

## Diagnostic du risque écotoxicologique au niveau du bassin de la Seine

Marc Bonnard<sup>1\*</sup>, Fulvia Baratelli<sup>2</sup>, Iris Barjhoux<sup>1</sup>, Marc Benedetti<sup>3</sup>, Nicolas Berthelot<sup>1</sup>, Aurélie Bigot-Clivot<sup>1</sup>, Hélène Budzinski<sup>4</sup>, Elise David<sup>1</sup>, Julie Do Nascimento<sup>1</sup>, Sabrina Guérin<sup>5</sup>, P. Labadie<sup>4</sup>, Mélissa Palos-Ladeiro<sup>1</sup>, Robin Richoux<sup>5</sup>, Vincent Rocher<sup>5</sup> & Alain Geffard<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université de Reims Champagne-Ardenne, UMR-I 02 SEBIO, Reims

<sup>2</sup> Sorbonne Université, UMR Metis 7619, Paris

<sup>3</sup> Université de Paris, Institut de physique du globe de Paris, CNRS, IGN, Paris

<sup>4</sup> CNRS/Université de Bordeaux, UMR 5805 EPOC, Bordeaux

<sup>5</sup> SIAAP- Direction Innovation, Colombes

\* marc.bonnard@univ-reims.fr

### Résumé

*Entre novembre et décembre 2020, des dreissènes provenant d'une population contrôlée (Lac du Der-51) ont été encagées durant trois semaines sur cinq sites pilotes (Champigny-sur-Marne, Choisy-le-Roi, Bougival, Triel-sur-Seine et Conflans-Sainte-Honorine), du réseau de surveillance de l'axe Seine et de ses affluents (Marne, Oise) (Réseau MeSeine et PIREN-Seine). Avec l'utilisation de la dreissène comme espèce intégratrice de la contamination, l'objectif est de proposer une évaluation globale de la qualité chimique et sanitaire des masses d'eau ainsi qu'un diagnostic du risque écotoxicologique par la mesure conjointe de biomarqueurs de génotoxicité et d'immunotoxicité au niveau des hémocytes. Les premiers résultats montrent un gradient amont-aval de génotoxicité et d'immunotoxicité, en particulier avec la mesure des cassures de brins de l'ADN et de l'avidité cellulaire. L'ensemble des réponses biologiques mesurées sur les hémocytes sera par la suite intégré au sein d'un indice unique et mis en relation, dans le cadre de cette étude et lors de prochaines campagnes terrain, avec le niveau d'imprégnation des dreissènes en contaminants (in)organiques (mesure des composés perfluoraalkylés, chloroalcanes et nanoparticules) et biologiques (mesure de la charge en protozoaires *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* et de la charge en virus bactériophages ARN-F spécifiques) permettant ainsi le diagnostic chimique et sanitaire des masses d'eaux.*

### Points clefs

- ✓ Intérêt des hémocytes de la dreissène pour le diagnostic de l'écotoxicité en lien avec la contamination des masses d'eau.
- ✓ Gradient amont-aval de génotoxicité et immunotoxicité environnementale mis en évidence par la mesure des cassures à l'ADN et de l'avidité cellulaire.
- ✓ Développement de la mesure de la longueur des télomères par qPCR chez la dreissène.

## Abstract

Between november and december 2020, zebra mussels coming from a control population (Lac du Der-51) were engaged for three weeks on five *pilot sites* (*Champigny-sur-Marne, Choisy-le-Roi, Bougival, Triel-sur-Seine and Conflans-Saint-Honorine*) along the *Seine* river and its tributaries (*Marne, Oise*) (belonging to the *Réseau MeSeine and PIREN-Seine*). With the use of the zebra mussel as sentinel species, the objectives of the present study are to propose a global evaluation of chemical and sanitary properties of waters, as well as a diagnosis of ecotoxicity associated with the water contamination, by the joined measures of genotoxicity and immunotoxicity biomarkers on hemocytes. First results highlighted an upstream-downstream gradient of genotoxicity and immunotoxicity, particularly with the measures of DNA strand breaks and cellular avidity. The global responses measured on hemocytes will be integrated into a unique index and related, in the present study and the next, with the impregnation of zebra mussels in chemicals (measures of perfluoroalkyl acids, chloroalkanes and nanoparticles in soft tissues) and biological contaminants (measures of three pathogenic protozoa - *Toxoplasma gondii, Cryptosporidium parvum and Giardia duodenalis* and RNA-F specific bacteriophages) for the chemical and sanitary diagnosis of water bodies.

## Key points

- ✓ Interest of hemocytes from zebra mussels for the diagnosis of ecotoxicity linked to the contamination of continental waters
- ✓ Upstream-downstream gradient regarding the genotoxicity and immunotoxicity of water contaminants, with the joined measures of DNA strand breaks and cellular avidity
- ✓ Development of the measure of telomere length by qPCR in zebra mussels

## Introduction

L'utilisation du biote pour la caractérisation des masses d'eau représente une opportunité non seulement pour la définition d'outils basés sur les effets biologiques (biomarqueurs), mais également comme matrice supplémentaire aux eaux/sédiments pour la surveillance chimique et sanitaire des milieux aquatiques, définie dans le cadre de la Directive Cadre Européenne sur l'eau (ex. de l'établissement de NQE biote) (directive 2000/60/CE). Parmi les organismes d'intérêt pour l'évaluation de la qualité des masses d'eau continentales figure la moule zébrée, communément appelée dreissène (Pallas, 1771) (Binelli et al., 2015). Comme tout mollusque bivalve, la dreissène est une espèce sessile qui possède une forte capacité de filtration et de bioaccumulation de contaminants, reflétant ainsi le degré de contamination chimique et/ou biologique des milieux qu'elle occupe. En raison de sa taille limitée (quelques cm) et de sa capacité d'acclimatation, la dreissène est un organisme facilement transposable sur le terrain via notamment des approches d'encagement (*caging*) et est en cela idéale pour caractériser l'état écotoxicologique des masses d'eau.

De nombreuses recherches portent aujourd'hui sur les réponses biologiques mesurées à des niveaux d'organisation (sub)individuels, de la molécule à l'individu, regroupées sous le terme générique de biomarqueurs. Ces réponses à plus faibles échelons biologiques s'expriment plus rapidement et peuvent être spécifiques de voies de toxicité, de sorte qu'ils sont considérés comme des signaux précoces d'une dégradation du milieu. Afin d'avoir une vue de l'ensemble des interactions entre les contaminants du milieu et les réponses biologiques, il est recommandé d'utiliser une approche multi-marqueurs intégrant aussi bien des biomarqueurs d'intégrité que des biomarqueurs de fonctionnalité. En ce sens, les hémocytes, cellules circulantes de l'hémolymphe, représentent des modèles cellulaires pertinents car ils permettent de mesurer différentes réponses impliquées dans les processus physiologiques couramment étudiés en écotoxicologie. Considéré comme l'une des premières lignes de défense de l'organisme, après la barrière physique de la coquille, ce type cellulaire est pertinent pour mettre en évidence la bioaccumulation de contaminants biologiques, chimiques et même l'accumulation de nanoparticules par les bivalves (Tran et al., 2008 ; Palos Ladeiro et al., 2015 ; Rocha

et al., 2015), mais également pour mesurer les réponses biologiques associées utilisées en tant que biomarqueurs (Auffret et al., 2006). De plus, l'hémolymphe représente un tissu intéressant dans les approches écotoxicologiques car il regroupe plusieurs avantages tels que i) le caractère non invasif du prélèvement, ii) le traitement de l'échantillon aisé car directement accessible, iii) son rôle central dans l'état de santé des organismes, iv) puisque tous les organes baignent dans l'hémolymphe, les réponses associées sont intégratives de l'individu.

Dans le cadre de la précédente phase du programme PIREN-Seine, nos travaux ont montré la pertinence des hémocytes pour mettre en évidence le caractère génotoxique et immunotoxique des contaminants environnementaux, en couplant la mesure des cassures à l'ADN par le test des comètes (Bonnard et al., 2019) à la mesure par cytométrie en flux de fonctionnalités hémocytaires, telles que la capacité et l'efficacité de la phagocytose, qui sont particulièrement pertinentes dans l'évaluation des risques immunotoxiques (Palos-Ladeiro et al., 2017). Grâce aux différentes campagnes *in situ* menées sur plusieurs sites et plusieurs temps d'exposition, les méthodologies ont pu être optimisées, miniaturisées et valorisées autour de la cellule hémocytaire dans le but de travailler à l'échelle individuelle et de mesurer sur le même échantillon un ensemble de biomarqueurs en lien avec la mise en évidence des effets génotoxiques et immunotoxiques. Sur la base de ces avancées, il est proposé d'approfondir la base de données autour du développement de biomarqueurs hémocytaires de la dreissène.

Ce rapport présentera ainsi les résultats d'écotoxicité obtenus à l'issue d'une campagne de transplantation de dreissènes qui a été réalisée entre novembre et décembre 2020 sur cinq sites ateliers le long de l'axe Seine et de ses affluents (Marne, Oise) suivant un gradient amont-aval : Champigny-sur-Marne, Choisy-le-Roi, Bougival, Triel-sur-Seine et Conflans-Sainte-Honorine. Ces sites ont été définis en lien avec le PIREN-Seine et le réseau de surveillance MeSeine. Il est proposé de poursuivre ces campagnes de transplantation pour 2021 et à la suite du programme PIREN-Seine phase 8, afin d'avoir un jeu de données suffisant permettant d'intégrer par la suite tout ou partie de ces biomarqueurs hémocytaires au sein d'un indice global « hémocytes » utile en biosurveillance environnementale. Cet indice intégrateur permettra d'améliorer notre compréhension des relations existantes entre les marqueurs d'intégrité et de fonctionnalité ainsi que leur complémentarité. Cependant, quelques verrous restent encore à lever afin de réaliser une bonne interprétation des mesures cellulaires. En ce sens, des efforts ont été entrepris au premier semestre 2021 dans le cadre du stage de Master 2 RE-BSE de l'URCA de Mr N. Berthelot pour développer la mesure des télomères, apportant une information essentielle sur « l'âge » des tissus biologiques, supports du développement de nos marqueurs.

## 1. Matériel et Méthodes

### 1.1. Transplantation des dreissènes

Les dreissènes utilisées dans le cadre de cette étude sont issues d'une même population provenant d'un site de référence (Lac du Der - 51). Cette population est suivie depuis plusieurs années par l'UMR-I 02 SEBIO dans le cadre de ses activités de recherche. Après avoir été calibrées en laboratoire (longueur comprise entre 20 et 25 mm) et réparties en différents lots ou cages de 150 individus, les dreissènes ont été transplantées (17 et 18 novembre 2020), et récupérées trois semaines après (08 et 09 décembre 2020), sur cinq sites ateliers le long de l'axe Seine et de ses affluents (Marne, Oise) suivant un gradient amont-aval : Champigny-sur-Marne (02°30'27.1764" E, 48°48'36.6480" N), Choisy-le-Roi (02°24'44.3340" E, 48°46'09.3972" N), Bougival (02°07'47.0" E, 48°52'11.2" N), Triel-sur-Seine (01°59'53.1" E, 48°58'55.5" N) et Conflans-Sainte-Honorine (02°04'20.0676" E, 48°59'19.4460" N) (Fig. 1).



Figure 1. Cartographie des sites d'étude (Crédit : Rapport de stage de Master 2, N. Berthelot) et dispositifs d'encagement des dreissènes (Crédit : Photographie de F. Baratelli, PIREN-Seine).

Les dreissènes ont été rapportées au laboratoire et stabulées dans l'eau du site sous oxygénation et en chambre thermostatée suivant la température du milieu, jusqu'au traitement des échantillons biologiques le lendemain (partie 1.3.).

## 1.2. Mesure des paramètres thermiques et physico-chimiques de l'eau au niveau des sites

La mise en place de *logger* sur les cages de dreissènes a permis une analyse toutes les heures de la température de l'eau des sites, soit plus de 500 mesures pendant la période de transplantation. Un même profil de diminution saisonnière de la température de l'eau (perte de l'ordre de 6°C entre le début et la fin des encagements) est observé quel que soit le site d'étude. Une température de l'eau légèrement supérieure de l'ordre de + 1°C peut être notée à Bougival (gris) et Triel-sur-Seine (jaune) en comparaison des trois autres sites d'étude (Fig. 2A).

En parallèle, différents paramètres physico-chimiques des eaux (MES, DBO5, DCO, NTK, NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, P total, pH, conductivité, COD, PO<sub>4</sub>, saturation en O<sub>2</sub>) ont été mesurées dans le cadre du réseau MeSeine à une fréquence hebdomadaire pendant la période de transplantation des dreissènes. L'ensemble des analyses est réalisé par le laboratoire SIAAP accrédité COFRAC (n° accréditation 1-1452) selon les normes indiquées par le tableau 1 ci-dessous. L'analyse multivariée en composantes principales (ACP) montre une bonne projection des sites d'étude suivant les deux axes principaux de l'ACP (représentativité de plus de 77% - Fig. 2B). Aucune différence notable des paramètres physico-chimiques n'est à noter entre les sites d'étude, bien que la station de Poissy (point de mesure le plus proche de Triel-sur-Seine) ait tendance à montrer des valeurs supérieures en azote et phosphore par rapport aux autres sites (Fig. 2C).

Tableau 1. Tableau d'analyse des paramètres physico-chimiques des eaux.

Paramètre	Unité	Méthode analytique	Limite de quantification
DBO <sub>5</sub>	mg O <sub>2</sub> /L	NF EN 1899-2	0,5 mg/L
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L	NF EN ISO 15681-2	0,02 mg/L
Phosphore total	mg P/L	NF EN ISO 6878 adaptée	0,01 mg/L
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L	NF EN ISO 11732	0,01 mg/L
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /L	NF EN ISO 10304-1	0,01 mg/L
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L	NF EN ISO 10304-1	0,5 mg/L
pH	pH	NF EN ISO 10523	-
Conductivité	mS / m	NF EN 27888	-
MES	mg/L	NF EN 872	2 mg/L
NTK	mg N/L	Méthode interne SIAAP_MOP_00007	0,5 mg/L
Oxygène dissous	mg O <sub>2</sub> /L	NF ISO 17289	-
Température	°C	Méthode interne SIAAP_MOP_00044	-

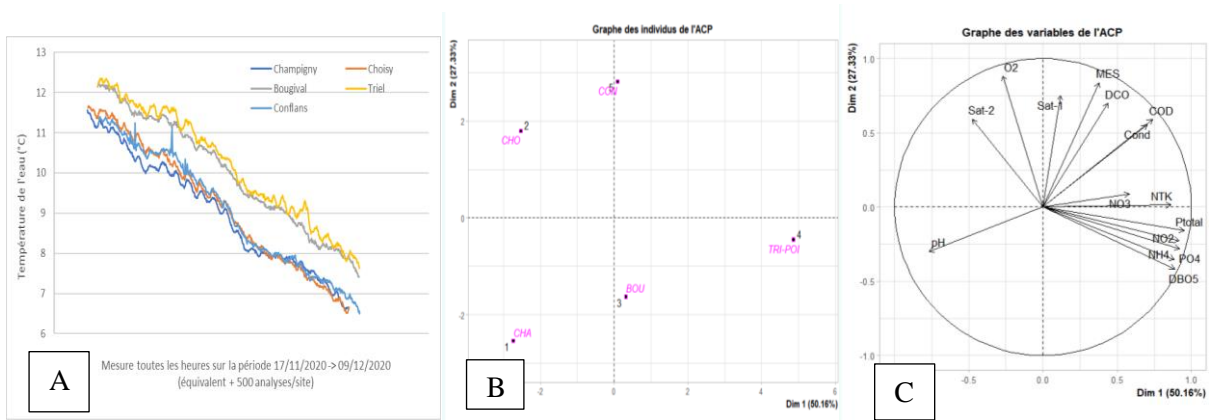


Figure 2. Données de température (2A) et des paramètres physico-chimiques de l'eau des sites (représentation des projections et du cercle des corrélations de l'ACP, 2B et 2C), mesurées pendant la période de transplantation des dreissènes.

Les paramètres physico-chimiques du milieu pourront également être mis en relation avec les mesures effectuées par les collègues du PIREN-Seine impliqués dans les autres actions du bloc 5, et ayant participé à cette campagne de terrain 2020. Ces actions sont focalisées sur les deux sites de Bougival et Triel-sur-Seine, ainsi que sur deux autres sites atelier : Marnay-sur-Seine et Poses. Ces études peuvent être regroupées essentiellement sous les thèmes suivants :

- L'analyse des micropolluants et la recherche de nouveaux contaminants à travers des échantillonnages ponctuels ainsi que des échantillonnages passifs (feuilles de silicone et POCIS) pour intégrer temporellement la contamination de la colonne d'eau ;
- L'analyse de la qualité de la matière organique dans la colonne d'eau par fluorescence 3D afin de déterminer ses différentes sources et sa variabilité spatio-temporelle ;
- L'analyse des biofilms et leur contribution aux flux de polluants métalliques ou organiques dans la colonne d'eau, leur rôle dans la transformation/dégradation des polluants organiques ou de la matière organique, la caractérisation de la qualité de la matière organique dissoute et particulaire dans les biofilms et la comparaison avec celle dans la colonne d'eau.

### 1.3. Mesure des paramètres biotiques des dreissènes

En amont de l'acquisition des paramètres hématocytaires, la mortalité des dreissènes ainsi que l'indice de condition correspondant au rapport de la « biomasse des tissus mous » sur la « biomasse entière de la dreissène » (n = 20) ont été mesurés sur chacun des sites. Ces paramètres individuels (survie, indice de condition) sont importants à prendre en considération quant à leur incidence possible sur la réponse fournie par les biomarqueurs mesurés au niveau sub-individuel (hématocytes) et/ou le niveau d'imprégnation des dreissènes en contaminants chimiques ou biologiques.

Le prélèvement dans le muscle adducteur de l'hémolymphe contenant les cellules circulantes, ou hématocytes, a ensuite été réalisé individuellement à l'aide d'une seringue de 0.5 mL. La perméabilité membranaire (*mortalité*) ainsi que la concentration totale en hématocytes (*Total Hemocyte Count*) sont mesurées par cytométrie en flux au niveau de la région d'intérêt cellulaire définie par les paramètres de taille et de complexité des événements. Après marquage des cellules à des fluorochromes spécifiques (*i.e.* hoechst 33342 et iodure de propidium), les échantillons sont sélectionnés afin de mesurer les marqueurs de génotoxicité et d'immunotoxicité (n = 10) sur le même prélèvement.

#### 1.3.1. Mesure des cassures de brins et lésions oxydatives de l'ADN par le test des comètes comme biomarqueurs de génotoxicité

L'échantillon d'hémolymphe prélevé est maintenu dans un milieu de conservation des cellules (milieu L15-15%) au froid (4°C) et à l'obscurité/sous lumière inactinique pendant toute la durée du test des comètes. Brièvement, après rétablissement de leur concentration cellulaire à  $5 \times 10^5$  cellules/mL, les hématocytes sont inclus dans un gel d'agarose bas point de fusion et coulés sur lame microscopique. Le protocole du test des comètes en condition alcaline permet de mettre en évidence le degré de cassures simple-brin (SSBs) et double-

brins (DSBs) de l'ADN et des sites alcali-labiles (ALS ; sites de l'ADN présentant une absence ou une modification des bases). L'échantillon biologique subit un traitement de lyse cellulaire durant 1 h à pH 10, suivie d'une dénaturation de l'ADN de 30 minutes à pH 13 et de la séparation par électrophorèse (20 V, 300 mA, 24 min) des fragments d'ADN endommagés du reste de l'ADN intact. Une étape de neutralisation (20 min) de l'ADN à pH 7.5 et de déshydratation (10 min) finit le protocole du test des comètes. Les nucléoïdes ainsi obtenus sont colorés à l'aide d'un fluorochrome spécifique (SYBR green 1X) et l'analyse des dommages se fait grâce au logiciel Comet assay IV de *Perceptive Instruments*. Cent nucléoïdes par gel et deux gels/dreissène (n = 10 dreissènes/site) sont analysés. Le paramètre % *Tail Intensity* (% TI) correspondant au pourcentage d'ADN endommagé est le paramètre recommandé pour exprimer les dommages à l'ADN.

En complément, une variante du test des comètes (*Fpg-modified comet assay*) a été réalisée sur les mêmes échantillons (duplicat) avec un traitement supplémentaire des nucléoïdes obtenus à l'issue de l'étape de lyse cellulaire à l'action de l'enzyme *Formamidopyrimidine ADN-glycosylase* (traitement de 30 min, à 37°C, et à 1U Fpg/mL). Cette enzyme, impliquée notamment dans les premières phases de la voie de réparation par excision de bases (voie BER ou *Base Excision Repair*) permet de reconnaître un large spectre de lésions oxydatives de l'ADN (*Fpg-sensitive sites* telles que les purines oxydées, fapy-guanines, -adénines, etc.) et de générer des cassures supplémentaires en comparaison de la version standard du test des comètes.

### 1.3.2. Mesure des marqueurs en lien avec l'immunité

À la suite du prélèvement de l'hémolymphe, différents paramètres cellulaires en lien avec l'immunité ont été évalués. Grâce à différents marqueurs ciblant une réponse biologique particulière, l'ensemble des paramètres a été mesuré à l'échelle individuelle grâce au protocole de triple marquage décrit dans Barjhoux et al. (2020). Brièvement, 10<sup>5</sup> cellules issues des différents sites ont été mises en contact avec des billes de latex fluorescentes de 2 µm, à raison de 100 billes pour 1 cellule durant 4h d'exposition *ex vivo* à 16°C. Les cellules ont ensuite été décollées avec de la Trypsine-EDTA 0,25X afin de remettre les cellules en suspension avant le passage au cytomètre. Les échantillons ont été marqués avec i) du Hoechst 33342 (intercalant à l'ADN des cellules vivantes et mortes) ainsi qu'avec ii) de l'iodure de propidium (IP - marqueur de perméabilité membranaire) afin de mesurer simultanément les réponses de mortalité cellulaire (T4h) et de phagocytose. Concernant ce dernier point, nous distinguerons les réponses caractérisant :

- la capacité de phagocytose qui représente le pourcentage de cellules ayant internalisé au moins une bille ;
- l'efficacité de phagocytose qui correspond au pourcentage de cellules ayant phagocyté au minimum 3 billes ;
- l'avidité cellulaire correspondant au nombre moyen de billes phagocytées pour une cellule.

L'ensemble des mesures, mortalité et indicateurs de phagocytose cités ci-dessus, sont effectuées sur 10 000 événements cellulaires (positifs au Hoechst 33342). L'analyse des résultats est réalisée à l'aide du logiciel BD Accuri C6.

## 1.4. Mesure de l'imprégnation des dreissènes pour l'évaluation du risque chimique et sanitaire des masses d'eaux

### 1.4.1. Mesure de la teneur interne en contaminants chimiques émergents

Ces analyses sont réalisées par les collègues du PIREN-Seine (EPOC et IPGP) et sont à mettre en relation avec leurs actions respectives (actions 5.3.2 et 5.1.2). Pour la détection et la quantification i) des composés perfluoroalkylés et des chloroalcanes, et ii) des nanophases de titane au sein des tissus mous des dreissènes, 5 g et 1,5 g de poids frais de dreissènes respectivement ont été préparés, congelés à -20°C puis envoyés aux partenaires. Du fait du contexte lié à la crise sanitaire qui a fortement impacté les activités d'analyse et d'acquisition de données, les analyses de micropolluants organiques seront réalisées en 2022 pour les deux premières campagnes, traitées conjointement selon des méthodologies précédemment établies au laboratoire (Labadie et al., 2019 ; Simonnet-Laprade et al., 2019). Les teneurs déterminées dans les dreissènes seront confrontées aux teneurs déterminées dans les MES échantillonnées à l'aide de pièges à particules intégratifs.

Pour permettre la détection et la quantification des nanophases de Ti, des optimisations du protocole en lien notamment avec la digestion des tissus biologiques ont été réalisées dans un premier temps sur des

moules *tests* (moules du commerce). Les expérimentations ont permis d'optimiser la dégradation des tissus mous par une action combinée d'un traitement au peroxyde d'hydrogène (oxydation) et d'une exposition répétée aux UV, sans entraîner de perte notable de la quantité de nanophase. Les premiers résultats montrent d'ailleurs que de nombreuses nanophases de Ti ont pu être détectées dans les moules du commerce. Des derniers essais sont en cours en vue de déterminer le meilleur volume de peroxyde d'hydrogène en lien avec la biomasse de départ. Une fois les conditions optimales retenues et testées avec des nanophases de référence (nombre connu de particules et taille identifiée) pour démontrer la préservation des concentrations en nombre et en masse des objets, le protocole sera appliqué aux échantillons de dreissènes transplantées dans le cadre de cette étude. Les données seront ainsi comparées aux données acquises sur les eaux, pour la nature et la concentration des nanophases identifiées.

#### 1.4.2. Détection des protozoaires et des virus

La détection des protozoaires dans les tissus mous de dreissène ( $n = 10$  pools de 2 individus) est réalisée via la détection de l'ADN des micro-organismes. Dans un premier temps, les tissus sont broyés à l'aide d'un Potter et d'un piston en verre puis digérés dans de la trypsine 1x pendant 1h30 à 37°C sous agitation. L'ADN est extrait grâce au kit FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals). Les formes environnementales des protozoaires (oocystes et kystes) sont recherchées et quantifiées par PCR quantitative en temps réel TaqMan en ciblant, pour *Toxoplasma gondii*, un fragment de 529 pb répété plus de 200 fois dans le génome de *T. gondii* (Lélu et al., 2011), pour *Cryptosporidium parvum*, un fragment de 452 pb spécifique de la séquence génomique de *C. parvum* (Fontaine and Guillot, 2002) et pour *Giardia duodenalis* un fragment d'une petite sous-unité ribosomique (like-16S) (Verweij et al., 2003).

La détection et le dénombrement des bactériophages ARN-F spécifiques infectieux se fait selon la norme ISO 10705-1 (1995) dans les glandes digestives de dreissènes. Cette technique consiste à réaliser un titrage d'échantillons environnementaux pour connaître le nombre de phages infectieux par gramme d'échantillon. Dans un premier temps, les échantillons sont disséqués, pesés, broyés puis incubés pendant 4h dans de la glace, puis centrifugés pour en garder le surnageant. Au surnageant est ajouté un volume de culture bactérienne hôte *Salmonella typhimurium* WG49 (préalablement mises en culture) ainsi que de la gélose complémentée semi solide. Le tout est réparti sur une boîte de Pétri et est incubé pendant 18h à 37°C. Après l'incubation, des plages de lyse se forment et leur dénombrement indique le nombre de phages infectieux qui étaient présents dans l'échantillon. Le résultat est exprimé en UFP (unité formant plaque)/g de glande digestive. En raison d'un problème technique, l'analyse des bactériophages ARN-F spécifiques a dû être repoussée. Les échantillons récoltés lors de cette campagne 2020 seront analysés en même temps que ceux de la prochaine campagne terrain programmée en novembre-décembre 2021.

Les méthodologies et les résultats associés à l'imprégnation des dreissènes en contaminants chimiques et biologiques seront présentés dans le rapport d'activité 2022, et mis en regard des résultats d'écotoxicité obtenus.

## 2. Résultats

### 2.1. Mesure de la survie et de l'indice de condition chez les dreissènes transplantées

Après trois semaines d'encagement, aucune mortalité significative des dreissènes n'a été constatée quel que soit le site de transplantation, avec une mortalité individuelle inférieure à 4% (données non présentées). Avec un indice de condition des dreissènes compris en moyenne entre 0,14 et 0,16, aucun effet de la transplantation n'a été constaté chez les bivalves (en comparaison avec les données Der-T0) et ce quel que soit le site d'étude (ANOVA de Kruskal-Wallis,  $KW = 8,35$ ,  $df = 5$ ,  $p\text{-value} = 0,1378$ ) (Fig. 3). L'absence d'effet quant à la survie des dreissènes et à l'évolution de leur indice de condition témoignant d'un état physiologique des dreissènes « comparable », démontre l'opérationnalité du dispositif et du temps d'encagement de trois semaines en vue d'établir un diagnostic du risque écotoxicologique, chimique et sanitaire de la contamination des masses d'eau.



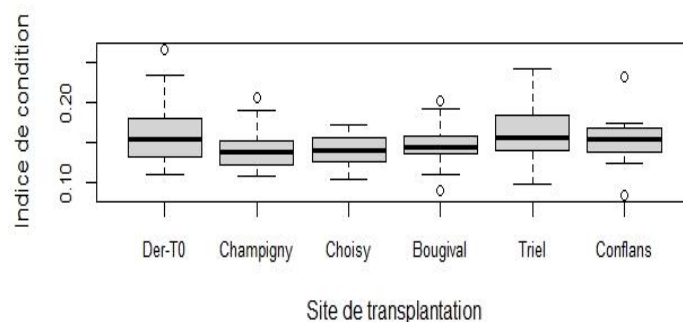


Figure 3. Représentation boxplot de l'Indice de condition (IC) des dreissènes avant et après la période de transplantation sur les sites d'étude.

## 2.2. Mesure des biomarqueurs de génotoxicité

L'analyse en cytométrie en flux de la perméabilité membranaire (*mortalité*) des hémocytes et de leur concentration sitôt le prélèvement des cellules (Tab. 2) peut être considérée comme un préalable à la mesure des marqueurs de génotoxicité, afin de s'assurer que les dommages à l'ADN mesurés par le test des comètes ne soient pas dus à un effet cytotoxique.

Tableau 2. Mesure de la perméabilité membranaire et de la concentration hémocytaire par cytométrie en flux après transplantation des dreissènes sur les sites d'étude.

Site de transplantation	Perméabilité membranaire (%) <i>Moyenne ± écart-type</i>	Concentration hémocytaire (x10 <sup>5</sup> cell./mL) <i>Moyenne ± écart-type</i>
<i>Champigny-sur-Marne</i>	7,07 ± 4,9	7,34 ± 3,6
<i>Choisy-le-Roi</i>	6,61 ± 2,8	9,36 ± 4,8
<i>Bougival</i>	7,99 ± 2,9	9,09 ± 4,2
<i>Triel-sur-Seine</i>	10,15 ± 4,4	6,19 ± 3,8
<i>Conflans-Sainte-Honorine</i>	7,31 ± 3,5	6,49 ± 3,7

L'analyse statistique n'a montré aucune différence significative du taux de perméabilité membranaire des hémocytes (ANOVA F = 2,025, df = 4, p-value = 0,1) entre les sites de transplantation, avec des niveaux inférieurs à 10-15% au niveau individuel validant ainsi la mesure des dommages à l'ADN (cassures, lésions oxydatives) par le test des comètes. Comme pour la perméabilité membranaire, l'analyse de la concentration en hémocytes dans l'échantillon (ANOVA F = 1,911, df = 4, p-value = 0,118) ne met pas en évidence d'effet « site ».

Concernant les paramètres de génotoxicité, les taux moyens de cassures de brins et du niveau d'oxydation des bases de l'ADN des hémocytes de dreissènes transplantées sont représentés (Fig. 4).



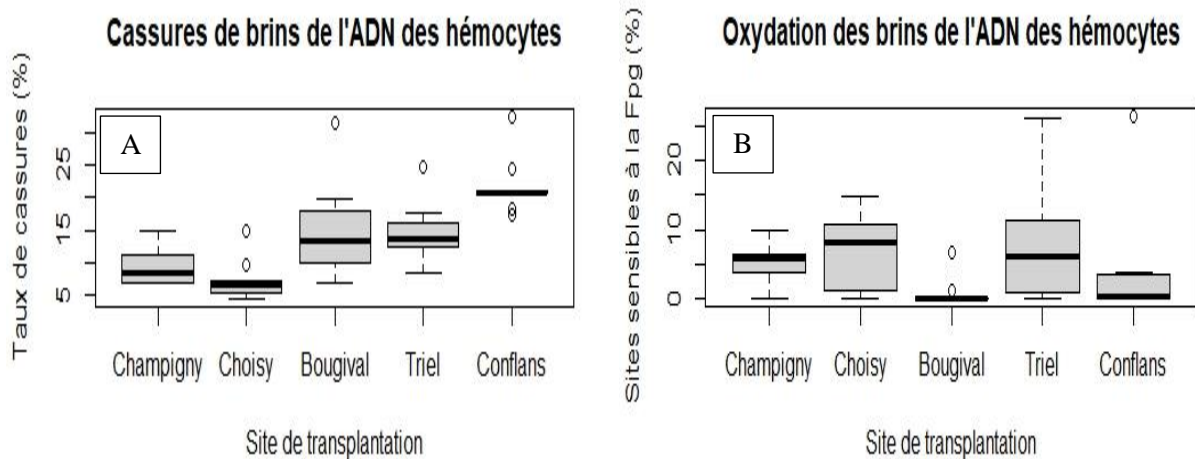


Figure 4. Représentation boxplot du taux de cassures (A) et d'oxydation des bases de l'ADN (B) mesurés au niveau des hémocytes de dreissènes, après leur transplantation sur les sites d'étude (N=10).

Par la mesure du taux de cassures de brins de l'ADN, un gradient de génotoxicité amont-aval a pu être noté au niveau des sites de transplantation, allant en moyenne de  $7,15 \pm 3,1\%$  pour le site de *Choisy-le-Roi* à  $21,7 \pm 4,2\%$  pour *Conflans-Sainte-Honorine* (Fig. 4A). L'analyse statistique sur données transformées indique un effet « site » hautement significatif (ANOVA  $F = 19,03$ ,  $df = 4$ ,  $p\text{-value} = 3,2 \cdot 10^{-9}$ ), hormis entre les sites *Champigny-sur-Marne* vs. *Choisy-le-Roi* et *Bougival* vs. *Triel-sur-Seine* (analyse post-hoc de comparaisons multiples de Tukey). Ces données vont dans le sens des résultats obtenus dans le cadre de la phase 7 du PIREN-Seine, où à la même période et durée de transplantation en 2018, un gradient de génotoxicité amont-aval avait été observé entre les sites *Marnay-sur-Seine*, *Bougival* et *Triel-sur-Seine* (Bonnard et al., 2019). Pour ces deux derniers sites, les taux moyens de cassures de brins mesurés dans cette campagne sont du même ordre de grandeur que ceux de 2018. De même, pour les cinq sites d'étude, les niveaux de dommages à l'ADN mesurés sont supérieurs aux valeurs de référence et seuil définies précédemment dans le cadre d'un programme de recherche sur un autre bassin versant (Projet EQUAL, financement AERM, Porteur : A. Geffard), témoignant d'un stress génotoxique pour les dreissènes en lien probablement avec la contamination environnementale.

La mesure des lésions oxydatives de l'ADN (*Fpg sensitive-sites*) en complément de l'évaluation des cassures de brins de l'ADN fait suite aux travaux de Master 2 de M. Louzon initiés lors de la précédente phase du PIREN-Seine. Les résultats obtenus à l'issue de cette campagne de transplantation ont montré un degré moyen de lésions de l'ADN différent selon les sites (ANOVA de Kruskal-Wallis,  $KW = 13,774$ ,  $df = 4$ ,  $p\text{-value} = 0,008$ ), globalement plus élevé pour les dreissènes transplantées sur les sites de *Champigny-sur-Marne*, *Choisy-le-Roi* et *Triel-sur-Seine* (Fig. 4B). Bien que nous ne disposions pas aujourd'hui du recul suffisant pour déterminer une valeur de référence du taux de lésions oxydatives de l'ADN, il avait été montré chez des dreissènes témoins qu'à un même niveau de cassures de brins pouvait correspondre un niveau variable d'oxydation (Louzon, 2017). En conséquence, la mesure des lésions oxydatives de l'ADN peut apporter une information complémentaire quant à la *sensibilité* des hémocytes de dreissène face à la pression génotoxique du milieu. En effet, l'oxydation des bases de l'ADN peut résulter du caractère oxydant des contaminants environnementaux, dont on sait qu'un certain nombre d'entre eux exercent leur action toxique via la génération d'*espèces réactives à l'oxygène* (ERO). Néanmoins, ce niveau d'oxydation de l'ADN peut également supposer l'implication de mécanismes de réparation en réponse à un stress génotoxique, notamment par l'activation de la voie de réparation par excision de bases (*Base Excision Repair*), le test des comètes mettant en évidence des lésions transitoires (ou réparables) de l'ADN. Les prochaines campagnes de transplantation des dreissènes permettront d'augmenter le jeu de données à disposition, afin de mieux comprendre les niveaux enregistrés ainsi que les relations entre le taux de cassures, le taux d'oxydation de l'ADN et les marqueurs immunitaires.

### 2.3. Mesure des biomarqueurs en lien avec l'immunité des dreissènes

Avant transplantation, les paramètres immunitaires de la population de dreissène ont été évalués à  $59 \pm 10$  % de capacité de phagocytose dont  $41,7 \pm 11$  % d'efficacité et en moyenne,  $14 \pm 5$  billes ont été ingérées par les hémocytes après 4h d'épreuve immunitaire. Au bout de 3 semaines de transplantation, aucune différence significative n'a été observée sur ces paramètres. Cependant, on note une tendance à l'augmentation de la capacité et de l'efficacité de phagocytose sur les sites de *Conflans-Sainte-Honorine* et *Triel-sur-Seine* avec respectivement  $64,3 \pm 14,8$  % de capacité de phagocytose dont  $50,7 \pm 17,3$  % d'efficacité et de  $61,1 \pm 15,7$  % de capacité de phagocytose dont  $44 \pm 18,4$  % d'efficacité (Fig. 5A et 5B). Bien que les moyennes ne mettent pas en évidence de résultats significatifs, il apparaît nettement une augmentation de la variabilité individuelle dans les résultats de ces deux sites.

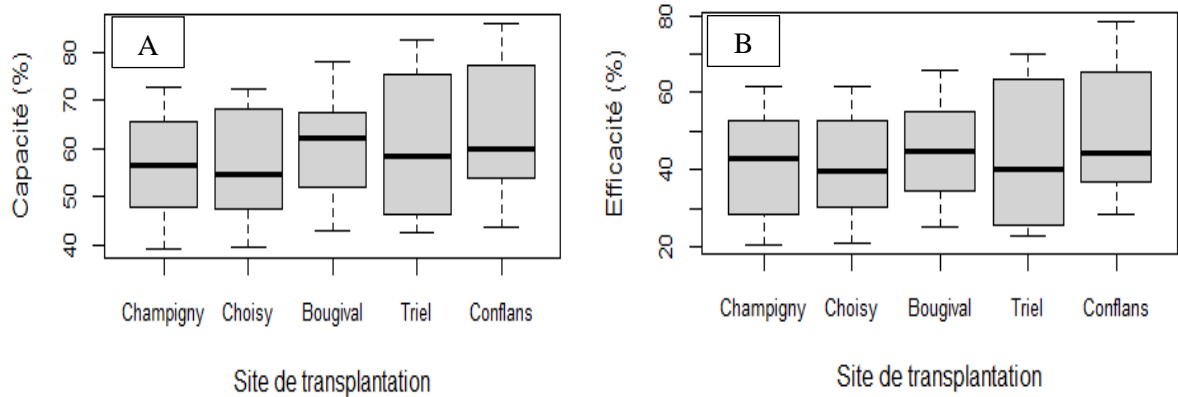


Figure 5. Représentation boxplot de la capacité (A) et efficacité (B) de phagocytose des hémocytes de dreissène après 4h de phagocytose ex vivo au contact de billes de latex fluorescentes mesurée au cytomètre en flux (N=10).

De façon similaire aux données de cassures à l'ADN des hémocytes, l'avidité cellulaire suit un gradient amont-aval suivant les sites de transplantation (Fig. 6). En moyenne le nombre de billes phagocytées par cellule varie de  $14,7 \pm 3,3$  pour *Choisy-le-Roi* à  $23,5 \pm 8,6$  pour *Conflans-Sainte-Honorine*. Le nombre important de billes par cellule sur les sites de *Bougival*, *Triel-sur-Seine* et *Conflans-Sainte-Honorine* indique une stimulation de la phagocytose. Ce résultat pourra être mis en regard des charges en agents biologiques bioaccumulées par les dreissènes sur la même période d'encagement (cf. partie 1.4.2).

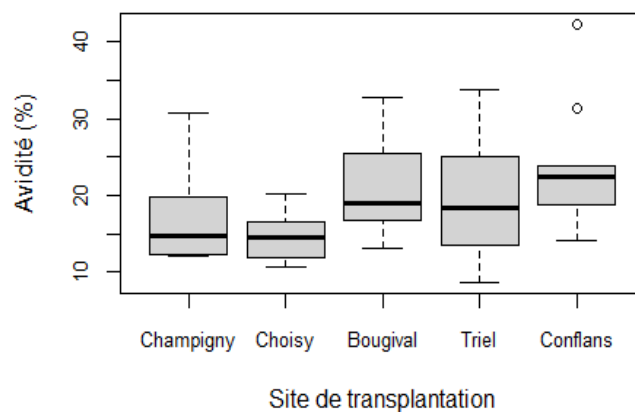


Figure 6. Représentation boxplot de l'avidité cellulaire des hémocytes de dreissène après 4h de phagocytose ex vivo au contact de billes de latex fluorescentes mesurée au cytomètre en flux (N=10).

## 2.4. Mesure de la longueur des télomères (stage de Master 2 de N. Berthelot)

Si les marqueurs hématocytaires apportent une réponse rapide et permettent un diagnostic de l'action toxique des contaminants environnementaux vis-à-vis de la dreissène, la mesure de la longueur des télomères pourrait être utilisée comme un indicateur ou traceur de *l'histoire de vie* des dreissènes. En ce sens, la mesure de la longueur des télomères sur des tissus biologiques d'intérêt permettrait de mieux comprendre la réponse apportée par les autres biomarqueurs, leurs significations biologiques et leurs relations éventuelles, notamment en lien avec le caractère génotoxique et immunotoxique des contaminants environnementaux.

Les télomères sont des séquences d'ADN non codantes situées aux extrémités des chromosomes. Ils jouent un rôle protecteur du génome, particulièrement lors de la réplication cellulaire, où ils subissent l'érosion de l'ADN à la place de l'ADN codant. Cette érosion trouve sa limite, dite de Hayflick, quand tout le télomère a disparu, la cellule entrant alors en sénescence (Cong et al., 2002). Cette érosion peut notamment être accélérée par le stress oxydatif, notamment en lien avec l'action de nombreux contaminants environnementaux (Reichert and Stier, 2017).

Il a donc été proposé dans le cadre d'un stage de Master 2 au cours du premier semestre 2021 (N. Berthelot, Master 2 RE-BSE de l'URCA) de procéder au développement et à l'optimisation de la mesure de la longueur relative des télomères par PCR quantitative (qPCR) au niveau des hématocytes et des branchies de la dreissène. Différentes méthodologies existent pour mesurer la longueur des télomères principalement développées chez les Vertébrés, les applications chez les Invertébrés et en particulier les Mollusques restant encore relativement limitées (Louzon et al., 2019). La méthode retenue pour cette première étude chez la dreissène repose sur l'amplification par qPCR de la séquence des télomères dans un extrait d'ADN avec des amorces spécifiques, et sa comparaison avec l'amplification d'une séquence d'ADN codant pour un gène au nombre de copies constant (gène codant pour la beta-actine dans notre cas). Les résultats sont exprimés en rapport T/S représentant la longueur relative des télomères, par un calcul qui intègre la quantité relative d'ADN des télomères par rapport à la quantité d'ADN du gène de l'actine (S), rapportée pour chaque individu à un échantillon contrôle. Le stage de N. Berthelot a permis de valider cette mesure au niveau des branchies de la dreissène en précisant les protocoles d'extraction d'ADN ainsi que les conditions expérimentales de la mesure (choix de l'actine comme gène à nombre de copie constant, concentration de la matrice ADN de départ, concentrations des amorces, température et nombre de cycles PCR, choix d'un échantillon contrôle). Le développement de la méthode sur les hématocytes nécessite encore des optimisations de protocole.

La mesure des télomères au niveau des branchies a été réalisée sur les échantillons de dreissènes transplantées sur les différents sites d'étude (Fig. 7), constituant ainsi un premier jeu de données. Les analyses statistiques ne mettent en évidence aucune différence significative de la longueur moyenne des télomères entre les sites d'étude (ANOVA de Kruskal-Wallis,  $df = 4$ ,  $p$ -value = 0,39), de même qu'aucune corrélation avec les paramètres morphométriques de la dreissène (en raison de la calibration de leur taille). Si un raccourcissement des télomères avec l'âge de vie des organismes peut être observé, cette relation ayant principalement été démontrée chez les Vertébrés et en particulier l'Homme (Aubert and Lansdorp, 2008), elle nécessite encore d'être étudiée pour la dreissène. Néanmoins, il peut déjà être noté dans notre étude une variabilité inter-individuelle du ratio T/S (longueur des télomères) qui peut sembler importante. Des investigations futures seront menées afin de voir s'il existe une relation entre la longueur de télomères et la réponse et/ou la sensibilité des dreissènes face à la contamination de leur milieu.

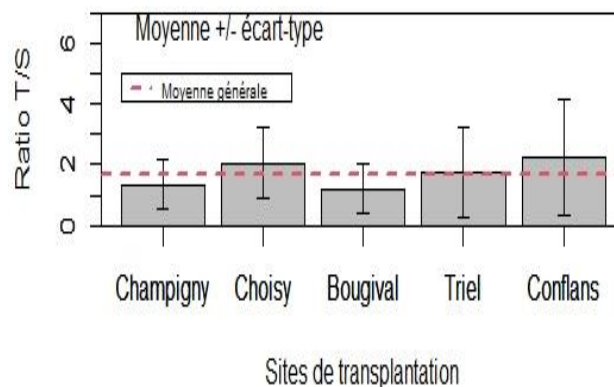


Figure 7. Représentation en histogramme (moyenne  $\pm$  écart-type) de la longueur relative des télomères (ratio T/S) mesurée au niveau des branchies de dreissènes, après leur transplantation sur les sites d'étude.

## Conclusion

Cette première campagne de transplantation menée dans le cadre de la phase 8 du PIREN-Seine renforce l'intérêt des hémocytes de la dreissène pour le diagnostic écotoxique en lien avec la contamination des masses d'eau. En effet, après trois semaines de transplantation des dreissènes sur cinq sites d'études le long de l'axe Seine et de ses affluents (Marne, Oise), un gradient amont-aval de génotoxicité et d'immunotoxicité a pu être mis en évidence, en particulier par la mesure des cassures de brins de l'ADN et de l'avidité cellulaire en tant que marqueur de phagocytose. L'objectif pour les prochaines années du programme PIREN-Seine visera, par la réalisation de futures campagnes de transplantation aux mêmes périodes de l'année, d'une part à approfondir le jeu de données autour de la mesure de ces biomarqueurs afin d'améliorer notre compréhension vis-à-vis de leurs relations éventuelles et de la signification de leurs réponses. La constitution de cette base de données permettra d'autre part de sélectionner tout ou partie des réponses biologiques en vue d'établir un indice unique (ou indice hémocytes) qui soit intégrateur et révélateur de l'ensemble des pressions génotoxiques et immunotoxiques du milieu. Les réponses biologiques mesurées seront mises en relation avec le degré d'imprégnation des dreissènes en contaminants chimiques (composés perfluoroalkylés, chloroalcanes et nanoparticules) et biologiques (protozoaires, bactériophages), permettant d'établir également un diagnostic du risque chimique et sanitaire en lien avec la contamination des masses d'eaux.

## Bibliographie

- Aubert, G. and P.M. Lansdorp (2008). Telomeres and aging. *Physiological Reviews* 88, 557–579.
- Auffret, M., S. Rousseau, I. Boutet, A. Tanguy, J. Baron, D. Moraga, and M. Duchemin (2006). A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63, 393–405.
- Barjhoux, I., D. Rioult, A. Geffard, and M. Palos-Ladeiro (2020). A new protocol for the simultaneous flow cytometric analysis of cytotoxicity and immunotoxicity on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) hemocytes. *Fish Shellfish Immunology*, 98, 224-235.
- Berthelot, N. (2021). Mesure de la longueur des télomères comme nouveau biomarqueur chez la dreissène. Rapport de stage de Master 2 *Risques et Environnement-Biodiversité, Santé, Environnement* (RE-BSE) de l'Université de Reims Champagne-Ardenne (URCA), 94 p.
- Binelli, A., C. Della Torre, S. Magni, and M. Parolini, M. (2015). Does zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) represent the freshwater counterpart of *Mytilus* in ecotoxicological studies? A critical review. *Environmental Pollution* 196, 386–403.
- Bonnard, M., F. Alliot, A. Bigot-Clivot, A. Goutte, E. Lance, M. Palos-Ladeiro, and A. Geffard (2019). La dreissène comme bioindicateur de la contamination en Seine, dans Devenir des contaminants : piégeage, transformation, bioaccumulation et effets écotoxicologiques, Gelabert & Goutte (eds.), Rapports de synthèse de la phase VII du PIREN-Seine, Volume 6.
- Cong, Y.S., W.E. Wright and J.W. Shay (2002). Human Telomerase and Its Regulation. *Microbiology and Molecular Biology Review* 66, 407-425.
- European Commission (EC) (2006). Regulation No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC.
- Fontaine, M. and E. Guillot (2002). Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*. *FEMS Microbiology Letters* 214, 13–17.
- ISO 10705-1 (1995). Qualité de l'eau — Détection et dénombrement des bactériophages — Partie 1 : Dénombrement des bactériophages ARN F spécifiques. 12p.
- Labadie, P., C. Blasi, K. Le Menach, E. Geneste, M. Babut, O. Perceval, and H. Budzinski (2019). Evidence for the Widespread Occurrence of Short- and Medium-Chain Chlorinated Paraffins in Fish Collected from the Rhône River Basin (France). *Chemosphere* 223, 232–239.

- Lélu, M., E. Gilot-Fromont, D. Aubert, A. Richaume, E. Afonso, E. Dupuis, C. Gotteland, F. Marnef, M.-L. Poulle, A. Dumètre, P. Thulliez, M.-L. Dardé, and I. Villena (2011). Development of a sensitive method for *Toxoplasma gondii* oocyst extraction in soil. *Veterinary Parasitology* 183, 59–67.
- Louzon, M. (2017). Pertinence et perspectives du test des comètes modifié dans un contexte de biosurveillance active des écosystèmes aquatiques d'eau douce - application sur hémocytes de moule zébrée. Rapport de stage de Master 2 Sciences des Environnements Côtiers et Continentaux, Risques Environnementaux Industriels, Risques Environnementaux Chimiques. 67 p.
- Louzon, M., M. Coeurdassier, F. Gimbert, B. Pauget and A. de Vaufleury (2019). Telomere dynamic in humans and animals: Review and perspectives in environmental toxicology. *Environment International* Elsevier, 2019, 131, ff10.1016/j.envint.2019.105025ff. fahal-02269457f
- Palos Ladeiro, M., A. Bigot-Clivot, D. Aubert, I. Villena, and A. Geffard (2015). Assessment of *Toxoplasma gondii* levels in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) by real-time PCR: an organotropism study. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 13693–13701.
- Palos-Ladeiro, M., et al. (2017). Mussel as a Tool to Define Continental Watershed Quality, Organismal and Molecular Malacology, Sajal Ray, IntechOpen, DOI: 10.5772/67995.
- Reichert, S. and A. Stier (2017). Does oxidative stress shorten telomeres *in vivo*? A review. *Biology Letters* 13: 20170463.
- Rocha, T.L., T. Gomes, V.S. Sousa, N.C. Mestre, and M.J. Bebianno (2015). Ecotoxicological impact of engineered nanomaterials in bivalve molluscs: An overview. *Marine Environmental Research* 111, 74–88.
- Simonnet-Laprade, C., H. Budzinski, K. Maciejewski, K. Le Menach, R. Santos, F. Alliot, A. Goutte, and P. Labadie (2019). Biomagnification of Perfluoroalkyl Acids (PFAAs) in the Food Web of an Urban River: Assessment of the Trophic Transfer of Targeted and Unknown Precursors and Implications. *Environmental Science: Processes and Impacts* 21(11), 1864–1874.
- Tran, D., J.C. Massabuau, J.C., and J. Garnier-Laplace (2008). Impact of hypoxia on hemolymph contamination by uranium in an aquatic animal, the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Environmental Pollution* 156, 821–826.
- Verweij, J.J., J. Schinkel, D. Laeijendecker, M.A.A. van Rooyen, L. van Lieshout, and A.M. Polderman (2003). Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. *Molecular and Cellular Probes* 17, 223–225.