucune expertise taxinomique, ce qui est très avantageux dans les études en milieu tropical. Dans notre étude, l'abondance et la biomasse moyennes des vers étaient plus importantes dans les oxisols de haut de pente qui renferment le plus de mercure total comparé aux sols hydromorphes de bas-fond. Dans les oxisols, l'abondance moyenne des vers était d'environ 40 individus par m² pour une biomasse moyenne de 4.5 g m⁻². Ces résultats sont supérieurs à ceux rapportés par Fragoso & Lavelle (1992) où l'abondance et la biomasse moyennes dans les forêts tropicales étaient de 68 individus par m² et 12.9 g m⁻² respectivement.

Afin de pallier aux problèmes d'identification rencontrés en milieu tropical, un travail de délimitation d'espèces basé sur le barcode ADN (Hebert *et al.*, 2003) a été effectué afin de proposer des espèces putatives (ou MOTUs). Le nombre de MOTUs présentes sur le site nous a permis d'avoir une première estimation de la diversité des vers: 12 MOTUs ont été

retrouvées dans l'oxisol contre 5 seulement dans le sol hydromorphe. L'oxisol présente donc la biodiversité la plus importante sur le site étudié. Ces résultats montrent que la diversité spécifique sur notre site d'étude est importante : 17 MOTUs au total ont été délimités alors que seulement 22 espèces ont été décrites dans la littérature en Guyane française à ce jour (Pavlicek & Csuzdi, 2012) et que 33 espèces auraient été échantillonnées dans ce département français (Brown & Fragoso, 2007b). De plus, ces MOTUs ont été identifiées morphologiquement jusqu'au genre en collaboration avec un spécialiste des vers tropicaux (S.W. James, University of Iowa, USA). L'espèce *Pontoscolex corethrurus* a été formellement identifiée dans l'oxisol. Dans le sol hydromorphe, une autre espèce du genre *Pontoscolex* a été identifiée.

Dans le but d'isoler les effets des polluants des autres paramètres environnementaux, les approches d'écologie du stress⁶ ont été développées et sont particulièrement utiles dans le cas de pollution diffuse (Van Straalen, 2003), comme c'est le cas du site étudié. Dans ce cadre, une approche multivariée où tous les paramètres sont considérés simultanément est préconisée.

Lors de notre étude d'impact du mercure *in situ*, différents paramètres biotiques (e.g. abondance, biomasse et diversité des vers) et abiotiques (e.g. analyses pédologiques des sols, humidité, pH, teneurs en mercure) ont été mesurés afin d'être pris en compte simultanément dans des analyses multivariées. Ces analyses multivariées effectuées (ACP) ont permis de visualiser les corrélations entre les différents paramètres mesurés. Des corrélations entre le mercure total et celles du fer total, l'aluminium total et les argiles ont été observées dans les sols étudiés (oxisol et sol hydromorphe), comme cela a été observé dans les sols guyanais (Roulet & Grimaldi, 2001; Harris-Hellal, 2008). De plus, trois clusters de MOTUs différents ont été observés dans ces analyses. Certaines MOTUs étaient corrélées au pH, d'autres aux nutriments (C, N, CEC) et enfin le troisième cluster était corrélé aux teneurs en fer, en aluminium, en argile et en mercure total. Ces résultats montrent une réponse spécifique selon les MOTUs de vers de terre du site.

Dans l'oxisol, de faibles quantités de mercure disponible ont été mesurées, ce qui induit un faible risque de toxicité pour les organismes. Ces sols sont situés en haut de pente et sont bien drainés. Dans ces conditions, la méthylation du mercure par les bactéries est mineure

⁶ Concept d'écologie récemment développé dans le domaine de l'écotoxicologie, qui recommande l'utilisation d'analyses multivariées dans l'évaluation des stress sur les communautés d'organismes.

comparée aux bas-fonds hydromorphes, ce qui pourrait également expliquer la plus grande diversité de vers observée dans l'oxisol. Par ailleurs, les vers présents sur le site d'étude ont pu développer une tolérance vis-à-vis du mercure car ils vivent en permanence en contact avec des sols contaminés. En conséquence, ces vers pourraient présenter des adaptations à l'environnement particulier du site d'étude. Ce qui pourrait en partie expliquer l'endémisme observé lorsque l'on compare la diversité des vers de notre site avec celle des Nouragues (réserve naturelle située également en Guyane française).

Il est parfois difficile d'identifier les écosystèmes contaminés en ne se basant que sur un seul groupe d'organismes (i.e. les vers de terre). Quand cela est possible, l'impact sur les communautés de plusieurs groupes d'organismes du sol devrait être évalué. Les contaminations n'affectent pas que les vers de terre, mais également la structure des communautés de la macrofaune des sols (e.g. Coleoptera, Arachnida, Diptera) (Nahmani & Lavelle, 2002). Ces études sont cependant plus difficiles à mettre en œuvre et requièrent des compétences multiples pour l'identification de tous les organismes échantillonnés ; et d'autant plus en milieu tropical.

VI-1.2. Evaluation de l'impact du mercure et des autres ETM *ex situ*

Sur le site de la Crique Combat, les concentrations en mercure dans les horizons superficiels varient de $0.1 \mu\text{g g}^{-1}$ dans les sols de haut de pente non contaminés à $9.22 \mu\text{g g}^{-1}$ dans les sols de bas-fonds orpaillés, ces concentrations diminuant rapidement avec la profondeur. L'oxisol utilisé lors du test écotoxicologique contient en moyenne $0.336 \mu\text{g Hg total g}^{-1}$ sol, valeur référence proposée par Santos-Francés *et al.* (2011) pour la détection de contamination par les activités minières au Venezuela. En effet, l'oxisol de la Crique Combat est impacté par les retombées atmosphériques du mercure lié aux activités d'orpaillage passées en amont du site et dans les bas-fonds.

Bien que l'utilité des tests écotoxicologiques ne soit plus à démontrer et que de nombreuses études aient été effectuées à ce jour (Lowe & Butt, 2007; Nahmani *et al.*, 2007; Spurgeon *et al.*, 2003 et les références citées dans ces revues), **le développement de méthodes « plus réalistes » est une nécessité, en particulier pour les études en milieu tropical.** Le choix d'un sol naturel par rapport au sols artificiels souvent utilisés en laboratoire (OCDE, 2004) est en accord avec la tendance actuelle à se rapprocher des conditions du terrain (Fründ *et al.*, 2010). Le choix de l'espèce de ver de terre utilisée pour

ces tests est également important : l'espèce doit être adaptée au substrat choisi et représentative de la région/site d'étude (Lowe & Butt, 2007).

L'utilisation d'espèces tropicales a récemment été proposée pour les tests écotoxicologiques en milieu tropical (Kuperman *et al.*, 2009). De plus, le cycle de vie de *P. corethrurus* a récemment été étudié dans le sol tropical artificiel (TAS) (Buch *et al.*, 2011). En effet, les caractéristiques de cette espèce en font un bon candidat pour devenir une espèce modèle tropicale : espèce géophage, distribution pantropicale, abondance sur le terrain, reproduction parthénogénétique (Lavelle *et al.*, 1987; Buch, 2010). Par ailleurs, son caractère parthénogénétique présente deux avantages en écotoxicologie : i) homogénéité génétique des individus utilisés pour un test limitant la variabilité des réponses due à la plasticité des vers, et ii) homogénéité des populations permettant de comparer les études menées dans différentes régions géographiques (Lowe & Butt, 2007).

Dans ce contexte, l'espèce *Pontoscolex corethrurus* et un sol naturel caractéristique de la Guyane française, l'oxisol, ont été choisis pour cette étude.

Les résultats du test écotoxicologique réalisé au laboratoire ont montré que seules les plus fortes concentrations en mercure ($>50 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ sol) peuvent affecter la survie, la biomasse et la reproduction de *Pontoscolex corethrurus*. Si un tel impact avait déjà été mesuré pour l'espèce *Eisenia fetida* (Lock *et al.*, 2001; Lapinski & Rosciszewska, 2008), aucune étude similaire à ce jour n'avait porté sur des vers tropicaux ni dans des sols naturels tropicaux. Dans notre étude, aucun effet visible sur *P. corethrurus* n'a été observé à une concentration de $20 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ sol, qui est pourtant une concentration supérieure à celle rencontrée sur le site d'étude ($9.22 \mu\text{g g}^{-1}$). Par contre, une mortalité a été observée dans notre étude pour une concentration à $100 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ sol après 56 jours d'incubation. Au Brésil et au Venezuela des concentrations pouvant aller jusqu'à 161 et plus de $500 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ sol respectivement ont été mesurées près de sites d'orpaillage (Duraó *et al.*, 2009; Santos-Francés *et al.*, 2011).

Afin d'évaluer la sensibilité au mercure de *P. corethrurus*, des tests supplémentaires et des comparaisons avec d'autres espèces tropicales sont nécessaires. En effet, *P. corethrurus* étant considérée comme une espèce tropicale particulièrement résistante (Lavelle *et al.*, 1987), d'autres espèces de vers pourraient être plus sensibles au mercure.

VI-1.3. Evaluation de la disponibilité du mercure et des autres ETM dans les sols

Dans ce travail de thèse, la disponibilité du mercure a été évaluée par deux extractions chimiques : le mercure soluble dans l'eau et le mercure soluble et échangeable extrait au CaCl_2 (0.1 M). Ces deux méthodes chimiques sont les plus simples et les plus utilisées par les chercheurs (i.e. extractions à l'eau et/ou au CaCl_2), car elles se rapprochent le plus de conditions réelles du terrain (Lebourg *et al.*, 1996; Peijnenburg *et al.*, 2007). La fraction disponible du mercure mesurée représente moins de 1% du mercure total dans les deux sols étudiés.

Bien que les concentrations extraites soient très faibles, des concentrations importantes ont été mesurées dans les vers de terre en microcosmes. *Pontoscolex corethrurus* a accumulé jusqu'à 10 fois les quantités de mercure total présentes dans les sols naturels ($0.336 \mu\text{g Hg g}^{-1}$) et jusqu'à 15 fois celui dans les sols dopés à $20 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ de sol. Pour *E. andrei*, les quantités accumulées sont jusqu'à deux fois plus importantes dans le sol dopé. Nos résultats confirment que les quantités disponibles évaluées par les méthodes chimiques sous-estiment la fraction du mercure réellement disponible dans les sols et par conséquent le niveau d'accumulation dans les organismes.

L'étude de van Gestel (2008) a comparé les méthodes chimiques (i.e. extractions) et biologiques (i.e. bioaccumulation) pour évaluer la disponibilité du Cd, Cu, Pb et Zn. Les résultats suggèrent que les concentrations disponibles, dans l'eau ou le CaCl_2 à 0.01 M, ne permettent pas de prédire la biodisponibilité des ETM. En effet, mesurer les ETM dans les tissus des vers de terre (i.e. bioaccumulation) donne une meilleure indication de leur biodisponibilité que les concentrations totales dans les sols car elle prend en compte les caractéristiques qui affectent la biodisponibilité des ETM dans les sols (Lanno *et al.*, 2004). L'utilisation de *Pontoscolex corethrurus* comme bioindicateur de la pollution au mercure pour notre site d'étude et pour le milieu tropical en général serait très intéressante et ceci comparativement aux méthodes chimiques.

En plus des vers de terre, d'autres organismes sont connus pour accumuler des polluants comme les champignons, les escargots, ou les moules et ils pourraient être utilisés comme bioindicateurs de pollution et/ou pour l'évaluation environnementale (biomonitoring). Les escargots ont récemment été utilisés dans des études *in situ* utilisant des cages et les résultats ont montré que la bioaccumulation du Cd avait lieu même sur les sites classés comme « non pollués » (Pauget *et al.*, 2013). Les résultats confirment également la nécessité d'utiliser des

mesures biologiques pour évaluer la mobilité des ETM dans les sols. Une attention particulière est portée aux champignons, qui ont une forte capacité de bioaccumulation du mercure et du méthylmercure (Kabata-pendias & Pendias, 2001; Falandysz *et al.*, 2002; Kabata-pendias & Mukherjee, 2007; Rieder *et al.*, 2011).

VI-2. Impact des vers de terre sur la distribution du mercure dans les sols

Afin d'évaluer les risques liés à la contamination des sols, une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels les vers de terre influent sur la mobilité, la répartition et la spéciation du mercure ou des autres ETM est fondamentale.

VI-2.1. Vers et mobilité du mercure : modification des paramètres physico-chimiques des sols

Les résultats de notre étude menée sur l'oxisol ont montré que la concentration de mercure disponible dans les turricules était inférieure à celle du sol témoin (non dopé). Un tel résultat indique que la fraction soluble a été diminuée en présence de *P. corethrurus* dans l'oxisol. Le mercure pourrait avoir été transformé dans le tube digestif des vers dû aux conditions particulières (pH neutre, eau et éléments organiques abondants) et favorables pour une activité bactérienne en condition anaérobie (Drake & Horn, 2007) et/ou avoir été transféré dans les tissus des vers. Ces résultats suggèrent que les vers de terre ont un rôle bénéfique dans les sols contaminés, limitant la disponibilité du mercure.

Dans les oxisols dopés, les vers de terre ont augmenté la fraction soluble du mercure. Les mêmes tendances ont été observées dans l'étude menée sur un sol tempéré avec *Eisenia andrei*. Ce résultat est inattendu au vue de la forte accumulation du mercure observée dans les vers. Cette augmentation pourrait toutefois être liée à une stimulation importante des bactéries par les vers dans les sols contaminés, car les concentrations de mercure liées à la matière organique ont significativement diminuées après 90 jours d'incubation (de 24% dans le sol à 9% dans les turricules).

Ces résultats mettent en évidence les risques liés à la contamination des sols au mercure, et la perturbation qu'il induit dans le fonctionnement des vers. Les résultats de cette étude sont les premiers concernant l'impact des vers de terre sur la mobilité du mercure.

Dans la littérature, les mêmes résultats ont toutefois été observés pour d'autres ETM. Plusieurs auteurs ont rapporté une augmentation de la mobilité des ETM (Zn) dans les sols dopés, en présence de vers (Cheng *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006), alors que les résultats de Zorn *et al.* (2005) suggèrent qu'*Aporrectodea caliginosa* peut diminuer la

disponibilité du Zn dans un sol dopé depuis 10 ans. Ces résultats montrent que les vers de terre peuvent avoir un impact différent selon qu'ils se trouvent dans un sol anciennement ou récemment dopé.

Le mercure ajouté dans les sols au laboratoire peut présenter des propriétés chimiques différentes de celui des sols naturels. Mais surtout, une grande quantité de mercure ajouté en une fois (e.g. pollution ponctuelle sur un site d'orpaillage) va saturer immédiatement tous les sites de fixation du complexe argilo-humique dans le sol en question. Dans notre étude, les extractions séquentielles montrent que le mercure s'est fixé en grande quantité sur la matière organique, soulignant le nombre de sites de fixation important pour le mercure sur cette fraction du sol.

Un protocole d'extraction séquentielle a été utilisé dans ces études de mobilité (Silveira *et al.*, 2006) afin d'évaluer la répartition du mercure dans les différentes phases du sol ainsi que l'évolution de cette répartition suite à l'activité des vers de terre. Les extractions séquentielles appliquées au sol sont des méthodes efficaces pour déterminer la répartition des métaux dans les sols et dans les turricules des vers. De plus, le protocole choisi est adapté aux sols tropicaux, et un protocole assez similaire a été utilisé récemment pour étudier l'impact de *P. corethrurus* sur la répartition du plomb et du manganèse dans des sols contaminés (Duarte *et al.*, 2012).

Bien que les quantités de mercure soient très faibles dans l'oxisol, les résultats obtenus ont montré que la distribution du mercure a été modifiée en présence de *P. corethrurus*. Les principales fractions affectées par les vers de terre ont été celles du mercure soluble et celles associées aux oxydes de fer amorphes. Dans l'oxisol non dopé, les vers de terre ont diminué la première et augmenté la deuxième. Ces résultats suggèrent une immobilisation du mercure en présence de *P. corethrurus*. En effet, le mercure lié au fer est moins mobile que celui des autres fractions. Ces mêmes tendances ont été observées dans l'étude de Duarte *et al.* (2012), confirmant le rôle bénéfique immobilisateur d'éléments traces métalliques de *P. corethrurus*.

Afin de mettre en évidence les mécanismes mis en jeu dans la mobilité des ETM dans les sols en présence des vers, le pH et le carbone organique dissous (COD) ont été suivis pendant toute l'expérimentation de notre étude en microcosmes. Des augmentations significatives du pH et du taux de COD ont été mesurées dans les turricules de *P. corethrurus* en comparaison au sol contrôle et au sol non ingéré. Les mêmes résultats ont été montrés chez cette espèce pour le pH dans différents oxisols brésiliens (Bartz *et al.*, 2010; Duarte *et al.*, 2012). Bien que

cette espèce soit connue pour augmenter les taux de carbone dans les sols tropicaux (Bartz *et al.*, 2010a, 2010b), son effet sur le carbone organique dissous a été mesuré pour la première fois dans ce travail.

Dans notre étude, les corrélations entre le pH ou le COD et le mercure soluble et soluble-échangeable étaient également significatives. Les augmentations du pH et du COD dans l'oxisol non dopé étaient corrélées à la diminution du Hg soluble et soluble-échangeable. Une corrélation significative a été montrée entre l'augmentation du COD par *E. fetida* et la concentration des ETM (Cu, Cd, Pb, Zn) dans la phase soluble du sol (Wen *et al.*, 2004).

Comme pour tous les ETM, l'adsorption du mercure diminue généralement avec la diminution du pH dû aux charges des surfaces des colloïdes qui sont pH-dépendantes (Gabriel & Williamson, 2004). Une augmentation du pH (ici dû au passage du sol dans le tube digestif des vers) favorise donc l'adsorption du mercure sur les surfaces des constituants du sol. De plus, à des pH moins acides, le Carbone Organique Dissous (COD) est davantage chargé en sites négatifs, complexant ainsi plus le mercure et le rendant conséquemment moins disponible pour les organismes du sol comme les bactéries réductrices et méthylantes (Ravichandran, 2004).

VI-2.2. Vers et microorganismes: mobilisation et méthylation du mercure

Les vers de terre creusent des galeries dans les sols et créent des turricules qui sont chimiquement, physiquement et biologiquement différents du sol environnant (Edwards, 2004). Cet écosystème s'appelle la drilosphère⁷. De plus, ils ingèrent directement le sol et la matière organique, ainsi que les microorganismes associés. Lors du passage dans le tube digestif des vers, l'activité de ces derniers peut être stimulée (Brown *et al.*, 2000; Drake & Horn, 2007).

Dans notre travail, une augmentation du nombre de communautés bactériennes actives a notamment été observée dans l'oxisol non dopé, et la même tendance a été observée dans les turricules d'*Eisenia fetida* dans des sols contaminés par différents ETM (Cu, Cd, Pb, Zn) (Wen *et al.*, 2004). *P. corethrurus* a également modifié la diversité fonctionnelle et génétique de ces communautés bactériennes. L'impact des vers de terre sur la mobilité du mercure *via* la stimulation des communautés bactériennes pourrait donc être un mécanisme important impliqué dans la modification de ses phases porteuses.

⁷ La **drilosphère** est la fraction de la terre qui est passée par le tube digestif des vers de terre et qui constitue la paroi des galeries. L'épaisseur moyenne de la drilosphère est de 2 mm mais peut atteindre 5 à 10 mm.

La modification de la disponibilité du mercure pourrait être liée à la stimulation de bactéries transformant la matière organique et/ou les oxydes de fer. Cette stimulation pourrait indirectement remobiliser le mercure lié à ces deux phases principales fixatrices du mercure (Harris-Hellal *et al.*, 2010).

Dans notre étude, les concentrations de mercure associées à la matière organique de l'oxisol ont été modifiées au cours du temps. En activant les communautés bactériennes dans les sols, les vers favorisent la dégradation de la matière organique, comme le montre l'augmentation significative du COD en comparaison des turricules et des sols témoins.

Une augmentation de la quantité de mercure associé à la phase oxydes de fer a été mesurée en présence de *P. corethrurus* dans l'oxisol. Des études récentes ont montré que les vers de terre modifient la disponibilité du fer et ses différentes formes lors du passage du sol dans leur tube digestif, comme cela a été observé chez *P. corethrurus* (Bartz *et al.*, 2010). Cette modification pourrait se faire *via* l'activation de bactérie ferri-réductrices dans le tube digestif et/ou dans le sol environnant. Dans le tube digestif des vers, les conditions favorables à la modification du fer et à l'activité des bactéries ferri-réductrices sont réunies : augmentation du pH, de composés organiques facilement assimilables, d'eau et conditions anaérobies (Barois & Lavelle, 1986; Bartz *et al.*, 2010). Par ailleurs, une étude récente dans notre laboratoire a montré que les bactéries ferri-réductrices étaient capables de solubiliser les oxydes de fer du sol modifiant ainsi la distribution du mercure qui lui est associé (Harris-Hellal *et al.*, 2010).

Les conditions anaérobies qui existent dans le tube digestif de vers sont favorables à certaines bactéries clés influant la modification des formes chimiques du mercure. En effet, les bactéries ferri-réductrices (BFR) et sulfato-réductrices (BSR) (Fleming *et al.*, 2006; Kerin *et al.*, 2006) sont capables de méthyler le mercure en condition anoxique. Ainsi, la méthylation du mercure pourrait avoir lieu dans le tube digestif des vers, ce qui a été montré dans deux études récentes : dans le tube digestif d'*Eisenia fetida* (Hinton & Veiga, 2002) et dans celui de *Lumbricus terrestris* (Rieder *et al.*, 2013). Or, le méthylmercure est la forme la plus facilement assimilable par les autres organismes dû à sa nature lipophile. La présence de cette forme toxique pourrait fortement impacter les chaînes trophiques terrestres.

L'impact de *P. corethrurus* dans les sols tropicaux guyanais (oxisol) est représenté schématiquement dans la Figure 1, d'après les résultats obtenus dans cette thèse et la littérature.

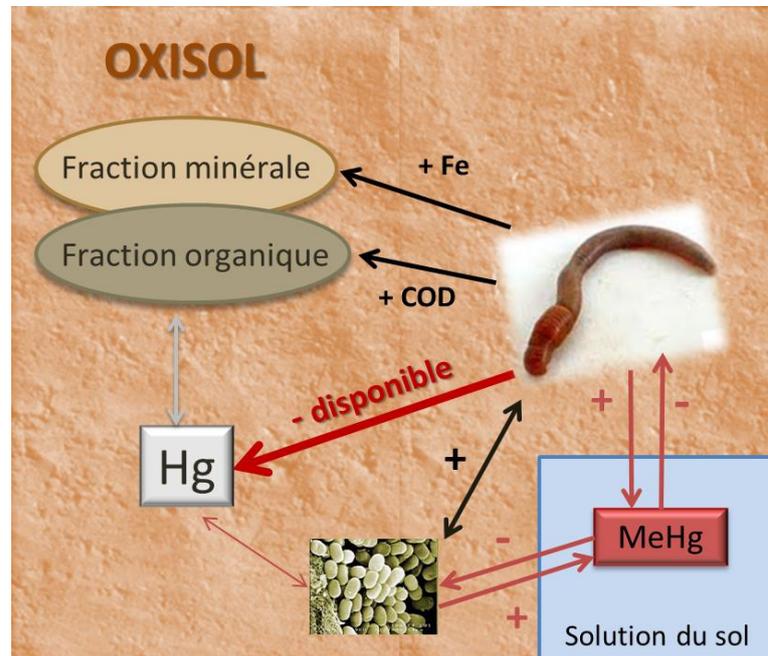


Figure 1. Impact de *Pontoscolex corethrurus* sur le mercure dans un oxisol guyanais (en rouge les interactions étudiées avec le mercure, en noir celles avec les vers et en gris la fixation du mercure sur certaines phases du sol).

P. corethrurus a tendance à diminuer la fraction du mercure disponible (-) dans l'oxisol guyanais et à augmenter la fraction liée aux oxydes de fer (+). Les mécanismes mis en jeu sont l'augmentation du pH et du COD (+) dans les sols, ainsi que la stimulation des communautés bactériennes (+). De plus, la méthylation du mercure (Hg^{2+}) peut se faire par les bactéries sulfato-réductrices (BSR) et ferri-réductrices (BFR) (+) dans les sols ou dans le tube digestif des vers (+), en condition d'anoxie. Le MeHg ainsi formé peut être accumulé dans les organismes terrestres (e.g. les vers de terre), et celui-ci impacte négativement les communautés des organismes dans les sols (-), ici les vers de terre et les bactéries et par voie de conséquence les animaux qui s'en nourrissent.

VI-3. Bioaccumulation du mercure et entrée dans la chaîne trophique terrestre

La capacité bioaccumulatrice de *P. corethrurus* a été évaluée et ce, dans deux volets différents. Le test écotoxicologique a montré que les quantités de mercure accumulées étaient corrélées aux quantités de mercure total dans le sol dopé. Pour les fortes contaminations (100 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ sol), les concentrations en mercure peuvent atteindre 2000 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ dw dans les vers. Si une telle corrélation entre mercure bioaccumulé et mercure présent dans les sols a été rapportée pour des vers tempérés (Hinton & Veiga, 2002 ; Ernst *et al.*, 2008), notre étude est la première à le montrer pour des vers tropicaux.

Par ailleurs, l'étude en microcosmes en présence de *P. corethrurus* a permis de comparer les cinétiques d'accumulation du mercure dans un sol naturel et un sol naturel dopé au laboratoire. Les résultats ont montré que l'accumulation du mercure augmente progressivement avec le temps mais de manière plus rapide et avec des concentrations plus importantes dans le sol dopé. En effet, dans ce sol, une saturation en mercure a été observée chez les vers dès le premier mois d'incubation. Les quantités de mercure accumulées ont peu augmentées après 30 jours (de 218 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ dw au bout de 30 jours à 234 et 258 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ dw après 60 et 90 jours respectivement). Les mêmes résultats ont été obtenus dans notre étude avec *E. andrei*, confirmant que l'accumulation du mercure est importante chez les vers de terre et que l'accumulation est progressive dans les sols peu contaminés, mais très rapide dans les sols fortement et artificiellement contaminés.

Cette différence observée dans la cinétique de bioaccumulation peut être liée à la fixation du mercure dans les sols. En effet, dans les sols naturels, le mercure a été accumulé sur des longues périodes de temps (i.e. des millions d'années pour les sols tropicaux) et s'est fixé lentement aux différentes fractions du sol, alors que dans les sols fortement et/ou artificiellement contaminés, le mercure est immédiatement plus disponible (Fujii & Kaneko, 2009).

Le calcul du facteur de bioaccumulation (BAF) a montré que *P. corethrurus* est capable d'accumuler jusqu'à 10 à 15 fois les quantités de mercure présentes dans les sols en 90 jours. Pour *E. andrei*, ces valeurs étaient deux fois plus importantes (jusqu'à 30 dans les sols dopés), suggérant que cette espèce est capable d'accumuler des quantités importantes de mercure dans ses tissus. Dans la littérature, les BAF calculés pour le mercure varient de 1 à 15 et dépendent des espèces étudiées. Dans le cadre d'une étude de bioaccumulation *in situ*, les BAFs les plus élevés étaient de 15 pour les espèces endogées comme *Aporrectodea rosea* et *Octolasion cyaneum* (Ernst *et al.*, 2008). Ernst & Frey (2007) ont rapporté des valeurs de BAF plus

faibles, en moyenne 1.0 pour *L. terrestris* et 2.3 pour *O. cyaneum* dans une étude en microcosme de courte durée (35 jours). De plus, des facteurs d'accumulation compris entre 0.4 et 4.7 ont été calculés pour *E. fetida* et *L. terrestris* dans des sols contaminés au mercure (Edwards *et al.*, 1998; Hinton & Veiga, 2002; Burton *et al.*, 2006).

Nos résultats et ceux de la littérature ont montré que les vers de terre sont capables d'accumuler des quantités importantes de mercure dans leurs tissus. Une attention particulière devrait être portée aux catégories écologiques de vers de terre car ils ne se retrouvent pas exposés aux prédateurs de la même façon selon qu'ils se retrouvent dans la litière comme *E. andrei* (espèces épigées) ou en permanence dans les sols comme *P. corethrurus* (espèces endogées).

Il est intéressant d'ajouter que quelques études ayant mesuré le taux de méthylmercure (MeHg) dans les vers de terre ont montré que le BAF varie de 175 à 249 et que ce MeHg représente entre 3 à 12% du mercure total dans les tissus des vers de terre (Burton *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009; Rieder *et al.*, 2011). Ces études ont portées sur des sols naturellement contaminés et des vers de terre soit trouvés *in situ* (Zhang *et al.*, 2009; Rieder *et al.*, 2011), soit l'espèce modèle *Eisenia fetida* (Burton *et al.*, 2006). Des analyses de méthylmercure dans les vers tropicaux (e.g. *Pontoscolex corethrurus*) permettraient d'évaluer son importance par rapport au mercure total accumulé dans les tissus des vers.

Il existe un risque important de contamination par le mercure de la chaîne trophique terrestre (Hobbelen *et al.*, 2006; Rieder *et al.*, 2011). En effet, des prédateurs consommant les vers de terre ingèrent en même temps le mercure (et le MeHg) bioaccumulé, faisant entrer ces contaminants dans la chaîne trophique terrestre (Ernst *et al.*, 2008) (Figure 2).

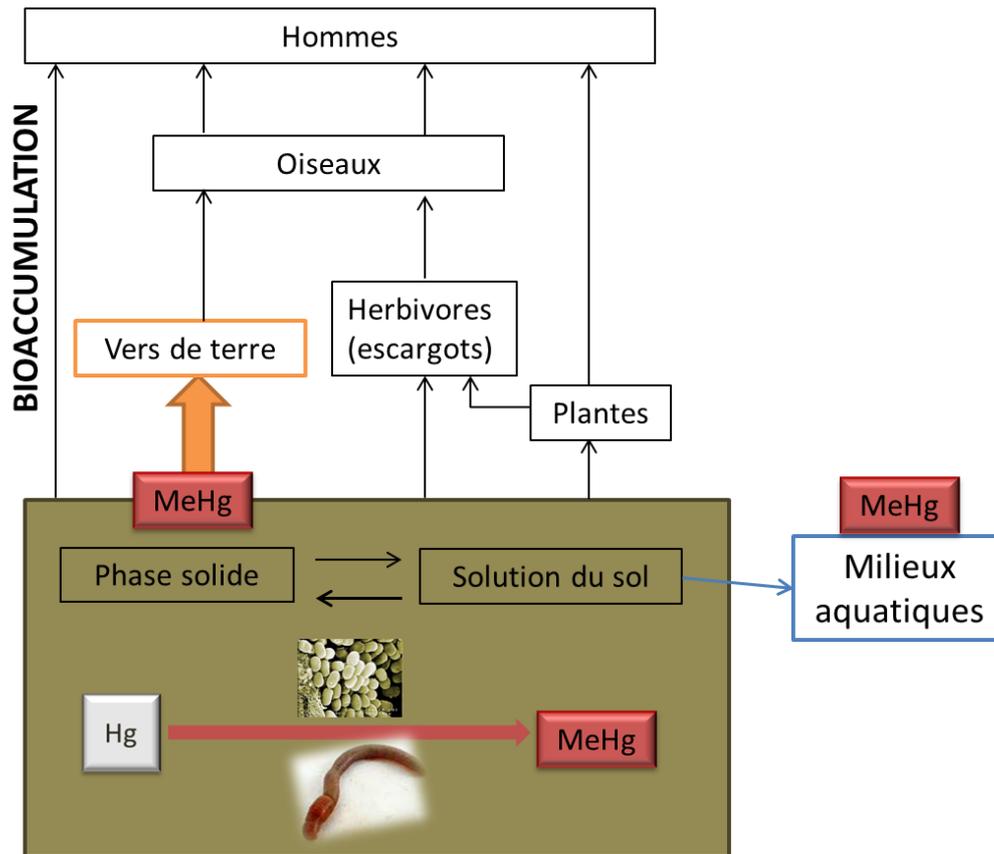


Figure 2. Bioaccumulation du mercure dans la chaîne trophique terrestre.

Le mercure dans les sols se trouve soit fixé aux différents composants du sol (phase solide), soit dans la solution du sol (phase liquide) où il peut être libre ou lié au COD. Ces différents stocks de mercure dans les sols sont plus ou moins disponibles pour les organismes. Le mercure disponible peut être méthylié en conditions anoxiques par l'activité bactérienne ou dans le tube digestif des vers de terre. Sous sa forme méthyliée, le mercure est très toxique et facilement accumulé. Les plantes et les escargots peuvent accumuler le mercure directement dans la solution du sol et les vers de terre peuvent également l'accumuler *via* l'ingestion du sol. Les vers de terre ont une capacité d'accumulation importante et le méthylmercure y est aussi accumulé. Les vers de terre représentent donc un maillon fort d'accumulation du mercure dans les chaînes trophiques terrestres, via les organismes qui s'en nourrissent et qui sont ensuite consommés par l'homme. On peut subodorer une bioamplification dans les chaînes comme cela a été montré dans les chaînes trophiques aquatiques.

Conclusion générale et perspectives

Dans le cadre de ce travail de thèse, les interactions entre les vers de terre, organismes « ingénieurs » des sols, et le mercure ont été étudiées dans les sols tropicaux de Guyane française (oxisols de haut de pente et bas-fonds hydromorphes). Les objectifs principaux de cette thèse étaient :

- i) d'évaluer l'abondance et la diversité des vers de terre *in situ* en lien avec le mercure,
- ii) d'évaluer expérimentalement l'impact du mercure sur une espèce de ver tropicale présente sur le site d'étude,
- iii) d'évaluer l'impact en microcosmes de l'activité des vers de terre sur la mobilité et la répartition du mercure dans les sols, de mettre en évidence les mécanismes d'action des vers de terre, ainsi que leur capacité bioaccumulatrice du mercure.

Dans le premier volet de ce travail, un échantillonnage standardisé des vers de terre a été effectué selon la méthode Tropical Soil Biology Fertility (TSBF) modifiée de Anderson and Ingram (1993). Les résultats obtenus montrent que l'abondance et la biomasse totale des vers sont plus importantes dans l'oxisol que le sol hydromorphe. Concernant la diversité des vers, des espèces putatives (ou MOTUs) ont été proposées à partir de méthodologies de délimitation basées sur le barcode ADN. Un travail de taxinomie morphologique *a posteriori* à partir de ces MOTUs a permis l'identification d'une espèce pantropicale considérée comme pérégrine : *Pontoscolex corethrurus*. A ce jour, les autres MOTUs ont pu être identifiées jusqu'au genre.

Les caractéristiques des sols et les teneurs en mercure ont été déterminées afin de tenter d'expliquer la distribution des vers sur le site étudié. Une seule MOTU a été retrouvée dans les deux sols étudiés (oxisol et sol hydromorphe). L'espèce *P. corethrurus* a été retrouvée exclusivement dans l'oxisol qui contient les concentrations les plus élevées de mercure total. Ce sol contient toutefois de faibles quantités de mercure disponible et probablement peu de méthylmercure comparé aux bas-fonds. Ce premier volet nous a permis de choisir une espèce de ver ainsi qu'un type de sol représentatif du site d'étude pour la mise en place des études en microcosmes.

Le second volet de ce travail a été consacré à l'étude de l'impact du mercure sur l'espèce tropicale *P. corethrurus*, à travers une approche écotoxicologique où le vers de terre a été exposé à différentes concentrations de mercure (5, 10, 20, 50 et 100 $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ sol) dans un oxisol dopé au laboratoire par ajout d'une solution de chlorure de mercure (HgCl_2). A des

concentrations de mercure allant jusqu'à $20 \mu\text{g g}^{-1}$ de sol, aucun impact sur la biomasse et la reproduction des vers n'a été mesuré dans les microcosmes après 56 jours. Les résultats de cette étude ont montré la résistance de cette espèce au mercure et ont de plus révélé sa forte capacité bioaccumulatrice. L'originalité de cette étude réside dans l'utilisation de *P. corethrurus* dans un test écotoxicologique et conforte l'idée de son utilisation comme espèce modèle pour les sols tropicaux. En effet, cette espèce présente de nombreux avantages : (1) elle est largement répandue sous les tropiques (Lavelle *et al.*, 1987), (2) représentative des sols tropicaux, du moins en Amérique du Sud (Brown & James, 2006), (3) c'est l'espèce tropicale la plus étudiée, (4) sa reproduction est parthénogénétique (Lowe & Butt, 2007), (5) elle est facilement identifiable comparée aux autres espèces tropicales et (6) le barcode ADN est déjà référencé pour cette espèce.

Dans le dernier volet, deux études en microcosmes se sont attachées à étudier l'impact des vers de terre sur la mobilité et la disponibilité du mercure : (a) dans des conditions proches de celles rencontrées en conditions naturelles (fond géochimique), et (b) en présence d'une forte concentration pouvant être rencontrée sur les sites orpaillés ($20 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ de sol). Les résultats obtenus ont montré que les vers de terre agissent sur la mobilité du mercure en modifiant la fraction soluble et en augmentant la fraction liée aux oxydes de fer. Les vers de terre ont directement induits des modifications physico-chimiques des sols (augmentation du pH et COD). Des modifications de l'abondance et la diversité fonctionnelle et génétique des communautés bactériennes, ainsi que des indices d'activation de certains groupes bactériens intervenant dans la mobilité du mercure et sa spéciation (e.g. bactéries ferri-réductrice) ont été observés. Enfin, la bioaccumulation importante du mercure dans les vers de terre a été confirmée, que ce soit en milieu tropical avec *P. corethrurus* ou en milieu tempéré avec *E. andrei*. Dans les sols dopés, une saturation a toutefois été observée pour les deux espèces de vers au bout de 90 jours d'incubation.

Ce travail de thèse a permis d'atteindre différents objectifs et a montré que :

- L'abondance et la biomasse des vers de terre n'est pas la même dans les deux sols étudiés *in situ*. La diversité des vers est importante : 17 MOTUs ont été délimités sur le site d'étude dont 12 MOTUs dans l'oxisol qui présente la diversité la plus importante. Une des espèces présentes a pu formellement être identifiée : *P. corethrurus* ;

- *P. corethrurus* est une espèce résistante présentant une bonne adaptabilité à l'ingestion du mercure de par sa présence marquée dans les sols ferrallitiques du site d'étude ainsi que par sa réponse aux teneurs croissantes en mercure lors des tests écotoxicologiques. Ces résultats confirment par ailleurs l'intérêt de cette espèce en tant que modèle pour les études écotoxicologiques en milieu tropical.

- Les vers de terre jouent un rôle dans la mobilité du mercure, en modifiant sa répartition dans les sols et en diminuant les conséquences environnementales liées à sa biodisponibilité. Les mécanismes mis en jeu sont multiples : les vers *P. corethrurus* modifient directement les caractéristiques des sols en augmentant le pH et le COD, et modifient les communautés bactériennes de l'oxisol ;

- La bioaccumulation du mercure mesurée chez les vers de terre est forte et joue un rôle important dans l'entrée du mercure dans la chaîne terrestre trophique.

Les résultats obtenus dans cette thèse ouvrent la voie aux études d'évaluation de l'impact du mercure dans les chaînes trophiques terrestres en Guyane française. Jusqu'à récemment, les études concernant le mercure en Guyane se sont focalisées sur l'évaluation des risques sanitaires et en conséquence sur l'accumulation du mercure dans la chaîne trophique aquatique. Cependant, il est important de comprendre les mécanismes en amont responsables de la circulation et du transfert du mercure dans ces milieux.

Les sols tropicaux et en particulier les oxisols sont de véritables réservoirs de mercure. Il est donc primordial de continuer à étudier le mercure dans ces sols afin de déterminer (i) son impact sur d'autres organismes terrestres, et (ii) de développer des bioindicateurs de pollution qui permettraient d'évaluer la contamination et sa biodisponibilité *in situ* et ainsi (iii) prévoir sa mobilité et son transfert vers les milieux aquatiques.

Les vers de terre représentent de bons indicateurs de contamination au mercure, en particulier l'espèce étudiée *Pontoscolex corethrurus*. Comme nous l'avons montré, cette espèce est résistante au mercure et a une capacité de bioaccumulation importante. Elle est donc susceptible d'être présente sur les sites contaminés à travers la Guyane française et autres sites tropicaux, dans la mesure que la contamination n'excède pas sa capacité de résistance.

Perspectives

Ce travail de thèse ouvre de nombreuses perspectives. Tout d'abord, l'impact du mercure sur les vers de terre devrait être évalué dans l'ANR INTERCONNECT grâce à un échantillonnage important effectué sur le site d'étude à trois reprises dans l'année 2013. Ces futurs résultats devraient renforcer ceux obtenus dans le cadre de cette thèse et permettre de différencier l'impact du mercure des autres paramètres physico-chimiques du sol. De plus, la diversité des vers à différentes saisons sur le site pourra être évaluée selon les mêmes méthodes de délimitation grâce à la banque de séquences générée dans cette thèse.

Concernant le test écotoxicologique, il serait intéressant d'étudier l'impact du mercure sur *P. corethrurus* en testant un nombre de concentrations plus important notamment entre 20, 50 et 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ de sol afin de pouvoir calculer les valeurs critiques pour cette espèce (LC_{50} et EC_{50}). L'impact du mercure pourrait également être testé en utilisant d'autres espèces de vers, notamment l'espèce putative 2 (groupe 2) qui est retrouvée dans les deux types de sol. Dans ce sens, le sol hydromorphe pourrait également être étudié au laboratoire. Lors de ces expérimentations, des extractions chimiques (eau et CaCl_2) pourraient être effectuées dans les sols et les turricules afin d'évaluer la fraction disponible du mercure susceptible d'impacter la survie, la biomasse et la reproduction des vers.

L'impact des vers de terre sur le mercure a été étudié pour deux espèces de vers de terre, l'une tropicale et l'autre tempérée. Il a été montré qu'elles pouvaient modifier certaines fractions du mercure, en modifiant directement les paramètres physico-chimiques du sol (pH et COD) et les communautés bactériennes. Des études supplémentaires pourraient être mises en place afin de préciser l'importance relative de ces mécanismes. Les caractérisations fines de la matière organique dans les sols et les turricules pourraient permettre de mieux comprendre les modifications chimiques expliquant la réactivité de cette composante du sol vis-à-vis du mercure.

Des mesures de méthylmercure dans les sols, les turricules et les vers renseigneraient sur la proportion de mercure présent sous cette forme dans les sols et si cette proportion change en présence de vers. Enfin, des analyses complémentaires de biologie moléculaire avec d'autres méthodes comme la qPCR et la T-RFLP devraient permettre de déterminer l'impact des vers de terre sur la diversité génétique bactérienne dans les sols (totale avec le gène *ADNr16s* et des gènes ciblés pour les bactéries résistantes au mercure comme les gènes *mer A*, *mer B* et les bactéries sulfato-réductrices avec le gène *dsrA*).

Suite aux résultats obtenus en microcosmes, il serait intéressant d'évaluer la capacité de bioaccumulation des vers de terre *in situ*, notamment pour l'espèce *Pontoscolex corethrurus*. Mis à part *P. corethrurus*, les espèces de vers sont difficilement identifiables ; la bioaccumulation du mercure pourrait être déterminée dans les différentes catégories écologiques de vers de terre. L'étude *in situ* de la capacité de bioaccumulation du mercure permettrait d'évaluer sa biodisponibilité sur le terrain. De plus, ces travaux permettraient de déterminer les quantités de mercure susceptibles d'entrer dans la chaîne trophique terrestre. Dans le but de développer cet aspect après la thèse, un projet a été rédigé et sera soumis à la Société Française d'Ecologie (SFE). Il est présenté en Annexe 8.

Enfin, le taux de métallothionéines pourrait être intéressant à mesurer afin de déterminer le niveau de stress induit chez les vers de terre en réponse au mercure pour des études *in situ* et/ou en conditions contrôlées. Ce bioindicateur a été largement utilisé pour le complexe d'espèces modèles *Eisenia* dont le génome est bien connu (Brulle *et al.*, 2007, 2010). Son utilisation pour des espèces tropicales et notamment *P. corethrurus* pourrait être prometteuse (Liang *et al.*, 2011).

Références bibliographiques

A

- Abassi, S., Soni, R., 1983. Stress-induced enhancement of reproduction in earthworm *Octochaetus pattoni* exposed to chromium (vi) and mercury (ii) - implications in environmental management. *International Journal of Environmental Studies* 22, 43–47.
- Ablain, F., 2002. Rôle des activités lombriciennes sur la redistribution des éléments traces métalliques issus de boue de station d'épuration dans un sol agricole. 152 p.
- Anderson, A., 1979. The Biochemistry of Mercury in the Environment, in: Nriagu, J.O. (Ed.), *Mercury in Soils*. Elsevier, Amsterdam, p. 79–112.
- Anderson, J.M., Ingram, J.S.I., 1993. *Tropical soil biology and fertility: a handbook of methods.*, Wallingford. ed. UK. 221 p.

B

- Baize, D., 1997. *Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols: France*. INRA Editions. 408 p.
- Barkay, T., Gillman, M., Turner, R.R., 1997. Effects of dissolved organic carbon and salinity on bioavailability of mercury. *Applied and environmental microbiology* 63, 4267–71.
- Barkay, T., Miller, S.M., Summers, A.O., 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 27, 355–384.
- Barois, I., Lavelle, P., 1986. Changes in respiration rate and some physicochemical properties of a tropical soil during transit through *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta). *Soil Biology and Biochemistry* 18, 539–541.
- Barois, I., Lavelle, P., Brossard, M., Tondoh, J., de los Angeles Martinez, M. Rossi, J.P., Senapati, B.K., Angeles, A., Fragoso, C., Jimenez, J.J., Decaëns, T., Lattaud, C., Kanyonyo, J., Blanchart, E., Chapuis, L., Brown, G., Moreno, A., 1999. Ecology of earthworm species with large environmental tolerance and/or extended distributions, in: Lavelle, P., Brussaard, L., Hendrix, P. (Eds.), *Earthworm Management in Tropical Agroecosystems*. p. 57-85.
- Bartlett, M.D., Briones, M.J.I., Neilson, R., Schmidt, O., Spurgeon, D., Creamer, R.E., 2010. A critical review of current methods in earthworm ecology: From individuals to populations. *European Journal of Soil Biology* 46, 67–73.
- Bartz, M.L., Carlos, A., Souza Jr, I.G., Brown, G.G., 2010. Micronutrientes e óxidos de ferro em coprolitos de minhocas produzidos em um latossolo vermelho distroférrico (oxisol) sob diferentes sistemas de manejo. *Acta Zoologica Mexicana* 26, 281–294.
- Bartz, M.L., Costa, A.C., Tormenta, A., Sousa Jr, I.G., Brown, G.G., 2010. Sobrevivência, produção e atributos químicos de coprolitos de minhocas em um latossolo vermelho distroférrico (oxisol) sob diferentes sistemas de manejo. *Acta Zoologica Mexicana* 26, 261–280.

- Becquer, T., Dai, J., Quantin, C., Lavelle, P., 2005. Sources of bioavailable trace metals for earthworms from a Zn-, Pb- and Cd-contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 1564–1568.
- Benson, D. A, Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W., 2013. GenBank. *Nucleic acids research* 41, 36–42.
- Bergsten, J., Bilton, D.T., Fujisawa, T., Elliott, M., Monaghan, M.T., Balke, M., Hendrich, L., Geijer, J., Herrmann, J., Foster, G.N., Ribera, I., Nilsson, A.N., Barraclough, T.G., Vogler, A.P., 2012. The effect of geographical scale of sampling on DNA barcoding. *Systematic biology* 61, 851–69.
- Beyer, W.N., Cromartie, E., Moment, G.B., 1985. Accumulation of methylmercury in the earthworm *Eisenia fetida* and its effect on regeneration. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 35, 157–162.
- Bhattacharjee, G., Chaudhuri, P.S., 2002. Cocoon production, morphology, hatching pattern and fecundity in seven tropical earthworm species - a laboratory-based investigation. *Journal of biosciences* 27, 283–94.
- Birky, C.W., Adams, J., Gemmel, M., Perry, J., 2010. Using population genetic theory and DNA sequences for species detection and identification in asexual organisms. *PloS one* 5, e10609.
- Birky, C.W., Wolf, C., Maughan, H., Herbertson, L., Henry, E., 2005. Speciation and Selection without Sex. *Hydrobiologia* 546, 29–45.
- Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C., Floyd, R., Abebe, E., 2005. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 360, 1935–43.
- Blaxter, M.L., 2004. The promise of a DNA taxonomy. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 359, 669–79.
- Bliefert, C., Perraud, R., 2001. *Chimie de l'environnement : air, eau, sols, déchets* (2^o Ed.). 478 p.
- Boening, D.W., 2000. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere* 40, 1335–1351.
- Boivin, M.E.Y., Greve, G.D., Kools, S. A. E., van der Wurff, A. W.G., Leeflang, P., Smit, E., Breure, a. M., Rutgers, M., van Straalen, N.M., 2006. Discriminating between effects of metals and natural variables in terrestrial bacterial communities. *Applied Soil Ecology* 34, 103–113.
- Boszke, L., Kowalski, A., Astel, A., Barański, A., Gworek, B., Siepak, J., 2008. Mercury mobility and bioavailability in soil from contaminated area. *Environmental Geology* 55, 1075–1087.
- Bouché, M.B., 1972. *Lombriciens de France, écologie et systématiques*. INRA, Paris. 671 p.
- Boudou, A., Ribeyre, F., 1997. Mercury in the food web: Accumulation and transfer mechanisms. *Metal Ions in Biological Systems* 34, 289–319.
- Boudou, A ; Dominique, Y; Cordier, S; Frery, N., 2006. Les chercheurs d'or et la pollution par le mercure en Guyane française : conséquences environnementales et sanitaires. *Environnement, Risques & Santé* 5, 167–179.

- Boulet, R., Lucas, Y., Fritsch, E., Paquet, H., 1993. Géochimie des paysages : le rôle des couvertures pédologiques., in: Coll. Acad. Sci. “ Sédimentologie et Géochimie de La Surface ” à La Mémoire de Georges Millot. p. 55–76.
- Bravo, A.G., Loizeau, J.-L., Bouchet, S., Richard, A., Rubin, J.F., Ungureanu, V.-G., Amouroux, D., Dominik, J., 2010. Mercury human exposure through fish consumption in a reservoir contaminated by a chlor-alkali plant: Babeni reservoir (Romania). *Environmental science and pollution research international* 17, 1422–32.
- Brown, G.G., 1995. How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? *Plant and Soil* 170, 209–231.
- Brown, G., Pashanasi, B., Villenave, C., Patron, J., Senapati, B.K., Giri, S., Barois, I., Lavelle, P., Blanchart, E., Blakemore, R.J., Spain, A.V., Boyer, J., 1999. Effects of earthworms on plant production in the tropics, in: Lavelle, P., Brussaard, L., Hendrix, P.F. (Eds.), *Earthworm Management in Tropical Agroecosystems*. p. 87–147.
- Brown, G.G., Barois, I., Lavelle, P., 2000. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *European Journal of Soil Biology* 36, 177–198.
- Brown, G.G., James, S.W., 2006. Ecologia, biodiversidade e biogeografia das minhocas no Brasil, in: *Minhocas Na América Latina: Biodiversidade e Ecologia*. p. 291–376.
- Brown, G., Fragoso, C., 2007a. Listado de las especies de lombrices de tierra de América Central (Guatemala, Belice, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá), las “Guyanas” (Surinam, Guyanne Française, Guyana), Venezuela y Paraguay, in: *Minhocas Na América Latina: Biodiversidade e Ecologia*. p. 421–452.
- Brown, G.G., Fragoso, C., 2007b. *Minhocas na América Latina : Biodiversidade e Ecologia*. 539 p.
- Brown, G.G., Callahan, M. a., Niva, C.C., Feijoo, A., Sautter, K.D., James, S.W., Fragoso, C., Pasini, A., Schmelz, R.M., 2013. Terrestrial oligochaete research in Latin America: The importance of the Latin American Meetings on Oligochaete Ecology and Taxonomy. *Applied Soil Ecology* 69, 2–12.
- Bulle, F., Mitta, G., Leroux, R., Lemièrre, S., Leprêtre, A., Vandebulcke, F., 2007. The strong induction of metallothionein gene following cadmium exposure transiently affects the expression of many genes in *Eisenia fetida*: A trade-off mechanism? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 144, 334–341.
- Bulle, F., Morgan, A. J., Coquerelle, C., Vandebulcke, F., 2010. Transcriptomic underpinning of toxicant-mediated physiological function alterations in three terrestrial invertebrate taxa: a review. *Environmental Pollution* 158, 2793–2808.

- Brulle, F., Coquerelle, C., Mitta, G., Castr, V., Douay, F., Leprêtre, A., Vandebulcke, F., 2011. Gene expression analysis of 4 biomarker candidates in *Eisenia fetida* exposed to an environmental metallic trace elements gradient: a microcosm study. *The Science of the Total Environment* 24, 5470-82.
- Buch, A., Brown, G., Niva, C., Klaus, D., Sousa, P., 2013. Toxicity of three pesticides commonly used in Brazil to *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) and *Eisenia andrei* (Bouché, 1972). *Applied Soil Ecology* 69, 32–38.
- Buch, A.C., 2010. *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) e *Eisenia andrei* (Bouché 1972) como bioindicadoras de solos contaminados por agrotóxicos.
- Buch, A.C., Brown, G.G., Niva, C.C., Sautter, K.D., Lourençato, L.F., 2011. Life cycle of *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) in tropical artificial soil. *Pedobiologia* 54, S19–S25.
- Burton, D.T., Turley, S.D., Fisher, D.J., Green, D.J., Shedd, T.R., 2006. Bioaccumulation of Total Mercury and Methylmercury in the earthworm *Eisenia fetida*. *Water, Air, and Soil Pollution* 170, 37–54.

C

-
- Camargo, A., Sites, J.J., 2013. Species Delimitation : A Decade After the Renaissance, in: Pavlinov, D.I. (Ed.), *The Species Problem - Ongoing Issues*. pp. 225–247.
- Carmouze, J., Lucotte, M., Boudou, A., 2001. Le mercure en Amazonie : Rôle de l'homme et de l'environnement, risques sanitaires. IRD Editions. 502 p.
- Carstens, B.C., Pelletier, T. a., Reid, N.M., Satler, J.D., 2013. How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology* 1–15.
- Cernosvitov, L., 1934. Les Oligochaetes de la Guyane Française et d'autres pays de l'Amérique du Sud. *Bulletin du Museum D'Histoire Naturelle* 6, 47–59.
- Cernosvitov, L., 1935. Oligochaeten aus dem tropischen Süd-America. *Capita Zoologica* 6, 3–37.
- Chang, C.-H., James, S., 2011. A critique of earthworm molecular phylogenetics. *Pedobiologia* 54, S3–S9.
- Chang, C.-H., Lin, Y.-H., Chen, I.-H., Chuang, S.-C., Chen, J.-H., 2007. Taxonomic re-evaluation of the Taiwanese montane earthworm *Amyntas wulinensis* Tsai, Shen & Tsai, 2001 (Oligochaeta: Megascolecidae): Polytypic species or species complex? *Organisms Diversity & Evolution* 7, 231–240.
- Chang, C.-H., Rougerie, R., Chen, J.-H., 2009. Identifying earthworms through DNA barcodes: Pitfalls and promise. *Pedobiologia* 52, 171–180.
- Chapman, P., Wang, F., 2000. Issues in ecological risk assessment of inorganic metals and metalloids. *Human and ecological Risk Assessment* 6, 965–988.
- Chapman, P.M., Ho, K.T., Munns, W.R., Solomon, K., Weinstein, M.P., 2002. Issues in sediment toxicity and ecological risk assessment. *Marine pollution bulletin* 44, 271–8.

- Chapuis-Lardy, L., Brauman, a., Bernard, L., Pablo, a. L., Toucet, J., Mano, M.J., Weber, L., Brunet, D., Razafimbelo, T., Chotte, J.L., Blanchart, E., 2010. Effect of the endogeic earthworm *Pontoscolex corethrurus* on the microbial structure and activity related to CO₂ and N₂O fluxes from a tropical soil (Madagascar). *Applied Soil Ecology* 45, 201–208.
- Charlet, L., Boudou, A., 2002. Cet or qui file un mauvais mercure. *La Recherche* 359, 52–59.
- Chauvel, A., Grimaldi, M., Barros, E., Blanchart, E., Desjardins, T., Sarrazin, M., Lavelle, P., 1999. Pasture damage by an Amazonian earthworm. *Nature* 398, 3–4.
- Cheng, J., Wong, M., 2002. Effects of earthworms on Zn fractionation in soils. *Biology and Fertility of Soils* 36, 72–78.
- Collins, R.A., Cruickshank, R.H., 2012. The seven deadly sins of DNA barcoding. *Molecular ecology resources*. p. 1-7.
- Conder, J.M., Lanno, R.P., 2000. Evaluation of surrogate measures of cadmium, lead, and zinc bioavailability to *Eisenia fetida*. *Chemosphere* 41, 1659–68.
- Conder, J.M., Lanno, R.P., Basta, N., 2001. Assessment of metal availability in smelter soil using earthworms and chemical extractions. *Journal of Environmental Quality* 30, 1231–1237.
- Cornu, S., Clozel, B., 2000. Extractions séquentielles et spéciation des éléments trace métalliques dans les sols naturels. *Etude et Gestion des Sols* 7, 179–189.
- Cortet, J., Gomot-de Vaufleury, A., Poinot-Balaguer, N., Gomot, L., Texier, C., Cluzeau, D., 1999. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *European Journal of Soil Biology* 35, 115–134.
- Csuzdi, C., Pavlicek, T., 2011a. A new earthworm genus *Nouraguesia* gen. nov from French Guiana with description of two new species (Oligochaeta, Glossoscolecidae). *Journal of Natural History* 45, 1759–1767.
- Csuzdi, C., Pavlicek, T., 2011b. New and little known species of the genus *Martiodrilus* Michaelsen, 1936 from French Guiana (Oligochaeta, Glossoscolecidae). *Zootaxa* 57–64.

D

-
- Dai, J., Becquer, T., Rouiller JH, Reversat, G, Bernhard-Reversat, F, Nahmani, J, Lavelle, P., 2004. Heavy metal accumulation by two earthworm species and its relationship to total and DTPA-extractable metals in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 91–98.
- De Silva, P.M.C.S., Van Gestel, C.A.M., 2009a. Development of an alternative artificial soil for earthworm toxicity testing in tropical countries. *Applied Soil Ecology* 43, 170–174.
- De Silva, P.M.C.S., Van Gestel, C.A.M., 2009b. Comparative sensitivity of *Eisenia andrei* and *Perionyx excavatus* in earthworm avoidance tests using two soil types in the tropics. *Chemosphere* 77, 1609–1613.

- De Vries, W., Lofts, S., Tipping, E., Meili, M., Groenenberg, J.E., Schütze, G., 2007. Impact of soil properties on critical concentrations of cadmium, lead, copper, zinc and mercury in soil and soil solution in view of ecotoxicological effects. *reviews of environmental contamination and toxicology* 47–89.
- Decaëns, T., Jiménez, J.J., Gioia, C., Measey, G.J., Lavelle, P., 2006. The values of soil animals for conservation biology. *European Journal of Soil Biology* 42, S23–S38.
- Decaëns, T., Lavelle, P., Jiménez, J.J., 2008. Priorities for conservation of soil animals. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 3, 1–18.
- Decaëns, T., Porco, D., Rougerie, R., Brown, G.G., James, S.W., 2013. Potential of DNA barcoding for earthworm research in taxonomy and ecology. *Applied Soil Ecology* 65, 35–42.
- Depta, B., Koscielniak, A., Rozen, A., 1999. Food selection as a mechanism of heavy metal resistance in earthworms. *Pedobiologia* 42, 608–614.
- Diez, S., Barata, C., Raldua, D., 2008. Exposure to Mercury: A Critical Assessment of Adverse Ecological and Human Health Effects, in: Prasad, M.N. V (Ed.), *Trace Elements as Contaminants and Nutrients - Consequences in Ecosystems and Human Health*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 343–371.
- Dolbec, J., 2001. Analyse des normes actuelles à travers le monde, in: *Le Mercure En Amazonie. Rôle de L'homme et de L'environnement, Risques Sanitaires*. Carmouze et Al., 2001. pp. 401–407.
- Drake, H.L., Horn, M. a, 2007. As the worm turns: the earthworm gut as a transient habitat for soil microbial biomes. *Annual review of microbiology* 61, 169–89.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology* 7, 214.
- Duarte, A.P., Melo, V.F., Brown, G.G., Pauletti, V., 2012. Changes in the forms of lead and manganese in soils by passage through the gut of the tropical endogeic earthworm (*Pontoscolex corethrurus*). *European Journal of Soil Biology* 53, 32–39.
- Dupont, L., 2009. Perspectives on the application of molecular genetics to earthworm ecology. *Pedobiologia* 52, 191–205.
- Dupont, L., Lazrek, F., Porco, D., King, R.A., Rougerie, R., Symondson, W.O.C., Livet, A., Richard, B., Decaëns, T., Butt, K.R., Mathieu, J., 2011. New insight into the genetic structure of the *Allolobophora chlorotica* aggregate in Europe using microsatellite and mitochondrial data. *Pedobiologia* 54, 217–224.
- Dupont, L., Decaëns, T., Lapied, E., Chassany, V., Marichal, R., Dubs, F., Maillot, M., Roy, V., 2012. Genetic signature of accidental transfer of the peregrine earthworm *Pontoscolex corethrurus* (Clitellata, Glossoscolecidae) in French Guiana. *European Journal of Soil Biology* 53, 70–75.
- Dupuis, J.R., Roe, A.D., Sperling, F. a H., 2012. Multi-locus species delimitation in closely related animals and fungi: one marker is not enough. *Molecular ecology* 21, 4422–36.

Durao, W., Palmieri, H., Trindade, M., Branco, O., Carvalho, C., Fleming, P., da Silva, J., Windmoller, C., 2009. Speciation, distribution, and transport of mercury in contaminated soils from Descoberto, Minas Gerais, Brazil. *Journal of environmental monitoring* 11, 1056–1063.

E

Edwards, C.A., Bohlen, P.J., 1996. *Biology and Ecology of Earthworms*, Chapman & Hall. ed. London. 434 p.

Edwards, C.A., 2004. *Earthworm Ecology*. CRC Press, London. 411 p.

Edwards, S.C., Macleod, C.L., Lester, J.N., 1998. The bioavailability of copper and mercury to the common nettle (*Urtica dioica*) and the earthworm *Eisenia fetida* from contaminated dredge soil. *Water, Air, and Soil Pollution* 102, 75–90.

Ekino, S., Susa, M., Ninomiya, T., Imamura, K., Kitamura, T., 2007. Minamata disease revisited: an update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. *Journal of the neurological sciences* 262, 131–44.

Ernst, G., Frey, B., 2007. The effect of feeding behavior on Hg accumulation in the ecophysiologicaly different earthworms *Lumbricus terrestris* and *Octolaseon cyaneum*: A microcosm experiment. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 386–390.

Ernst, G., Zimmermann, S., Christie, P., Frey, B., 2008. Mercury, cadmium and lead concentrations in different ecophysiological groups of earthworms in forest soils. *Environmental pollution* 156, 1304–13.

F

Falandysz, M., Gucia, B., Skwarzec, A., J., 2002. Total Mercury in Mushrooms and Underlying Soil Substrate from the Borecka Forest, Northeastern Poland. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42, 145–154.

Fernández, R., Almodóvar, A., Novo, M., Simancas, B., Díaz Cosín, D.J., 2012. Adding complexity to the complex: new insights into the phylogeny, diversification and origin of parthenogenesis in the *Aporrectodea caliginosa* species complex (Oligochaeta, Lumbricidae). *Molecular phylogenetics and evolution* 64, 368–79.

Fitzgerald, W.F., Mason, R.P., 1997. Biogeochemical cycling of mercury in the marine environment. *Metal Ions Biol. Syst.* 34, 53–111.

Fleming, E.J., Mack, E.E., Green, P.G., Nelson, D.C., 2006. Mercury Methylation from Unexpected Sources: Molybdate-Inhibited Freshwater Sediments and an Iron-Reducing Bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 457–464.

Fragoso, C., Lavelle, P., 1992. Earthworm tropical communities of rain forests. *Soil Biology and Biochemistry* 24, 1397–1408.

- Frey, B., Rieder, S.R., 2013. Response of forest soil bacterial communities to mercury chloride application. *Soil Biology and Biochemistry* 1–9.
- Fründ, H.-C., Butt, K., Capowicz, Y., Eisenhauer, N., Emmerling, C., Ernst, G., Potthoff, M., Schädler, M., Schrader, S., 2010. Using earthworms as model organisms in the laboratory: Recommendations for experimental implementations. *Pedobiologia* 53, 119–125.
- Fu, Z., Wu, F., Mo, C., Liu, B., Zhu, J., Deng, Q., Liao, H., Zhang, Y., 2011. Bioaccumulation of antimony, arsenic, and mercury in the vicinities of a large antimony mine, China. *Microchemical Journal* 97, 12–19.
- Fujii, Y., Kaneko, N., 2009. The effect of earthworms on copper fractionation of freshly and long-term polluted soils. *Ecotoxicology and environmental safety* 72, 1754–9.

G

-
- Gabriel, M.C., Williamson, D.G., 2004. Principal biogeochemical factors affecting the speciation and transport of mercury through the terrestrial environment. *Environmental geochemistry and health* 26, 421–34.
- Gadd, G.M., 2004. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma* 122, 109–119.
- García, J.A., Fragoso, C., 2002. Growth, reproduction and activity of earthworms in degraded and amended tropical open mined soils : laboratory assays. *Applied soil ecology* 20, 43–56.
- García, J.A., Fragoso, C., 2003. Influence of different food substrates on growth and reproduction of two tropical earthworm species (*Pontoscolex corethrurus* and *Amyntas corticis*). *Pedobiologia* 47, 754–763.
- García, M., Römbke, J., de Brito, M.T., Scheffczyk, A., 2008. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. *Environmental Pollution* 153, 450–6.
- García, M.V., 2004. Effects of pesticides on soil fauna: Development of ecotoxicological test methods for tropical regions, in: *Ecology and Development Series No. 19*. Zentrum für Entwicklungs Forschung. University of Bonn, Germany, p. 281.
- Garland, J.L., 1996. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 213–221.
- Garland, J.L., 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS microbiology ecology* 24, 289–300.
- Garland, J.L., Mills, A.L., 1991. Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Community-Level Sole-Carbon-Source Utilization. *Appl environ microbiol* 57, 2351–2359.

- Godard, E., Chaud, P., Cardoso, T., Ardillon, V., Boyer, S., Quénel, P., 1997. Le mercure en Guyane. p. 1-10.
- Goldstein, P.Z., DeSalle, R., 2011. Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: determination, discovery, and description. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 33, 135–47.
- Gounou, C., 2008. Mobilité des éléments traces métalliques dans les sédiments : couplage et comparaison des approches chimiques et microbiologiques. 314 p.
- Grimaldi, M., Gaudet, J.P., Grimaldi, C., Melieres, M.-A., Spadini, L., 2001. Sources, stocks et transferts dans les sols et sédiments. Programme de recherche. Le Mercure en Guyane Française. Rapport final, partie I : la région de St Elie et le réservoir de Petit Saut.
- Grybos, M., Davranche, M., Gruau, G., Petitjean, P., 2007. Is trace metal release in wetland soils controlled by organic matter mobility or Fe-oxyhydroxides reduction? *Journal of colloid and interface science* 314, 490–501.
- Gudbrandsen, M., Sverdrup, L.E., Aamodt, S., Stenersen, J., 2007. Short-term pre-exposure increases earthworm tolerance to mercury. *European Journal of Soil Biology* 43, S261–S267.
- Guedron, S., 2008. Impact de l'exploitation minière en Guyane française sur les flux de mercure vers les écosystèmes aquatiques. 322 p.
- Guedron, S., Grangeon, S., Lanson, B., Grimaldi, M., 2009. Mercury speciation in a tropical soil association; Consequence of gold mining on Hg distribution in French Guiana. *Geoderma* 153, 331–346.
- Guedron, S., Grimaldi, C., Chauvel, C., Spadini, L., Grimaldi, M., 2006. Weathering versus atmospheric contributions to mercury concentrations in French Guiana soils. *Applied Geochemistry* 21, 2010–2022.

H

-
- Hall, T., 2007. BioEdit: Biological sequence allignement editor for Win95/98/NT/2K/XP [WWW Document]. URL <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
- Hallaire, V., Curmi, P., Duboisset, A., Lavelle, P., Pashanasi, B., 2000. Soil structure changes induced by the tropical earthworm *Pontoscolex corethrurus* and organic inputs in a Peruvian ultisol. *European Journal of Soil Biology* 36, 35–44.
- Hamoui, H., 1991. Life-cycle and growth of *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) (Oligochaeta, Glossoscolecidae) in the laboratory. *Rev. Ecol. Biol. Sol* 28, 469–478.
- Han, F.X., Su, Y., Monts, D.L., Waggoner, C. a, Plodinec, M.J., 2006. Binding, distribution, and plant uptake of mercury in a soil from Oak Ridge, Tennessee, USA. *The Science of the total environment* 368, 753–68.
- Harmsen, J., 2007. Measuring bioavailability: from a scientific approach to standard methods. *Journal of Environmental Quality* 36, 1420–1428.

- Harris-Hellal, J., 2008. Etude des interactions entre sols – mercure – composante microbiologique en Guyane française. 237 p.
- Harris-Hellal, J., Grimaldi, M., Garnier-Zarli, E., Bousserhine, N., 2010. Mercury mobilization by chemical and microbial iron oxide reduction in soils of French Guyana. *Biogeochemistry* 103, 1–27.
- Harris-Hellal, J., Vallaeys, T., Garnier-Zarli, E., Bousserhine, N., 2009. Effects of mercury on soil microbial communities in tropical soils of French Guyana. *Applied Soil Ecology* 41, 59–68.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., DeWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences* 270, 313–321.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., de Waard, J.R., 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences* 270, S96–S99.
- Hernández-Castellanos, B., Ortiz-Ceballos, A., Martínez-Hernández, S., Noa-Carrazana, J.C., Luna-Guido, M., Dendooven, L., Contreras-Ramos, S.M., 2013. Removal of benzo (a) pyrene from soil using an endogeic earthworm *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857). *Applied Soil Ecology* 70, 62–69.
- Hinton, J., 2002. Earthworms as a bioindicator of mercury pollution in an artisanal gold mining community, Cachoeira do Piria, Brazil. 161 p.
- Hinton, J., Veiga, M., 2009. Using Earthworms to Assess Hg Distribution and Bioavailability in Gold Mining Soils. *Soil and Sediment Contamination* 18, 512–524.
- Hinton, J., Veiga, M.M., 2002. Earthworms as bioindicators of mercury pollution from mining and other industrial activities. *Geochemistry, Exploration, Environment, Analysis* 2, 269–274.
- Hobbelen, P.H.F., Koolhaas, J.E., van Gestel, C. a M., 2006. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* in relation to total and available metal concentrations in field soils. *Environmental pollution* 144, 639–46.
- Hopkin, S.P., 1989. *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. Applied Science, London. 366 p.
- Huang, J., Xu, Q., Sun, Z.J., Tang, G.L., Su, Z.Y., 2007. Identifying earthworms through DNA barcodes. *Pedobiologia* 51, 301–309.

I

- Insee, 2012. Évolution de la population totale au 1er janvier 2012 [WWW Document]. URL http://www.insee.fr/fr/themes/tableau.asp?reg_id=25&ref_id=poptc02101
- International Organization for standardization, I., 1998. Soil quality – effects of pollutants on earthworms – part 2: determination of effects on reproduction. ISO 11268-2. Geneva, Switzerland.

Issaro, N., Abi-Ghanem, C., Bermond, a, 2009. Fractionation studies of mercury in soils and sediments: a review of the chemical reagents used for mercury extraction. *Analytica chimica acta* 631, 1–12.

IUCN, 2003. Biodiversité et conservation en Outre-Mer. p. 39-56.

J

James, S.W., Davidson, S.K., 2012. Molecular phylogeny of earthworms (Annelida:Crassieclitellata) based on 28S, 18S and 16S gene sequences. *Invertebrate Systematics* 26, 213-229.

James, S.W., Porco, D., Decaëns, T., Richard, B., Rougerie, R., Erséus, C., 2010. DNA barcoding reveals cryptic diversity in *Lumbricus terrestris* L., 1758 (Clitellata): resurrection of *L. herculeus* (Savigny, 1826). *PloS one* 5.

Jones, C.G., Lawton, J.H., Shachak, M., 1994. Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* 69, 373–386.

Jörger, K.M., Norenburg, J.L., Wilson, N.G., Schrödl, M., 2012. Barcoding against a paradox? Combined molecular species delineations reveal multiple cryptic lineages in elusive meiofaunal sea slugs. *BMC evolutionary biology* 12, 245.

Jusselme, M.D., Poly, F., Miambi, E., Mora, P., Blouin, M., Pando, A., Rouland-Lefèvre, C., 2012. Effect of earthworms on plant *Lantana camara* Pb-uptake and on bacterial communities in root-adhering soil. *The Science of the total environment* 416, 200–7.

K

Kabata-pendias, A., Pendias, H., 2001. Trace Elements in Soils and Plants - 3rd edition. CRC Press. 403 p.

Kabata-pendias, A., Mukherjee, A.B., 2007. Trace elements from soils to Human. Springer. 550 p.

Karaca, A., 2011. Biology of earthworms. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 332 p.

Kerin, E.J., Gilmour, C.C., Roden, E., Suzuki, M.T., Coates, J.D., Mason, R.P., 2006. Mercury methylation by dissimilatory iron-reducing bacteria. *Applied and environmental microbiology* 72, 7919–21.

Khalil, M. A., Janssens, T.K.S., Berg, M.P., van Straalen, N.M., 2009. Identification of metal-responsive oribatid mites in a comparative survey of polluted soils. *Pedobiologia* 52, 207–221.

Khwaja, A.R., Bloom, P.R., Brezonik, P.L., 2006. Binding constants of divalent mercury (Hg²⁺) in soil humic acids and soil organic matter. *Environmental science & technology* 40, 844–9.

King, R.A., Tibble, A.L., Symondson, W.O.C., 2008. Opening a can of worms: unprecedented sympatric cryptic diversity within British lumbricid earthworms. *Molecular ecology* 17, 4684–98.

Kizilkaya, R., 2004. Cu and Zn accumulation in earthworm *Lumbricus terrestris* L. in sewage sludge amended soil and fractions of Cu and Zn in casts and surrounding soil. *Ecological Engineering* 22, 141–151.

- Klok, C., Goedhart, P.W., Vandecasteele, B., 2007. Field effects of pollutants in dynamic environments. A case study on earthworm populations in river floodplains contaminated with heavy metals. *Environmental pollution* 147, 26–31.
- Klok, C., Kraak, M.H.S., 2008. Living in highly dynamic polluted river floodplains, do contaminants contribute to population and community effects? *The Science of the total environment* 406, 455–61.
- Klok, C., Thissen, J., 2009. Are laboratory derived toxicity results informative for field situations? Case study on earthworm populations contaminated with heavy metals. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 251–255.
- Kools, S. a E., Boivin, M.-E.Y., Van Der Wurff, A.W.G., Berg, M.P., Van Gestel, C. a M., Van Straalen, N.M., 2009. Assessment of structure and function in metal polluted grasslands using Terrestrial Model Ecosystems. *Ecotoxicology and environmental safety* 72, 51–9.
- Kuperman, R.G., Checkai, R.T., Garcia, M.V.B., Römbke, J., Stephenson, G.L., Sousa, J.P., 2009. State of the science and the way forward for the ecotoxicological assessment of contaminated land. *Pesquisa agropecuaria brasileira* 44, 811–824.

L

-
- Lacerda, L.D. De, 2003. Updating global Hg emissions from small-scale gold mining and assessing its environmental impacts. *Environmental Geology* 43, 308–314.
- Lacerda, L.D., de Souza, M., Ribeiro, M.G., 2004. The effects of land use change on mercury distribution in soils of Alta Floresta, Southern Amazon. *Environmental pollution* 129, 247–55.
- Lafont, A., Risède, J.-M., Loranger-Merciris, G., Clermont-Dauphin, C., Dorel, M., Rhino, B., Lavelle, P., 2007. Effects of the earthworm *Pontoscolex corethrurus* on banana plants infected or not with the plant-parasitic nematode *Radopholus similis*. *Pedobiologia* 51, 311–318.
- Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K., Basta, N., 2004. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 39–47.
- Lapied, E., 2000. A case of temperate earthworms (Lumbricidae) invasion in a lowland tropical rainforest of French Guiana, in: Rusek, J. (Ed.), *Book of Abstracts. XIII International Colloquium on Soil Zoology and Ecology*, 14-18 August. p. 177.
- Lapied, E., 2004. A new giant earthworm species (Oligochaeta, Glossoscolecidae) for the Guayana shield., in: *Book of Abstracts. XIV International Colloquium on Soil Zoology and Ecology*, 30 August - 3 September. University of Rouen, Mont Saint-Aignan, p. 45.
- Lapied, E., Lavelle, P., 2003. The peregrine earthworm *Pontoscolex corethrurus* in the East coast of Costa Rica. *Pedobiologia* 47, 471–474.
- Lapinski, S., Rosciszewska, M., 2008. The impact of cadmium and mercury contamination on reproduction and body mass of earthworms. *Plant Soil Environment* 54, 61–65.
- Lavelle, P., 1988. Earthworm activities and the soil system. *Biology and Fertility of Soils* 6, 237–251.

- Lavelle, P., Barois, I., Cruz, I., Fragoso, C., Hernandez, A., Pineda, A., Rangel, P., 1987. Adaptive strategies of *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta), a peregrine geophagous earthworm of the humid tropics. *Biology and Fertility of Soils* 5, 188–194.
- Lavelle, P., Decaëns, T., Aubert, M., Barot, S., Blouin, M., Bureau, F., Margerie, P., Mora, P., Rossi, J.-P., 2006. Soil invertebrates and ecosystem services. *European Journal of Soil Biology* 42, S3–S15.
- Lavelle, P., Lapied, E., 2003. Endangered earthworms of Amazonia: an homage to Gilberto Righi. *Pedobiologia* 47, 419–427.
- Lavelle, P., Spain, A.V., 2001. *Soil Ecology*, Kluwer Sci. ed. Springer, Amsterdam. 664 p.
- Leaché, A.D., Fujita, M.K., 2010. Bayesian species delimitation in West African forest geckos (*Hemidactylus fasciatus*). *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 277, 3071–7.
- Lebourg, A., Sterckeman, T., Ciesielski, H., Proix, N., 1996. Intérêt de différents réactifs d'extraction chimique pour l'évaluation de biodisponibilité des métaux en traces du sol. *Agronomie* 16, 201–215.
- Li, L., Wu, J., Tian, G., Xu, Z., 2009. Effect of the transit through the gut of earthworm (*Eisenia fetida*) on fractionation of Cu and Zn in pig manure. *Journal of hazardous materials* 167, 634–40.
- Li, L., Xu, Z., Wu, J., Tian, G., 2010. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworm *Eisenia fetida* in relation to bioavailable metal concentrations in pig manure. *Bioresource technology* 101, 3430–6.
- Liang, S.-H., Chen, S.-C., Chen, C.-Y.C.-C., Kao, C.-M., Yang, J.-I., Shieh, B.-S., Chen, J.-H., 2011. Cadmium-induced earthworm metallothionein-2 is associated with metal accumulation and counteracts oxidative stress. *Pedobiologia* 54, 333–340.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451–1452.
- Liu, X., Hu, C., Zhang, S., 2005. Effects of earthworm activity on fertility and heavy metal bioavailability in sewage sludge. *Environment international* 31, 874–9.
- Lock, K., Janssen, C.R., Lock, Janssen, 2001. Ecotoxicity of mercury to *Eisenia fetida*, *Enchytraeus albidus* and *Folsomia candida*. *Biology and Fertility of Soils* 34, 219–221.
- Loos, M., Ragas, A.M.J., Plasmeijer, R., Schipper, A.M., Hendriks, a J., 2010. Eco-SpaCE: an object-oriented, spatially explicit model to assess the risk of multiple environmental stressors on terrestrial vertebrate populations. *The Science of the total environment* 408, 3908–17.
- Lowe, C.N., Butt, K.R., 2007. Earthworm culture, maintenance and species selection in chronic ecotoxicological studies: A critical review. *European Journal of Soil Biology* 43, S281–S288.
- Lukkari, T., Taavitsainen, M., Väisänen, A., Haimi, J., 2004. Effects of heavy metals on earthworms along contamination gradients in organic rich soils. *Ecotoxicology and environmental safety* 59, 340–8.

Lukkari, T., Teno, S., Väisänen, A., Haimi, J., 2006. Effects of earthworms on decomposition and metal availability in contaminated soil: Microcosm studies of populations with different exposure histories. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 359–370.

M

Ma, Y., Dickinson, N.M., Wong, M.H., 2002. Toxicity of Pb/Zn mine tailings to the earthworm *Pheretima* and the effects of burrowing on metal availability. *Biology and Fertility of Soils* 36, 79–86.

Marichal, R., Grimaldi, M., Mathieu, J., Brown, G.G., Desjardins, T., Silva Junior, M.L. Da, Praxedes, C., Martins, M.B., Velasquez, E., Lavelle, P., 2012. Is invasion of deforested Amazonia by the earthworm *Pontoscolex corethrurus* driven by soil texture and chemical properties? *Pedobiologia* 55, 233–240.

Marichal, R., Martinez, A.F., Praxedes, C., Ruiz, D., Carvajal, A.F., Oszwald, J., del Pilar Hurtado, M., Brown, G.G., Grimaldi, M., Desjardins, T., Sarrazin, M., Decaëns, T., Velasquez, E., Lavelle, P., 2010. Invasion of *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta) in landscapes of the Amazonian deforestation arc. *Applied Soil Ecology* 46, 443–449.

Mason, R.P., Fitzgerald, W.F., Morel, F.M.M., 1994. The biogeochemical cycling of elemental mercury: Anthropogenic influences. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58, 3191–3198.

Mathema, V.B., Thakuri, B.C., Sillanpää, M., 2011. Bacterial mer operon-mediated detoxification of mercurial compounds: a short review. *Archives of microbiology* 193, 837–44.

Mayr, E., 1999. Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist. Harvard University Press. 334 p.

Météo France, 2012. Le climat guyanais [WWW Document]. URL [Le climat guyanais.htm](http://www.meteo.fr/guyane)

Météo France, 2013. Archives Bulletins Climatiques Mensuels de Guyane [WWW Document].

Monaghan, M.T., Wild, R., Elliot, M., Fujisawa, T., Balke, M., Inward, D.J.G., Lees, D.C., Ranaivosolo, R., Eggleton, P., Barraclough, T.G., Vogler, A.P., 2009. Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. *Systematic biology* 58, 298–311.

Moreno, A.G., 2004. Who is *Pontoscolex (Pontoscolex) corethrurus* (Müller, 1857) (Annelida, Glossoscolecidae)?, in: Moreno, A., Borges, S. (Eds.), *Avances En Taxonomia de Lombrices de Tierra*. Madrid, pp. 361–391.

Müller, a K., Rasmussen, L.D., Sørensen, S.J., 2001. Adaptation of the bacterial community to mercury contamination. *FEMS microbiology letters* 204, 49–53.

Müller, a K., Westergaard, K., Christensen, S., Sørensen, S.J., 2001. The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. *FEMS microbiology ecology* 36, 11–19.

Müller, a K., Westergaard, K., Christensen, S., Sørensen, S.J., 2002. The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances. *Microbial ecology* 44, 49–58.

N

-
- Nahmani, J., Lavelle, P., 2002. Effects of heavy metal pollution on soil macrofauna in a grassland of Northern France. *European Journal of Soil Biology* 38, 297–300.
- Nahmani, J., Lavelle, P., Lapied, E., van Oort, F., 2003. Effects of heavy metal soil pollution on earthworm communities in the north of France. *Pedobiologia* 47, 663–669.
- Nahmani, J., Rossi, J.-P., 2003. Soil macroinvertebrates as indicators of pollution by heavy metals. *Comptes Rendus Biologies* 326, 295–303.
- Nahmani, J., Hodson, M.E., Black, S., 2007a. Effects of metals on life cycle parameters of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to field-contaminated, metal-polluted soils. *Environmental pollution* 149, 44–58.
- Nahmani, J., Hodson, M.E., Black, S., 2007b. A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. *Environmental pollution* 145, 402–24.
- Nahmani, J., Hodson, M.E., Devin, S., Vijver, M.G., 2009. Uptake kinetics of metals by the earthworm *Eisenia fetida* exposed to field-contaminated soils. *Environmental pollution* 157, 2622–8.
- Neculita, C.-M., Zagury, G.J., Deschenes, L., 2005. Mercury speciation in highly contaminated soils from chlor-alkali plants using chemical extractions. *J Environ Qual* 34, 255–262.
- Novo, M., Almodóvar, A., Fernández, R., Trigo, D., Díaz-Cosín, D.J., Giribet, G., 2012. Appearances can be deceptive: different diversification patterns within a group of Mediterranean earthworms (*Oligochaeta*, *Hormogastridae*). *Molecular ecology* 21, 3776–93.
- Novo, M., Fernández, R., Marchán, D.F., Mónica Gutiérrez, Cosín, D.J.D., 2012. Compilation of morphological and molecular data, a necessity for taxonomy: The case of *Hormogaster abbatisae* sp. n. (*Annelida*, *Clitellata*, *Hormogastridae*). *ZooKeys* 16, 1–16.
- Nriagu, J.O., 1979. Production and uses of Mercury., in: Nriagu, J. (Ed.), *The Biogeochemistry of Mercury in the Environment*. Elsevier, Amsterdam, p. 23–40.
- Nriagu, J.O., 1989. A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature* 338, 47–49.

O

-
- OCDE, 2004. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. p. 1-19.
- Oliveira, A., Pampulha, M.E., 2006. Effects of long-term heavy metal contamination on soil microbial characteristics. *Journal of bioscience and bioengineering* 102, 157–61.
- Osborn, A.M., Bruce, K.D., Strike, P., Ritchie, D.A., 1997. Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. *FEMS microbiology ecology* 19, 239–262.
- Oste, L.A., Dolfing, J., Ma, W.C., Lexmond, T.M., 2001. Cadmium uptake by earthworms as related to the availability in the soil and the intestine. *Environmental toxicology and chemistry* 20, 1785–1791.

P

- Pacyna, E.G., Pacyna, J., Steehuisen, F., Wilson, S., 2006. Global anthropogenic mercury emission inventory for 2000. *Atmospheric Environment* 40, 4048–4063.
- Patra, M., Sharma, A., 2000. Mercury toxicity in plants. *Botanical Review* 66, 379–422.
- Pauget, B., Gimbert, F., Coeurdassier, M., Crini, N., Pérès, G., Faure, O., Douay, F., Hitmi, A., Beguiristain, T., Alaphilippe, A., Guernion, M., Houot, S., Legras, M., Vian, J.-F., Hedde, M., Bispo, A., Grand, C., de Vaufleury, A., 2013. Ranking field site management priorities according to their metal transfer to snails. *Ecological Indicators* 29, 445–454.
- Pavlicek, T., Csuzdi, C., 2012. Earthworm fauna of French Guiana, in: *Advances of the 5th International Oligochaeta Taxonomy Meeting*. p. 107–110.
- Peijnenburg, W.J.G.M., Zablotkaja, M., Vijver, M.G., 2007. Monitoring metals in terrestrial environments within a bioavailability framework and a focus on soil extraction. *Ecotoxicology and environmental safety* 67, 163–79.
- Peralta-Videa, J.R., Lopez, M.L., Narayan, M., Saupe, G., Gardea-Torresdey, J., 2009. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: implications for the food chain. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41, 1665–77.
- Pérès, G., Vandenbulcke, F., Guernion, M., Hedde, M., Beguiristain, T., Douay, F., Houot, S., Piron, D., Richard, A., Bispo, A., Grand, C., Galsomies, L., Cluzeau, D., 2011. Earthworm indicators as tools for soil monitoring, characterization and risk assessment. An example from the national Bioindicator programme (France). *Pedobiologia* 54, S77–S87.
- Pérez-Losada, M., Eiroa, J., Mato, S., Domínguez, J., 2005. Phylogenetic species delimitation of the earthworms *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* (Bouché, 1972) (Oligochaeta, Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Pedobiologia* 49, 317–324.
- Pérez-Losada, M., Ricoy, M., Marshall, J.C., Domínguez, J., 2009. Phylogenetic assessment of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* species complex (Oligochaeta: Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular phylogenetics and evolution* 52, 293–302.
- Philippot, L., Cregut, M., Chèneby, D., Bressan, M., Dequiet, S., Martin-Laurent, F., Ranjard, L., Lemanceau, P., 2008. Effect of primary mild stresses on resilience and resistance of the nitrate reducer community to a subsequent severe stress. *FEMS microbiology letters* 285, 51–7.
- Pizl, V., Josen, G., 1995. Earthworm communities along a gradient of urbanization. *Environmental pollution* 90, 7–14.
- Pons, J., Barraclough, T., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W., Vogler, A., 2006. Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects. *Systematic Biology* 55, 595–609.
- Puillandre, N., Lambert, a, Brouillet, S., Achaz, G., 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular ecology* 21, 1864–77.

Puillandre, N., Modica, M. V, Zhang, Y., Sirovich, L., Boisselier, M.-C., Cruaud, C., Holford, M., Samadi, S., 2012. Large-scale species delimitation method for hyperdiverse groups. *Molecular ecology* 21, 2671–91.

R

R Development Core Team, 2008. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Ranjard, L., Richaume, A., Jocteur-Monrozier, L., Nazaret, S., 1997. Response of soil bacteria to Hg(II) in relation to soil characteristics and cell location. *FEMS microbiology ecology* 24, 321–331.

Rasmussen, L.D., Sørensen, S.J., 2001. Effects of mercury contamination on the culturable heterotrophic, functional and genetic diversity of the bacterial community in soil. *FEMS microbiology ecology* 36, 1–9.

Rasmussen, L.D., Sørensen, S.J., Turner, R.R., Barkay, T., 2000. Application of a *mer-lux* biosensor for estimating bioavailable mercury in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 639–646.

Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N., 2013. A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System. *PloS one* 8, e66213.

Ravichandran, M., 2004. Interactions between mercury and dissolved organic matter—a review. *Chemosphere* 55, 319–31.

Richard, B., Decaëns, T., Rougerie, R., James, S.W., Porco, D., Hebert, P.D.N., 2010. Re-integrating earthworm juveniles into soil biodiversity studies: species identification through DNA barcoding. *Molecular ecology resources* 10, 606–14.

Rieder, S.R., Brunner, I., Daniel, O., Liu, B., Frey, B., 2013. Methylation of mercury in earthworms and the effect of mercury on the associated bacterial communities. *PloS One* 8.

Rieder, S.R., Brunner, I., Horvat, M., Jacobs, A., Frey, B., 2011. Accumulation of mercury and methylmercury by mushrooms and earthworms from forest soils. *Environmental pollution* 159, 2861–2869.

Righi, 1984. *Pontoscolex* (Oligochaeta, Glossoscolecidae), a new evaluation. *Studies on neotropical fauna and environment* 19, 159–177.

Robert, M., 1996. Sol : interface dans l'environnement, ressource pour le développement. 226 p.

Römbke, J., 2007. Searching for a standardization of quantitative terrestrial oligochaete sampling methods: the ISO methodology. p. 491-499.

Römbke, J., Garcia, M., 2000. Assessment of Ecotoxicological Effects of Pesticides on the Soil Fauna and Soil Processes under Tropical Conditions, in: German-Brazilian Workshop on Neotropical Ecosystems – Achievements and Prospects of Cooperative Research. pp. 543–549.

- Rossi, J.P., Celini, L., Mora, P., Mathieu, J., Lapied, E., Nahmani, J., Ponge, J.-F., Lavelle, P., 2010. Decreasing fallow duration in tropical slash-and-burn agriculture alters soil macroinvertebrate diversity: A case study in southern French Guiana. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 135, 148–154.
- Rougerie, R., Decaëns, T., Deharveng, L., Porco, D., James, S.W., 2009. DNA barcodes for soil animal taxonomy. *pesquisa agropecuaria brasileira* 44, 789–801.
- Roulet, M., Lucotte, M., 1995. Geochemistry of mercury in pristine and flooded ferralitic soils of a tropical rain forest in French Guiana, South America. *Water, Air, and Soil Pollution* 80, 1079–1088.
- Roulet, M., Lucotte, M., Saint-Aubin, a, Tran, S., Rhéault, I., Farella, N., De Jesus Da silva, E., Dezencourt, J., Sousa Passos, C.J., Santos Soares, G., Guimarães, J.R., Mergler, D., Amorim, M., 1998. The geochemistry of mercury in central Amazonian soils developed on the Alter-do-Chão formation of the lower Tapajós River Valley, Pará state, Brazil. *The Science of the total environment* 223, 1–24.
- Roulet, M., Lucotte, M., Farella, N., Serique, G., Coelho, H., Sousa Passos, C.J., De Jesus Da Silva, E., Scavone De Andrade, P., Mergler, D., Guimarães, J.-R.D., Amorim, M., 1999. Effects of recent human colonization on the presence of mercury in amazonian ecosystems. *Water, Air, and Soil Pollution* 112, 297–313.
- Roulet, M., 2001. Le mercure: son cycle biogéochimique et sa répartition aux échelles planétaire et amazonienne., in: Carmouze, J., Lucotte, M., Boudou, A. (Eds.), *Le Mercure En Amazonie. Rôle de L'homme et de L'environnement, Risques Sanitaires*. IRD Editions, Paris, p. 81–120.
- Roulet, M., Grimaldi, C., 2001. Le mercure dans les sols d'Amazonie., in: Carmouze, J.P., Lucotte, M., Boudou, A. (Eds.), *Le Mercure En Amazonie. Rôle de L'homme et de L'environnement, Risques Sanitaires*. IRD Editions, Paris, p. 121-165.
- Rubinoff, D., Holland, B., 2005. Between Two Extremes: Mitochondrial DNA is neither the Panacea nor the Nemesis of Phylogenetic and Taxonomic Inference. *Systematic Biology* 54, 952–961.

S

-
- Sandoval, M.C., Veiga, M., Hinton, J., Klein, B., 2001. Review of biological indicators for metal mining effluents: a proposed protocol using earthworms. p. 67–79.
- Santos-Francés, F., García-Sánchez, a, Alonso-Rojo, P., Contreras, F., Adams, M., 2011. Distribution and mobility of mercury in soils of a gold mining region, Cuyuni river basin, Venezuela. *Journal of environmental management* 92, 1268–76.
- Sheppard, S.C., Gaudet, C., Sheppard, M.I., Cureton, P.M., Wong, M.P., 1992. The development of assessment and remediation guidelines for contaminated soils, a review of the science. *Canadian Journal of Soil Science* 72, 359–394.

- Silveira, M.L., Alleoni, L.R.F., O'Connor, G.A., Chang, A.C., 2006. Heavy metal sequential extraction methods - a modification for tropical soils. *Chemosphere* 64, 1929–38.
- Sizmur, T., Hodson, M.E., 2009. Do earthworms impact metal mobility and availability in soil? -a review. *Environmental pollution* 157, 1981–9.
- Sizmur, T., Palumbo-Roe, B., Watts, M.J., Hodson, M.E., 2011. Impact of the earthworm *Lumbricus terrestris* (L.) on As, Cu, Pb and Zn mobility and speciation in contaminated soils. *Environmental pollution* 159, 742–8.
- Skylberg, U., Bloom, P.R., Qian, J., Lin, C.-M., Bleam, W.F., 2006. Complexation of Mercury(II) in Soil Organic Matter: EXAFS Evidence for Linear Two-coordination with Reduced Sulfur Groups. *Environmental science & technology* 40, 4174–4180.
- Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), 2007. Ecosystem responses to mercury contamination - Indicators of Change. CRC Press. 242 p.
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., 1996a. Effects of metal-contaminated soils on the growth, sexual development, and early cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*, with particular reference to zinc. *Ecotoxicology and environmental safety* 35, 86–95.
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., 1996b. The effects of metal contamination on earthworm populations around a smelting works: quantifying species effects. *Applied Soil Ecology* 4, 147–160.
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., 1999a. Seasonal variation in the abundance, biomass and biodiversity of earthworms in soils contaminated with metal emissions from a primary smelting works. *Journal of Applied Ecology* 36, 173–183.
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., 1999b. Environmental Contamination and Toxicology Tolerance to Zinc in Populations of the Earthworm *Lumbricus rubellus* from Uncontaminated and Metal-Contaminated Ecosystems. *Environmental contamination and toxicology* 37, 332–337.
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., 1999c. Comparisons of metal accumulation and excretion kinetics in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to contaminated field and laboratory soils. *Applied Soil Ecology* 11, 227–243.
- Spurgeon, D.J., Weeks, J.M., Van Gestel, C.A.M., 2003. A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology. *Pedobiologia* 47, 588–606.
- Srivathsan, A., Meier, R., 2012. On the inappropriate use of Kimura-2-parameter (K2P) divergences in the DNA-barcoding literature. *Cladistics* 28, 190–194.
- Suthar, S., Singh, S., Dhawan, S., 2008. Earthworms as bioindicator of metals (Zn, Fe, Mn, Cu, Pb and Cd) in soils: Is metal bioaccumulation affected by their ecological category? *Ecological Engineering* 32, 99–107.

T

-
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* 28, 2731–9.
- Teršič, T., Gosar, M., 2012. Comparison of elemental contents in earthworm cast and soil from a mercury-contaminated site (Idrija area, Slovenia). *The Science of the total environment* 430, 28–33.
- Tessier, A., Campbell, P., Bisson, M., 1979. Sequential Extraction Procedure for the Speciation of Particulate Trace Metals. *Analytical Chemistry* 51, 844–851.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673–4680.

U

-
- Udovic, M., Lestan, D., 2007. The effect of earthworms on the fractionation and bioavailability of heavy metals before and after soil remediation. *Environmental pollution* 148, 663–8.
- Udovic, M., Plavc, Z., Lestan, D., 2007. The effect of earthworms on the fractionation, mobility and bioavailability of Pb, Zn and Cd before and after soil leaching with EDTA. *Chemosphere* 70, 126–34.
- Udovic, M., Lestan, D., 2010. Eisenia fetida avoidance behavior as a tool for assessing the efficiency of remediation of Pb, Zn and Cd polluted soil. *Environmental pollution* 158, 2766–72.
- UNEP, 2005. Evaluation mondiale du mercure. 292 p.
- UNEP, 2013. Global Mercury Assessment. 32 p.
- Ure, A.M., Quevauviller, P., Muntau, H., Griepink, B., 1993. Speciation of Heavy Metals in Soils and Sediments. An Account of the Improvement and Harmonization of Extraction Techniques Undertaken Under the Auspices of the BCR of the Commission of the European Communities Speciation of Heavy Metals in Soils and Sedi. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 51, 135–151.
- Ure, A.M., Davidson, C.M., Thomas, R.P., 1995. Single and sequential extraction for trace metal speciation in soil and sediment, in: Quevauviller, P., Maier, Griepink (Eds.), *Quality Assurance for Environmental Analysis. Method Evaluation Within the Measurements and Testing Programme (BCR)*. p. 505–523.

V

-
- Van Gestel, C. a M., 2008. Physico-chemical and biological parameters determine metal bioavailability in soils. *The Science of the total environment* 406, 385–95.

- Van Straalen, N.M., 2002. Assessment of soil contamination--a functional perspective. *Biodegradation* 13, 41–52.
- Van Straalen, N.M., 2003. Ecotoxicology becomes stress Ecology. *Environmental Science & Technology* 324–330.
- Van Straalen, N.M., van Gestel, C. a M., 2008. A stress ecology framework for comprehensive risk assessment of diffuse pollution. *The Science of the total environment* 406, 479–83.
- Veiga, M.M., Hinton, J., Lilly, C., 1999. Mercury in the Amazon : A comprehensive review with special emphasis on bioaccumulation and bioindicators, in: *Mercury in the Amazon : A Comprehensive Review with Special Emphasis on Bioaccumulation and Bioindicators*. pp. 19–39.
- Vijver, M.G., Van Gestel, C.A.M., Lanno, R.P., Van Straalen, N.M., Peijnenburg, W.J.G.M., 2004. Internal Metal Sequestration and Its Ecotoxicological Relevance : A Review. *Environmental science & technology* 38, 4705–4712.
- Vijver, M.G., Vink, J.P.M., Miermans, C.J.H., van Gestel, C. a M., 2007. Metal accumulation in earthworms inhabiting floodplain soils. *Environmental pollution* 148, 132–40.

W

-
- Wang, D., Li, H., Wei, Z., Wang, X., Hu, F., 2006. Effect of earthworms on the phytoremediation of zinc-polluted soil by ryegrass and Indian mustard. *Biology and Fertility of Soils* 43, 120–123.
- Wasserman, C.J., Hacon, S., Wasserman, M.A., 2003. Biogeochemistry of Mercury in the Amazonian Environment. *Ambio* 32, 336–342.
- Wen, B., Hu, X., Liu, Y., Wang, W., Feng, M., Shan, X., 2004. The role of earthworms (*Eisenia fetida*) in influencing bioavailability of heavy metals in soils. *Biology and Fertility of Soils* 40, 181–187.
- Will, K.W., Mishler, B.D., Wheeler, Q.D., 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic biology* 54, 844–51.
- Wolfe, M.F., Chwarzbach, S., Sulaiman, R.A., 1998. Effects of mercury on wildlife: a comprehensive review. *Environmental toxicology and chemistry* 17, 146–160.
- WRB, 2006. World reference base for soil resources 2006. 145 p.

Y

-
- Yang, Z., Rannala, B., 2010. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 9264–9.
- Yu, X., Cheng, J., Wong, M.H., 2005. Earthworm–mycorrhiza interaction on Cd uptake and growth of ryegrass. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 195–201.

Z

-
- Zhang, M., Zou, X., Schaefer, D.A., 2010. Alteration of soil labile organic carbon by invasive earthworms (*Pontoscolex corethrurus*) in tropical rubber plantations. *European Journal of Soil Biology* 46, 74–79.
- Zhang, Z.S., Zheng, D.M., Wang, Q.C., Lv, X.G., 2009. Bioaccumulation of total and methyl mercury in three earthworm species (*Drawida* sp., *Allolobophora* sp., and *Limnodrilus* sp.). *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 83, 937–42.
- Zorn, M.I., Van Gestel, C. a. M., Eijsackers, H., 2005. The effect of two endogeic earthworm species on zinc distribution and availability in artificial soil columns. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 917–925.

Annexes

Annexe 1. Procédure GMYC

I) Détermination du modèle de substitution nucléotidique adéquat avec MrModeltest :

- enregistrer le fichier fasta (fas) en format nexus (nex)
- coller le bloc MrModelblock à la fin du fichier nexus
- exécuter PAUP* 4.0b10 pour générer un fichier scores (scores)
- exécuter le fichier scores sous MrModeltest en utilisant MrModelGui (console)
- copier la ligne de code désignant le modèle sélectionné par le critère AIC de MrModelTest, soit (GTR+I+G) dans notre cas:

```
Lset nst=6 rates=invgamma;
Prset statefreqpr=dirichlet (1,1,1,1);
```

II) Générer un arbre ultramétrique avec BEAST :

- importer le fichier nexus d'origine (sans le MrModelblock) dans BEAUti v1.7.2
- vérifier les données du fichier (nombre de taxa, sites, type de données)
- dans l'onglet "Sites", choisir le modèle de substitution "GTR" et le modèle d'hétérogénéité des sites "Gamma + Invariant Sites", laisser les autres valeurs par défaut
- dans l'onglet "Clock", choisir "uncorrelated lognormal model" avec un taux de 1 (ne pas cocher "estimate")
- dans l'onglet MCMC, définir la longueur de la chaîne à 10 000 000 de générations, avec un échantillonnage toutes les 1000 générations
- générer 3 fichiers BEAST nommés "COICacao-1", " COICacao-2", " COICacao-3" qui représenteront trois analyses indépendantes
- exécuter en parallèle dans BEAST v1.7.2 les trois fichiers xml générés
- exécuter les trois fichiers trees.txt générés dans LogCombiner v1.7.2, ajouter un burnin de 1000
- exécuter le fichier généré (sans extension) dans TreeAnnotator v1.7.2 sans burnin

III) Exécuter une procédure GMYC de délimitation avec Split sous R :

- ouvrir le fichier nexus généré sous R et le transformer en objet Phylo
- > MyTree <- read.nexus("MyNexusTreefile.nex")
- Faire tourner la procédure GMYC
- > MyTree <- gmyc(test.tr, method="single", interval=c(0, 10))

Annexe 2. Les substrats carbonés sur une plaque BIOLOG EcoPlate™.

BIOLOG
EcoPlate™

Microbial Community Analysis

A1 Water	A2 β-Methyl-D- Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D- Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D- Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine
B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine
C1 Tween 40	C2 l-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 l-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 l-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine
D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine
E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine
F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid
G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine
H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine

FIGURE 1. Carbon Sources in EcoPlate

Annexe 3. Protocole DGGE

Concentration des produits PCR :

Les volumes suivants sont donnés pour 100µL de produit PCR

- Transférer les produits PCR dans des Eppendorfs de 2mL
- Ajouter 10µL d'acétate de sodium 3M
- Ajouter 250µL d'éthanol absolu (99.8%)
- Inverser 3fois chaque tube (manier les tubes avec douceur)
- Mettre à 4°C pendant 45 minutes (précipitation des ADN)
- Centrifuger 20 minutes à 11500g (13500rpm sur microcentrifugeuse). Attention, le culot qu'on cherche à récupérer est trop petit pour être visible. Il faut donc positionner parfaitement le tube pour savoir où il se trouve.
- Pipeter le surnageant en prenant garde de ne pas aspirer le culot invisible
- Ajouter 300µL d'éthanol à 70°
- Inverser 3fois chaque tube
- Centrifuger 10 minutes à 11500g (même précautions qu'à la première centrifugation)
- Pipeter le surnageant
- Laisser sécher le culot
- Ajouter 30µL de ddH₂O sur le culot (volume d'eau stable dépendant du volume des puits dans le gel de DGGE et non du volume réactionnel).

Vérification des concentrations de PCR :

La vérification des concentrations de produits PCR se fait par électrophorèse sur gel d'agarose 1% et TAE 0.5X, avec Sybr safe 1X pour révélation aux UV en déposant 3µL du concentré de chaque PCR préalablement mélangé à 3µL de bleu de charge.

On dépose une quantité connue de smartladder, marqueur de taille quantitatif pour comparer les bandes des échantillons à celles du marqueur dont la concentration est connue.

Quantification des produits PCR avec le Gel Doc et le logiciel Quantity One :

- Allumer l'ordinateur et allumer le Gel Doc
- Cliquer sur le lien « Quantity One » une fenêtre s'ouvre
- Cliquer sur « Basic », la fenêtre du logiciel Quantity One s'ouvre
- Sur le Gel Doc, poser le gel et refermer le tiroir à fond
- Appuyer sur le bouton « trans UV »
- Cliquer sur « autoexposition » pour accroître progressivement le temps exposition, puis sur « freeze » lorsque l'exposition semble correcte
- Cliquer sur « manual acquire » pour un réglage manuel du temps d'exposition
- Vérifier la saturation des bandes
- Cliquer sur « save » pour enregistrer en « Raw 1-D Image »

Pour la quantification des bandes par Quantity One:

- Dans Quantity One, ouvrir l'image sous le format « Raw 1-D Image »
- Cliquer sur Zoom Box pour zoomer sur la zone étudiée
- Cliquer sur « Volume rect tool » et encadrer chaque bande devant être quantifiée en commençant par celle du marqueur qui servira de référence et celle servant à soustraire la luminosité de fond.
- Cliquer sur « Volume analysis report », une fenêtre s'ouvre alors présentant un Tableau de valeurs correspondant aux bandes encadrées
- Calculer les quantités d'ADN présentes contenues dans chaque bande

Préparation des solutions :

- Solution 0% :
 - 40% acrylamide/bis 20 mL
 - TAE 50X 2 mL
 - H2O 78 mL
 - Volume final 100 mL

- Solution 100% :
 - Urée 42 g
 - TAE 50X 2 mL
 - Formamide déionisée 40 mL
 - 40% acrylamide/bis 20 mL

Choix du gradient :

Gradient choisi	20 %	25 %	30 %	35 %	40 %	45 %	50 %	55 %	60 %	65 %	70 %	75 %	80 %
Solution 0% (ml)	12.8	12	11.2	10.4	9.6	8.8	8	7.2	6.4	5.6	4.8	4	3.2
Solution 100%(ml)	3.2	4	4.8	5.6	6.4	7.2	8	8.8	9.6	10.4	11.2	12	12.8

Annexe 4. Liste des 81 haplotypes utilisés pour la méthode GMYC.

Haplotypes	n spécimens	Noms des spécimens EWCA	Groupes ABGD	Groupes GMYC
1	2	150, 149	groupe 1	groupe 1
2	4	134, 003, 151, 009		
3	1	133		
4	1	91	groupe 2	groupe 2d
5	1	136	groupe 2	
6	1	87	groupe 2	
7	2	10	groupe 2	groupe 2c
8	1	67	groupe 2	
9	12	137, 081, 070, 056, 053, 052, 051, 029, 025, 021, 011, 049	groupe 2	
10	1	68	groupe 2	
11	1	15	groupe 2	
12	1	71	groupe 2	
13	2	132, 082	groupe 2	
14	2	160, 158	groupe 2	
15	1	131	groupe 2	
16	1	27	groupe 2	
17	6	138, 102, 090, 063, 030, 005	groupe 2	
18	9	055, 072, 073, 153, 156, 159, 161, 092, 088	groupe 2	
19	1	28	groupe 2	
20	1	17	groupe 2	
21	1	13	groupe 2	
22	1	1	groupe 2	
23	3	32, 36, 31	groupe 2	groupe 2a
24	3	189, 122, 185	groupe 2	
25	7	130, 128, 121, 119, 187, 186, 182	groupe 2	
26	1	118	groupe 2	
27	2	188, 123	groupe 2	
28	2	116, 184	groupe 2	
29	1	117	groupe 2	
30	1	23	groupe 2	groupe 2b
31	1	94	groupe 3	groupe 3
32	1	65	groupe 3	
33	18	100, 096, 095, 089, 086, 085, 079, 069, 061, 058, 057, 042, 169, 163, 157, 144, 141, 135	groupe 3	
34	1	44	groupe 3	
35	3	008, 083, 020	groupe 3	
36	1	142	groupe 3	
37	1	84	groupe 4	
38	1	54	groupe 4	

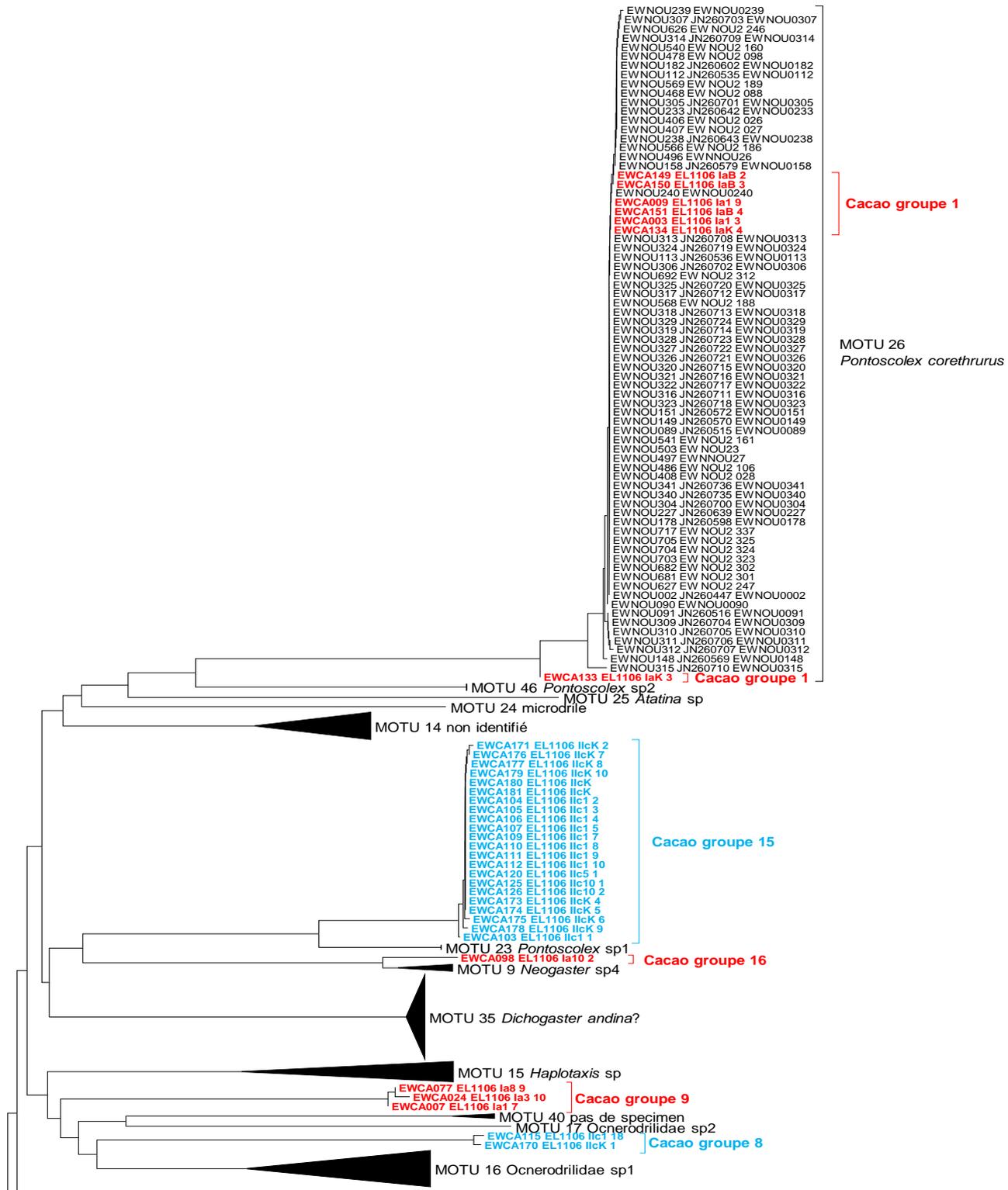
39	4	014, 139, 155, 154	groupe 4		
40	1	60	groupe 4		
41	1	99	groupe 4		
42	1	148	groupe 5	groupe 5	
43	1	166	groupe 5		
44	1	143	groupe 5		
45	1	97	groupe 5		
46	1	140	groupe 5		
47	1	168	groupe 5		
48	2	165, 164	groupe 5		
49	1	66	groupe 5		
50	1	147	groupe 5		
51	1	19	groupe 5		
52	2	167, 145	groupe 5		
53	1	190	groupe 5		
54	1	124	groupe 6		groupe 6
55	1	146	groupe 7		groupe 7
56	1	115	groupe 8	groupe 8	
57	1	170	groupe 8		
58	2	007, 077	groupe 9	groupe 9	
59	1	24	groupe 9		
60	1	152	groupe 10	groupe 10a	
61	1	18	groupe 10		
62	1	101	groupe 10		
63	1	59	groupe 10		
64	6	016, 004, 093, 050, 046, 045	groupe 11	groupe 11	
65	1	43	groupe 11		
66	1	47	groupe 17	groupe 17	
67	1	35	groupe 12	groupe 12	
68	2	034, 074	groupe 13	groupe 13	
69	1	76	groupe 13		
70	5	012, 080, 078, 075, 039	groupe 13		
71	1	33	groupe 13		
72	1	41	groupe 13		
73	5	183, 172, 129, 114, 113	groupe 14	groupe 14 + 18	
74	1	108	groupe 18		
75	18	174, 173, 126, 125, 120, 112, 111, 110, 109, 107, 106, 105, 104, 181, 180, 179, 177, 176,	groupe 15	groupe 15	
76	1	171	groupe 15		
77	1	178	groupe 15		
78	1	175	groupe 15		
79	1	103	groupe 15		
80	1	98	groupe 16	groupe 16	
81	1	162	groupe 10	groupe 10b	

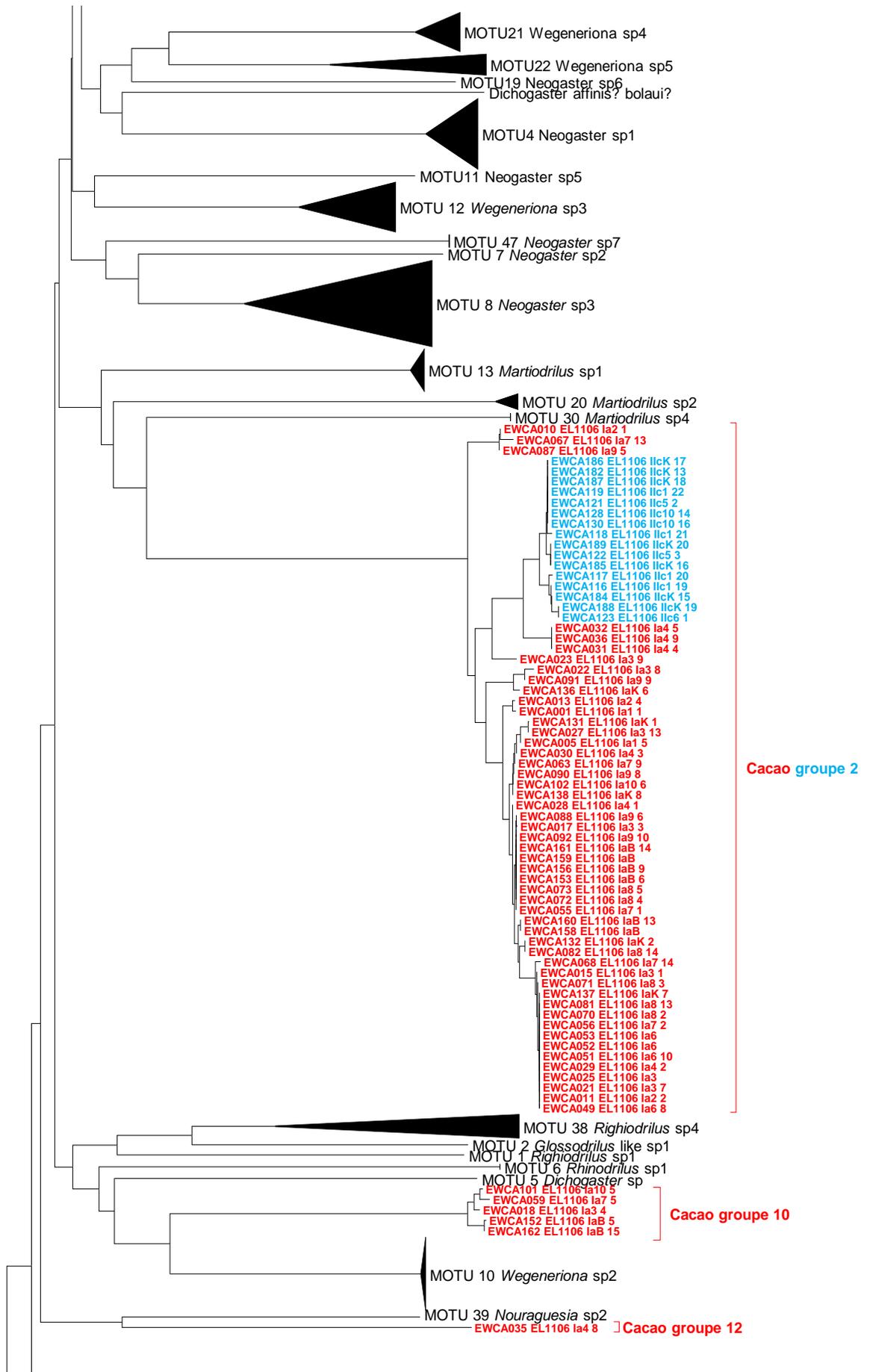
Annexe 5. Identifications morphologiques des vers de terre de chaque MOTUs et commentaires par S.W. James.

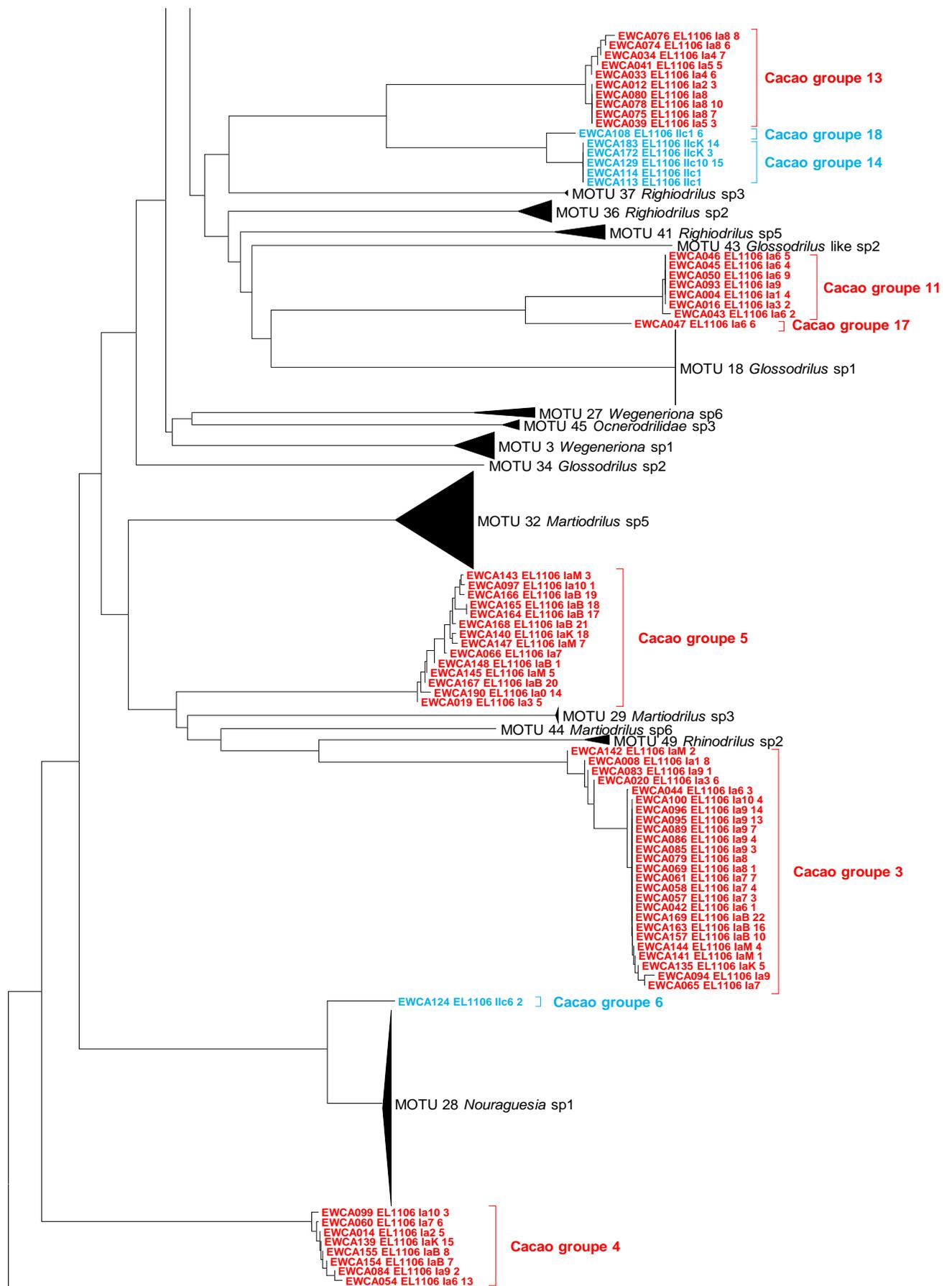
MOTUs ABGD	Specimens	ID par S.W. James	Commentaires par S.W. James
groupe 1	IaK_3B	<i>Pontoscolex corethrurus</i> (probably)	but external characters off by one segment e.g. clitellum 14-21; tail region setae A only slightly offset, not fully in quincunxial pattern, <u>tail setae not hooked</u> and not on papillae.
groupe 1	IaK_4	<i>Pontoscolex</i>	dorsal tail setae on raised papillae, <u>setae not hooked</u>
groupe 2	Ia3_9D	<i>Martiodrilus</i> sp.	very faint pigmentation, juvenile
groupe 2	IICk_18	no heads, only tails.	But this is another species , with dark violet dorsal pigment and distinctive ventral body surface.
groupe 2	IICk_17	<i>Martiodrilus</i> sp.	probably different from the others.
groupe 2	Ia4_4D	No ID	Tail fragment with slight dorsal pigmentation
groupe 2	IaK_6	<i>Martiodrilus</i> sp.	Brown dorsal pigment, flattened body with modifications for crawling on surface
groupe 3	Ia K_5	<i>Martiodrilus</i> sp.	unpigmented juvenile
groupe 4	IaK_15	<i>Urobenus</i> sp.	
groupe 5	IaM_3	<i>Martiodrilus</i> sp.	Juvenile
groupe 5	IaM_5	<i>Martiodrilus</i> sp.	Juvenile
groupe 5	IaK_18	<i>Martiodrilus</i> sp.	Juvenile
groupe 6	IIC6_2	<i>Nouraguesia</i> sp1	(selon comparaison avec vers des Nouragues)
groupe 7	IaM_6	<i>Martiodrilus tenkatei</i>	(probably)
groupe 8	IICk_1	Not ID-able	very small juvenile, no gizzard.
groupe 9	Ia8_9b	could be Enchytraeidae.	tiny white worm with no red blood
groupe 10	IaB_15	<i>Glossodrilus</i> ?	very bad condition
groupe 11	Ia6_2C	<i>Righiodrilus</i> sp.	very thick septa 6/7-9/10, large papillae paired on 11, associate with enlarged setae. Proandric.
groupe 12	Ia4_8b	could be Enchytraeidae.	tiny white worm with no red blood
groupe 13	Ia8_8B	<i>Glossodrilus</i>	Tiny juvenile looks like a glossodrilus, unpigmented
groupe 14	IICk_3, IICk_14	Mystery worm, genre inconnu.	Possibly a <i>Glossodrilus</i> or related, but very unusual with spermathecae in 14, 15 16; large gizzard in space of segs 5-7, no septa 5/6/7. sparse pre-clitellar red dorsal pigment, setae separate.
groupe 15	IICk_6	<i>Pontoscolex</i> species 1	tail setae <u>strongly hooked</u> . setae A in regular lines but all other setae of posterior in quincunx arrangement
groupe 16	Ia10_2E	<i>Neogaster</i> (or <i>Wegeneriona</i>)	Epigeic, with flattened body, probably climbs trees. / depending on spermathecae (which are not developed in this specimen)
groupe 17	Ia 6_6B	no ID	Fragments
groupe 18	IIC1_6	no ID	Fragments

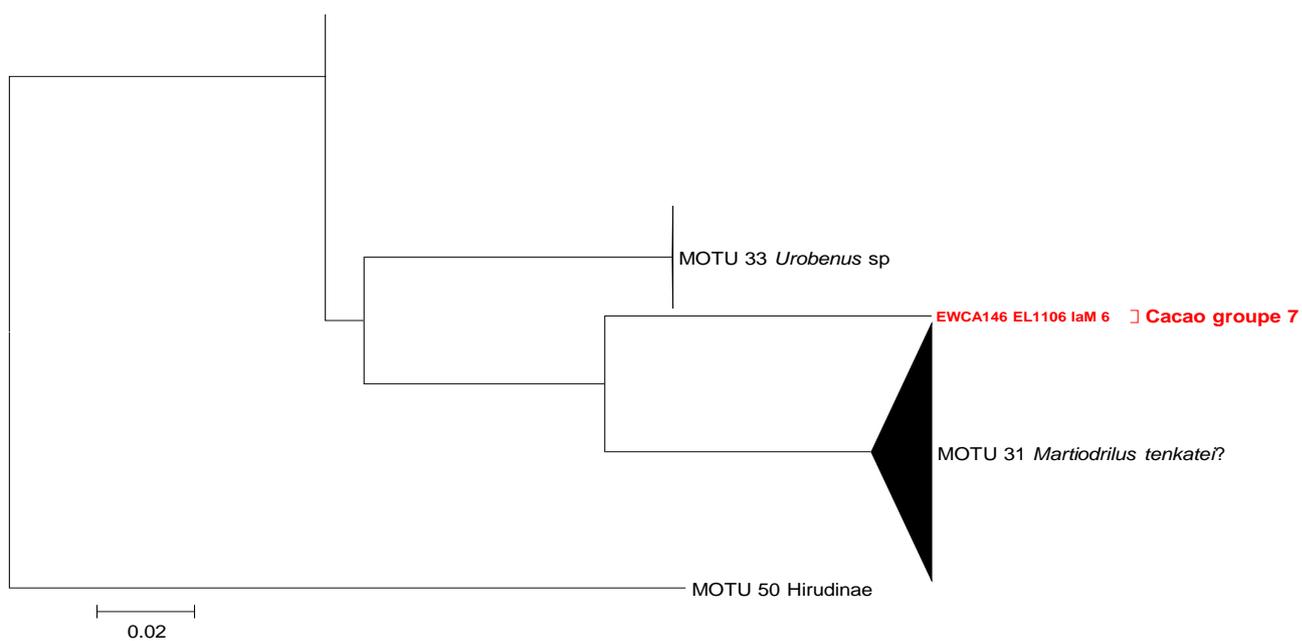
Annexe 6. Arbre BIONJ avec les vers de Cacao et ceux du projet Nouragues (2011-2012)

basé sur le gène COI.





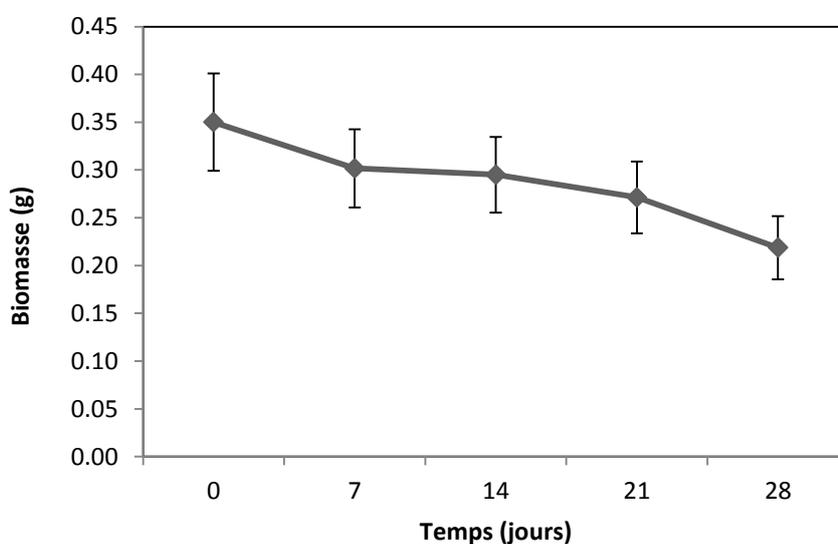




Oxisol en rouge et sol hydromorphe en bleu

Annexe 7. Test pour étude écotoxicologique avec *Eisenia andrei*.

Ce test a été mis en place au moment de la préparation du test écotoxicologique avec *Pontoscolex corethrurus*. Le but était de lancer une série de microcosmes avec *E. andrei* et les mêmes conditions expérimentales afin de comparer l'espèce tropicale à l'espèce modèle (OCDE, 2004). La diminution de la biomasse observée ne nous a pas permis de lancer l'expérimentation car l'oxisol n'est pas approprié pour le maintien d'*Eisenia andrei*, sans doute à cause de son pH acide (pH=4) et de sa teneur en carbone (C total 5%).



Inoculation de 10 vers de l'espèce *Eisenia andrei* dans un microcosme de 500g (poids sec) de l'oxisol guyanais de la toposéquence I et suivi de la biomasse totale pendant 28 jours (n=10, valeur \pm SE).

Annexe 8. Bourse SFE – Description du projet de terrain

Description du projet de terrain

« Etude de la capacité de bioaccumulation du mercure chez différentes catégories de vers de terre en Guyane française »

Lieu et date prévus

Le projet de terrain aura lieu en Guyane française, département français avec un climat tropical. Le site d'étude est une concession minière qui exploite l'or, situé à 15 km du village de Cacao. Un séjour de 15 jours est prévu à la fin de la saison des pluies, en février ou en juin. En effet, c'est la saison la plus propice à l'échantillonnage de vers de terre.

Contexte

Le mercure est reconnu comme un contaminant majeur par la commission européenne et son utilisation est interdite depuis 2006. C'est un constituant naturel de l'écorce terrestre et il peut être libéré dans l'environnement. A cette source naturelle, s'ajoutent différentes sources anthropiques : activités industrielles et extraction artisanale d'or. Les sols et les sédiments sont les principaux compartiments de stockage du mercure dans les écosystèmes terrestres et aquatiques. Différents paramètres biotiques (activités biologiques) et abiotiques (pH, température) peuvent modifier la fixation du mercure dans le sol et celui-ci peut être libéré et se déplacer. Si le mercure est transféré vers les milieux aquatiques anaérobies, il peut être méthylé par voie bactérienne et être transformé en méthylmercure (forme la plus toxique). C'est sous forme de méthylmercure que l'accumulation dans les organismes a lieu. Sa bioaccumulation le long des chaînes alimentaires engendre des problèmes environnementaux et sanitaires majeurs. Les populations locales consommant les poissons des cours d'eau sont directement contaminées (Boudou *et al.*, 2006).

En Amazonie, et en Guyane française en particulier, les stocks de mercure sont 5 à 10 plus importants que dans les sols tempérés. Ceci est dû d'une part, à une accumulation naturelle du mercure en surface des sols riches en Fer et à des activités d'orpaillage d'autre part. Dans le sol, le mercure se fixe sur deux phases porteuses : la matière organique et les oxydes de fer. Ainsi, tout paramètre biotique et/ou abiotique capable de modifier la stabilité de ses phases porteuses peut modifier la dynamique du mercure dans le sol. Ainsi les organismes du sol peuvent affecter les propriétés de leur environnement par leurs activités, et par conséquence la dynamique du mercure dans le sol.

Les vers de terre, « ingénieurs du sol », représentent une biomasse importante et assurent de nombreuses fonctions dans le sol (Lavelle *et al.*, 2006). Par leurs activités, ils peuvent affecter des paramètres tels que la matière organique, le carbone dissous, et le pH. Ces paramètres sont fondamentaux pour la dynamique des éléments métalliques en général et donc du mercure (Sizmur & Hodson, 2009). Pour ces raisons, les vers de terre et leur interaction avec les éléments du sol sont de bons sujets d'étude dans les problématiques de devenir des polluants dans les sols et de bio-indications.

De plus, les vers de terre sont particulièrement intéressants pour évaluer la bio-disponibilité du mercure (fraction assimilable par les organismes) car ils vivent en contact permanent avec le sol. Ainsi, la quantité de mercure accumulée dans les tissus des vers peut être mesurée et renseigner sur la part de mercure disponible dans le sol, fraction du mercure qui peut potentiellement être transformée en méthylmercure par les bactéries ferri-réductrices et/ou sulfato-réductrices.

Enfin, la comparaison des différentes classes écologiques de vers décrites par Bouché (1971) est nécessaire car des comportements différents (anéciques, épigés et endogés) n'affecteront pas le mercure dans le sol de façon identique. Selon qu'ils vivent dans la litière ou plus en profondeur, les vers de terre n'auront pas le même impact sur les éléments du sol.

Objectifs

Ce projet a pour objectif principal d'étudier la bioaccumulation du mercure dans les vers de terre sur deux types de sol avec des concentrations en mercure et une dynamique différentes : un oxisol et un sol hydromorphe. L'oxisol est le type de sol dominant en Guyane française, riche en oxydes de fer. Le sol hydromorphe quant à lui présente des conditions d'anaérobiose propices à la méthylation du mercure. Deux oxisols semblables mais avec des concentrations en mercure différentes *in situ* nous permettront de comparer les quantités de mercure bio-disponible pour les vers. De plus, les quantités de méthylmercure dans les deux types de sol seront comparées, le sol hydromorphe étant a priori plus propice à la méthylation du mercure que l'oxisol.

L'intérêt de cette étude est de i) mesurer la bioaccumulation du mercure dans un des premiers maillons de la chaîne trophique terrestre, le ver de terre, ii) pouvoir évaluer l'importance de ce mécanisme dans les sols tropicaux riches en mercure, iii) comparer le mécanisme de bioaccumulation pour les différentes classes écologiques de vers.

En même temps, cette étude renseignera sur la part de mercure bio-disponible dans le sol, fraction pouvant potentiellement se retrouver dans l'eau et présenter un risque toxique. Enfin,

étant donné le manque d'étude sur le sujet, l'utilisation des vers de terre comme bio-indicateurs de pollutions métalliques des sols sera à mettre en évidence par ce projet dans le cas spécifique du mercure dans des sols tropicaux.

Choix du site d'étude et justification

Le site d'étude appartient à la Concession Minière Boulanger et est situé à environ 15 km du village de Cacao. C'est un bassin versant de 1 km², recouvert de forêt primaire appelée la Crique Combat. Ce site a déjà été étudié lors de la phase II du programme « Mercure en Guyane » du CNRS et de plusieurs thèses (Guedron, 2008; Harris-Hellal, 2008). Le sol a été caractérisé pour ses teneurs en mercure et sa composante microbiologique. Cependant, aucune étude de bioaccumulation du mercure dans les vers n'y a pour le moment été effectuée.

Des études de diversité des vers de terre ont été effectués dans le cadre de ma thèse en collaboration avec différents chercheurs : Virginie Roy (BIOEMCO, Créteil), Emmanuel Lapiéd (BioForsk, Norvège) et Johanne Nahmani (CEFE, Montpellier). Les résultats obtenus nous ont permis de préciser ce projet de « bioaccumulation dans les vers ».

Matériel et méthodes

- Echantillonnage des vers de terre et du sol

Les vers de terre seront échantillonnés dans deux types de sol sur le même site: l'oxisol (haut de pente bien drainé) et dans le sol hydromorphe (bas-fonds). L'oxisol sera échantillonné en deux points, correspondant à deux concentrations en mercure différentes.

Les vers de terre seront échantillonnés selon la méthode TSBF modifiée d'Anderson et Ingram (1993) : un cadre de 25x25 cm sur 10 cm de profondeur.

De plus, pour chaque TSBF, 500g de sol environ sera prélevé et séché à température ambiante, puis conservé à 4°C jusqu'à analyses.

- Analyses des vers et des sols échantillonnés

Les vers adultes épigés et endogés collectés seront dépurés pendant 3 jours minimum dans des boîtes de Pétris avec du papier humide. Le papier sera changé quotidiennement pour éviter la coprophagie. Chaque ver sera identifié (méthode moléculaire), pesé, et analysé pour sa teneur en mercure total et si possible en méthylmercure.

Des analyses de mercure (total, disponible, méthylmercure), ainsi que des analyses pédologiques et physico-chimiques seront faites sur tous les échantillons de sol.

- Analyses statistiques

Des analyses de variance (ANOVA) seront effectuées avec le logiciel R afin de déterminer s'il existe des différences significatives entre les différentes catégories de vers en termes de bioaccumulation du mercure et dans les différents sols. L'interaction entre les deux facteurs sera également testée. De plus, des corrélations seront faites entre les quantités de mercure accumulées dans les vers et les teneurs mesurées dans les sols (mercure total et disponible).

Résultats attendus et valorisation

Ce projet de terrain permettra de connaître précisément la capacité de bioaccumulation chez différentes catégories écologiques de vers de terre tropicaux qui vivent dans les sols guyanais contaminés au mercure. Aucune étude à ce jour ne décrit la biodisponibilité du mercure dans les sols tropicaux pour les vers de terre.

Les résultats attendus sont :

1. Des quantités de mercure bioaccumulées dans les vers plus importantes pour les sols les plus contaminés. S'il y a plus de mercure dans le sol, il y a potentiellement plus de mercure disponible pour les vers de terre.
2. Dans les sols hydromorphes en particulier, des quantités plus importantes de méthylmercure sont attendues dû aux conditions anaérobies dans les bas-fonds, favorables à la méthylation du mercure par les bactéries (Fleming *et al.*, 2006; Kerin *et al.*, 2006).
3. Concernant les catégories écologiques de vers de terre, les vers endogés ont tendance à accumuler plus de mercure que les vers épigés car ils vivent en permanence dans le sol alors que les épigés restent plutôt en surface (Burton *et al.*, 2006). Cependant, aucune étude ne le démontre en milieu tropical, où le mercure est préférentiellement accumulé en surface en se liant à la matière organique.

Ces résultats seront valorisés sous forme d'articles dans des revues à comité de lecture, de rang international (*Applied Soil Ecology* par exemple), et présentés à des congrès nationaux et internationaux sur les sols pollués et les organismes des sols.

Résumé

Le mercure suscite beaucoup d'attention de par les conséquences sanitaires et environnementales qu'il engendre. Son impact est particulièrement important en Guyane française où les teneurs en mercure sont naturellement élevées dans les sols, et s'ajoutent celles liées aux activités d'orpaillage. Si l'impact du mercure dans les milieux aquatiques a été largement étudié, peu d'études ont évalué son impact dans les milieux terrestres. Dans ce **contexte**, les interactions entre les vers de terre, organismes ingénieurs des sols, et le mercure ont été étudiées dans des sols tropicaux, avec comme **objectifs** : i) d'évaluer l'abondance et la diversité des vers *in situ* en lien avec le mercure, ii) d'évaluer expérimentalement la résistance au mercure d'une espèce de ver tropical présente sur le site d'étude et iii) d'évaluer l'impact en microcosmes de l'activité des vers de terre sur la mobilité et la répartition du mercure dans les sols. Ces objectifs ont été appréhendés au travers de trois volets, avec comme matériel d'étude des sols naturels et des vers de terre tropicaux provenant d'un site orpaillé, situé dans les environs de Cacao, en Guyane française. Dans le **premier volet**, un échantillonnage standardisé des vers de terre (TSBF), a permis de proposer des espèces putatives (ou MOTUs) à partir de méthodologies de délimitation basées sur le barcode ADN. Ces MOTUs ont ensuite été identifiés morphologiquement, parmi lesquels *Pontoscolex corethrurus*, une espèce pantropicale considérée comme pérégrine. De plus, les caractéristiques des sols et les teneurs en mercure ont été déterminés afin de tenter d'expliquer la distribution des vers sur le site étudié. *P. corethrurus* se retrouve exclusivement dans l'oxisol, qui contient les concentrations les plus élevées de mercure total. Le **second volet** de ce travail a été consacré à l'étude de l'impact du mercure sur l'espèce tropicale *P. corethrurus*, à travers une approche écotoxicologique où le vers de terre a été exposé à différentes concentrations de mercure dans un oxisol dopé au laboratoire. Les résultats obtenus ont confirmé la résistance de cette espèce à des concentrations de mercure allant jusqu'à $20 \mu\text{g g}^{-1}$ de sol et ont révélé sa forte capacité bioaccumulatrice. Les résultats précédemment décrits ont ouvert la voie à un **troisième volet** où deux études en microcosmes se sont attachées à étudier l'impact des vers de terre sur la mobilité et la disponibilité du mercure (a) dans des conditions proches de celles rencontrées en conditions naturelles (fond géochimique), et (b) en présence d'une forte concentration pouvant être rencontrée sur les sites orpaillés ($20 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ de sol). Les résultats ont montré que les vers de terre agissent sur la mobilité du mercure directement par modifications physico-chimiques des sols (augmentation du pH et COD) et indirectement par stimulation des communautés bactériennes totales du sol. **En conclusion**, notre étude a montré que (1) *P. corethrurus* est une espèce résistante au mercure de par sa présence sur notre site d'étude et les résultats du test écotoxicologique, ce qui confirme l'idée d'un modèle tropical pour ce type d'étude ; (2) la bioaccumulation du mercure mesurée chez les vers de terre est importante et pourrait ainsi être responsable de l'entrée du mercure dans la chaîne terrestre trophique ; et (3) les vers de terre jouent un rôle dans la mobilité du mercure, modifiant sa répartition dans les sols et diminuant sa biodisponibilité.

Mots-clés : mercure, sol tropical, Guyane française, vers de terre, mobilité, disponibilité.

Abstract

Mercury is of major concern because of health and environmental problems that they cause. This toxic pollutant is particularly prevalent in tropical Amazonian regions and in French Guiana where soils are naturally rich in mercury and past and present gold mining activities occurred. While many studies have shown the impact of mercury in aquatic environments, to our knowledge only a few have focused on terrestrial ecosystems. This doctoral research examined the interactions between earthworms, which are soil engineers, and mercury in a tropical soil from French Guiana. The **objectives** of the research were to: i) evaluate *in situ* earthworm diversity and distribution in soils related to mercury concentrations, ii) evaluate the impact of mercury on a tropical earthworm species present in our study site, and iii) evaluate the impact of earthworms on mercury mobility and availability in different soils. In order to achieve these objectives, three studies were conducted using natural tropical soils and tropical earthworms sampled in a small catchment basin located near Cacao, in French Guiana. In the **first part**, earthworms were collected in the field using the standard TSBF method, and species delimitation was done based on DNA barcoding. Putative species were then morphologically identified, among them *Pontoscolex corethrurus*, a pantropical and peregrine species. Furthermore, soil characteristics and mercury concentrations were determined in a first attempt to explain earthworm distribution in the field. *P. corethrurus* was found only in the oxisol, which contained highest mercury concentrations in the field. In the **second part**, an ecotoxicological study was done using a natural tropical soil in order to assess the impact of mercury on *P. corethrurus*. The results showed that *P. corethrurus* can resist up to high mercury concentrations; it was not affected until $20 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil and showed high capacity of Hg bioaccumulation. In the **last part**, two studies were conducted in microcosms in order to assess the impact of earthworms on Hg mobility and availability in soils. For these studies, conditions near natural conditions and also a high mercury concentration were applied to the soil ($20 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ soil). Results showed the impact of earthworms on mercury mobility and availability through different mechanisms: directly, through soil modifications (increase of soil pH and DOC), and indirectly, through stimulation of the soil microbial population. Furthermore, results confirmed the high capacity of earthworms for Hg bioaccumulation. **In conclusion**, we showed that (1) *P. corethrurus* is resistant to mercury, due to its presence in our field site and the results of the toxicity test, thus confirming the use of a tropical species for these studies; (2) Hg bioaccumulation measured in earthworms is important and thus could be responsible for its entry and biomagnification in the terrestrial food chain; and (3) earthworms affect mercury mobility modifying its fractioning in soils and decreasing its availability.

Keywords: mercury, tropical soil, French Guiana, earthworms, mobility, availability.