

Utilisation de la dreissène pour l'évaluation de la qualité écotoxicologique de différents hydrosystèmes du bassin versant de la Seine

Catherine Gourlay-Francé¹ *, Adeline Bourgeault¹, Cécile Michel¹, Emmanuelle Uher¹, Françoise Vincent-Hubert¹, Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin¹, Frédéric Palais², Sylvie Biagiante-Risbourg², Alain Geffard², Sandrine Pain-Devin³.

¹ Cemagref, UR Hydrosystèmes et Bioprocédés, Parc de Tourvoie, Antony et FIRE FR-3020, 4 place Jussieu, Paris

² Université de Reims Champagne Ardenne, Unité de recherche Vignes et Vins de Champagne-Stress Environnement EA 2069, Laboratoire d'Eco-Toxicologie.

³ LIEBE, Université Paul Verlaine, Metz - CNRS UMR 7146

*personne à contacter catherine.gourlay@cemagref.fr

Introduction

Un des objectifs de la phase 5 du PIREN-Seine consiste à observer et à comprendre l'impact des micropolluants métalliques et organiques sur les organismes du milieu. Pour cela, nous nous sommes attachés à utiliser un organisme aquatique modèle (la dreissène) largement présent dans le bassin, sédentaire et résistant aux perturbations des milieux aquatiques, pour en faire un outil de biomonitoring actif (transplantation). La mesure de différentes réponses biologiques sur cet organisme a été développée (bioaccumulation, réponses enzymatiques (Palais et al., 2008) biomarqueurs de génotoxicité, (Vincent-Hubert et al., 2009)) de façon à pouvoir les suivre in situ et évaluer les possibilités de les interpréter en termes de contamination chimique.

En 2008, une campagne de transplantations de dreissènes sur deux mois sur deux sites contrastés du bassin versant de l'Orge a été réalisée (Bourgeault et al., 2009a). L'analyse des résultats a montré l'importance de considérer un ensemble de réponses écotoxicologiques, plus ou moins spécifiques de la contamination par les micro-contaminants. En particulier, les petites rivières urbaines sont caractérisées par une contamination chimique accompagnée d'un changement de la qualité physico-chimique du milieu. L'étude menée en 2008 a montré que l'interprétation des réponses biologiques devait prendre en compte les autres facteurs environnementaux, tels que le niveau trophique et la croissance des organismes (Bourgeault et al., in press.).

Suite à ces premiers résultats, nous avons cherché à mieux comprendre les relations entre la contamination chimiques d'un milieu et les différentes réponses biologiques sur lesquelles nous nous sommes penchées au cours de la phase 5 du PIREN-Seine. Nous avons mis en place un suivi pour observer les réponses de dreissènes transplantées sur une année hydrologique complète. Des dreissènes ont donc été transplantées sur sept sites réparties sur deux zones :

- sur l'axe Seine, suivant un gradient d'urbanisation, sur trois sites communs aux autres études menées par les équipes de chimie du PIREN;
- sur le bassin versant de la Vesle, caractérisé par une pression agricole.

Ce rapport présente l'ensemble des méthodologies employées et les résultats disponibles à ce jour. En effet, l'ensemble des analyses n'a pas été complètement finie (fin de la campagne en automne 2009 seulement) et l'interprétation de tous ces résultats n'est pas encore réalisée.

1 Matériels et méthodes

1.1 Sites d'échantillonnage et déploiement des organismes

Les dreissènes ont été prélevées dans le canal de la Meuse à Commercy la veille du déploiement sur les sites en octobre 2008. Elles ont été calibrées (20-22mm pour la bioaccumulation, 20-24 mm pour les réponses enzymatiques, 25-30 mm pour les marqueurs génotoxiques), réparties dans des cages puis transplantées sur les sites. Les cages sont ensuite prélevées chaque mois.

1.1.1 Sites de la Seine

Trois sites ont été choisis sur l'axe Seine (Figure 1) :

- Marnay, à une centaine de kilomètres en amont de Paris
- Bougival en aval de Paris
- Triel, à 50km en aval de Bougival et en aval du rejet de la station d'épuration de Seine-Aval recevant les eaux usagées de Paris et d'une partie de la région parisienne

1.1.2 Sites de la Vesle

Le bassin versant de la Vesle est soumis à une pression anthropique, notamment dans sa zone amont où s'étendent des agro-ressources, les grandes cultures et le vignoble. Ces activités agricoles sont source d'une pollution chimique diffuse (Bardet et al., 2005). De plus la Vesle traverse la ville de Reims et est également soumise aux rejets de la station d'épuration. Pour cette étude nous avons donc choisi différents sites permettant de définir la qualité de la Vesle Amont (Bouy et Sept-Sault), de la Vesle Aval (Fismes V) et aussi de L'Ardre (Fismes A) qui n'est quasiment soumise qu'à des rejets d'origine agro-viticole (Figure 1).



Figure 1: Position des différents sites d'étude sur le bassin versant de la Seine et de la Vesle.

1.2 Prélèvements

1.2.1 Sites de la Seine


Les trois sites ont été suivis mensuellement d'octobre 2008 à octobre 2009. Des prélèvements ponctuels ont été réalisés aux dates indiquées sur le Tableau 1 afin de mesurer les métaux dissous et totaux sur eau brute, les HAP dissous et particulaires, les matières en suspension (MES), le carbone organique dissous et particulaire (COD et COP), la concentration en chlorophylle, phéopigments, ions majeurs et hydrogencarbonates (TAC). Les métaux labiles sont mesurés par DGT sur toute la durée de l'exposition par tranche de 1 mois : lors des prélèvements, trois DGT retirées sont remplacées par trois nouvelles. De même les HAP labiles sont mesurés par des duplicats de SPMD déployées pendant 1 mois. Le pH est mesuré sur site lors de chaque prélèvement. La température est suivie en continu à l'aide de sondes.

Sur l'ensemble des dreissènes transplantées, 20-25 organismes ont été prélevés aux dates indiquées dans le Tableau 1 et ramenés au laboratoire dans des bouteilles réfrigérées contenant de l'eau du site. Sur ces

organismes, l'indice de condition, le taux de filtration et les concentrations en HAP et en métaux bioaccumulés ont été mesurés.







Trois prélèvements ont été réalisés pour l'étude des réponses génotoxiques: en janvier, avril et juin 2009. A chaque prélèvement, l'indice de condition des organismes a été calculé, le test comète et le test des micronoyaux ont été effectués immédiatement au retour du terrain pour déterminer respectivement le taux de cassures à l'ADN et les niveaux de cassures chromosomiques. Concernant les marqueurs biochimiques, la périodicité de prélèvements a été saisonnière (trimestrielle). Les dreissènes prélevées étaient transférées le jour même au laboratoire de Reims pour y être disséquées.

Tableau 1: Organisation des prélèvements et du suivi chimique des sites sur l'ensemble de la campagne Seine

	Date	Prélèvement de dreissènes bioaccumulation	Prélèvement de dreissènes génotox	Prélèvement de dreissènes marqueurs biochimiques	Suivi chimique	Suivi DGT / SPMD
M0	22.10.08	Pose cages			x	
M1	25.11.08	x		x	x	
M2	16.12.08	x			x	
M3	20.01.09	x	x	x	x	
M4	24.02.09	x			x	
M5	24.03.09	x			x	
M6	22.04.09	x	x	x	x	
M7	09.06.09	x			x	
M8	22.06.09	x	x		x	
M9	22.07.09	x		x	x	
M10	19.08.09	x - mortalité 70%			x	
M11	29.09.09	x - mortalité 90%			x	
M12	22.10.09				x	

1.2.2 Sites de la Vesle

Tableau 2 : Organisation des prélèvements et du suivi chimique des sites sur l'ensemble de la campagne Vesle

	Date	Prélèvement de dreissènes Marqueurs biochimiques bioaccumulation	Suivi chimique	DGT	SPMD
M0	Nov 08	Pose cages			
M1	Dec 08	x			
M2	Jan 09	x			
M3	Fev 09	x	x		
M4	Mar 09	x			
M5	Avr 09	x	x		
M6	Mai 09	x			
M7	Jui 09	x			
M8	Juil 09	x			
M9	Aou 09	x	x		
M10	Sep 09	x			
M11	Oct 09	x	x		

Les sites du bassin versant de la Vesle ont fait l'objet d'un suivi mensuel pour les marqueurs biochimiques, les glutathions S-transférases (GST), les métallothionéines (MT) et les enzymes digestives (amylase, endoglucanase). Les métaux bioaccumulés ont également été mesurés. A quatre périodes de l'année, un suivi chimique a été réalisé par mesure des métaux dissous et totaux sur eau brute, les MES, le COD, le COP, ions majeurs et hydrogénocarbonates (TAC) (Tableau 2). Les métaux labiles ont été mesurés

par DGT sur un mois d'exposition, suivant le même protocole que sur la Seine. Les HAP dissous ont été quantifiés en avril et en octobre, les HAP labiles en avril.

1.3 Traitement des échantillons au laboratoire

1.3.1 Analyses chimiques de l'eau et des dreissènes

La concentration en métaux dissous du milieu est évaluée en filtrant sur site 20ml d'eau à travers un filtre PES de porosité 0,45µm. L'échantillon est acidifié (1% HNO₃) le jour même puis analysé par ICP-MS. Les échantillons destinés à l'analyse des métaux totaux sur eau brute sont minéralisés sur bloc chauffant par eau régale puis analysés en ICP-MS. Les résines de DGT pour les métaux labiles sont éluées dans HNO₃ 1M. L'éluat est ensuite analysé par ICP-MS.

Les échantillons d'eau prélevés pour l'analyse des HAP sont filtrés sur filtre GF/F. Le filtrat est passé sur cartouche C18 afin d'en extraire les HAP dissous; quant au filtre, il est lyophilisé avant de subir une extraction micro-onde dans un mélange dichlorométhane/méthanol (v/v) (90/10) afin d'estimer la contamination en HAP particulaire. L'extraction des HAP échantillonnés par SPMD se fait par dialyse dans de l'heptane (48h). L'échantillon ainsi récupéré est concentré puis purifié sur cartouche de florisil.

Les tissus frais sont prélevés, pesés, congelés à -80°C puis lyophilisés. Les tissus secs ainsi obtenus sont à leur tour pesés puis broyés en une fine poudre. Une partie cette poudre est minéralisée sur bloc chauffant dans un mélange HNO₃/H₂O₂ alors que le restant est utilisé pour l'analyse des HAP et la détermination du taux de lipide (Bligh and Dyer, 1959). Les HAP sont extraits par micro-onde dans un mélange acétone/heptane (v/v) (50/50) dopé en HAP deutérés (étalons internes). Suite à l'extraction par micro-onde l'échantillon est filtré, purifié sur cartouche de florisil puis concentré. Ce protocole d'extraction a été validé par l'utilisation d'un matériel de référence (Mussel Homogenate IAEA-432). Les métaux dans les tissus sont analysés par ICP-MS et les HAP par GC-MS.

1.3.2 Indice de condition

L'indice de condition (IC) est défini comme étant le rapport entre le poids des tissus mous et le poids total de l'organisme (comprenant la coquille). Il donne une idée sur l'état de santé globale de l'organisme.

$$IC = \frac{\text{Masse tissus frais}}{\text{Masse tissus frais} + \text{masse coquille}}$$

Un indice gonado-somatique (IGS) a également été calculé. Il correspond au rapport entre le poids de la gonade et le poids de l'ensemble des tissus mous. Cet indice va pouvoir nous renseigner sur la période de gamétogénèse avant l'émission des gamètes dans le milieu.

$$IGS = \frac{\text{Masse gonade}}{\text{Masse tissus frais}}$$

Il est également calculé un indice hépato-somatique. Il correspond au rapport entre le poids de l'hépatopancréas (glande digestive) et le poids de l'ensemble des tissus mous. Cet indice va pouvoir nous renseigner également sur l'état physiologique global de l'organisme.

$$IHS = \frac{\text{Masse hépatopancreas}}{\text{Masse tissus frais}}$$

1.3.3 Taux de filtration

Dès le retour au laboratoire, le taux de filtration est estimé avec de l'eau du site préalablement filtrée et dopée en algues dans une pièce thermostatée réglée sur la température de l'eau du site. La mesure est effectuée en suivant la décroissance en algue dans le milieu due à la filtration des dreissènes. le protocole est détaillé dans le rapport de l'année précédentes (Bourgeault et al., 2009b).

1.3.4 Marqueurs de génotoxicité

Les branchies sont prélevées à l'aide de pinces, puis rincées dans du PBS dilué au 1/3, pH 7,4. Les branchies sont alors coupées en trois morceaux à l'aide de scalpels, déposées dans une solution de dispase II (2U/ml) puis incubées à 37°C dans une étuve, à l'obscurité sous agitation, durant 30min. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée puis conservée à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à l'inclusion dans le gel d'agarose pour le test comète. La viabilité cellulaire est évaluée par un test d'exclusion au bleu de Trypan.

Le protocole du test comète décrit par (Singh et al., 1988) a été modifié pour les dreissènes (Vincent-Hubert *et al.*, en préparation). Après isolement enzymatique des cellules de branchies, les cellules sont incluses dans un gel d'agarose à 0,65% à 37°C. Le mélange est coulé sur lames, préalablement recouvertes d'agarose normal. Après polymérisation de l'agarose, les lames sont immergées 1h dans une solution de lyse, l'ADN est ensuite déroulé durant 15min puis les lames sont soumises à une électrophorèse durant 10min. Les lames sont ensuite rincées et déshydratées pour améliorer la lecture au microscope. L'ADN est marqué au BET 8µg/ml, les lames sont ensuite observées au microscope optique à fluorescence, objectif X40 pour une analyse d'image à l'aide du logiciel Komet 5, (Andor Technologies). 100 noyaux sont analysés par moule, 12 moules sont analysés par site. Plusieurs paramètres sont mesurés pour exprimer les cassures à l'ADN. On utilisera dans nos travaux, le % Tail DNA qui représente le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète ainsi que l'Olive Tail Moment qui est le produit de la distance entre les centres de gravité de la tête et de la queue de la comète (Tail Moment Length) et le % Tail DNA.

Pour le test des micronoyaux, les cellules sont remises en suspension et fixées dans un mélange méthanol/acide acétique (3:1) puis déposées sur lame et mises à sécher une nuit en chambre humidifiée. Les lames sont rincées au PBS, colorées au DAPI et à nouveau rincées au PBS. Elles sont finalement montées en tampon PBS – glycérol 33% (V/V). La lecture s'effectue, après le séchage, au microscope optique en fluorescence plus lumière visible à fond vert en contraste de phase. 2000 cellules par moules ayant un cytoplasme intact sont observées pour déterminer la fréquence de micronoyaux, cellules binuclées, noyaux bourgeonnant, ou noyaux fragmentés de cellules en apoptose (Bolognesi et al., 2004).

1.3.5 Marqueurs biochimiques

Les marqueurs biochimiques étudiés sont les glutathions S-transférases (GST), les métallothionéines (MT) et les enzymes digestives (amylase, endoglucanase).

Sur l'ensemble des organismes transplantés, 6 (Seine) et 8 (Vesle) individus ont été disséqués pour les GST à chaque date de prélèvement afin d'isoler la glande digestive, organe qui est le siège de la plupart des réactions enzymatiques de défense cellulaire. Les glandes digestives ont ensuite été broyées individuellement. Après centrifugation des broyats, les surnageants contenant les enzymes cytosoliques recherchées sont utilisés pour doser l'activité GST selon la méthode de Habig et al. (1974) (évaluation de la capacité de l'extrait enzymatique à conjuguer du glutathion sur une molécule substrat, le CDNB).

Pour les MT, 6 (Seine) et 8 (Vesle) individus ont été disséqués pour chaque date de prélèvement afin d'isoler la glande digestive. Les glandes sont broyées dans un tampon Tris 20mM, pH 8.2 avec 10 mM de β-mercaptoéthanol puis centrifugées à 25000g pendant 55 minutes à 4°C. A partir du surnageant obtenu, les MT sont partiellement isolées par choc thermique (80°C 10 min, puis 4°C 1h) suivi d'une nouvelle centrifugation (15000g, 10 min, 4°C). Le surnageant contenant les MT est récupéré et stocké à -80°C jusqu'à analyse. Les teneurs en MTs sont déterminées par polarographie (Geffard et al., 2007). Le reste des tissus mous des individus de la Vesle (après prélèvement de la glande digestive) a été minéralisé à chaud à l'aide d'acide nitrique pour la quantification d'éléments métalliques (Cd, Cu, Zn, Ni et Pb) par spectrométrie d'absorption atomique (électrothermique et flamme).

Pour les activités d'enzymes digestives, à nouveau 8 individus (Vesle et Seine) ont été disséqués afin d'isoler la glande digestive. Les stylets cristallins de l'ensemble des individus utilisés pour les marqueurs biochimiques (20, Seine ; 24, Vesle) ont été récupérés et regroupés (5 pools) afin d'analyser leurs activités en enzymes digestives. La méthodologie mise en place pour la mesure de ces activités a été détaillée dans différents manuscrits (Palais et al., sous presse; Palais et al., 2008).

2 Résultats et discussion

2.1 Caractérisation des sites

Les données de caractérisation des sites du BV de la Vesle ne sont pas disponibles et donc non présentées dans ce rapport.

2.1.1 Données physico-chimiques

Les données physico-chimiques sont disponibles pour les trois sites de l'axe Seine. Elles ont, présentées Figure 23 et montrent peu de différences entre les sites en terme de concentration en MES et COP. Une différence nette apparaît au niveau de la concentration en carbone organique dissous (COD) soulignant des sites de plus en plus chargés vers l'aval.

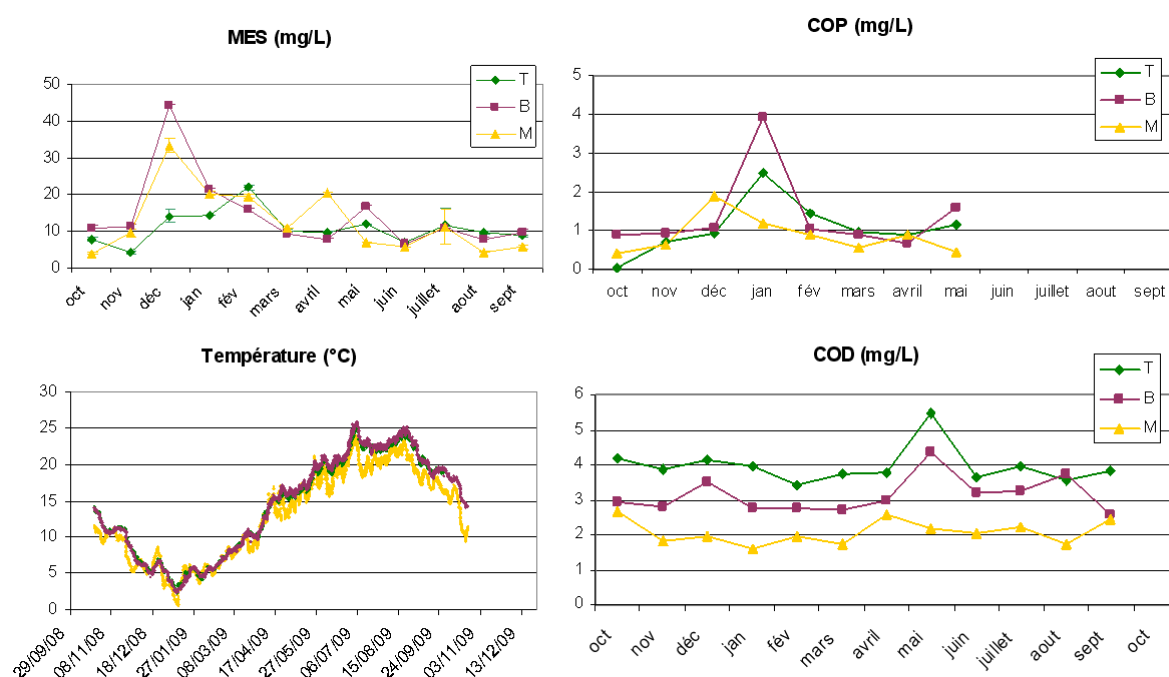


Figure 2: Caractéristiques physico-chimiques des 3 sites étudiés: concentration en MES, COP et COD et évolution de la température

2.1.2 Contaminations métalliques et organiques

Les concentrations en métaux totaux, dissous et labiles, disponibles pour les 7 premiers mois (Figure 3 et Figure 4), indiquent une contamination moindre en amont (Marnay) comparée aux 2 sites aval (Triel et Bougival). De plus, certains pics de pollution ont pu être observés à Bougival (site en aval des rejets de la station d'épuration de Seine-Aval) reflétant le caractère ponctuel de certains rejets chargés en métaux.

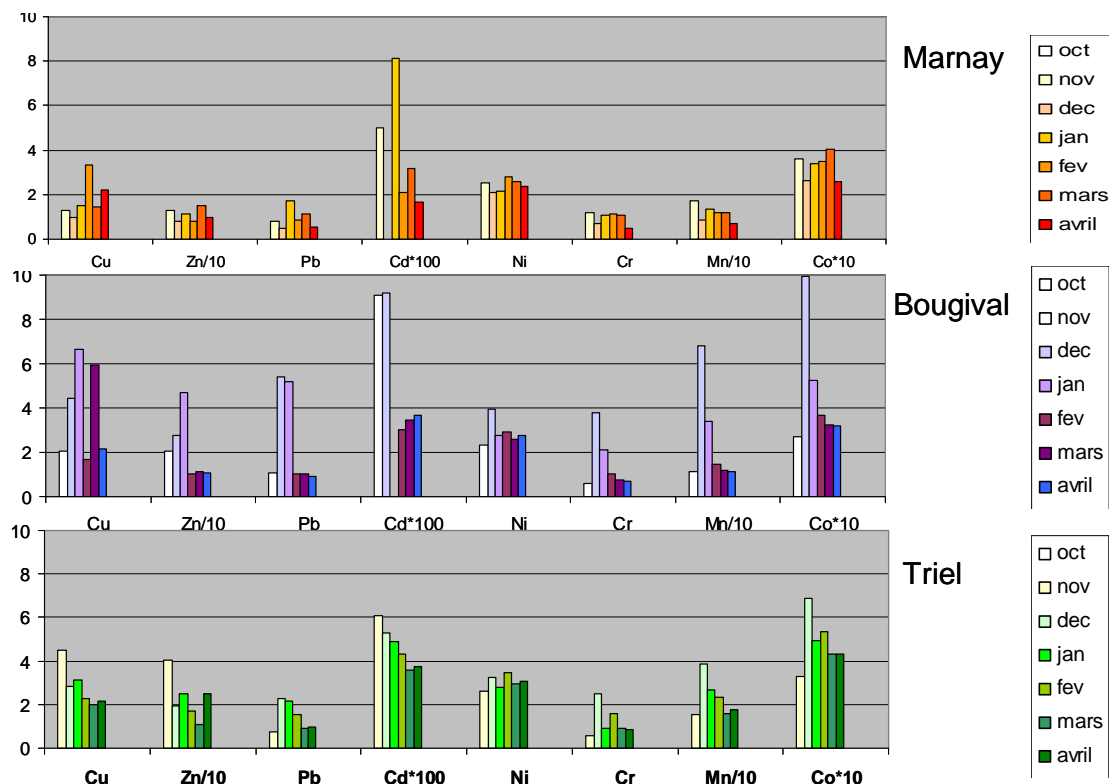


Figure 3 : Concentration en métaux totaux à Marnay, Bougival et Triel ($\mu\text{g/L}$) entre octobre 2008 et avril 2009

Les mesures par DGT ont permis dans certains cas de mesurer les concentrations en métaux labiles alors que les concentrations en métaux dissous étaient en dessous des limites de quantification (principalement pour le Pb, Cd et Cr). Le pourcentage de métal labile par rapport au métal total dissous est présenté dans le Tableau 3. Le Mn est plus labile que d'autres métaux comme le Cr, le Ni, le Co ou le Cu plus susceptibles de se lier à la matière organique. Aucune différence entre l'amont et l'aval n'a pu être mise en évidence contrairement à ce qui avait pu être observé lors d'une étude précédente sur la Seine (Tusseau-Vuillemin et al., 2007). Cependant une variation saisonnière de la labilité du Mn observée sur chacun des 3 sites (données non présentées ici) pourrait indiquer une modification de la composition en matière organique au cours de l'année.

Tableau 3 : Pourcentage de métaux labiles par rapport aux métaux dissous. (-):valeurs non déterminées car les concentrations en métaux dissous sont inférieures à la limite de quantification

		Cu	Zn	Pb	Cd	Ni	Cr	Mn	Co
Marnay	moy	18%	36%	-	-	18%	7%	81%	12%
	EC	3%	17%	-	-	16%	5%	47%	5%
Triel	moy	19%	32%	14%	27%	20%	11%	65%	19%
	EC	4%	9%	7%	11%	6%	6%	38%	9%
Bougival	moy	19%	17%	21%	29%	15%	7%	75%	17%
	EC	5%	7%	8%	11%	5%	1%	45%	8%

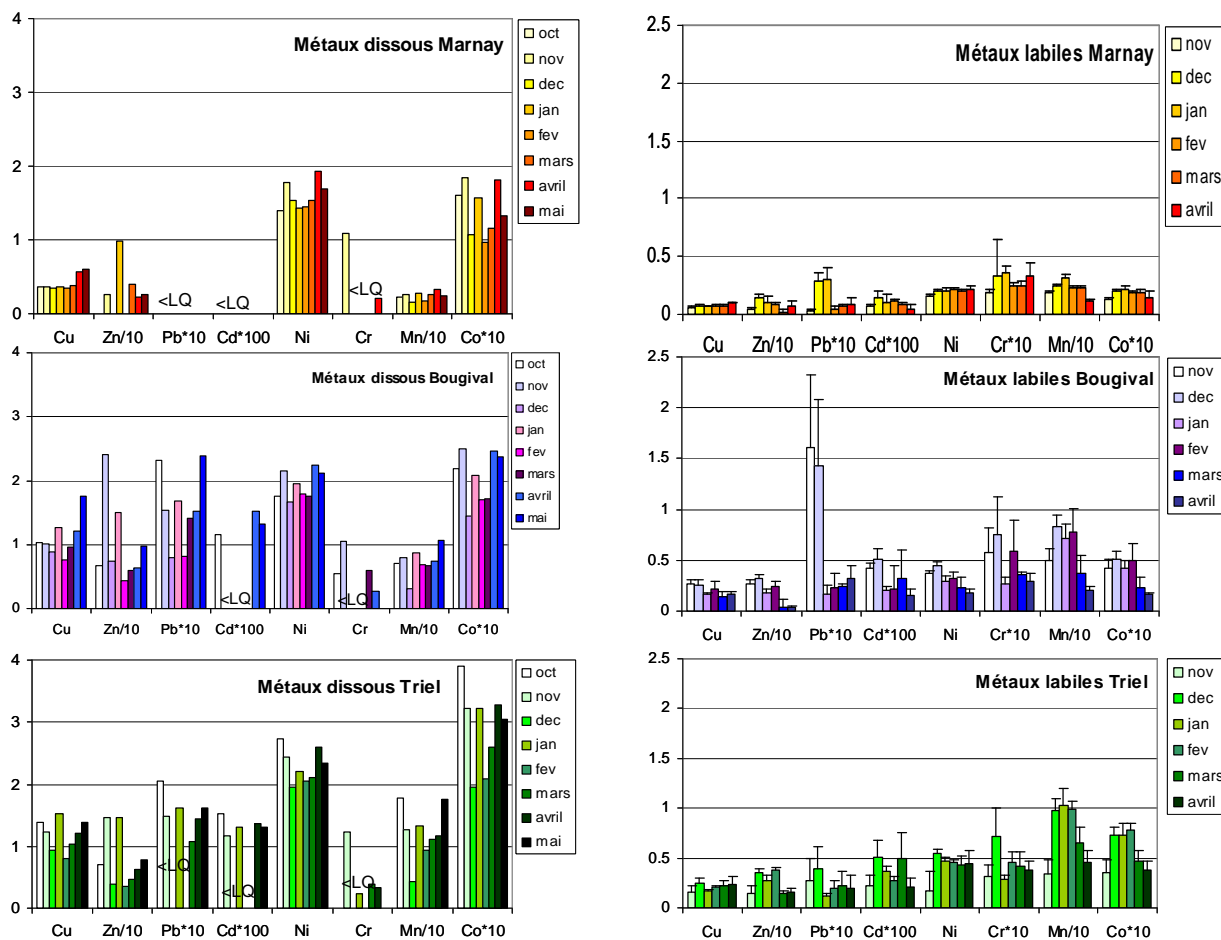


Figure 4 Concentration en métaux labiles et dissous à Marnay, Bougival et Triel (µg/L)

Les contaminations en HAP dissous sont présentées sur la Figure 5. Ici l'ensemble des HAP analysés a été sommé (le profil de contamination entre les 3 sites étant globalement le même pour chacun des HAP pris individuellement). Sur l'ensemble des HAP analysés, les concentrations les plus importantes ont été obtenues pour les HAP légers tels que l'Acénaphthylène, l'Acénaphène, le Fluorène et le Phénanthrène.

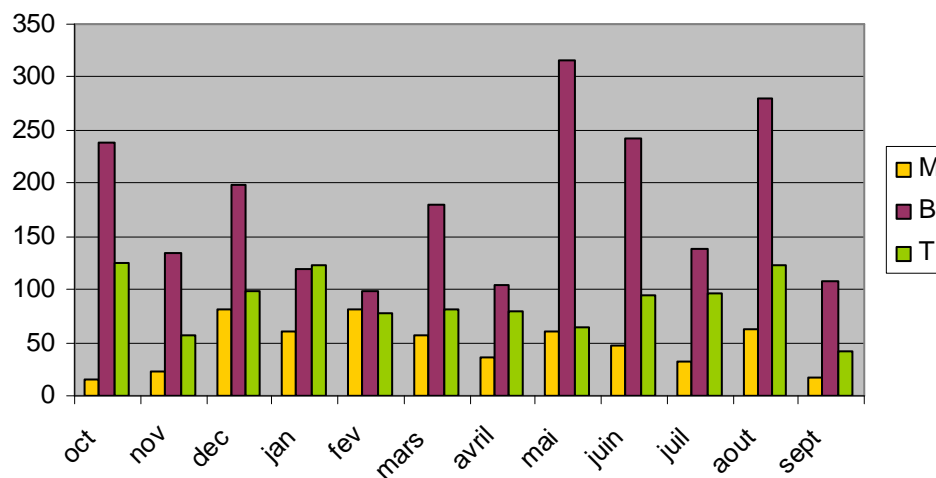


Figure 5: Concentration en ΣHAP dissous (ng/L) sur les trois sites étudiés entre octobre 2008 et septembre 2009

Il apparaît nettement que Marnay est le site le moins contaminé (en moyenne 50 ng.L⁻¹ de HAP dissous sur la durée de la campagne) alors que Bougival l'est le plus (180 ng.L⁻¹), Triel étant à 90 ng.L⁻¹ en moyenne.

Les HAP labiles (échantillonnés par SPMD) sont en cours d'analyse, et ne sont pas présentés ici.

2.2 Etat physiologique des organismes

2.3 Indice de condition

Le poids des tissus sec des dreissènes a augmenté de 16, 39 et 46% respectivement à Marnay, Triel et Bougival pendant les 6 premiers mois d'exposition. Cette croissance est visible à travers l'évolution de l'indice de condition (IC) (Figure 6). La diminution de l'IC en mars/avril indique que la ponte des organismes à vraisemblablement eu lieu à cette période.

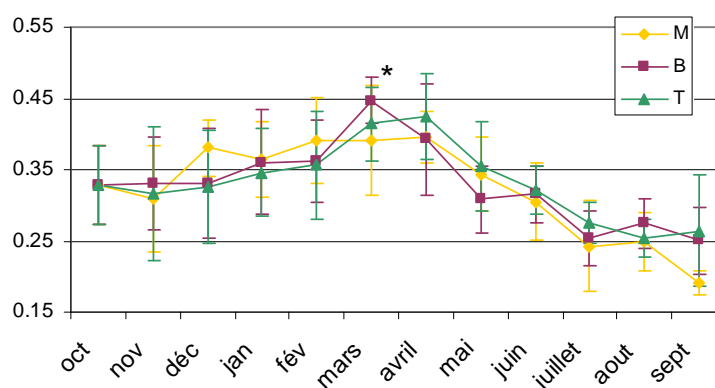


Figure 6: Evolution de l'indice de condition chez les dreissènes calibrées 20-22mm transplantées en Seine. Moyenne ± écart-type. *: valeur à Bougival en mars significativement différente de celle à Marnay en septembre (anova., $p < 0.1$).

Les indices de condition mesurés chaque mois sur les dreissènes transplantées sur le bassin de la Vesle sont présentés sur la Figure 7. Nous observons une décroissance régulière de l'IC pour les organismes présents sur les différents sites. Cependant, entre Mars et Juillet, des IC supérieurs sont observés chez les individus des sites aval (Fismes et Ardre) par rapport aux sites amont (Bouy et Sept-Saulx).

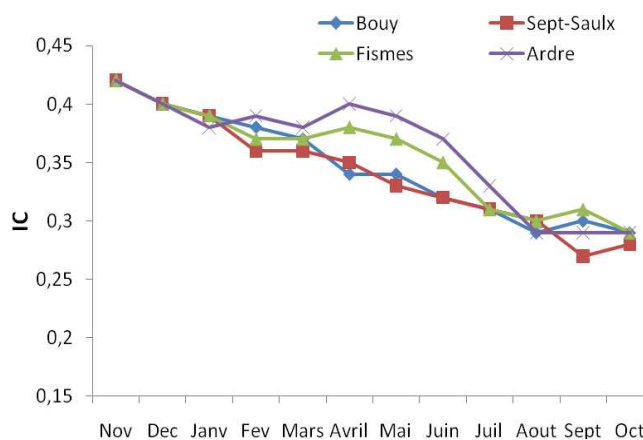


Figure 7: Evolution de l'indice de condition chez les dreissènes transplantées sur le BV de la Vesle (les ET ne sont pas indiqués)

Les indices gonado-somatiques (IGS) mesurés chaque mois sur les dreissènes transplantées sur le bassin versant de la Vesle sont présentés sur la Figure 8. Pour la Seine, cet indice n'a été mesuré qu'en Janvier, Avril et Juillet et les résultats sont présentés dans le Tableau 4. L'IGS des individus présents sur les sites amont de la Vesle (Bouy et Sept-Saulx) est stable tout au long de l'étude. En revanche, une augmentation importante de l'IGS est observée chez les individus des sites aval (Fismes, Ardre), traduisant l'activité de gamétogénèse. Les IGS mesurés sur les individus présents sur les trois sites de Seine sont similaires à ceux de la Vesle pour les périodes hors reproduction (Janvier, Juillet). Pour le mois d'Avril, les IGS mesurés en Seine sont similaires à ceux des sites aval du BV de la Vesle (Fismes, Ardre) indiquant le début de la gamétogénèse.

La comparaison des différents types d'indice chez les individus des deux hydrosystèmes souligne un lien direct entre l'IC et l'IGS. En effet la modification de l'IC provient, au moins en partie, de la maturation sexuelle/émission des gamètes des individus. D'après ces indices globaux il semblerait qu'une maturation sexuelle soit observée chez les individus de la Seine, ainsi que chez les individus du BV de la Vesle aux sites aval. Pour les individus des sites amont du BV de la Vesle, les indices suggèrent l'absence de maturation. Ceci peut être lié aux conditions physico-chimiques/nutritives de ces sites et pourra être complété par l'étude histologique des gonades par la définition de l'indice gonadique (observation des différents stades de maturation des cellules germinales).

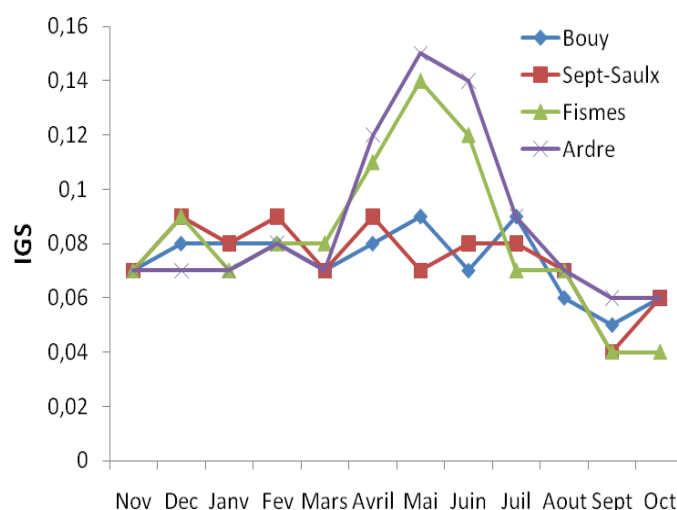


Figure 8: Evolution de l'indice gonado-somatique (moyenne ; n = 20) chez les dreissènes transplantées sur le BV de la Vesle (les ET ne sont pas indiqués)

Tableau 4 : Indice gonado-somatique (moyenne ± ET ; n= 20) chez les dreissènes transplantées sur la Seine pour les différentes dates de prélèvements

Site	T0 (oct)	Janvier	Avril	Juillet
Référence	0.07 (0.02)			
Marnay		0.07 (0.03)	0.10 (0.04)	0.05 (0.03)
Bougival		0.08 (0.03)	0.11 (0.03)	0.07 (0.02)
Triel		0.08 (0.03)	0.12 (0.04)	0.07 (0.02)

Des résultats tout à fait similaires à ceux de l'IGS ont été observés en ce qui concerne l'indice hépato-somatique (non montré). Ceci souligne, une nouvelle fois, que pour les individus présents sur le bassin de la Vesle, la biométrie des différents organes n'évoluent pas de la même façon en fonction du lieu géographique (amont ou aval). Durant la période printanière/reproduction il y a une augmentation du poids de l'hépatopancréas (glande digestive) chez les individus des sites aval et pas chez les individus des sites amont. Ceci peut être dû à une différence trophique des milieux.

2.3.1 Taux de filtration

Seules les informations concernant le bassin versant de la Seine sont disponibles. Le taux de filtration (Figure 9) mesurés pour les dreissènes exposées en Seine semble être influencé à la fois par la température et la concentration en COD. En effet le taux de filtration atteint son minimum en décembre où les températures ont été les plus froides. Pour chaque pas de temps le taux de filtration est maximal pour le site présentant la plus faible concentration en COD (Marnay) et minimal pour le site le plus chargé (Triel).

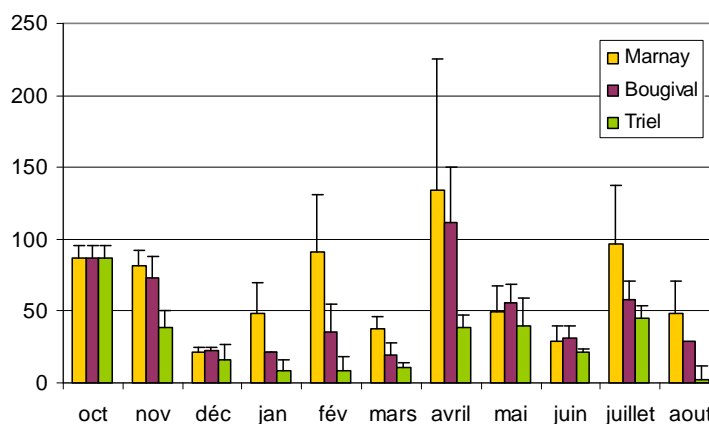


Figure 9: Evolution du taux de filtration des dreissènes exposées aux trois sites de la Seine (en mL/h/organisme)(moy. + écart-type).

2.4 Bioaccumulation dans les organismes

2.4.1 Bioaccumulation des métaux

Dreissènes transplantées en Seine

Pour des raisons pratiques de limitation du nombre de dreissènes utilisées pour cette expérience, nous n'avons pas réalisé de réplicats sur les mesures de bioaccumulation. Une seule valeur est disponible, réalisée sur un pool de 20 à 25 organismes. La variabilité biologique d'un lot de 20-25 individus a été évalué précédemment par l'étude de Bervoets et al. (2004). Quant à la variabilité due au traitement puis à l'analyse de l'échantillon, elle a été estimée par des mesures successives d'un matériel de référence (Mussel Homogenate IAEA-432). Chacune de ces deux variabilités étant inférieure à 10% (tous métaux confondus), l'erreur associée à la mesure, représentée sur la Figure 10, est considérée à 10%.

Les données de métaux dans des tissus de dreissènes montrent une contamination moindre à Marnay (notamment pour le Pb, le Co et le Mn) comparé aux 2 sites aval. De plus, dès le deuxième mois d'exposition, une diminution de la contamination des tissus peut être observée pour la plupart des sites et des métaux (en particulier pour le Pb, Cr, Co et Mn). Rappelons que lors de ces 6 premiers mois d'exposition le poids des tissus a fortement augmenté, entraînant potentiellement une dilution biologique des contaminants accumulés.

Le lien entre la bioaccumulation chez les dreissènes et la contamination du milieu n'est pas direct puisque l'accumulation des contaminants dépend de nombreux facteurs tels que la physiologie de l'organisme (croissance/amaigrissement) ou les paramètres physico-chimique du milieu (répartition des contaminants entre la phase dissoute et particulaire, composition chimique de l'eau). L'approche biodynamique présentée devrait permettre de mieux comprendre l'importance de ces facteurs sur la réponse biologique qu'est la bioaccumulation (Bourgeault et al., in press.; Luoma and Rainbow, 2005). En effet ce modèle incorpore à la fois l'évolution du poids des tissus, les niveaux de contamination dissoute et particulaire et l'activité de filtration (par l'intermédiaire du taux d'ingestion IR).

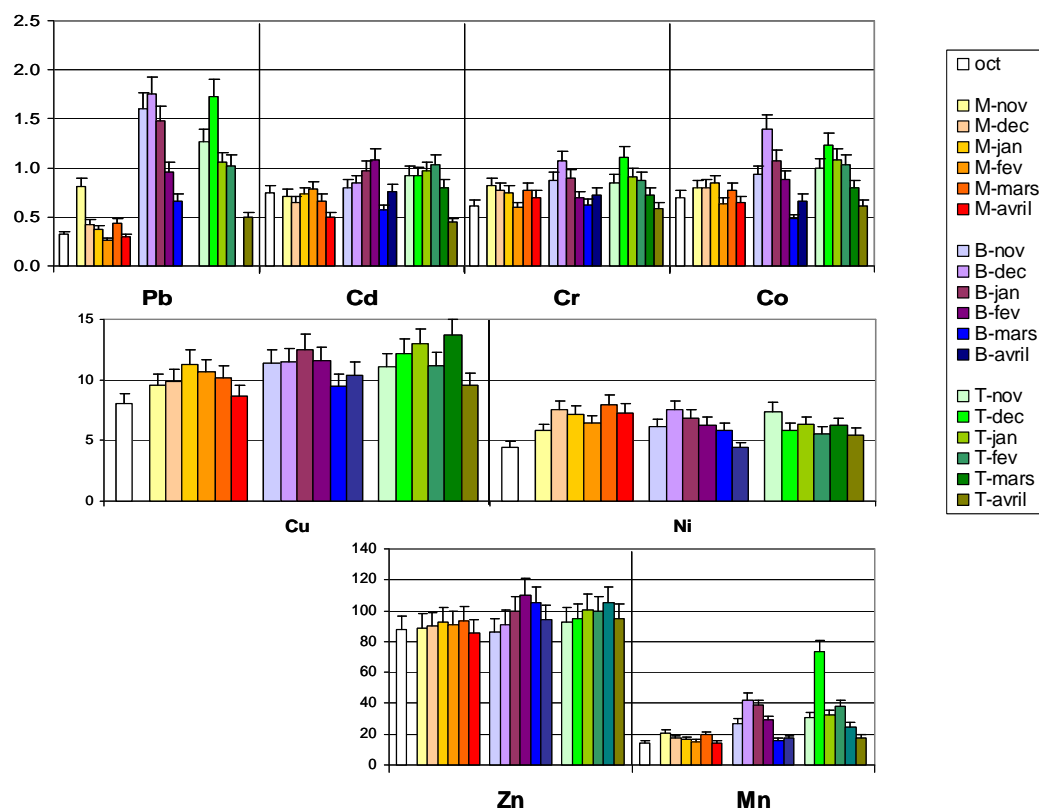


Figure 10: Contamination métallique dans les tissus de dreissène ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ poids sec) au cours des 6 premiers mois d'exposition

Dreissènes transplantées sur le bassin versant de la Vesle

Les teneurs métalliques mesurées au niveau des restes de tissus mous des dreissènes présentes sur les différents sites du BV de la Vesle nous indiquent clairement un gradient amont/aval pour les différents éléments métalliques sauf pour le Cd (pas montré) (Figure 9A et B). Même si la quantification métallique n'a pas été établie sur l'ensemble des tissus mous (absence de la glande digestive), ces mesures reflètent le degré d'exposition et d'imprégnation des organismes sur les différents sites d'études. Il existe un organotropisme fort, notamment chez les bivalves, avec des teneurs métalliques décroissantes selon les organes considérés dans l'ordre suivant : glande > branchies > reste (manteau + muscle adducteur + gonade). Cependant, les teneurs métalliques au niveau de ces différents organes ou groupes d'organes sont corrélées positivement entre elles (Geffard et al., 2004). Des variations temporelles sont observées principalement pour les individus des sites avals avec des augmentations les premiers mois, liées au degré d'exposition sur ces sites, et des diminutions durant la période de gamétogénèse (en effet parmi le reste des tissus mous il y a la gonade) traduisant un effet potentiel de dilution biologique. Pour les sites amonts il n'y a pas d'exposition métallique particulière et les indices (IC, IGS et IHS) n'indiquent pas non plus de variation physiologique ce qui peut expliquer l'absence de fluctuation des teneurs métalliques (exception sur 1 ou 2 mois pour le Cu). Dans le cas de notre étude, il apparaît que le degré d'imprégnation métallique chez les individus exposés sur les sites avals soit suffisamment marqué pour ne pas être masqué par le phénomène de dilution biologique observée également uniquement chez les individus des sites avals.

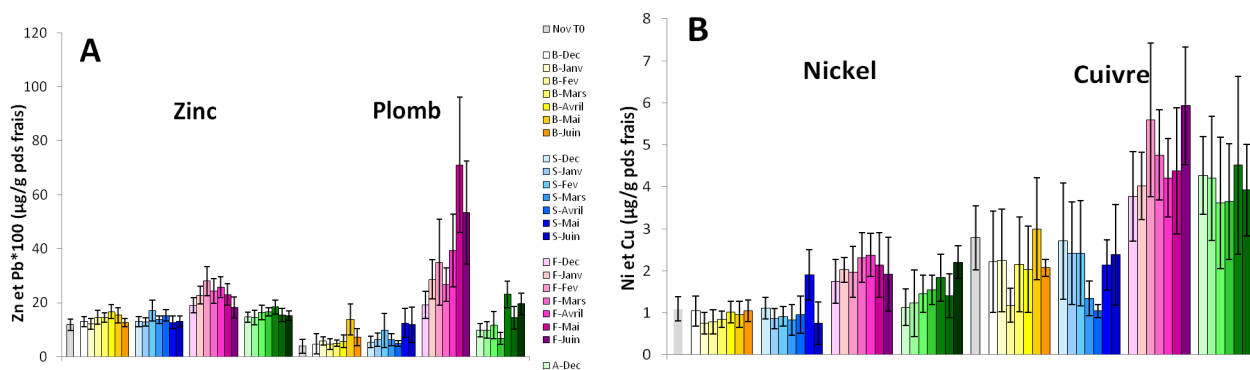


Figure 9. Teneurs métalliques ($\mu\text{g/g}$ de poids frais ; moyenne \pm ET, $n=8$) mesurées au niveau du reste des tissus mous (pas la glande digestive) des dreissènes exposées pendant 1 à 6 mois sur les différentes stations du BV de la Vesle. A : Zinc et Plomb ; B : Nickel et Cuivre.

Afin de gommer l'influence possible des fluctuations physiologiques, nous avons également exprimé la charge métallique des individus par rapport à une variable indépendante qui est le poids de la coquille. Les résultats sont exprimés sur la Figure 10A et B. Des tendances similaires à celles exprimées par rapport au poids des tissus frais sont observées. Cette similitude montre à nouveau que le facteur d'exposition métallique des individus des sites aval est plus important que le facteur de dilution biologique.

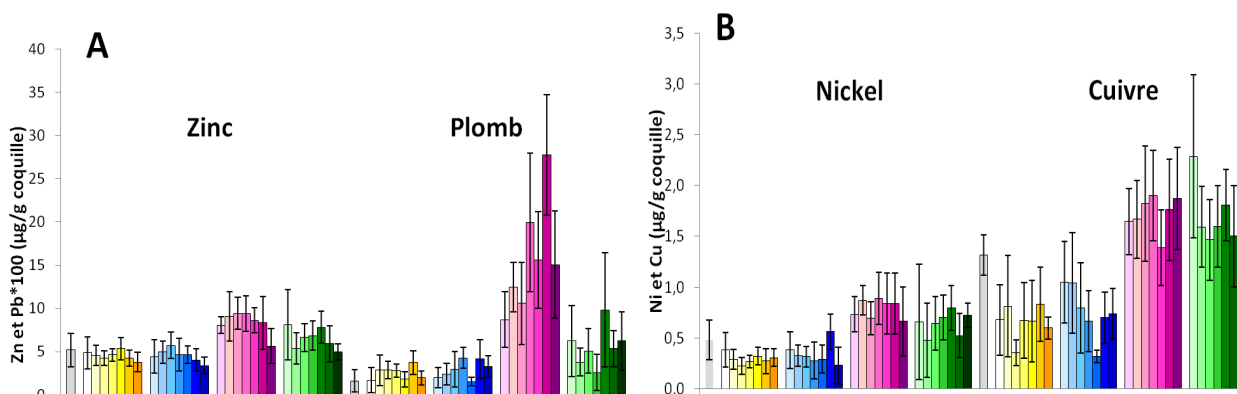


Figure 10. Teneurs métalliques ($\mu\text{g/g}$ de coquille ; moyenne \pm ET, $n=8$) mesurées au niveau du reste des tissus mous (pas la glande digestive) des dreissènes exposées pendant 1 à 6 mois sur les différentes stations du BV de la Vesle. A : Zinc et Plomb ; B : Nickel et Cuivre.

2.4.2 Bioaccumulation des HAP (en Seine)

En comparant chacun des sites à la même date, Marnay apparaît comme le moins contaminé et Bougival comme étant le plus contaminé (excepté pour le mois de février et mars pour lesquels la contamination est supérieure à Triel). Comme pour les métaux, une fois l'ensemble des échantillons analysés, l'interprétation du lien entre la bioaccumulation des HAP par la dreissène et la contamination des sites devra être faite dans le contexte du modèle biodynamique.

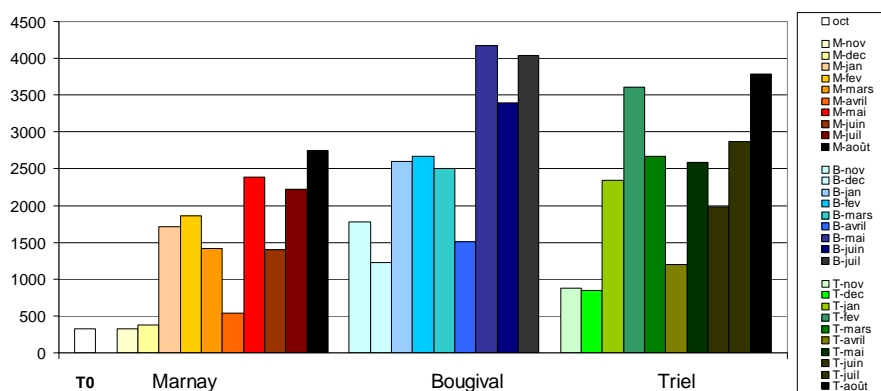


Figure 11: Concentration en Σ HAP dans les tissus de dreissène (ng/g poids sec) à Marnay (ton orangé), Bougival (ton bleu) et Triel (ton vert). Une barre d'histogramme correspond à un mois. T0, en blanc, représente octobre 2008

2.5 Marqueurs biochimiques

Concernant les marqueurs biochimiques, l'acquisition des données est encore trop partielle pour une présentation de l'ensemble des résultats. Nous nous focalisons ici sur la réponse en lien avec les teneurs métalliques sur les échantillons de la Vesle.

Les teneurs en métallothionéines (MT) mesurées au niveau des organismes exposés de décembre à juin sur les différents sites de la Vesle sont présentées sur la Figure 12A et la Figure 12B. De façon générale, les résultats exprimés en fonction du poids des tissus indiquent une tendance à l'augmentation des teneurs au cours des premiers mois (décembre à mars) puis une tendance à la diminution pour les mois suivants (avril à juin). Ces variations temporelles peuvent être liées à une fluctuation du poids de l'organe (IC, IHS) mais également à une demande en éléments essentiels disponibles variable en fonction du stade du cycle de reproduction (Geffard et al., 2001; Geffard et al., 2002). Les résultats de la charge en MT exprimée en fonction du poids des tissus ne présentent pas de différence intersites. Comme pour la charge métallique, la charge en MT d'un organisme est soumise, non seulement au facteur de contamination, mais également à l'influence de facteurs biotiques (poids, reproduction...). Dans le cadre de notre étude, la diminution potentielle des teneurs en MT liées au phénomène de dilution biologique ne semble possible que pour les individus des sites aval et non pour ceux des sites amont (cf variations IC, IGS). Dans ces conditions, la comparaison des teneurs en MT, sur la base du poids frais des tissus considérés, entre les individus des sites amont et aval ne reflète pas la seule différence de pression en contaminants entre ces stations.

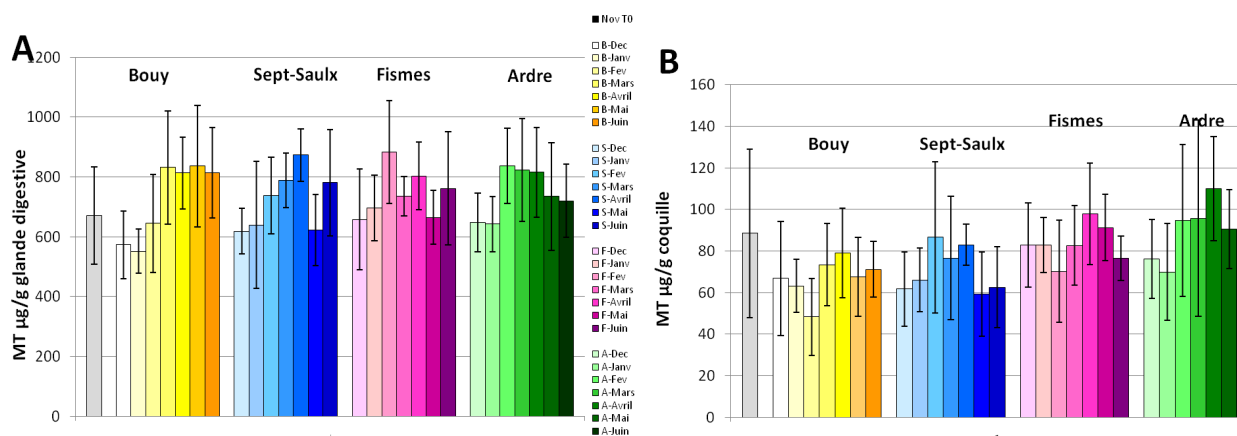


Figure 12. Teneurs en métallothionéines (MT) mesurées chaque mois (moyenne \pm ET ; n = 8) au niveau de la glande digestive des dreissènes exposées sur les différents sites du bassin versant de la Vesle entre 1 et 6 mois. A : résultats exprimés en fonction du poids frais de la glande ; B : résultats exprimés en fonction du poids de la coquille.

Pour tenter à nouveau de palier au risque de dilution biologique possible chez les organismes situés sur les sites aval (degré d'exposition métallique supérieur, mais aussi augmentation de IC et IHS en période de gamétogénèse) par rapport aux individus des sites amont (pas d'exposition métallique importante et pas de fluctuation des indices, IC et IHS) nous avons également exprimés la charge corporelle en MT en fonction d'une variable indépendante (poids de coquille, Figure 12B). Il est à nouveau observé une variation temporelle sur les différents sites mais l'information nouvelle réside d'avantage dans une discrimination entre les individus des sites amont et ceux des sites aval. En effet nous observons des teneurs moyennes sur la période d'étude de 67 ± 9 et 71 ± 11 μg MT/g de coquille pour les sites amont de Bouy et Sept-Saulx respectivement et de 84 ± 9 et 89 ± 13 μg MT/g de coquille pour les sites aval de Fismes et Ardre respectivement.

En tant que marqueur d'exposition métallique, il est important de définir s'il existe une relation positive et significative entre la charge métallique et la charge en MT des individus. Etant donné le rôle de la MT dans l'homéostasie des éléments essentiels (Zn, Cu, Ni) et la capacité de détoxification par chélation des éléments non essentiels, notamment le Cd dans notre cas, nous nous sommes intéressés à la relation entre la charge métallique globale des individus (Zn+Cu+Ni+Cd) et leur charge en MT. Dans ces relations nous n'avons pas considéré le Pb. Les effets toxiques du Pb sont connus, et donc la traduction d'une disponibilité en cet élément par l'imprégnation au sein des organismes est une source importante d'information. Par contre les données existantes sur cet élément chez les invertébrés indiquent qu'il y a quasiment une absence de cet élément au niveau de la fraction cytosolique ainsi qu'au niveau de la MT (Geffard et al., 2007; Geffard et al., 2010). Les relations entre la charge métallique globale des individus et leurs teneurs en MT sont présentées dans la Figure 13. L'information importante de ces résultats est l'absence de relation entre ces paramètres lorsqu'ils sont exprimés par rapport au poids des tissus mous considérés (Figure 13A). Par contre, lorsque l'on exprime les résultats vis-à-vis d'une variable indépendante, le poids de la coquille, nous observons une relation positive et hautement significative entre la charge métallique des individus et la charge en MT au niveau de la glande digestive (Figure 13B). Ces mêmes relations sont observées pour chacun des mois pris séparément (non montrés).

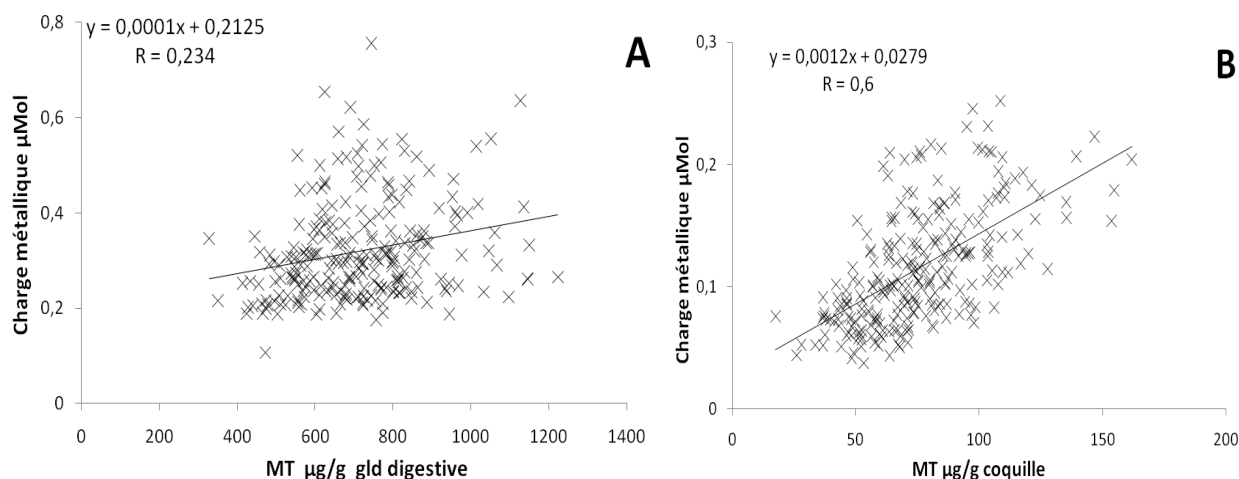


Figure 13 : Relation entre la charge métallique totale (Zn+Cu+Ni+Cd) mesurée au niveau des restes de tissus mous des dreissènes et la teneur en MT mesurée au niveau de la glande digestive. A : résultats exprimés en fonction du poids des tissus mous concernés ; B : résultats exprimés en fonction du poids de la coquille.

2.6 Biomarqueurs de génotoxicité

L'indice de condition a été mesuré sur les moules qui ont été engagées pour l'étude des biomarqueurs de génotoxicité. Il est resté stable au cours de l'exposition (non montré). La différence avec l'indice de condition des dreissènes utilisées pour la bioaccumulation est peut-être due à la taille initiale, en rapport direct avec l'âge des organismes, les dreissènes utilisées pour la génotoxicité étant plus grosses et plus vieilles.

Les résultats présentés sur les Figure 14 et Figure 15 montrent que les moules transplantées sur le site de Marnay ont moins de dommages à l'ADN et de dommages chromosomiques que les moules présentes sur les deux autres sites, situés plus en aval, et cela quelle que soit la saison.

En ce qui concerne les saisons, les résultats du test comète montrent qu'en janvier, les moules ont un faible taux de dommages à l'ADN. En hiver, les températures de l'eau sont basses (5°C) ce qui se traduit par un taux de filtration relativement bas (≈ 62 ml/dreissène/h). Ce faible taux de filtration pourrait entraîner une diminution de l'exposition aux micro-polluants et donc une génotoxicité plus faible. La forte augmentation de la génotoxicité observée en avril, pourrait être liée à une augmentation du taux de filtration (62 à 130 ml/dreissène/h) en lien avec l'augmentation de la température de l'eau (15°C). En juin, le taux de dommages à l'ADN diminue tout en restant supérieur à celui du mois de janvier.

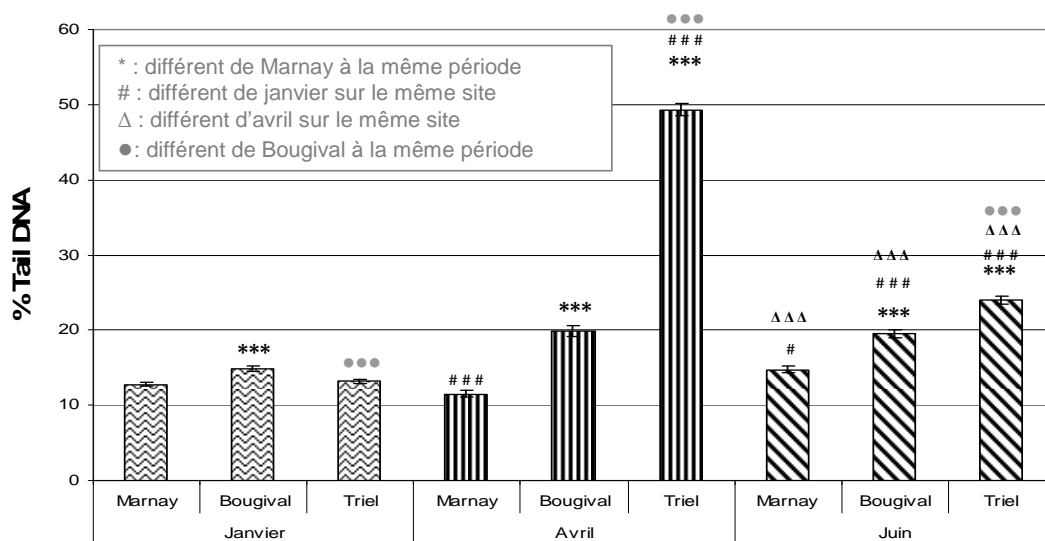


Figure 14 : Pourcentage d'ADN dans la queue des comètes des cellules de branchies de moules transplantées sur les trois sites de la Seine, prélevées à 3 saisons différentes (moyennes \pm SE)

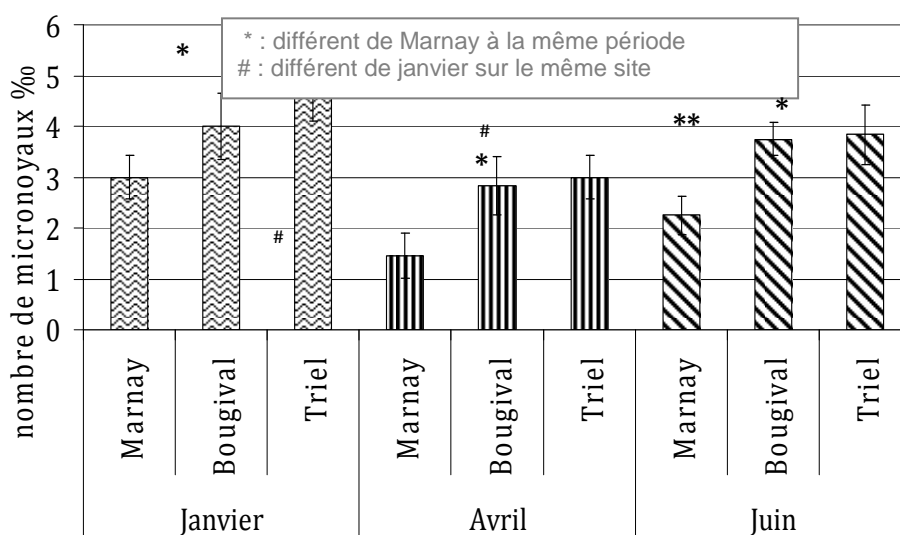


Figure 15: Fréquence des micronoyaux dans les cellules des branchies de moules transplantées sur les trois sites de la Seine, prélevées à 3 saisons différentes (moyennes \pm SE)

Conclusion

Les résultats présentés dans ce rapport constituent une partie seulement de l'ensemble des données issues du travail de terrain mené en 2009. Bien que parcellaire, quelques premiers résultats peuvent être dégagés, qu'il conviendra de confirmer et de confronter une fois l'ensemble des données acquises. De plus, lorsque l'ensemble des résultats seront disponibles, une comparaison plus précise pourra être abordée entre les stations des deux structures hydriques, bassin versant de la Vesle et Seine.

Le suivi saisonnier nous montre que la réponse génotoxique est faible lorsque la température de l'eau est faible (5°C). Au printemps, avec l'augmentation de la température et donc du taux de filtration, la réponse génotoxique augmente suite, probablement, à une plus forte exposition aux micro-polluants. Une augmentation de la réponse génotoxique à l'aval de la Seine a été observée.

L'influence de la reproduction comme facteur confondant semble plus importante pour l'expression des résultats biochimiques (MT) que pour les teneurs métalliques. Cependant, pour valider totalement nos observations, nous devons prendre en compte l'ensemble des résultats sur une année d'étude et quantifier la charge métallique au plus près de la quantification de la MT, c'est-à-dire dans la glande digestive (une fraction de l'organe a été conservée à cet effet).

La bioaccumulation ne reflète pas directement la contamination du milieu. Comme pour l'expérience menés en 2008 sur le bassin versant de l'Orge, la prise en compte de la physiologie des dreissènes (croissance, taux de filtration, ponte...) sera nécessaire pour comprendre le lien entre la contamination des sites et celle des organismes transplantés.

Bibliographie

- Bardet C., Rouxel-David E., Auguste G., Cordonnier G., Dachy S. 2005. Synthèse des études menées sur le bassin versant du champ captant (Reims, Marne), 2002-2004. rapport BRGM FREDONA. http://europolagro.univ-reims.fr/garde_couraux.pdf.
- Bervoets L., Voets J., Chu S., Covaci A., Schepens P., Blust R., 2004. Comparison of accumulation of micropollutants between indigenous and transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1973-1983.
- Bligh E. G., Dyer W. J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* 37, 911-917.
- Bolognesi C., Buschini A., Branchi E., Carboni P., Furlini M., Martino A., Monteverde M., Poli P., Rossi C., 2004. Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. *Science of The Total Environment* 333, 127-136.
- Bourgeault A., Gourlay-Francé C., Vincent-Huubert F., Palais F., Geffard A., Biagiante-Risbourg S., Pain-Devin S., Tusseau-Vuillemin M. H., in press. Lessons from a transplantation of zebra mussels in a small urban river : an integrated ecotoxicological assessment. *Environmental Toxicology*.
- Bourgeault A., Palais F., Arini A., Biagiante-Risbourg S., Geffard A., Gourlay-Francé C., Pain-Devin S., Uher E., Vincent-Huubert F., 2009a. Impact du milieu urbain sur un organisme modèle : réponses biologiques chez les dreissènes transplantées dans le bassin de l'Orge. Rapport annuel d'activité du PIREN-Seine 2008.
- Bourgeault A., Pellet B. J., Gourlay-Francé C., Ayrault S., Tusseau-Vuillemin M. H., 2009b. Facteurs de contrôle de la bioaccumulation de métaux traces (Cadmium et Cuivre) dans deux organismes modèles. Rapport annuel d'activité du PIREN-Seine 2008.
- Geffard A., Amiard-Triquet C., Amiard J.-C., Mouneurac C., 2001. Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters *Crassostrea gigas* from a clean and a metal-rich sites. *Biomarkers* 6, 91-107.
- Geffard A., Amiard J.-C., Amiard-Triquet C., 2002. Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker : seasonal and intersite fluctuations. *Biomarkers* 7, 123-137.
- Geffard A., Jeantet A., Amiard J.-C., Le Pennec M., Ballan Dufrançais C., Amiard-Triquet C., 2004. Comparative study of metal handling strategies in bivalves *Mytilus edulis* and *Crassostrea gigas*: a multidisciplinary approach. *J. Mar. Biol. Ass. UK*. 84, 641-650.

- Geffard A., Quéau H., Dedourge O., Biagianti-Risboug S., Geffard O., 2007. Influence of biotic and abiotic factors on metallothionein level in *Gammarus pulex*. . *Comp. Biochem. Physiol.* 145C, 631-640.
- Geffard A., Sartelet S., Garric J., Biagianti-Risboug S., Delahaut L., Geffard O., 2010. Subcellular compartmentalization of cadmium, nickel and lead in *Gammarus fossarum*: comparison of methods. *Chemosphere* 78, 822-829.
- Luoma S. N., Rainbow P. S., 2005. Why is metal bioaccumulation fo variable ? *Biodynamics as a unifying concept. Environmental Science and Technology* 39, 1921-1931.
- Palais F., Jubeaux G., Dedourge-Geffard O., Biagianti-Risbourg S., Geffard A., sous presse. Studies of amyolytic and cellulolytic activities in the cristalline style and the diverticule gland of the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771). *Molluscan Research*.
- Palais F., Pain-Devin S., Jubeaux G., Dedourge-Geffard O., Geffard A. 2008. Mise en place des biomarqueurs d'effets sur le métabolisme digestif et sur le cycle reproducteur de la dreissène. Rapport d'activité du PIREN-Seine 2007.
- Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184-191.
- Tusseau-Vuillemin M. H., Gourlay C., Lorgeoux C., Mouchel J. M., Buzier R., Gilbin R., Seidel J. L., Elbaz-Poulichet F., 2007. Dissolved and bioavailable contaminants in the Seine river basin. *Science of the Total Environment* 375, 244-256.
- Vincent-Hubert F., Palais F, Arini A., Biagianti-Risboug S., Dedourge-Geffard O., Geffard A., 2009. Développement de réponses du métabolisme digestif et de génotoxicité chez la dreissène: validation en laboratoire par des contaminants modèles. Rapport annuel d'activité du PIREN-Seine 2008.