

La dreissène dans l'évaluation du risque sanitaire en Seine

Julie Do Nascimento¹, Aurélie Bigot-Clivot¹, Marc Bonnard¹, Isabelle Bonnard¹,
Laurence Delahaut¹, Nicolas Boudaud², Christophe Gantzer³, Mélissa Palos-Ladeiro¹ &
Alain Geffard^{1*}

¹. Université de Reims Champagne-Ardenne, UMR-I 02 SEBIO, Reims

². ACTALIA, 50 000 Saint-Lô, France

³. Université de Lorraine, UMR 7564, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

* alain.geffard@univ-reims.fr

Résumé

*Lors de deux campagnes réalisées durant les mois de novembre et décembre 2020 et 2021, des dreissènes provenant d'une population contrôlée (Lac du Der-51) ont été engagées 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 et 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 écotoxique par la mesure conjointe de biomarqueurs de génotoxicité et d'immunotoxicité au niveau des hémocytes. Le caractère écotoxique de la contamination en Seine ayant été présenté dans le précédent rapport d'activité (Bonnard et al., 2021), celui-ci mettra l'accent sur le risque sanitaire. Les résultats des deux campagnes mettent en évidence une contamination parasitaire en Seine sur trois sites d'étude (Choisy-le-Roi, Triel-sur-Seine, Conflans-Sainte-Honorine), avec l'accumulation et la détection dans les tissus mous de la dreissène d'oocystes et kystes de protozoaires (*Toxoplasma gondii*, *Giardia duodenalis*). De la même façon, ce rapport montre la pertinence de la dreissène dans le suivi de la contamination des masses d'eau par les bactériophages ARN F spécifiques (FRNAPH). Les travaux en laboratoire mettent en évidence la capacité de la dreissène à bioaccumuler et à retenir au sein de la glande digestive ces indicateurs de contamination fécale, reflétant ainsi l'état de contamination du milieu dans lequel elle vit. Les campagnes de transplantation traduisent une contamination des masses d'eau en bactériophages dans tous les sites d'étude, avec des concentrations généralement plus élevées en 2021 qu'en 2020. Un gradient de concentration en FRNAPH peut être noté au niveau de l'axe Seine entre les sites de Choisy-le-Roi et Triel-sur-Seine, de même qu'une contribution importante des affluents de la Seine (Marne et Oise).*

Points clefs

- ✓ Pertinence de la dreissène pour le suivi sanitaire de la contamination des masses d'eaux en parasites (protozoaires *T. gondii*, *G. duodenalis*) et en bactériophages ARN-F spécifiques.
- ✓ Niveaux de contamination des eaux en bactériophages globalement plus importants en 2021 qu'en 2020.
- ✓ Gradient de contamination amont-aval de l'axe Seine.

Abstract

Two field studies have been performed between November and December 2020 and 2021 with the 3-week caging of zebra mussels coming from a control population (Lac du Der-51) on five pilot sites (*Champigny-sur-Marne*, *Choisy-le-Roi*, *Bougival*, *Triel-sur-Seine* and *Conflans-Sainte-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 measurements of genotoxicity and immunotoxicity biomarkers on hemocytes. Ecotoxicity data from the first campaign having been previously described (see Bonnard et al., 2021), the present report will focus on the biological contamination. First results highlighted the presence of two pathogenic protozoa - *Toxoplasma gondii* and *Cryptosporidium parvum* - in the soft tissues of zebra mussels, reflecting the biological contamination in the water from three sites. In the same manner, the use of dreissena is particularly useful for evaluating the water contamination by RNA F-specific bacteriophages (FRNAPH). By both its bioaccumulation capacity and its storage into the digestive gland, dreissenid species reflect the levels of water contamination. Transplantation studies also highlighted a global contamination of waters by FRNAPH for all sites, with concentrations in biota being generally higher in 2021 than 2020. An upstream-downstream gradient was also noticed in the Seine river between the sites *Choisy-le-roi* and *Triel-sur Seine*, as well as a significant contribution in water contamination by its tributaries (Marne and Oise rivers).

Key points

- ✓ *Reliability of Dreissena polymorpha for the biomonitoring of water contamination by protozoa and RNA -F bacteriophages*
- ✓ *Levels in bacteriophages measured in bivalves higher in 2021 than in 2020*
- ✓ *Upstream-downstream contamination gradient in the Seine river*

Introduction

Les masses d'eau sont sujettes à de nombreuses contaminations, difficiles à mesurer par leur caractère diffus [1]. La pollution fécale du milieu aquatique peut survenir quand des rejets d'effluents de STEP sont émis dans l'environnement (WHO, 2010). En effet, malgré les différents processus pour épurer les eaux usées brutes, les microorganismes pathogènes tels que les bactéries, virus et protozoaires peuvent passer à travers des mailles d'assainissement et perdurer dans les eaux et boues traitées en étant infectieux (Bosch et al., 1986).

Depuis le XIX^{ème} siècle, il est proposé d'utiliser des microorganismes indicateurs de la contamination fécale pour surveiller la qualité sanitaire des masses d'eau (Ashbolt et al., 2001). Les caractéristiques d'un potentiel bon indicateur de la pollution fécale sont les suivantes (Armon & Kott, 1996 ; Harwood & Stoeckel, 2011; Jofre et al., 2014; Yates, 2007) :

- l'origine de l'indicateur et celle du pathogène recherché doit être la même (dans le cas des virus entériques, cette origine doit être entérique)
- l'indicateur doit présenter une résistance et une cinétique de survie semblable en conditions environnementales à celles des virus
- il doit être non pathogène (et donc incapable de se multiplier dans l'environnement), mais à la fois suffisamment abondant dans l'environnement pour être facilement détecté
- il doit toujours être présent quand le pathogène recherché l'est.

Cependant, les indicateurs bactériens traditionnellement utilisés, comme les coliformes dont *E. coli*, sont plus facilement détruits par les traitements d'épuration que les virus, que les spores de *C. perfringens* ou encore que les formes de résistance des protozoaires (Ottoson et al., 2006). Les indicateurs bactériens ne sont donc pas adaptés pour estimer le risque viral et parasitaire (protozoaires) (Doré & Lees, 1995 ; Flannery et al., 2009). Depuis quelques années, un intérêt grandissant est né pour les bactériophages considérés comme indicateurs prometteurs de la contamination virale entérique, bien plus proche des virus en termes de cinétique de survie, structure et comportement dans l'eau que les indicateurs bactériens (Hartard et al., 2015 ; Havelaar et al., 1986 ; Ogorzaly & Gantzer, 2006). En particulier, les bactériophages ARN F spécifiques (FRNAPH) remplissent les critères d'un bon indicateur. Ils ont l'avantage d'être facilement détectables par une méthode standardisée, rapide et peu coûteuse : la technique de la double couche d'agar (norme ISO 10705-1a). Le dénombrement précis et fiable de ces plages renseigne sur le nombre de phages infectieux (Hartard et al., 2016 ; Havelaar & Hogeboom, 1984). Cependant, l'intérêt de l'utilisation des phages pour évaluer la qualité des masses d'eau se heurte à différentes difficultés : i) limite de détection de la méthode pour les faibles charges, ii) variabilité des résultats d'analyses sur l'eau liée aux changements spatiotemporels inhérents à la matrice eau (débit des rivières, événements météorologiques) (Fauvel et al., 2016) pouvant influencer la propagation et le transport des bactériophages ARN F spécifiques (Fauvel et al., 2017).

Afin de lever ces limites, il est proposé de s'appuyer d'une part sur les capacités de bioaccumulation de bivalves aquatiques, et tout particulièrement de la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*) pour le milieu continental, et d'autre part sur la représentativité de ces organismes vis-à-vis de leur milieu de vie (espèces sessiles) pour améliorer la mesure des FRNAPH dans un objectif de surveillance de la qualité des masses d'eau comme cela a été récemment suggéré dans une première étude (Capizzi-Banas et al., 2021).

1. Matériel et Méthodes

1.1. Caractérisation en laboratoire des cinétiques d'accumulation et d'élimination des FRNAPH chez *D. polymorpha*

Pour caractériser les capacités d'accumulation des FRNAPH par la dreissène, une série de trois expérimentations a été réalisée. Pour ces expérimentations, les modèles de FRNAPH utilisés dans les expositions au laboratoire sont ceux qui sont le plus fréquemment retrouvés dans les eaux usées (Haramoto et al., 2005) : le MS2 appartenant au génogroupe I et fréquemment associé à une pollution fécale d'origine animale et le GA appartenant au génogroupe II qui caractérise plutôt une pollution fécale d'origine humaine (Beekwilder et al., 1996 ; Cole et al., 2003 ; Harwood et al., 2013 ; Hsu et al., 1995 ; Schaper et al., 2002 ; Sundram et al., 2002, 2006). Les deux souches sont produites en laboratoire, à partir de la norme (ISO10705-1, 2001a).

- *Exposition de dreissènes à un large gradient de concentrations en FRNAPH.*

Cette première expérience a pour objectif de valider la capacité des dreissènes à accumuler les FRNAPH et à renseigner si cette accumulation est représentative du niveau d'exposition. Pour ceci, des dreissènes ont été exposées durant 48h, comme suggéré par les travaux de Capizzi-Banas et al. (2021), à une large gamme de concentrations incluant des charges environnementales de FRNAPH infectieux (Tableau I) dont les plus faibles (0,01X et 1X), ne peuvent pas être détectées par une analyse directe de l'eau (*i.e.* sans étape de concentration) (Havelaar et al., 1993). La concentration la plus forte 1000X (équivalent à 10^3 UFP/mL) est, quant à elle, de l'ordre de grandeur des concentrations retrouvées dans des eaux usées brutes.

Tableau I : Concentrations d'expositions de FRNAPH infectieux testées.

Conditions	Concentration moyenne d'exposition :
0,01X	0,05 UFP/mL
1X	5 UFP/mL
10X	~ 10 UFP/mL
50X	~ 50 UFP/mL
100X	~ 10^2 UFP/mL
1000X	~ 10^3 UFP/mL

- Exposition de dreissènes sur une cinétique temporelle (jusqu'à 14 jours)

Afin de déterminer le temps de mise à l'équilibre des dreissènes vis-à-vis de la concentration d'exposition, des individus ont été exposés aux deux plus fortes concentrations en FRNAPH infectieux décrites ci-dessus (100X et 1000X, voir Tableau I) sur une période de 14 jours. Pour maintenir un niveau d'exposition constant en FRNAPH infectieux, le milieu a été renouvelé tous les deux jours. Afin de suivre la cinétique, des individus ont été prélevés après 1, 7 et 14 jours d'exposition.

- Evaluation de la cinétique de déuration des FRNAPH accumulés chez la dreissène

En complément des précédentes expérimentations, cette troisième expérience a pour objectif de renseigner la vitesse de déuration des FRNAPH accumulés chez les dreissènes. Pour cela des dreissènes ont été exposées sur une courte période, à savoir 48h, aux deux concentrations d'expositions les plus élevées du tableau I, soit 100X et 1000X. Après ces 48h d'exposition, une part des individus est prélevée pour évaluer le niveau d'accumulation des FRNAPH, et les individus restants sont placés dans de nouveaux aquariums avec de l'eau propre, sans phages infectieux. Des prélèvements réguliers après 2, 7, 14, 21, 28 et 35 jours de mise en déuration ont été réalisés.

1.2. Transplantation des dreissènes

Pour rappel, 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). 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 pendant trois semaines entre novembre et décembre 2020 (première campagne) et 2021 (deuxième campagne), sur cinq sites ateliers le long de l'axe Seine et de ses affluents (Marne et Oise) suivant un gradient amont-aval : Champigny-sur-Marne, Choisy-le-Roi, Bougival, Triel-sur-Seine et Conflans-Sainte-Honorine. 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. Pour plus de précisions sur la méthodologie d'encagement ainsi que la mesure de paramètres physico-chimiques du milieu, se référer au précédent rapport (Bonnard et al., 2021).

1.3. Mesure des paramètres biotiques des dreissènes

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. Si aucune mortalité notable des dreissènes n'a été constatée ($< 4\%$) pour les deux campagnes, les dreissènes de la campagne 2021 montrent un indice de condition supérieur à celui des dreissènes de 2020 bien que les valeurs restent dans la gamme de celles observées à cette période de l'année (Tableau II).

Tableau II : Mortalité (en pourcentage) et indice de condition (moyenne \pm écart-type) des dreissènes, à l'issue des trois semaines d'encagement sur les cinq sites d'étude lors de la réalisation des campagnes 2020 et 2021.

Campagne	Der-T0	Champigny sur Seine	Choisy-le-Roi	Bougival	Triel-sur-Seine	Conflans Ste Honorine
2020	/ 0,16 \pm 0,04	1,45% 0,14 \pm 0,03	1,45% 0,14 \pm 0,02	< 4% 0,15 \pm 0,03	< 4% 0,16 \pm 0,04	< 4% 0,15 \pm 0,03
2021	/ 0,20 \pm 0,05	2,8% 0,18 \pm 0,03	0,7% 0,17 \pm 0,03	0,7% 0,21 \pm 0,03	0% 0,23 \pm 0,02	2,15% 0,17 \pm 0,03

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

1.4.1. Détection des protozoaires

Les tissus mous de 10 pools de 2 dreissènes par site ont été prélevés dans le but de mesurer une éventuelle bioaccumulation en parasites protozoaires (*Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* et *Giardia duodenalis*). La détection des protozoaires dans les tissus de dreissène est réalisée par biologie moléculaire. Dans un premier temps, les tissus sont broyés dans de la trypsine 1x, puis les échantillons sont incubés 1h30 à 37°C sous agitation. L'ADN est extrait grâce au kit FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP

Biomedicals). Les oocystes des protozoaires sont recherchés et quantifiés par PCR 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 & Guillot, 2002) et pour *Giardia duodenalis* un fragment d'une petite sous-unité ribosomique (like-16S) (Verweij et al., 2003). Le nombre d'oocystes de *T. gondii* et de *C. parvum* ainsi que le nombre de kystes de *G. duodenalis* ont été quantifiés dans les tissus des dreissènes grâce à une gamme mise en place dans notre laboratoire suite à un dopage de tissus avec des quantités connues en protozoaires (50 000, 10 000, 5 000, 1 000, 500, 100, 50, 10, 5 et 1 protozoaire(s)).

1.4.2. Mesure des FRNAPH infectieux

La mesure se base sur l'adaptation du CEFAS (2007) de la norme (ISO10705-1, 2001a), qui permet de détecter la présence et quantifier les FRNAPH infectieux dans des échantillons d'eau. Le principe consiste à produire des cultures de bactéries qui serviront d'hôtes pour les FRNAPH, *Salmonella typhimurium* lactose positives, appelées « cultures de travail » et qui possèdent dans leur génome un plasmide codant pour la production de pili F. Cela permet aux FRNAPH infectieux présents dans l'échantillon à analyser de se fixer à ce pili F afin d'infecter les bactéries hôtes (Guttman et al., 2005). Ces cultures de travail sont ensuite mises en contact avec l'homogénéat de bivalves et de la gélose semi-solides en surfusion. Cet hétérogénéat est coulé sur une boîte de Pétri contenant déjà une première couche d'agar, d'où son nom de technique de double couche d'agar. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C. Cela permet la formation d'un tapis bactérien qui met en évidence la présence des FRNAPH infectieux par l'apparition de plages de lyses. Chaque plage de lyse équivaut à un phage infectieux. Le résultat est exprimé en UFP (unité formant plaque) / gramme de chair de bivalve (Figure 1).

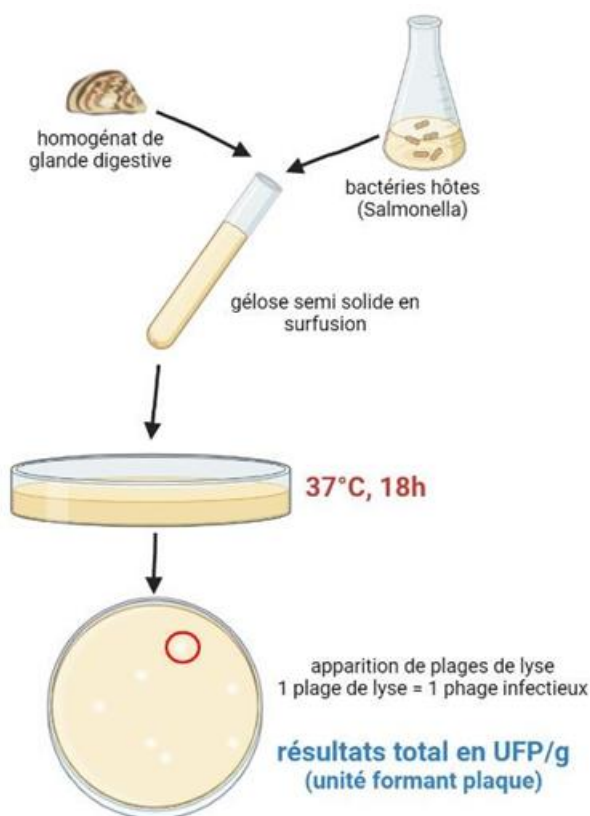


Figure 1 : Méthode d'énumération de FRNAPH infectieux dans les bivalves (CEFAS, 2007).

Cette procédure étant uniquement décrite pour une application sur bivalves marins, quelques ajustements ont dû être faits pour pouvoir l'appliquer à la dreissène. Dans le protocole, le nombre d'individus prélevés par sous-échantillon varie en fonction de la taille de l'espèce du bivalve utilisé. Pour l'huître creuse *Crassostrea gigas* (8 à 40 cm) 12 à 18 individus entiers sont recommandés alors que pour la mactre épaisse *Spisula solida* (2.5 à 5 cm), il s'agit plutôt de 30 à 50 individus. Pour la dreissène, seules les glandes digestives ont été prélevées, et non l'ensemble des tissus mous. Le nombre de glandes par échantillon est de 20, avec 3 réplifications, sauf pour la campagne terrain 2020 où 12 *pools* de 3 glandes ont été analysés. Par gramme

d'échantillon est ajouté 1 mL de PBS et 1 mL de PBS peptone 0.3%. Les glandes sont broyées à l'Ultraturrax® et le broyat est incubé pendant 4 h dans de la glace. Une centrifugation de 5 min à 4400 rpm permet de récupérer le surnageant dont uniquement 1 mL est coulé sur une grosse boîte de Pétri par échantillon ($\varnothing = 15$ cm).

Afin de valider le titrage des échantillons, un échantillon négatif (contenant 1mL de PBS et 1mL de PBS peptone 0.3%) et un témoin positif (contenant une concentration de 1.5×10^3 UFP/mL de FRNAPH MS2 infectieux) sont coulés en même temps sur des petites boîtes de Pétri ($\varnothing = 9$ cm).

2. Résultats et discussions

2.1. Caractérisation de la cinétique d'accumulation et d'élimination des FRNAPH chez la dreissène

Les concentrations en FRNAPH infectieux mesurées chez les dreissènes exposées à un large gradient de contamination sont présentées dans la Figure 2. A l'exception de la condition 0,01X, des FRNAPH infectieux sont mesurés pour toutes les autres conditions et ce de façon croissante avec le niveau d'exposition. Ces résultats soulignent, suite à une exposition de 48h, une bonne représentativité de la concentration en FRNAPH infectieux dans les glandes digestives de dreissènes vis-à-vis de la contamination de leur milieu de vie. Cette représentativité est un critère important pour ensuite proposer la dreissène comme matrice pour l'analyse des FRNAPH infectieux dans un objectif de surveillance de la qualité des masses d'eau. Cependant, on peut noter que pour les conditions 1X et 10X, les concentrations mesurées dans les dreissènes sont assez similaires (absence de facteur 10) pouvant suggérer que l'on est proche de la limite de quantification, paramètre qu'il sera nécessaire de déterminer.

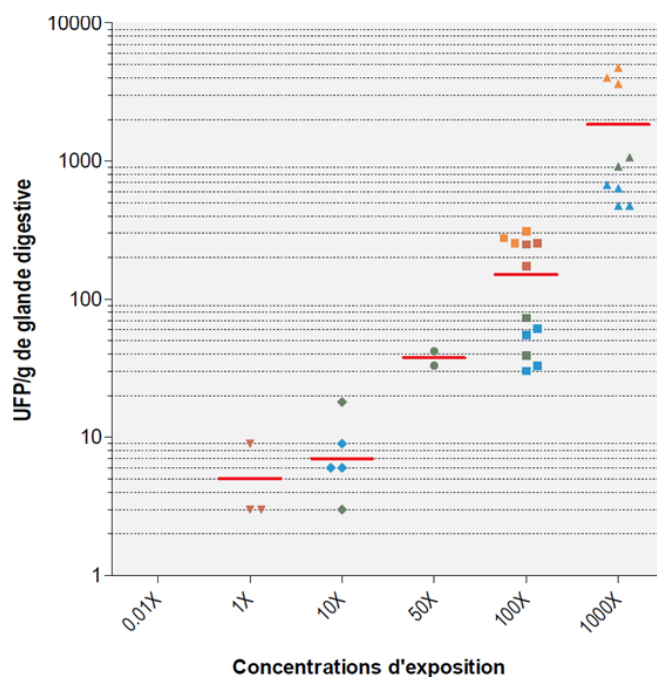


Figure 2 : Représentation de la concentration en FRNAPH (UFP/g ; $n = 3$ pools de 20 glandes) dans les glandes digestives de dreissènes exposées 48h à un gradient de FRNAPH dans l'eau.

Ces premières données sont en cohérence avec les travaux de Capizzi-Banas et al. (2021) qui suggéraient une accumulation rapide (48h) des FRNAPH infectieux par la dreissène. Ce point est également confirmé par les résultats obtenus dès 24h (J1) d'exposition des dreissènes aux deux plus fortes concentrations considérées (Figure 3). Outre cette accumulation rapide, le suivi de la charge en FRNAPH dans les dreissènes sur 14 jours, montre que les organismes se mettent rapidement en équilibre avec le degré de contamination de leur milieu de vie et que leur niveau d'imprégnation reste stable si l'exposition persiste (Figure 3). En complément de la capacité d'accumulation, cette représentativité du degré d'exposition, et donc de la contamination de son milieu de vie au cours du temps, est un critère également d'intérêt pour l'utilisation de la dreissène en tant que matrice pour la surveillance des masses d'eau.

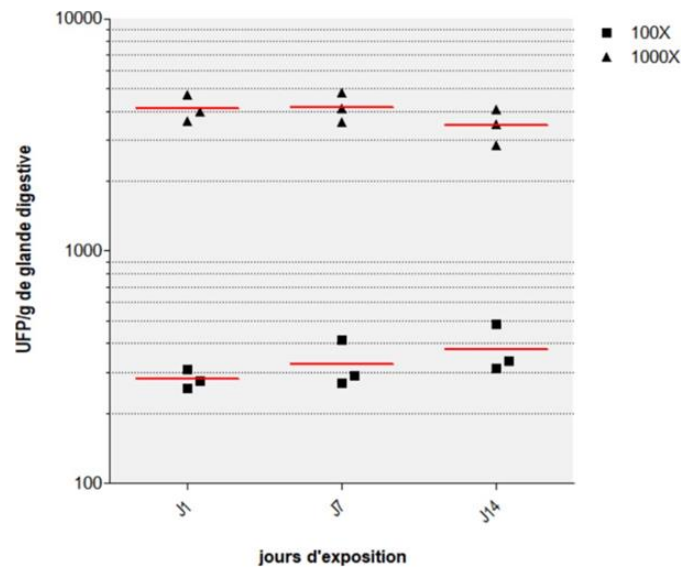


Figure 3 : Représentation de la concentration en FRNAPH (UFP/g, n = 3 pools de 20 glandes) dans les glandes digestives de dreissènes exposées à 2 concentrations (100X et 1000X, cf tableau I) sur une période de 14 jours.

Les concentrations de FRNAPH infectieux mesurées chez les dreissènes exposées pendant 48h aux deux concentrations testées (J0) puis mises en condition de dépuración (J2 à J35) sont présentées dans la figure 4. Durant la phase de dépuración, la charge en FRNAPH infectieux diminue régulièrement sur 14 (100X) et 28 jours (1000X) selon le niveau d'imprégnation initial.

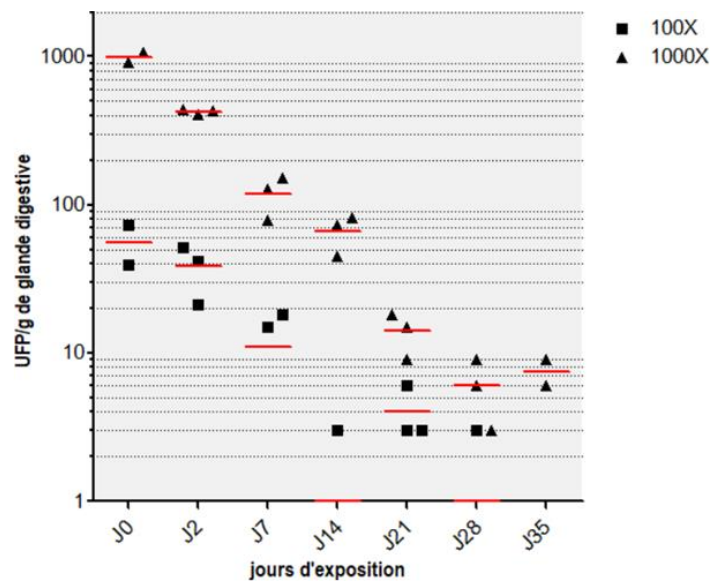


Figure 4 : Représentation de la concentration de FRNAPH (UFP/g) dans les glandes digestives d'organismes exposés durant 48h puis mis en dépuración sur une période de 35 jours.

Le temps nécessaire pour obtenir une réduction de 90% (T90) de la concentration des FRNAPH infectieux dans les dreissènes exposées aux concentrations 100X et 1000X a été calculé à l'aide des équations de courbe de tendance obtenues à partir des données expérimentales. Des T90 de 14 jours ($R^2=0.97$) et 13 jours ($R^2=0.91$) sont obtenus pour les conditions 100X et 1000X respectivement.

2.2. Mesure de l'imprégnation des dreissènes en protozoaires après transplantation

A l'issue de la campagne de transplantation réalisée en automne 2020, *T. gondii* a été détecté dans les tissus de dreissènes (1 pool de 2 dreissènes sur 10) encagées à Conflans-Sainte-Honorine (non quantifiable car inférieur à la limite de quantification - LOQ) (Tableau III). *G. duodenalis* a également été détecté durant cette période dans les tissus de bivalves (2 pools de 2 dreissènes sur 10) provenant du site de Triel-sur-Seine avec une quantité maximale détectée de 4,79 kystes/pool. Durant l'automne 2021, des oocystes de *T. gondii* (<LOQ) et des kystes de *G. duodenalis* (2,11 kystes) ont été mis en évidence sur le site de Choisy-le-Roi avec 1 pool de 2 dreissènes positives. De plus, 1,1 kyste de *G. duodenalis* a également été quantifié dans 1 pool de 2 dreissènes encagées à Conflans-Sainte-Honorine.

Au cours de ces deux campagnes de transplantation, aucun oocyste de *C. parvum* n'a été détecté dans les tissus mous de dreissènes, ce qui suggère qu'aucune contamination à ce protozoaire n'a eu lieu sur les sites ciblés pendant la durée de l'encagement. Nos précédentes expositions menées au laboratoire (Géba et al., 2020 ; Palos Ladeiro et al., 2015) ont montré que le pourcentage de dreissènes positives reflète la charge en protozoaire dans l'eau et que la bioaccumulation des protozoaires par le bivalve était persistante dans le temps. Les résultats obtenus dans la présente étude en conditions naturelles soulignent l'utilité de *D. polymorpha* en tant qu'outils de biosurveillance de la contamination en protozoaires.

Tableau III : *T. gondii* et *C. parvum* détectés et quantifiés dans les tissus de *Dreissena polymorpha* encagées sur différents sites de la Seine en 2020 et 2021.

		<i>Toxoplasma gondii</i>		<i>Giardia duodenalis</i>	
		Nombre d'échantillons + N= 10 pools de 2 dreissènes		Nombre d'échantillon + N= 10 pools de 2 dreissènes	
		Nombre d'oocystes/ échantillon		Nombre de kystes/ échantillon	
2020	Conflans-Sainte-Honorine	1/10	<LOQ	NA	NA
	Triel-sur-Seine	NA	NA	2/10	4,79 et <LOQ
2021	Choisy-le-Roi	1/10	<LOQ	1/10	2,11
	Conflans-Sainte-Honorine	NA	NA	1/10	1,1

Limite de quantification (LOQ) = 5 oocystes de *T. gondii* et 1 kyste de *G. duodenalis*

2.3. Mesure de l'imprégnation en FRNAPH infectieux après transplantation

Les concentrations en FRNAPH infectieux mesurées chez les dreissènes exposées sur les différents sites durant les deux campagnes sont présentées dans la figure 5. Tous les sites prospectés en Île-de-France présentent une concentration élevée en FRNAPH infectieux. De plus, on observe un niveau de concentration bien plus élevé durant la campagne 2021 que durant celle de 2020. Il sera intéressant de comparer les situations météorologiques (température, débit, orage...) entre ces deux campagnes afin de savoir si cela peut être un élément d'explication. Cependant, pour les deux campagnes, on observe un gradient sur l'axe Seine entre Choisy-le-Roi et Triel-sur-Seine. Si l'axe Seine présente des concentrations élevées en FRNAPH au niveau des organismes qui y sont exposés, il est intéressant de noter l'apport important de FRNAPH via les affluents Marne et Oise.

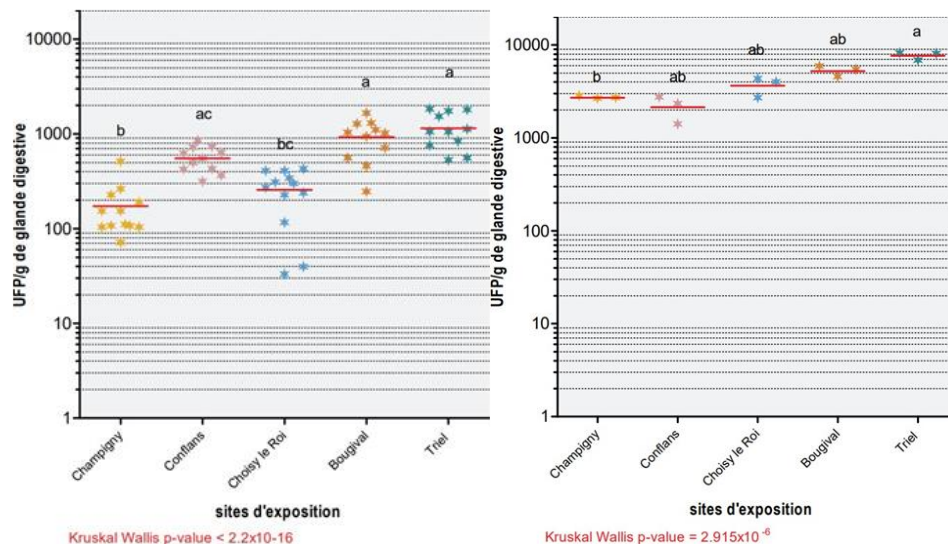


Figure 5 : Représentation de la concentration de FRNAPH infectieux (UFP/g) dans les glandes digestives des dreissènes exposées durant 3 semaines sur différents sites du bassin de la Seine. À gauche les résultats de la campagne d'octobre 2020 (n = 10 pools de 3 glandes). À droite les résultats de la campagne d'octobre 2021 (n = 3 pools de 20 glandes).

Pour chaque campagne, pour les sites avec une même lettre, les moyennes des concentrations ne sont pas significativement différentes (p-value < 0,01).

Conclusion

Ces deux premières campagnes de transplantation menées dans le cadre de la phase 8 du PIREN Seine renforcent la pertinence et l'intérêt de la dreissène pour le diagnostic du risque sanitaire en lien avec la contamination des masses d'eaux. En effet, après trois semaines de transplantation des dreissènes sur les cinq sites d'études le long de l'axe Seine et de ses affluents (Marne et Oise), une bioaccumulation des dreissènes en protozoaires, *T. gondii* et *G. duodenalis*, a pu être constatée sur certains sites. Nos travaux ont également permis de caractériser la cinétique d'accumulation et d'élimination des FRNAPH, proposés comme indicateurs de contamination virale d'origine fécale chez la dreissène. L'association des résultats obtenus lors de nos travaux réalisés en conditions contrôlées de laboratoire et *in situ* souligne le fort intérêt de l'utilisation de la dreissène pour évaluer et suivre la qualité des masses d'eau. Ces résultats seront complétés par i) des analyses des génogroupes des FRNAPH accumulés dans les dreissènes afin de renseigner sur une origine possible de la contamination, et ii) la recherche des génomes de Norovirus, pathogènes d'intérêt sanitaire. D'un point de vue plus opérationnel, les données obtenues en laboratoire et *in situ* serviront pour définir un modèle de type toxicocinétique, déjà classiquement utilisé en chimie, afin de permettre une prédiction de la concentration en FRNAPH infectieux dans la colonne d'eau sur la base de mesures réalisées dans les dreissènes.

L'utilisation de la dreissène pour la biosurveillance de la contamination biologique des masses d'eau est à mettre en regard avec le suivi de l'imprégnation chimique et de l'écotoxicité des contaminants environnementaux qui s'est poursuivi lors de cette seconde campagne de transplantation. Pour rappel, l'imprégnation des dreissènes en contaminants chimiques est étudiée par les collègues associés du PIREN-Seine (EPOC-P. Labadie et IPGP-M. Benedetti) en relation avec leurs actions respectives ; avec la détection et la quantification des composés perfluoroalkylés et des chloroalcanes, ainsi que des nanophasés de titane. Les teneurs des contaminants organiques déterminées dans les dreissènes seront confrontées aux teneurs déterminées dans les MES échantillonnées à l'aide de pièges à particules intégratifs. En parallèle, différents marqueurs de cytotoxicité (mortalité cellulaire), de génotoxicité (mesure des cassures de brins et des lésions oxydatives à l'ADN) et d'immunotoxicité en lien avec la phagocytose des hémocytes ou cellules immunitaires de la dreissène, sont mesurés afin de traduire l'état de santé général des dreissènes. Une troisième campagne de transplantation est prévue pour le mois de janvier 2023 sur les mêmes sites d'étude. A l'issue de ces trois campagnes sera dressé un bilan comparatif permettant d'établir un diagnostic temporel et spatial du risque sanitaire, chimique et écotoxicologique que représente la contamination des masses d'eau dans le bassin de la Seine. De même, l'objectif pour le diagnostic du risque écotoxicologique visera, sur la base des données

acquises à sélectionner, tout ou partie des réponses biologiques mesurées 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.

Bibliographie

- Armon, R. & Kott, Y. (1996). Bacteriophages as indicators of pollution. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 26(4), 299-335.
- Ashbolt, N. J., Grabow, W. O., & Snozzi, M. (2001). Indicators of microbial water quality. *Water quality: Guidelines, standards and health*, 289-316.
- Beekwilder, J., Nieuwenhuizen, R., Havelaar, A. H., & van Duin Leiden, J. (1996). An oligonucleotide hybridization assay for the identification and enumeration of F-specific RNA phages in surface water. *Journal of Applied Bacteriology*, 80(2), 179-186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03207.x>
- Bonnard, M., Baratelli, F., Barjhoux, I., Benedetti, M., Berthelot, N., Bigot-Clivot, A., Budzinski, H., David, E., Do Nascimento, J., Guérin, S., Labadie, P., Palos-Ladeiro, M., Richoux, R., Rocher, V. & Geffard, A. (2021). Diagnostic du risque écotoxicologique au niveau du bassin de la Seine. Rapport d'activités 2021 - PIREN Seine Phase 8.
- Bosch, A., Lucena, F., Gironés, R., & Jofre, J. (1986). Survey of viral pollution in Besós River (Barcelona). *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 87-91.
- Capizzi-Banas, S., Palos Ladeiro, M., Bastien, F., Bonnard, I., Boudaud, N., Gantzer, C., & Geffard, A. (2021). The Utility of *Dreissena polymorpha* for Assessing the Viral Contamination of Rivers by Measuring the Accumulation of F-Specific RNA Bacteriophages. *Water*, 13(7), 904.
- CEFAS. (2007). CEFAS standard operating procedure—Enumeration of male specific RNA bacteriophage in bivalve molluscan shellfish. <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:vHQEqw76L5kJ:https://www.cefas.co.uk/bacteriological-contamination-of-bivalves/information-centre/nrl-laboratory-protocols/enumeration-of-male-specific-rna-bacteriophages-in-bivalve-molluscan-shellfish/+&cd=2&hl=fr&ct=clnk&gl=fr>
- Cole, D., Long, S. C., & Sobsey, M. D. (2003). Evaluation of F+ RNA and DNA Coliphages as Source-Specific Indicators of Fecal Contamination in Surface Waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6507-6514. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6507-6514.2003>
- Doré, W. J., & Lees, D. N. (1995). Behavior of *Escherichia coli* and male-specific bacteriophage in environmentally contaminated bivalve molluscs before and after depuration. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 2830-2834. <https://doi.org/10.1128/aem.61.8.2830-2834.1995>
- Fauvel, B., Cauchie, H.-M., Gantzer, C., & Ogorzaly, L. (2016). Contribution of hydrological data to the understanding of the spatio-temporal dynamics of F-specific RNA bacteriophages in river water during rainfall-runoff events. *Water Research*, 94, 328-340.
- Fauvel, B., Gantzer, C., Cauchie, H.-M., & Ogorzaly, L. (2017). In situ dynamics of F-specific RNA bacteriophages in a small river: New way to assess viral propagation in water quality studies. *Food and environmental virology*, 9(1), 89-102.
- Flannery, J., Keaveney, S., & Dore, W. (2009). Use of FRNA bacteriophages to indicate the risk of norovirus contamination in Irish oysters. *Journal of food protection*, 72(11), 2358-2362.
- Fontaine, M. and E. Guillot (2002). Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*. *FEMS Microbiology Letters* 214, 13–17.
- Guttman, B., Raya, R., & Kutter, E. (2005). Basic phage biology. *Bacteriophages: Biology and applications*, 4, 30-63.
- Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., & Ohgaki, S. (2005). Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses, and torque teno viruses in the Tamagawa River in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2403-2411.
- Hartard, C., Banas, S., Loutreul, J., Rincé, A., Benoit, F., Boudaud, N., & Gantzer, C. (2016). Relevance of F-specific RNA bacteriophages in assessing human norovirus risk in shellfish and environmental waters. *Applied and environmental microbiology*, 82(18), 5709-5719.
- Hartard, C., Rivet, R., Banas, S., & Gantzer, C. (2015). Occurrence of and Sequence Variation among F-Specific RNA Bacteriophage Subgroups in Feces and Wastewater of Urban and Animal Origins. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(18), 6505-6515. <https://doi.org/10.1128/AEM.01905-15>

Harwood, V. J., Boehm, A. B., Sassoubre, L. M., Vijayavel, K., Stewart, J. R., Fong, T.-T., Caprais, M.-P., Converse, R. R., Diston, D., Ebdon, J., Fuhrman, J. A., Gourmelon, M., Gentry-Shields, J., Griffith, J. F., Kashian, D. R., Noble, R. T., Taylor, H., & Wicki, M. (2013). Performance of viruses and bacteriophages for fecal source determination in a multi-laboratory, comparative study. *Water Research*, 47(18), 6929-6943. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.064>

Harwood, V. J., & Stoeckel, D. M. (2011). Performance criteria. In *Microbial source tracking : Methods, applications, and case studies* (p. 7-30). Springer.

Havelaar, A. H., Furuse, K., & Hogeboom, W. M. (1986). Bacteriophages and indicator bacteria in human and animal faeces. *Journal of Applied Bacteriology*, 60(3), 255-262. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1986.tb01081.x>

Havelaar, A. H., & Hogeboom, W. M. (1984). A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. *Journal of Applied Bacteriology*, 56(3), 439-447. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1984.tb01372.x>

Havelaar, A. H., Olphen, M. van, & Drost, Y. C. (1993). F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(9), 2956-2962. <https://doi.org/10.1128/aem.59.9.2956-2962.1993>

Hsu, F. C., Shieh, Y. S., Duin, J. van, Beekwilder, M. J., & Sobsey, M. D. (1995). Genotyping male-specific RNA coliphages by hybridization with oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(11), 3960-3966. <https://doi.org/10.1128/aem.61.11.3960-3966.1995>

ISO10705-1. (2001a). *International Organization for Standardization, 2001a. ISO 10705-1. Water quality : Detection and enumeration of bacteriophages. Part 1 : Enumeration of F-specific RNA bacteriophages. Geneva, Switzerland.* <https://www.iso.org/standard/18794.html>

Jofre, J., Blanch, A. R., Lucena, F., & Muniesa, M. (2014). Bacteriophages infecting Bacteroides as a marker for microbial source tracking. *Water research*, 55, 1-11.

Lélu, M., E. Gilot-Fromont, D. Aubert, A. Richaume, E. Afonso, E. Dupuis, C. Gotteland, F. Marnef, M.-L. Pouille, 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.

Ogorzaly, L., & Gantzer, C. (2006). Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups : Application to urban raw wastewater. *Journal of virological methods*, 138(1-2), 131-139.

Ottoson, J., Hansen, A., Westrell, T., Johansen, K., Norder, H., Stenström, T.A., 2006. Removal of Noro- and Enteroviruses, *Giardia* Cysts, *Cryptosporidium* Oocysts, and Fecal Indicators at Four Secondary Wastewater Treatment Plants in Sweden. *Water Environment Research* 78, 828–834. <https://doi.org/10.2175/106143006X101719>

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.

Schaper, M., Duran, A. E., & Jofre, J. (2002). Comparative resistance of phage isolates of four genotypes of F-specific RNA bacteriophages to various inactivation processes. *Applied and environmental microbiology*, 68(8), 3702-3707.

Sundram, A., Donnelly, L., Ehlers, M. M., Vrey, A., Grabow, W. O. K., & Bailey, I. W. (2002). Evaluation of F-RNA coliphages as indicators of viruses and the source of faecal pollution. *Water SA*, 86-91.

Sundram, A., Jumanla, N., & Ehlers, M. M. (2006). Genotyping of F-RNA coliphages isolated from wastewater and river water samples. *Water SA*, 32(1), 65-70.

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.

WHO. (2010). *Joint monitoring programme for water supply and sanitation: Report on intercountry workshop, Jakarta, Indonesia, 27-29 April 2009.* WHO Regional Office for South-East Asia.

Yates, M. V. (2007). Classical indicators in the 21st century—Far and beyond the coliform. *Water environment research*, 79(3), 27.

Sitographie

[1] Eau France, La pollution de l'eau et des milieux, 11 avril 2019 (Pollutions / Pressions sur les milieux et risques). <https://www.eaufrance.fr/la-pollution-de-leau-et-des-milieux> (16/02/2021)