HAL
open science

Impact du milieu urbain sur un organisme modèle : réponses biologiques chez les dreissènes transplantées dans le bassin de l'Orge

Adeline Bourgeault, Frédéric Palais, Adeline Arini, Sylvie Biagianti-Risbourg, Alain Geffard, Catherine Gourlay-Francé, Sandrine Pain-Devin, Emmanuelle Uher, Françoise Vincent-Hubert

To cite this version:

Adeline Bourgeault, Frédéric Palais, Adeline Arini, Sylvie Biagianti-Risbourg, Alain Geffard, et al.. Impact du milieu urbain sur un organisme modèle : réponses biologiques chez les dreissènes transplantées dans le bassin de l'Orge. [Rapport de recherche] irstea. 2009, pp.18. hal-02592664

HAL Id: hal-02592664

https://hal.inrae.fr/hal-02592664v1

Submitted on 15 May 2020

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

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

Impact du milieu urbain sur un organisme modèle : réponses biologiques chez les dreissènes transplantées dans le bassin de l'Orge

Adeline Bourgeault[1] *, Frédéric Palais[2], Adeline Arini[1], Sylvie Biagianti-Risbourg[2], Alain Geffard[2], Catherine Gourlay-Francé[1], Sandrine Pain-Devin[3], Emmanuelle Uher[1], Francoise Vincent-Hubert[1]

[1] Cemagref, UR Hydrosystèmes et Bioprocédés, Parc de Tourvoie, Antony.

[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 adeline.bourgeault@cemagref.fr

1. Introduction 1
2. Matériels et méthodes 2
2.1. Sites d'échantillonnage et déploiement des organismes 2
2.2. Prélèvements 3
2.3. Traitement des échantillons au laboratoire 3
2.3.1 Analyses chimiques de l'eau et des dreissènes 3
2.3.2 Indice de condition 3
2.3.3 Marqueurs de génotoxicité 4
2.3.4 Marqueurs biochimiques 4
3. Résultats et discussion 5
3.1. Caractérisation des sites 5
3.2. Bioaccumulation dans les organismes 7
3.2.1 Indice de condition 7
3.2.2 Bioaccumulation des métaux 8
3.2.3 Bioaccumulation des HAP 9
3.3. Marqueurs biochimiques 10
3.4. Biomarqueurs de génotoxicité 15
3.4.1 Cassures de brins d'ADN 15
3.4.2 Anomalies nucléaires dans les cellules de l'hémolymphe et les branchies 16
4. Conclusion 17
5. Bibliographie 17

1. Introduction

L'objectif de cette étude était d'observer in situ l'impact des micropolluants métalliques et organiques sur des organismes aquatiques modèles (les dreissènes) ainsi que les effets toxiques associés. Cette étude a été réalisée sur le site atelier de l'Orge. Le bassin de l'Orge présente une variabilité d'occupation des sols relativement marquée avec un amont rural et un aval très urbanisé. Ceci lui confère un intérêt tout particulier dans l'étude des pressions anthropiques.

Au cours de cette étude (initiée en 2007) différents paramètres ont été analysés; à la fois sur le milieu (physico-chimie, concentration en micropolluants) et sur les organismes (bioaccumulation, génotoxicité, marqueurs biochimiques). Lors de la campagne de 2007, il a été mis en évidence peu de différence de contamination entre les 5 sites étudiés, en termes de contamination métallique du milieu mais également en termes de contamination des dreissènes. C'est pourquoi une seconde campagne a été lancée en avril 2008 et pour laquelle nous avons choisi un site bien plus en amont. Nous présentons ici les méthodologies utilisées et les résultats obtenus lors des campagnes 2007 et 2008.

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

2. Matériels et méthodes

2.1. Sites d'échantillonnage et déploiement des organismes

En septembre 2007, les dreissènes ont été transplantées sur 5 sites :

- 1 : Orge aval, à Athis-Mons, juste avant la confluence avec la Seine
- 2 : l'Yvette, juste avant la confluence avec l'Orge
- 3 : Orge en amont de l'Yvette
- 4 : Orge amont, intitulé Orge aval Rémarde dans les graphiques suivants, à Saint-Germain-lès-Arpajon
- 5 : La Prédecelle, en amont du bassin.
  Cette campagne s'est déroulée sur un mois (du 25 septembre au 23 octobre 2007).

En 2008, la campagne s'est déroulée sur deux mois (du 20 mars au 15 mai), deux sites ont été retenus :

- 1 : l'Orge à Athis-Mons
- 6 : la Renarde à Villeconin (91)

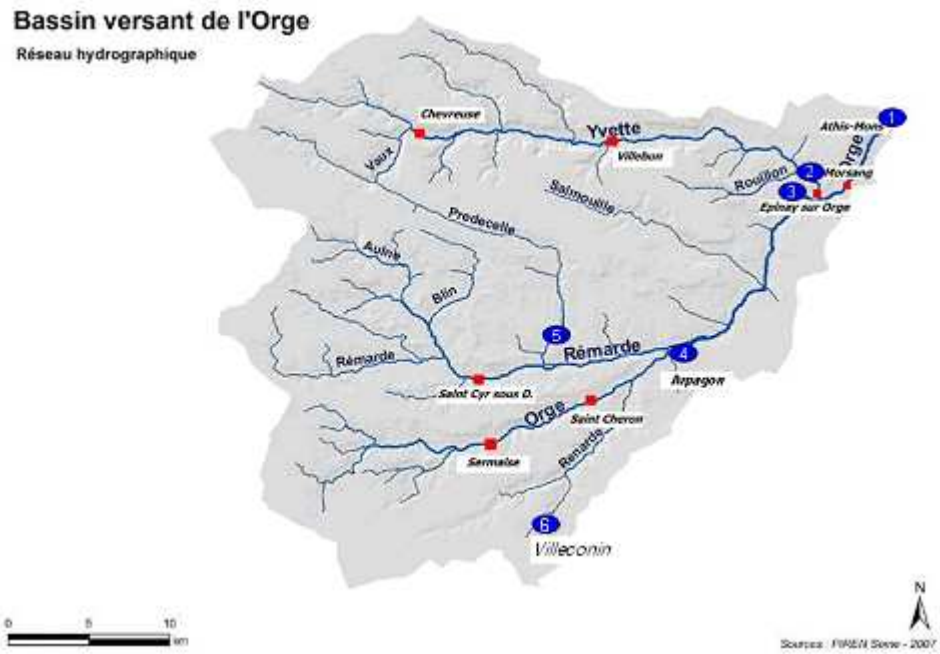


Figure 1: Sites d'études du bassin de l'Orge

Figure 2: Photo de cages contenant un lot de dreissène

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

Les dreissènes ont été prélevées dans la Meuse la veille du déploiement sur les sites. Elles ont été calibrées (20-22mm), réparties dans des cages (Figure 2), puis transplantées sur les sites (Figure 1).

2.2. Prélèvements

Pour chacune des 2 campagnes, le pH et la conductivité ont été mesurés in situ à chaque passage sur les sites. La température a été suivie en continu grâce à des sondes. Des prélèvements ponctuels ont été réalisés afin de mesurer les métaux totaux, particulaires et dissous, les HAP particulaires et dissous, le COD, le COP, la concentration en chlorophylle, phéopigments, ions majeurs et hydrogénocarbonates (TAC). Ces prélèvements ont été effectués toutes les semaines lors de la campagne 2007 et toutes les 2 semaines lors de celle de 2008.

Les métaux labiles ont été évalués par le déploiement de DGT (DGT Research, Davison et Zang, 1994) en 2 séries de 2 semaines pour la campagne 2007 et 2 séries de 4 semaines pour la campagne 2008. Les DGT sont des capteurs passifs permettant d'échantillonner les métaux labiles; ils sont constitués d'un résine chelex-100, d'un gel de diffusion restrictif et de 2 filtres (un filtre PES de 0,45 µm et un filtre PC de 0,4 µm) (Tusseau-Vuillemin, 2003).

En 2007 les dreissènes transplantées ont été prélevées après un mois d'exposition pour des analyses chimiques (concentration en métaux dans les tissus), la mesure de l'indice de condition et des biomarqueurs.

En 2008, sur l'ensemble des dreissènes transplantées, 20 organismes sont prélevés tous les 15 jours pour les analyses chimiques (métaux et HAP dans les tissus) et pour la mesure de l'indice de condition. 40 dreissènes sont prélevées à un et deux mois d'exposition pour les analyses de génotoxicité et de marqueurs biochimiques.

2.3. Traitement des échantillons au laboratoire

2.3.1 Analyses chimiques de l'eau et des dreissènes[1]

La concentration en métaux dissous du milieu à été évaluée en filtrant 20ml d'eau à travers un filtre PES de porosité 0,45µm. L'échantillon est acidifié (1%HNO_3) puis analysé par ICP-MS.

Les échantillons destinés à l'analyse des métaux totaux et particulaire sont minéralisés par DigiPREP puis analysés en ICP-MS.

Les 20 dreissènes prélevées par site, sont congelées à -80°C puis lyophilisées. 5 subissent une digestion acide à froid puis sont utilisées pour l'analyse des métaux dans les tissues (analyse individuelle par ICP-AES).

Les 15 restantes sont poolées, réduites en poudre et servent à l'analyse des HAP. 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 colonne de silice, concentré puis analysé par GC-MS. Ce protocole d'extraction a été validé par l'utilisation d'un matériel de référence (Mussel Homogenate IAEA-432).

Du fait de difficultés analytiques, il n'a pas été possible d'obtenir de mesure fiable des concentrations en HAP labile, dissous et particulaire dans le milieu.

2.3.2 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.

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

[1] Les résultats concernant les mesures chimiques de métaux et de HAP de la campagne 2007 sont présentés dans le rapport d'activité 2008 du PIREN-Seine. Certains résultats seront rappelés pour mémoire et comparaison. Ici, nous présenterons surtout les résultats des mesures de la campagne 2008.

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

2.3.3 Marqueurs de génotoxicité

Lors de la campagne 2008, le test comète et le test micronoyaux (MN) ont été réalisés sur les moules exposées pendant 30 et 60 jours à Villeconin et Athis-Mons (10 moules par site). Deux tissus ont été analysés, les branchies et l'hémolymphe. Les analyses ont été effectuées dès le retour au laboratoire. Les protocoles du test comète et du test MN sont présentés dans un rapport conjoint (rapport 2b, 2008).

Branchies: les tests comète et MN ont été effectués sur 10 dreissènes analysées de manière indépendante. Pour le test comète, 100 cellules ont été analysées par individu, soit 1000 cellules par site. Le taux de cassures de l'ADN est exprimé par site, le paramètre retenu est le tail DNA (% d'ADN dans la queue de comète). Pour le test MN, 1000 cellules ont été analysées/lame, soit 10000 cellules/site.

Hémolymphe: Compte tenu des difficultés de prélèvement d'hémolymphe, deux pools cellulaires ont été effectués, chaque pool contenant l'hémolymphe de 5 moules. Au total, 200 cellules/site ont été analysées pour le test comète, et 2000 cellules/site pour le test MN.

2.3.4 Marqueurs biochimiques

Les Glutathion-S-Transférases (GST) sont une famille d'enzymes impliquées dans plusieurs processus de défense des animaux contre les contaminants. Cette famille enzymatique est notamment majoritairement impliquée dans les réactions de conjugaison, qui sont des réactions de détoxication des contaminants, ainsi que dans le métabolisme du glutathion qui est une molécule primordiale dans la lutte contre le stress oxydant. Etant donné sa position dans les systèmes enzymatiques de défense cellulaire, l'activité des GST est considérée comme un biomarqueur d'exposition des organismes à la contamination de leur milieu.

Pour chaque condition étudiée, 10 dreissènes ont été disséquées 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).

Les métallothionéines (MT), sont des protéines cytosoliques de faible poids moléculaire capables de chélater les métaux, les empêchant ainsi d'exercer leur activité toxique (Amiard et al 2006). Ces protéines interviennent dans la physiologie normale des organismes dans la mesure où elles participent à la régulation homéostatique des métaux essentiels, mais elles sont également impliquées dans la gestion des métaux non essentiels qui sont toxiques. L'induction des métallothionéines est couramment utilisée en tant que biomarqueur d'exposition à la contamination.

Pour chaque condition d'étude, 6 dreissènes ont été disséquées afin d'isoler la glande digestive. Les glandes ont été homogénéisées dans un tampon Tris (20 mM) NaCl (150 mM) de pH 8,6 avec du β-mercaptoethanol (10-5 mM) comme antioxydant. Après une centrifugation, les métallothionéines, protéines cytosoliques, sont séparées des autres protéines par choc thermique (15 min à 75°C, puis 30 min dans la glace). Une seconde centrifugation permet de conserver dans le surnageant les métallothionéines thermostables. Les métallothionéines sont quantifiées par une méthode polarographique basée sur la quantification des groupements thiols (Thompson & Cosson, 1984)

Les enzymes digestives, choisies dans cette étude sont l'amylase et l'endoglucanase. Les conditions analytiques de mesure de l'activité de ces enzymes sont présentées dans un rapport conjoint (rapport 2b, 2008).

En automne 2007, pour chaque site d'étude, les activités ont été mesurées sur trois individus différents. Pour cette première étude les stylets cristallins n'ont pas été analysés. Au printemps 2008, pour chaque site (Villeconin et Athis-Mons) et date d'exposition (30 et 60 J) les activités ont été mesurées dans 5 glandes digestives individuellement et au niveau de 4 pools de stylets cristallins.

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

3. Résultats et discussion

3.1. Caractérisation des sites

Données physico-chimiques:

Les données physico-chimiques montrent qu'Athis-Mons est plus chargé en matière organique que Villeconin. En effet les concentrations en MES, chlorophylle et phéopigment sont supérieures à Athis-Mons (Figure 3).

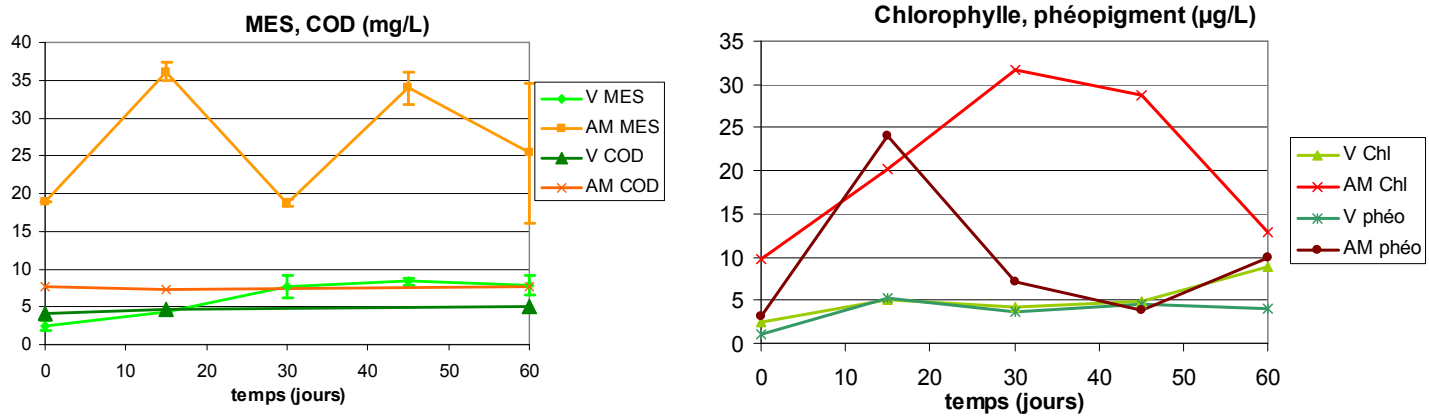


Figure 3: Evolution des paramètres globaux sur les deux sites de l'Orge (Villeconin et Athis-Mons) en 2008

Au cours des 2 mois d'exposition la température de l'eau a fortement augmenté (de 8 à 18°C à Athis-Mons, de 9 à 14°C à Villeconin).

Contaminations métalliques:

Les concentrations en métaux dissous et totaux ne montrent pas d'évolution significative au cours du temps (Figure 4, Figure 6). Les concentrations en métaux dissous obtenues à Athis-Mons montrent que ce site est très impacté par les activités urbaines, ce que traduit les fortes concentrations en certains métaux tels que les Cu, Zn, Cd et Pb. Elles sont comparables au niveau moyen de contamination de la Seine (Tusseau-Vuillemin, 2007). Pour l'ensemble des analyses Athis-Mons apparait comme le site le plus contaminé (Figure 4, Figure 5, Figure 6). Les concentrations mesurées sont comparable à celles de la campagne 2007.

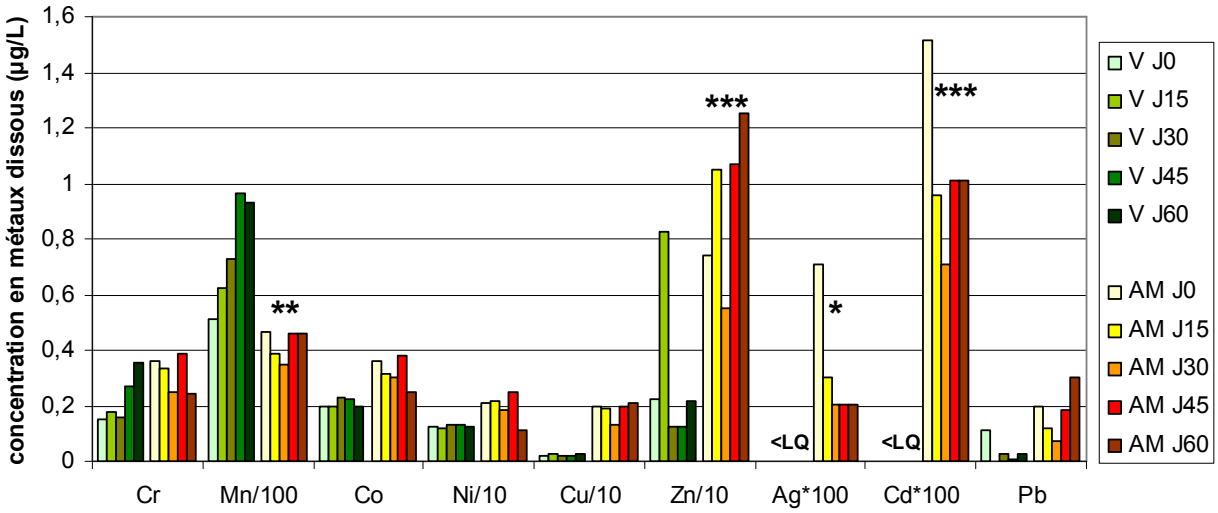


*Figure 4: Evolution des concentrations en métaux dissous à Athis-Mons (AM) et Villeconin (V) au cours de l'exposition (<LQ : inférieur à la limite de quantification). Valeurs significativement différentes entre les 2 sites en considérant la contamination moyenne au cours de l'exposition ou la valeur de la LQ dans le cas de Cd et Ag (Test HSD Tukey post ANOVA, ***p<0,001, ** p<0,05, * p<0,1)*

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

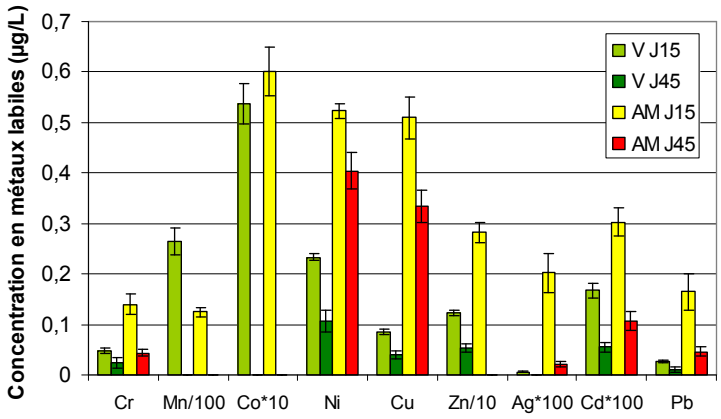


Figure 5: Concentrations en métaux labiles à Athis-Mons (AM) et Villeconin (V) évaluées par DGT. Valeurs significativement différentes entre les 2 sites (Z-Test, p<0.5) sauf pour le Co, le Cr à J45 et le Cd à J45.

Certaines concentrations en métaux labiles n'ont pas pu être exploitées suite à des difficultés analytiques.

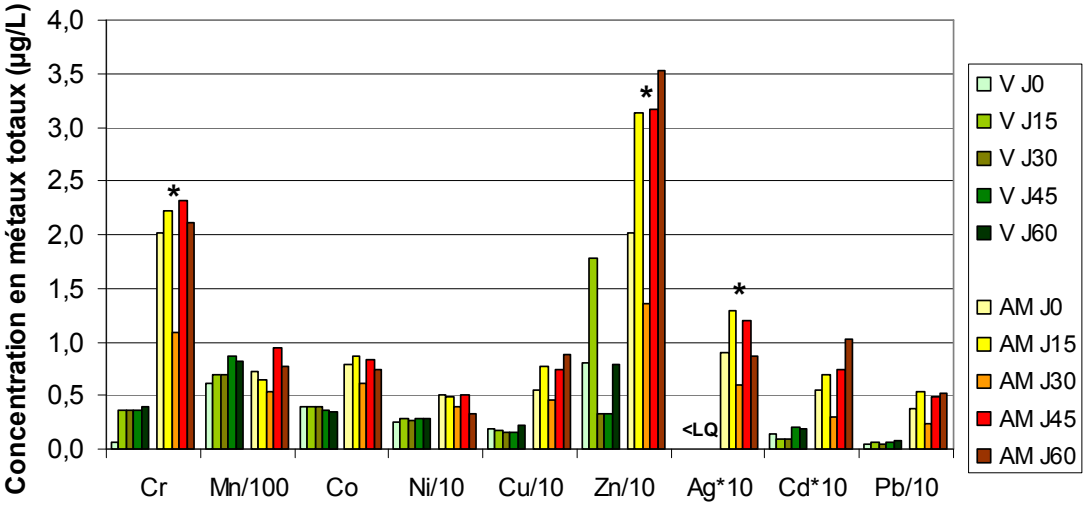


*Figure 6: Evolution des concentrations en métaux totaux à Athis-Mons (AM) et Villeconin (V) au cours de l'exposition. * Valeurs significativement différentes entre les 2 sites en considérant la contamination moyenne au cours de l'exposition (Test HSD Tukey post ANOVA, p<0,001).*

A partir de ces données (Figure 5), le pourcentage de métaux labiles par rapport aux métaux dissous a pu être calculé (Tableau 1). Ces valeurs sont cohérentes avec celles observées par Tusseau-Vuillemin (2007) sur la Seine et la Marne (Co: 20-29%, Ni: 42-52%, Cu:25%, Cd: 29-37%).

Tableau 1:Pourcentage de métaux labiles par rapport aux métaux dissous, - : valeurs non disponibles car concentrations de métaux dissous ou labiles non déterminées.

		Cr	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	Ag	Cd
Campagne 2008	V J15	29 ± 6	42 ± 11	26 ± 5	19 ± 1	40 ± 9	31 ± 30	-	-
	V J45	9 ± 9	-	-	8 ± 3	19 ± 8	34 ± 17	-	-
	AM J15	44 ± 15	31 ± 6	18 ± 3	26 ± 3	30 ± 8	36 ± 13	50 ± 38	29 ± 15
	AM J45	15 ± 7	-	-	22 ± 9	19 ± 6	-	10 ± 5	12 ± 5
Campagne 2007	AM		76 ± 6		19 ± 5	10 ± 4	13 ± 3		

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

Il n'apparait pas différence marquée entre les sites bien que les ligands organiques présents dans le milieu ne soit probablement pas les mêmes entre l'amont et l'aval du bassin. En effet les teneurs en COD, ligands potentiels des métaux, sont presque deux fois plus fortes en aval à Athis-Mons qu'en amont. Notons que les écarts type sont relativement élevés pour le zinc et l'argent. Ceci est principalement dû à la variation de concentration en métaux dissous dans le milieu.

Les DGT étaient habituellement déployés sur les sites pendant 15 jours. Lors de la campagne 2008 nous avons validé des essais sur une période d'un mois. Les résultats ont en effet montré une accumulation linéaire des métaux sur cette durée. La Figure 7 montre un des exemples d'accumulation du nickel dans la résine obtenus à Athis-Mons.

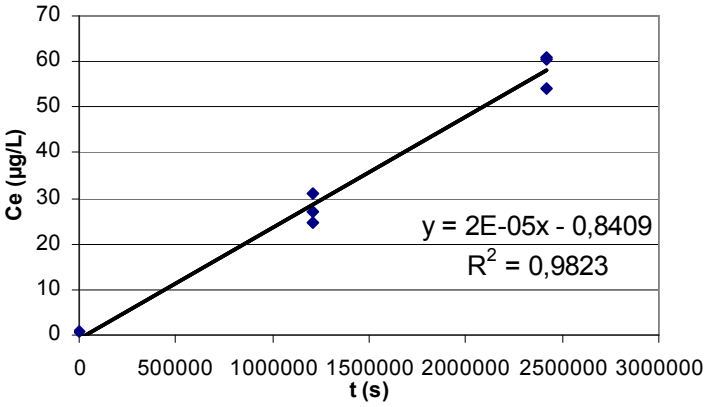


Figure 7: Accumulation du nickel labile dans les DGT au cours d'un mois d'exposition (exemple d'Athis-Mons J15)

3.2. Bioaccumulation dans les organismes

3.2.1 Indice de condition

Les résultats de la campagne 2008 montrent une évolution positive de l'indice de condition à Athis-Mons alors qu'il reste globalement stable à Villeconin (Figure 8). Le poids mou des dreissènes a presque doublé en deux mois d'exposition à Athis-Mons. Ceci est en accord avec les données physico-chimique (Figure 3, section 3.1) qui montrent un milieu nutritivement plus favorable à Athis-Mons.

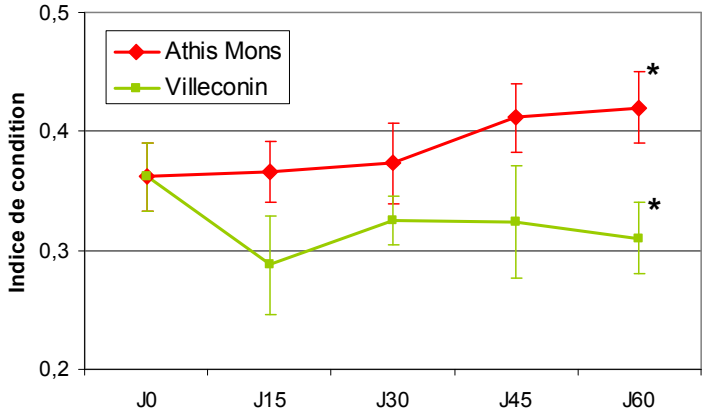


*Figure 8: Evolution de l'indice de condition au cours de l'exposition. *: valeurs significativement différentes entre les 2 sites (Z-Test, p<0.01)*

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

3.2.2 *Bioaccumulation des métaux*

Les concentrations en métaux dans les tissus de dreissènes lors de la campagne 2008 ne montrent pas de différence significative entre les deux sites étudiés, ni même de différence avec le témoin (J0) (Figure 9).

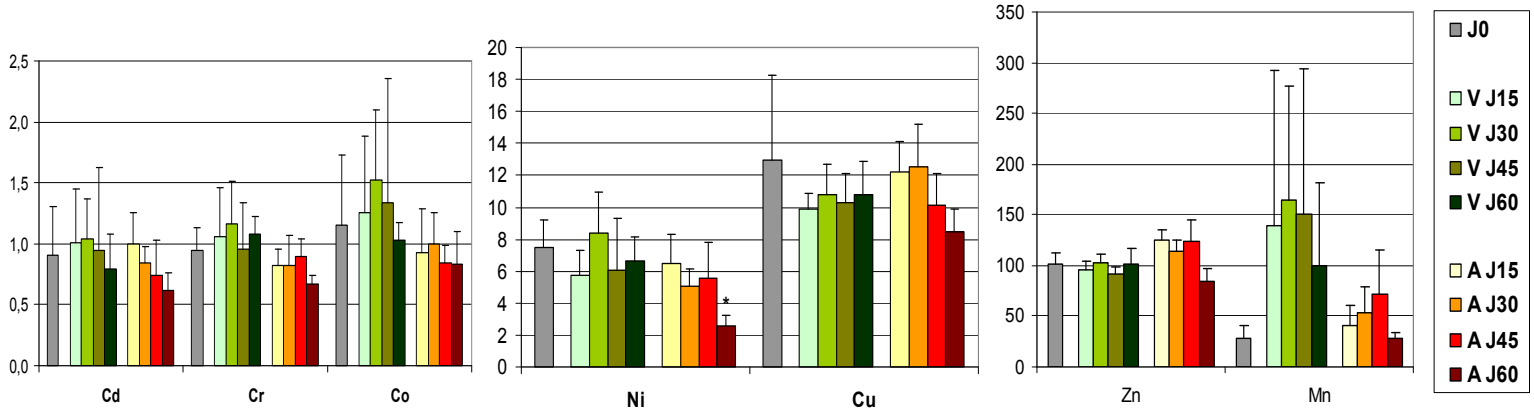


Figure 9: Bioaccumulation des métaux dans les dreissènes (µg/g poids sec).

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 ou les paramètres physico-chimique du milieu (cf. rapport 2.a). Ainsi l'absence apparente de lien entre la bioaccumulation chez les individus et les mesures dans l'eau peut être due à ces paramètres. Lors de cette campagne 2 hypothèses ont pu être proposées :

- une différence supposée de l'activité ventilatoire des dreissènes entre les sites. En effet d'après Reeders (1989 et 1990) plus un milieu est pauvre en MES plus le taux de filtration des dreissènes est important. D'après ces études le taux de filtration dans un milieu comparable à Athis-Mons ([MES]~30mg/L) serait de l'ordre de 50-60 ml/dreissène/heure alors que dans un milieu comme Villeconin ([MES]~8mg/L) il serait de 150-200 ml/dreissène/heure. Ainsi il est possible que les flux de contaminant entrant au sein des dreissènes exposées sur les 2 sites ne soit pas très différents, les plus faibles concentrations étant compensées par des volumes filtrés plus grands. Cependant, n'ayant pas mesuré l'activité ventilatoire in situ, cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée.
- l'évolution du poids des individus. En effet les individus exposés à Athis-Mons présentent un indice de condition plus élevé, traduisant des conditions physiologiques plus favorables (augmentation des tissus mous) ce qui peut engendrer un effet de dilution biologique masquant la bioaccumulation.

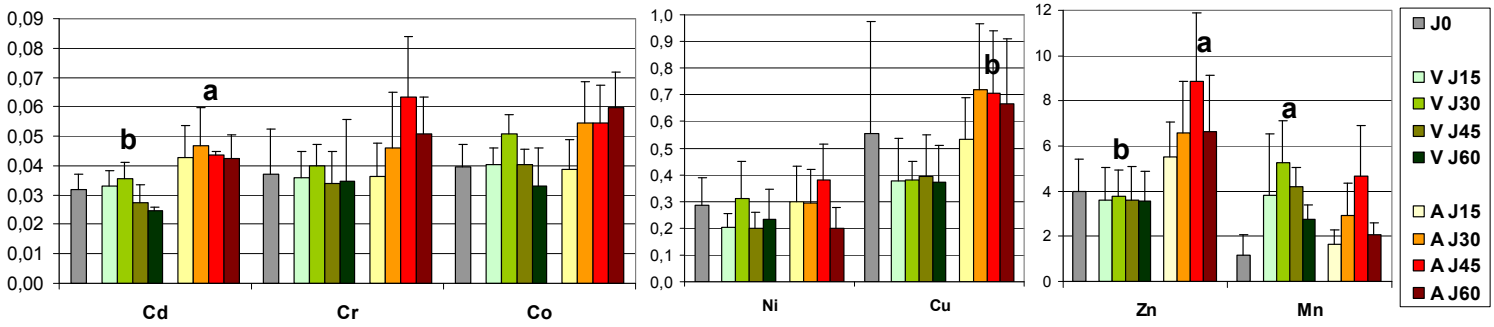


Figure 10: Concentrations en métaux dans les tissus de dreissènes au cours des 2 mois d'exposition pondérée par le poids des organismes. Tests statistiques appliqués sur les moyennes de chaque site (a: valeurs significativement différente du témoin J0, p<0.05; b: valeurs significativement différentes entre les 2 sites, p<0.05).

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

La seconde hypothèse est confirmée par les résultats de bioaccumulation pondérés par le poids des organismes (Figure 10), qui montrent une accumulation accrue en aval, où les teneurs dans l'eau en métaux sont plus élevées. Pour le Cr, Co, Ni, Cu, Zn et Cd les concentrations moyennes en métaux dans les tissus sont supérieures à Athis-Mons. Seul le Mn est plus accumulé à Villeconin, ce qui est en relation avec la contamination du milieu (Figure 4, Figure 5). De plus cette différence est validée statistiquement pour le Cu, le Zn et le Cd. Pour certains métaux il semble y avoir une tendance à la dépuration à Villeconin (Cd, Co, Cu) et une accumulation à Athis-Mons (Cr, Co, Cu, Zn, Mn) au cours de l'exposition.

Ainsi, la contamination des organismes reflète celle du milieu sous réserve de prendre en compte la physiologie de l'organisme (ici l'évolution du poids des tissus). Le lien entre la contamination du milieu et celle des organismes nécessite une bonne compréhension des facteurs de contrôle à la fois biologiques et environnementaux. Il apparaît donc primordial de comprendre, dans des conditions contrôlées, comment ces facteurs interviennent pour pouvoir moduler les résultats en fonction des paramètres du milieu.

3.2.3 Bioaccumulation des HAP

Pour la plupart des HAP, une nette différence d'accumulation peut être observée entre les 2 sites lors de la campagne 2008 (Figure 11). La concentration en HAP dans les organismes est supérieure à Athis-Mons, d'autant plus si les résultats sont pondérés par le poids des organismes (Figure 12). Une autre étude (Teil *et al*., 2009), menées sur le bassin de l'Orge en parallèle de la notre, nous a permis d'évaluer le niveau de contamination en HAP de 2 sites: Villeconin et Viry-Chatillon (quelques kms en amont d'Athis-Mons). Six HAP ont été dosés dans l'eau brute: BbF, BkF, BaP, *DbA*, BghiP et IcdP. Ces résultats montrent que le site aval est 4 à 5 fois plus contaminé que Villeconin, ce qui est en accord avec nos résultats.

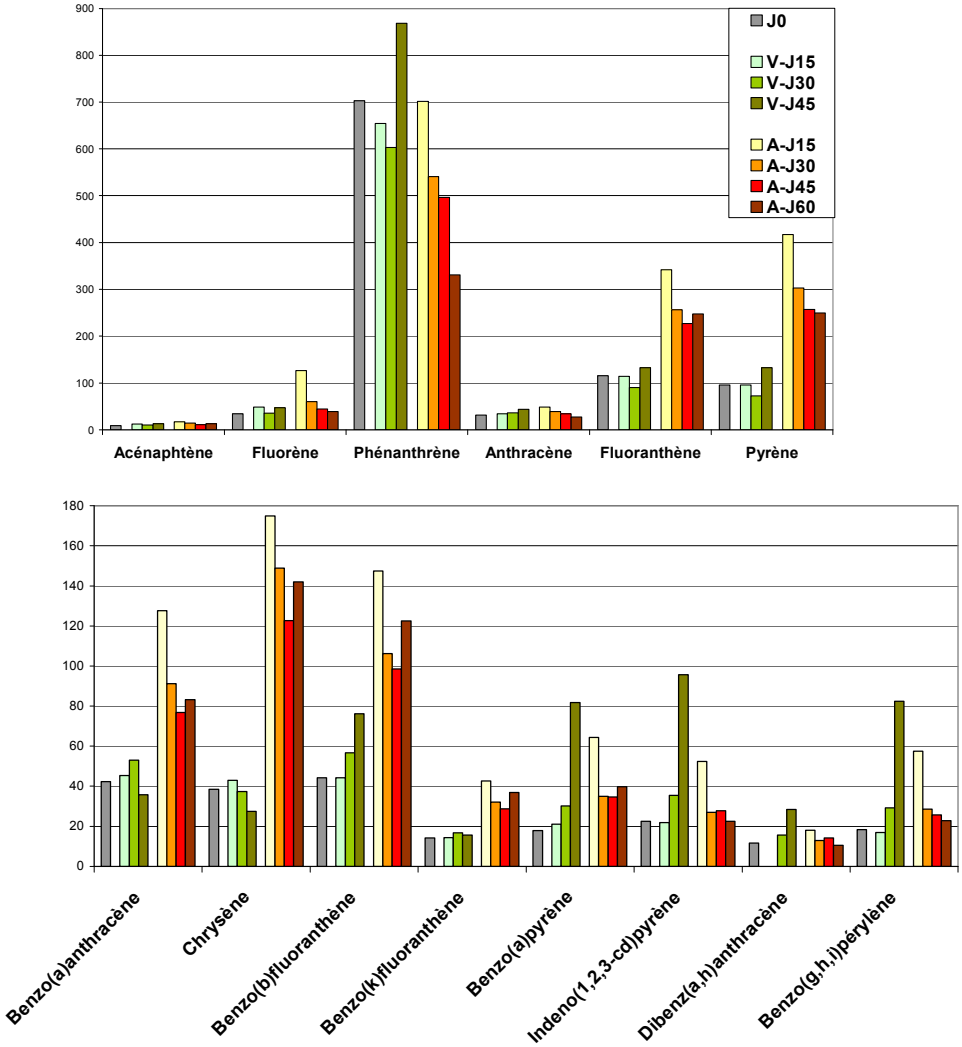


Figure 11: Concentration en HAP dans les tissus de dreissènes (ng/g poids sec).

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

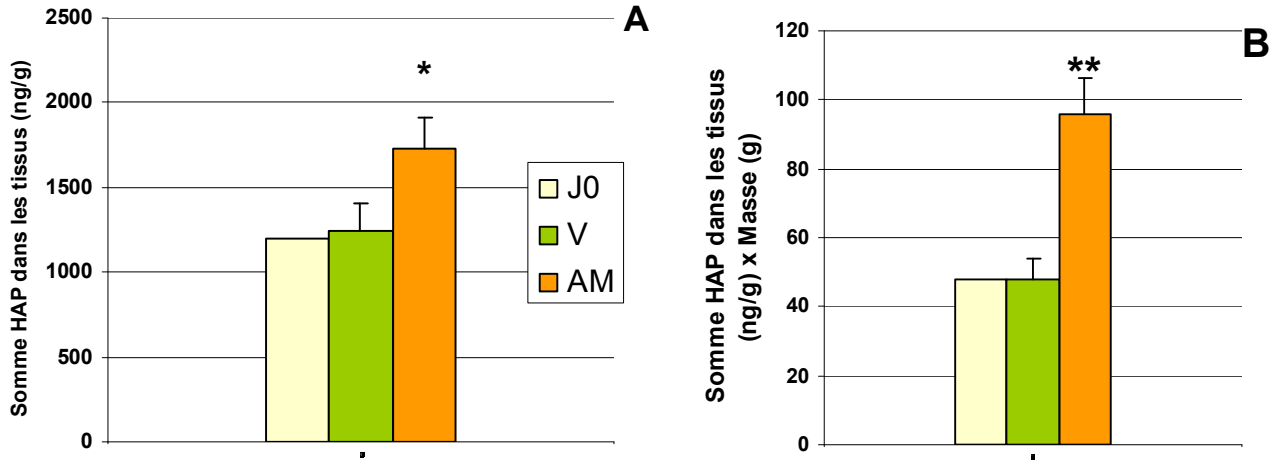


*Figure 12: Somme des concentrations en HAP dans les tissus de dreissènes, moyennée sur les 2 mois d'exposition (A) et pondéré par le poids des organismes (B) (valeurs significativement différente du témoin J0 et de l'autre site, z-test,*p<0.05, **p<0.001)*

3.3. Marqueurs biochimiques

Glutathion-S-Transférases (GST)

Les résultats concernant l'activité glutathion S-transférase sont présentés dans la Figure 13. En automne 2007, il est observé une augmentation de l'activité GST le long du gradient amont-aval. Les deux sites de l'Orge localisés en aval du bassin montrent en effet une activité accrue, mais la différence avec les sites plus en amont et avec l'activité témoin à J0 n'est pas significative. En revanche, l'activité mesurée chez les dreissènes exposées dans l'Yvette est clairement induite par rapport aux autres sites et par rapport au témoin, laissant supposer une exposition à des composés organiques de type électrophile plus importante sur ce site que sur les autres (Anova, F=7,28 ; p=0,002 - HSD Tukey, p<0,05)

Concernant la campagne du printemps 2008 les résultats obtenus pour l'activité GST sont assez différents. En effet ils montrent une réduction significative entre l'amont et l'aval du bassin versant. A Villeconin, site localisé en amont, l'activité GST est restée stable au cours de l'expérimentation et ne diffère pas du témoin J0. On peut donc supposer qu'il n'y pas eu d'exposition notable à des composés organiques susceptibles d'induire les mécanismes de biotransformation impliqués dans la protection cellulaire. En revanche, à Athis-Mons, site localisé en aval du bassin versant, les résultats montrent une réduction significative de l'activité GST (Anova, F=11,8 ; p<0,001 - HSD Tukey, p<0,05). Cette réduction s'amorce après 30 jours d'exposition (test t, p=0.02) et est clairement installée après 60 jours (test t, p<0.001). Cette réduction nette de l'activité de défense cellulaire est interprétée comme un dysfonctionnement traduisant une perturbation des organismes. Ces observations vont dans le sens d'une imprégnation plus importante, particulièrement en HAPs, des individus présents sur le site d'Athis-Mons.

Entre les deux campagnes il y a le site d'Athis-Mons en commun, et après 30 J d'exposition en automne ou au printemps l'activité chez les individus de ce site est relativement similaire. Or l'interprétation entre ces deux études apparaît différente. Ceci souligne l'importante influence de la saison considérée. En effet un niveau d'activité différent d'un facteur 3 est observé chez les témoins du J0 entre les deux saisons. Ces résultats soulignent l'importance de connaître l'influence possible de facteurs environnementaux (confusion) sur les réponses biologiques afin d'éviter toute erreur d'interprétation.

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

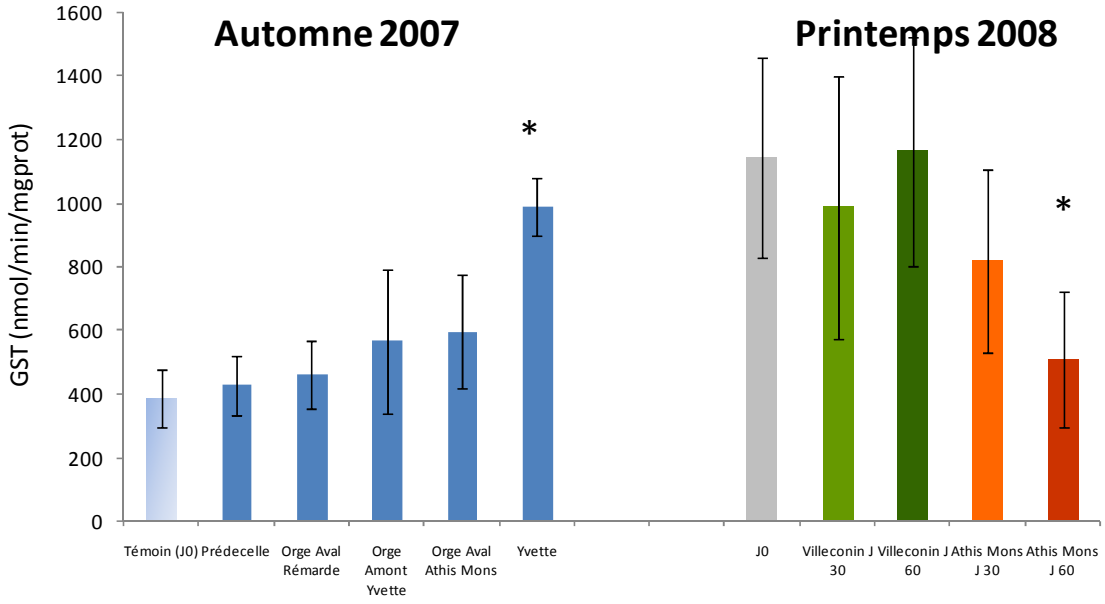


Figure 13: Evolution de l'activité GST exprimée en nanomoles de conjugué formé par minute et par mg de protéines) au niveau de la glande digestive des dreissènes exposées 30 jours sur les 5 sites du bassin de l'Orge en automne 2007 ou exposées 30 et 60 jours sur Villeconin et Athis-Mons au printemps 2008. indique une différence significative par rapport au Témoin et par rapport aux autres sites (Test HSD Tukey post ANOVA, p<0,05)*

Les métallothionéines (MT)

Les teneurs en MT ont été déterminées uniquement sur les dreissènes transplantées en période automnale (2007) et sont présentées sur la Figure 14. Une teneur en MT significativement supérieure est notée chez les individus transplantés sur les sites d'Orge aval Rémarde et Orge amont Yvette par rapport aux individus contrôles. La teneur en MT la plus faible est observée chez les individus exposés sur le site de l'Yvette. Les MT sont principalement impliquées dans l'homéostasie des éléments essentiels ou la détoxication des éléments en excès. Les résultats obtenus sont cohérents avec les mesures de bioaccumulation métallique (Pain-Devin et al., 2007). En effet ce sont les individus du site Yvette qui présentent les teneures métalliques les plus faibles. Parmi les autres sites présentant les plus fortes teneurs métalliques, il est difficile de définir un réel gradient car l'ordre est variable en fonction de l'élément considéré (Pain-Devin et al., 2007).

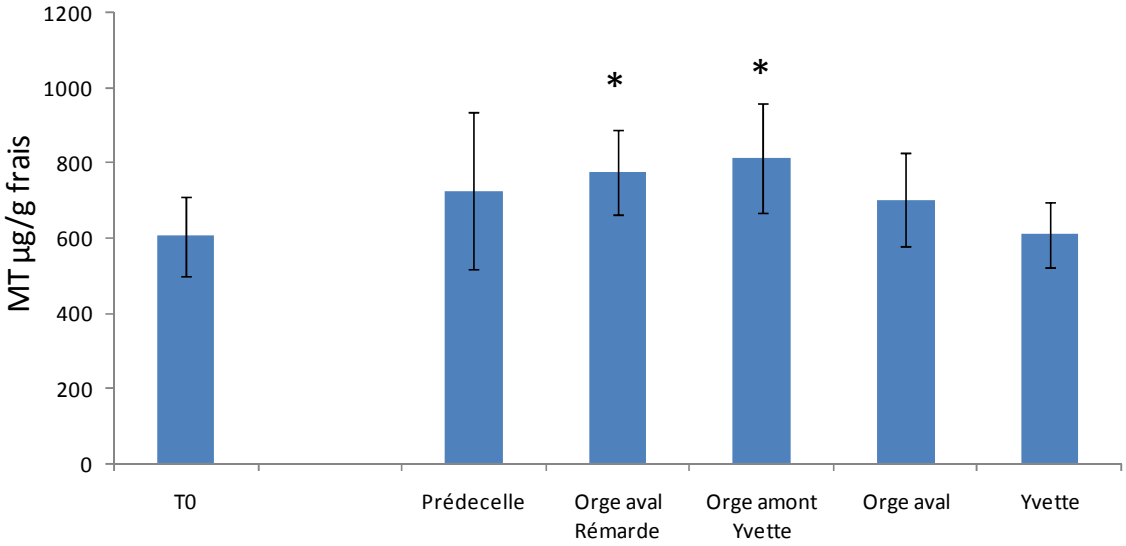


Figure 14: Evolution de la teneur en MT exprimée en µg/g de poids frais après 30 jours d'exposition sur les 5 sites du bassin de l'Orge en automne 2007. indique une différence significative par rapport au Témoin et par rapport au site Yvette (Test HSD Tukey post ANOVA, p<0,05).*

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

Le métabolisme digestif (amylase et endoglucanase)

Glande digestive

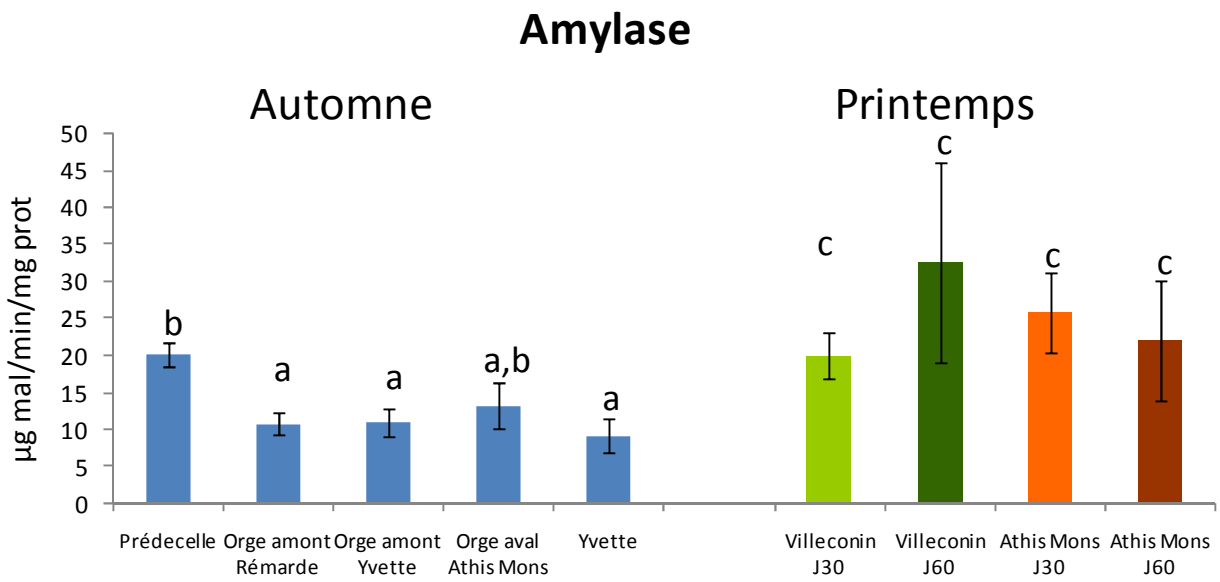
Les activités des enzymes digestives au niveau de la glande digestive des dreissènes exposées sur différents sites du bassin versant de l'Orge sont présentées sur la Figure 15. Concernant l'étude de l'automne 2007, les individus exposés 30J sur le site de la Prédecelle présentent une activité amylase supérieure aux dreissènes exposées aux autres sites, à l'exception d'Orge aval à Athis-Mons. A l'inverse les individus de la Prédecelle présentent une activité endoglucanase inférieure à ceux du site de l'Orge amont Rémarde. Pour les organismes transplantés durant le printemps 2008 aucune différence significative d'activité n'est observée pour l'amylase. En ce qui concerne l'endoglucanase, une activité significativement réduite est enregistrée chez les individus exposés sur le site d'Athis-Mons pendant 60J. Ces résultats sont cohérents avec ceux de l'activité GST, en particulier pour l'activité endoglucanase. Ceci peut traduire une perturbation générale du métabolisme des individus exposés pendant 60 J sur le site d'Athis-Mons.

Cependant, comme pour la GST, des différences importantes d'activités amylase et endoglucanase apparaissent entre les deux saisons. De façon générale, des activités enzymatiques plus élevées sont observées au printemps et ce tout particulièrement pour la cellulase. Ces différences peuvent être liées à des variations de paramètres environnementaux tels que la température, la nourriture (quantité, diversité…). Il apparaît donc important de mieux préciser l'importance relative de facteurs naturels (confusion) et de contamination sur l'activité de ces enzymes.

Stylet cristallin

Les activités des enzymes digestives ont été déterminées au niveau des stylets cristallins uniquement pour l'expérimentation du printemps 2008 (Figure 16). Après 30 ou 60 jours d'exposition, aucune différence intersites n'est observée. Par contre pour les deux enzymes et au niveau des deux sites, les individus exposés pendant 60 J présentent des activités significativement supérieures aux individus exposés seulement 30 J. Il est à noter durant cette expérimentation une augmentation importante de la température de l'eau qui est passée de 10°C pour J30 à 18°C pour J60. L'effet possible de cette augmentation de température sur l'activité des enzymes au niveau du stylet cristallin n'avait pas été mis en évidence au niveau de la glande. Ces résultats confirment la nécessité de mieux définir l'influence des facteurs naturels sur les réponses biologiques.

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref



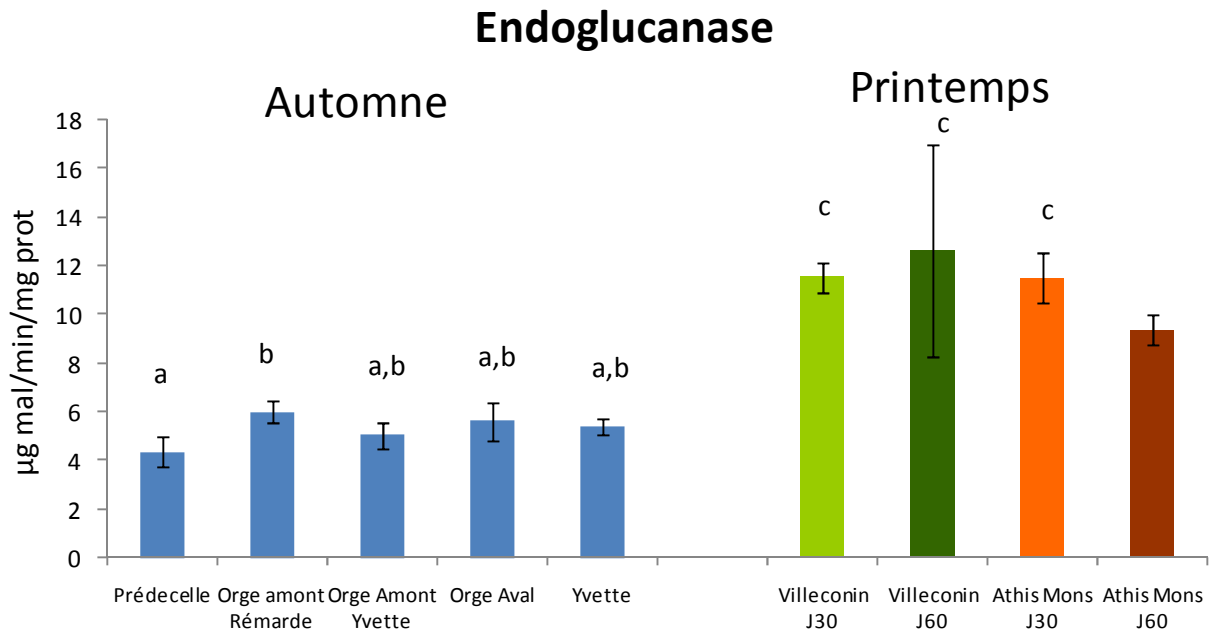


Figure 15: Evolution de l'activité des enzymes digestives, amylase et endoglucanase (exprimée en µg de maltose formé par minute et par mg de protéines) au niveau de la glande digestive des dreissènes exposées 30 jours sur les 5 sites du bassin de l'Orge en automne 2007 ou exposées 30 et 60 jours sur Villeconin et Athis-Mons au printemps 2008. Pour chaque saison les barres avec la même lettre ne présentent pas de différence significative (Test HSD Tukey post ANOVA, p<0,05)

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

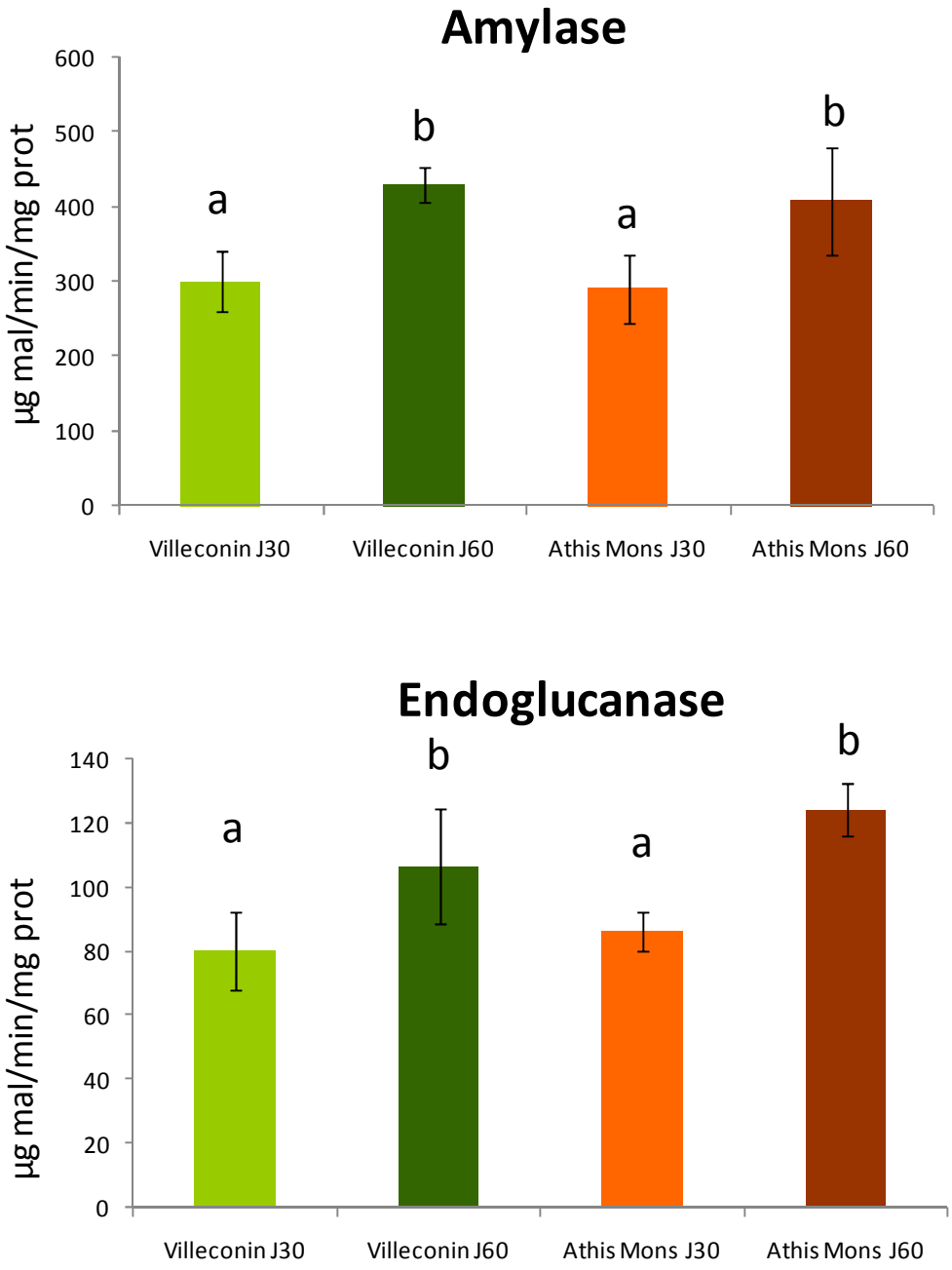


Figure 16: Evolution de l'activité des enzymes digestives, amylase et endoglucanase (exprimée en µg de maltose formé par minute et par mg de protéines) au niveau du stylet cristallin des dreissènes exposées 30 et 60 jours sur Villeconin et Athis-Mons au printemps 2008. Pour chaque date et chaque enzyme, les barres avec la même lettre ne présentent pas de différence significative (Test HSD Tukey post ANOVA, $p<0,05$)

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

3.4. Biomarqueurs de génotoxicité

3.4.1 Cassures de brins d'ADN

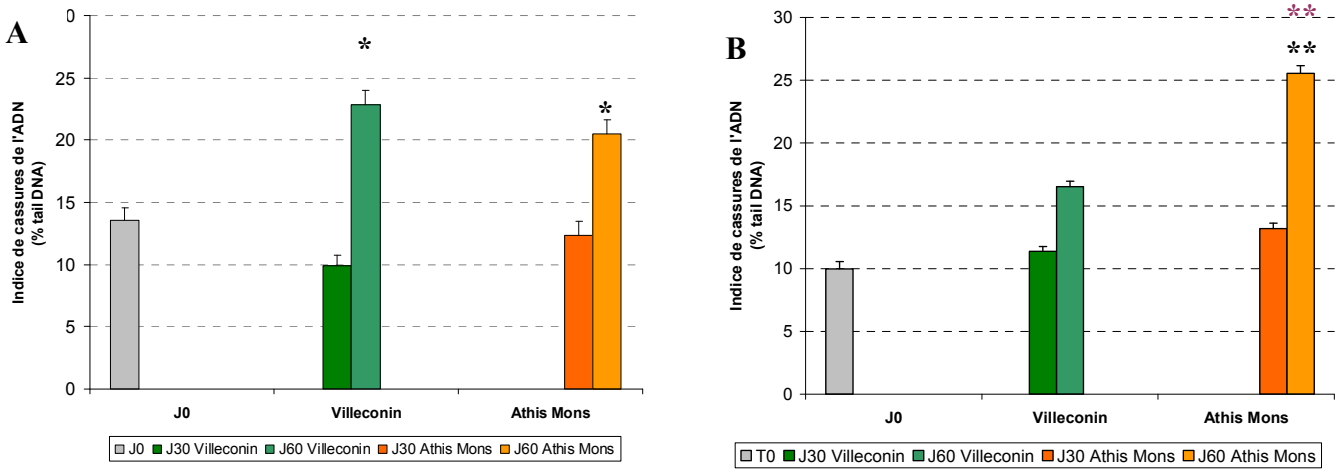


*Figure 17: Comparaison du tail DNA dans les cellules de l'hémolymphe (A) et dans les cellules de branchies (B) de dreissènes exposées pendant 30 et 60 jours dans le bassin de l'Orge. Les valeurs correspondent à la moyenne ± erreur type relative. ANOVA réalisé sur les moyennes des échantillons; différences significatives entre les valeurs à J0 et les valeurs des deux sites * p<0,01 ou ** p<0,001 et entre les valeurs de tail DNA à Athis-Mons et Villeconin** p<0,001.*

Le taux de cassures de l'ADN a été mesuré par le test comète dans les cellules de l'hémolymphe et les cellules de branchies de moules après 30 et 60 jours de transplantation. Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen d'ADN contenu dans la queue de la comète (% Tail DNA), (Figure 17). Le taux de cassures de l'ADN mesuré dans les moules de Commercy 5 jours après leur prélèvement dans le canal de l'Est a servi de référence (J0).

Après 30 jours de transplantation dans l'Orge, on n'observe pas de variation significative du taux de cassures de l'ADN dans les deux tissus, et cela quel que soit le site de transplantation. Par contre après 60 jours de transplantation, on observe une augmentation significative du taux de cassures de l'ADN dans les hémocytes par rapport à J0 (graphe A), et cela quel que soit le site d'étude. Enfin, c'est à J60 dans les cellules de branchies des moules d'Athis-Mons qu'on note le plus fort taux de cassures de l'ADN. Ce dernier résultat a permis de mettre en évidence une différence entre site après 60 jours de transplantation.

Le test comète est classiquement réalisé sur les hémocytes de dreissène (Pavlica et al., 2001; Buschini et al., 2003; Binelli, 2008). Cette nouvelle application du test comète aux cellules de branchie dans une étude de terrain montre que l'induction de cassures de l'ADN est plus élevée dans les branchies par rapport aux cellules de l'hémolymphe, ce qui pourrait être expliqué par une plus grande sensibilité des branchies aux agents génotoxiques, résultant d'une réparation de l'ADN moins efficace.

On doit néanmoins souligner le fait que la température de l'eau a augmenté de 10°C entre J30 (10°C) et J60 (18°C). La température de l'eau in situ pourrait stimuler l'activité de filtration, 15°C étant considéré comme la température optimum de filtration chez la dreissène. Cette élévation de température se répercuterait sur l'exposition et la métabolisation des micropolluants et, au final cela se traduirait aussi par une augmentation de la génotoxicité. Récemment, (Pavlica et al. 2008) ont montré une variabilité saisonnière du taux de MN sur les sites pollués par rapport au site de référence.

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

3.4.2 Anomalies nucléaires dans les cellules de l'hémolymphe et les branchies

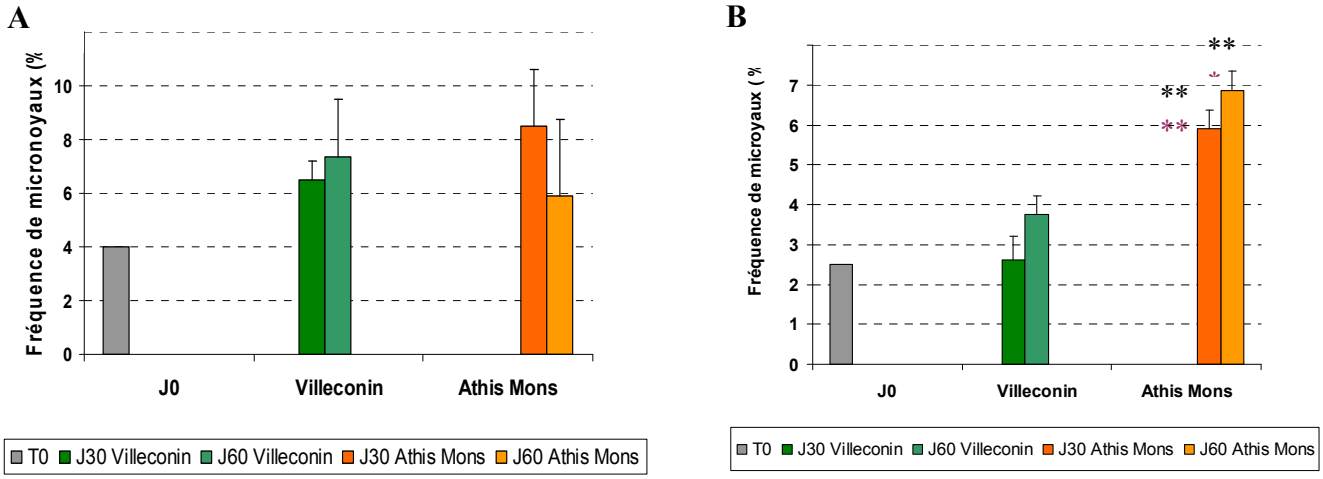


*Figure 18: Comparaison de la fréquence de micronoyaux dans les cellules de l'hémolymphe (A) et de branchies (B) de dreissènes exposées pendant 30 et 60 jours dans le bassin de l'Orge. ANOVA réalisé sur les moyennes des échantillons; différences significatives entre les valeurs à J0 et les valeurs des deux sites ** p<0,001 et entre les valeurs Athis-Mons et Villeconin * p<0,01 et ** p<0,001.*

Le taux de MN à J0 a été mesuré dans les moules de Commercy au moment de l'échantillonnage (J0). Cette valeur a servi de valeur de référence dans l'expérience de transplantation. On constate que le taux à J0 est plus élevé dans les cellules de l'hémolymphe, par rapport aux cellules de branchie, respectivement 4‰ contre 2,6‰ (Figure 18).

Compte tenu des difficultés de prélèvements d'hémolymphe, les échantillons d'hémocytes et de cellules de branchies sont différents (cf. matériels & méthodes). Néanmoins, on observe une augmentation du taux de MN dans les hémocytes à J30 par rapport à J0, à Villeconin et Athis-Mons (Figure 18, graphe A). A J60, seul le taux de MN à Villeconin est encore élevé par rapport à J30. On ne note pas de différences du taux de MN entre les deux sites.

Dans les cellules de branchies (Figure 18, graphe B), le taux de MN augmente sur le site d'Athis-Mons: l'induction de MN est significative à J30 et J60 par rapport à J0. Par contre, les moules de Villeconin ne présentent pas de différence significative par rapport à J0. Contrairement aux cassures de l'ADN, le taux de MN ne varie pas avec la température de l'eau.

L'induction de MN dans les branchies est comparable à celle observée en milieu perturbé chez la moule marine dans le Golf de Gdansk (Barsiène *et al.,* 2006) ou chez la dreissène exposée à une eau de surface traitée par des désinfectants (Bolognesi et al., 2004) ou encore à des agents clastogènes de référence (Mersh *et al*. 1996). Comme l'ont observé Mersh *et al*., (1996) chez la dreissène et Bolognesi et al., (1999) chez la moule marine *Mytillus galloprovincialis*, nos résultats montrent que les cellules de branchies sont plus sensibles aux dommages chromosomiques que les cellules de l'hémolymphe.

Enfin, des concentrations plus élevées en métaux et en MES dans le milieu ont été mise en évidence à Athis-Mons (cf.Figure 3, Figure 4 et Figure 6). La contamination chimique des moules par certains HAPs est également plus forte à Athis-Mons. Elle reflète une augmentation de l'exposition aux HAPs, et probablement une métabolisation partielle des HAPs expliquant l'accumulation de certains HAPs. Ces résultats vont dans le sens d'une pression chimique forte sur les individus du site d'Athis-Mons. La génotoxicité exprimée par les individus à Athis-Mons apparaîtrait donc comme une réponse à la pression chimique du milieu.

En conclusion, le test comète sur cellules de branchies a été appliqué pour la première fois dans une étude de terrain. L'analyse de la génotoxicité dans les cellules de branchies montre clairement une différence entre les deux sites, Athis-Mons ayant le plus fort taux de MN et de cassures de l'ADN, et une plus grande sensibilité des cellules de branchies aux génotoxines. La fréquence de MN et le taux de cassures de l'ADN dans les branchies semblent être des paramètres biologiques sensibles à la pression chimique du milieu. Il sera nécessaire dans une

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

prochaine étude de déterminer s'il existe une variabilité du taux de cassure de l'ADN et de la fréquence de MN en lien avec les paramètres du milieu (température) et la période de reproduction de l'animal. Pour cela un suivi annuel de ces paramètres est prévu en 2009 sur trois sites de l'axe Seine selon un gradient de contamination amont-aval.

4. Conclusion

Les différentes observations soulignent un effet de la pression de contamination des sites avals sur la physiologie des organismes. En effet, lors de la campagne de 2008, des différences significatives ont été observées au niveau de la bioaccumulation des métaux et des HAP dans les tissus ainsi qu'au niveau des marqueurs de génotoxicité. Dans le cas des marqueurs biochimiques, il est également observé des variations temporelles importantes ne permettant pas de conclure précisément (automne2007/printemps2008). Ces variations peuvent être liées à différents facteurs environnementaux.

Les résultats issus de ces 2 campagnes soulignent l'importance de mieux définir l'influence relative des différents types de paramètres, naturels ou de contamination, sur ces réponses biologiques. Pour ceci nous nous proposons de mettre en place des études en conditions environnementales, à long terme (1 année), sur différents sites caractérisés par des pressions anthropiques de différentes origines. Le déploiement sur une année hydrologique et biologique complète permettra de mieux comprendre l'importance des facteurs environnementaux et de la physiologie de l'organisme par rapport à la réponse à la contamination chimique. Ainsi des transplantations de dreissènes sur trois stations de la Seine (pression urbaine) et cinq stations du bassin versant de la Vesle (pression agri-viticole) seront réalisées avec un prélèvement mensuel ou semestriel selon les paramètres.

5. Bibliographie

Amiard JC., Amiard-Triquet C., Barka S., Pellerin J. et Rainbow PS. (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers, Aquatic Toxicology, 76:160-202.

Barsiene, J., Schiedek, D., Rybakovas, A., Syvokiene, J., Kopecka, J., Forlin, L.(2006). Cytogenetic and cytotoxic effects in gill cells of the blue mussel Mytilus spp. from different zones of the Baltic Sea. Marine Pollution Bulletin 53, 469-478.

Binelli, A.C. RivaD. Cogni and A. Provini (2008). "Assessment of the genotoxic potential of benzo(a)pyrene and pp-dichlorodiphenyldichloroethylene in Zebra mussel (Dreissena polymorpha)." Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 649(1-2): 135-145.

Bolognesi, C.E. LandiniP. RoggieriR. Fabbri and A. Viarengo (1999). "Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: Experimental studies." Environmental and Molecular Mutagenesis 33(4): 287-292.

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 Total Environ. 333, 127-136.

Davison, W. et Zhang H. (1994). In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin film gels. Nature 367: 546-548.

Habig WH., Pabst MJ., Jokoby WB. (1974). Glutathione S-transferase. the first enzymatic step in mercapturic acid

Mersch, J., Beauvais, M.N., Nagel, P. (1996). Induction of micronuclei in hemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. Mutat. Res. 371, 47-55.

Mersch, J. & Beauvais, M.N. (1997). The micronucleus assay in the zebra mussel, Dreissena polymorpha, to in situ monitor genotoxicity in freshwater environnements. Mutat. Res. 393, 141-149.

Pain-Devin S, Gourlay-Francé, Kuhn Emmanuelle, Dedourge-Geffard O, Geffard A, Tusseau-Vuillemin MH, (2007). Concentrations métalliques et réponses biologiques in situ :Validation de l'utilisation de la dreissène en surveillance active surle bassin de l'Orge. Rapport d'activité du PIREN-Seine.

Pavlica,M., Podrug, M., Stambuk, A., Cvjetko, P., and Klobucar, G. I. V. (2008). Seasonal variability in micronuclei induction in haemocytes of mussels along the eastern adriatic coast. Polish Journal of Environmental Studies 17, 765-771.

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

Reeders, H. H., and Bij de Vaate, A. (1990). Zebra mussels (Dreissena polymorpha): a new perspective for water quality management. *Hydrobiologia* **200-201**, 437-450.

Reeders, H. H., Bij De Vaate, A., and Slim, F. J. (1989). The filtration rate of Dreissena polymorpha (Bivalvia) in three Dutch lakes with reference to biological water quality management. Freshwater Biology 22, 133-141.

Teil M.J., Alliot F., Blanchard M., Bourges C., Dargnat C., Desportes A., Gasperi J., Labadie P., Lorgeoux C., Moilleron R., Moreau-Guigon E., Tamtam F., Tlili K., Chevreuil M. (2009). Contamination de l'Orge et de la Seine par des micropolluants organiques : PBDE, phtalates, alkylphénols, HAP et antibiotiques sous différentes conditions hydrologiques. Rapport d'activité du Piren-Seine.

Thompson JAJ, Cosson RP, (1984). An improved electrochemical model for the quantification of metallothioneins in marine organisms. Mar. Environ. Res. 11 : 137-152.

Tusseau-Vuillemin, M.-H. et al., (2007). Dissolved and bioavailable contaminants in the Seine River basin. Science of the Total Environment 375, 244-256.

Tusseau-Vuillemin, M.-H., Miège C., Gourlay C., Gilbin R., Ravalet C., Elbaz-Poulichet F., Seidel J.-L., Garric J., (2003). Systèmes d'estimation intégrative de la contamination par les micro-polluants et de leur biodisponibilité. In Rapport d'activité du PIREN-Seine 2002. Disponible sur http://www.sisyphe.jussieu.fr/internet/piren/index.html.

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref