

**Surveillance intégrée pour les écosystèmes dulçaquicoles :
Biomarqueurs et Omics chez le bivalve d'eau douce *Dreissena
polymorpha* (BIOMICS)**

Biomarqueurs d'intérêt pour le suivi des eaux douces

Rapport final

Convention ONEMA – Université de Lorraine
Laboratoire LIEC – UMR CNRS 7360

Auteurs

Marine Potet

Sandrine Pain-Devin, Fanny Louis, Laure Giambérini

Simon Devin

Sommaire

Synthèse Bibliographique	2
Evaluation de l'état de santé des écosystèmes aquatiques	2
1. Evaluation de l'état chimique : monitoring chimique et notion de biodisponibilité	2
2. Evaluation de l'état écologique : bioindication et outils disponibles aux échelles supra-individuelles	6
3. Marqueurs au niveau individuel	7
Les biomarqueurs au niveau sub-individuel : des outils précoces et intégrateurs de la contamination du milieu.....	9
1. Définition.....	9
2. Biomarqueurs de défense	10
3. Biomarqueurs de dommage	11
4. Le métabolisme énergétique.....	12
5. Intérêt d'une approche multi-marqueurs	14
6. Difficultés d'application des biomarqueurs.....	16
7. Le phénomène de tolérance aux contaminants : implications en biosurveillance	19
L'utilisation des biomarqueurs dans notre contexte	20
Présentation des organismes et éléments méthodologiques	23
Les dreissenidés comme organismes sentinelles	24
1. Systématique	24
2. Origine, historique et répartition géographique.....	24
3. Morphologie et Anatomie.....	26
4. Ecologie.....	29
5. Synthèse comparative des deux espèces.....	29
6. Intérêt comme organismes sentinelles.....	30
Présentation des sites de prélèvement	31
Matériel et méthodes	37
1. Mesure des paramètres abiotiques sur les sites étudiés	37
2. Echantillonnage des organismes.....	39

3. Accumulation des contaminants par les organismes	40
4. Biomarqueurs mesurés	40
Variabilité des biomarqueurs <i>in situ</i>.....	43
Description du jeu de données.....	43
Variabilité temporelle des biomarqueurs.....	45
1. Echelle saisonnière	45
2. Echelle journalière.....	49
Variabilité inter et intra-spécifique.....	51
1. Variabilité inter-spécifique.....	51
2. Variabilité intra-spécifique (inter-populations)	53
Réponses des biomarqueurs au regard de la contamination des sites.....	55
1. Caractérisation de la contamination des sites	55
2. Caractérisation de la physico-chimie des sites étudiés	57
3. Bioaccumulation des contaminants <i>in situ</i>	58
4. Caractérisation des réponses biologiques.....	59
Acquisition de la tolérance	65
Réponse à la transplantation.....	67
Conclusion.....	71
Etude intégrée de toutes les données acquises	74
Effort de prélèvement des organismes	75
Discussion autour de l'exploration des données	77
Discussion générale.....	81
Que faire de la variabilité naturelle des biomarqueurs ?	81
Peut-on, à l'heure actuelle, utiliser les biomarqueurs chez ces espèces dans un contexte de surveillance des milieux ?	85
Conclusion générale et perspectives.....	87
Bibliographie.....	88

Synthèse Bibliographique

L'écotoxicologie est définie par Newman (2015) comme « la science des contaminants dans la biosphère et leurs effets sur les constituants de la biosphère, incluant les humains ». La question des effets des contaminants peut se poser à tous les niveaux d'organisation biologique, tout comme la question de leur devenir et de leur transport. Le développement de cette discipline s'est fait sous la pression de devoir évaluer rapidement le risque engendré par un polluant, et s'est donc focalisé en premier lieu sur des descripteurs rapides et peu coûteux comme les tests de toxicité ou les biotests, qui constituent le squelette de l'écotoxicologie, mais présentent de nombreuses limites. Le besoin s'est rapidement fait sentir de développer des méthodologies plus pertinentes pour évaluer et/ou caractériser l'état de santé des écosystèmes aquatiques, mais aussi permettre leur suivi sur le long terme afin d'évaluer l'efficacité des mesures adoptées. Pour répondre aux exigences législatives, différents outils de surveillance ont donc été développés. En premier lieu, l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques reposait essentiellement sur la mesure de paramètres physico-chimiques, hydromorphologiques, sur le monitoring chimique des polluants et les caractéristiques des communautés (monitoring écologique). Mais l'intégration d'éléments intermédiaires de qualité biologique est devenue essentielle, pour permettre de détecter les effets des polluants sur les organismes, avant que des répercussions n'apparaissent aux niveaux d'organisation supérieurs (Allan et al., 2006b ; Amiard et al., 1998).

Les biomarqueurs constituent de bons candidats pour ce type d'approche, car ils se situent à des niveaux intermédiaires (individu, population) et permettent d'intégrer non seulement l'état de contamination du milieu, mais aussi ses effets sur le biote. Toutefois, il est désormais acquis qu'outre les contaminants, ces biomarqueurs sont aussi influencés par les caractéristiques structurelles des milieux aquatiques (température, cycle saisonnier, minéralisation de l'eau...), mais également par des facteurs intrinsèques aux populations comme le cycle reproducteur, les caractéristiques génétiques ou encore le parasitisme. En définitive, l'utilisation des biomarqueurs en tant qu'outils pour évaluer l'état de santé de populations *in situ*, exposées à des pollutions multiples et des facteurs environnementaux changeants, reste encore complexe malgré des déploiements croissants, aussi bien en milieu marin que d'eau douce.

Evaluation de l'état de santé des écosystèmes aquatiques

Un stressor¹ est défini comme « toute entité chimique, physique, ou biologique pouvant induire des effets néfastes sur les composants écologiques, c'est-à-dire les individus, les populations, les communautés ou les écosystèmes » (Norton et al., 1992). A ce titre, les polluants sont des stressors pouvant entraîner des perturbations allant d'atteintes moléculaires à la perte de fonctions écosystémiques. Le but de l'évaluation du risque environnemental (ERA, pour Environmental/Ecological Risk Assessment) est de déterminer la nature et la probabilité des effets des polluants sur les écosystèmes et leurs composantes en utilisant une approche fondée sur des preuves (WoE pour Weight of Evidence ; Galloway et al., 2004 ; SETAC, 1997). On essaye dans ce cas de collecter un maximum d'informations complémentaires pour aboutir à une évaluation fiable de la situation (Benedetti et al., 2011).

Que ce soit pour faire de la surveillance (observer un milieu et ses éventuels changements d'état) ou de l'évaluation du risque plus poussée, des outils pertinents, fiables, et utilisables de la même façon par tous sont nécessaires. Le choix de ces outils dépendra de la complexité de leur mise en œuvre, de leur coût, de leur fiabilité, de leur sensibilité, et du type d'information que l'on veut en obtenir. Par ailleurs, certains outils sont mieux adaptés que d'autres à certaines situations ou certains sites.

Brièvement, le monitoring chimique peut se faire de manière continue ou *via* des prélèvements ponctuels d'échantillons sur différentes matrices. Le monitoring écologique se fait plutôt à l'aide d'outils spécifiques et d'indices. La biosurveillance (monitoring biologique, ou biomonitoring) consiste en l'utilisation d'organismes vivants (ou de leurs réponses) pour évaluer l'état ou les changements d'état de leur milieu. Les outils à employer pour évaluer les éléments de qualité chimique, biologique et écologique ne sont pourtant pas spécifiés dans la DCE (Allan et al., 2006a) et chaque pays membre est libre d'appliquer ses propres réglementations.

1. Evaluation de l'état chimique : monitoring chimique et notion de biodisponibilité

Différents seuils réglementaires constituent à l'heure actuelle les outils majeurs de protection de l'environnement et de la santé humaine. L'évaluation du risque conventionnelle vise à identifier le danger, l'exposition (PEC, Predicted Environmental Concentration), à caractériser le danger (PNEC, Predicted No Effect Concentration) et le risque (RQ, Risk Quotient) pour les organismes (Amiard et

¹ Un stress représente les réponses physiologiques d'un organisme essayant de se maintenir en cas de perturbation, pour augmenter ses chances de survie ; c'est une force qui pousse les processus physiologiques normaux en dehors de leurs limites, et qui peut toucher tous les niveaux d'organisation biologique

Amiard-Triquet, 2015a). A partir de ces éléments sont calculées des Normes de Qualité Environnementale (NQE ; Amiard et Amiard-Triquet, 2015b) pour l'eau, les sédiments ou le biote.

Lorsque ces seuils de qualité sont dépassés, il est nécessaire d'identifier les sources de pollution et de réduire la décharge de contaminants (Allan et al., 2006a). L'utilité des NQE pour le biote peut cependant être mise en cause, puisqu'ils ne précisent pas quelle espèce utiliser, à quel niveau trophique et quel stade de vie. On pourra donc se retrouver en dessous ou au-dessus de ce seuil, selon l'espèce considérée et sa capacité à accumuler le polluant ciblé (Lepom et al., 2012).

Dans le cadre de la DCE, le monitoring chimique est concentré sur la quantification de 45 substances prioritaires, sélectionnées selon leur degré de persistance, leur toxicité et leur capacité de bioaccumulation (UE, 2013). Cette liste est revue tous les 4 ans. A chaque substance sont associées des NQE pour l'eau et le biote, mais pas pour les sédiments (UE, 2000).

1.1. Détection des contaminants dans le milieu

Différentes analyses chimiques (chromatographie, spectrophotométrie...) permettent la détection et la quantification précise des polluants, à partir d'échantillons réduits, aussi bien dans les matrices physiques que biologiques (eau, sédiment, végétaux, animaux). Ces mesures sont indispensables pour savoir si les concentrations présentes dans l'environnement respectent les standards établis par la législation. Elles informent sur la présence et la distribution spatiale des polluants et sur l'évolution temporelle de la contamination.

Cependant, elles sont souvent focalisées sur des contaminants faciles à analyser, et certains composés ne peuvent être dosés par les méthodes actuelles ou coûtent cher. Dans la DCE, le « statut chimique » se réfère à quelques polluants prioritaires qui ne représentent qu'une petite portion de la pollution générale. On conclue souvent à un bon état chimique si on se réfère aux NQE, mais une diminution de la contamination ne veut pas dire que le biote n'est plus sous pression.

Outre le fait de pouvoir mesurer et/ou prédire la concentration en polluants dans le milieu, il faut également déterminer quelle fraction des polluants est susceptible d'entrer en contact et d'exercer une action toxique sur les organismes.

1.2. Biodisponibilité et bioaccumulation

La biodisponibilité d'un polluant désigne sa capacité à interagir avec les organismes, à s'accumuler dans les organismes et éventuellement à entraîner des effets (Férard et Blaise, 2013) ; une molécule est dite biodisponible quand elle peut interagir ou passer au travers de la membrane cellulaire. Sur un plan écotoxicologique, ce paramètre apporte donc des informations plus pertinentes sur les polluants que le simple fait de les quantifier.

La bioaccumulation correspond à l'accumulation nette des contaminants dans et sur un organisme à partir de différentes sources (eau, air, nourriture, sédiment, particules en suspension). La bioconcentration ne concerne que les contaminants accumulés à partir de l'eau (Newman, 2015). Une fois dans l'organisme, les contaminants peuvent subir différents processus comme (1) des réactions de biotransformation et de détoxification afin de protéger l'organisme (élimination, séquestration, redistribution) ou (2) des phénomènes d'activation (production de métabolites secondaires plus toxiques que les molécules mères ; Newman, 2015). La bioaccumulation résulte de ces différents processus.

La mesure de la concentration en polluant accumulé dans un organisme exposé est une autre méthode, à la fois chimique et biologique, qui permet d'évaluer la biodisponibilité et la bioaccumulation des contaminants. Le biote constitue en effet une excellente matrice intégrative ; il permet de détecter des contaminants qui seraient classiquement en dessous des limites de détection, ou des contaminations antérieures et complémente ainsi le monitoring chimique (Benito et al., 2017 ; Richman et Somers, 2005). Les espèces bioaccumulatrices, et les bivalves en particulier, sont très employées en biosurveillance comme indicateurs de la contamination des milieux naturels. Les espèces sélectionnées pour ce type de mesure sont généralement sessiles (représentatives de l'aire d'échantillonnage), abondantes localement, fournissent assez de tissus pour l'analyse, sont relativement résistantes aux toxiques (les contaminants doivent être accumulés sans entraîner la mort de l'organisme), et d'une durée de vie suffisante (qui permet un suivi sur le long terme et une intégration des variations temporelles de la contamination). Bien que *D. polymorpha* ait été plus largement utilisée, les deux espèces de dreissènes étudiées constituent de bons biomoniteurs de pollution organique et minérale, et la quantité de polluants qu'elles accumulent suit en général le gradient de contamination auquel elles sont soumises (Benito et al., 2017 ; Bervoets et al., 2004 ; Johns et Timmerman, 1998 ; Marie et al., 2006 ; Richman et Somers, 2005 ; Voets et al., 2009 ; Wiesner et al., 2001). Chez les bivalves, la coquille peut elle aussi servir d'organe bioaccumulateur, et stocker les polluants sous forme inactive de façon transitoire (Wiesner et al., 2001).

1.3. Lien entre état chimique et effets sur le biote

Dans les milieux aquatiques, différents processus physiques (transport, diffusion, adsorption), chimiques (dégradation, liaisons covalentes) et biologiques (biodégradation, accumulation, métabolisation) peuvent transformer les polluants, qui deviendront plus ou moins accessibles et plus ou moins dangereux. Cependant, beaucoup de mécanismes interviennent avant que les contaminants n'atteignent leur cible biologique. Les bivalves par exemple peuvent fermer leur coquille pour limiter l'absorption du polluant. Ils possèdent aussi des mécanismes de tri au niveau des branchies, des palpes labiaux et du système digestif qui sélectionnent les particules selon leur taille, et affectent donc la biodisponibilité des contaminants présents dans la nourriture. Si le contaminant parvient à pénétrer

dans les cellules, l'organisme peut réguler sa biodisponibilité intracellulaire en le métabolisant pour favoriser son élimination, le stocker, le chélater à l'aide de protéines spécifiques (Amiard-Triquet, 2015 ; Rainbow, 2002). La toxicité survient quand les métaux de la fraction disponible dépassent un certain seuil.

La présence simultanée de contaminants dans le milieu peut entraîner des effets synergétiques ou antagonistes. Le dosage indépendant de chaque polluant peut mener à la conclusion qu'il n'y a pas de danger, si on les compare aux seuils réglementaires. En revanche, seule l'évaluation des effets biologiques d'un mélange de polluants permettra de dire si leur combinaison est dangereuse ou non pour les organismes (Oertel et Salanki, 2003). A l'heure actuelle, la modélisation ne permet pas de prédire avec certitude l'accumulation et la toxicité des contaminants. Il apparaît alors nécessaire de compléter le monitoring chimique avec des approches écologiques et biologiques plus intégratives, et parfois plus faciles à mettre en place et moins coûteuses (Allan et al., 2006b). Ces indicateurs permettent de mesurer les réponses du biote à une exposition toxique, chacun présentant ses propres avantages et inconvénients. Ils doivent être choisis avec soin, selon la question posée et les moyens financiers (Allan et al., 2006a ; Figure 1).

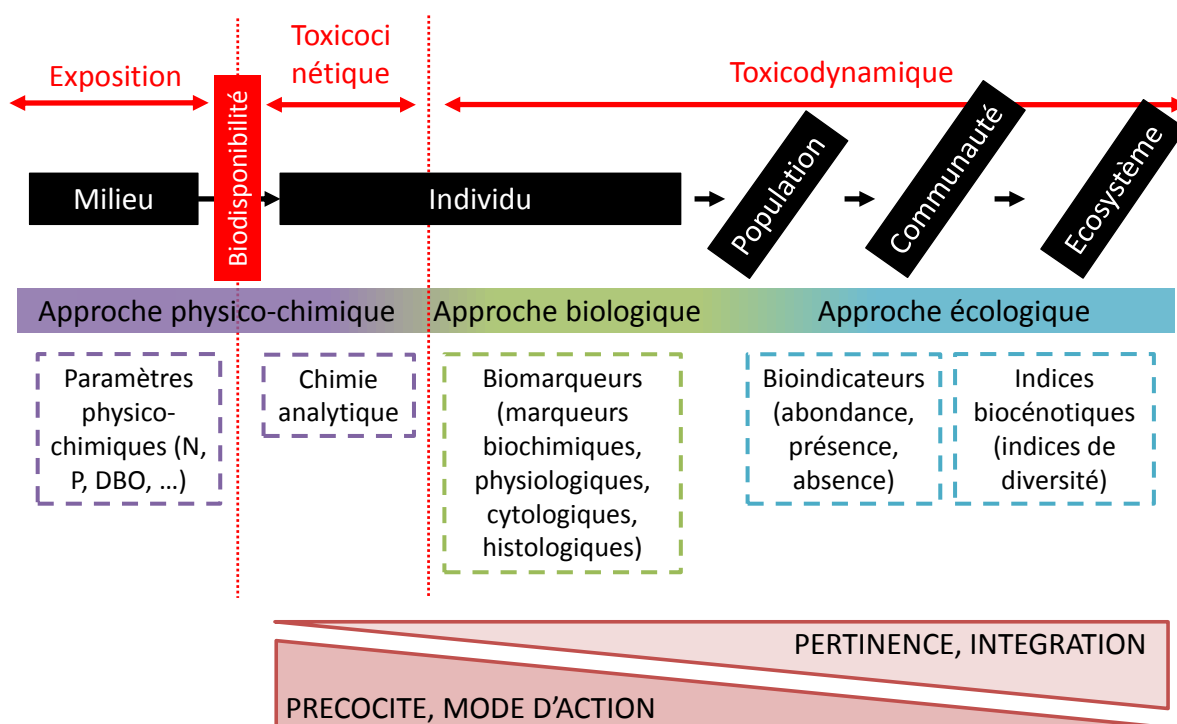


Figure 1 : Evaluation des effets des contaminants à différents niveaux d'organisation biologique (d'après Amiard et al., 1998)

2. Evaluation de l'état écologique : bioindication et outils disponibles aux échelles supra-individuelles

Contrairement au monitoring chimique, le monitoring biologique (biomonitoring ou biosurveillance²) permet d'intégrer l'effet des contaminants sur les organismes. Il est en général moins onéreux et nécessite moins d'équipements sophistiqués. S'intéresser à la présence d'espèces bioindicatrices, ou à leur état de santé, permet d'évaluer l'état écologique des milieux et de mettre en évidence les effets de stress subis sur le long terme et de changements brutaux (Amiard et al., 1998 ; Li et al., 2010). Les mesures réalisées dans le cadre de la biosurveillance peuvent se faire à n'importe quel niveau d'organisation biologique.

2.1. Au niveau écosystémique

Au niveau écosystémique, il est possible de quantifier la biomasse, ou des processus écosystémiques tels que la productivité, la décomposition de la matière organique ou encore la dynamique des nutriments. Les cycles des nutriments et des minéraux, ainsi que les flux de matière et d'énergie peuvent être modifiés, par exemple suite à une modification des assemblages de producteurs/consommateurs/décomposeurs. Des mesures plus fonctionnelles permettent aussi de mettre en évidence les effets des contaminants sur un écosystème, comme la diminution de l'activité photosynthétique du phytoplancton ou le ralentissement de la décomposition de la litière par les détritivores (Colas et al., 2013 ; Newman, 2015). Ce niveau écosystémique est le plus intégrateur et permet de s'assurer (ou non) de leur bon fonctionnement.

2.2. Aux niveaux des communautés et des populations

Les communautés représentent l'intégrité écosystémique dans son ensemble puisqu'elles sont le reflet des facteurs physiques, chimiques et biologiques qui agissent sur le système. Elles intègrent les effets au niveau des populations et peuvent permettre de prédire les effets au niveau écosystémique.

La mesure d'assemblage d'espèces est couramment réalisée pour évaluer les effets de la pollution. Différents indices ont été créés pour évaluer la richesse, l'abondance et la structure de différents groupes taxonomiques dont les plus utilisés sont le périphyton, les macroinvertébrés benthiques et les poissons (Li et al., 2010). Historiquement, on utilisait l'indice saprobique ou l'indice de Trent, le BMWP (Biological Monitoring Working Party score), qui étaient plutôt basés sur la présence d'espèces clés que sur l'échantillonnage complet de tous les taxons présents (Chapman et al., 1996). Pour le périphyton, constitué de producteurs primaires à cycle de vie court et à reproduction rapide, il

² Utilisation du vivant (organisme ou ensemble d'organismes, à tous les niveaux d'organisation biologique) pour surveiller l'évolution des modifications, des altérations ou la stabilité de la qualité d'un milieu (IRSTEA, 2010)

existe l'IBD (Indice Biologique Diatomées). Pour les macroinvertébrés, très importants dans le réseau trophique, l'IBGN (Indice Biologique Global Normalisé) et l'I2M2 (Indice Invertébrés Multimétrique) et enfin l'IPR (Indice Poissons Rivières) pour les poissons. Il existe également l'indice oligochètes et l'IBMR (Indice Biologique Macrophytes Rivière). Au niveau populationnel, d'autres paramètres sont évalués tels que l'occurrence, l'abondance, le succès reproducteur, la structure des classes d'âge/taille, la mortalité, la réduction de l'abondance et de la biomasse, la structure génétique (Clements et al., 2000 ; Oertel et Salanki, 2003).

Une détérioration, révélée par des approches écologiques, est en général due à des stressseurs qui ont commencé à impacter les écosystèmes bien des années avant (Figure 2 ; Vasseur et Cossu-Leguille, 2003). Des modifications dans la structure des communautés sont d'une grande pertinence écologique et peuvent témoigner d'une modification du milieu, mais peinent à en identifier les causes précises (eutrophisation, pollution, dégradation de l'habitat) et ne fournissent pas d'explication mécanistique à la réponse observée (Connon et al., 2012 ; Vasseur et Cossu-Leguille, 2003). D'autres outils sont recommandés, tels que l'utilisation des réponses biologiques à d'autres niveaux d'organisation, en tant que biomarqueurs de présence/d'effets des contaminants (Allan et al., 2006b ; Amiard et al., 1998).

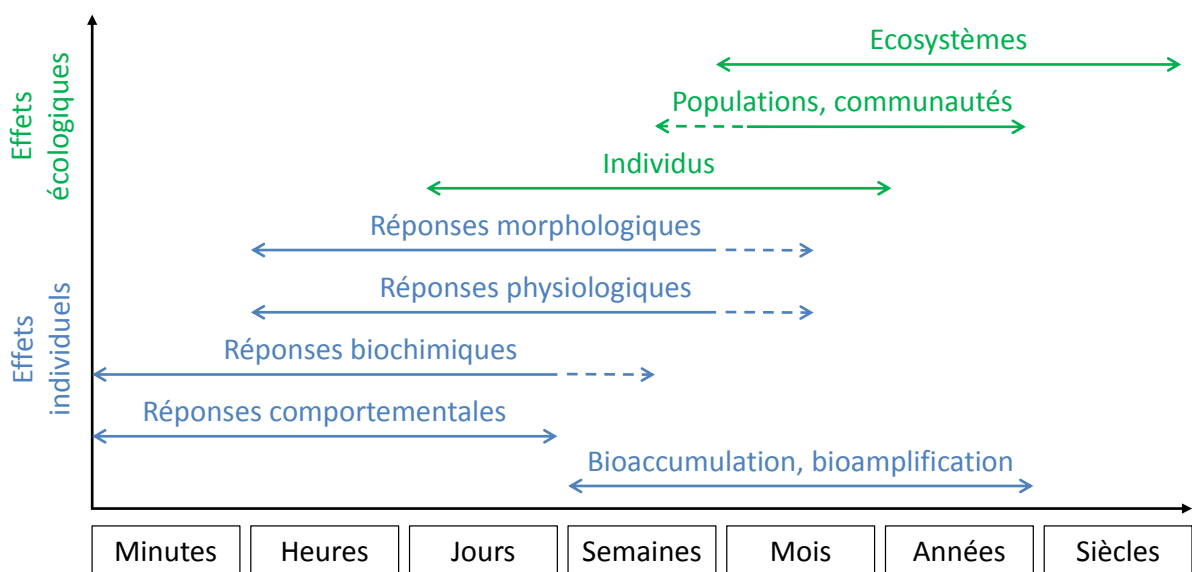


Figure 2 : Effets des contaminants à différents niveaux d'organisation et leur durée (d'après Chapman et al., 1996)

3. Marqueurs au niveau individuel

Au niveau individuel, on réalise généralement des tests de toxicité ou des biotests, la plupart du temps sur des espèces modèles, souvent absentes des écosystèmes que l'on cherche à protéger. Les

tests de toxicité aigüe sont généralement effectués en laboratoire pour évaluer la Concentration Létale³ d'un composé. En pratique, la mort des individus peut cependant être provoquée de manière indirecte lors d'une exposition sublétales (augmentation de la prédation, problème pour l'accouplement ; Newman, 2015).

Les biotests prennent généralement en compte des paramètres sub-létaux pour des conditions définies (un intervalle de temps, une température), et peuvent être effectués *in situ* ou en laboratoire à partir d'échantillons d'eau et de sédiments collectés sur le terrain. Les biotests permettent la détermination des CE_n (Concentration entraînant un Effet pour n% de la population) et peuvent concerner des paramètres physiologiques (production d'oxygène, alimentation, activité de filtration, respiration, excrétion, osmorégulation, bioénergétique), développementaux (croissance, asymétrie), reproductifs (changements mâle/femelle, comportement sexuel, fertilité) ou biochimiques (inhibition d'enzyme, bioluminescence ; Chapman et al., 1996). Le comportement des organismes peut aussi être affecté en présence de polluants ; ils peuvent modifier leurs préférences, ou éviter certains facteurs (lumière, température, salinité, courant), modifier leur activité (léthargie, hyperactivité), leur alimentation, leur performance (comportement natatoire), et autres (apprentissage, activité respiratoire, prédation, compétition, interactions sociales).

L'indice de condition (IC) est aussi un bon indicateur d'état de santé global des organismes ; chez les bivalves, il illustre le taux de remplissage de la coquille. La diminution de l'IC est principalement reliée à une perte de masse, qui peut être due à une perte de poids suite à la libération des gamètes ou à une croissance plus faible (réallocation énergétique pour lutter contre un stress toxique). Il donne ainsi une idée du statut nutritionnel et du stress subi par les organismes. Un IC élevé est en général associé à un meilleur état des individus.

Ces modifications, qui résultent de causes sub-individuelles, mettent en évidence les effets d'une contamination ; ils sont directement liés à la dynamique des populations et des communautés et peuvent permettre de prédire les effets sur la fitness et le risque aux échelles supérieures. Ils sont pertinents pour déterminer la toxicité relative de différents composés, et pour comparer la toxicité des molécules entre différents groupes taxonomiques (Newman, 2015).

Chez les dreissènes, l'activité de filtration est couramment utilisée comme marqueur d'état de santé individuel. Alors que la théorie associe une baisse de cette activité comme un marqueur de stress, Kraak et al. (1993) montrent que la mortalité de *D. polymorpha* augmente avec le temps d'exposition à Cu, Zn, Cd, pris séparément ou en mélange, sans qu'il n'y ait d'effet sur l'activité de filtration. Leur étude prouve que les effets des contaminants sur la survie et la filtration sont indépendants, et qu'on ne peut pas toujours prédire les effets à long terme (e.g. survie) à partir d'effets à court terme (e.g. filtration).

³ CL_n = concentration d'un toxique entraînant la mort de n% d'individus dans une population donnée, pendant un temps donné, dans des conditions données (IRSTEA, 2010)

Les biomarqueurs au niveau sub-individuel : des outils précoces et intégrateurs de la contamination du milieu

Les espèces bioindicatrices peuvent, au travers de l'abondance des individus, rendre compte de la qualité du milieu. Mais même s'ils sont présents dans le milieu, l'état de santé des taxons bioindicateurs peut être affecté par les polluants. Les outils biologiques, c'est-à-dire les mesures réalisées du niveau cellulaire au niveau comportemental et incluant les biomarqueurs, permettent de détecter les effets de l'ensemble des contaminants qui pourraient ne pas être détectés individuellement lors du monitoring chimique (Allan et al., 2006a). Ils peuvent aussi indiquer d'éventuelles lésions ou dysfonctionnements physiologiques chez ces individus et permettre d'anticiper des effets délétères pouvant affecter la dynamique de population (e.g. en modifiant la capacité à se reproduire ou la fécondité ; Amiard et al., 1998). En effet, les contaminants commencent par affecter les biomolécules avant que des effets plus visibles ne se répercutent à des niveaux d'organisation supérieurs (Figure 2).

1. Définition

De multiples définitions de ce terme coexistent dans la littérature. Celle que nous retiendrons ici est celle de Depledge (1994) : les biomarqueurs sont définis comme des paramètres biochimiques, cellulaires, physiologiques ou comportementaux qui peuvent être mesurés dans les tissus ou les fluides d'un organisme ou sur l'organisme entier, pour mettre en évidence l'exposition à, ou les effets, d'un ou plusieurs contaminants. Ils permettent d'intégrer l'exposition à plus ou moins long terme à un contaminant et reflètent la manière dont les organismes sont. Ils permettent de savoir si la qualité d'un milieu s'améliore ou se dégrade, d'identifier les causes de perturbations observées à des niveaux supérieurs (communautés), ou encore d'identifier une pollution spécifique (Vasseur et Cossu-Leguille, 2003). Utilisés *in situ*, ils sont des manifestations directes de l'exposition simultanée des organismes à tous les facteurs de stress du milieu.

Comme les changements au niveau sub-individuel sont détectables avant que des effets délétères n'apparaissent aux niveaux supérieurs, l'approche par biomarqueurs est souvent considérée comme un signal d'alarme (de Lafontaine et al., 2000 ; Depledge, 1994; Vasseur et Cossu-Leguille, 2003). Ils peuvent être utilisés dans un contexte de biosurveillance, comme outil de diagnostic (lorsqu'ils mettent en évidence des effets au niveau individuel) ou comme outil prédictif (lorsqu'ils présagent de perturbations au niveau populationnel ; Depledge et Fossi, 1994), et sont au cœur de nombreux programmes de recherche, notamment en milieu marin où leur application est plus développée qu'en eau douce (Allen et Moore, 2004 ; Lam et Gray, 2003). Les biomarqueurs présentés ici peuvent être mesurés à différentes échelles sub-individuelles (tissu, organe, cellule) et permettent une meilleure compréhension du mode d'action des polluants lorsqu'ils pénètrent dans les organismes.

2. Biomarqueurs de défense

Les biomarqueurs de défense permettent aux organismes de faire face à la présence de contaminants. Ils ont généralement un rôle dans la tolérance des organismes, puisqu'ils détoxifient les contaminants bioaccumulés, limitent leur assimilation et/ou facilitent leur excrétion. Ils permettent de minimiser la présence de polluants dans la cellule, qui pourraient endommager différentes cibles cellulaires.

2.1. Enzymes de biotransformation : Glutathion-S-transférase

Les enzymes de biotransformation jouent un rôle dans l'homéostasie, la détoxification et l'excrétion des xénobiotiques (Faria et al., 2009).

Les glutathion S-transférases (GST) sont des enzymes cytosoliques de phase II qui catalysent la conjugaison des composés toxiques, ayant généralement subi les réactions de phase I, avec un groupement –SH (issu le plus souvent du glutathion). L'ajout de ce groupement va neutraliser les sites électrophiles des xénobiotiques, les rendant plus hydrosolubles et donc plus facilement excrétables (Contardo-Jara et al., 2009 ; Faria et al., 2009).

Les activités de biotransformation chez les invertébrés et leur induction sont faibles comparé à celles observées chez les vertébrés. L'activité de la GST est toutefois très utilisée comme biomarqueur de pollution organique (Cajaraville et al., 2000 ; Robillard et al., 2003). Chez les bivalves, les GST sont généralement considérées comme des biomarqueurs d'exposition sensibles à de nombreux contaminants.

2.2. Phosphatase acide

Les phosphatases sont des enzymes que l'on retrouve chez tous les organismes, des archées aux mammifères, confirmant le rôle fondamental de ces protéines dans les processus biochimiques. Elles appartiennent à la classe des hydrolases et catalysent l'hydrolyse des liaisons esters en formant du phosphate inorganique. Elles sont classées selon leur pH optimum en phosphatase alcaline (pH > 8) ou phosphatase acide (pH < 6 ; Seitkalieva et al., 2015).

La phosphatase acide (ACP, pour Acid Phosphatase), est une enzyme lysosomale jouant un rôle dans la dégradation de nombreuses molécules biologiques et dans la détoxification des polluants (Giambérini et Pihan, 1997 ; Suresh et Mohandas, 1990). Lorsque la capacité de stockage des lysosomes est dépassée, ou qu'ils sont trop endommagés, ils éclatent et libèrent les enzymes lysosomales (dont l'ACP) dans le cytoplasme et l'environnement extracellulaire. La mesure quantitative de ces enzymes est utilisée comme marqueur de stress toxique.

2.3. Biomarqueurs de stress oxydant

Les radicaux libres sont des atomes, des molécules ou des ions possédant des électrons non appariés, rendant ces composés très réactifs ; ils sont souvent assimilés aux ROS (Reactive Oxygen Species, ou espèces réactives de l'oxygène en français). Il faut noter que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) bien que n'étant pas un radical, reste une espèce plus réactive que l'oxygène moléculaire (Lushchak, 2011). Il existe différents mécanismes de formation des ROS au sein des systèmes biologiques, mais la plupart sont issus de la réduction partielle de l'oxygène. Les ROS sont produits de manière permanente, en tant que produits secondaires du métabolisme aérobie (Lushchak, 2011).

Du fait de leur réactivité, les ROS peuvent interagir avec les composants cellulaires et extracellulaires, tels que l'ADN, les protéines et les lipides, provoquant peroxydation lipidique, dommages à l'ADN, inactivation d'enzymes, dégradation des protéines et parfois perturbation de la synthèse de l'ATP et au final, la mort cellulaire (Livingstone et al., 1992).

Le métabolisme des ROS est donc sous contrôle très fin, grâce à l'action de molécules antioxydantes. Lorsque la balance entre la production de ROS et leur élimination est perturbée, la concentration en ROS augmente, le statut oxydoréducteur est perturbé et des dommages cellulaires apparaissent. C'est ce qu'on appelle le stress oxydant (ou stress oxydatif ; Lushchak, 2011), qui peut apparaître chez toutes les formes de vie aérobie (van der Oost et al., 2005). La forte pollution présente dans leur écosystème peut perturber ces processus et favoriser le stress oxydant (Lushchak, 2011), soit en modifiant les mécanismes de gestion du stress oxydant, soit en contribuant à la génération de radicaux libres (Newman, 2015).

Certains de ces systèmes antioxydants peuvent être utilisés en tant que biomarqueurs de stress oxydatif pour le monitoring des écosystèmes marins et d'eau douce. Des modifications de ces activités enzymatiques sont en effet souvent observées chez des organismes vivants dans des sites contaminés ou exposés à des contaminants en laboratoire. Des modifications des défenses antioxydantes enzymatiques (SOD, Cat, GPx) sont de bons biomarqueurs pour révéler des conditions prooxydantes (Livingstone, 2001; Regoli et al., 2002) et ont été décrites comme des biomarqueurs de stress oxydatif liés aux métaux (Marasinghe Wadige et al., 2014).

3. Biomarqueurs de dommage

Les biomarqueurs de dommage ont pour but de révéler les effets délétères des contaminants.

3.1. Peroxydation lipidique

Les phospholipides sont les constituants majeurs des membranes cellulaires. Les acides gras (polyinsaturés) qui les constituent contiennent des doubles liaisons facilement oxydables, pouvant être la cible des ROS. L'oxydation des lipides *via* la formation de peroxydes est appelée lipoperoxydation (ou peroxydation lipidique, LPO). C'est une des principales formes de dommage résultant du stress

oxydatif et elle est fréquente chez les organismes aquatiques qui présentent généralement de fortes teneurs en lipides (Arab et Steghens, 2004 ; Lushchak, 2011).

La peroxydation lipidique contribue à diverses physiopathologies et anomalies cellulaires et tissulaires (Jiang et al., 1991) et peut poser un problème lors de la formation et du stockage des graisses (Eymard et Genot, 2003). Elle peut conduire à la perte des fonctions cellulaires. La mesure des hydroperoxydes lipidiques, concomitamment avec les ROS, est utilisée comme indicateur de stress oxydant.

3.2. Activité apoptotique

L'apoptose est une forme de mort cellulaire programmée qui joue un rôle dans de nombreux processus biologiques, mais également en cas de maladie. Elle peut être induite par divers stimulus, mais aboutit toujours au même résultat, à savoir la mort de la cellule (Gurtu et al., 1997). Les caspases sont des protéases à cystéine jouant un rôle dans le processus apoptotique, qui vont cliver les substrats après les résidus aspartate (Gurtu et al., 1997). L'induction des caspases laisse supposer que les cellules ont subi des dommages et entament leur processus de mort cellulaire.

4. Le métabolisme énergétique

L'énergie qu'un organisme est capable d'allouer à la croissance et à la reproduction dépend de sa balance énergétique (apport d'énergie *via* l'alimentation et l'assimilation, et perte d'énergie par le métabolisme et l'excrétion). Cette balance varie avec les facteurs environnementaux tels que la température et la disponibilité en nourriture. L'exposition à des polluants peut aussi influencer la balance énergétique, en augmentant les coûts de maintenance (activation des défenses ou des mécanismes de réparation), diminuant ainsi l'énergie disponible pour la reproduction. Lors d'un stress sévère, la balance énergétique peut devenir négative, contraignant les moules à consommer leurs réserves (glycogène et lipides ; Palais et al., 2011).

Les réserves énergétiques disponibles (représentées par le glycogène, les lipides et les protéines) et la consommation d'énergie (ETS) sont mesurées au niveau cellulaire et intégrées dans un indicateur de stress général (Fanslow et al., 2001). Les xénobiotiques peuvent affecter le budget énergétique des organismes, entraînant une dépense énergétique supplémentaire.

Les biomarqueurs reliés au métabolisme énergétique peuvent être affectés directement (modification du comportement alimentaire, des enzymes digestives) ou indirectement (coût énergétique lié aux mécanismes de défense, diminution du nombre de proies) en présence de polluants. Ils peuvent être mesurés à différents niveaux d'organisation (Figure 3). Cependant, ces biomarqueurs sont très dépendants du cycle reproducteur ; il est donc nécessaire de bien connaître leur variation naturelle.

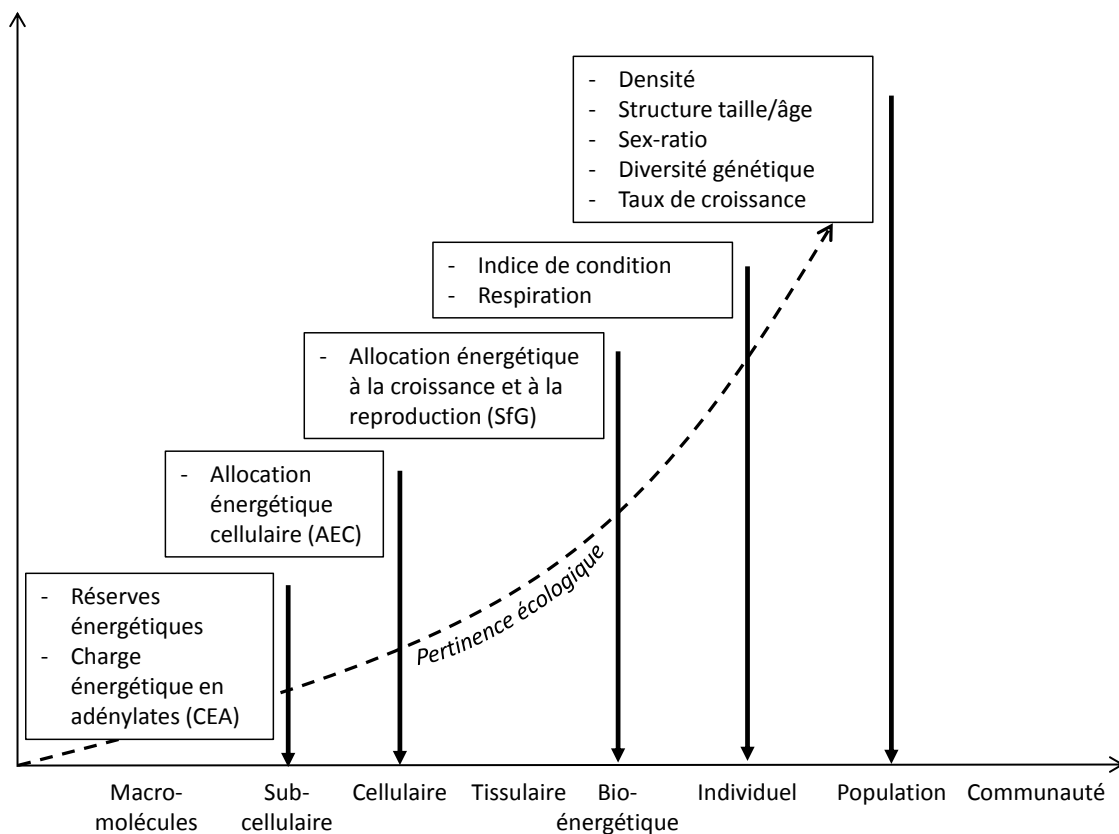


Figure 3 : Biomarqueurs en lien avec le métabolisme énergétique selon le niveau d'organisation biologique (d'après Durou et al., 2008)

4.1. Le système de transport d'électrons mitochondrial

L'ETS (Electron Transport System) est retrouvé dans la cellule au niveau des mitochondries et des microsomes. Il consiste en une chaîne complexe de cytochromes, de flavoprotéines et d'ions métalliques qui transportent les électrons vers l'oxygène lors du catabolisme des nutriments (Fanslow et al., 2001 ; Packard, 1968). La mesure de l'ETS, qui donne une idée du taux maximal d'absorption d'oxygène (Smolders et al., 2004), est simple et sensible, contrairement à la mesure de la consommation d'oxygène qui est longue et peu pratique. De plus, la réponse de l'ETS à un changement environnemental implique la synthèse et la dégradation de macroenzymes, elle est donc plus longue que la réponse de la respiration et permet ainsi d'éviter les stress liés à l'échantillonnage des organismes, les artéfacts et les variations à court terme.

4.2. La lactate déshydrogénase

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytoplasmique de transfert de l'hydrogène qui joue un rôle important dans le cycle glycolytique, et qui participe au métabolisme anaérobie des cellules. Son activité peut être utilisée en tant que biomarqueur de stress lié à la quantité d'oxygène. L'activité LDH augmente en cas d'hypoxie et constitue donc une réponse biochimique à un faible

niveau d'oxygène (Falfushynska et al., 2014 ; Wu et Lam, 1997). Mais une augmentation de la concentration en LDH peut aussi être une réponse à un stress général de l'organisme qui augmente son métabolisme énergétique pour y faire face.

5. Intérêt d'une approche multi-marqueurs

Le Tableau I reporte certaines études ayant utilisé différents types de biomarqueurs chez les dreissènes.

Tableau I : Utilisation des biomarqueurs en laboratoire chez les dreissènes

Etudes utilisant des paramètres biochimiques					
Espèce	Pop(s)	Lieu	Polluant(s) testé(s)	Biomarqueur(s) mesuré(s)	Référence
ZM	1	France	Clastogènes (4)	MN	Mersch et al., 1996
ZM	1	Québec	Cd	MT	Tessier et Blais, 1996
ZM	1	France	Pb, Zn	Lysosomes	Giamberini et Pihan, 1997
ZM	1	Québec	Cd	MTLP	High et al., 1997
ZM	1	Suisse	Cu, TBT	HSP	Clayton et al., 2000
ZM	1	Croatie	Pentachlorophenol	Dommage ADN (comètes)	Pavlica et al., 2001
ZM	1	France	Aroclor 1254, 3MC, chrysène, atrazine	ARNm	Bultelle et al., 2002
ZM	1	France	Fuel-2 oil	MXR	Pain et Parant, 2003b
ZM	5	Croatie	Fuel-2 oil	MXR	Smital et al., 2003
ZM	1	France	Cu, Cd	MT	Lecoeur et al., 2004
ZM	1	Irlande	PE	VTG, IC, cholestérol	Quinn et al., 2004
ZM	1	Italie	Désinfectants	MN, Comètes	Bolognesi et al., 2004
ZM	1	Italie	Paraquat	Histologie, MN	Mantecca et al., 2006
ZM	1	Irlande	Nonylphenol	VTG, mortalité, attachement, IC, cholestérol	Quinn et al., 2006
ZM	1	France	HAP	Adduits ADN	Le Goff et al., 2006
ZM	1	France	Cd, Zn	MT, MTcDNA	Marie et al., 2006b
ZM	1	UK	Cu, As	MT, LPO, NaK ATPase	Bouskill et al., 2006
ZM	1	Pays Bas	HAP, PCB	DT diaphorase, cytochrome c reductase, GST, Cat, GSH	Osman et al., 2007
ZM	1	Espagne	Clofibrate	Acides gras (33), lipides, triglycérides, IG	Lazzara et al., 2012
ZM	1	Italie	Triclosan	Protéomique, LPO	Riva et al., 2012
ZM	1	France	Ni + parasitisme	ROS, phagocytose, stabilité lysosomale, Cat, Lipofuscin, LN	Minguez et al., 2012a
ZM	1	Espagne	Dacthal, Hg	Expression ARNm MXR + mesure fonctionnelle	Navarro et al., 2012
ZM	1	France	nTiO ₂	Hémocytes (viabilité, phagocytose, phosphorylation des MAPK)	Couleau et al., 2012
ZM	1	Italie	Métabolites de la cocaïne	Cytotoxicité, SOD, Cat, GPx, GST, LPO, PCC, MN, comètes	Parolini et Binelli, 2013
ZM	1	Allemagne	Cyanotoxine (BMAA)	GST, Cat, GR, GPx	Contardo-Jara et al., 2014
ZM	1	France	HAPs (1-nitropyrene)	Adduits à l'ADN, expression des gènes codant pour Cat, SOD, GST, HSPP70, AHR, Pgp, MT	Châtel et al., 2014
ZM	1	France	nCeO ₂	Activité Na/K ATPase, paramètres ioniques, GPx, Cat, GST, LPO, glycogène, lipides, lysosomes	Garaud et al., 2015
ZM	1	Italie	Drogues	Comètes, apoptose, MN	Parolini et al., 2016
ZM	1	Italie	Antidépresseurs	SOD, Cat, GPx, GST, LPO, PCC, MN, MXR	Magni et al., 2017
Etudes incluant de plus hauts niveaux d'organisation					
Espèce	Pop(s)	Lieu	Polluant(s) testé(s)	Biomarqueur(s) mesuré(s)	Référence
ZM	1	France	Cu, Hg	Filtration	Mouabad et Pihan, 1993
ZM	1	Pays bas	Cu, Zn, Cd	Filtration	Kraak et al., 1994
ZM	1	Pays bas	Ni	Filtration	Stuijzand et al., 1995
ZM	1	Allemagne	Pentachlorophénol	Mouvement valvaire	Borcherding et Jantz, 1997
ZM	1	Pays bas	Acridine	Filtration, mortalité	Kraak et al., 1997
ZM	2	Allemagne	Cd, pentachlorophénol, nitroaniline	Mouvement valvaire	Borcherding et Wolf, 2001
ZM	1	Croatie	Atrazine	Histologie, mortalité	Zupan et Kalafatic, 2003
ZM	2	France	HAP, ETM	Indice gonadique, prévalence parasitaire, histologie	Minguez et al., 2009
ZM	1	France	BaP	Indice de condition, ARN, adduits	Châtel et al., 2012
ZM	1	Italie	Morphine	Filtration, cytotoxicité, SOD, Cat, GPx, GST, LPO, PCC, MN	Magni et al., 2014
ZM	1	Italie	MDMA	Filtration, cytotoxicité, SOD, Cat, GPx, GST, LPO, PCC, MN	Parolini et al., 2014
ZM	1	France	nCeO ₂	Filtration, ARN, hémocytes, biomarqueurs sub-cellulaires	Garaud et al., 2016
ZM et QM	1 x 2 espèces	France	Ni, Cr	Filtration, biomarqueurs sub-cellulaires	Potet et al., 2016

Légende : MN = micronoyaux ; MT = métallothionéines ; HSP = heat shock protein ; MTLP = métallothionéine-like protein ; IC = indice de condition ; IG = indice gonadique ; EROD = activité de CYP450 ; LPO = peroxydation lipidique ; VTG = vitellogénine ; MXR = résistance multixénobiotique ; SOD = superoxyde dismutase ; Cat = catalase ; GPx = glutathion peroxydase ; GST = glutathion-S-transférase ; PCC = protéine carbonyl content ; AHR = aryl-hydrocarbon receptor ; Pgp = P-glycoprotéine ; GSH = glutathion ; ROS = reactive oxygen species ; LN = lipides neutres ; MAPK = mitogen activated protein kinase

Ce tableau permet plusieurs constats. On remarque que le nombre de biomarqueurs utilisés augmente avec le temps, tout comme l'intégration des effets au niveau individuel avec l'activité de filtration ou la mortalité par exemple. En effet, les perturbations sont souvent liées à des causes multifactorielles, et seul un panel d'outils complémentaires et pertinents peut aider à les identifier (Guerlet et al., 2007 ; Vasseur et Cossu-Leguille, 2003). En utilisant des combinaisons de biomarqueurs (approche multi-biomarqueurs), on obtient une évaluation intégrée de l'impact d'un polluant et de son mode d'action (Magni et al., 2017). Cela peut aussi permettre d'évaluer les effets engendrés par des mélanges de contaminants, même si en pratique ils sont peu souvent utilisés avec cet objectif lors d'études en laboratoire (CF Tableau I ; Parolini et al., 2016).

Des outils existent pour ensuite intégrer l'ensemble des réponses mesurées au niveau individuel en un indice intégrateur. Ils permettent de résumer les réponses des biomarqueurs et simplifier leur interprétation. C'est le cas de l'IBR (Integrated Biomarker Response ; Beliaeff et Burgeot, 2002) et du BRI (Biomarker Response Index) développé pour *M. edulis* par Hagger et al. (2008). Ces outils permettent de comparer les niveaux de stress entre plusieurs sites, d'identifier les périodes de l'année où l'impact est le plus fort et la période la plus adaptée pour utiliser les biomarqueurs, ou encore de mettre en évidence la toxicité de polluants pris séparément ou en mélange (Magni et al., 2017). Au fil de leur utilisation, on découvre des biais dans ces indicateurs, qui sont alors revus (Devin et al., 2014a). L'IBR est généralement calculé à partir de marqueurs sub-individuels, mais certaines études y incluent des biomarqueurs individuels. Des efforts sont faits pour construire des indicateurs basés sur une combinaison raisonnée de biomarqueurs, susceptibles d'être ensuite associés à des informations chimiques et écologiques (Dagnino et al., 2008, 2007). Les biomarqueurs au niveau sub-cellulaire utilisés au cours de ces travaux sont présentés en Figure 4 4.

Mais même en utilisant ces approches multi-marqueurs, les biomarqueurs restent critiqués pour leur manque de spécificité et leur manque de pertinence écologique (De Coen et al., 2000 ; Forbes et al., 2006 ; Hagger et al., 2006).

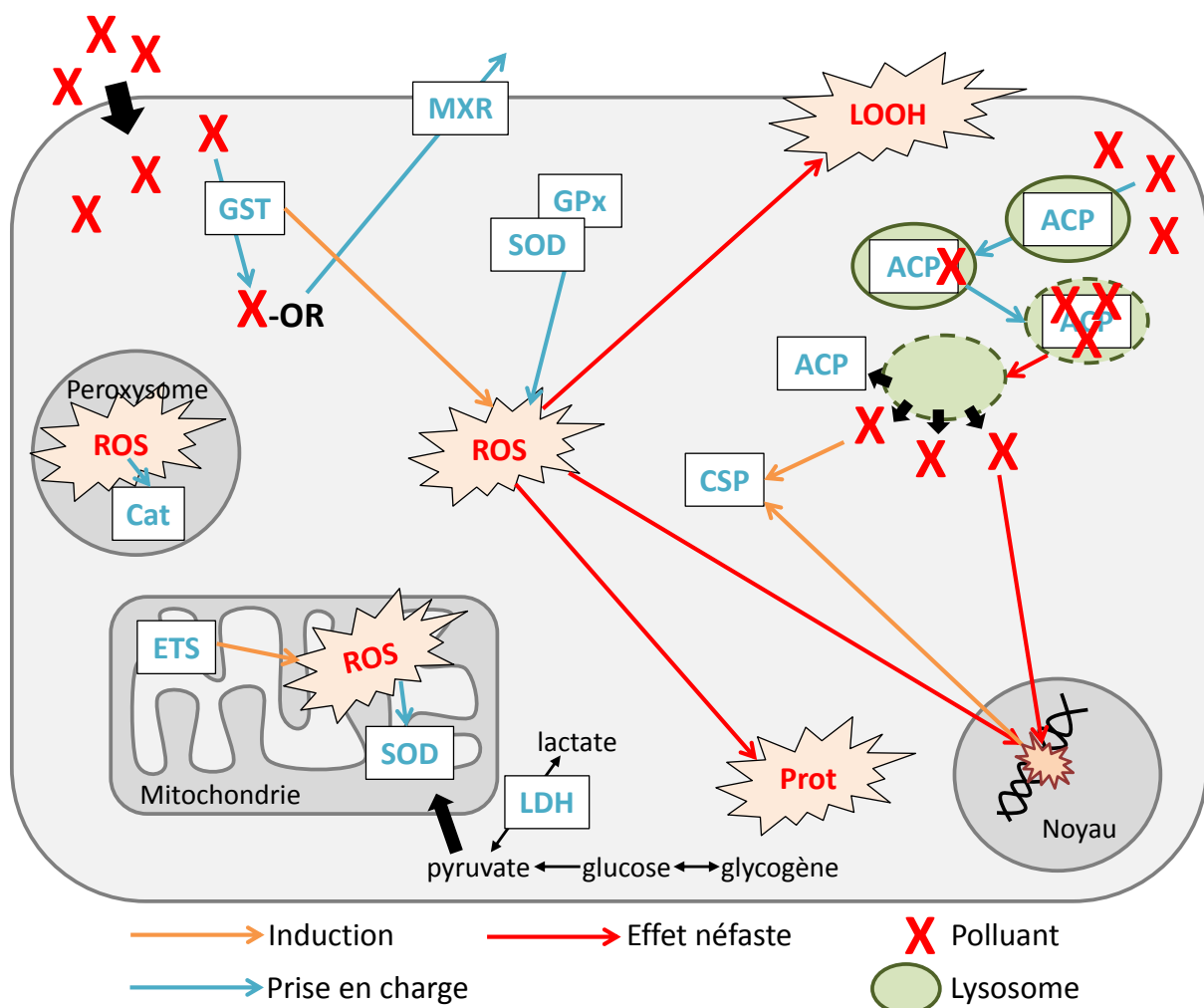


Figure 4 : Représentation schématique de l'effet d'un polluant sur les différents biomarqueurs mesurés au niveau sub-cellulaire

6. Difficultés d'application des biomarqueurs

6.1. Facteurs confondants

Les modifications biologiques observées chez un organisme et utilisées comme biomarqueurs ne sont pas uniquement dues à la présence de contaminants. Une population exposée à un contaminant est en parallèle soumise à des facteurs biotiques et abiotiques changeants, tels que des modifications de l'habitat, la disponibilité en nourriture, la prédation, le parasitisme, le passage d'un stade de vie à un autre, le sexe, l'âge, l'acquisition de la maturité sexuelle, le statut reproducteur... Le rôle de ces facteurs confondants sur les réponses des biomarqueurs peut être étudié aussi bien en laboratoire que sur le terrain.

Les plus étudiés sont la température, la salinité, et le trio taille/poids/âge. La température peut influencer les biomarqueurs de différentes manières (Sokolova et Lannig, 2008), notamment les

activités enzymatiques et la cinétique des contaminants, et entraîner la mort des organismes lorsqu'elle est trop élevée (Del Piero et al., 2012). D'autres facteurs entrent également en jeu comme la lumière, le cycle circadien, le régime alimentaire, le pH, la teneur en oxygène. La disponibilité en nourriture peut aussi jouer un rôle sur les réponses des biomarqueurs, et sur des marqueurs plus individuels comme l'indice de condition (Bourgeault et al., 2010).

La plupart des facteurs confondants sont liés à des variations saisonnières naturelles des facteurs biotiques (cycle reproducteur) et abiotiques (température, disponibilité en nourriture, pollution en lien avec les événements hydrologiques, application de pesticides à certaines périodes de l'année). Wojtal-Frankiewicz et al. (2017) ont mis en évidence l'impact de la saisonnalité et de plusieurs facteurs abiotiques (surtout la force ionique, l'oxygène et le pH) sur le stress oxydant chez *D. polymorpha*, suggérant une tolérance limitée aux conditions environnementales changeantes. Bourgeault et al. (2011) observent une variation saisonnière du taux de filtration, qui diminue en décembre et augmente de janvier à août *in situ* du fait de la température ; les auteurs notent aussi que la filtration est plus forte sur le site où il y a moins de nourriture disponible. Dans cette même étude, ils observent une variation saisonnière de l'indice de condition qui augmente d'octobre à mars et diminue fortement jusqu'en septembre.

Les biomarqueurs peuvent aussi répondre à des stress généraux associés à l'échantillonnage (par exemple, la synthèse d'un nouveau byssus nécessite de l'énergie), à l'acclimatation aux conditions expérimentales et sa durée, à l'anoxie, aussi bien pour des études en laboratoire, *in situ*, que pour des transplantations.

Si on ne prend pas en compte ces facteurs environnementaux, on peut aisément surestimer l'effet des contaminants ; une modification d'un biomarqueur n'est en effet pas toujours due à la présence de polluants. Les études en laboratoire permettent de peaufiner et de comprendre les mécanismes responsables des effets écologiques observés (Johnston et Roberts, 2009). Actuellement pour la dreissène, les études en conditions de stress multiples sont assez limitées en laboratoire, et sont plutôt réalisées *in situ* (Tableau II).

Tableau II : Application des biomarqueurs chez les dreissènes *in situ*

Espèce	n	Lieu	Facteur de variation	Transplantation	Saison	Biomarqueurs	Référence
ZM	3	Allemagne	Pollution		oui	Métabolisme énergétique complet	Sprung, 1995 (a,b, c)
ZM	2	Allemagne	Pollution	N.D.		Mouvement valvaire (Dreissena-monitor)	Borcherding et Jantz, 1997
ZM	1	France	Pollution	oui (1 > 7)		MN, IC, IG	Mersch et Beauvais, 1997
ZM	1	USA	Saisonnalité		oui	Budget énergétique	Stoeckmann et Garton, 1997
ZM	13	Canada	Pollution			MT, EROD, LPO, VTG, cassure ADN	De Lafontaine et al., 2000
ZM	2	USA	Saisonnalité		oui	ETS, taux de respiration	Fanslow et al., 2001
ZM	1	Croatie	Pollution	oui (1 > 1)		Dommage ADN (comètes)	Pavlica et al., 2001
ZM	1	Belgique	Pollution	oui (1 > 5)		IC, SFG	Smolders et al., 2002
ZM	1	Croatie	Pollution	oui (1 > 5)		MN, comètes	Klobucar et al., 2003
ZM	1	France	Pollution	oui (1 > 3)		MXR	Pain et Parant, 2003b
ZM	1	Belgique	Pollution	oui (1 > 5)		AEC (glycogène, lipides, ETS), SFG	Smolders et al., 2004a
ZM	2	Italie	Pollution		oui	IG, histo, Sex ratio	Binelli et al., 2004
ZM	17	Italie	Pollution			EROD, AChE	Binelli et al., 2005
ZM	14	Italie	Pollution			EROD, AChE	Ricciardi et al., 2006
ZM	3	France	Pollution			adduits ADN	Le Goff et al., 2006
ZM	1	France	Pollution	oui (1 > 4)		MT	Marie et al., 2006a
ZM	6	Italie	Pollution			AChE, EROD, comètes	Binelli et al., 2007
ZM	1	France	ABM/PBM	oui (1 > 3)	oui	Histo, IG, lipides	Guerlet et al., 2007
ZM	1	France	Saisonnalité et PhCh	oui (1 > 3)	oui	MXR	Pain et al., 2007
ZM	1	Espagne	Statut reproducteur		oui	Acides gras (33), IG	Lazzara et al., 2012
ZM	8	Italie	Pollution			SOD, Cat, GPx, GST, LPO, PCC, cassures ADN, BRI	Parolini et al., 2013
ZM	11	Espagne	Pollution		oui	SOD, Cat, GSH, GST, MXR, LDH, LPO, cassures ADN, IG, MXR, filtration	Faria et al., 2014
ZM	8	France	Pollution			MT ; IC ; expression gènes codant pour MT, SeGPx, piGST ; lysosomes ; MXR ; LPO ; Protéomique, IBR	Pain-Devin et al., 2014
ZM	1	France	Pollution	oui (1 > 3)		adduits à l'ADN, expression des gènes codant pour Cat, SOD, GST, HSP70, AHR, Pgp, MT	Châtel et al., 2015
QM	5	Hongrie	Pollution		oui	MT, VTG, EROD, LPO, DNAsb, IC	Acs et al., 2016
ZM	2	Pologne	PhCh et cyanobactéries		oui	Cat, GSH, LPO	Wojtal-Frankiewicz et al., 2017
ZM et QM	5	Hongrie	Pollution		oui	MT, VTG, EROD, LPO, DNAsb, IC	Farkas et al., 2017

Légende : MN = micronoyaux ; IC = indice de condition ; IG = indice gonadique ; MT = métallothionéines ; EROD = activité de CYP450 ; LPO = peroxydation lipidique ; VTG = vitellogénine ; ETS = système de transport d'électrons mitochondrial ; SFG = scope for growth ; MXR = résistance multixénobiotique ; AEC = allocation énergétique cellulaire ; AChE = acétylcholinestérase ; SOD = superoxyde dismutase ; Cat = catalase ; GPx = glutathion peroxydase ; GST = glutathion-S-transférase ; PCC = protein carbonyl content ; BRI = biomarker response index ; IBR = integrated biomarker response ; HSP = heat shock protein ; AHR = aryl-hydrocarbon receptor ; Pgp = P-glycoprotéine ; DNAsb = cassure à l'ADN ; GSH = glutathion

Ces études *in situ* sont surtout focalisées sur l'impact de la pollution sur les biomarqueurs, bien que certaines s'intéressent uniquement à la saisonnalité des réponses mesurées, ou à l'impact d'autres facteurs (statut reproducteur, physico-chimie du milieu, cyanobactéries). A la différence des études en laboratoire, elles sont souvent effectuées sur plusieurs populations, et impliquent parfois des transplantations d'organismes (biosurveillance active). En revanche là encore, très peu se sont intéressées aux réponses de *D. r. bugensis*. La prise en compte des multiples facteurs présents dans les milieux naturels est donc possible, même si elle demeure compliquée à comprendre et à analyser d'un point de vue statistique (Faria et al., 2014 ; Heugens et al., 2001).

6.2. Extrapolation aux niveaux supérieurs

Malgré leur précocité, un des reproches fait aux biomarqueurs sub-individuels est leur manque de pertinence écologique. Il est en effet difficile de faire le lien entre des changements cellulaires

précoces, des effets organismiques et l'intégrité des populations ou des communautés, même si certains peuvent malgré tout présager de l'impact aux niveaux supérieurs. L'extrapolation des biomarqueurs aux niveaux supérieurs est rendue difficile notamment à cause des mécanismes compensatoires et de régulation mis en place par les organismes. Ainsi, une atteinte au niveau individuel n'entraînera pas systématiquement de répercussion aux niveaux supérieurs.

Il est donc difficile de discriminer les réponses naturelles des réponses au stress chimique, et d'extrapoler les réponses d'une échelle biologique à une autre, et d'une espèce à une autre. Mais il existe également une variation de la sensibilité au stress chimique d'une espèce à une autre, et parfois entre populations d'une espèce : une même mesure de biomarqueur sur deux espèces différentes, ou deux populations différentes ne reflètera donc pas forcément le même degré de contamination, et ne sera pas indicateur du même niveau de danger/risque pour la population.

7. Le phénomène de tolérance aux contaminants : implications en biosurveillance

La tolérance est définie comme la capacité, pour un organisme, à gérer un stress, aussi bien d'origine naturelle (température, salinité, oxygène, ...) qu'anthropique (contaminants). Cette capacité est présente chez tous les organismes (bactéries, champignons, animaux et végétaux). Le terme de résistance est similaire, mais s'intéresse plutôt à la base génétique de cette tolérance.

Dans le milieu, les contaminants agissent comme une force sélective au même titre que les facteurs environnementaux, favorisant les individus les plus aptes à la génération suivante, conduisant donc à une augmentation de la tolérance. C'est le cas par exemple pour les insectes résistants aux pesticides (Newman, 2015), dont les premiers cas ont été étudiés au début des années 1900 (Pimentel et al., 2005). Pour les organismes aquatiques, les premières études sur la tolérance datent des années 1950, et étaient au départ menées sur les algues et les bactéries (Klerks et Weis, 1987).

Au niveau populationnel, la tolérance peut être envisagée comme un facteur confondant des réponses des organismes. En effet, les paramètres environnementaux et la contamination sont différents d'un site à l'autre : chaque population s'adapte à son milieu, met en place des mécanismes pour lutter contre les stress environnementaux, et seuls les individus tolérants contribueront aux générations suivantes. Différentes populations d'une même espèce auront donc une tolérance différente aux contaminants, et donc des réponses biologiques différentes, qu'il est nécessaire d'évaluer si on envisage de les utiliser en biosurveillance. La tolérance doit être prise en compte quand on veut utiliser des réponses biologiques (biochimiques, comportementales, génétiques, biomarqueurs) pour faire de la biosurveillance. Les niveaux basaux des biomarqueurs sur le terrain sont souvent différents d'une population à une autre, car chaque population est influencée par les conditions environnementales locales et par ses caractéristiques génétiques. Cette divergence entre populations d'une même espèce doit être considérée comme un facteur confondant des réponses des biomarqueurs

et souligne la nécessité de connaître en profondeur les populations d'organismes sentinelles pour pouvoir interpréter correctement leurs réponses aux changements environnementaux. Après tout, les études *in situ* ne se font que sur les organismes ayant survécu... Dans la même idée, deux espèces différentes (même très proches phylogénétiquement) n'auront pas, elles non plus, la même tolérance aux contaminants.

Il existe principalement deux façons de devenir tolérant à un contaminant : l'acclimatation physiologique (*via* une exposition subléta à ce contaminant, sans base génétique et donc non transmissible, sauf par des mécanismes épigénétiques) ou l'adaptation génétique (dans les populations exposées sur plusieurs générations ; sélection naturelle des individus résistants ; transmissible à la descendance).

L'utilisation des biomarqueurs dans notre contexte

Pour répondre à la menace liée à l'introduction de nombreux polluants dans l'environnement, l'évaluation du risque s'est historiquement focalisée sur des mesures simples pour détecter rapidement leur présence et leur risque dans les écosystèmes. D'autres outils se sont développés petit à petit. Le monitoring chimique permet de mesurer le niveau de pollution et d'évaluer le danger encouru par les organismes dans un milieu donné. La qualité biologique d'un milieu, mesurée à l'aide de différents indices de diversité, reflète son statut écologique. Et les biomarqueurs au niveau infra-individuel fournissent des indicateurs précoces, sensibles et peu coûteux des effets des contaminants et de leur mode d'action. Tous ces outils sont complémentaires (Chapman, 2002 ; Smolders et al., 2004) mais la nécessité de développer des stratégies de biosurveillance des milieux effectivement applicables par les gestionnaires a conduit à appliquer des approches raisonnées, avec un souci de ratio coût/efficacité le plus favorable possible. L'accent a donc souvent été mis sur le monitoring chimique et les indices de diversité, au détriment des biomarqueurs dont la variabilité est très mal connue et comprise. Depuis leur description dans les années 90, les biomarqueurs sont tenus de répondre à un certain nombre de critères (Newman, 2015) :

- ils doivent permettre d'identifier les effets des contaminants avant que des conséquences n'apparaissent aux niveaux supérieurs
- leur cinétique de réponse doit être connue (relation concentration/effet)
- leur mesure doit être rapide, peu coûteuse, et suffisamment simple pour être largement utilisée, y compris *in situ*
- ils doivent être spécifiques d'un contaminant ou d'une classe de contaminants
- ils doivent être applicables à une large gamme d'espèces
- dans l'idéal, ils doivent renseigner sur le statut physiologique et la performance des individus

- les facteurs pouvant confondre leurs réponses doivent être identifiés (variabilité inhérente)

Cette liste de critères est longue (et pourrait être rallongée), et rares sont les biomarqueurs susceptibles d'y répondre complètement. Contrairement au milieu marin où une certaine structuration se développe (Burgeot et al., 2017 ; Vethaak et al., 2017), il n'existe pas particulièrement de stratégie raisonnée pour le choix des biomarqueurs, le choix des espèces, ni sur la mise en place de protocoles adaptés à la biosurveillance en eau douce. Mais sachant le potentiel de ce type d'outils, de nombreuses méthodes ont été développées pour tenter de gommer ces incertitudes, et promouvoir leur intégration dans une stratégie raisonnée de biosurveillance des eaux douces (Besse et al., 2012 ; Connon et al., 2012 ; Martinez-Haro et al., 2015 ; Wernersson et al., 2015).

La clé du succès réside majoritairement dans la compréhension des facteurs confondants qui affectent la plupart des biomarqueurs utilisés en écotoxicologie. En effet dans un milieu naturel complexe, les organismes sont soumis à des stress multiples, à des mélanges de contaminants, impliquant différents mécanismes de toxicité, à des conditions physico-chimiques fluctuantes et parfois défavorables (température, salinité, oxygène dissout, pollution, parasites). Traditionnellement, une réponse élevée est interprétée comme un stress, alors qu'en réalité elle peut simplement correspondre à une variation normale pour l'organisme en question et n'entraîner aucun impact sur sa fitness. L'idée est de réussir à identifier les causes naturelles et anthropiques responsables de la variabilité des réponses mesurées, et de connaître l'amplitude des réponses attendue dans un contexte physiologique normal (Baird et Burton, 2001).

Deux approches sont possibles pour l'utilisation des biomarqueurs *in situ* pour évaluer la qualité des milieux. La biosurveillance active est réalisée grâce à des transplantations : des organismes sont prélevés dans une population source, et transplantés (encagés) sur les sites dont on veut évaluer la qualité. La biosurveillance passive elle est réalisée en utilisant les organismes naturellement présents sur le site.

La biosurveillance active permet de sélectionner des organismes standardisés (taille homogène, sexe, poids, âge, statut reproducteur) avec une histoire de vie similaire, et donc de garder un contrôle sur les caractéristiques bio-écologiques de la population (Amiard et Amiard-Triquet, 2015a). Comme les individus transplantés partent tous théoriquement des mêmes valeurs initiales, une modification des valeurs des biomarqueurs pourra plus facilement être reliée à une modification de la contamination du milieu, si l'influence des autres facteurs physico-chimiques sur ces marqueurs est connue. Cette méthode permet de décider du temps d'exposition, de détecter des contaminations récentes, et d'évaluer la réaction d'une même population d'origine sur différents sites. Toutefois elle présente deux inconvénients majeurs. D'abord, lorsque l'espèce indicatrice sélectionnée est invasive et/ou qu'elle n'est pas présente spontanément sur le site, le transfert est impossible ce qui constitue un frein méthodologique. Mais même dans le cas d'une espèce autochtone, les transplantations peuvent

modifier le phénomène migratoire et les flux de gènes. Il faut donc s'assurer de réaliser les transplantations hors période de reproduction (surtout quand on utilise des espèces aussi dynamiques que les dreissènes) et que les organismes encagés ne peuvent pas s'échapper. D'autre part, cette méthode néglige le phénomène d'adaptation génétique : les réponses des individus encagés, même si elles mettent en évidence une contamination, ne seront pas forcément représentatives de celles des individus autochtones qui auraient pu développer une tolérance suite à une exposition chronique (Berthet et al., 2011). La question de la transition entre effets individuels et populationnels restera en suspend.

La biosurveillance passive, elle, intègre de manière explicite les mécanismes d'acclimatation et d'adaptation puisque, par principe, il faut qu'une population se maintienne dans l'écosystème pour pouvoir être échantillonnée. En se débarrassant de la contrainte de la transplantation et en intégrant l'adaptation, la difficulté principale qui émerge est l'interprétation des valeurs prises par les biomarqueurs. En effet, les processus adaptatifs peuvent conduire à des valeurs radicalement différentes pour un biomarqueur entre 2 populations, sans que la fitness de chaque population ne soit affectée. Il s'agira alors de chercher à définir une gamme de variation pour chaque biomarqueur, au-delà de laquelle les processus adaptatifs ne peuvent être les seuls impliqués. Cette méthode nécessite toutefois que les organismes soient présents en nombre suffisant sur les sites sélectionnés.

Cette synthèse bibliographique met en exergue la complexité du travail sur les biomarqueurs, et souligne l'interdépendance de nombreux facteurs à prendre en compte pour les utiliser de manière pertinente.

L'objectif de ce travail est de comprendre l'influence de ces facteurs de variations (paramètres biotiques et abiotiques, réponses biphasiques, phénomène de tolérance) sur les réponses des biomarqueurs chez les dreissènes, afin d'évaluer la faisabilité de leur utilisation en biosurveillance.

Des approches *in situ* ont été réalisées sur plusieurs populations des deux espèces, à différentes périodes de l'année, pour tenter d'établir une gamme de variation « normale » des biomarqueurs en réponse aux fluctuations saisonnières, tout en intégrant les facteurs intrinsèques aux différents milieux.

Le couplage d'analyses physico-chimiques et de réponses cellulaires et biochimiques *in situ* devrait permettre de détecter les effets des facteurs abiotiques, dont les contaminants, sur les organismes, tout en examinant les relations de cause à effet. Ces études *in situ* permettront aussi d'évaluer la variabilité intra et inter-populationnelle des réponses des organismes dans leur environnement naturel, et de voir si *D. r. bugensis* est aussi apte que sa congénère à être utilisée en biosurveillance.

Présentation des organismes et éléments méthodologiques

La question de l'évaluation du risque environnemental ne peut pas être traitée indépendamment de celle concernant les organismes modèles. A toutes les échelles décrites précédemment, la question de la communauté étudiée, du groupe trophique considéré, de l'espèce modèle utilisée sera centrale pour la généralisation des résultats, la fiabilité et la pertinence de l'évaluation réalisée. Ce chapitre présente les différents aspects des organismes étudiés : leur systématique, leur anatomie, leur physiologie, leur dynamique d'invasion, leur écologie et enfin leur intérêt en biosurveillance. Cette présentation des dreissènes est suivie d'une partie plus méthodologique, avec la présentation des sites de prélèvements, les différentes mesures réalisées sur le terrain (physico-chimie des sites et contamination) et en laboratoire (contamination des organismes, biomarqueurs).

Les dreissénidés comme organismes sentinelles

1. Systématique

La classification (Figure 5) a été établie à partir du site ITIS (Integrated Taxonomic Information System, <http://www.itis.gov/>, consulté le 7.08.2017).

Règne Animalia
Sous-règne Bilateria
Infra-règne Protostomia
Super-embranchement Lophozoa
Embranchement Mollusca
Classe Bivalvia, Linnaeus, 1758
Sous-classe Heterodonta, Neumayr, 1884
Ordre Veneroida, H. Adams et A. Adams, 1856
Super-famille Dreissenoidea, Gray, 1840
Famille Dreissenidae, Gray, 1840
Genre *Dreissena*, van Beneden, 1835
Espèce *Dreissena polymorpha* Pallas, 1771 ; nom vernaculaire : moule zébrée
Espèce *Dreissena bugensis* Andrusov, 1897 ; nom vernaculaire : moule quagga

Figure 5 : Systématique des espèces du genre *Dreissena*

La moule zébrée, *Dreissena polymorpha*, tire son nom vernaculaire des zébrures présentes sur sa coquille ; « polymorpha » fait référence aux nombreux morphes qui existent au sein de cette espèce, notamment en termes de coloration. *Dreissena rostriformis bugensis* est couramment appelée « moule quagga », en référence à une sous-espèce de zèbre aujourd'hui éteinte (*Equus quagga quagga*), dont les zébrures sont beaucoup moins marquées (May et Marsden, 1992).

2. Origine, historique et répartition géographique

Dreissena polymorpha et *Dreissena rostriformis bugensis* sont des espèces très proches, toutes deux originaires de la région Ponto-Caspienne (Quinn et al., 2014). Les ancêtres des dreissènes seraient apparus dans le Tethys (-420 à -250 millions d'années) au moment de la Pangée, puis se seraient diversifiés lors de la formation du Paratethys il y a environ 30 millions d'années (Morton, 1993). Le premier représentant du genre *Dreissena* serait âgé de 10.6 millions d'années (Stepien et al., 2014).

La dispersion des dreissènes est médiée par des mécanismes naturels (le courant, les oiseaux et les autres animaux) ou anthropiques (la construction de canaux, la navigation, la pêche, le ballast, les hydravions, les activités de recherche...) qui sont expliqués en détail par Carlton (1993). Cette dispersion est facilitée par l'existence du byssus qui leur permet de se fixer sur des supports rigides, comme des coques de bateaux (Tachet et al., 2000). Selon les mécanismes, ce sont les larves, les

juvéniles ou les adultes qui vont être transportés, aussi bien à l'échelle locale que globale (Carlton, 1993 ; Pollux et al., 2010).

2.1. En Europe

Elle s'est dispersée en Europe au début du 19^{ème} siècle (Figure 6), principalement *via* les systèmes de canaux bâtis en Europe de l'Ouest (van der Velde et al., 2010). Dès 1820, on la retrouve dans les régions baltiques, mais aussi en Grande Bretagne et aux Pays-Bas, où elle a probablement été importée sur du bois flotté destiné au chauffage ou à la construction (van der Velde et al., 2010). Elle est arrivée dans le delta du Rhin en 1826. Dès 1860, elle est présente dans toute l'Europe au nord des Alpes (Ram et al., 2012). Une seconde vague d'expansion a eu lieu dans la seconde moitié du 20^{ème} siècle/début 21^{ème}, dans des régions jusque-là préservées par les barrières naturelles (deltas, montagnes...), devenues franchissables avec la facilitation de la circulation en Europe (van der Velde et al., 2010). *D. polymorpha* est dès lors retrouvée dans les régions alpines et en Europe du sud : dans les lacs alpins et subalpins dans les années 1960 (Pollux et al., 2003), en Irlande en 1997 (Burlakova, 2006), au nord-ouest de l'Espagne en 2001 (Navarro et al., 2006), et enfin au sud de l'Italie en 2006 (Lori et Cianfanelli, 2006). Elle est désormais présente dans toute l'Europe, excepté en Norvège et en Islande (van der Velde et al., 2010).

Cette période (20/21^{ème} siècle) voit aussi la dispersion de *D. r. bugensis* (Ram et al., 2012), qui était jusqu'en 1940 confinée au Boug méridional (Southern Bug) et au Dniepr (Dnieper), deux fleuves ukrainiens qui se jettent dans la Mer Noire (Son, 2007 ; van der Velde et al., 2010 ; Figure).

Entre 1964 et 1989, elles s'est répandue dans un rayon de 500 km au nord, au sud et à l'est, en empruntant les canaux (Mills et al., 1996). Depuis les années 1980, Elle est apparue dans les bassins du Don et de la Volga, en Russie dans les années 1980 (Orlova et al., 2004 ; Son, 2007), et dans le Danube (Roumanie) en 2004 (Zhulidov et al., 2006). Elle apparaît en Europe de l'Ouest en 2006 dans le Hollands Diep, un bras de rivière faisant le lien entre le Rhin et la Meuse (Molloy et al., 2007) et dans la rivière Main (van der Velde et Platvoet, 2007). Bien que l'expansion de *D. r. bugensis* en Europe ait été beaucoup plus tardive, elle n'en est pas pour autant moins lente.



Figure 6 : Répartition et expansion de *D. polymorpha* et *D. r. bugensis* en Europe (d'après Morton, 1993 ; van der Velde et al., 2010)

3. Morphologie et Anatomie

3.1. Morphologie

Les dreissènes sont des bivalves, leur corps est donc enfermé dans une coquille à deux valves, sécrétée par le manteau, et composée de carbonate de calcium (CaCO_3). La coquille de *D. polymorpha* est aplatie sur la face ventrale, avec une légère courbure concave, et présente un angle ventro-latéral aigu. La face ventrale de *D. r. bugensis* est plutôt convexe et son angle ventro-latéral arrondi (Figure). L'ouverture permettant l'extension du byssus est plus antérieure chez *D. r. bugensis*.

Leur forme est tout à fait adaptée à leur mode de vie : la forme de leur face ventrale et la fixation grâce au byssus les rendent difficilement préhensibles, le crochet améliore leur stabilité, et leur coquille est comme aiguisée afin de limiter la prédation (Claudi et Mackie, 1994). Il existe une forte variabilité morphologique inter et intra-spécifique (Figure).

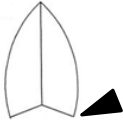
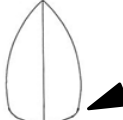
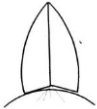
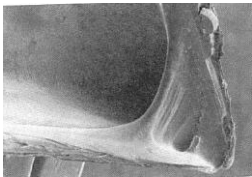
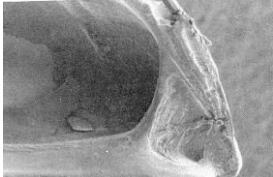
	<i>D. polymorpha</i>	<i>D. r. bugensis</i>
Vue de derrière	 Côté ventral concave. Angle ventro-latéral caréné (flèche).	 Côté ventral convexe. Angle ventro-latéral arrondi (flèche).
Mode de vie épifaunal		
Vue des plaques myophores		

Figure 7 : Caractéristiques morphologiques de *D. polymorpha* (à gauche) et *D. r. bugensis* (à droite) (d'après Claudi et Mackie, 1994)



Figure 8 : Différents morphotypes de *D. polymorpha* (en haut) et *D. r. bugensis* (en bas) observés lors des campagnes de prélèvements

3.2. Anatomie

Au niveau interne, les muscles adducteurs antérieur et postérieur, permettent la fermeture des valves (Figure 9). Le ligament, situé du côté antéro-dorsal, forme une charnière et permet de les ouvrir (Claudi et Mackie, 1994). Le corps est enveloppé dans le manteau, qui s'ouvre en deux endroits ; le premier laisse passer les siphons inhalant et exhalant (Claudi et Mackie, 1994). Le plus large est le siphon inhalant (SI) bordé de 80 à 100 tentacules qui commencent le tri des particules alimentaires. Le siphon exhalant (SE), plus étroit et conique, est positionné dorsalement par rapport au premier. Une autre ouverture dans le manteau permet l'extension du pied et du byssus. Les branchies se trouvent entre le pied et le manteau (Claudi et Mackie, 1994). La masse viscérale abrite le système digestif, le système rénal ainsi que le cœur et les gonades. La bouche forme un orifice entouré d'une paire de palpes labiaux. Elle s'ouvre sur un court œsophage qui aboutit à un estomac, où se situe le stylet cristallin, un organe gélatineux qui sécrète les enzymes digestives. La nourriture passe ensuite dans la glande digestive.

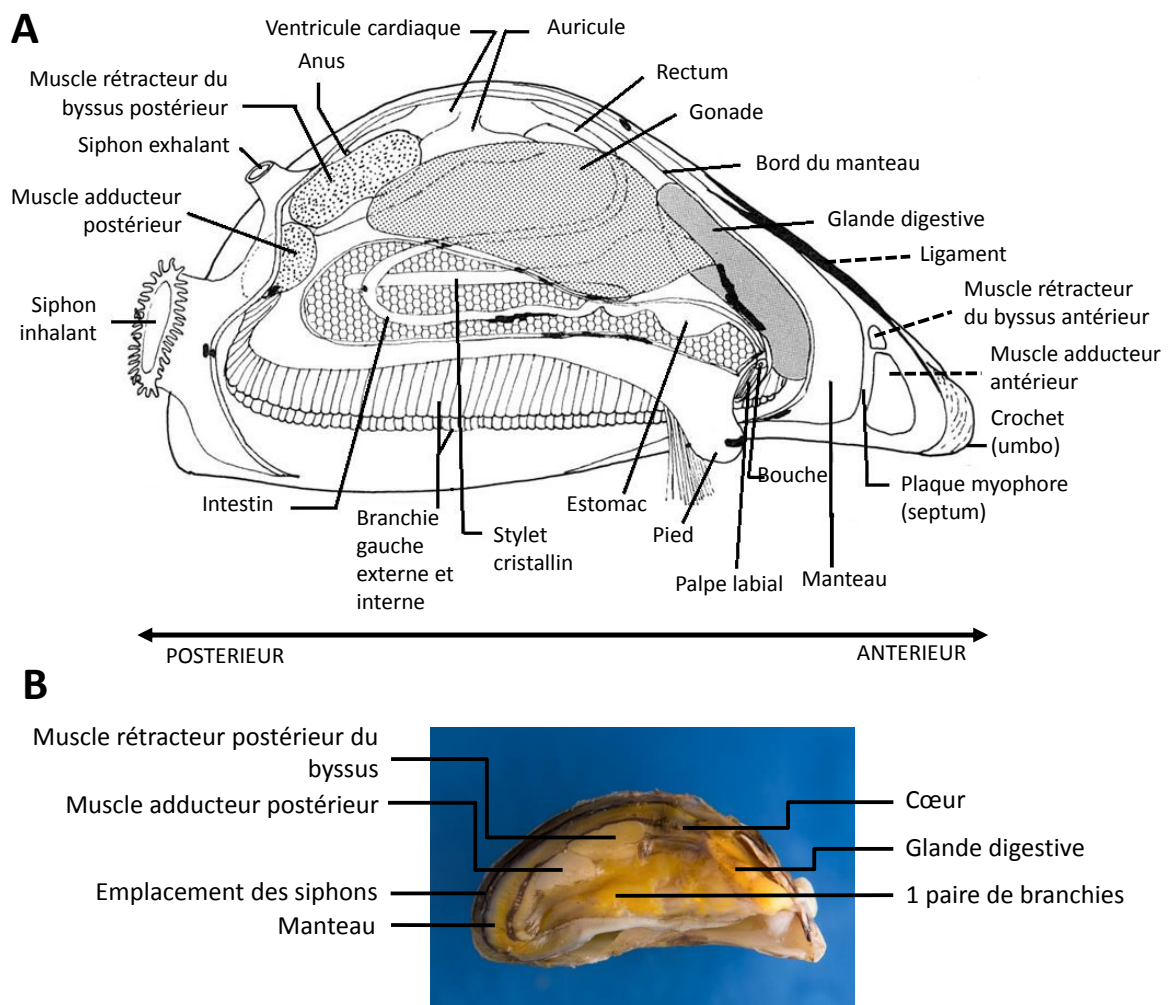


Figure 9 : Schéma (A) et photographie (B, crédit photo : D. Coacolo) montrant la localisation des principaux organes internes de *D. polymorpha* (d'après Claudie et Mackie, 1994)

3.3. Différenciation des deux espèces

La différenciation des dreissènes peut se faire sur la base de critères morphologiques, tels que la forme de la coquille (Molloy et al., 2010) ou encore l'anatomie des siphons (Smith, 1999). L'angle ventro-latéral est très souvent utilisé pour distinguer visuellement les deux espèces (Molloy et al., 2007). L'identification morphologique, bien que controversée, est nécessaire dans les programmes de monitoring, lorsqu'on travaille sur un grand nombre d'individus dans des conditions de terrain. Teubner et al. (2016) ont significativement amélioré le calcul de l'angle ventro-latéral (moins d'1% d'erreur), si toutefois il est effectué par des personnes entraînées (sinon il passe à 8.4%). Mais l'utilisation de marqueurs génétiques reste la seule méthode fiable à 100% (Marescaux et Van Doninck, 2013).

4. Ecologie

La forte plasticité morphologique évoquée précédemment, couplée aux fortes variabilités génétiques retrouvées à la fois entre les espèces et entre les populations suggèrent une forte plasticité physiologique ainsi qu'une tolérance et des réponses différentes aux niveaux intra et inter-spécifiques (Hebert et al., 1989). On retrouve les dreissènes aussi bien en Suède qu'en Italie, ce qui veut dire qu'elles peuvent vivre dans des environnements très variés, et possèdent de bonnes capacités de compensation et/ou de tolérance pour une large gamme de paramètres environnementaux. Ces différents facteurs ont été revus dans différentes études, et sont généralement utilisés pour comprendre la colonisation des milieux et prédire la dispersion des dreissènes (Cohen, 2005 ; Garton et al., 2014 ; Karatayev et al., 1998).

5. Synthèse comparative des deux espèces

En définitive, même si les informations se font plus rares pour *D. r. bugensis*, les deux espèces sont très proches et vivent dans des habitats similaires en utilisant les mêmes ressources (écologie et niche très proches), ce qui suggère une forte compétition inter-spécifique (Garton et al., 2014). Elles ont les mêmes patrons de reproduction et de dispersion, et sont toutes deux vulnérables aux maladies, à la prédation et au parasitisme. Comme le résume le Tableau , elles diffèrent cependant au niveau de la régulation de leur métabolisme, et de leur capacité de filtration et d'assimilation de la nourriture.

Ces éléments montrent que *D. r. bugensis* allouerait moins d'énergie au maintien de son état physiologique et davantage à la reproduction et à la croissance, ce qui lui donnerait un avantage compétitif sur *D. polymorpha* (Garton et al., 2014). Selon le principe d'exclusion compétitive, l'une des espèces devrait donc finir par remplacer l'autre si les facteurs écologiques sont constants. Mais en réalité la coexistence des deux est possible grâce aux variations spatio-temporelles inhérentes aux milieux d'eau douce, qui évitent la dominance d'une espèce par rapport à l'autre.

Tableau III : Synthèse des principales différences entre *D. polymorpha* et *D. r. bugensis*

Facteur	<i>D. polymorpha</i>	<i>D. r. bugensis</i>	Référence(s)
Morphologie	Face ventrale concave ; angle ventro-latéral aigu ; byssus en position médiane ; plus large que haute	Face ventrale convexe ; angle ventro-latéral arrondi ; byssus en position antérieure ; plus haute que large	Claudi et Mackie, 1994
Filtration	-	+	Diggins, 2001
Synthèse du byssus et force d'attachement	+	-	Peyer et al., 2009
Taille des larves	-	+	Martel et al., 2001
Coquille	Plus épaisse et plus lourde	Plus fine et plus légère	Mackie et Schloesser, 1996
Limite thermique supérieure	30 - 32°C en Amérique du Nord	25°C en Amérique du Nord	Elderkin et Klerks, 2005 ; Iwanyzki et McCauley, 1993 ; Spidle et al., 1995a ; McMahon et Ussery, 1995 ; Aldridge et al., 1995
Température de spawning	12 °C	9 °C	Claxton et Mackie, 1998
Calcium	8 mg/L pour croissance	12 mg/L pour croissance	Claudi et Mackie, 1994 ; Jones et Ricciardi, 2005
Salinité	Mortalité à 8-9 psu ; 11-15 avec acclimatation	Mortalité à 4-6 psu ; 8 avec acclimatation	Orlova et al., 1998 dans Garton et al., 2014
Emersion	+	-	Ricciardi et al., 1995
Tolérance au courant	+	-	Ackerman, 1999 ; Clarke et McMahon, 1996
Tolérance à la turbidité	-	+	Diggins, 2001
Croissance	-	+	Mills et al., 1996 ; Stoeckmann, 2003
Taux d'assimilation	-	+	Baldwin et al., 2002
Substrat	Plutôt sur des substrats durs	Peut vivre sur des substrats durs à mous	Dermott et Munawar, 1993
Profondeur	Zones peu profondes	Peut vivre en zone épibenthique et dépasser 150 m de profondeur	Mackie et Schloesser, 1996
Susceptibilité à la prédation	-	+	Casper et Johnson, 2010 ; Grutters et al., 2012

6. Intérêt comme organismes sentinelles

Lors d'une étude à l'échelle individuelle, il est nécessaire de choisir rigoureusement l'organisme modèle qui sera utilisé. Pour être considérée comme « sentinelle », une espèce doit répondre à plusieurs critères : elle doit être représentative du milieu, sédentaire de la zone d'étude, la taille de la population doit être suffisante pour permettre des prélèvements répétés d'individus, l'aire de répartition doit être assez large pour permettre une comparaison des résultats entre différents sites. L'organisme doit présenter une certaine sensibilité aux polluants sans que ceux-ci n'induisent une mort systématique. Il est également nécessaire de bien connaître la biologie de l'espèce. Ces critères sont réunis pour les deux espèces de dreissènes, qui semblent toutes indiquées pour la biosurveillance des milieux aquatiques. Elles sont largement répandues dans les eaux douces de l'hémisphère nord et présentent un mode de vie sessile. Elles sont capables d'accumuler tous les types de polluants, notamment à cause de leur forte activité de filtration, et présentent des réponses physiologiques et biochimiques utilisables en tant que biomarqueurs de la contamination des milieux. Ces affirmations sont moins vraies pour *D. r. bugensis*, encore trop méconnue.

Présentation des sites de prélèvement

Des données fournies par l'ONEMA nous ont permis de réaliser une cartographie relativement récente (2007 – 2013) de la présence, et parfois de l'abondance, de la dreissène en France. Une quinzaine de sites potentiellement viables ont été sélectionnés et la première vague de prospections a eu lieu en avril 2015. Sur les 13 sites prospectés, seuls 4 se sont avérés appropriés pour nos études (présence de d'individus en abondance suffisante, facilité d'accès, absence de marnage ou de chaumage) : Riaucourt, Scey, Seurre et Nantua. Suite à de fortes pluies, certains sites étaient en crue sur cette période et n'ont pas pu être vérifiés (même si des dreissènes étaient présentes, elles n'étaient pas accessibles par notre mode de prélèvement). A ces 4 populations se sont ajoutées les populations plus locales, déjà connues, de Saint Mihiel et de Montigny (canal de Jouy).

Trois campagnes supplémentaires, en octobre 2015, avril 2016 et février 2017, ont permis l'échantillonnage d'un nombre plus important de sites, ajoutés aux 6 déjà connus (Figure 1). Au niveau local, il s'agit des sites de Liverdun, Jouy aux Arches et du lac de Madine. La population de Verneuil en Halatte (déjà utilisée dans le cadre du projet ANR IPOC « Interactions entre la POLLution et les Changements climatiques : développement d'une nouvelle stratégie de surveillance »), ainsi que deux populations dans le nord de la France (Condé et Courcelles) ont été ajoutées. Il s'est également avéré que le canal de Metz, annexe au site de Montigny – canal de Jouy contenait une population de *D. r. bugensis* différente de celle du canal principal en terme de morphologie. Il faut noter qu'en avril 2016, une population a été modifiée : le site de Verneuil en Halatte sur l'Oise a été remplacé par un site légèrement en amont, Pont Sainte Maxence, suite à l'épuisement de la population sur le premier. Les prospections réalisées sur les sites d'Angers (Loire), de la centrale de Golfech (Garonne) et le lac du Salagou (Hérault) n'ont rien donné de concluant.

La localisation des différents sites de prélèvement des dreissènes est présentée sur la Figure 1. Il est à noter la situation intéressante rencontrée sur plusieurs stations (Meuse à Saint-Mihiel, Canal de Jouy à Montigny, Oise à Verneuil-en-Halatte), où les 2 espèces cohabitent. Le Tableau IIII fourni une brève présentation de chaque site (type et nom de la masse d'eau, espèces rencontrées et abondance relative, caractéristiques du site, historique).

Lors des campagnes d'octobre 2015 et de février 2017, sur chaque site, des prélèvements de sédiments ont été réalisés pour mesurer respectivement le niveau de contamination par les PCB, les HAP et les métaux. Par ailleurs, en février 2017, les concentrations en contaminants dans les organismes (HAP, PCB, métaux) ont été quantifiées, quand la masse de matériel biologique collectée le permettait. Les mesures physico-chimiques (charges organiques et minérales) ont été systématiquement réalisées pour toutes les campagnes.

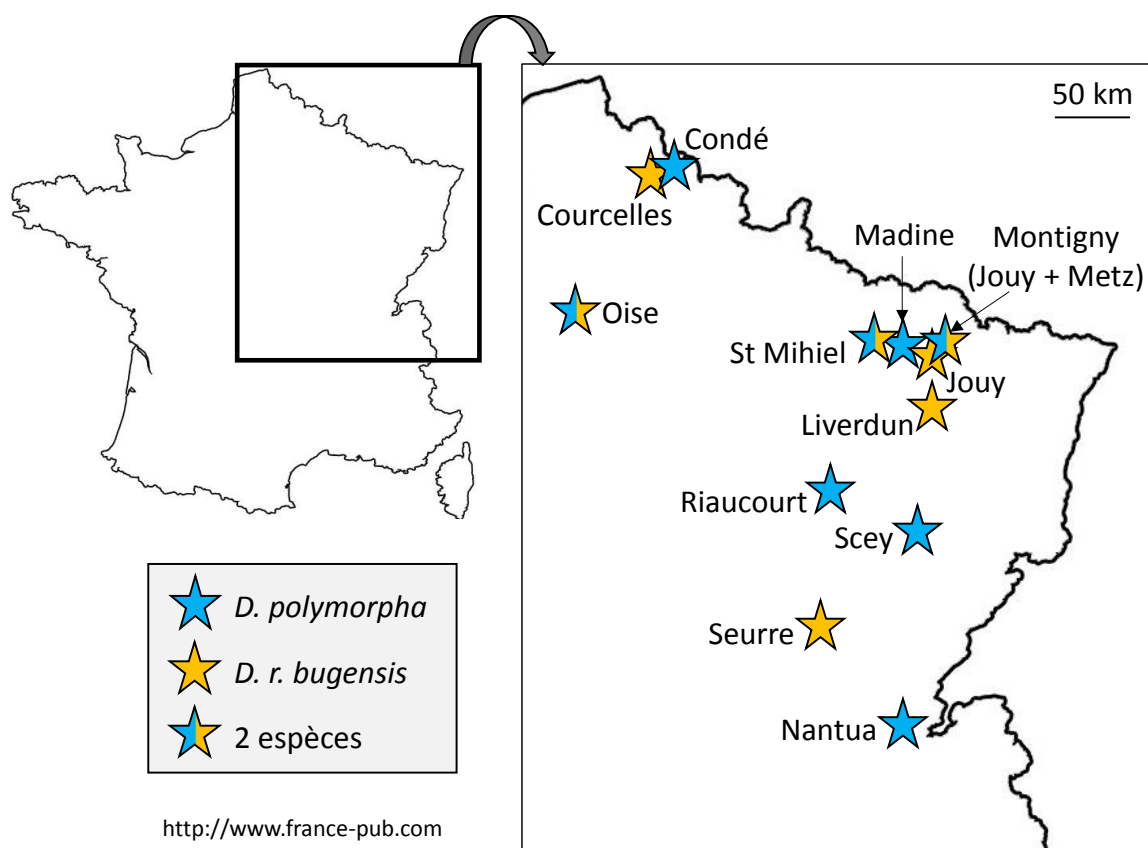


Figure 1 : Localisation des sites de prélèvement des dreissènes

Tableau III : Présentation des sites de prélèvement de dreissènes

Condé sur l'Escaut (étang Chabaud Latour)			
Etang d'affaissement minier situé sur l'Escaut. Présence de <i>D. polymorpha</i>, dont certains individus de taille importante (voir photos). Eau noirâtre, le site semble très eutrophe. Situé dans l'ancien bassin minier du Nord Pas de Calais. Cette zone était utilisée pour l'exploitation du charbon au 20^{ème} siècle (fosse Ledoux), jusqu'en 1989⁴.			M. Potet

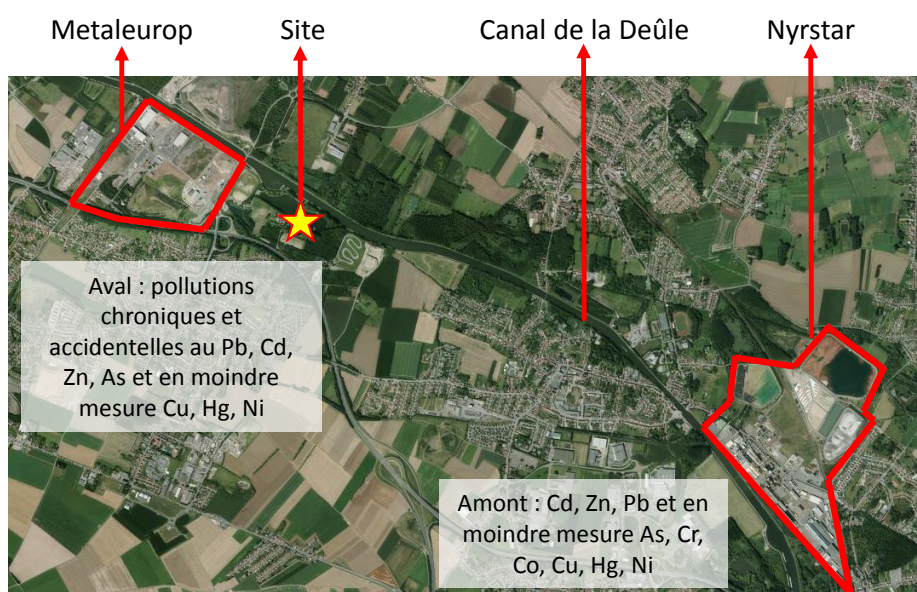
⁴ <http://www.s-pass.org/SPASSDATA/ALGEDIM/QOKQWR/D251/D25144.pdf>

Courcelles-lès-Lens



P. Wagner

Créé en 1905 sur le canal de la Deûle, c'était à l'origine un port, qui a été réhabilité en 1977 pour devenir une base de loisirs⁵. Présence de *D. r. bugensis*. Le site est situé entre les usines de Metaleurop (démantelée⁶) et Nyrstar, connues pour leurs rejets de plomb, cadmium et zinc⁷.



Verneuil en Halatte et Pont Sainte Maxence



M. Potet

Sites sur l'Oise (canalisée). La zone de prélèvement a été changée entre octobre 2015 et avril 2016, car l'abondance de la population de Verneuil était fortement réduite. Sur les deux sites, *D. polymorpha* et *D. r. bugensis* sont présentes, avec une plus faible abondance pour la dernière. Pas de pollution connue, mais une station d'épuration se situe au niveau de Brenouille (en amont de Verneuil, et en aval de Pont Ste Maxence) ; les eaux usées sont rejetées dans l'Oise. Transport fluvial important pour relier le bassin parisien et le nord de la France.

⁵ http://www.courcelles-les-lens.fr/la-gare-d-eau_fr.html

⁶ http://www.sante-environnement-travail.fr/minisite.php?id_rubrique=883&id_article=2873

⁷ <http://www.safir-network.com/site-de-metaleurop/>

Saint Mihiel



Potet, Wagner

Canal de l'Est (branche nord). Présence de *D. polymorpha* et *D. r. bugensis* ; les abondances sont très faibles depuis 2 ans. Les moules sont échantillonnées sur les parois de l'écluse, et sont donc fréquemment soumises à l'émersion. Pas de pollution particulière à notre connaissance.

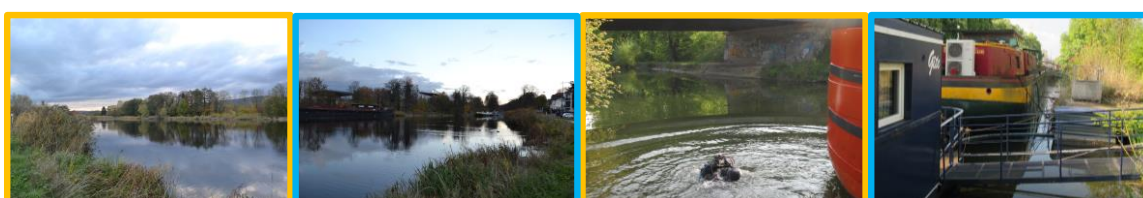
Lac de Madine



Potet, Coacolo

Lac alimenté par un affluent de la Moselle, la Madine. Présence de *D. polymorpha*, mais de taille relativement petite (< 20 mm en général). C'est une base de loisirs, interdite aux bateaux à moteur thermique, qui constitue une réserve d'eau potable pour la ville de Metz.

Montigny lès Metz (canal de Jouy et canal de Metz)



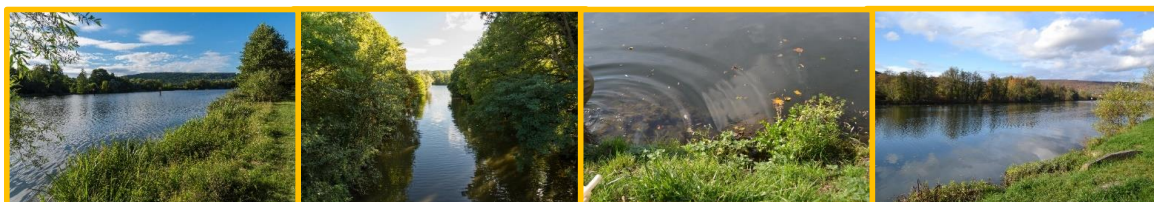
Potet, Pain-Devin

Situé sur la Moselle canalisée (canal de Jouy ; contient *D. polymorpha* et *D. r. bugensis*) ; le canal de Metz correspond à la dérivation de la Moselle qui passe juste à côté du canal (uniquement *D. r. bugensis*). En amont, à Ars sur Moselle, se trouve une usine de traitement de bois (Imprélorraine), utilisant des sels métalliques et de la créosote⁸. A Jouy aux Arches, en amont également se trouvait une raffinerie de goudrons, fermée en 1996 (HAP, phénols, naphtalène, créosote)⁹.

⁸ http://basol.developpement-durable.gouv.fr/fiche.php?page=2&index_sp=57.0008

⁹ <http://infoterre.brgm.fr/rapports/67-DSGR-A-079.pdf> et http://basol.developpement-durable.gouv.fr/fiche.php?page=2&index_sp=57.0095

Jouy aux Arches



Potet, Coacolo

Situé également sur la Moselle canalisée (canal de Jouy), mais légèrement en amont par rapport à Montigny. Présence de *D. r. bugensis*.

Liverdun



M. Potet

Situé sur la Moselle, avant la confluence avec la Meurthe. Présence de *D. r. bugensis*.

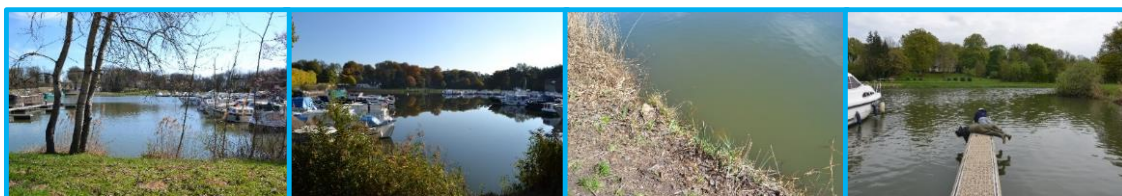
Riaucourt



Potet, Wagner

Canal entre Champagne et Bourgogne, sur la Marne. Présence de *D. polymorpha*. Le niveau d'eau est très fluctuant, et le chômage est fréquent, rendant les prélèvements compliqués.

Scey-sur-Saône-et-Saint-Albin



Potet, Wagner,
Louis

Port de plaisance situé sur la Saône. Présence de *D. polymorpha*, en très grande abondance sous les pontons.

Seurre



Potet, Wagner

Situé dans le port de Seurre, entre la Saône et son canal de dérivation. Présence de *D. r. bugensis*. *D. polymorpha* découverte en avril 2016 sur les pontons uniquement, en très faible abondance. Un bateau a coulé dans le port le 18 septembre 2015¹⁰ (voir photos), c'est pourquoi les analyses de sédiments ont été faites deux fois (octobre 2015 et avril 2016) afin de voir l'influence de cet événement sur la contamination sédimentaire.

Nantua



Potet, Wagner

Lac d'origine glaciaire. Présence de *D. polymorpha*. Classé site naturel protégé depuis 1936¹¹.

¹⁰ <http://france3-regions.francetvinfo.fr/bourgogne/cote-d-or/dans-le-port-de-seurre-l-epave-d-un-yacht-fait-polemique-897867.html>

¹¹ https://www.legifrance.gouv.fr/affichSarde.do;jsessionid=399517A3A4B358D7660AFC8CB88E06E2.tpdjo09v_1?reprise=true&fastReqId=1201340161&idSarde=SARDOBJT000007104572&page=41

Matériel et méthodes

1. Mesure des paramètres abiotiques sur les sites étudiés

Comme mentionné plus haut, l'évaluation de la qualité d'un cours d'eau passe en premier lieu par la mesure de paramètres physico-chimiques et chimiques. La qualité d'un milieu dépend de ces paramètres, mais aussi de la quantité d'eau présente dans la masse d'eau, du régime hydrologique et de la quantité de matières en suspension qui vont conditionner la dilution et la dispersion des polluants dans la masse d'eau (Davie, 2008).

1.1. Paramètres physico-chimiques

Sur chaque site, la température (°C), le pH, la conductivité (μS) et la teneur en dioxygène (en % et en mg.L^{-1}) ont été mesurés à l'aide d'une sonde Multi 3430 SET G (WTW). Ces mesures ont été réalisées à 10 cm sous la surface de l'eau, *in situ*, pour pallier aux variations liées à une mesure différée (Bartram et Ballance, 1996).

Des flacons en polyéthylène de 2 L ont également été remplis avec l'eau de chaque site, transportés au laboratoire dans des glacières à 4 °C à l'obscurité (pour limiter le développement algal). Ces échantillons ont permis des analyses plus approfondies des paramètres physico-chimiques, dont l'intérêt et les méthodes de mesure sont détaillés ci-dessous.

Les matières azotées ont été mesurées par chromatographie ionique pour les nitrates et les nitrites, et par spectrométrie d'absorption UV/visible pour l'ammonium. Les résultats sont exprimés en mg d'azote par litre (N mg.L^{-1}).

Le **phosphore total (P_{tot})** comprend les orthophosphates, les polyphosphates et les phosphates organiques. Il est mesuré par spectrométrie d'absorption UV/visible et exprimé en mg de phosphore par litre (P mg.L^{-1}).

Pour compléter cette mesure, **les orthophosphates (PO_4^{3-})** sont également dosés par chromatographie ionique, ou par spectrométrie UV/visible si la concentration est inférieure à 0.5 mg de P.L⁻¹. Les éléments en solution - Minéralisation

Les concentrations en ions sont exprimées en mg.L^{-1} et sont mesurées par chromatographie ionique (Cl^- , SO_4^{2-}) ou par spectrométrie d'absorption atomique en flamme (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+).

Ces différents éléments permettent de calculer les quantités d'**anions totaux (TotA)** et de **cations totaux (TotC)**, exprimés en milliéquivalent par litre (meq.L^{-1}), ainsi que la **balance ionique (Bal. Ion.)** qui symbolise l'équilibre entre les anions et les cations et s'exprime en %.

L'alcalinité (TAC pour Titre Alcalimétrique Complet) est mesurée *via* la neutralisation d'un volume d'eau par un acide minéral fort et s'exprime en meq.L^{-1} ($1 \text{ meq.L}^{-1} = 5$ degrés français (d°f)). Elle correspond à la teneur en hydroxydes libres, en carbonates et en hydrogénocarbonates dans l'eau¹². L'alcalinité correspond à la capacité à neutraliser l'acidité. Elle est surtout due aux bicarbonates de calcium et de magnésium (Bartram et Ballance, 1996).

1.1.1. Les matières organiques et oxydables

Les matières organiques sont naturellement présentes dans l'eau, mais à faible concentration. En plus de leur origine naturelle, elles peuvent provenir de rejets domestiques (eaux usées, excréments), agricoles (lisiers) ou industriels (tanneries, abattoirs). La dégradation de ces matières organiques par les microorganismes (auto-épuration) est consommatrice d'oxygène, et permet de calculer différents indices.

La **demande biochimique en oxygène (DBO)** représente la quantité d'oxygène utilisée par les bactéries et d'autres microorganismes pour dégrader les matières biochimiques oxydables, qui constituent leur source de carbone. La DBO_5 exprime la quantité d'oxygène nécessaire à la dégradation des matières organiques, *via* l'action des microorganismes, à 20 °C et à l'obscurité, sur une période de 5 jours. Elle est donc mesurée *via* le suivi de la diminution de la quantité d'oxygène dans l'échantillon entre 0 et 5 jours, et s'exprime en $\text{mg d'O}_2.\text{L}^{-1}$.

La **demande chimique en oxygène (DCO)** correspond à la quantité d'oxygène consommée par la matière organique. Les matières organiques sont oxydées par l'ajout d'un oxydant, le dichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) en milieu acide. Le dichromate en excès est ensuite titré avec une solution de sulfate de fer (II) et d'ammonium et le résultat est exprimé en mg.L^{-1} .

Les **matières en suspension totales (MEST)** sont constituées de toutes les particules organiques ou minérales insolubles véhiculées par les eaux (charge en matières solides). Pour les mesurer, l'eau est filtrée et le poids de matières retenues par le filtre est déterminé par une pesée différentielle après un séchage à 105 °C. Les MEST sont exprimées en mg.L^{-1} (Davie, 2008).

Les MEST comprennent les matières minérales et les **matières volatiles en suspension (MVS)**, qui représentent la masse de matières particulaires organiques. Les MVS correspondent à la partie des MEST volatilisée après calcination du filtre à 525 °C (les résidus secs correspondants aux matières minérales). Les MVS sont donc exprimées en % (par rapport aux MEST).

1.2. Contamination sédimentaire

Les mesures de paramètres physico-chimiques ont été complétées par l'analyse de la contamination sédimentaire. Sur chaque site, les sédiments ont été prélevés à l'aide d'une benne ou

¹² http://lda.lozere.fr/sites/default/files/upload/chimie_des_eaux.pdf

d'une pelle à sédiments en trois points différents, homogénéisés, puis stockés à l'obscurité dans des glacières à 4 °C. Les analyses des concentrations en métaux lourds, HAP et PCB ont été réalisées par le laboratoire La Drome (accréditation Cofrac n° 1-0852). Les différents éléments analysés et les méthodes de mesure relatives à chacun d'eux sont présentés en Annexe 1.

La notion d'« éléments-traces métalliques » (ETM) remplace désormais les métaux lourds ; en effet, les ETM regroupent à la fois des métaux lourds et des métalloïdes plus légers, aussi bien essentiels que non-essentiels. Les éléments mesurés sur nos sites sont les suivants : Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, et Zn.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), composés uniquement de carbone et d'hydrogène, peuvent être d'origine naturelle, mais sont surtout issus des activités humaines, et notamment de la combustion incomplète de composés organiques (bois, charbon, pétrole, gaz naturel). Parmi les 10 HAP mesurés dans notre étude, 7 figurent parmi les substances prioritaires de la DCE (anthracène*, benzo(a)pyrène*, benzo(ghi)perylène*, benzo(k)fluoranthène*, fluoranthène, indéno(1,2,3-cd)pyrène*, naphthalène) et 5 sont considérés comme substance dangereuse prioritaire (*). Les 3 autres sont le benzo(a)Anthracène, le chrysène et le phénanthrène.

Les polychlorobiphényles (PCB) sont des contaminants d'origine purement anthropique, produits par chloration du biphényle. Bien que leur production et leur utilisation soient totalement interdites en France depuis 1987, les PCB sont classés parmi les polluants organiques persistants (POPs) par le Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE). Les PCB mesurés sur nos sites d'étude (101, 118, 138, 153, 180, 28 et 52) correspondent aux 7 PCB dits « indicateurs » sélectionnés en 1982 par le Bureau Communautaire de Référence de la Commission Européenne. Ils représentent environ 80% des PCB totaux et sont recherchés en priorité dans les matrices organiques, dont les sédiments, du fait de leur abondance, de leur persistance dans l'environnement et de leur toxicité (INERIS, 2011).

2. Echantillonnage des organismes

Pour éviter d'endommager les tissus, les organismes sont prélevés à même le substrat en sectionnant leur byssus à l'aide d'un scalpel. Les individus supposés juvéniles (< 10 mm de longueur) ne sont pas prélevés.

Pour les expérimentations *in situ*, les organismes ont été disséqués sur place et leurs tissus furent placés dans des cryotubes et congelés dans de l'azote liquide avant d'être ramenés au laboratoire (Figure).

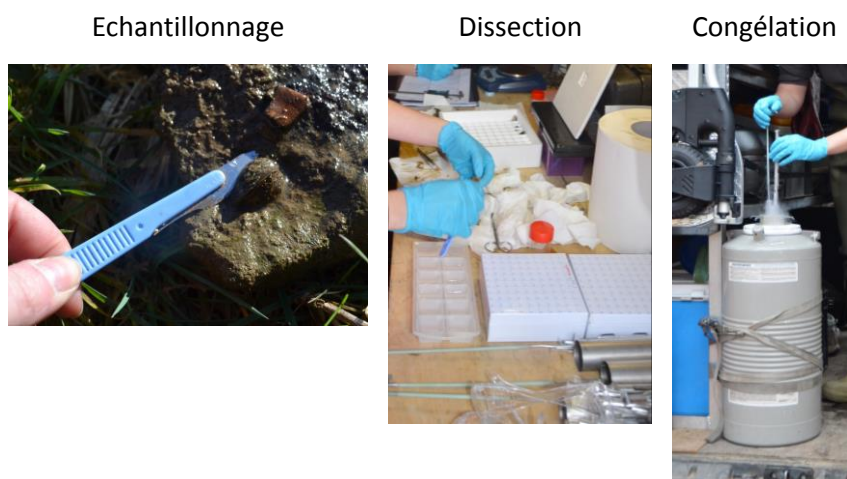


Figure 11 : Echantillonnage sur le terrain

3. Accumulation des contaminants par les organismes

Pour les mesures de contaminants bioaccumulés *in situ* sur les différents sites lors de la campagne de février 2017, les moules ont été disséquées, poolées et congelées immédiatement après leur prélèvement. Au retour au laboratoire, elles ont été séchées à l'étuve à 60 °C durant 48 h, pesées, et envoyées pour analyses à MicroPolluants Technologie S.A. (accréditation Cofrac n° 1-1151). Les différents éléments analysés et les méthodes de mesure relatives à chacun d'eux sont présentés en Annexe 1.

4. Biomarqueurs mesurés

4.1. Préparation des tissus avant mesure

Les mesures de biomarqueurs au niveau sub-cellulaire ont été faites sur la glande digestive, l'organe majeur de détoxification chez les bivalves (Balabaskaran et al., 1986). Les glandes digestives des organismes sont disséquées et congelées à -80 °C (dans de l'azote liquide pour les dissections sur site). Au moment de l'analyse, chaque glande est décongelée, pesée et broyée dans du tampon d'homogénéisation (tampon phosphate 50 mM pH 7.6, supplémenté avec 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) et 1 mM L-serine borate comme inhibiteurs de protéases) à un ratio de 1/8 poids/volume (4000 µL pour 500 mg de glande). Après ajout du tampon, deux billes en acier inoxydable sont placées dans les microtubes et les glandes sont broyées au broyeur électrique (Retsch MM400®) durant 30 secondes à une vitesse de 30 Hz.

Une première centrifugation à 250 x g, 4 °C, 5 min permet d'éliminer les plus gros débris. Une partie du surnageant est récupérée et constitue le broyat brut. Le reste du surnageant est centrifugé à nouveau, 1000 x g, 20 min, 4 °C et à nouveau 20000 x g, 50 min, 4 °C. Le surnageant final correspond à la fraction cytosolique. Sur chaque glande digestive, une batterie de 13 biomarqueurs sub-cellulaires a donc été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre automatisé (Konélab 20XTi®, ThermoScientific),

qui réalise le mélange des échantillons et des réactifs, et effectue les lectures d'absorbance (Figure). Cette méthodologie de dosage développée au sein du LIEC permet d'obtenir ces 13 valeurs sur un seul organisme, permettant donc de décrire de façon fine les relations à l'échelle individuelle entre l'ensemble de ces réponses, et de pouvoir observer la variabilité inter-individuelle.

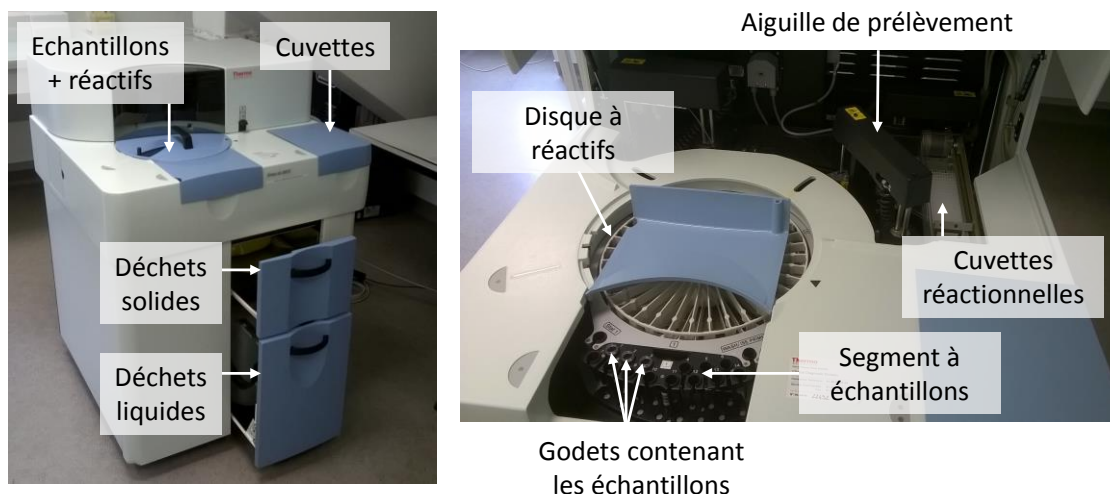


Figure 12 : Spectrophotomètre automatisé Konélab 20XTi

Biomarqueurs mesurés sur le broyat :

- Concentrations en protéines, triglycérides et cholestérol
- Phosphatase Acide (ACP)
- Hydroperoxydes lipidiques (LOOH)
- Activité du système de transport d'électrons mitochondrial (ETS)

Biomarqueurs mesurés sur la fraction cytosolique

- Glutathion-S-transférase (GST)
- Glutathion peroxydase (GPx)
- Mesure de l'activité de la catalase (CAT)
- Mesure de la capacité antioxydante totale (TAC)
- Activité des caspases (Csp)
- Activité de la lactate déshydrogénase (LDH)

4.2. Autres biomarqueurs

Pour la mesure du taux de filtration (Figure 13), les moules sont placées individuellement dans 50 mL d'une solution de rouge neutre à 5 mg.L^{-1} , dans le noir. Les siphons sont orientés vers le

centre, pour éviter leur obstruction. Après 2 h, les organismes sont retirés et la solution de rouge neutre est acidifiée à pH 5 avec de l'HCl à 37%, puis agitée.



Figure 13 : Différentes étapes de la mesure de l'activité de filtration

L'absorbance est lue à 530 nm et la concentration en rouge neutre est calculée grâce à une courbe d'étalonnage. Le taux de filtration (f) est ensuite calculé d'après la formule de Coughlan (1969) :

$$f \text{ (mL.moule}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) = \left(\frac{V}{n * t} \right) * \log \left(\frac{C_0}{C_t} \right)$$

Avec V le volume de solution de rouge neutre, n le nombre d'individus mis dans la solution, t le temps (en h) et C_0 et C_t les concentrations initiale et finale en rouge neutre.

L'indice de condition (IC) est calculé après avoir mesuré la longueur, la largeur et la hauteur (en mm, Figure) de chaque individu avec un pied à coulisse électronique (Powerfix IAN 30563, précision 0.01mm) et pesé le poids frais de ses tissus mous (sans le byssus, en mg), selon la formule suivante (Guerlet et al., 2010) :

$$\text{IC (mg.mm}^{-3}) = \frac{\text{poids frais}}{\text{longueur} * \text{largeur} * \text{hauteur}}$$

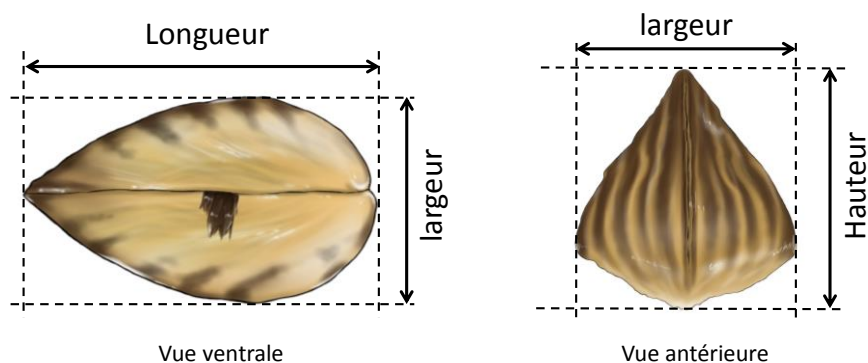


Figure 14 : Mesures pour le calcul de l'indice de condition (© Florian Lamousse)

Variabilité des biomarqueurs *in situ*

Ce chapitre regroupe l'ensemble des données obtenues lors des différentes campagnes de biosurveillance passive sur les différentes populations de nos deux espèces modèles. Le but est d'étudier les réponses des biomarqueurs en fonction des variations saisonnières, journalières et des facteurs environnementaux (paramètres physico-chimiques et contamination des milieux) afin d'identifier les déterminants de la variabilité des réponses des biomarqueurs *in situ* et quels facteurs environnementaux pourraient entraîner une mauvaise lecture des réponses biologiques. Ce chapitre cherche également à décrire et comprendre la variabilité des réponses observées entre les deux espèces, et entre les différentes populations.

Description du jeu de données

Les sites échantillonnés dans le cadre de la convention BIOMICS ont été présentés précédemment. Leur caractérisation physico-chimique n'a pas été effectuée à chaque campagne, et les biomarqueurs n'ont pas non plus pu être mesurés sur chaque site et lors des 4 campagnes d'échantillonnage, faute de disponibilité suffisante en organismes.

Le Tableau IV résume les paramètres mesurés pour chaque population. De ce tableau découle la stratégie d'analyse des données, le jeu de données conséquent étant subdivisé en fonction de la question à laquelle nous cherchons à répondre.

Tableau IV : Plan d'échantillonnage des différentes populations de *D. polymorpha* et *D. r. bugensis* in situ. Les cellules en gris représentent les données collectées dans le cadre de la convention BIOMICS. On distinguera ici les deux populations de *D. polymorpha* présentant des morphologies distinctes sur le site de Condé (Condé 1 : longueur standard ; Condé 2 : longueur supérieure à 3.5 cm)

		Avril 2015		Octobre 2015				Avril 2016				Février 2017				
		Biomarqueurs	Indice de condition	Biomarqueurs	Indice de condition	Contamination des sédiments	Chimie de l'eau	Biomarqueurs	Indice de condition	Contamination des sédiments	Chimie de l'eau	Biomarqueurs	Indice de condition	Bioaccumulation	Contamination des sédiments	Chimie de l'eau
Espèce	Site															
<i>D. r. bugensis</i>	Courcelles															
	Jouy															
	Liverdun															
	Montigny - Canal de Jouy															
	Montigny - Canal de Metz															
	Oise															
	Seurre															
	Saint-Mihiel															
<i>D. polymorpha</i>	Condé 1															
	Condé 2															
	Liverdun															
	Madine															
	Montigny - Canal de Jouy															
	Nantua															
	Oise															
	Riaucourt															
	Scey															
	Seurre															
	Saint-Mihiel															

Sur la base de ce bilan, nous traiterons les données de la façon suivante :

- la variabilité saisonnière sera étudiée séparément pour les deux espèces, sur les sites où nous disposons de suffisamment d'informations sur les différentes saisons
- la variation journalière, non représentée dans ce tableau, a été étudiée sur le site de Montigny – Canal de Metz pour *D. r. bugensis*, et de Montigny – Canal de Jouy pour *D. polymorpha* et les résultats sont présentés sous la forme d'une publication.
- la variabilité inter-spécifique sera étudiée sur avril 2016 et février 2017, puisque ce sont à ces dates que le plus de sites ont été échantillonnés. Un focus sur Montigny – Canal de Jouy, l'Oise et Saint-Mihiel en avril 2016 sera fait, dans la mesure où les 2 espèces coexistent sur ces trois sites
- la variabilité inter-populationnelle au sein de chaque espèce sera étudiée en octobre 2015 et en février 2017

La dernière partie aura pour but de mettre en relation les réponses des biomarqueurs avec l'accumulation des contaminants dans les organismes et la contamination des sédiments.

Variabilité temporelle des biomarqueurs

1. Echelle saisonnière

La variabilité saisonnière de la physiologie des organismes est un mécanisme bien connu, lié notamment au cycle reproducteur, à la température et à la disponibilité des ressources. Néanmoins, dans une optique de biosurveillance, ce qui nous intéresse ici n'est pas la variation en valeur absolue des réponses biologiques en fonction de la saison, mais la stabilité des patrons de réponse. Pour résumer, les réponses biologiques que nous mesurons sont-elles toutes modifiées de la même façon par le facteur saisonnier, auquel cas ce facteur peut-il être considéré comme peu ou pas structurant pour le diagnostic ? Dans le cas contraire, il sera nécessaire de comprendre les modifications physiologiques induites par ce facteur.

1.1. Chez *D. polymorpha*

Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur la réponse de *D. polymorpha* aux 4 dates d'échantillonnage sur les sites de Montigny, Nantua, Riaucourt, Scey et St Mihiel. Une première analyse réalisée sans prendre en compte le facteur « site » met en évidence le gradient de réponse en fonction de la saison (Figure). Deux points importants ressortent de cette première analyse : d'une part, en hiver (février 2017), la taille de l'ellipse est très réduite par rapport aux autres saisons, ce qui illustre une diminution de la variabilité inter-populationnelle à ce moment. Nous le reverrons plus tard, d'autres analyses confirment que l'hiver n'est pas une saison à privilégier pour le déploiement des biomarqueurs.

L'autre fait marquant est la variabilité inter-annuelle : en effet, les 2 ellipses d'avril 2015 et 2016 ne se superposent pas du tout. Pour établir des valeurs de référence pour les biomarqueurs, les études s'appuient généralement sur une modélisation de l'influence de facteurs environnementaux sur les valeurs mesurées (température, conductivité, oxygénation...), qui sont fortement reliés aux cycles saisonniers. La divergence des réponses entre les mois d'avril de deux années successives, aux conditions climatiques globalement similaires, pointe une potentielle difficulté à établir des valeurs de référence pour les biomarqueurs chez la dreissène. Pour ces conditions, le partitionnement de la variance indique que la date et le site expliquent respectivement 26 et 10% de la variabilité observée, avec 65% de variance inexpliquée.

Le cercle des corrélations associé à cette ACP révèle que les réserves énergétiques (protéines, triglycérides, cholestérol) sont plus élevées en avril que pour les mois plus froids. En effet, en octobre et en février, le métabolisme énergétique est plus important, tout comme l'activité des marqueurs de défense (GST, TAC).

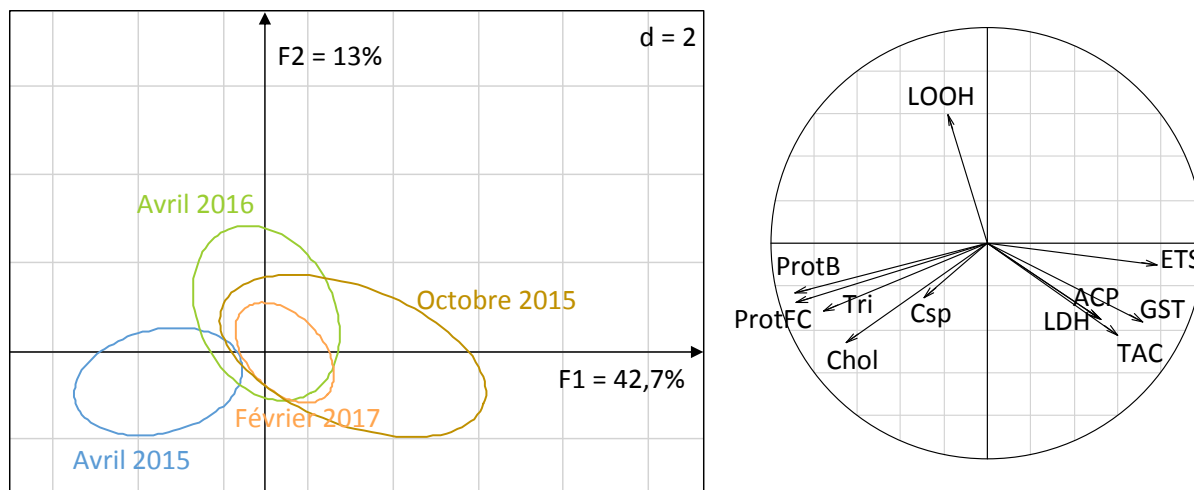


Figure 15 : Variabilité temporelle des biomarqueurs chez *D. polymorpha* pour les 4 dates d'échantillonnage pour les sites de Montigny, Nantua, Riaucourt, Scey et St Mihiel. Plan factoriel F1F2 de l'analyse du tableau individus x biomarqueurs (240 lignes x 11 colonnes) et cercle des corrélations associé

Dans un second temps, nous avons scindé le jeu de données en fonction de la saison. Des ACP ont été réalisées indépendamment à chaque saison, puis l'analyse de la co-structure a été réalisée par une analyse de co-inertie¹³. Tous les croisements entre 2 saisons ont été étudiés. Il ressort de cette analyse que, malgré les différences entre saisons mises en évidence précédemment, la co-structure est toujours significative (Tableau), les patrons de réponses sont donc stables d'une saison à l'autre.

Tableau VI : p-valeurs des différentes analyses de co-inertie des ACP individus x biomarqueurs réalisées pour chaque saison pour les différentes populations de *D. polymorpha*. Les probabilités indiquées correspondent aux résultats des tests de Monte-Carlo réalisés sur la co-structure

	Avril 2015	Octobre 2015	Avril 2016	Février 2017
Avril 2015		0.023	0.013	0.006
Octobre 2015			0.001	0.001
Avril 2016				0.001
Février 2017				

Les mêmes analyses ont été reconduites, uniquement pour 3 dates (octobre 2015, avril 2016 et février 2017), pour lesquelles nous disposons d'un plus grand nombre de sites (Condé, Madine, Montigny, Nantua, Oise, Riaucourt, Scey, St Mihiel ; Figure). Les mêmes tendances que précédemment sont retrouvées, mais cette fois le partitionnement de la variance indique que la date et le site expliquent respectivement 21 et 18% de la variabilité observée, avec 62% de variance inexpliquée. Les analyses de co-inertie indiquent là encore que les patrons de réponses sont stables d'une saison à l'autre, même si l'on considère ici un plus grand nombre de sites (octobre/février : $p = 0.001$; octobre/avril : $p = 0.001$; février/avril : $p = 0.006$).

¹³ Les analyses de co-inertie sont basées sur le croisement de 2 ACP contenant le même nombre de lignes. Elles sont réalisées à l'aide de la fonction « coinertia » du package ade4. Un test de Monte-Carlo (fonction « randtest ») permet ensuite de déterminer si la co-inertie est significative, c'est à dire s'il existe une structure commune aux 2 jeux de données

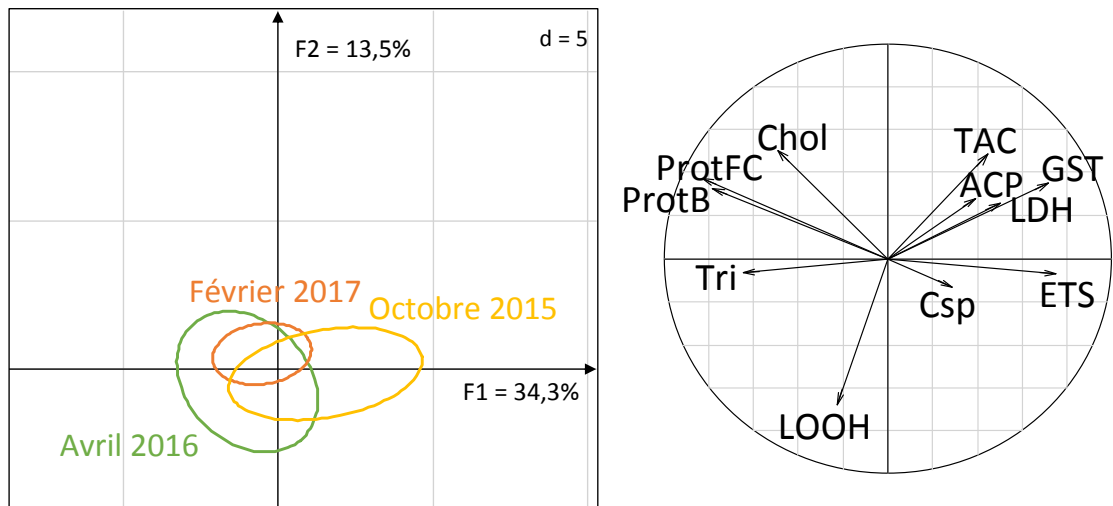


Figure 16 : Variabilité temporelle des biomarqueurs chez *D. polymorpha* pour 3 dates d'échantillonnage (octobre 2015, avril 2016, février 2017) pour les sites de Condé, Madine, Montigny, Nantua, Oise, Riaucourt, Scey, St Mihiel. Plan factoriel F1F2 de l'analyse du tableau individus x biomarqueurs (288 lignes x 11 colonnes) et cercle des corrélations associé

1.2. Chez *D. r. bugensis*

Les mêmes analyses ont été réalisées pour *D. r. bugensis*. Dans un premier temps, pour voir si le phénomène d'inter-annualité était aussi présent chez cette espèce, une ACP a été réalisée sur 2 populations (Seurre et St Mihiel) pour lesquelles on disposait de données en avril 2015, octobre 2015 et avril 2016 (Figure). Pour ces conditions, le partitionnement de la variance indique que la date et le site expliquent respectivement 25 et 0% de la variabilité observée, avec 75% de variance inexpliquée.

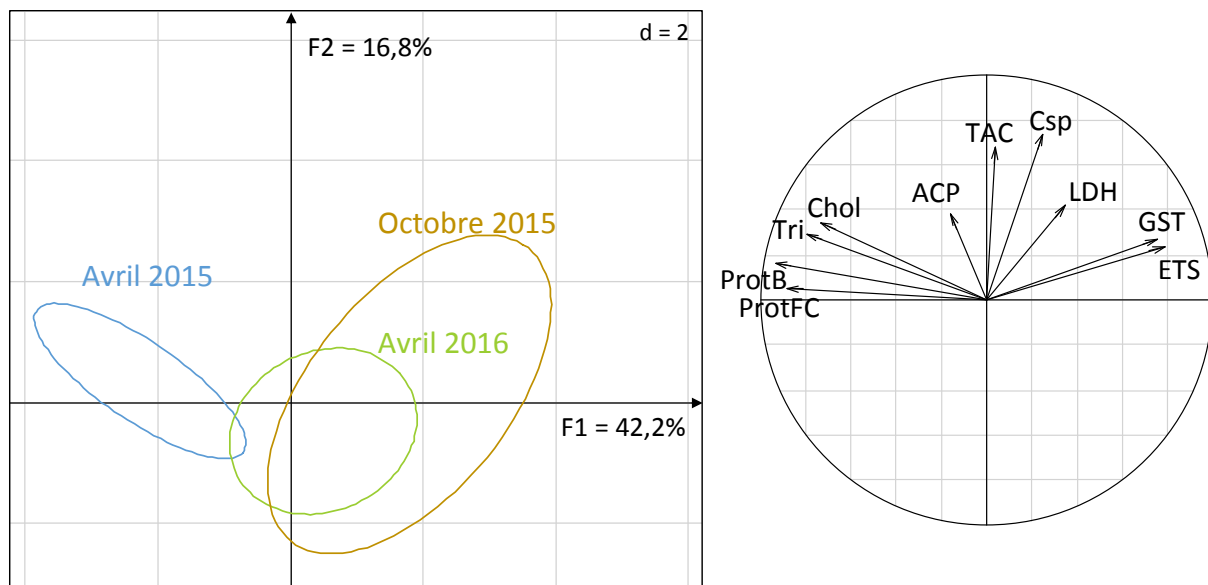


Figure 17 : Variabilité temporelle des biomarqueurs chez *D. r. bugensis* pour 3 dates d'échantillonnage (avril 2015, octobre 2015, avril 2016) pour les sites de Seurre et St Mihiel. Plan factoriel F1F2 de l'analyse du tableau individus x biomarqueurs (72 lignes x 10 colonnes) et cercle des corrélations associé

Les analyses de co-inertie ont aussi été réalisées et mettent en évidence pour cette espèce une absence de co-structure, indiquant que chez *D. r. bugensis* les patrons de réponse ne sont pas stables d'une saison à l'autre (Tableau).

Tableau VII : p valeurs des différentes analyses de coinertie des ACP individus x biomarqueurs réalisées pour 3 saisons pour deux populations de *D. r. bugensis*. Les probabilités indiquées correspondent aux résultats des tests de Monte-Carlo réalisés sur la co-structure

	Avril 2015	Octobre 2015	Avril 2016
Avril 2015		0.159	0.185
Octobre 2015			0.642
Avril 2016			

En revanche, l'analyse réalisée sur les autres dates (octobre 2015, avril 2016 et février 2017) pour les populations échantillonnées (Courcelles, Jouy, Liverdun, Montigny et Seurre) atteste de la présence d'une co-structure (Figure). On peut donc en déduire que les données d'avril 2015 sont particulières. L'analyse des ACP met ainsi en évidence, quelle que soit l'espèce, des valeurs particulièrement élevées des réserves énergétiques. Cette instabilité des réponses, à saison constante, suggère d'une part la nécessité d'acquérir des informations sur le long terme sur les populations étudiées, pour identifier des modifications ponctuelles des réponses biologiques, ou au contraire des tendances temporelles, et d'autre part de collecter systématiquement les données relatives à l'environnement pour être en mesure de construire une grille d'interprétation intégrant les facteurs du milieu à l'instant t, et qu'en intégrant un plus grand nombre de sites dans le jeu de données on obtient des patrons de réponse stables d'une saison à l'autre. Pour ces conditions, le partitionnement de la variance indique que la date et le site expliquent respectivement 18 et 14% de la variabilité observée, avec 69% de variance inexpliquée.

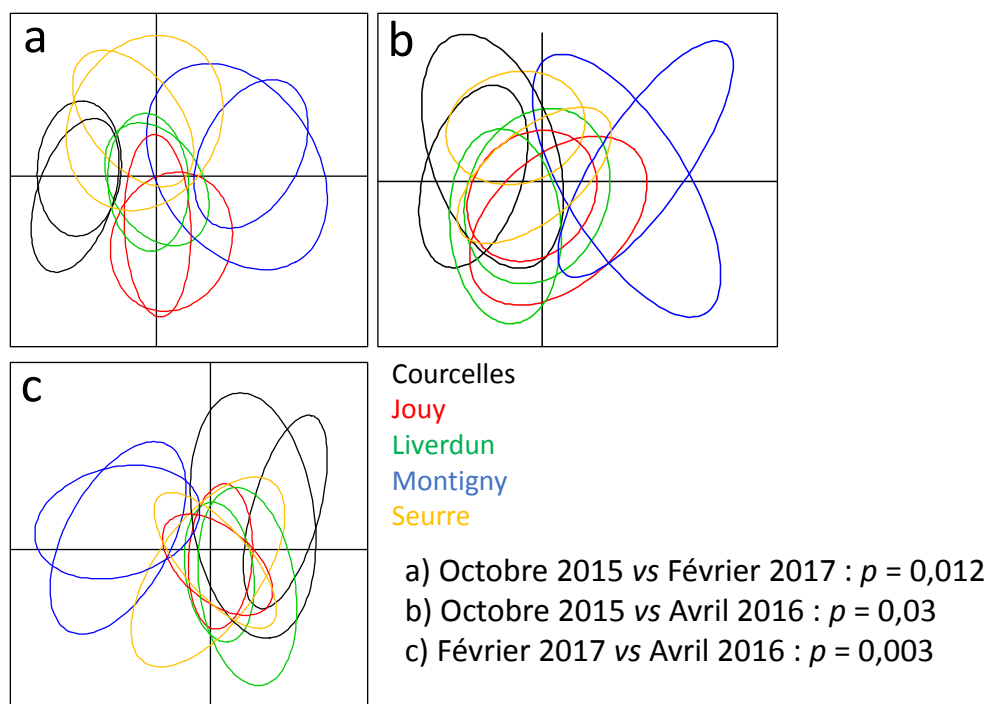


Figure 18 : Plans factoriels de trois analyses de co-inertie des ACP individus x biomarqueurs réalisées pour *D. r. bugensis* en octobre 2015, avril 2016 et février 2017. Seules les ellipses sont représentées. Les probabilités indiquées sur la figure correspondent aux résultats des tests de Monte-Carlo réalisés sur la co-structure

2. Echelle journalière

La variabilité temporelle, lorsqu'elle est prise en compte dans les études en écotoxicologie, se focalise toujours sur les variations saisonnières. Cette première approche est naturelle, dans le sens où la plupart des processus physiologiques interagissant avec les biomarqueurs sont eux même calqués sur des cycles saisonniers. Cependant, il nous a semblé essentiel de s'intéresser également à de potentielles variations à l'échelle du cycle circadien (la disponibilité en nourriture pouvant suivre par exemple un tel cycle avec les migrations planctoniques dans la colonne d'eau). Cette donnée est essentielle dans le cadre d'un réseau de surveillance, puisque tous les échantillons ne peuvent pas être collectés simultanément. Si l'heure de prélèvement influence les niveaux des biomarqueurs, cela peut être problématique dans l'établissement d'un diagnostic environnemental fiable. Pour étudier ce point, nous avons mesuré l'ensemble de notre batterie de biomarqueurs chez les deux espèces *in situ* pendant 24 h.

Les deux populations étudiées sont celles de Montigny – Canal de Metz (pour *D. r. bugensis*) et de Montigny – Canal de Jouy (pour *D. polymorpha*). Quelques jours avant le début de l'expérience, des individus ont été prélevés au sein de chaque population et mis en panier, toujours sur leur site d'origine (Figure 19). Les paniers ont ensuite été prélevés, à raison d'un échantillon de 12 individus toutes les 2 heures pendant 24 h, de 10 h du matin (J0) à 8 h du matin (J1). Des mesures de

température et de luminosité ont été prises en continu, et les mesures de paramètres physico-chimiques ont également été réalisées toutes les deux heures.



Figure 19 : Sites d'échantillonnage et dispositif d'encagement

L'analyse des données obtenues suite à ce suivi de 24 h ne révèle aucune variation journalière pour les biomarqueurs mesurés, à cette période de l'année (novembre). Nous n'avons mis en évidence ni un effet du facteur temps ($p=0,28$), ni de l'interaction espèce x temps ($p=0,13$). Parmi les paramètres physico-chimiques mesurés, la luminosité est le seul paramètre avec des variations importantes, mais aucun lien n'a pu être établi avec les réponses des biomarqueurs. Toutefois, la différence interspécifique d'expression des biomarqueurs est là encore observable. Ces résultats impliquent que dans un but de biosurveillance, l'heure de prélèvement (à cette période de l'année) n'est pas déterminante.

Variabilité inter et intra-spécifique

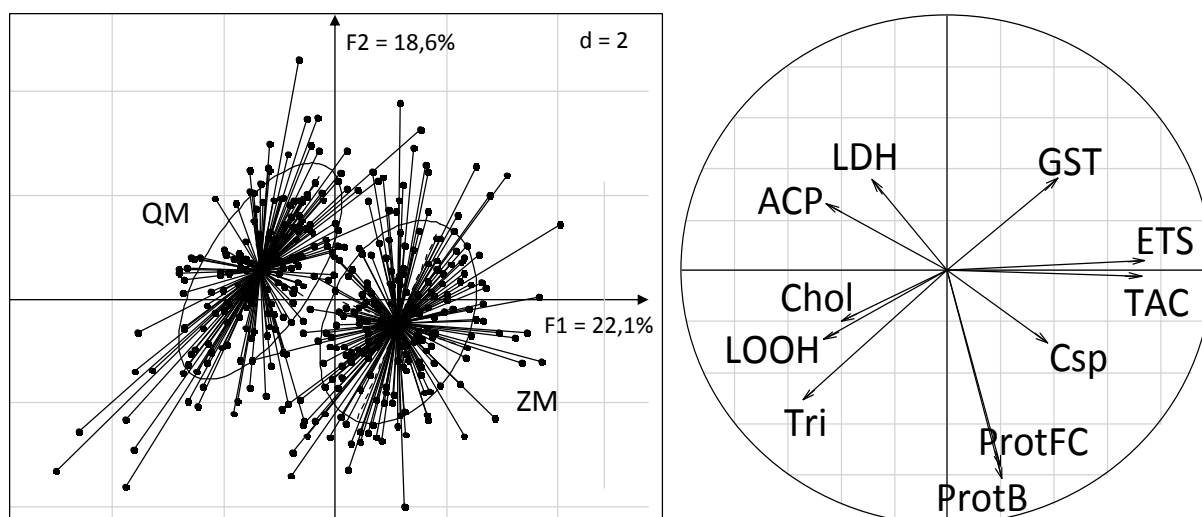
1. Variabilité inter-spécifique

Comme décrit précédemment, les hydrosystèmes français sont depuis relativement peu de temps colonisés par une seconde espèce de dreissenidés, *D. r. bugensis*. La question qui se pose alors est celle de l'identité des réponses biomarqueurs entre cette nouvelle espèce et *D. polymorpha*, espèce modèle en écotoxicologie sur laquelle un large corpus de données est déjà disponible.

Dans une optique de biosurveillance, il nous a semblé essentiel de soulever ce point, afin de voir le poids que pouvait avoir une méconnaissance des critères d'identification de ces deux bivalves sur l'interprétation des biomarqueurs.

Nous avons donc traité cette question à l'aide des données collectées en avril 2016 et en février 2017, dates pour lesquelles nous disposons du plus grand nombre de populations pour les deux espèces.

Une première ACP met clairement en évidence une différence des niveaux de biomarqueurs entre les deux espèces (Figure). Pour saisir l'ampleur de cette différence, il est important de prendre conscience que la figure présentée mélange, pour chaque espèce, 2 dates (avec un effet saison détaillé plus haut) et plusieurs populations. Malgré ces 2 sources de variabilité non explicitement représentées sur le plan factoriel, la différenciation des ellipses des 2 espèces reste très marquée. Les différences de valeurs mesurées pour les 11 biomarqueurs conservés dans l'étude entre espèces sont donc bien plus importantes que celles générées par un effet saison ou un effet population.



De plus, nous nous sommes focalisés sur 3 cas particuliers, 3 stations où les deux espèces coexistent (Montigny – Canal de Jouy, Oise, St Mihiel), à une seule saison, avril 2016. Cette seconde analyse nous permet de comprendre plus finement les différences entre les 2 espèces considérées.

Le plan factoriel (Figure) confirme la différence entre les 2 espèces. Cependant, le plus important ici n'est pas la position de *D. r. bugensis* relativement à la position de *D. polymorpha*, mais la manière dont se distribuent les 3 sites étudiés le long de l'axe F2 : la position relative des stations s'inverse entre *D. polymorpha* et *D. r. bugensis*, suggérant des patrons de réponses inversés par rapport aux conditions du milieu. En explorant plus finement les réponses biologiques, nous pouvons dire que:

- *D. r. bugensis* présente sur l'axe F1, d'une manière générale, des réponses antioxydantes et antitoxiques plus faibles que *D. polymorpha* (TAC, GST), se traduisant par une peroxydation lipidique plus forte (LOOH). *D. r. bugensis* possède également plus de réserves énergétiques (triglycérides), alors que dans le même temps, *D. polymorpha* présente une activité ETS plus élevée

- L'axe F2, qui structure les différences entre populations, est structuré par la LDH, et les quantités de cholestérol et de protéines. Cette différence inter-spécifique marquée pointe la nécessité de correctement identifier les organismes prélevés sur le terrain pour éviter de brouiller l'information fournie par la mesure de biomarqueurs.

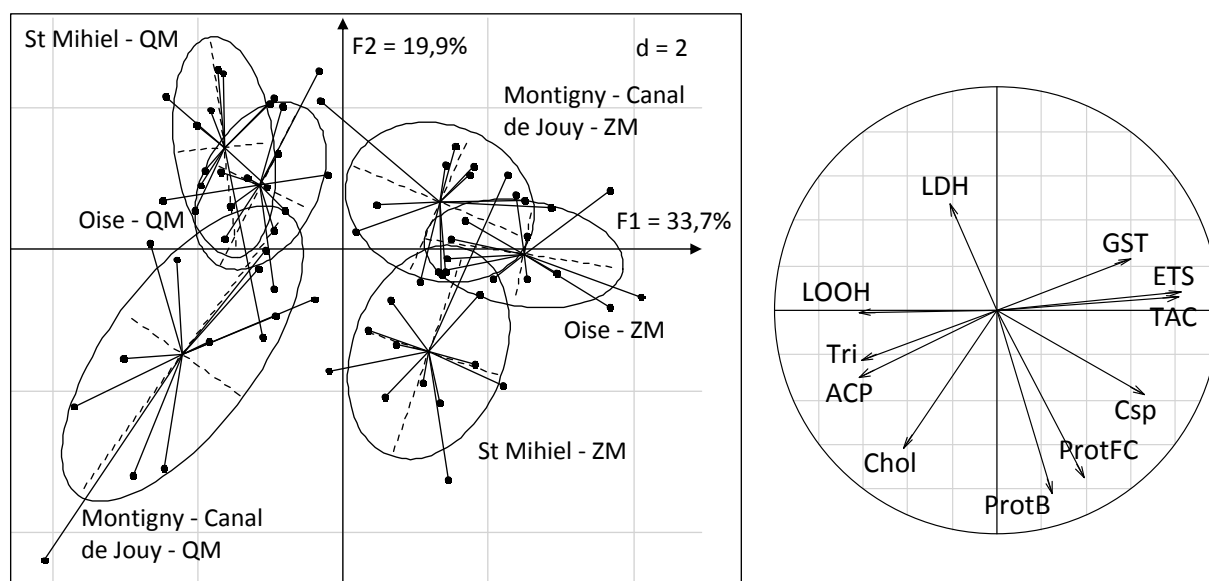


Figure 21 : Variabilité inter-spécifique des biomarqueurs pour les 3 stations où les deux espèces sont présentes en sympatrie échantillonnées en avril 2016.

Nous avons réalisé le même type d'analyse sur 4 autres stations (Montigny – Canal de Jouy, Oise, Seurre, Liverdun) où les deux espèces coexistent pour la campagne de février 2017. Cette seconde analyse confirme les différences interspécifiques observées précédemment, avec une séparation nette des réponses des deux espèces (Figure).

Contrairement à l'analyse précédente, il n'y a pas d'inversion de réponse le long de l'axe F2 entre les deux espèces pour les sites considérés ici. Cela suggère que sur ces sites les deux espèces ont

les mêmes patrons de réponse par rapport aux conditions du milieu, bien que chaque espèce reste dans sa propre gamme de réponse.

Là encore *D. r. bugensis* présente, d'une manière générale, des réponses antioxydantes plus faibles, se traduisant par une peroxydation lipidique plus forte (LOOH), mais possède plus de réserves énergétiques que *D. polymorpha*.

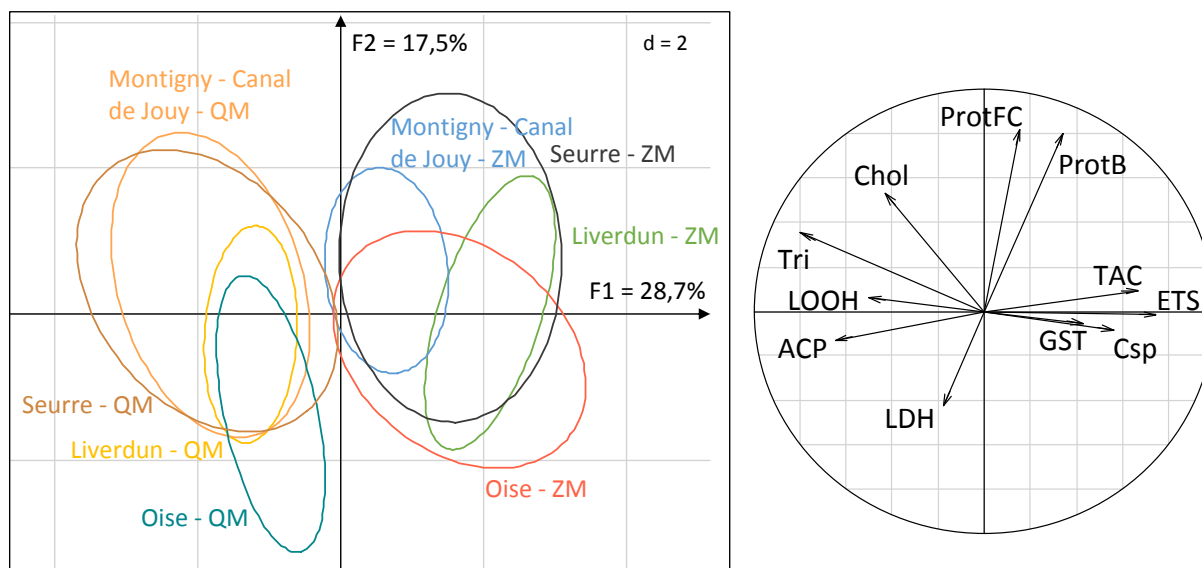


Figure 22 : Variabilité inter-spécifique des biomarqueurs pour les 4 stations où les deux espèces sont présentes en sympatrie échantillonnées en février 2017.

2. Variabilité intra-spécifique (inter-populations)

Outre ces variations inter-spécifiques, nous avons aussi souhaité évaluer l'existence de différences entre populations d'une même espèce (variations inter-populationnelles).

Pour *D. polymorpha* (Figure) il existe des différences de réponses entre populations, avec une séparation des ellipses correspondant aux différentes populations. Cette ACP reflète aussi l'effet saisonnier observé précédemment, avec les réponses du mois de février localisées principalement dans le quart supérieur gauche du plan factoriel, contrairement aux réponses du mois d'octobre. On peut également constater que les ellipses du mois d'octobre sont beaucoup plus étendues et plus éclatées les unes par rapport aux autres que celles du mois de février. Cela implique que (1) la variabilité inter-individuelle au sein de chaque population est plus importante en octobre, et que (2) les différences inter-populationnelles sont aussi plus marquées pour cette saison.

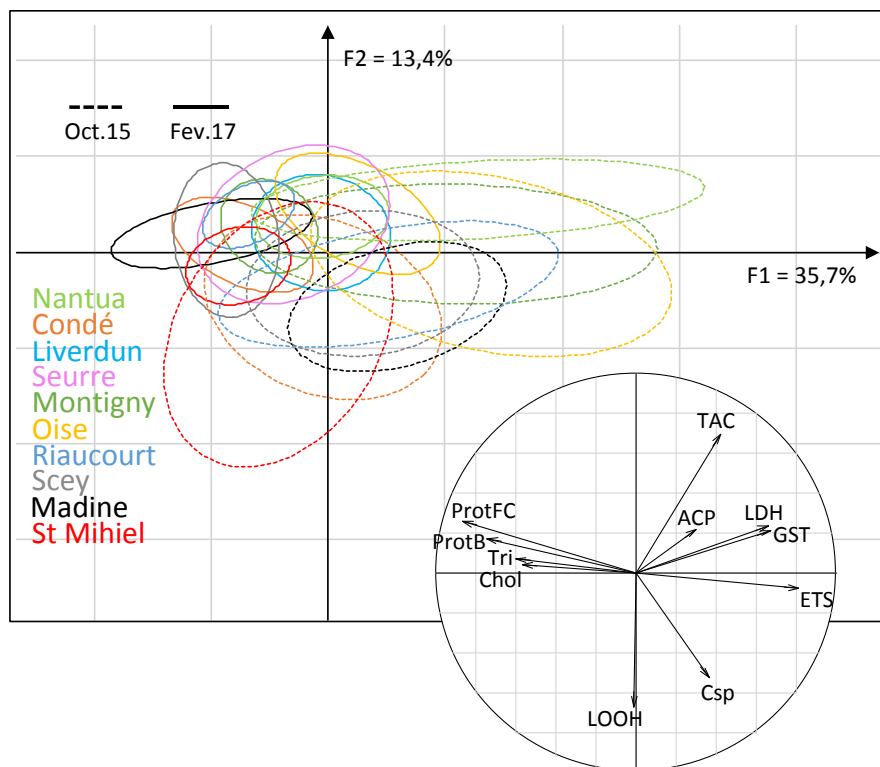


Figure 23 : Variabilité inter-populationnelle des biomarqueurs pour les populations de *D. polymorpha* échantillonnées en octobre 2015 et février 2017.

Des différences inter-populationnelles existent également pour *D. r. bugensis* (

Figure). L'influence saisonnière est moins marquée, les ellipses pour février et octobre étant globalement superposées. Ici aussi les ellipses du mois d'octobre sont beaucoup plus étendues et plus éclatées les unes par rapport aux autres que celles du mois de février, impliquant que (1) la variabilité inter-individuelle au sein de chaque population est plus importante en octobre, et que (2) les différences inter-populationnelles sont aussi plus marquées pour cette saison.

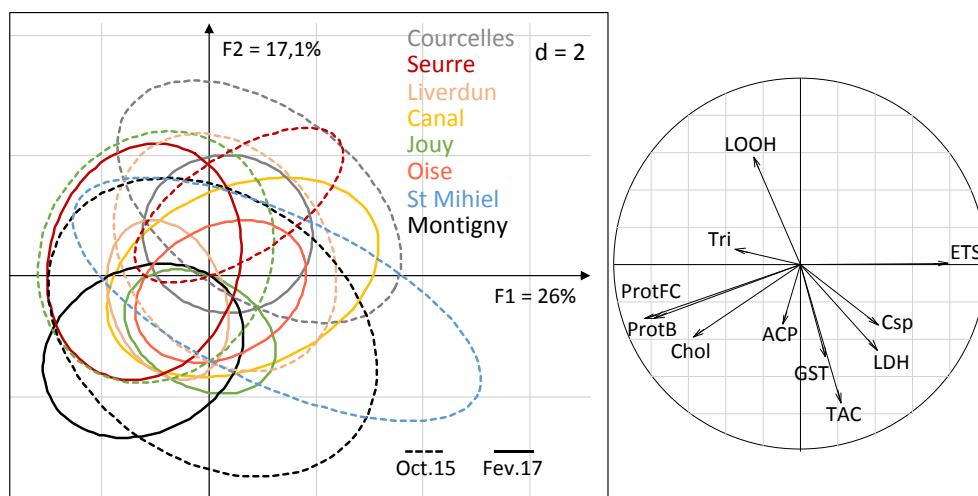


Figure 24 : Variabilité inter-populationnelle des biomarqueurs pour les populations de *D. r. bugensis* échantillonnées en octobre 2015 et février 2017.

Réponses des biomarqueurs au regard de la contamination des sites

L'objectif affiché de la convention BIOMICS est de mettre en évidence le potentiel des biomarqueurs pour évaluer la qualité des milieux aquatiques. Pour cela, nous avons choisi d'investiguer la variabilité des réponses biologiques entre populations, dans une démarche de biosurveillance passive, et de relier ces réponses aux paramètres abiotiques de leur milieu de vie.

1. Caractérisation de la contamination des sites

La DCE et autres directives et arrêtés associés ne fournissent quasiment aucun seuil de qualité pour les sédiments des cours d'eau intérieurs CF directives (UE, 2000, p. 60 ; UE, 2013, p. 105 ; UE, 2008). Ils identifient les substances prioritaires, et fournissent des NQE pour l'eau et le biote mais pas pour les sédiments. Faute de réglementation « récente » pour la qualité des sédiments issus des cours d'eau, nous avons réalisé deux classements de la contamination sédimentaire de nos sites :

- au regard de l'article 1^{er} de l'Arrêté du 9 août 2006, présentant un seuil de qualité pour 8 métaux lourds, ainsi que pour les HAP et PCB totaux (Tableau V)

Tableau V : Contamination sédimentaire au regard du Tableau IV de l'article 1er de l'Arrêté du 9 août 2006 concernant les niveaux relatifs aux éléments et composés traces pour les sédiments extraits de cours d'eau ou canaux. Lorsque la valeur S1 est atteinte pour un paramètre au moins, le site est classé > S1 (en orange)

Seuil S1 ⁽¹⁾	Somme HAP*	Somme PCB*	Al*	As*	Cd*	Cr*	Co*	Cu*	Fe*	Mn*	Hg*	Ni*	Pb*	Zn*
	22800	680	N.D.	30	2	150	N.D.	100	N.D.	N.D.	1	50	100	300
Octobre 2015														
Condé	8.838	0.0465	84.85	0.0082	0.0004	0.122	0.0179	0.0583	25.25	0.6958	0.0002	0.049	0.0304	0.1928
Courcelles	41.143	0.0175	23.07	0.0162	0.0547	0.0624	0.0061	0.079	14.74	0.3463	0.0045	0.0176	1.004	2.443
Nantua	16.981	0.0175	4.338	0.0045	0.0002	0.0422	0.0025	0.0398	6.848	0.1264	0.0005	0.0217	0.1435	0.128
Riaucourt	20.355	0.0175	25.84	0.0225	0.0003	0.1168	0.0077	0.0165	42.2	0.2354	5E-05	0.028	0.0252	0.1291
Scey	0.342	0.0175	49.25	0.024	0.0002	0.0583	0.008	0.013	19.13	0.1881	1E-05	0.016	0.0243	0.0483
Seurre	1.895	0.0175	43.79	0.0154	0.0008	0.0597	0.0081	0.1085	22.9	0.3729	0.0001	0.0236	0.0348	0.265
Oise	1.684	0.0175	15.92	0.0036	0.0001	0.0465	0.0039	0.0121	11.15	0.2582	7E-05	0.0086	0.0157	0.0602
St Mihiel	2.035	0.0175	29.58	0.0078	0.0003	0.0539	0.0072	0.0231	17.23	0.2042	6E-05	0.0226	0.0186	0.1225
Jouy	3.949	0.0175	65.68	0.0264	0.001	0.0933	0.0133	0.0441	40.48	0.6929	0.0002	0.042	0.0618	0.2759
Liverdun	11.897	0.1145	57.31	0.0306	0.0009	0.0808	0.01	0.0296	41.09	0.4701	0.0003	0.0241	0.3554	0.8539
Madine	3.191	0.0175	8.708	0.0219	0.0002	0.023	0.0054	0.0059	24.23	0.3365	2E-05	0.0106	0.0085	0.0413
Montigny (Jouy)	27.488	0.0175	40.84	0.0114	0.0003	0.0815	0.0068	0.0449	27.66	0.8823	4E-05	0.016	0.0697	0.1099
Février 2017														
Condé	6.307	0.176	25.64	0.0071	0.0005	0.1462	0.0165	0.0644	20.86	1.963	7E-05	0.0388	0.0458	0.1829
Courcelles	20.711	0.0285	24.18	0.0192	0.0595	0.0693	0.0067	0.0807	17.16	0.3196	0.0041	0.0192	0.9823	2.851
Nantua	3.071	0.0175	3.268	0.0026	0.0001	0.0149	0.001	0.0191	4.869	0.0965	0.0001	0.005	0.0322	0.0925
Riaucourt	15.28	0.0175	20.36	0.0292	0.0001	0.1217	0.0076	0.0138	50.98	0.236	5E-05	0.0292	0.0309	0.1309
Scey	1.438	0.0175	68.45	0.0324	0.0008	0.0898	0.0159	0.0885	40.28	0.5885	0.0002	0.0434	0.0627	0.4323
Seurre	2.197	0.0175	40.21	0.018	0.0005	0.061	0.0103	0.0223	23.78	0.5076	0.0003	0.0234	0.0251	0.1643
Oise	1.268	0.0175	20.5	0.0057	0.0003	0.0626	0.0054	0.0139	14.31	0.3387	8E-05	0.0129	0.0177	0.0717
St Mihiel	2.936	0.0175	41.71	0.0082	0.0004	0.0501	0.0071	0.0379	22.88	0.208	7E-05	0.0234	0.0261	0.1486
Jouy	16.95561	0.022	78.69	0.0241	0.001	0.0854	0.0111	0.0492	37.71	0.5248	0.0002	0.0348	0.0669	0.2448
Liverdun	0.838	0.0175	63.48	0.0147	0.0001	0.0601	0.0039	0.01	12.76	0.1238	4E-05	0.01	0.0429	0.0769
Madine	0.279	0.0175	15.16	0.0101	0.0001	0.0416	0.0028	0.008	10.03	0.2578	1E-05	0.0115	0.0135	0.0303
Montigny (Jouy)	2.287	0.0175	36.6	0.0084	0.0001	0.0845	0.0031	0.0144	18.35	0.4831	1E-05	0.009	0.0339	0.0356
Montigny (Metz)	2.783	0.0175	36.4	0.0109	0.0001	0.1136	0.0039	0.0134	16.72	0.2596	8E-05	0.0127	0.0272	0.0625

* résultats exprimés en mg/kg

⁽¹⁾ en mg/kg de sédiment sec analysé sur la fraction inférieure à 2 mm

- par un test de rang, permettant de construire un gradient de contamination des sites. Pour construire ce gradient (Tableau), nous avons transformé la variable quantitative associée à chaque contaminant en une variable discrète représentant le rang de chaque station au sein de l'ensemble des stations étudiées. Les rangs sont alors sommés pour tous les contaminants (Rang total), ou par classe de polluants (organiques et métaux).

Tableau IX: Classement par rang des 13 sites étudiés réalisé sur les paramètres de contamination des sédiments. Les codes couleurs correspondent aux 4 stations ayant le plus faible niveau de contamination (vert), aux 4 (octobre) ou 5 (février) avec les niveaux intermédiaires (orange pâle) et enfin les 4 stations avec les plus hauts niveaux rencontrés (orange foncé)

	Octobre 2015			Février 2017		
	Rang total	Rang organiques	Rang métaux	Rang total	Rang organiques	Rang métaux
Oise	69	38	31	102	41	61
Scey	71	17	54	193	51	142
Madine	86	50	36	46	18	28
St Mihiel	102	46	56	166	87	79
Seurre	131	36	95	161	59	102
Nantua	140	90	50	129	92	37
Jouy	181	61	120	262	130	132
Riaucourt	188	105	83	203	118	85
Montigny (canal de Jouy)	198	118	80	124	64	60
Courcelles	221	125	96	265	152	113
Condé	234	123	111	308	195	113
Liverdun	269	152	117	82	27	55
Montigny (canal de Metz)				145	81	64

Si on se fie au Tableau V ci-dessus, nos sites sont de bonne qualité. Toutefois, les seuils reportés dans cet Arrêté sont très élevés, et l'utilisation du classement de nos sites sur la base du test de rang nous a semblé plus pertinente.

L'ACP réalisée sur la contamination des sédiments (Figure) isole le site de Courcelles, sur le canal de la Deûle, un ancien site Metaleurop. Ce site est caractérisé par une forte charge en HAP et en métaux lourds (Hg, Pb, Zn, Cd, Cu...). Le site de Condé sur l'axe 2 se distingue par un fort niveau en PCB. Les autres sites présentent un gradient de contamination structuré essentiellement par les métaux.

L'autre enseignement majeur de cette analyse est la variabilité saisonnière de la contamination des sédiments. Les sédiments sont réputés être un compartiment intégrateur dans le temps de la contamination du milieu, et les analyses de la contamination des sédiments reflèteraient alors un état moyen de la charge en polluant du milieu. Cependant, comme nous pouvons le voir notamment pour Condé, Liverdun, Jouy ou encore Montigny – Canal de Jouy, le profil change radicalement entre octobre 2015 et février 2017. Cela souligne la nécessité de réaliser ces échantillonnages du sédiment à chaque campagne biomarqueurs, ce que nous n'avons pas fait en avril 2016, si l'on souhaite étudier finement les liens entre les compartiments biotiques et abiotiques.

C'est pourquoi, lorsque nous mettrons en relation les biomarqueurs avec la contamination des sites, nous nous limiterons aux 2 campagnes pour lesquelles ces informations ont été collectées simultanément (octobre 2015 et février 2017).

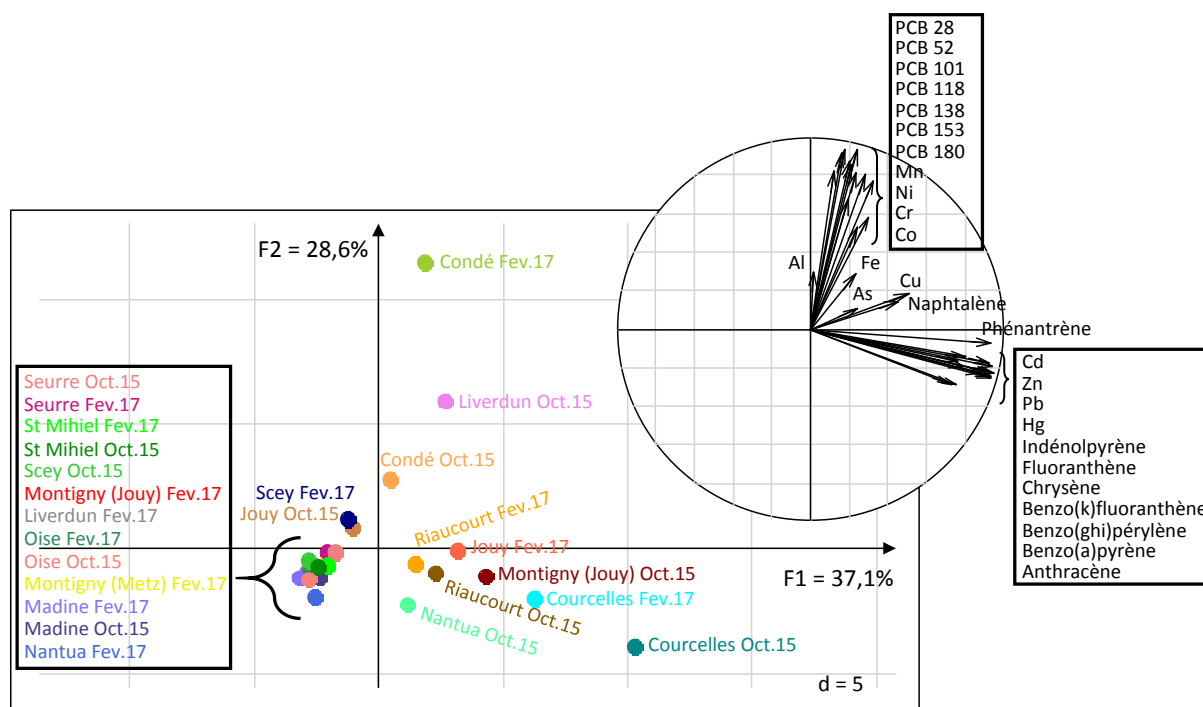


Figure 25 : Résultats de l'ACP du tableau de contamination des sédiments pour les 29 contaminants mesurés pour 12 sites x 2 saisons (octobre 2015 : Oct.15 ; février 2017 : Feb.17), sauf pour le site Montigny – Canal de Metz analysé uniquement en février 2017

2. Caractérisation de la physico-chimie des sites étudiés

Les ACP réalisées sur les données physico-chimiques de la colonne d'eau pour les deux (octobre 2015 et février 2017 ; Figure) ou trois dates d'échantillonnage (octobre 2015, avril 2016, février 2017 ; Figure) mettent en évidence la relative stabilité de ces paramètres aux différentes dates d'échantillonnage.

Ces deux analyses mettent toutefois en évidence la position particulière du site de Condé, une ancienne mine de charbon reconvertie en étang, ce qui explique sa forte DBO_5 .

Les autres sites présentent un gradient le long de l'axe 1, relié à la minéralisation du milieu, avec sites sur la Moselle occupant une place à part. Pour ces sites (Jouy et les 2 sites de Montigny), nous pouvons observer une certaine variabilité entre les dates d'échantillonnage, particulièrement sur la Figure 27: cela est lié au prélèvement d'avril 2016, effectué pendant une période de très forts débits, ayant entraîné une dilution des apports salins et donc une baisse notable de la minéralisation (autour de $800 \mu S.cm^{-1}$ contre $1900 \mu S.cm^{-1}$ habituellement).

Les plans factoriels mettent également en évidence la grande similitude, du point de vue chimie de l'eau, des autres sites échantillonnés. Ces paramètres ne joueront donc, a priori, qu'un rôle marginal sur la réponse biologique des organismes.

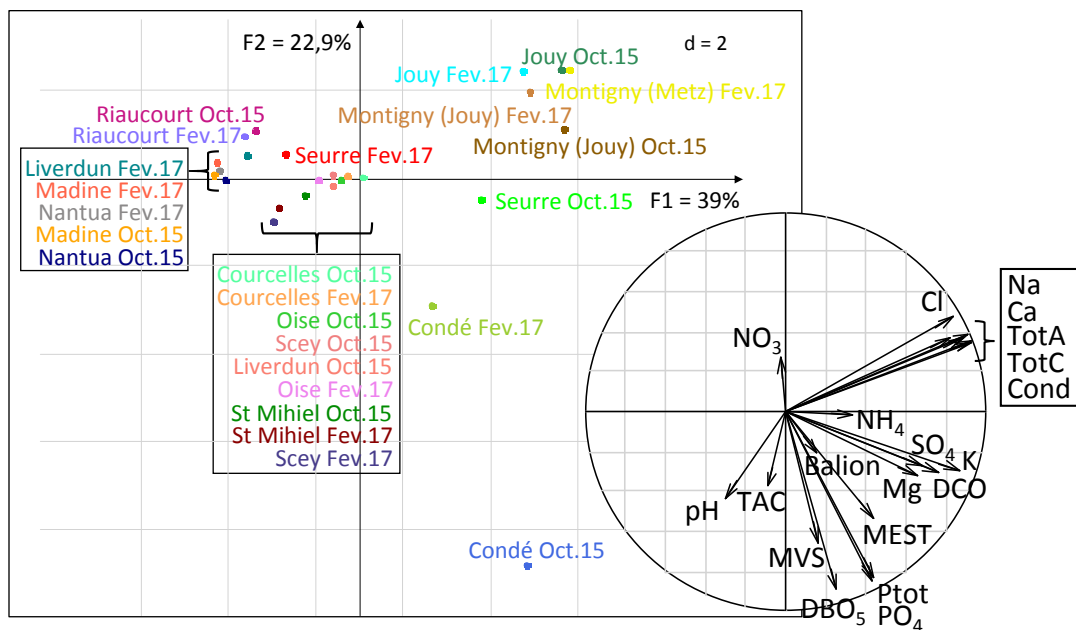


Figure 26 : Résultats de l'ACP du tableau de physico-chimie de la colonne d'eau pour les 20 paramètres mesurés pour 12 sites x 2 saisons (octobre 2015 : Oct.15 ; février 2017 : Fev.17), sauf pour le site Montigny – Canal de Metz analysé uniquement en février 2017

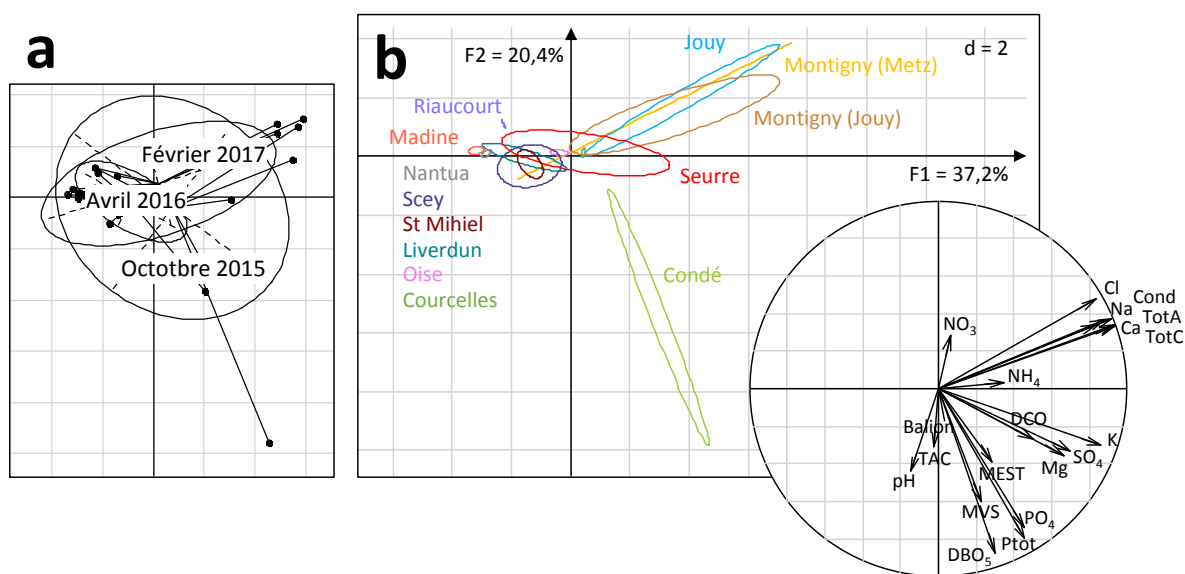


Figure 27 : Résultats de l'ACP du tableau de physico-chimie de la colonne d'eau pour les 20 paramètres mesurés pour 12 sites x 3 saisons, plus le site de Montigny – Canal de Metz analysé uniquement en avril 2016 et février 2017

3. Bioaccumulation des contaminants *in situ*

Les concentrations internes en contaminants n'ont été mesurées qu'en février 2017. Les contaminants suivis sont les mêmes que ceux mesurés dans les sédiments, sauf pour le naphthalène qui a été oublié lors de la création du devis. L'analyse des données révèle une plus forte tendance à la bioaccumulation chez *D. r. bugensis*, quelle que soit la famille de contaminants considérée (Figure).

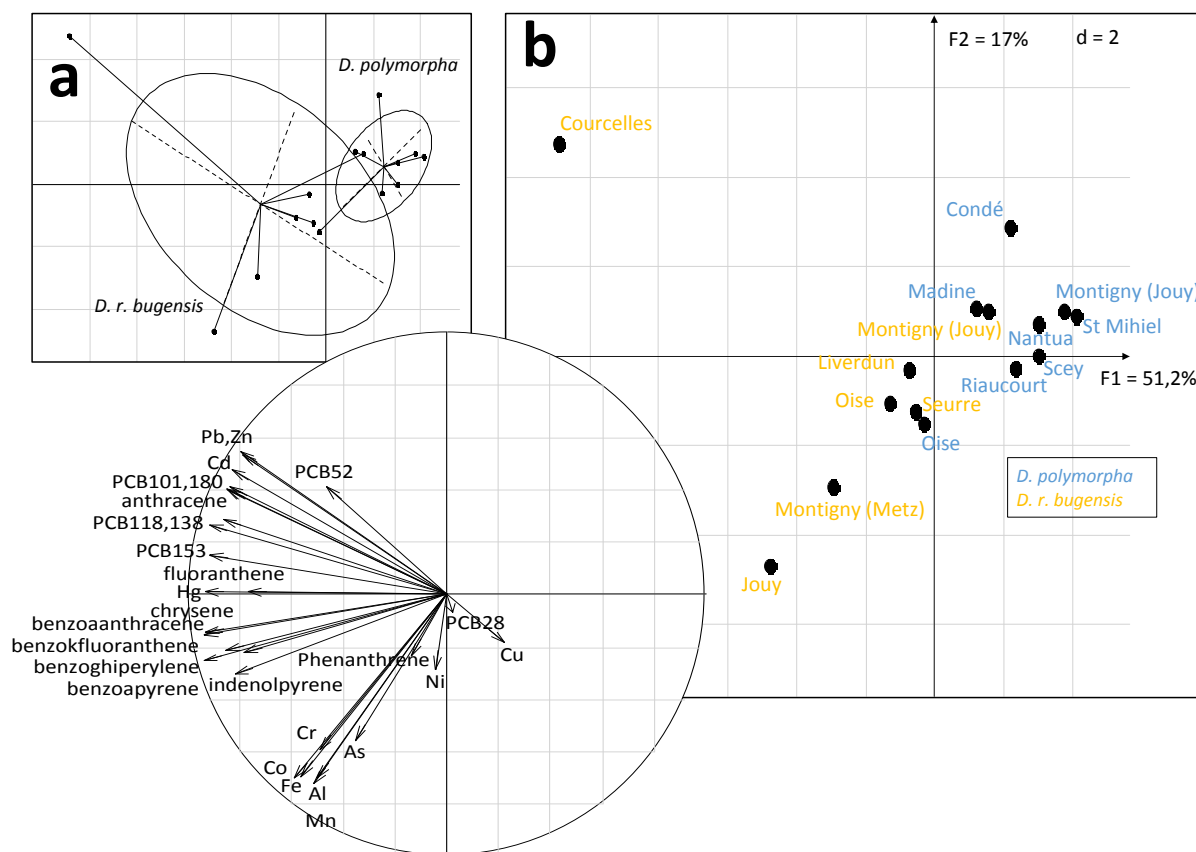


Figure 28 : Résultats de l'ACP sur les données de bioaccumulation par les organismes (15 stations x 28 contaminants) pour février 2017

4. Caractérisation des réponses biologiques

L'idée ici est de mettre en relation les réponses biologiques avec les paramètres environnementaux, afin de tenter de dégager une batterie de biomarqueurs apte à décrire un état de contamination du milieu.

Comme nous l'avons vu précédemment, la variabilité saisonnière, à la fois dans la contamination des sédiments et dans les réponses biologiques, nous a conduits à traiter les données indépendamment pour les 2 dates (octobre 2015 et février 2017).

Une première approche a consisté en l'étude des co-structures entre les différentes informations collectées : chimie de l'eau, contamination des sédiments, concentrations internes et biomarqueurs. Cette analyse se fait par l'étude de la co-inertie, dont les résultats sont synthétisés dans le Tableau VI.

Tableau VI : Résultats des 18 co-inerties réalisées pour étudier les co-structures des jeux de données disponibles. Chaque co-inertie est basée sur le croisement de deux ACP (par exemple une ACP entre la contamination des sédiments et une entre les concentrations internes en contaminants pour la première ligne du tableau). Les co-inerties significatives (c'est-à-dire révélant une structure commune aux deux jeux de données) sont en gras

Costructure analysée	Total		<i>D. polymorpha</i>		<i>D. r. bugensis</i>	
	Octobre 2015	Février 2017	Octobre 2015	Février 2017	Octobre 2015	Février 2017
Contamination des sédiments vs bioaccumulation		0.039		0.536		0.016
Contamination des sédiments vs biomarqueurs	0.147	0.898	0.355	0.966	0.816	0.463
Chimie de l'eau vs biomarqueurs	0.08	0.228	0.974	0.946	0.004	0.346
Bioaccumulation vs biomarqueurs		0.003		0.415		0.021

Les résultats montrent globalement peu de co-structures significatives. La tendance à la bioaccumulation des polluants de *D. r. bugensis* décrite précédemment se traduit par une co-structure significative entre la contamination des sédiments et les concentrations internes, patrons non retrouvés pour *D. polymorpha*. Pour *D. r. bugensis* on retrouve également un lien entre les concentrations internes en contaminants et les réponses des biomarqueurs, ce qui n'est pas vrai chez *D. polymorpha*.

D'une manière générale, nous voyons que ces analyses conduisent à dire que les biomarqueurs ne répondent pas à la diversité des profils de contamination rencontrés sur le terrain.

Ce premier constat nous a conduits à procéder différemment, et à repenser notre stratégie d'analyse des données. En effet, l'objectif n'est pas de comprendre comment les paramètres du milieu influencent les réponses biomarqueurs, mais plutôt de voir comment les biomarqueurs traduisent un état de contamination du milieu, évalué ici au travers de la contamination des sédiments.

Pour répondre plus spécifiquement à cette question, nous avons développé une autre approche, à l'aide d'une régression PLS (Partial Least Squares, régression des moindres carrés). La régression PLS est une technique de régression qui vise à prédire les valeurs prises par un groupe de variables Y (variables à prédire, variables cibles, variables expliquées) à partir d'une série de variables X (variables prédictives, descripteurs, variables explicatives). Elle permet de traiter simultanément un grand nombre de descripteurs, même quand l'information qu'ils apportent est redondante. Pour toutes les PLS réalisées, les valeurs ont systématiquement été retenues sur les 3 premiers facteurs (il est difficile de représenter un espace à plus de trois dimensions). Les VIP (Variable Importance in the Projection) indiquent l'importance relative des biomarqueurs dans l'explication de la contamination. Ici nous n'avons retenu que les VIP pour le troisième facteur (prises à la suite, les colonnes rendent compte de l'évolution du rôle de la variable à mesure que l'on intègre l'information, c'est pour cela que nous avons conservé la dernière). Les seuils de significativité ont été arbitrairement fixés à 60% pour la variance expliquée cumulée, à 0.8 pour les R^2 cumulés et à 1 pour les VIP.

Trois questions ont été traitées : la contamination des sédiments est-elle expliquée par les réponses des biomarqueurs ? La contamination des sédiments est-elle expliquée par la bioaccumulation ? La bioaccumulation des contaminants est-elle expliquée par les réponses des biomarqueurs ?

4.1. La contamination des sédiments expliquée par les biomarqueurs

Cette première PLS, dont les résultats sont présentés dans le Tableau VIIa, visait à voir si les biomarqueurs sont aptes à refléter la contamination sédimentaire.

Pour les deux espèces aux deux saisons, plus de 70% de la variation des descripteurs est expliquée par les trois premiers facteurs (variables latentes). Cela veut dire qu'une grande partie de l'information apportée par les biomarqueurs (descripteurs) est bien retranscrite. Concernant les variables cibles, la variance expliquée permet d'observer le pouvoir explicatif du modèle. La proportion de variance expliquée des variables cibles est ici toujours plus faible que celles des variables explicatives. Ici, le modèle est meilleur pour *D. r. bugensis* : 67.4 et 60.2% de la variabilité des Y sont expliquées par les 3 premiers facteurs pour octobre et février respectivement, contre seulement 50.6 et 38.5% pour *D. polymorpha*. Plus la proportion de variance cumulée est proche de 1, plus la connaissance des variables explicatives (biomarqueurs) permet de prédire avec certitude les valeurs prises par les variables expliquées (contaminants sédimentaires). Autrement dit ici, les réponses des biomarqueurs chez *D. r. bugensis* reflètent bien la contamination sédimentaire contrairement à *D. polymorpha* qui présente un pourcentage de variabilité expliquée faible.

Si on regarde la variance expliquée cumulée des variables (R^2 cumulé), les deux tableaux R^2 indiquent la corrélation de chaque variable (explicative et expliquée) avec les facteurs, c'est-à-dire la proportion de variance expliquée pour chaque variable sur les 3 facteurs retenus. Certains biomarqueurs ont un poids déterminant sur les 3 premiers facteurs, mais ce ne sont pas les mêmes selon l'espèce, ni selon la saison. Pour identifier les biomarqueurs d'importance, il faut recouper ce tableau avec celui des VIP. Pour *D. r. bugensis* en octobre, les concentrations en protéines et en cholestérol, et les activités ETS, ACP et TAC reflètent les niveaux de contamination. En février on retrouve toujours les protéines, l'ETS et l'ACP, mais également l'activité des caspases et l'IBR. Pour *D. polymorpha* en octobre, on retrouve les ProtB, les triglycérides et le cholestérol, les activités GST, TAC, Csp et l'IBR. Pour le mois de février, les ProtFC, les triglycérides, les LOOH, l'activité GST et l'IBR. Toutefois, rappelons que pour cette espèce (*D. polymorpha*), le pourcentage de variance totale expliquée est inférieur au seuil de significativité de 60% : même si ces biomarqueurs semblent être les plus pertinents, ils ne reflètent pas forcément bien la contamination sédimentaire.

Pour *D. r. bugensis*, la plupart des contaminants, sauf les PCB, ont aussi un poids déterminant dans la construction de ces trois premiers facteurs. Il existe donc une liaison entre les biomarqueurs d'importance et certains contaminants (les HAP et les métaux surtout). Ce n'est pas vrai pour *D. polymorpha*.

Tableau VII : Résultats des régressions PLS concernant le lien entre biomarqueurs et contamination sédimentaire (a) et le lien entre biomarqueurs et accumulation des contaminants dans les tissus mous (b)

a	CONTAMINATION DES SEDIMENTS EXPLIQUEE PAR LES BIOMARQUEURS			
	<i>D. r. bugensis</i>		<i>D. polymorpha</i>	
	Octobre 2015	Février 2017	Octobre 2015	Février 2017
	Variance expliquée cumulée sur 3 axes (%)			
Variables explicatives	72.43	78.91	87.37	76.21
Variables expliquées	67.40	60.19	50.56	38.46
	R ² cumulé sur 3 axes - Variables explicatives			
ProtB	0.95	0.96	0.85	0.58
Tri	0.83	0.97	0.97	0.95
Chol	1.00	0.70	0.90	0.74
ETS	1.00	0.91	0.84	0.54
LOOH	0.72	0.99	0.99	0.69
ACP	0.94	0.80	0.62	0.65
ProtFC	0.99	0.77	0.95	0.82
GST	0.89	0.35	0.99	0.80
TAC	0.43	0.29	0.87	0.86
LDH	0.65	0.91	0.73	0.72
Csp	0.24	0.96	0.80	0.90
IBR	0.07	0.86	1.00	0.91
Total expliqué	0.72	0.79	0.87	0.76
	R ² cumulé sur 3 axes - Variables expliquées			
Anthracène	0.97	0.81	0.50	0.63
Benzo(a)anthracène	0.97	0.87	0.44	0.63
Benzo(a)pyrène	0.99	0.83	0.46	0.61
Benzo(ghi)pérylène	0.97	0.84	0.42	0.59
Benzo(k)fluoranthène	0.98	0.86	0.42	0.61
Chrysène	0.98	0.86	0.42	0.63
Fluoranthène	0.97	0.95	0.39	0.62
Indénolpyrène	0.96	0.79	0.40	0.59
Naphtalène	0.99	0.86	0.16	0.15
PCB 101	0.06	0.00	0.53	0.07
PCB 118	0.06	0.00	0.53	0.07
PCB 138	0.06	0.93	0.00	0.07
PCB 153	0.06	0.90	0.00	0.07
PCB 180	0.06	0.00	0.00	0.07
PCB 28	0.00	0.00	0.53	0.07
PCB 52	0.06	0.00	0.53	0.07
Phénanthrène	0.96	0.72	0.51	0.56
Somme PCB	0.06	0.95	0.53	0.07
Al	0.84	0.44	0.77	0.70
As	0.60	0.26	0.80	0.64
Cd	0.97	0.93	0.67	0.38
Cr	0.91	0.20	0.82	0.30
Co	0.99	0.18	0.79	0.44
Cu	0.16	0.92	0.65	0.45
Fe	0.71	0.37	0.70	0.61
Mn	0.99	0.43	0.18	0.10
Hg	0.98	0.94	0.72	0.16
Ni	0.96	0.32	0.82	0.63
Pb	0.97	0.93	0.70	0.44
Zn	0.99	0.94	0.74	0.52
Total expliqué	0.67	0.60	0.51	0.38
	VIP sur 3 axes			
ProtB	1.11	1.18	1.22	0.72
Tri	0.89	0.84	1.14	1.44
Chol	1.20	0.72	1.05	0.81
ETS	1.32	1.34	0.88	0.48
LOOH	0.88	0.76	0.83	1.25
ACP	1.19	1.28	0.68	0.85
ProtFC	1.18	1.04	0.92	1.12
GST	0.97	0.91	1.07	1.12
TAC	1.06	0.48	1.05	0.83
LDH	0.86	0.95	0.81	0.90
Csp	0.60	1.03	1.11	0.94
IBR	0.20	1.11	1.11	1.16

b	BIOACCUMULATION EXPLIQUEE PAR LES BIOMARQUEURS	
	Février 2017	
	<i>D. r. bugensis</i>	<i>D. polymorpha</i>
	Variance expliquée cumulée sur 3 axes (%)	
Variables explicatives	84.42	78.00
Variables expliquées	74.75	54.57
	R ² cumulé sur 3 axes - Variables explicatives	
ProtB	0.97	0.89
Tri	0.96	0.65
Chol	0.71	0.50
ETS	0.94	0.94
LOOH	0.99	0.60
ACP	0.82	0.87
ProtFC	0.74	0.84
GST	0.95	0.93
TAC	0.95	0.85
LDH	0.71	0.83
Csp	0.92	0.51
IBR	0.48	0.95
Total expliqué	0.84	0.78
	R ² cumulé sur 3 axes - Variables expliquées	
Bioacc-Anthracène	0.83	0.60
Bioacc-Benzo(a)anthracène	0.87	0.46
Bioacc-Benzo(a)pyrène	0.85	0.76
Bioacc-Benzo(ghi)pérylène	0.84	0.33
Bioacc-Benzo(k)fluoranthène	0.83	0.40
Bioacc-Chrysène	0.93	0.95
Bioacc-Fluoranthène	0.65	0.50
Bioacc-Indénolpyrène	0.44	0.56
Bioacc-Phénanthrène	0.62	0.31
Bioacc-PCB 101	0.96	0.13
Bioacc-PCB 118	0.90	0.74
Bioacc-PCB 138	0.93	0.32
Bioacc-PCB 153	0.92	0.11
Bioacc-PCB 180	0.87	0.85
Bioacc-PCB 28	0.32	0.85
Bioacc-PCB 52	0.91	0.19
Bioacc-Al	0.33	0.75
Bioacc-As	0.15	0.05
Bioacc-Cd	0.95	0.89
Bioacc-Cr	0.47	0.77
Bioacc-Co	0.57	0.83
Bioacc-Cu	0.97	0.02
Bioacc-Fe	0.78	0.89
Bioacc-Mn	0.61	0.55
Bioacc-Hg	0.86	0.63
Bioacc-Ni	0.68	0.54
Bioacc-Pb	0.94	0.88
Bioacc-Zn	0.95	0.44
Total expliqué	0.75	0.55
	VIP sur 3 axes	
ProtB	1.16	1.05
Tri	1.00	0.76
Chol	0.83	0.83
ETS	1.21	1.12
LOOH	0.90	0.66
ACP	1.22	1.36
ProtFC	0.92	0.99
GST	1.21	1.30
TAC	0.89	0.96
LDH	0.85	1.08
Csp	1.00	0.75
IBR	0.62	0.87

4.2. La bioaccumulation expliquée par les biomarqueurs

Pour cette deuxième PLS (Tableau VIIb), le but était de voir si les réponses des biomarqueurs étaient capables de refléter l'accumulation des contaminants par les organismes.

Là encore, en regardant la variance expliquée cumulée, on voit que les réponses des biomarqueurs reflètent bien l'accumulation des contaminants dans les tissus mous, de façon plus prononcée pour *D. r. bugensis* que pour *D. polymorpha*.

Pour *D. polymorpha*, les réponses des biomarqueurs sont surtout reliées à l'accumulation de certains métaux (Cd, Co, Fe, Pb), mais pas tous. Pour *D. r. bugensis*, elles sont surtout reliées à l'accumulation des contaminants organiques (HAP et PCB). Si on compare avec la partie précédente, pour *D. r. bugensis*, les biomarqueurs reflètent l'accumulation des PCB par les organismes, mais pas leur présence dans les sédiments.

Contrairement à la relation entre les biomarqueurs et la contamination sédimentaire, où les biomarqueurs d'importance étaient différents entre les deux espèces, ici ce sont quasiment les mêmes qui reflètent l'accumulation des contaminants dans les tissus mous : ProtB, ETS, ACP et GST, même s'il convient de rappeler que pour *D. polymorpha* ces biomarqueurs sont surtout reliés à l'accumulation des métaux, alors qu'ils sont reliés à l'accumulation des organiques pour *D. r. bugensis*.

4.3. La contamination des sédiments expliquée par la bioaccumulation

Enfin, la dernière PLS visait à étudier le lien entre l'accumulation des contaminants dans les tissus mous des organismes et la contamination sédimentaire (Tableau VIII).

Concernant la variance expliquée cumulée, on voit que pour deux espèces, l'accumulation des contaminants dans les tissus mous reflète bien la contamination sédimentaire.

Si on regarde les R^2 , on voit que c'est surtout vrai pour les contaminants organiques : *D. polymorpha*, constitue un bon indicateur de la présence de PCB dans les sédiments, alors que *D. r. bugensis* reflète plutôt la présence de HAP. C'est moins vrai pour les métaux, probablement car ce ne sont pas des composés lipophiles, et qu'ils sont probablement accumulés et détoxiqués différemment par les organismes.

Tableau VIII : Résultats de la régression PLS concernant le lien entre l'accumulation des contaminants dans les tissus mous et la contamination sédimentaire

CONTAMINATION DES SEDIMENTS EXPLIQUEE PAR LA BIOACCUMULATION					
Février 2017			Février 2017		
	<i>D. r. bugensis</i>	<i>D. polymorpha</i>		<i>D. r. bugensis</i>	<i>D. polymorpha</i>
	Variance expliquée cumulée sur 3 axes (%)			R ² cumulé sur 3 axes - Variables expliquées	
Variables explicatives	88.04	72.04	Anthracène	0.80	0.75
Variables expliquées	62.95	68.34	Benzo(a)anthracène	0.88	0.75
	R ² cumulé sur 3 axes - Variables explicatives		Benzo(a)pyrène	0.84	0.75
Bioacc-Anthracène	0.98	0.86	Benzo(ghi)pérylène	0.84	0.77
Bioacc-Benzo(a)anthracène	0.87	0.81	Benzo(k)fluoranthène	0.86	0.76
Bioacc-Benzo(a)pyrène	0.98	0.67	Chrysène	0.87	0.75
Bioacc-Benzo(ghi)pérylène	0.84	0.28	Fluoranthène	0.98	0.75
Bioacc-Benzo(k)fluoranthène	0.84	0.33	Indénolpyrène	0.81	0.77
Bioacc-Chrysène	0.94	0.94	PCB 101	0.00	0.92
Bioacc-Fluoranthène	0.92	0.47	PCB 118	0.00	0.92
Bioacc-Indénolpyrène	0.72	0.69	PCB 138	0.99	0.92
Bioacc-Phénanthrène	0.94	0.16	PCB 153	0.86	0.92
Bioacc-PCB 101	0.99	0.98	PCB 180	0.00	0.92
Bioacc-PCB 118	0.99	0.95	PCB 28	0.00	0.92
Bioacc-PCB 138	0.95	0.93	PCB 52	0.00	0.92
Bioacc-PCB 153	0.92	0.91	Phénanthrène	0.80	0.81
Bioacc-PCB 180	0.97	0.85	Al	0.49	0.25
Bioacc-PCB 28	0.10	0.91	As	0.46	0.36
Bioacc-PCB 52	0.89	1.00	Cd	0.99	0.20
Bioacc-Al	0.69	0.69	Cr	0.55	0.75
Bioacc-As	0.79	0.67	Co	0.36	0.61
Bioacc-Cd	1.00	0.82	Cu	0.88	0.46
Bioacc-Cr	0.87	0.97	Fe	0.62	0.65
Bioacc-Co	0.90	0.75	Mn	0.21	0.88
Bioacc-Cu	0.93	0.43	Hg	0.98	0.15
Bioacc-Fe	0.99	0.88	Ni	0.57	0.62
Bioacc-Mn	0.94	0.61	Pb	0.99	0.57
Bioacc-Hg	0.91	0.64	Zn	0.99	0.33
Bioacc-Ni	0.82	0.96	Total expliqué	0.63	0.68
Bioacc-Pb	0.99	0.74			
Bioacc-Zn	0.99	0.31			
Total expliqué	0.88	0.72			
VIP sur 3 axes					
Bioacc-Anthracène	1.09	1.76			
Bioacc-Benzo(a)anthracène	1.08	0.77			
Bioacc-Benzo(a)pyrène	1.08	0.85			
Bioacc-Benzo(ghi)pérylène	0.99	0.96			
Bioacc-Benzo(k)fluoranthène	0.93	0.64			
Bioacc-Chrysène	1.10	0.77			
Bioacc-Fluoranthène	1.04	0.62			
Bioacc-Indénolpyrène	1.17	1.12			
Bioacc-Phénanthrène	0.95	0.60			
Bioacc-PCB 101	1.09	1.30			
Bioacc-PCB 118	1.10	0.98			
Bioacc-PCB 138	1.07	1.08			
Bioacc-PCB 153	1.05	1.41			
Bioacc-PCB 180	1.20	1.00			
Bioacc-PCB 28	0.33	1.06			
Bioacc-PCB 52	1.05	1.23			
Bioacc-Al	0.81	0.70			
Bioacc-As	1.10	1.12			
Bioacc-Cd	1.13	1.09			
Bioacc-Cr	0.77	1.24			
Bioacc-Co	0.89	0.46			
Bioacc-Cu	0.71	0.94			
Bioacc-Fe	0.76	0.68			
Bioacc-Mn	0.96	0.71			
Bioacc-Hg	1.15	1.11			
Bioacc-Ni	0.64	1.40			
Bioacc-Pb	1.12	0.63			
Bioacc-Zn	1.12	0.32			

Acquisition de la tolérance

Nous avons souhaité évaluer la tolérance des différentes populations à un stress aigu. Comme nous l'avons déjà évoqué, la tolérance différentielle peut être responsable de l'hétérogénéité des réponses des biomarqueurs entre plusieurs populations d'organismes sentinelles. Bien que *D. polymorpha* soit très utilisée en biosurveillance, les capacités de tolérance entre plusieurs populations n'ont été que très peu étudiées, tout comme celles de la nouvelle invasive *D. r. bugensis*. Quand elles le sont, c'est généralement au regard des paramètres environnementaux (température, salinité), pour prédire leur invasion, mais rarement au sens où nous l'entendons ici, à savoir l'adaptation aux contaminants et les processus conférant cette tolérance, utilisables en tant qu'outils de biosurveillance.

Pour évaluer ces différences de tolérance, nous avons exposé la plupart des populations à une concentration élevée en nickel (2.5 mg.L^{-1}) et réalisé un suivi de la mortalité. Un LT_{50} (temps léthal au bout duquel 50% des organismes de la population meurent) a ainsi pu être établi pour chaque population. Plus ce LT_{50} est élevé, plus la population est considérée comme tolérante. Les réponses des biomarqueurs et les concentrations en nickel dans les tissus mous ont aussi été mesurées, pour tenter de relier la tolérance au statut physiologique des organismes, et évaluer leur aptitude à prendre en charge cette contamination métallique.

Aucune mortalité n'a été observée chez les témoins. Nous avons pu mettre en évidence des différences de tolérances entre espèces, avec des LT_{50} plus élevés en moyenne pour les populations de *D. polymorpha* ($193.6 \text{ h} \pm 85.2$) que pour celles de *D. r. bugensis* ($67.8 \text{ h} \pm 16.7$, Figure 29).

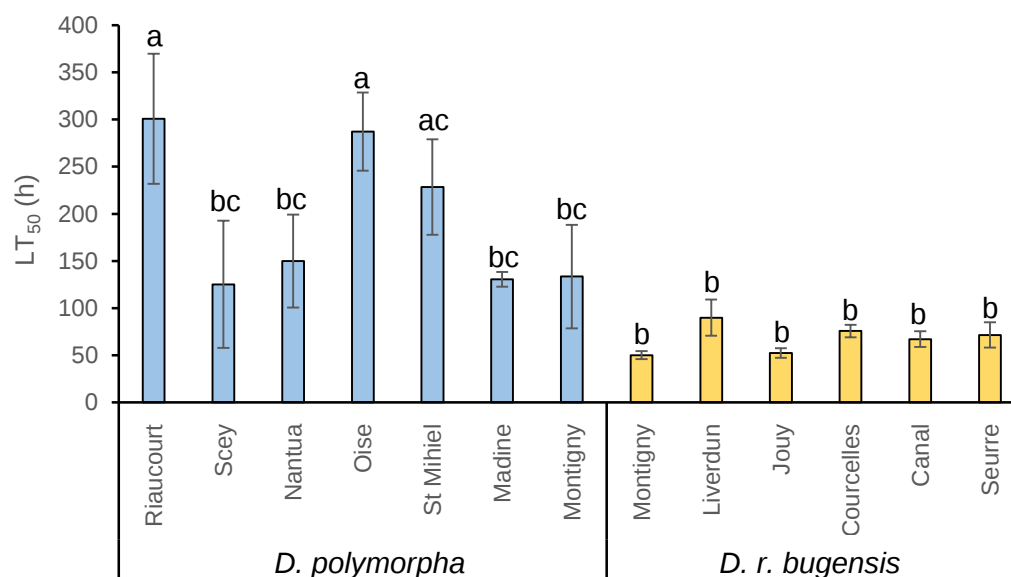


Figure 29: LT_{50} (moyenne $\pm$ ET, $n = 3$. pour chaque population exposée au nickel ($2,5 \text{ mg.L}^{-1}$). Les différences entre populations sont analysées par un test Post-Hoc de Tukey.

En plus de cette forte différence inter-spécifique, les TL50 sont beaucoup plus hétérogènes entre les populations de *D. polymorpha*, alors qu'ils sont similaires entre les populations de *D. r. bugensis*. Cette hétérogénéité entre populations de *D. polymorpha* est certainement liée à l'historique d'exposition et à l'adaptation de chaque population à son environnement local ; nous avons en effet mis en évidence un lien entre la contamination en métaux (le nickel en particulier) in situ et la tolérance (représentée par le TL50) pour cette espèce (Figure 30), alors que cette relation est inexistante chez *D. r. bugensis*. Les populations de *D. polymorpha* sont en effet établies depuis plus longtemps, et présentent une forte différenciation génétique par rapport à *D. r. bugensis*, chez qui les processus adaptatifs ne sont pas encore visibles.

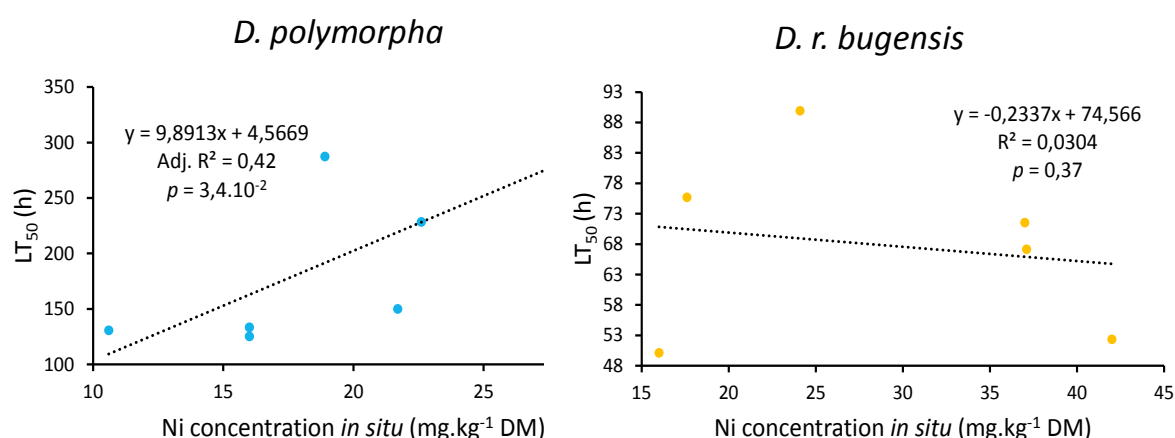


Figure 30 : Relation entre la concentration en Nickel enregistrée dans le sédiment et la tolérance à ce métal mesurée au laboratoire lors d'une exposition aigüe.

Les deux espèces accumulent le nickel de façon équivalente, mais les populations de *D. polymorpha* semblent plus aptes à le gérer puisqu'elles survivent plus longtemps. Les réponses des biomarqueurs ont été fortement perturbées par la forte concentration en Ni appliquée ici, nécessaire pour obtenir ces TL50. Toutefois, les populations de *D. polymorpha* présentaient là encore des mécanismes de défenses plus actifs et ont réussi à maintenir leurs processus apoptotiques, contrairement aux populations de *D. r. bugensis* qui étaient totalement dépassées.

Réponse à la transplantation

Dans le cadre de ce programme, le potentiel des deux espèces de dreissène à constituer de bons organismes modèles dans une démarche de biosurveillance active a également été exploré. La biosurveillance active, comme expliqué précédemment, consiste en la transplantation d'organismes depuis une population source vers un site que l'on souhaite suivre. Cette démarche a l'avantage de s'affranchir des contraintes liées à l'acclimatation et à l'adaptation des organismes modèles. Cependant, et nous y reviendrons, elle ne répond pas aux mêmes questions que la biosurveillance passive.

Une transplantation croisée entre 2 sites, pour chaque espèce, a été réalisée. Les sites ont été choisis sur la base de profils physico-chimiques et de profils de réponses biologiques très différents. L'objectif était de voir si, à l'issue de la période de transplantation, les réponses biologiques étaient (1) similaires aux organismes du site d'origine ou (2) similaires aux organismes du site de transfert.

Si l'hypothèse (1) est vérifiée, cela pourrait signifier que les mécanismes adaptatifs sont importants pour permettre, sur la durée du transfert, une acclimatation aux conditions environnementales du site de transfert, rendant de ce fait nos organismes inadéquats pour être des indicateurs fiables et honnêtes de l'état de santé de cet écosystème récepteur. Dans le cas contraire, c'est-à-dire si l'hypothèse (2) est vérifiée, alors la méthodologie de transplantation est pertinente pour réaliser une biosurveillance active.

L'originalité de notre démarche repose sur le fait de transférer nos organismes dans un écosystème où l'espèce est déjà présente, et ainsi d'avoir à notre disposition une référence pour valider les réponses obtenues lors du transfert.

Pour *D. polymorpha*, les 2 sites retenus sont le Canal de Jouy, à Metz, et la Meuse à Saint-Mihiel. Pour *D. r. bugensis*, les 2 sites retenus sont le canal de la Moselle à Metz et la Moselle à Liverdun (Figure 31). La transplantation a duré 28 jours, entre Avril et Mai 2017. Les paramètres suivis, à J0 et J28, sont la batterie de biomarqueurs présentée précédemment, les concentrations en contaminants internes aux organismes et le flux de contaminants métalliques auxquels ils ont été exposés, via l'installation de DGT¹⁴ (Diffusive Gel Thin Film) dans les milieux.

¹⁴ Les membranes DGT sont des échantillonneurs passifs - contenant une résine adsorbante, un gel de diffusion, et une membrane filtrante – permettant de capter la fraction labile des métaux circulant dans la colonne d'eau



Figure 31 : carte de localisation des sites d'origine et de transfert pour les 2 populations des 2 espèces de dreissenidés étudiées.

Aucune mortalité, ni aucune variation de l'indice de condition n'a été observée au cours de l'expérience. La transplantation et l'encagement ne semble ainsi pas affecter l'état de santé global des organismes.

Pour *D. polymorpha*, nous pouvons observer (Figure 32) que les réponses mesurées à J0 sur chacun des deux sites sont contrastées, essentiellement du fait de concentrations en triglycérides plus élevées sur le site de Saint Mihiel. Après 28 jours de transfert, nous voyons un fort décalage des ellipses vers la gauche du plan factoriel, associé à une augmentation des niveaux d'acide phosphatase et une diminution de la LDH, de la GST et des concentrations en protéines et en cholestérol. Ces modifications concernent tous les groupes, qu'il s'agisse d'organismes transplantés ou non. Les différences entre les populations natives sont maintenues pendant les 28 jours, et toujours expliquées principalement par les triglycérides. Si l'on s'intéresse aux individus transplantés, le patron n'est pas tranché. En effet, qu'il s'agisse des individus en provenance de Saint Mihiel ou de Montigny, nous pouvons observer une tendance des réponses biologiques à converger vers les réponses mesurées dans la population du site de transplantation, sans que cette transition ne soit complètement effective après 28 jours. Les réponses des individus transplantés se retrouvent finalement au milieu du gué, à égale distance des réponses mesurées sur leur site d'origine et sur le site de transplantation.

Deux explications peuvent cohabiter : soit la durée de 28 jours n'est pas suffisante pour permettre l'acclimatation des réponses mesurées aux nouvelles conditions environnementales, ce qui est toutefois contradictoire avec les connaissances déjà acquises sur cette espèce modèle en écotoxicologie, et notamment sur les expérimentations d'exposition court terme à des contaminants, pendant lesquelles les réponses se mettent en place en quelques jours.

L'autre explication, qui nécessiterait des investigations supplémentaires, est que les gammes de variation des biomarqueurs au sein de chaque population ne sont pas identiques : elles se chevauchent en partie, ce qui explique les similitudes entre individus transplantés après 28 jours, mais les réponses ne sont pas assez plastiques pour converger totalement.

Enfin, nous ne pouvons pas exclure que les conditions physico-chimiques rencontrées sur les différents sites ne sont pas assez tranchées pour nécessiter la mise en place de mécanismes nouveaux chez les organismes transplantés, ce qui soulève la question de la sensibilité de cette méthodologie.

L'ensemble de ces observations est également valable pour *D. r. bugensis*.

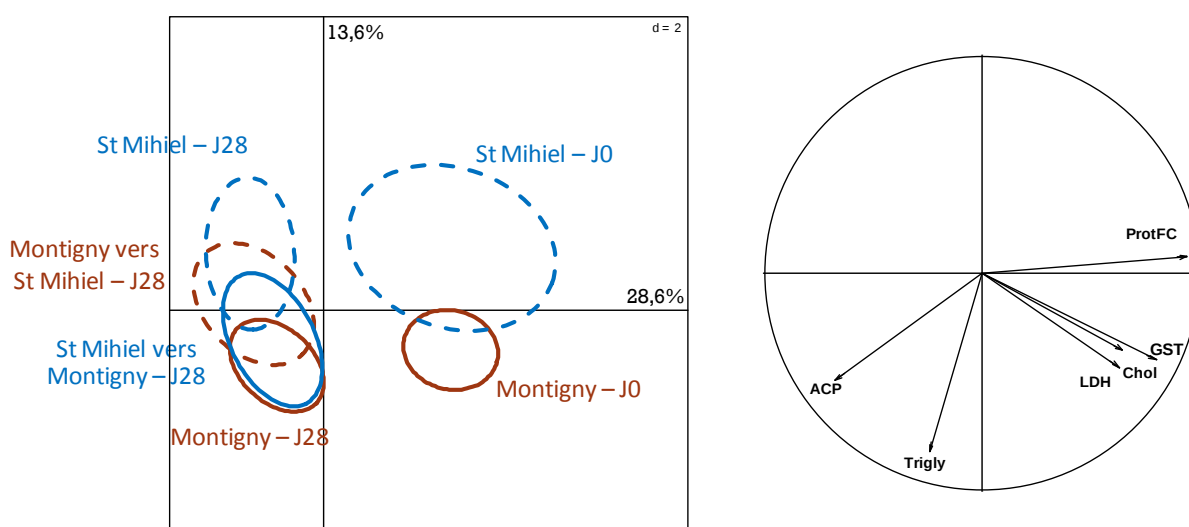


Figure 32. Plan factoriel et cercle des corrélations issues de l'analyse en PLS-DA sur les données de transplantation de *D. polymorpha* entre Saint-Mihiel et Le canal de Jouy à Montigny-les-Metz.

Un autre volet inclus dans cette expérimentation est la capacité de chaque espèce à refléter, dans un contexte de biosurveillance active, les concentrations en contaminants biodisponibles. Il s'agit ici de comparer la quantité de contaminants accumulés par les organismes avec les concentrations retrouvées dans les films DGT et dans les sédiments. L'ensemble de ces données sont résumées dans le tableau XIII.

Les analyses statistiques n'ont montré que peu de variations entre les concentrations initiales et finales des différents métaux chez les deux espèces, ainsi qu'entre les états initiaux des différentes populations. Cela soulève de nouveau les questions de la pertinence du choix des sites et de la sensibilité de notre outil, auxquelles seules de nouvelles investigations pourraient répondre.

Tableau XIII. Synthèse des données de contamination métalliques lors de l'expérience de transplantation croisée. Les lignes T0 et T28 se réfèrent aux concentrations accumulées par les organismes au démarrage et à l'issue des 28 jours de transplantation. Il s'agit des moyennes de 3 à 5 organismes, exprimées en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec. La ligne DGT correspond à la moyenne des concentrations en $\mu\text{g.L}^{-1}$ obtenue sur 3 films. La concentration dans les sédiments correspond à la concentration en mg.kg^{-1} de poids sec de sédiments sur la fraction 2mm.

		<i>D. polymorpha</i>				<i>D. r. bugensis</i>			
		Montigny --> Montigny	Montigny --> Saint-Mihiel	Saint-Mihiel --> Saint-Mihiel	Saint-Mihiel --> Montigny	Montigny --> Montigny	Montigny --> Liverdun	Liverdun --> Liverdun	Liverdun --> Montigny
Co	T0	<LQ	<LQ	0,70	0,70	4,66	4,66	<LQ	<LQ
	T28	<LQ	0,60	0,60	0,74	2,93	3,03	0,75	0,98
	DGT	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
	Sédiment	0,003	0,01	0,01	0,003	0,004	0,01	0,01	0,004
Cr	T0	0,80	0,80	1,27	1,27	5,44	5,44	2,90	2,90
	T28	0,26	0,28	1,30	1,07	3,05	2,63	1,10	3,20
	DGT	4,50	4,77	4,77	4,50	4,67	4,93	4,93	4,67
	Sédiment	0,08	0,05	0,05	0,08	0,11	0,06	0,06	0,11
Fe	T0	182,88	182,88	416,30	416,30	3073,28	3073,28	1522,12	1522,12
	T28	119,62	224,43	474,00	836,00	1824,35	1598,05	758,75	1587,53
	DGT	118,67	246,67	246,67	118,67	434,67	668,00	668,00	434,67
	Sédiment	18,35	22,88	22,88	18,35	16,72	12,76	12,76	16,72
Mn	T0	22,64	22,64	16,00	16,00	1590,72	1590,72	91,24	91,24
	T28	16,60	17,10	28,70	36,06	2042,55	2363,53	340,74	344,20
	DGT	55,03	59,80	59,80	55,03	127,20	2577,68	2577,69	127,20
	Sédiment	0,48	0,21	0,21	0,48	0,26	0,12	0,12	0,26
Ni	T0	3,33	3,33	4,76	4,76	27,94	27,94	5,00	5,00
	T28	<LQ	3,80	6,93	5,85	12,90	5,40	2,67	4,80
	DGT	27,15	37,03	37,03	27,15	41,70	26,17	26,17	41,70
	Sédiment	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
As	T0	2,98	2,98	1,66	1,66	4,02	4,02	2,88	2,88
	T28	2,68	1,85	1,30	1,52	2,58	3,70	2,00	1,83
	DGT	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	Sédiment	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Pb	T0	0,50	0,50	0,38	0,38	3,74	3,74	1,86	1,86
	T28	0,38	0,35	0,80	0,94	3,40	3,48	1,06	2,40
	DGT	8,13	2,20	2,20	8,13	2,27	1,87	1,87	2,27
	Sédiment	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03

Conclusion

Ce chapitre regroupe l'ensemble des résultats obtenus *in situ*, et les données de caractérisation des sites et de réponses des organismes constituent une base de travail pour les expérimentations qui ont été réalisées en laboratoire.

Dans le contexte du déploiement à large échelle des biomarqueurs chez les dreissenidés, les résultats nous permettent de lister les points de vigilance suivants :

L'identification de l'espèce (*D. polymorpha* ou *D. r. bugensis*) doit être réalisée avec certitude, puisque les réponses des deux espèces utilisées ici sont clairement différentes, peu importe la saison, la physico-chimie du milieu, le site d'origine et son état de contamination.

Pour les deux espèces, la saison de prélèvement ne semble pas importante dans le contexte d'une étude sur plusieurs sites, puisque les patrons de réponses sont stables d'une saison à l'autre.

Dans tous les cas, la variabilité saisonnière des niveaux de réponse ne permet pas, pour l'heure, une interprétation « absolue » de la mesure, hors référentiel.

Toujours concernant la saison, nous préconisons d'éviter l'hiver (février ici), saison pendant laquelle la dispersion des réponses est moindre, et donc la discrimination des sites plus ardue (la contrainte environnementale à cette période de l'année canalise les réponses)

Il existe des différences inter-populationnelles au niveau des réponses des biomarqueurs, qui sont plus marquées en automne (octobre) qu'en hiver (février).

Les réponses des biomarqueurs chez *D. r. bugensis* peuvent renseigner sur la contamination des sédiments par les HAP et les métaux, mais pas par les PCB. En revanche les réponses des biomarqueurs chez *D. polymorpha* reflètent assez mal la contamination sédimentaire.

Les réponses des biomarqueurs sont capables de refléter l'accumulation des contaminants par les organismes ; pour *D. polymorpha*, ce sont quelques métaux qui sont concernés ; pour *D. r. bugensis* ce sont plutôt les contaminants organiques (HAP et PCB).

L'accumulation des PCB par *D. r. bugensis* reflète bien la contamination sédimentaire pour ces composés ; pour *D. polymorpha* ce sont plutôt les HAP.

Certains biomarqueurs, comme l'ETS, l'ACP, la GST et la TAC semblent mieux refléter la contamination sédimentaire et l'accumulation des contaminants par les organismes

L'heure de prélèvement n'influence pas la valeur des biomarqueurs, et n'est donc pas une contrainte dans les programmes de biosurveillance.

En définitive, *D. r. bugensis* semble avoir des réponses plus plastiques et serait plus apte à refléter la contamination du milieu que *D. polymorpha*. L'accumulation des contaminants organiques (lipophiles) par les organismes reflète bien leur présence dans les sédiments. Pour les métaux, ce seront plutôt les biomarqueurs qui seront indicateurs de leur présence.

Les deux espèces présentent des réponses différentes, qu'il est nécessaire d'intégrer dans les campagnes de biosurveillance.

La contamination des sites n'explique pas totalement les différences inter-populationnelles observées au sein d'une espèce donnée. C'est pourquoi une autre partie des travaux, présentée dans le chapitre 4, s'est focalisée sur la tolérance et les capacités de modulation des biomarqueurs dans certaines de nos populations.

Variabilité des biomarqueurs *in situ*

A RETENIR

- De nombreux facteurs de variabilité influencent les réponses des biomarqueurs : variabilité saisonnière, inter-annuelle, inter-spécifique, inter-populationnelle, intra-site
- La distinction entre les deux espèces doit être réalisée avec certitude
- Les patrons de réponse sont stables d'une saison à l'autre mais la collecte de données intégrant les paramètres du milieu est nécessaire pour construire des grilles d'interprétation fiables des réponses biologiques en fonction des périodes de prélèvement
- L'heure de prélèvement, en automne, n'influence pas les réponses des biomarqueurs
- Les biomarqueurs reflètent bien la contamination sédimentaire et l'accumulation des contaminants dans les tissus mous pour *D. r. bugensis* ; la relation est moins nette pour *D. polymorpha*
- L'accumulation des contaminants organiques dans les tissus mous reflète bien la contamination sédimentaire pour ces composés ; la relation est moins nette pour les métaux
- Les populations de *D. polymorpha* ont une meilleure tolérance à un stress aigu au nickel que les populations de *D. r. bugensis*, expliquée par la contamination sédimentaire (nickel notamment) des sites d'origine des organismes
- Les populations de *D. polymorpha* sont plus hétérogènes, aussi bien dans leurs capacités de tolérance qu'au niveau des réponses des biomarqueurs, que les populations de *D. r. bugensis*
- Les réponses des biomarqueurs chez les deux espèces peuvent être influencées par la température du milieu et la disponibilité en nourriture, qui vont agir sur l'activité de filtration, l'accumulation des contaminants et l'activité métabolique
- Ces différents points mis en parallèle pourraient indiquer que les populations de *D. r. bugensis*, arrivées plus récemment, présenteraient des capacités d'acclimatation physiologique similaires entre populations, qui leur permettraient de survivre *in situ*, mais seraient insuffisantes lors d'expositions à des stress plus intenses. A l'inverse, *D. polymorpha* est installée depuis beaucoup plus longtemps : chaque population a pu s'adapter génétiquement aux conditions environnementales locales, ce qui expliquerait les différences observées entre populations

Etude intégrée de toutes les données acquises

Ce chapitre constitue une analyse globalisée des différents résultats obtenus durant ces trois années de travaux. Cette partie apportera des éléments de réponse aux livrables attendus dans le cadre du projet BIOMICS, à savoir combien et quels biomarqueurs sélectionner dans une démarche de biosurveillance ? Quel échantillon minimal d'organismes est nécessaire pour s'assurer d'une bonne représentativité des résultats ? Et au final, peut-on établir une gamme de variation des biomarqueurs en dehors de laquelle on pourra considérer que le milieu présente un danger pour les organismes ? Nous verrons également si un écart par rapport aux valeurs de référence mesurées *in situ* est indicateur d'une modification de la contamination du milieu.

Effort de prélèvement des organismes

Un point clé des études en écotoxicologie, lié à la lourdeur expérimentale de la mesure des biomarqueurs et à la quantité de tissus nécessaire à leur mesure, est le nombre d'individus, ou plus généralement de réplicats, nécessaires à la mesure de chaque biomarqueur. Un trop faible nombre de réplicats remet en effet en cause la validité des patrons de réponses révélés. Un compromis devait alors nécessairement être trouvé entre un grand nombre de biomarqueurs, sur peu d'individus, ou peu de biomarqueurs sur de nombreux individus. L'utilisation d'un automate de dosage nous a permis de lever l'un des verrous expérimentaux, en permettant de doser plus d'une dizaine de variables biologiques sur un seul individu, laissant le champ libre à une augmentation du nombre d'individus étudiés.

La question de la représentativité de notre échantillon expérimental par rapport à la taille de la population se pose alors. Nous avons de ce fait cherché à déterminer le nombre d'individus nécessaire pour obtenir une réponse pertinente par rapport à la population étudiée. Cette démarche n'a pas été appliquée à toutes les populations étudiées, mais seulement à 2 populations de *D. polymorpha* et 3 populations de *D. r. bugensis*. Sur ces 5 populations, un effort d'échantillonnage important a été effectué (de 20 à 36 individus selon la population). La batterie de 13 biomarqueurs a été mesurée pour chacun d'entre eux.

Pour définir la taille minimale permettant de limiter les erreurs liées à la variabilité au sein de chaque population, nous avons produit 2 échantillons aléatoires de n individus parmi les N prélevés, n allant de 3 (taille minimale requise pour un échantillon) à N . Ces 2 échantillons sont comparés par un test t , et la procédure est répétée 100 fois pour chaque valeur de n .

Tableau IXIV : Synthèse du nombre de différences significatives entre sous-échantillons aléatoires tirés au sort au sein de chaque population, pour différentes valeurs de n . Les valeurs rencontrées dans le tableau peuvent se lire comme des pourcentages d'erreur, la méthode de sous-échantillonnage ayant été répétée 100 fois pour chaque valeur de n et pour chaque biomarqueur

	n	Protéines (broyat)	Protéines cytosoliques	Triglycérides	Cholestérol	ETS	LOOH	AcP	GST	TAC	LDH	CSP
ZM	3	4	1	1	1	5	0	0	0	1	5	2
Montigny -	6	3	1	2	1	3	2	0	1	4	7	4
Canal de Jouy	10	4	1	2	5	1	0	1	2	0	1	2
ZM	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Saint-Mihiel	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QM	3	2	0	1	3	4	1	4	3	3	6	1
Montigny -	6	2	0	4	6	0	2	4	2	1	5	1
Canal de Jouy	10	2	1	1	1	0	0	4	1	0	2	0
QM	3	2	1	1	1	0	5	4	1	3	6	3
Saint-Mihiel	6	1	2	4	2	0	2	2	5	0	3	2
	10	2	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0
QM	3	1	0	2	1	2	1	2	1	2	2	2
Montigny -	6	0	0	0	2	1	1	3	2	2	3	0
Canal de Metz	10	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0

Le Tableau IXV présente le nombre de fois où le test t a mis en évidence une différence significative entre les 2 sous-échantillons aléatoires, pour certaines valeurs de n seulement. Il illustre l'hétérogénéité de la variabilité intra-populationnelle : ainsi, pour *D. polymorpha*, nous pouvons voir que, même pour $n = 10$, certaines erreurs peuvent subsister, conduisant à établir une différence de réponse entre échantillons provenant de la population de Montigny - Canal de Jouy (pour le cholestérol, cette erreur se produit dans 5% des cas, qui est l'erreur maximale admissible), alors que pour la population de la même espèce prélevée à Saint-Mihiel, aucune erreur n'a pu être mise en évidence, même avec $n = 3$. Les mêmes patrons de réponse sont identifiés pour *D. r. bugensis*, avec toutefois une plus grande stabilité des réponses, et toujours la population de Montigny - Canal de Jouy, qui présente la variabilité la plus élevée.

Cette première étape nous a cependant permis d'établir qu'un n compris entre 8 et 10 était généralement suffisant pour rendre compte de la réponse moyenne de la population. Par précaution, nous avons utilisé $n = 10$ à $n = 12$ durant nos expérimentations.

Discussion autour de l'exploration des données

Nous avons vu ici que lorsqu'on considérait la réponse globale des organismes, en intégrant simultanément tous les biomarqueurs, il était difficile de distinguer un patron net entre les réponses naturelles des organismes dans leur milieu et leurs réponses en cas de stress. Il semble toutefois que ce soit possible pour certaines populations, qu'il serait nécessaire de caractériser.

Nous avons vu également que les relations entre biomarqueurs changeaient lorsque l'intensité du stress croissait, sans pour autant réussir à identifier un patron de réponse clair. C'est vrai pour la batterie de biomarqueurs que nous avons sélectionnés ici, mais le remplacement ou l'ajout de certains marqueurs pourraient peut-être améliorer ces liens entre réponses biologiques.

Certains biomarqueurs pris individuellement présentent malgré tout un bon potentiel en tant qu'indicateurs de stress : l'ACP principalement, la LDH et la TAC si elles sont mesurées hors période de reproduction, la GST pour *D. polymorpha*, et l'ETS et LOOH pour *D. r. bugensis*. Ce sont d'ailleurs généralement ces marqueurs qui s'expriment lors des différentes expérimentations réalisées.

La biosurveillance à l'aide de paramètres écologiques (abondance, densité, biodiversité) permet de caractériser l'état des écosystèmes impactés mais manque de capacités prédictives (Martinez-Haro et al., 2015). Depuis leur description dans les années 90, les biomarqueurs, qui permettent d'identifier les stressseurs avant que des changements aux niveaux supérieurs n'apparaissent, gagnent en crédibilité et leur utilisation est de plus en plus recommandée (Besse et al., 2012 ; Wernersson et al., 2015). En focalisant sur des niveaux plus bas, à l'aide d'approches multibiomarqueurs au niveau sub-individuel, on peut caractériser la nature des stress (oxydatif, immunologique, cytotoxique...) à des concentrations sublétales, et évaluer la contamination chimique de façon anticipée, avant que les communautés ne soient affectées (Hanson, 2011). Toutefois, il est difficile d'attribuer à une réponse cellulaire une valeur écologique et ils sont constamment remis en question pour leur manque de pertinence. Leur application est pour le moment beaucoup plus développée en milieu marin que continental, où elle a permis de développer des outils opérationnels pour le suivi des milieux présentés ci-après (Burgeot et al., 2017 ; Vethaak et al., 2017).

L'influence de facteurs confondants sur les biomarqueurs, qui complique l'interprétation des résultats et limite leur efficacité, doit être prise en compte. Une des méthodes possible passe par l'utilisation d'analyses statistiques permettant de standardiser l'influence des facteurs confondants et de développer des modèles prédictifs pour définir un niveau de base représentatif de conditions de référence (Artigas et al., 2012). L'OSPAR (Convention pour la protection du milieu marin de l'Atlantique Nord Est) et l'ICES (International Council for the Exploration of the Sea, ou CIEM en français) ont proposé une méthode pour établir ces gammes de référence, via l'établissement de critères d'évaluation appelés BAC (Background Assessment Concentration) et EAC (Environmental Assessment Criteria) pour définir la qualité de l'environnement marin (OSPAR, 2009). Cette méthode

fonctionne en définissant la plage de valeurs attendues dans un site de référence en tant que BAC¹⁵ et les valeurs en dehors de cette plage en tant que EAC¹⁶. Pour établir avec succès le BAC et l'EAC, il est recommandé de recueillir des organismes sur un site de référence pendant au moins deux cycles saisonniers afin d'établir l'influence des facteurs de confusion chimiques et physiques lors de la mesure des biomarqueurs et de faciliter l'identification des sites pollués (OSPAR, 2009). Pour établir avec succès ces niveaux de base, il est également nécessaire de caractériser les différences maximales entre sites (Hanson, 2011) et de sélectionner des espèces sentinelles reconnues, l'idée étant de fournir un modèle permettant d'établir un niveau de base pour le biomarqueur sélectionné en prenant en compte l'influence de facteurs confondants (Barrick et al., 2016).

Dans notre cas, pour rendre cette approche pertinente, il faudrait appliquer les critères établis pour les BAC et les EAC cités précédemment en augmentant considérablement le nombre de sites échantillonnés et en réalisant des suivis mensuels. Cette démarche d'observation, menée sur le long terme, fait encore cruellement défaut dans les milieux d'eau douce.

Pour implémenter les biomarqueurs dans les campagnes de biosurveillance, il est aussi nécessaire de définir quantitativement des seuils de variation naturelle. Certains biomarqueurs, sont très variables et très dépendants des facteurs externes, et leur implémentation ne sera peut-être possible qu'à l'échelle locale plutôt qu'à l'échelle continentale voir planétaire. Les approches par biomarqueur sont généralement concentrées sur la standardisation et le contrôle de la variabilité, en sélectionnant des organismes de même taille ou de même génotype, afin d'avoir des données comparables entre sites (Durou et al., 2007). Cette approche restreinte à un sous-ensemble de la population peut ne pas refléter l'ensemble des réponses possibles au sein de la population globale (Calow, 1996 ; Devin et al., 2014b). Il est donc nécessaire d'adapter les campagnes d'échantillonnage, afin d'appréhender cette variation et de créer des gammes de référence écologiquement pertinentes (Handy et al., 2003). Il faut également identifier en amont les besoins et objectifs réels afin d'utiliser des méthodologies adaptées au questionnement. Ainsi, en caractérisant la gamme de variation d'un biomarqueur au sein d'une population, on peut déterminer un seuil au-delà duquel la population est considérée en danger (Adams et al., 2001) ; en utilisant de multiples sites de référence, on peut définir une gamme de variation attendue pour les sites propres, et identifier rapidement un site à risque qui sortirait de cette gamme dite de référence.

Certains biomarqueurs, appelés « core biomarkers », ont été sélectionnés pour leur pertinence et leur efficacité aussi bien en laboratoire qu'*in situ* chez différents types d'organismes en milieu marin. Pour les moules (*Mytilus sp.*), l'utilisation des métallothionéines, de la stabilité lysosomale et de l'histopathologie sont recommandées (Davies et Vethaak, 2012). Pour ces biomarqueurs, des BAC et des EAC sont disponibles (Davies et Vethaak, 2012 ; OSPAR, 2009) et on connaît relativement bien

¹⁵ BAC : estimés à partir de données issues de régions éloignées ; permettent d'évaluer si une concentration dépasse ou non un contexte naturel

¹⁶ EAC : dérivés de données toxicologiques et indiquant un effet subléthal

l'influence des facteurs confondants sur leur réponse. Malgré cela, même si les effets de certains contaminants à travers les différents niveaux d'organisation biologiques sont connus (grâce au développement de l'AOP ou Adverse Outcome Pathway, Ankley et al., 2010), les valeurs quantitatives sont rares et les EAC ne fournissent des valeurs que pour un nombre restreint d'espèces et de contaminants. De plus, elles ne constituent pas de limites légales contrairement aux NQE.

Pour évaluer l'état de santé d'un écosystème, il est indispensable de comprendre ce que signifie une modification de la valeur d'un biomarqueur. Une modification de cette valeur est indicatrice d'un stress pour l'organisme, mais en terme de biosurveillance, il est indispensable de comprendre la nature et l'intensité de ce stress, la façon dont les individus sont affectés (mise en place de mécanismes de défense, dommages), et les impacts au niveaux supérieurs. Dans le cadre de l'utilisation des biomarqueurs pour la biosurveillance des eaux douces, il semble nécessaire d'améliorer la détermination des EAC et de développer les AOP.

Etude approfondie des données acquises

A RETENIR

- Il faut un minimum de 8 individus pour rendre compte de la réponse moyenne de la population
- Selon le site considéré, les réponses des organismes sur le terrain et exposés en laboratoire peuvent être similaires (Saint Mihiel), ou différentes (Montigny). Si l'on considère tous les sites simultanément, la distinction entre réponses sur le terrain et réponses en laboratoire n'est pas possible
- Pour le site le plus documenté (Montigny) le passage en laboratoire semble être un facteur déterminant dans la réponse des organismes, pouvant masquer l'effet d'une exposition à des stressseurs de faible intensité.
- L'effet saisonnier est encore mis en évidence, puisqu'une population donnée peut être considérée comme stressée ou non *in situ* selon la saison
- Pour les deux espèces, la TAC et la LDH semblent jouer un rôle dans la réponse au stress
- Les réseaux de corrélation ne montrent pas de patron de réponse clair des biomarqueurs lorsqu'on passe d'une situation non-stressante à une situation stressante
- Ils ne permettent pas non plus de mettre en évidence un mode d'action spécifique des stressseurs sur les biomarqueurs
- L'absence de patron commun à toutes les typologies souligne (1) que la redondance entre biomarqueurs d'un même système (antioxydant par exemple) peut n'être vraie que dans des conditions d'exposition bien particulières et que par conséquent (2) chaque biomarqueur pouvant être amené à répondre indépendamment des autres à un stress particulier, l'utilisation d'une batterie est une nécessité

Discussion générale

Pour rappel, l'objectif de nos travaux était d'identifier les rôles relatifs des paramètres physico-chimiques des milieux aquatiques, des pressions anthropiques et des caractéristiques des populations sur les réponses des biomarqueurs des deux espèces, *D. polymorpha* et *D. r. bugensis*. Le but était d'évaluer leur potentiel à constituer des modèles en biosurveillance des milieux d'eau douce, en cherchant notamment à comprendre la signification des biomarqueurs en termes de sensibilité et de vulnérabilité des populations. Pour cela, une batterie de biomarqueurs représentatifs de grandes fonctions physiologiques, comme le métabolisme énergétique et les défenses antitoxiques et antioxydantes, a été suivie chez ces organismes. Des approches de surveillance passive *in situ* ont été menées afin d'évaluer les réponses des organismes dans leur environnement naturel, tout en intégrant un certain nombre de facteurs de variabilité (variabilité journalière, variabilité saisonnière, variabilité inter-spécifique, inter-populationnelle, intra-populationnelle). Des expérimentations en laboratoire ont permis d'approfondir les connaissances concernant les capacités de tolérance, et la modulation des réponses biologiques en conditions de stress contrôlé chez ces espèces.

Que faire de la variabilité naturelle des biomarqueurs ?

Comme nous avons pu le voir à travers les différents chapitres, les réponses des biomarqueurs (prises dans leur globalité, sous formes d'ACP ou de PLSDA) présentent une forte variabilité spatio-temporelle.

Un des facteurs de variabilité les plus importants que nous avons pu observer est lié à la saison. En effet, il a été constaté une variation des réponses en fonction de la saison chez plusieurs populations de *D. polymorpha*. Chez *D. r. bugensis*, l'influence de la saison existe aussi, même si elle reste moins marquée.

Outre les flux de contaminants, qui peuvent eux-mêmes être soumis à des variations saisonnières en lien avec le caractère saisonnier de certaines activités anthropiques, les variations saisonnières des réponses biologiques s'expliquent en partie par les fluctuations des facteurs environnementaux (e.g. température, salinité, oxygénation), ou encore des facteurs biotiques en lien avec la physiologie (taille, poids, sexe, statut reproducteur, statut énergétique) et l'écologie des organismes (parasitisme, prédation, compétition ; la prévalence parasitaire chez *D. polymorpha* suit par exemple une dynamique saisonnière (Minguez et Giambérini, 2012). Dans notre cas, il semble que

les biomarqueurs énergétiques et de défense (TAC, LDH, GST, ETS) soient également plus actifs en octobre par rapport aux autres dates de prélèvement, et ce pour les deux espèces.

Les variations saisonnières des réponses des biomarqueurs sont aussi étroitement liées aux facteurs biotiques, et notamment au cycle reproducteur. Faria et al. (2014) ont par exemple montré que le statut reproducteur dans différentes populations de *D. polymorpha* était fortement corrélé aux réponses de certains biomarqueurs (SOD, Cat, GSH, GST, MXR, LDH, peroxydation lipidique, cassures à l'ADN). Guerlet et al. (2007) ont aussi montré la saisonnalité des réponses biologiques chez *D. polymorpha*, en lien avec le cycle reproducteur, avec une augmentation de la teneur en lipides et de l'activité de filtration en période de reproduction, lorsque la température augmente. A un niveau d'organisation inférieur, l'évolution au fil des saisons du statut reproducteur des organismes entraîne aussi une modification du transcriptome chez *D. polymorpha* (Navarro et al., 2013).

Ces différentes études indiquent que les variations des biomarqueurs sont plus importantes au printemps et en été, avec une influence très importante de la température, du cycle reproducteur et de la disponibilité en nourriture. Même si l'été ne semble pas être la période la plus propice, il faudra envisager d'ajouter cette saison dans la poursuite des travaux pour mieux intégrer les modifications physiologiques que subissent les organismes à cette période.

La variabilité naturelle des biomarqueurs représente un des freins à leur utilisation en biosurveillance. En effet, le challenge consistant à identifier la variation liée à un stress toxique dans un ensemble de réponses naturellement fluctuantes reste à l'heure actuelle difficile à appréhender (Hanson et al., 2010). Plusieurs méthodes existent néanmoins, et cherchent à prendre en compte l'influence des facteurs environnementaux dans l'interprétation des biomarqueurs.

La biosurveillance active permet par exemple de limiter l'influence des facteurs biotiques intrinsèques : transplanter des individus d'une population source sur différents sites d'étude permet de standardiser les individus (sexe, taille, poids, statut reproducteur homogènes), de s'affranchir des phénomènes d'adaptation locale (puisque une seule et même population est utilisée), de contrôler la durée d'exposition des organismes. Toutefois, la mise en place de ce type d'approche est généralement plus complexe que l'approche passive et peut manquer de pertinence, dans la mesure où il n'y a pas de parallèle possible entre les réponses d'organismes transposés et celles d'organismes autochtones adaptés à leur environnement (Khan et al., 2011). L'utilisation de cette approche active n'est de plus pas envisageable de manière systématique pour les espèces invasives comme les dreissènes, dans la mesure où il est inconcevable de les introduire dans un milieu où elles ne sont pas déjà présentes. Dans ce cas, l'approche active doit se limiter aux milieux déjà colonisés. Enfin, comme nous l'avons montré, la durée de la phase de transplantation est délicate à définir, et une transplantation de 28 jours ne semble pas suffisante.

Pour intégrer les facteurs environnementaux, il est possible d'utiliser une approche amont-aval, qui fait l'hypothèse que les stations d'une portion de cours d'eau sont similaires en termes de paramètres physico-chimiques et diffèrent uniquement selon leur niveau de contamination. Ce type d'approche permet une biosurveillance ciblée, généralement réservée au suivi de l'impact d'une installation anthropique (zone agricole, agglomération, installation industrielle...) (Hanson, 2011).

D'aucun préconisent alors de définir des gammes de valeurs de référence qui prennent en compte cette variabilité spatio-temporelle (Hagger et al., 2008; Hanson et al., 2010) en faisant un suivi de plusieurs populations de référence à différentes saisons. Mais ces gammes sont généralement très variables (à cause de la grande variabilité des réponses des organismes), ce qui augmente le risque de faux négatifs (risque de ne pas détecter un impact alors qu'il y en a un). La stabilisation d'une gamme de référence nécessite d'intégrer un grand nombre de sites et de tenir compte de l'évolution constante des milieux en les actualisant régulièrement. De plus, pourquoi ne considérer que des populations de référence ? Nos travaux soulignent les différences de tolérance entre populations, et les différences qui peuvent exister en termes de réponses biochimiques d'une population à l'autre. Ignorer sciemment l'existence de populations plus tolérantes lors de l'établissement de ces gammes conduirait également à un biais.

A cette variabilité saisonnière s'ajoute une variabilité inter-annuelle, observée chez *D. polymorpha* et chez *D. r. bugensis* entre avril 2015 et avril 2016. Alors que la saisonnalité est souvent prise en compte, cette problématique de l'inter-annualité est trop rarement intégrée et les suivis de biomarqueurs sur plusieurs années consécutives sont assez rares, spécialement en eau douce. Dans notre cas, la conductivité était très différente pour les mois d'avril 2015 et 2016, en comparaison avec les autres dates d'échantillonnage, avec de fortes crues sur l'ensemble du territoire à ces deux périodes qui ont considérablement réduit la conductivité (à titre d'exemple sur les sites Mosellans, Montigny – canal de Jouy, Montigny – canal de Metz et Jouy, elle est passée de 1.5 psu en temps normal à 0.5 psu). Or, il a été montré que les variations de salinité pouvaient influencer les réponses des biomarqueurs (Bertrand et al., 2017). Les variations de température et de salinité peuvent être associées à une modification de la biodisponibilité des contaminants, couplée à une modification de l'activité des métallothionéines (Money et al., 2011).

Outre les facteurs de variabilité déjà identifiés et que l'on sait déterminants, la plupart des analyses statistiques réalisées sur les résultats obtenus *in situ* mettent en évidence une grande part de variance résiduelle non expliquée. Cette part de variabilité inexpliquée est en général supérieure à 60%, et n'est liée ni à l'espèce, ni au site de prélèvement, ni à la saison.

Cette instabilité des réponses d'une saison à l'autre et d'une année à l'autre souligne le besoin :

- d'acquérir des données sur le long terme sur les populations d'intérêt afin d'identifier des modifications ponctuelles des réponses ou au contraire des tendances temporelles
- de collecter systématiquement les données relatives aux paramètres du milieu pour construire des grilles d'interprétation intégrant ces facteurs à l'instant t
- d'intégrer le maximum de sites pour définir un patron de réponse stable et établir un gradient des sites les uns par rapport aux autres.

Si on se base sur les campagnes que nous avons réalisées, le tableau Tableau X représente le coût que pourrait engendrer ce type de campagne à large échelle et sur le long terme. Si on imagine réaliser des suivis complets, sur 30 populations, tous les deux mois pendant 3 ans, on aboutit à un budget de 731 036 euros, qui n'inclue pas les salaires des personnes impliquées, uniquement les frais de fonctionnement. Ce budget est conséquent à l'échelle d'un seul laboratoire ou bureau d'étude, et souligne l'importance du travail en collaboration pour mutualiser les financements, les moyens humains et techniques, et rentabiliser au mieux les échantillonnages sur de larges échelles spatiales et temporelles. Ce budget initial est celui qui serait nécessaire pour développer et mettre au point l'outil, jusqu'à un stade opérationnel. Son déploiement en tant qu'indicateur serait nettement moins coûteux, dans la mesure où l'objectif est d'obtenir avec l'outil biomarqueur des informations sur la contamination du milieu, des organismes et sur le risque pour l'écosystème.

Tableau X: Estimation des frais de fonctionnement pour une campagne à large échelle (30 populations, à raison de 12 organismes par population), sur le long terme (3 ans, à raison d'un échantillonnage tous les 2 mois)

	15 sites, 1 campagne	30 sites, 18 campagnes
Bioaccumulation dans les organismes	3 800 €	136 800 €
Contamination sédimentaire	4 500 €	162 000 €
Frais d'essence	200 €	7 200 €
Hotel, restauration pour 2 personnes	1 100 €	39 600 €
Automate de mesure	65 000 €	65 000 €
Biomarqueurs (matériel, amortissement machine)	8 901 €	320 436 €
TOTAL	83 501 €	731 036 €

Peut-on, à l'heure actuelle, utiliser les biomarqueurs chez ces espèces dans un contexte de surveillance des milieux ?

La variabilité des réponses que nous avons mise en évidence dans ces travaux n'est généralement pas le premier facteur incriminé quand il s'agit de l'utilisation des biomarqueurs. On leur reproche plutôt leur manque de pertinence écologique, ou la difficulté d'extrapoler aux niveaux supérieurs à partir de mesures individuelles. En règle générale, on essaye de réduire au maximum la variabilité des réponses biologiques, qui est considérée comme un « bruit ». Néanmoins, cette variabilité existe et vouloir la réduire à tout prix n'est pas forcément pertinent, puisqu'elle englobe par essence l'ensemble des réponses possibles au sein de la population. En sélectionnant un échantillon d'individus calibrés, de même taille, de même sexe, ou de même stade de vie, on peut surestimer ou sous-estimer la tolérance de la population dans son ensemble, d'autant plus que cette tolérance varie de façon spatio-temporelle. Prélever un échantillon représentatif de la population dans son ensemble aboutit à des résultats plus complexes, mais aussi plus réalistes, permettant d'aborder les conséquences aux échelles supérieures avec plus de fiabilité. C'est pourquoi nous avons fait le choix d'exploiter l'information contenue dans la variabilité intra- et inter-populationnelle, généralement négligée (Devin et al., 2014b).

Nos résultats ont permis d'établir que les populations et les espèces réagissent à plusieurs stressseurs dans le même sens, ce qui paraît avantageux en biosurveillance. En revanche, ces résultats montrent aussi que les niveaux de base diffèrent (entre espèces et entre populations), et qu'il serait difficile d'établir un intervalle de réponses « de référence » en dehors duquel les populations étudiées pourraient être considérées comme stressées. En définitive, les biomarqueurs ne seraient pas applicables en l'état pour une approche ponctuelle (évaluer la qualité d'un site donné à l'instant *t* par rapport à une gamme dite de référence), mais pourraient être utilisables dans le cadre d'une approche comparative incluant plusieurs sites, pour déterminer un gradient de qualité des sites les uns par rapport aux autres ; c'est d'ailleurs dans ce sens qu'ils sont utilisés en milieu marin, pour lequel une certaine structuration des méthodes de biosurveillance a déjà été mise en place (Burgeot et al., 2017).

Malgré l'évidente différence entre les deux espèces, et entre les populations, nous n'avons pas pu mettre en lumière de patron de réponse clair des biomarqueurs lorsqu'on passe d'une situation non-stressante à une situation stressante, ni de mode d'action spécifique des stressseurs sur les biomarqueurs. L'absence de patron commun à toutes les typologies souligne (1) que la redondance entre biomarqueurs d'un même système (antioxydant par exemple) peut n'être vraie que dans des conditions d'exposition bien particulières et que par conséquent (2) chaque biomarqueur pouvant être amené à répondre indépendamment des autres à un stress particulier, l'utilisation d'une batterie est une nécessité.

Selon les populations considérées, les réponses des organismes sur le terrain et exposés en laboratoire peuvent être similaires (Saint Mihiel), ou différentes (Montigny). Si l'on considère tous les sites simultanément, la distinction entre réponses sur le terrain et réponses en laboratoire n'est pas possible. Ces résultats soulignent à nouveau la nécessité de caractériser chacun des sites de prélèvement, et de connaître les patrons de réponse des populations qui y vivent. Pour le site le plus documenté au cours de ces travaux (Montigny), le passage en laboratoire semble être un facteur déterminant dans la réponse des organismes, qui masque même l'effet de stress faible par rapport aux témoins. Malgré tout pour les deux espèces, la TAC et la LDH, qui sont respectivement indicatrices des capacités antioxydantes et d'un syndrome de stress général des organismes, semblent jouer un rôle majeur dans la réponse au stress.

L'accumulation des contaminants dans les tissus mous et les réponses des biomarqueurs, notamment chez *D. r. bugensis*, peuvent traduire l'état de contamination du milieu, notamment pour les contaminants organiques. L'établissement de ce type de lien nécessite de caractériser la qualité des sites à chaque campagne car la contamination des sites montre des variations annuelles.

Le recours à une batterie de biomarqueurs permet d'intégrer l'impact de la contamination dans son ensemble en y associant les autres facteurs de stress. Toutefois, l'augmentation du nombre de réponses mesurées augmente également la complexité de l'interprétation conjointe de ces mesures. Outre les outils de statistiques multivariées qui permettent de décrire et visualiser des jeux de données complexes, des outils intégrateurs sont également essentiels, à la fois pour résumer l'ensemble des mesures dans une réponse simple et synthétique et pour faciliter le transfert de ces outils vers les gestionnaires (Hagger et al., 2008). Parmi les outils proposés pour répondre à ce besoin, l'Integrated Biomarker Response (IBR ; Beliaeff et Burgeot, 2002 ; Devin et al., 2014a) est une méthode prometteuse qui offre à la fois une synthèse graphique des réponses des différents biomarqueurs et une valeur numérique qui intègre toutes ces réponses. Des étapes préliminaires à l'utilisation d'indices sont généralement nécessaires, afin de sélectionner les réponses les plus pertinentes et les plus riches en informations. Ces étapes permettent aussi de rechercher les liens entre un contaminant (ou une famille de contaminants) et une réponse biologique particulière. Dans notre cas, l'IBR semble pouvoir refléter la qualité des sites, mais dans des conditions très particulières. Bien que cet outil synthétique vienne appuyer les conclusions obtenues quant à la qualité des sites, l'interprétation de la réponse des biomarqueurs pris individuellement reste de mise, dans la mesure où ils permettent de comprendre plus précisément les mécanismes de réponse des organismes soumis à des conditions stressantes.

Conclusion générale et perspectives

Les résultats obtenus au cours de ces travaux ont permis d'interroger les notions de sensibilité et de vulnérabilité des populations et de mieux comprendre les facteurs déterminant les réponses biologiques des organismes confrontés à des stressseurs. Les différences inter-populationnelles montrent que l'accumulation des contaminants par les organismes et leurs réponses biologiques sont bien dépendantes de la qualité du biotope propre à chaque population, mais aussi de la saison, un facteur certes naturel mais confondant qui doit donc être pris en compte dans l'analyse des biomarqueurs lors de campagnes de biosurveillance. A l'ère de l'anthropocène, on peut aussi considérer que les polluants chimiques sont devenus une variable comme une autre de nos écosystèmes, et qu'ils peuvent être intégrés en tant que facteur de variabilité supplémentaire.

Ces travaux montrent que les deux espèces étudiées sont aptes à nous renseigner sur l'état de contamination du milieu dans lequel elles vivent, même si les grilles d'interprétation peuvent être différentes de l'une à l'autre. Les variations des réponses des biomarqueurs au niveau sub-cellulaire témoignent de façon précoce de modifications de la qualité du milieu. Certains biomarqueurs semblent toutefois plus informatifs que d'autres, la batterie mesurée pourrait donc être réduite. A l'avenir, ces travaux permettront une meilleure lecture et interprétation des biomarqueurs mesurés dans des populations autochtones ou transplantées, et attestent de l'intérêt des biomarqueurs en tant qu'outils d'évaluation de la qualité des milieux aquatiques.

Des suivis sur le long terme sont nécessaires, et pourraient être mis en place *via* des systèmes d'observatoires pérennes. Pour cela, il serait nécessaire d'augmenter le nombre de sites de prélèvement, d'étendre les dates d'échantillonnage sur plusieurs années et de travailler sur des sites les plus contrastés possibles, moyennant un coût et des besoins humains assez conséquents. Bien que la Directive Cadre-Stratégie pour le Milieu Marin ait été mise en application 8 ans après la Directive Cadre sur l'Eau, l'application des biomarqueurs en milieu marin est bien plus aboutie. On peut alors se demander pourquoi ce décalage existe, et s'il ne serait pas intéressant de travailler main dans la main, pour faire progresser simultanément l'utilisation de ces outils, pour les milieux marins et dulçaquicoles. Un autre enjeu majeur sera de se doter d'outils performants pour discriminer des sites au profil de contamination complexe, mais modérée. Le développement d'outil d'agrégation des données sera nécessaire pour favoriser le transfert vers les gestionnaires des milieux aquatiques.

Bibliographie

- Adams, S.M., Giesy, J.P., Tremblay, L.A., Eason, C.T., 2001. The use of biomarkers in ecological risk assessment: recommendations from the christchurch conference on biomarkers in ecotoxicology. *Biomarkers* 6, 1–6. doi:10.1080/135475001452724
- Allan, I., Vrana, B., Greenwood, R., Mills, G., Knutsson, J., Holmberg, A., Guigues, N., Fouillac, A., Laschi, S., 2006a. Strategic monitoring for the European Water Framework Directive. *Trends in Analytical Chemistry* 25, 704–715. doi:10.1016/j.trac.2006.05.009
- Allan, I., Vrana, B., Greenwood, R., Mills, G., Roig, B., Gonzalez, C., 2006b. A “toolbox” for biological and chemical monitoring requirements for the European Union’s Water Framework Directive. *Talanta* 69, 302–322. doi:10.1016/j.talanta.2005.09.043
- Allen, J.I., Moore, M.N., 2004. Environmental prognostics: Is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation? *Marine Environmental Research* 58, 227–232. doi:10.1016/j.marenvres.2004.03.119
- Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., 2015a. Conventional risk assessment of environmental contaminants, in: Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Mouneyrac, C. (Eds.), *Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks*. Academic Press, pp. 25–49.
- Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., 2015b. Quality standard setting and environmental monitoring, in: Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Mouneyrac, C. (Eds.), *Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks*. Academic Press, pp. 51–76.
- Amiard, J.-C., Caquet, T., Lagadic, L., 1998. Introduction - Les biomarqueurs parmi les méthodes d’évaluation de la qualité de l’environnement, in: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C., Ramade, F. (Eds.), *Utilisation de Biomarqueurs Pour La Surveillance de La Qualité de L’environnement*. Lavoisier, Paris, pp. XXI–XXXI.
- Amiard-Triquet, C., 2015. Introduction, in: Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Mouneyrac, C. (Eds.), *Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks*. Academic Press, pp. 1–23.
- Ankley, G.T., Bennett, R.S., Erickson, R.J., Hoff, D.J., Hornung, M.W., Johnson, R.D., Mount, D.R., Nichols, J.W., Russom, C.L., Schmieder, P.K., Serrano, J.A., Tietge, J.E., Villeneuve, D.L., 2010. Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 730–741. doi:10.1002/etc.34
- Arab, K., Steghens, J.-P., 2004. Plasma lipid hydroperoxides measurement by an automated xylenol orange method. *Anal. Biochem.* 325, 158–163. doi:10.1016/j.ab.2003.10.022
- Artigas, J., Arts, G., Babut, M., Caracciolo, A.B., Charles, S., Chaumot, A., Combourieu, B., Dahllöf, I., Despréaux, D., Ferrari, B., Friberg, N., Garric, J., Geffard, O., Gourlay-Francé, C., Hein, M., Hjorth, M., Krauss, M., De Lange, H.J., Lahr, J., Lehtonen, K.K., Lettieri, T., Liess, M., Lofts, S., Mayer, P., Morin, S., Paschke, A., Svendsen, C., Usseglio-Polatera, P., van den Brink, N., Vindimian, E., Williams, R., 2012. Towards a renewed research agenda in ecotoxicology. *Environmental Pollution* 160, 201–206. doi:10.1016/j.envpol.2011.08.011
- Baird, D.J., Burton, G.A. (Eds.), 2001. *Ecological variability: Separating natural from anthropogenic causes of ecosystem impairment*. SETAC Press, Pensacola, Florida.
- Balabaskaran, S., Chew, S., Segaran, M., 1986. Studies on glutathione S-transferase in molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 85, 183–192. doi:10.1016/0305-0491(86)90241-5
- Barrick, A., Châtel, A., Marion, J.-M., Perrein-Ettajani, H., Bruneau, M., Mouneyrac, C., 2016. A novel methodology for the determination of biomarker baseline levels in the marine polychaete *Hediste diversicolor*. *Marine Pollution Bulletin* 108, 275–280. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.04.056
- Bartram, J., Ballance, R. (Eds.), 1996. *Water quality monitoring: a practical guide to the design and implementation of freshwater quality studies and monitoring programmes*. E&FN Spon, London, UK.
- Beliaeff, B., Burgeot, T., 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 1316–1322. doi:10.1002/etc.5620210629
- Benedetti, M., Ciaprin, F., Piva, F., Onorati, F., Fattorini, D., Notti, A., Ausili, A., Regoli, F., 2011. A multidisciplinary weight of evidence approach for classifying polluted sediments: Integrating sediment chemistry, bioavailability, biomarkers responses and bioassays. *Environment International* 38, 17–28. doi:10.1016/j.envint.2011.08.003
- Benito, M., Mosteo, R., Rubio, E., LaPlante, D., Ormad, M.P., Goñi, P., 2017. Bioaccumulation of inorganic elements in *Dreissena polymorpha* from the Ebro River, Spain: Could zebra mussels be used as a bioindicator of the impact of human activities? *River Research and Applications* 33, 718–728. doi:10.1002/rra.3126

- Berthet, B., Leung, K.M.Y., Amiard-Triquet, C., 2011. Inter- and intraspecific variability of tolerance: implications for bioassays and biomonitoring, in: Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S., Roméo, M. (Eds.), *Tolerance to Environmental Contaminants*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 49–84.
- Bertrand, C., Devin, S., Mouneyrac, C., Giambérini, L., 2017. Eco-physiological responses to salinity changes across the freshwater-marine continuum on two euryhaline bivalves: *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana*. *Ecological Indicators* 74, 334–342. doi:10.1016/j.ecolind.2016.11.029
- Bervoets, L., Voets, J., Chu, S., Covaci, A., Schepens, P., Blust, R., 2004. Comparison of accumulation of micropollutants between indigenous and transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environmental toxicology and chemistry* 23, 1973–1983. doi:10.1897/03-365
- Besse, J.-P., Geffard, O., Coquery, M., 2012. Relevance and applicability of active biomonitoring in continental waters under the Water Framework Directive. *Trends in Analytical Chemistry* 36, 113–127. doi:10.1016/j.trac.2012.04.004
- Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Priadi, C., Ayrault, S., Tusseau-Vuillemin, M.-H., 2011. Bioavailability of particulate metal to zebra mussels: Biodynamic modelling shows that assimilation efficiencies are site-specific. *Environmental Pollution* 159, 3381–3389. doi:10.1016/j.envpol.2011.08.034
- Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Vincent-Hubert, F., Palais, F., Geffard, A., Biagianti-Risbourg, S., Pain-Devin, S., Tusseau-Vuillemin, M.-H., 2010. Lessons from a transplantation of zebra mussels into a small urban river: An integrated ecotoxicological assessment. *Environmental Toxicology* 25, 468–478. doi:10.1002/tox.20591
- Burgeot, T., Akcha, F., Ménard, D., Robinson, C., Loizeau, V., Brach-Papa, C., Martínez-Gómez, C., Le Goff, J., Budzinski, H., Le Menach, K., Cachot, J., Minier, C., Broeg, K., Hylland, K., 2017. Integrated monitoring of chemicals and their effects on four sentinel species, *Limanda limanda*, *Platichthys flesus*, *Nucella lapillus* and *Mytilus* sp., in Seine Bay: A key step towards applying biological effects to monitoring. *Marine Environmental Research* 124, 92–105. doi:10.1016/j.marenvres.2016.10.009
- Burlakova, L.E., 2006. Endosymbionts of *Dreissena polymorpha* in Ireland: Evidence for the introduction of adult mussels. *Journal of Molluscan Studies* 72, 207–210. doi:10.1093/mollus/eyi067
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viareng, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of The Total Environment* 247, 295–311. doi:10.1016/S0048-9697(99)00499-4
- Calow, P., 1996. Variability: noise or information in ecotoxicology? *Environmental toxicology and pharmacology* 2, 121–123. doi:10.1016/S1382-6689(96)00041-5
- Carlton, J.T., 1993. Dispersal mechanisms of the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*), in: Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), *Zebra Mussels - Biology, Impacts and Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 677–697.
- Chapman, D., Jackson, J., Krebs, F., 1996. Chapter 11 - Biological monitoring, in: Bartram, J., Ballance, R. (Eds.), *Water Quality Monitoring*. E&FN Spon, Londres, UK, pp. 270–309.
- Claudi, R., Mackie, G.L., 1994. *Practical manual for zebra mussel monitoring and control*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- Clements, W.H., Carlisle, D.M., Lazorchak, J.M., Johnson, P.C., 2000. Heavy metals structure benthic communities in Colorado Mountain streams. *Ecological Applications* 10, 626. doi:10.2307/2641120
- Cohen, A.N., 2005. A review of Zebra mussels' environmental requirements. San Francisco Estuary Institute.
- Colas, F., Baudoin, J.-M., Danger, M., Usseglio-Polatera, P., Wagner, P., Devin, S., 2013. Synergistic impacts of sediment contamination and dam presence on river functioning: *Multiple stressors impacts associated with dams*. *Freshwater Biology* 58, 320–336. doi:10.1111/fwb.12060
- Connon, R.E., Geist, J., Werner, I., 2012. Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. *Sensors* 12, 12741–12771. doi:10.3390/s120912741
- Contardo-Jara, V., Krueger, A., Exner, H.-J., Wiegand, C., 2009. Biotransformation and antioxidant enzymes of *Dreissena polymorpha* for detection of site impact in watercourses of Berlin. *Journal of Environmental Monitoring* 11, 1147. doi:10.1039/b820734h
- Coughlan, J., 1969. The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Marine Biology* 2, 356–358. doi:10.1007/BF00355716
- Dagnino, A., Allen, J.I., Moore, M.N., Broeg, K., Canesi, L., Viarengo, A., 2007. Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. *Biomarkers* 12, 155–172. doi:10.1080/13547500601037171
- Dagnino, A., Sforzini, S., Dondero, F., Fenoglio, S., Bona, E., Jensen, J., Viarengo, A., 2008. A weight-of-evidence approach for the integration of environmental “triad” data to assess ecological risk and biological vulnerability. *Integrated Environmental Assessment and Management* 4, 314–326. doi:10.1897/IEAM_2007-067.1
- Davie, T. (Ed.), 2008. *Water quality*, in: *Fundamentals of Hydrology 2nd Edition*, Routledge Fundamentals of Physical Geography Series. Routledge, London, pp. 125–150.

- Davies, I.M., Vethaak, D. (Eds.), 2012. Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects, ICES cooperative research report. ICES/CIEM, Copenhagen.
- De Coen, W.M., Janssen, C.R., Giesy, J.P., 2000. Biomarker applications in ecotoxicology: bridging the gap between toxicology and ecology, in: Persoone, G., Janssen, Colin R., De Coen, Wim M. (Eds.), *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. Springer, Boston, MA, pp. 13–25.
- de Lafontaine, Y., Gagné, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P., Chan, H.M., 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology* 50, 51–71. doi:10.1016/S0166-445X(99)00094-6
- Del Piero, S., Masiero, L., Casellato, S., 2012. Influence of temperature on fluoride toxicity and bioaccumulation in the nonindigenous freshwater mollusk *Dreissena polymorpha* Pallas, 1769. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 2567–2571. doi:10.1002/etc.1979
- Depledge, M.H., 1994. The rationale basis for the use of biomarkers as ecological tools, in: Fossi, M.C., Leonzio, C. (Eds.), *Non Destructive Biomarkers in Vertebrates*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 271–296.
- Depledge, M.H., Fossi, M.C., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Invertebrates. Ecotoxicology* 3, 161–172. doi:10.1007/BF00117081
- Devin, S., Burgeot, T., Giambérini, L., Minguez, L., Pain-Devin, S., 2014a. The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 2448–2454. doi:10.1007/s11356-013-2169-9
- Devin, S., Giambérini, L., Pain-Devin, S., 2014b. Variation in variance means more than mean variations: What does variability tell us about population health status? *Environment International* 73, 282–287. doi:10.1016/j.envint.2014.08.002
- Durou, C., Mouneyrac, C., Pellerin, J., Péry, A., 2008. Conséquence des perturbations du métabolisme énergétique, in: Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C. (Eds.), *Les Biomarqueurs Dans L'évaluation de L'état Écologique Des Milieux Aquatiques*. Lavoisier, Paris, pp. 273–294.
- Durou, C., Poirier, L., Amiard, J.-C., Budzinski, H., Gnassia-Barelli, M., Lemenach, K., Peluhet, L., Mouneyrac, C., Roméo, M., Amiard-Triquet, C., 2007. Biomonitoring in a clean and a multi-contaminated estuary based on biomarkers and chemical analyses in the endobenthic worm *Nereis diversicolor*. *Environmental Pollution* 148, 445–458. doi:10.1016/j.envpol.2006.12.022
- Eymard, S., Genot, C., 2003. A modified xylene orange method to evaluate formation of lipid hydroperoxides during storage and processing of small pelagic fish. *European Journal of Lipid Science and Technology* 105, 497–501. doi:10.1002/ejlt.200300768
- Falfushynska, H., Gnatyshyna, L., Yurchak, I., Ivanina, A., Stoliar, O., Sokolova, I., 2014. Habitat pollution and thermal regime modify molecular stress responses to elevated temperature in freshwater mussels (*Anodonta anatina*: Unionidae). *Science of The Total Environment* 500–501, 339–350. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.08.112
- Fanslow, D.L., Nalepa, T.F., Johengen, T.H., 2001. Seasonal changes in the respiratory electron transport system (ETS) and respiration of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* in Saginaw Bay, Lake Huron. *Hydrobiologia* 448, 61–70. doi:10.1023/A:1017582119098
- Faria, M., Carrasco, L., Diez, S., Riva, M.C., Bayona, J.M., Barata, C., 2009. Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149, 281–288. doi:10.1016/j.cbpc.2008.07.012
- Faria, M., Ochoa, V., Blázquez, M., Juan, M.F.S., Lazzara, R., Lacorte, S., Soares, A.M.V.M., Barata, C., 2014. Separating natural from anthropogenic causes of impairment in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) populations living across a pollution gradient. *Aquatic Toxicology* 152, 82–95. doi:10.1016/j.aquatox.2014.03.020
- Férard, J.-F., Blaise, C. (Eds.), 2013. *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer, Netherlands.
- Forbes, V.E., Palmqvist, A., Bach, L., 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 272–280. doi:10.1897/05-257R.1
- Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M.B., Depledge, M.H., 2004. A multibiomarker approach to environmental assessment. *Environmental Science & Technology* 38, 1723–1731. doi:10.1021/es030570+
- Garton, D.W., McMahon, R., Stoeckmann, A.M., 2014. Limiting environmental factors and competitive interactions between zebra and quagga mussels in North America, in: Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), *Quagga and Zebra Mussels - Biology, Impacts, and Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 383–402.
- Giambérini, L., Pihan, J.-C., 1997. Lysosomal changes in the hemocytes of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* experimentally exposed to lead and zinc. *Diseases of Aquatic Organisms* 28, 221–227. doi:10.3354/dao028221

- Guerlet, E., Ledy, K., Meyer, A., Giambérini, L., 2007. Towards a validation of a cellular biomarker suite in native and transplanted zebra mussels: A 2-year integrative field study of seasonal and pollution-induced variations. *Aquatic Toxicology* 81, 377–388. doi:10.1016/j.aquatox.2006.12.016
- Guerlet, E., Vasseur, P., Giambérini, L., 2010. Spatial and temporal variations of biological responses to environmental pollution in the freshwater zebra mussel. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1170–1181. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.05.009
- Gurtu, V., Kain, S.R., Zhang, G., 1997. Fluorimetric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Analytical Biochemistry* 251, 98–102.
- Hagger, J.A., Jones, M.B., Leonard, D.R., Owen, R., Galloway, T.S., 2006. Biomarkers and integrated environmental risk assessment: are there more questions than answers? *Integrated Environmental Assessment and Management* 2, 312–329. doi:10.1002/ieam.5630020403
- Hagger, J.A., Jones, M.B., Lowe, D., Leonard, D.R.P., Owen, R., Galloway, T.S., 2008. Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: A case study. *Marine Pollution Bulletin* 56, 1111–1118. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.03.040
- Handy, R.D., Galloway, T.S., Depledge, M.H., 2003. A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. *Ecotoxicology* 12, 331–343. doi:10.1023/A:1022527432252
- Hanson, N., 2011. Using biological data from field studies with multiple reference sites as a basis for environmental management: The risks for false positives and false negatives. *Journal of Environmental Management* 92, 610–619. doi:10.1016/j.jenvman.2010.09.026
- Hanson, N., Förlin, L., Larsson, Å., 2010. Spatial and annual variation to define the normal range of biological endpoints: An example with biomarkers in perch. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 2616–2624. doi:10.1002/etc.300
- Hebert, P.D., Muncaster, B.W., Mackie, G.L., 1989. Ecological and genetic studies on *Dreissena polymorpha* (Pallas): a new mollusc in the Great Lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46, 1587–1591. doi:10.1139/f89-202
- Heugens, E.H., Hendriks, A.J., Dekker, T., van Straalen, N.M., Admiraal, W., 2001. A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factors for use in risk assessment. *Critical reviews in toxicology* 31, 247–284. doi:10.1080/20014091111695
- INERIS, 2011. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : les polychlorobiphényles (PCB) (No. DRC-11-118962-11081A).
- Jiang, Z.-Y., Woollard, A.C., Wolff, S.P., 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26, 853–856. doi:10.1007/BF02536169
- Johns, C., Timmerman, B.E., 1998. Total cadmium, copper, and zinc in two dreissenid mussels, *Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*, at the outflow of Lake Ontario. *Journal of Great Lakes Research* 24, 55–64.
- Johnston, E.L., Roberts, D.A., 2009. Contaminants reduce the richness and evenness of marine communities: A review and meta-analysis. *Environmental Pollution* 157, 1745–1752. doi:10.1016/j.envpol.2009.02.017
- Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Padilla, D.K., 1998. Physical factors that limit the distribution and abundance of *Dreissena polymorpha* (Pall.). *Journal of Shellfish Research* 17, 1219–1235.
- Khan, F.R., Irving, J.R., Bury, N.R., Hogstrand, C., 2011. Differential tolerance of two *Gammarus pulex* populations transplanted from different metallogenic regions to a polymetal gradient. *Aquatic Toxicology* 102, 95–103. doi:10.1016/j.aquatox.2011.01.001
- Klerks, P.L., Weis, J.S., 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review. *Environmental Pollution* 45, 173–205. doi:10.1016/0269-7491(87)90057-1
- Kraak, M.H.S., Schoon, H., Peeters, W.H.M., Vanstraelen, N.M., 1993. Chronic Ecotoxicity of Mixtures of Cu, Zn, and Cd to the Zebra Mussel *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 25, 315–327. doi:10.1006/eesa.1993.1029
- Lam, P.K., Gray, J.S., 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin* 46, 182–186. doi:10.1016/S0025-326X(02)00449-6
- Lepom, P., Irmer, U., Wellmitz, J., 2012. Mercury levels and trends (1993–2009) in bream (*Abramis brama* L.) and zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from German surface waters. *Chemosphere* 86, 202–211. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.10.021
- Li, L., Zheng, B., Liu, L., 2010. Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: Definitions, approaches and trends. *Procedia Environmental Sciences* 2, 1510–1524. doi:10.1016/j.proenv.2010.10.164
- Livingstone, D.R., Lips, F., Martinez, P.G., Pipe, R.K., 1992. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 112, 265–276. doi:10.1007/BF00702471

- Lori, E., Cianfanelli, S., 2006. New records of *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) (Mollusca: Bivalvia: Dreissenidae) from Central Italy. *Aquatic Invasions* 1, 281–283. doi:10.3391/ai.2006.1.4.11
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101, 13–30. doi:10.1016/j.aquatox.2010.10.006
- Magni, S., Parolini, M., Della Torre, C., de Oliveira, L.F., Catani, M., Guzzinati, R., Cavazzini, A., Binelli, A., 2017. Multi-biomarker investigation to assess toxicity induced by two antidepressants on *Dreissena polymorpha*. *Science of The Total Environment* 578, 452–459. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.10.208
- Marasinghe Wadige, C.P.M., Taylor, A.M., Maher, W.A., Ubrihien, R.P., Krikowa, F., 2014. Effects of lead-spiked sediments on freshwater bivalve, *Hyridella australis*: linking organism metal exposure-dose-response. *Aquatic Toxicology* 149, 83–93. doi:10.1016/j.aquatox.2014.01.017
- Marescaux, J., Van Doninck, K., 2013. Using DNA barcoding to differentiate invasive *Dreissena* species (Mollusca, Bivalvia). *ZooKeys* 365, 235–244. doi:10.3897/zookeys.365.5905
- Marie, V., Baudrimont, M., Boudou, A., 2006a. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere* 65, 609–617. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.01.074
- Mills, E.L., Rosenberg, G., Spidle, A.P., Ludyanskiy, M., Pligin, Y., May, B., 1996. A review of the biology and ecology of the quagga mussel (*Dreissena bugensis*), a second species of freshwater dreissenid introduced to North America. *American Zoologist* 36, 271–286.
- Minguez, L., Giambérini, L., 2012. Seasonal dynamics of zebra mussel parasite populations. *Aquatic Biology* 15, 145–151. doi:10.3354/ab00418
- Molloy, D.P., bij de Vaate, A., Wilke, T., Giambérini, L., 2007. Discovery of *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov 1897) in Western Europe. *Biological Invasions* 9, 871–874. doi:10.1007/s10530-006-9078-5
- Molloy, D.P., Giambérini, L., Burlakova, L.E., Karatayev, A.Y., Cryan, J.R., Trajanovski, S.L., Trajanovska, S.P., 2010. Investigations of the endosymbionts of *Dreissena stankovici* with morphological and molecular confirmation of host species, in: van der Velde, G., Rajagopal, S., bij de Vaate, A. (Eds.), *The Zebra Mussel in Europe*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp. 227–238.
- Money, C., Braungardt, C.B., Jha, A.N., Worsfold, P.J., Achterberg, E.P., 2011. Metal speciation and toxicity of Tamar Estuary water to larvae of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research* 72, 3–12. doi:10.1016/j.marenvres.2011.05.001
- Morton, B., 1993. The anatomy of *Dreissena polymorpha* and the evolution and success of the heteromyarian form in the Dreissenidae, in: Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), *Zebra Mussels - Biology, Impacts and Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 185–215.
- Navarro, A., Campos, B., Barata, C., Piña, B., 2013. Transcriptomic seasonal variations in a natural population of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Science of The Total Environment* 454–455, 482–489. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.03.048
- Navarro, E., Bacardit, M., Caputo, L., Palau, T., Armengol, J., 2006. Limnological characterization and flow patterns of a three coupled reservoir system and their influence on *Dreissena polymorpha* populations and settlement during the stratification period. *Lake and Research Management* 22, 293–302. doi:10.1080/07438140609354363
- Newman, M.C., 2015. *Fundamentals of Ecotoxicology the Science of Pollution*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 375p.
- Norton, S.B., Rodier, D.J., Gentile, J.H., van der Schalie, W.H., Wood, W.P., Slimak, M.W., 1992. A framework for ecological risk assessment at the EPA. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, 1663–1672. doi:10.1002/etc.5620111202
- Oertel, N., Salanki, J., 2003. Biomonitoring and bioindicators in aquatic ecosystems, in: Ambasht, R.S., Ambasht, N.K. (Eds.), *Modern Trends in Applied Aquatic Ecology*. Springer, New York, pp. 219–246.
- Orlova, M.I., Muirhead, J.R., Antonov, P.I., Shcherbina, G.K., Starobogatov, Y.I., Biochino, G.I., Theriault, T.W., MacIsaac, H.J., 2004. Range expansion of quagga mussels *Dreissena rostriformis bugensis* in the Volga River and Caspian Sea basin. *Aquatic Ecology* 38, 561–573. doi:10.1007/s10452-004-0311-y
- OSPAR, 2009. Background document on CEMP assessment criteria for the QSR 2010.
- Packard, T.T., 1968. The Measurement of Respiratory Electron-transport Activity in Marine Phytoplankton. *Journal of Marine Research* 29, 3.
- Palais, F., Mouneyrac, C., Dedourge-Geffard, O., Giambérini, L., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, A., 2011. One-year monitoring of reproductive and energy reserve cycles in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 83, 1062–1073. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.01.060
- Parolini, M., Magni, S., Castiglioni, S., Binelli, A., 2016. Genotoxic effects induced by the exposure to an environmental mixture of illicit drugs to the zebra mussel. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 132, 26–30. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.05.022

- Pimentel, D., Zuniga, R., Morrison, D., 2005. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics* 52, 273–288. doi:10.1016/j.ecolecon.2004.10.002
- Pollux, B.J.A., Minchin, D., van der Velde, G., Van Alen, T., Moon-van der Staay, S.Y., Hackstein, J., 2003. Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in Ireland, AFLP-fingerprinting and boat traffic both indicate an origin from Britain. *Freshwater Biology* 48, 1127–1139.
- Pollux, B.J.A., van der Velde, G., bij de Vaate, A., 2010. A perspective on global spread of *Dreissena polymorpha*: a review on possibilities and limitations, in: van der Velde, G., Rajagopal, S., bij de Vaate, A. (Eds.), *The Zebra Mussel in Europe*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp. 45–58.
- Quinn, A., Gallardo, B., Aldridge, D.C., 2014. Quantifying the ecological niche overlap between two interacting invasive species: the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and the quagga mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*). *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* 24, 324–337. doi:10.1002/aqc.2414
- Rainbow, P.S., 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental Pollution* 120, 497–507. doi:10.1016/S0269-7491(02)00238-5
- Ram, J.L., Karim, A.S., Banno, F., Kashian, D.R., 2012. Invading the invaders: reproductive and other mechanisms mediating the displacement of zebra mussels by quagga mussels. *Invertebrate Reproduction & Development* 56, 21–32. doi:10.1080/07924259.2011.588015
- Regoli, F., Gorbi, S., Frenzilli, G., Nigro, M., Corsi, I., Focardi, S., Winston, G.W., 2002. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Marine Environmental Research* 54, 419–423.
- Richman, L., Somers, K., 2005. Can we use zebra and quagga mussels for biomonitoring contaminants in the Niagara River? *Water Air Soil Pollut.* 167, 155–178. doi:10.1007/s11270-005-0083-6
- Robillard, S., Beauchamp, G., Laulier, M., 2003. The role of abiotic factors and pesticide levels on enzymatic activity in the freshwater mussel *Anodonta cygnea* at three different exposure sites. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 135, 49–59. doi:10.1016/S1532-0456(03)00049-8
- Seitkalieva, A.V., Menzorova, N.I., Rasskazov, V.A., 2015. Phosphatases of echinoderms and bivalve mollusks of the Japan and Okhotsk seas. *Russian Journal of Marine Biology* 41, 51–59. doi:10.1134/S1063074015010071
- SETAC, 1997. Technical Issue Paper - Ecological Risk Assessment. Society of Environmental Toxicology and Chemistry.
- Smith, D.G., 1999. Differences in siphonal anatomy between *Dreissena polymorpha* and *D. bugensis* (Mollusca: Dreissenidae) in Lake Ontario. *The American Midland Naturalist* 141, 402–405. doi:10.1674/0003-0031(1999)141[0402:DISABD]2.0.CO;2
- Smolders, R., De Coen, W., Blust, R., 2004. An ecologically relevant exposure assessment for a polluted river using an integrated multivariate PLS approach. *Environmental Pollution* 132, 245–263. doi:10.1016/j.envpol.2004.04.024
- Sokolova, I., Lannig, G., 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate Research* 37, 181–201. doi:10.3354/cr00764
- Son, M., 2007. Native range of the zebra mussel and quagga mussel and new data on their invasions within the Ponto-Caspian Region. *Aquatic Invasions* 2, 174–184. doi:10.3391/ai.2007.2.3.4
- Sousa, R., Gutiérrez, J.L., Aldridge, D.C., 2009. Non-indigenous invasive bivalves as ecosystem engineers. *Biological Invasions* 11, 2367–2385. doi:10.1007/s10530-009-9422-7
- Sousa, R., Novais, A., Costa, R., Strayer, D.L., 2014. Invasive bivalves in fresh waters: impacts from individuals to ecosystems and possible control strategies. *Hydrobiologia* 735, 233–251. doi:10.1007/s10750-012-1409-1
- Stepien, C.A., Grigorovich, I.A., Gray, M.A., Sullivan, T.J., Yerga-Woolwine, S., Kalayci, G., 2014. Evolutionary, biogeographic, and population genetic relationships of dreissenid mussels, with revision of component taxa, in: Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), *Quagga and Zebra Mussels - Biology, Impacts, and Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 403–444.
- Suresh, K., Mohandas, A., 1990. Hemolymph acid phosphatase activity pattern in copper-stressed bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology* 55, 118–125. doi:10.1016/0022-2011(90)90041-4
- Tachet, H., Richoux, P., Bournaud, M., Usseglio-Polatera, P. (Eds.), 2000. *Invertébrés d'eau douce - Systématique, biologie, écologie*. CNRS Editions, Paris.
- Teubner, D., Wesslein, A.-K., Rønne, P.B., Veith, M., Frings, C., Paulus, M., 2016. Is a visuo-haptic differentiation of zebra mussel and quagga mussel based on a single external morphometric shell character possible? *Aquatic Invasions* 11, 145–154. doi:10.3391/ai.2016.11.2.04
- UE, 2013. Directive 2013/39/UE du Parlement européen et du Conseil du 12 août 2013 modifiant les directives 2000/60/CE et 2008/105/CE en ce qui concerne les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l'eau, *Journal Officiel de l'union Européenne* n° 226 du 24 août 2013.

- UE, 2008. Directive 2008/105/CE du 16/12/08 établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau, modifiant et abrogeant les directives du Conseil 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/280/CEE et modifiant la directive 2000/60/CE, Journal Officiel de l'union Européenne n° 348 du 24 décembre 2008.
- UE, 2000. Directive 2000/60/EC du Parlement Européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau.
- van der Oost, R., Porte-Visa, C., van den Brink, P.J., 2005. Biomarkers in environmental assessment, in: den Besten, P.J., Munawar, M. (Eds.), *Ecotoxicological Testing of Marine and Freshwater Ecosystems: Emerging Techniques, Trends, and Strategies*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 87–137.
- van der Velde, G., Platvoet, D., 2007. Quagga mussels *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov, 1897) in the Main River (Germany). *Aquatic Invasions* 2, 261–264. doi:10.3391/ai.2007.2.3.11
- van der Velde, G., Rajagopal, S., bij de Vaate, A., 2010. From zebra mussels to quagga mussels: an introduction to the Dreissenidae, in: van der Velde, G., Rajagopal, S., bij de Vaate, A. (Eds.), *The Zebra Mussel in Europe*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp. 1–10.
- Vasseur, P., Cossu-Leguille, C., 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environment International* 28, 711–717. doi:10.1016/S0160-4120(02)00116-2
- Vethaak, A.D., Davies, I.M., Thain, J.E., Gubbins, M.J., Martínez-Gómez, C., Robinson, C.D., Moffat, C.F., Burgeot, T., Maes, T., Wosniok, W., Giltrap, M., Lang, T., Hylland, K., 2017. Integrated indicator framework and methodology for monitoring and assessment of hazardous substances and their effects in the marine environment. *Marine Environmental Research* 124, 11–20. doi:10.1016/j.marenvres.2015.09.010
- Voets, J., Redeker, E.S., Blust, R., Bervoets, L., 2009. Differences in metal sequestration between zebra mussels from clean and polluted field locations. *Aquatic Toxicology* 93, 53–60. doi:10.1016/j.aquatox.2009.03.006
- Wernersson, A.-S., Carere, M., Maggi, C., Tusil, P., Soldan, P., James, A., Sanchez, W., Dulio, V., Broeg, K., Reifferscheid, G., Buchinger, S., Maas, H., Van Der Grinten, E., O'Toole, S., Ausili, A., Manfra, L., Marziali, L., Polesello, S., Lacchetti, I., Mancini, L., Lilja, K., Linderroth, M., Lundeberg, T., Fjällborg, B., Porsbring, T., Larsson, D.J., Bengtsson-Palme, J., Förlin, L., Kienle, C., Kunz, P., Vermeirssen, E., Werner, I., Robinson, C.D., Lyons, B., Katsiadaki, I., Whalley, C., den Haan, K., Messiaen, M., Clayton, H., Lettieri, T., Carvalho, R.N., Gawlik, B.M., Hollert, H., Di Paolo, C., Brack, W., Kammann, U., Kase, R., 2015. The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environmental Sciences Europe* 27. doi:10.1186/s12302-015-0039-4
- Wojtal-Frankiewicz, A., Bernasińska, J., Frankiewicz, P., Gwoździński, K., Jurczak, T., 2017. The role of environmental factors in the induction of oxidative stress in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Ecology*. doi:10.1007/s10452-017-9617-4
- Wu, R.S.S., Lam, P.K., 1997. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase in the green-lipped mussel (*Perna viridis*): possible biomarkers for hypoxia in the marine environment. *Water Research* 31, 2797–2801. doi:10.1016/S0043-1354(97)00116-4
- Zhulidov, A.V., Nalepa, T.F., Kozhara, A.V., Zhulidov, D.A., Gurtovaya, T.Y., 2006. Recent trends in relative abundance of two dreissenid species, *Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis* in the Lower Don River system, Russia. *Archiv für Hydrobiologie* 165, 209–220. doi:10.1127/0003-9136/2006/0165-0209