



Projet LIFE+ Nature LIFE13 NAT/FR/000506

Préservation de *Margaritifera margaritifera* et restauration de la continuité écologique de la Haute Dronne

Volet 3 : Amélioration des connaissances sur la biologie et l'écotoxicologie de la Petite Mulette

Rapport scientifique final

Magalie Baudrimont

Université de Bordeaux, UMR EPOC 5805

Station Marine d'Arcachon

Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon

05 56 33 39 27

magalie.baudrimont@u-bordeaux.fr



Table des matières

INTRODUCTION	5
Objectifs du Volet « Amélioration des connaissances sur la biologie et l'écotoxicologie de la Petite Mulette »	6
Objectif 1	6
Objectif 2	7
RESULTATS.....	8
1. Études écotoxicologiques de la sensibilité de <i>Margaritifera margaritifera</i> adulte à la présence de micropolluants (métaux traces).....	8
Objectifs	8
Résultats attendus.....	8
Résultats obtenus.....	9
Conclusion	19
Perspectives	20
2. Sensibilité des stades juvéniles de <i>Margaritifera margaritifera</i> aux micropolluants et à la qualité de l'eau en Dronne	20
Objectifs	20
Résultats attendus.....	21
Résultats obtenus.....	21
Conclusion	26
Perspectives	27
3. Caractérisation des niveaux de contaminants métalliques de la Dronne (eau, sédiment, bryophytes)	27
Objectifs	27
Résultats attendus.....	27
Résultats obtenus.....	28
Conclusion	31
Perspectives	31
CONCLUSION GENERALE	31
Liste des références citées.....	33
Liste des annexes.....	35

Liste des figures

Figure 1 : a) Courbe de croissance Von Bertalanffy de la Longueur de coquille en fonction de l'âge pour les individus provenant de l'amont et de l'aval. b) Croissances annuelles moyennes des individus provenant de l'amont et de l'aval en fonction de l'âge (Vieira, 2017).	10
Figure 2 : Variations chronologiques de concentrations en cuivre et en manganèse des coquilles de trois individus adultes provenant de l'amont. Les limites de quantification (LOQ = 3x limite de détection) sont représentées en pointillés horizontaux et la position des stries en pointillés verticaux gris (Vieira, 2017). 12	12
Figure 3 : Variations chronologiques de concentrations en strontium et en magnésium des coquilles de trois individus adultes provenant de l'amont. Les limites de quantification (LOQ = 3x limite de détection) sont représentées en pointillés horizontaux et la position des stries en pointillés verticaux gris (Vieira, 2017).	13
Figure 4 : Exemple de l'expression des gènes spécifiquement corrélés à la concentration en chrome dans les reins des moules perlières, et en fonction de leur âge.....	14
Figure 5 : Nombre de gènes corrélés spécifiquement à un facteur (Bertucci et al, 2017 ; annexe 3).....	15
Figure 6 : Analyses histologiques des gonades de moules perlières des conditions témoins, œstradiol et Cd à 5 µg/L. H : hermaphrodite. F : femelle. OV : ovocytes. SPZ : spermatozoïdes (Baudrimont et al, 2019)...	18
Figure 7 : Pourcentage de mortalité des juvéniles de <i>M. margaritifera</i> (âgés de 13 mois) en fonction de la concentration en sel (en g/L) pour une durée d'exposition de 48 heures.....	22
Figure 8 : Comparaison des CL50 pour le NaCl à 96h00 sur juvéniles de différentes espèces de moules d'eau douce (d'après Wang et al, 2017).	22
Figure 9 : Expression de différents gènes par rapport aux témoins après 4, 7 et 21 jours d'exposition des juvéniles de <i>M. margaritifera</i> âgés de 17 mois à différentes concentrations en cadmium et en arsenic....	25
Tableau 6 : Liste des présentations issues des résultats obtenus sur les études écotoxicologiques menées sur les juvéniles de <i>Margaritifera margaritifera</i>	26
Figure 10 : Localisation des différents sites échantillonnés pour les analyses de métaux dans l'eau, les sédiments et les bryophytes	28
Figure 11 : Bilan des prélèvements réalisés avant, pendant et après travaux sur les principaux ouvrages. 30	30
Figure 12 : Pourcentages de variation des métaux après travaux comparativement à avant et concentrations de Cd et de Cr mesurées dans les bryophytes.	30
Figure 13 : Concentrations métalliques labiles de Ni, As et Co avant, pendant et après travaux pour les 3 principaux sites suivis : Firbeix, Moulin de la Maque (Chappelas) et St Pardoux.	31

Liste des tables

Tableau 1 : Fonctions des gènes différentiellement exprimés en fonction de chaque facteur étudié.....	166
Tableau 2 : Liste des présentations issues des résultats obtenus sur les études écotoxicologiques menées sur les individus adultes de <i>Margaritifera margaritifera</i>	199
Tableau 3 : Bilan de la mise en élevage des jeunes mulettes et de leur réintroduction dans le milieu naturel.	211
Tableau 4: Concentrations létales à 50% (CL50) de différents contaminants obtenus après une exposition de 96 heures des juvéniles de <i>M. margaritifera</i> âgés de 10 à 28 mois.....	233
Tableau 5 : Seuils de toxicité (CL50) obtenus pour les juvéniles de <i>M. margaritifera</i> fraîchement décrochés (< 5 jours) après exposition à différentes concentrations en contaminant pendant 96 h. (Les valeurs sont exprimées en concentrations nominales)	244
Tableau 6 : Liste des gènes étudiés et leurs fonctions associées.....	244

INTRODUCTION

En Europe, la qualité de l'eau s'est fortement dégradée au cours du siècle dernier. Les espèces inféodées aux milieux aquatiques sont les espèces les plus menacées de disparition du continent. C'est le cas de la Petite Mulette ou *Margaritifera margaritifera*, dont les effectifs ont diminué de plus de 90% à l'échelle du continent. En France, le déclin a été plus dramatique et dépasse 99%. Il n'y subsiste plus qu'environ 100 000 individus répartis dans environ 80 cours d'eau. La Haute-Dronne abrite la première population de *Margaritifera margaritifera* avec environ 15 000 individus. En Europe, les raisons de cet important déclin sont la surpêche, la dégradation de la qualité de l'eau, des habitats, et de celle des populations de poissons hôtes (Truites fario et Saumons atlantique) liée à la rupture de la continuité écologique.

Sur la Dronne, les menaces principales sont la dégradation de la qualité de l'eau, le colmatage des substrats et la rupture de la continuité écologique. L'eau de la Dronne est de bonne qualité, mais elle peut dépasser 7 mg/L de nitrates (NO₃⁻), valeurs proches de la limite de survie des juvéniles, donnée à 1,7 mg/l de N (Moorkens, 2000). La dégradation des habitats par le colmatage est renforcée par les obstacles à la continuité écologique. En effet, l'amont des ouvrages est enfoui sous des sédiments fins. L'aval est colmaté par un important développement algal lié à l'augmentation de la température et à la baisse du potentiel auto-épuration de l'eau.

À court terme, le but de ce projet est de mettre en place les conditions favorables au maintien de la population de *Margaritifera margaritifera* de la Haute-Dronne et à long terme de permettre son accroissement pour la rendre viable. Pour cela, des travaux de restauration de la continuité écologique sont réalisés sur les principaux obstacles à la continuité : passages busés, seuils et plans d'eau. Ils permettront de restaurer les habitats dans le cours principal de la rivière et sur certains affluents dans la limite du périmètre Natura 2000. Cela permettra à moyen terme de restaurer une population sauvage de truite fario, synonyme d'un nombre suffisant de poissons hôtes. En parallèle, une station d'élevage sera mise en place. La production des juvéniles de Petites Mulettes permettra le renforcement des populations dans le milieu naturel, dans des zones propices à leur développement. Cette action permettra aussi la compréhension de l'impact des métaux traces sur les juvéniles qui représentent la phase de vie la plus sensible de l'espèce.

En parallèle, un important volet de communication sera mis en place autour de l'espèce cible *Margaritifera margaritifera* et des travaux entrepris pour restaurer la continuité écologique. Son but sera de valoriser le projet au niveau local en sensibilisant les habitants et les acteurs à la préservation de la Haute-Dronne et son espèce emblématique, la Petite Mulette. Il servira également à exporter les leçons qui seront tirés de ce programme, pour permettre la restauration d'autres cours d'eau de tête de bassin versant en France et en Europe et préserver la Petite Mulette.

Margaritifera margaritifera a un très long au cycle de vie. Il est difficile de chiffrer l'évolution de sa population lors d'un programme de moins de 10 ans. Pour les Mulettes adultes, la principale cause de mortalité est liée aux crues, durant lesquelles certains individus adultes sont arrachés aux substrats et déposés en amont dans les retenues des ouvrages. Ces zones sont des mouroirs pour la Petite Mulette qui ne supporte ni le colmatage des substrats, ni l'ensevelissement par les sédiments fins. Les travaux pour restaurer la continuité écologique permettront de supprimer ces zones mortes sur l'ensemble du secteur à Petite Mulette. Sur ces secteurs, les individus présents et en vie suite aux travaux auront été sauvés par ce projet. Sur le bassin versant, le nombre de plans d'eau est passé de 23 en 1856 à 566 en 2006. Ils ont le même impact que les seuils et barrages. Seuls 7 plans d'eau, 5 sur le cours principal, 2 sur les affluents, feront l'objet d'aménagement permettant de rétablir la continuité écologique et/ou de réduire les impacts thermiques et apports de particules fines à l'aval, car ils sont dans le périmètre Natura 2000. La réduction de l'impact thermique et rétablissement de la continuité écologique sur l'ensemble du linéaire à Petite Mulette et les principaux affluents, permettra l'accroissement de la population de truite fario.

La population de la Haute-Dronne ne se renouvelle plus suffisamment. Pour y remédier, un minimum de 16000 juvéniles seront produits en captivité et relâchés dans le milieu naturel. Pour une réussite pleine et entière de ces lâchers, des études seront menées pour évaluer l'impact des métaux traces

sur leur métabolisme. En effet, les secteurs cristallins sont des secteurs renfermant beaucoup de métaux dont une partie fut exploitée, entraînant des relargages de métaux toxiques (arsenic, cadmium...). Cette connaissance sur la qualité du milieu et l'impact des métaux traces permettra d'identifier des cours d'eau pour lesquels il est vain de chercher à protéger *Margaritifera margaritifera* car les teneurs en métaux traces ou les paramètres physico-chimiques sont en deçà de ceux supportés par les juvéniles, et à contrario cibler les zones les plus favorables à leur développement après réintroduction. D'autres seront menées pour mieux comprendre l'impact des facteurs environnementaux sur ces espèces hautement sensibles. Des juvéniles seront aussi conservés en captivité pour permettre de conserver un pool en cas de pollution accidentelle.

Objectifs du Volet « Amélioration des connaissances sur la biologie et l'écotoxicologie de la Petite Mulette »

Une partie du programme Life Haut Dronne est directement dévolu à l'amélioration des connaissances sur la biologie et l'écotoxicologie de la moule perlière de manière à pouvoir assurer pleinement la réussite de sa sauvegarde et comprendre l'impact des principaux facteurs potentiellement à l'origine de sa disparition *in situ* : la température, l'oxygénation, la présence de nutriments, de micropolluants métalliques et organiques... En effet, peu de travaux dans la littérature se sont intéressés à l'impact potentiel notamment des micropolluants sur les moules perlières et encore moins sur les stades juvéniles de l'espèce. Ainsi, ces travaux sont menés selon 2 principaux objectifs.

Objectif 1

Il s'agit de déterminer les niveaux de contamination métallique de la Haute Dronne (à l'échelle du bassin versant, soit un linéaire d'environ 50 km) dans l'eau, les sédiments et les bryophytes, au niveau des points de suivi de la qualité physico-chimique du milieu mis en œuvre dans le cadre du projet LIFE, en relation avec les actions de restauration de la continuité écologique programmées au cours des 5 prochaines années (volet 1 du projet LIFE). En effet, compte tenu de la sensibilité toute particulière de la moule perlière à la qualité de l'eau et du substrat, la caractérisation des niveaux de contaminants métalliques de la Haute Dronne s'avère indispensable afin de vérifier l'innocuité des travaux de restauration de la continuité écologique, notamment vis-à-vis de la libération éventuelle de contaminants présents dans les sédiments accumulés en amont des ouvrages hydrauliques.

De plus, tout au long du programme LIFE, un suivi de l'évolution du milieu est réalisé : l'objectif principal est de suivre l'évolution des habitats aquatiques suite aux travaux de restauration de la continuité écologique afin de définir les habitats les plus favorables à la moule perlière et à son poisson hôte, la Truite fario. Il consistera également à suivre le degré de colmatage des substrats suivant la méthode de mesure du potentiel d'oxydo-réduction. Ce suivi est nécessaire car il permettra de suivre l'évolution des sites restaurés tout au long du projet, au regard de la qualité hydromorphologique du cours d'eau (granulométrie des sédiments, conditions d'écoulements, degré de colmatage, etc.).

En combinant les études menées par l'Université de Bordeaux dans le cadre du volet 3 du LIFE et le suivi hydromorphologique du cours d'eau, il sera possible d'établir des cartographies d'habitats les plus favorables sur le bassin versant de la Haute Dronne (absence de colmatage, bonne qualité chimique du substrat, absence d'éléments métalliques traces, etc.) qui serviront ensuite pour la réintroduction de moules perlières dans le milieu naturel.

La combinaison des actions menées par le Parc et l'Université de Bordeaux doit donc permettre d'optimiser les chances de survie des juvéniles de moules perlières en milieu naturel, et ainsi de pérenniser les populations à moyen et long terme.

Objectif 2

Il s'agit de déterminer la sensibilité de la moule perlière (aux stades juvéniles et adultes) à la présence de micropolluants. Les conclusions de ces études permettront de générer des outils d'aide à la décision pour les gestionnaires afin de prioriser les actions à mettre en œuvre pour protéger des populations de moules perlières à l'échelle régionale, nationale et européenne. En effet, il sera possible d'identifier les cours d'eau ou portion de cours qui, bien qu'abritant encore des individus adultes, ne permettent plus une reproduction naturelle de l'espèce à cause des teneurs en éléments traces métalliques qu'ils contiennent ; et de mettre en place pour ces populations des actions de déplacement d'individus adultes, voire la mise en place d'un programme de reproduction assistée afin de conserver un maximum de diversité génétique. Il sera également possible d'affiner les programmes de restauration des cours d'eau en réorientant certains objectifs concernant la restauration des habitats aquatiques au vue des quantités de micropolluants relevées.

Concrètement pour le bassin versant de la Haute Dronne, ces études permettront d'évaluer les tronçons « à risques » à éviter lors des opérations de réintroduction de moules perlières en milieu naturel, mais aussi de réduire au maximum l'impact cumulatif des travaux de restauration de la continuité écologique en hiérarchisant par exemple l'ordre d'intervention sur les ouvrages.

A plus long terme, ces nouveaux outils opérationnels permettront d'établir des diagnostics rapides de l'état de santé de différentes populations de moules perlières provenant de différents cours d'eau (dans le cadre du Plan Régional d'Action et du Plan National d'Action par exemple), et ainsi d'étendre la capacité à qualifier le bon état écologique des cours d'eau (la moule perlière étant considéré comme une espèce « parapluie » et un bio-indicateur pertinent pour évaluer la qualité du milieu).

Problématiques issues du diagnostic	Objectifs contrat de territoire Intitulés des types d'actions
Amélioration des connaissances sur la biologie et l'écotoxicologie de la Petite Mulette	<ul style="list-style-type: none"> ○ Etude écotoxicologique de la sensibilité de la Moule Perlière adulte à la présence de micropolluants ○ Sensibilité stades juvéniles à la présence de micropolluants et à la qualité de l'eau de la Dronne ○ Caractérisation des niveaux de contaminants métalliques

RESULTATS

1. Études écotoxicologiques de la sensibilité de *Margaritifera margaritifera* adulte à la présence de micropolluants (métaux traces)

Objectifs

L'objectif est ici de développer des études écotoxicologiques pour documenter la sensibilité de *Margaritifera margaritifera* aux pollutions métalliques : d'une part pour avoir une connaissance approfondie de la sensibilité des moules perlières adultes aux contaminants chimiques du milieu (essentiellement métalliques) ; d'autre part, afin de mettre en place les meilleures stratégies de réintroduction des moules perlières sur la Haute Dronne.

Ces études sont développées tout d'abord sur le stade adulte, car elles permettent d'accroître les connaissances déjà existantes sur cette espèce en termes de biologie et d'écologie et apportent des données jusque-là inexistantes sur l'écotoxicologie.

Résultats attendus

Afin d'augmenter nos connaissances sur la tolérance des moules perlières aux facteurs environnementaux et de contamination par les éléments traces métalliques (ETM) et d'établir un diagnostic de leur état de santé en Dronne, de nouveaux outils de biologie moléculaire (séquençage haut débit du transcriptome, expression quantitative des gènes par PCR quantitative et mesures épigénétiques) seront développés, parallèlement à la détermination de l'âge des individus par analyse sclérochronologique des coquilles. Par la suite, des prélèvements non invasifs à partir de ponctions d'hémolymphe seront utilisés pour mesurer les réponses transcriptomiques et épigénétiques *in situ*. Ainsi, de nouveaux marqueurs spécifiques et sensibles de l'état de santé des moules seront caractérisés. Ces marqueurs seront utilisés pour déterminer les meilleures stratégies de sauvegarde de l'espèce, soit en déplaçant des populations jugées comme « à risque » vis-à-vis des conditions du milieu vers des sites moins impactés, soit pour choisir les meilleurs sites de réintroduction des juvéniles.

Ces nouveaux outils opérationnels nous permettront également d'établir des diagnostics rapides de l'état de santé de différentes populations de moules provenant de différents cours d'eau, et ainsi d'étendre notre capacité à qualifier le bon état écologique des milieux. Ils pourront également être utilisés à différents stades de vie, et notamment au stade juvénile qui s'avère être beaucoup plus sensible aux conditions du milieu que le stade adulte, lorsque la ferme d'élevage sera opérationnelle.

Remarque :

Ces études se basent sur de premiers résultats obtenus à partir du prélèvement de 113 individus de M. margaritifera dans la Dronne en 2009-2010, par l'UMR EPOC, à des fins scientifiques (arrêté du ministère de l'environnement). Mais seul un nombre limité d'analyses a pu être réalisé. Il s'agit donc de compléter ces premières données et de proposer de nouvelles méthodes d'étude non destructives des moules perlières.

En effet, les premières études réalisées en 2009 et en 2010, ont permis de démontrer l'impact de la décharge de la Maque sur les moules situées à l'aval, comparativement à l'amont. Des accumulations significatives de métaux dans la population aval (Cd, Pb, Cr, As et Co) ont été observées. Elles ont conduit à la génération

d'un stress oxydant, révélé par des analyses d'expression de gènes spécifiques, et à une augmentation de la production de protéines de détoxification des métaux dans les tissus. Nous avons pu développer quelques outils de biologie moléculaire par la recherche et le séquençage de 6 gènes, mais nous sommes aujourd'hui limités en termes d'interprétation. Ainsi, fort de ces résultats prometteurs, il nous est apparu fondamental de poursuivre ces efforts en déterminant et comparant à l'aide de la récente technologie RNAseq le transcriptome (production d'ARN messagers à partir de l'ADN, qui seront ensuite traduits en protéines) de moules témoins et contaminées, de façon à pouvoir accroître la qualité de la réponse génétique obtenue, tout en tenant compte de l'âge des individus.

Résultats obtenus

1. Analyses des coquilles de *Margaritifera margaritifera*.

Un élément fondamental pouvant jouer sur la capacité de bioaccumulation des micropolluants par les individus et également sur la réponse génétique et physiologique de ces individus à la contamination correspond à leur âge. Une des premières étapes a ainsi été de mener des analyses sclérochronologiques (analyse des stries de croissance des coquilles des individus) de manière à déterminer leur âge réel. En parallèle, des analyses de sclérochimie (analyse des éléments métalliques accumulés dans ces mêmes coquilles) ont été menés de manière à pouvoir documenter les variations annuelles de ces accumulations et leur relation avec les variations physico-chimiques ou de contamination des milieux, permettant par là-même de pouvoir documenter l'historique d'exposition des moules.

Pour cela, les coquilles de moules perlières prélevées en amont et en aval de la décharge de St Saud Lacoussière, lors des études préalables au projet en 2009 et 2010, ont été analysées par sclérochronologie et sclérochimie (stage de Master 2 de Johan Vieira, 2017. Direction : Julien Thebault, LEMAR de Brest, co-direction : Magalie Baudrimont, UMR EPOC, annexe 1).

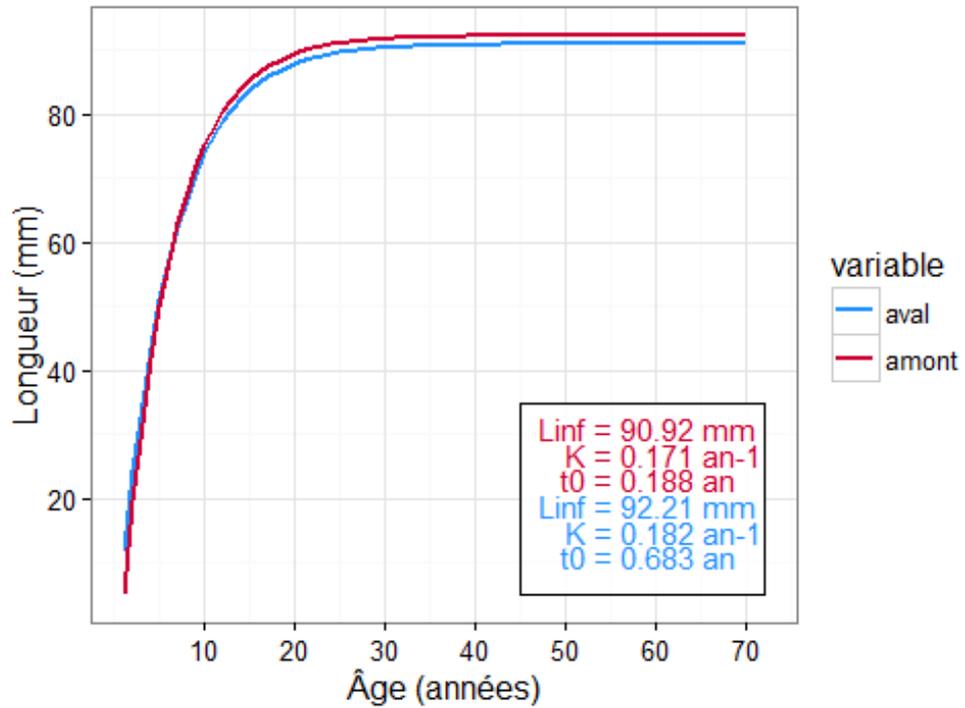
Les principaux résultats de croissance ont permis, grâce au modèle de Von Bertalanffy, d'obtenir les paramètres d'espérance de taille L_{∞} (92.21 mm pour l'amont et 90.92 mm pour l'aval) et de taux de croissance k (0.182 an^{-1} pour l'amont et 0.171 an^{-1} pour l'aval) avec des coefficients de corrélation élevés ($R^2=0.976$ amont et $R^2=0.982$ aval) (Figure 1a). En ce qui concerne l'indice de performance de croissance Φ' , il a été calculé des valeurs de 1.19 et 1.15, respectivement pour l'amont et l'aval. Les courbes issues du modèle présentées ci-dessous montrent qu'il ne semble pas y avoir de différence de stratégie de croissance entre nos deux groupes d'individus. La croissance annuelle de l'ensemble des moules ralentit fortement vers l'âge de 12 ans et la taille maximale est atteinte aux alentours de 25 ans.

La comparaison des L_{∞} calculées avec les longueurs maximales observées sur les individus montre, comme dans l'étude de Miguel et al. (2004), que certains individus dépassent cette limite théorique. Ceci confirme le fait que cette valeur est une espérance de taille moyenne et non pas absolue (Bauer, 1992). Si l'on oppose les valeurs de L_{∞} , k et Φ' obtenues avec celles d'autres populations européennes, les résultats montrent que la population observée se rapproche d'une population étudiée par Miguel et al. (2004) en Espagne ayant une longueur maximale théorique assez faible et un taux de croissance élevé. La corrélation inverse entre ces deux paramètres démontrée par Bauer (1992) est mise en évidence.

Il n'existe pas de courbe de croissance représentative de l'espèce en général. Chaque population présente une courbe différente (Dunca et al., 2011). Ces observations sont en accord avec les connaissances sur la *Bergmann's rule*, loi biologique s'appliquant également à cette espèce (Munch et Salinas, 2009). La latitude influencerait la taille et l'espérance de vie d'une espèce. Les organismes vivants dans des pays froids sont plus gros et vivent plus longtemps que ceux vivants dans des pays chauds (Hunt et Roy, 2006). Ceci

serait une adaptation permettant de faire varier le rapport surface/volume corporel dans le but d'une régulation thermique du corps. L'indice de performance de croissance Φ' et le taux de croissance k semblent assez élevés par rapport aux autres population étudiées. Cela montrerait que les populations de Dordogne bénéficient de bonnes conditions pour une croissance rapide.

a)



b)

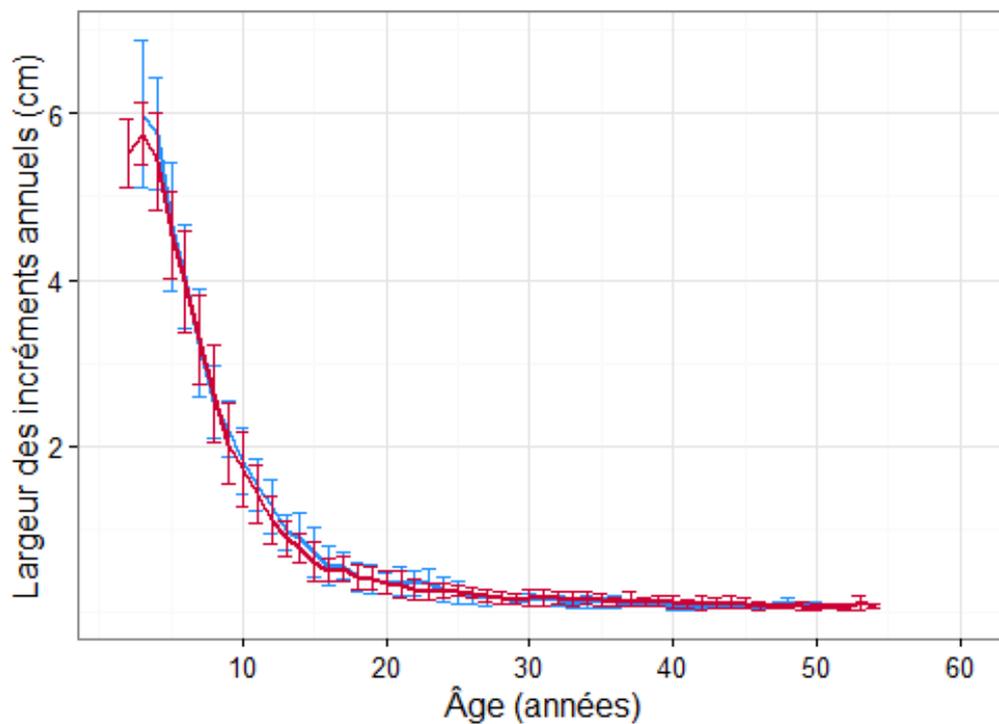


Figure 1 : a) Courbe de croissance Von Bertalanffy de la Longueur de coquille en fonction de l'âge pour les individus provenant de l'amont et de l'aval. b) Croissances annuelles moyennes des individus provenant de l'amont et de l'aval en fonction de l'âge (Vieira, 2017).

La largeur des incréments annuels en fonction de l'âge individuel (Figure 1b) permet d'observer les variations de taux de croissance au cours de la vie des individus. Ces variations ne semblent pas différer entre les individus des deux sites, les moyennes étant très proches et les écarts-types se chevauchant. Ces derniers montrent que la variabilité inter-individu est importante, notamment pour les 20 premières années, avant de diminuer fortement une fois la taille maximale atteinte. La localisation du maximum de croissance pour les deux populations semble se situer la 3^{ème} année.

Concernant les analyses de métaux dans les coquilles, les résultats obtenus par laser ICP-MS montrent que la majorité des éléments analysés ne sont pas détectables ou quantifiables dans les coquilles : la plupart sont présents en concentrations trop faibles (inférieures à la limite de quantification) pour pouvoir interpréter une différence de pollution métallique entre les deux sites. Les résultats ont été analysés pour quatre éléments (magnésium, strontium, manganèse et cuivre), les trois premiers étant présents en concentrations élevées et le dernier présentant des fluctuations importantes et étant connu pour affecter la croissance (Hartmut et Gerstmann, 2007).

Les figures 2 et 3 présentent pour exemple les variations de concentration molaire en cuivre/manganèse et strontium/magnésium des trois individus âgés prélevés en amont au cours de leur vie. Les limites de quantification (LOQ) de l'instrument d'étude sont matérialisées par des lignes horizontales (ex : LOQMn). La position des stries est représentée par des lignes de pointillés verticaux. Dans un premier temps, il est observable que l'ensemble des individus présente des cycles de variations annuels de concentration en Strontium, Magnésium et Manganèse dans leurs coquilles. L'augmentation des concentrations molaires chaque année de croissance montre une incorporation importante de ces éléments. La différence de forme des signaux entre les grands et les plus petits incréments est due à la différence du nombre de mesures réalisées sur chacun d'entre eux. Les plus larges permettent de constater que ces augmentations sont progressives et régulières lors des phases de croissance. Les minimums de concentration semblent également correspondre à l'emplacement des stries. Pour le manganèse, des augmentations communes sont notables l'année 1973 (pour les trois) et en 1980/1981 (pour les deux dernières). Une décroissance de concentration sur les dernières années de vie (hormis pour l'individu 70) ne permet plus d'observer de variations cycliques. Le strontium et le magnésium montrent des fluctuations annuelles régulières sur la période analysée. Sur les trois individus, il semblerait que les variations de concentration de ces deux éléments se suivent dans le temps. Il est notable que la coquille n°21 possède des concentrations plus importantes de magnésium les années 1974 et 1979. En ce qui concerne le cuivre, un problème de quantification dans la coquille 70 a conduit à la non présentation des résultats pour celle-ci. L'observation des variations temporelles de concentration des deux autres individus montre que son incorporation est assez fluctuante selon la coquille observée et souvent à des niveaux de concentration inférieurs à la limite de quantification. Aucun cycle d'incorporation n'est observable. Cette chronologie semble montrer que des concentrations plus importantes en cuivre étaient présentes dans le milieu à la fin des années 1960 et au début des années 1970. Une décroissance de celles-ci avec l'âge est également identifiable.

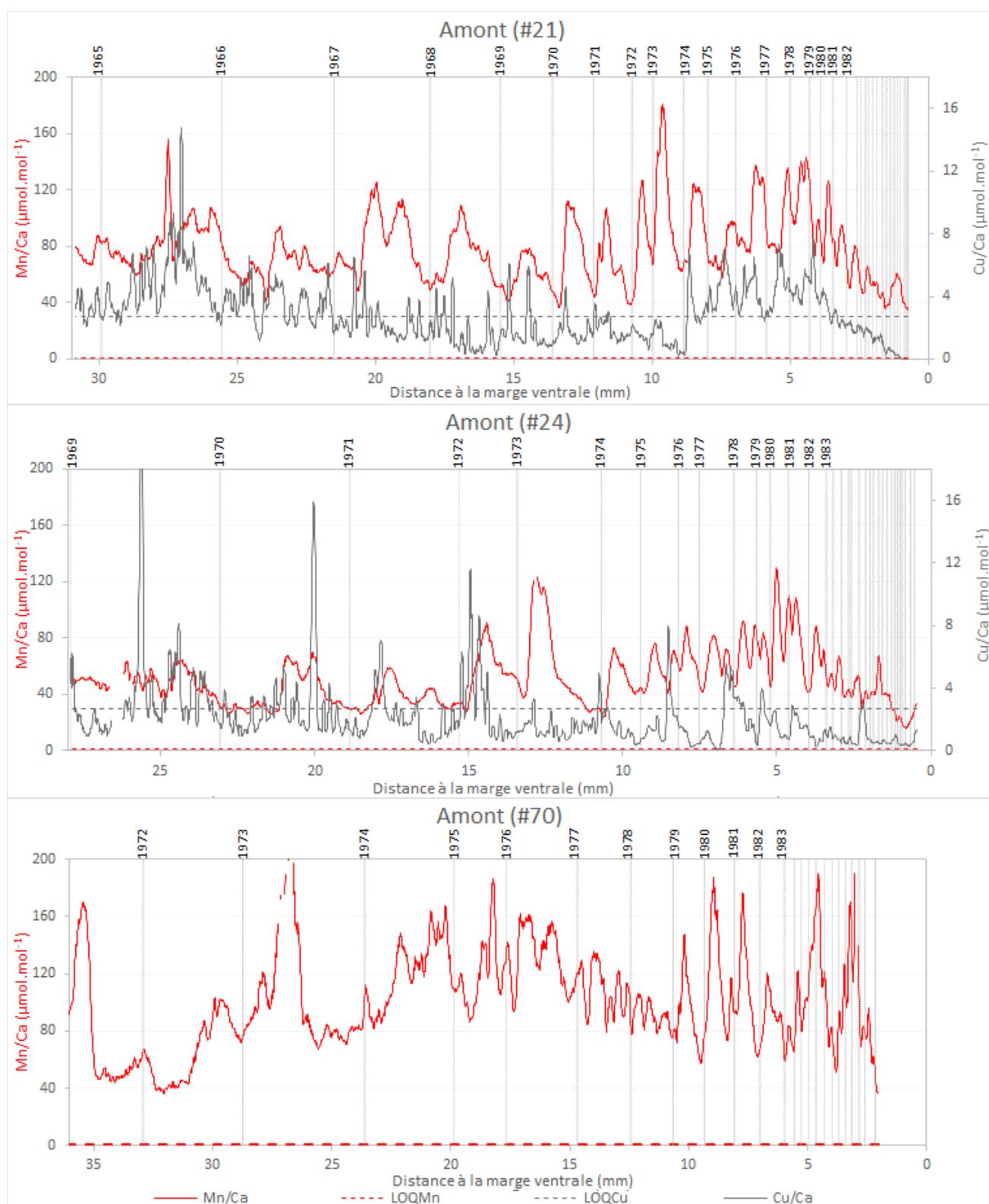


Figure 2 : Variations chronologiques de concentrations en cuivre et en manganèse des coquilles de trois individus adultes provenant de l'amont. Les limites de quantification (LOQ = 3x limite de détection) sont représentées en pointillés horizontaux et la position des stries en pointillés verticaux gris (Vieira, 2017).

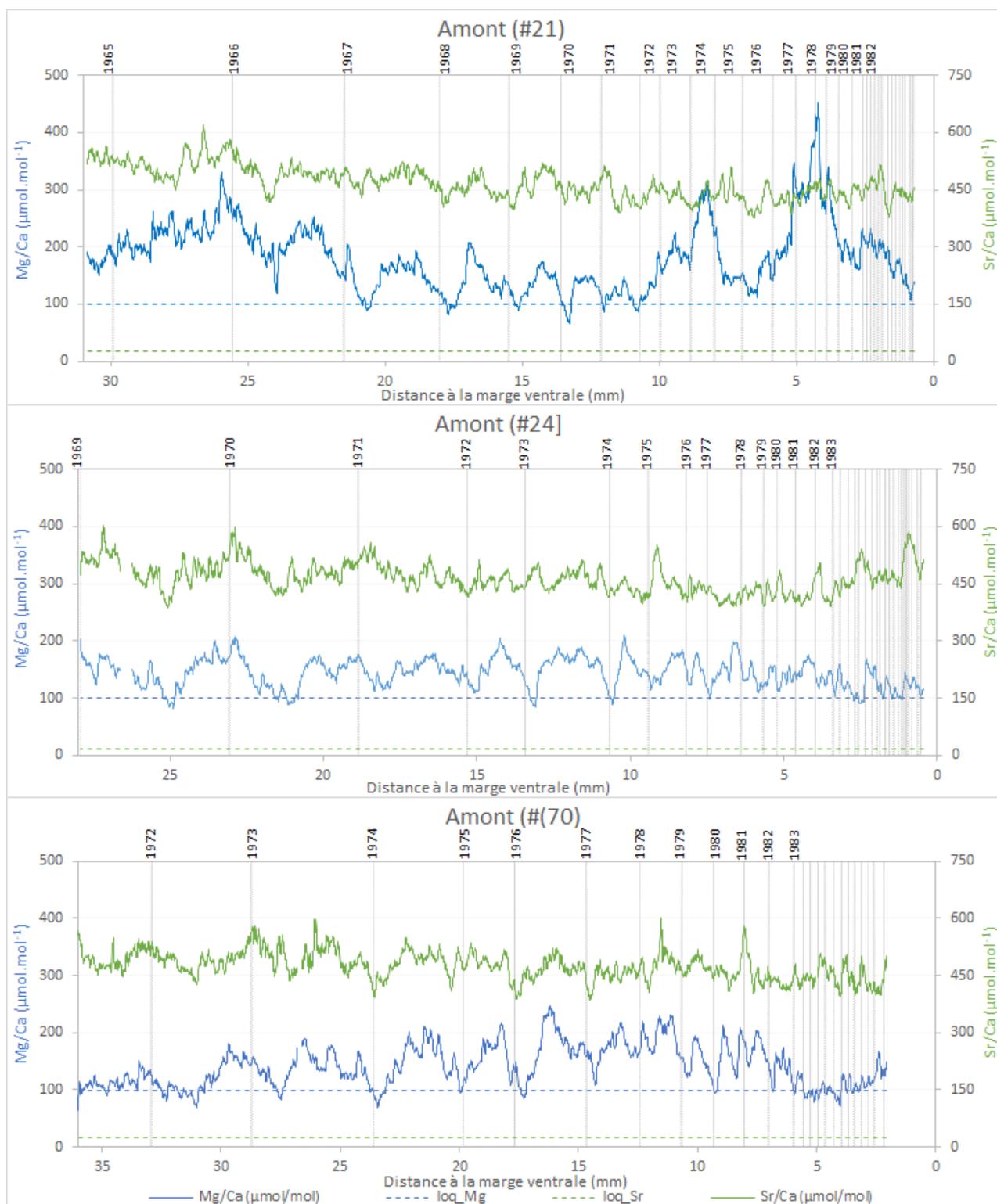


Figure 3 : Variations chronologiques de concentrations en strontium et en magnésium des coquilles de trois individus adultes provenant de l'amont. Les limites de quantification (LOQ = 3x limite de détection) sont représentées en pointillés horizontaux et la position des stries en pointillés verticaux gris (Vieira, 2017).

D'autre part, un travail a été initié sur la détermination du $\delta_{18}\text{O}$ dans les coquilles de *Margaritifera margaritifera* initialement analysées en sclérochronologie lors du stage de Johan Vieira, grâce à un stage de Licence 3 (Albaredes, 2019 ; annexe 2). Il s'agit ici de pouvoir retracer l'historique de la température subie

par les organismes au cours de leur vie et de pouvoir relier cet historique avec celui de l'enregistrement en ETM dans les coquilles. Les analyses de $\delta_{18}\text{O}$ n'ont pas pu être finalisées au cours du stage pour des raisons de disponibilité de l'appareil de mesure, mais le seront d'ici début 2020.

2. Analyse du transcriptome de *Margaritifera margaritifera*.

Le séquençage haut débit du transcriptome de *Margaritifera margaritifera* a été développé sur des échantillons de reins de moules prélevés en 2009 et 2010 en amont et en aval de la décharge sauvage de la Maque (post-doctorat d'Anthony Bertucci, 2015-2017). Celui-ci a été réalisé par la technique de séquençage à haut débit HiSeq3000 d'Illumina sur la plateforme GenoToul qui a également pris en charge la reconstruction des gènes par bioinformatique. Suite à cette analyse, 51 392 gènes ont été identifiés, dont plus de 22 000 ont des fonctions connues chez d'autres espèces. La qualité de ce transcriptome est similaire, voire supérieure, à ce qui existe chez de nombreuses espèces non-modèles en biologie.

Une première approche classique de comparaison entre les sites amont et aval de la décharge n'a révélé que très peu de changements dans les niveaux d'expressions des gènes (41 gènes différemment exprimés). Ce premier résultat peut s'expliquer par une forte variabilité dans la contamination et la réponse des individus.

Nous avons alors choisi d'adopter une approche FAMT (Factorial Analysis for Multiple Testing) afin d'établir des corrélations entre l'expression génique, les paramètres biologiques (taille et âge des individus) et les paramètres environnementaux (niveaux de contamination) (Figure 4).

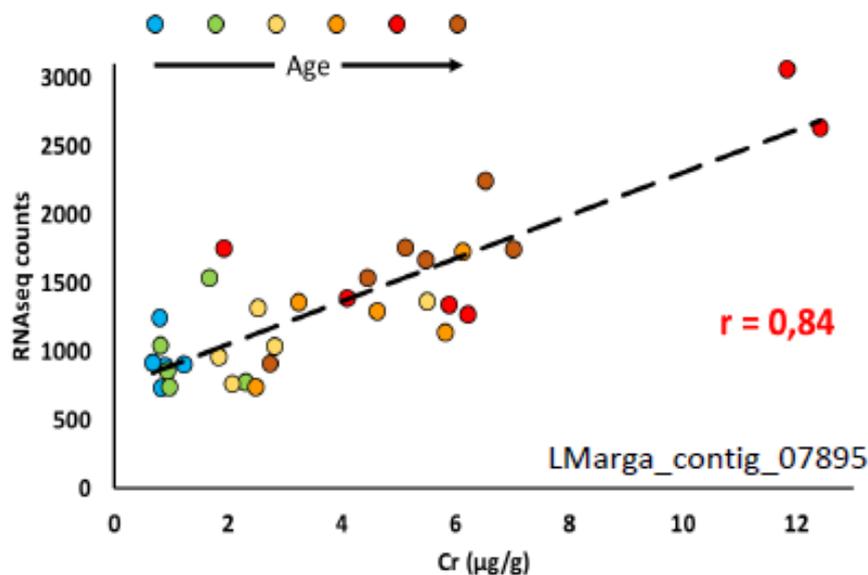


Figure 4 : Exemple de l'expression des gènes spécifiquement corrélés à la concentration en chrome dans les reins des moules perlières, et en fonction de leur âge.

L'âge des individus est le paramètre expliquant le plus grand nombre de variations dans les niveaux d'expression alors que le Cr, le Zn, le Cd et le Ni sont les principaux polluants métalliques produisant un effet sur l'expression génique (Figure 5).

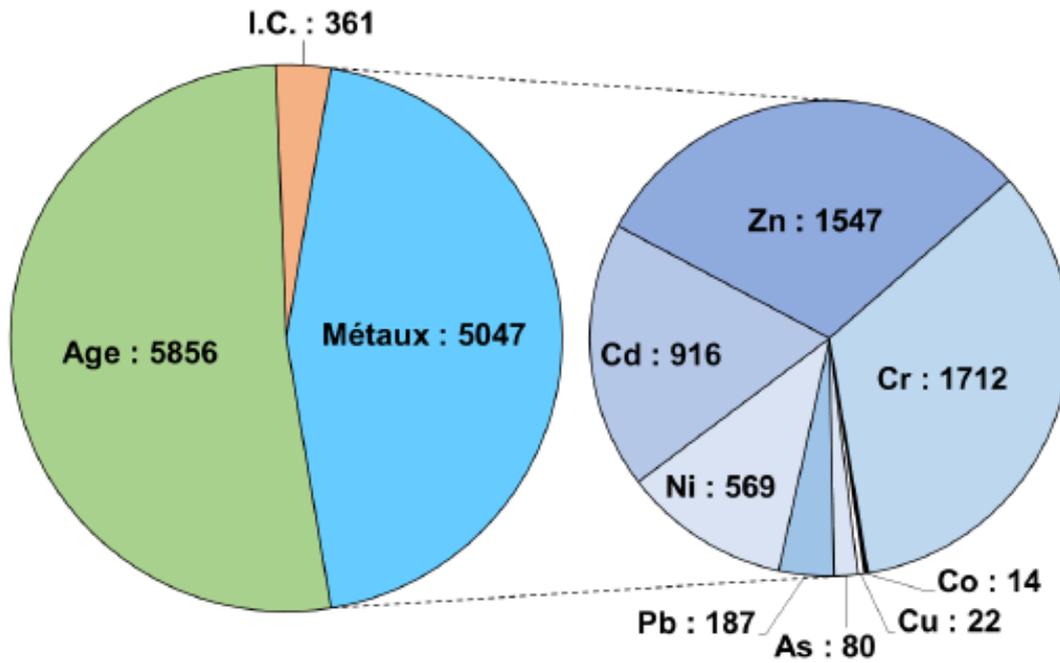


Figure 5 : Nombre de gènes corrélés spécifiquement à un facteur (Bertucci et al, 2017 ; annexe 3).

Les fonctions touchées par ces différents facteurs correspondent principalement pour l'âge à une répression des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN, la transcription ou l'initiation (Tableau 1). L'indice de condition stimule l'activité des facteurs de croissance et la liaison aux carbohydrates. Le chrome induit la régulation des processus apoptotiques et la réponse immunitaire. Le zinc stimule la synthèse des protéines. Le cadmium agit positivement sur la réponse au stimulus et les modifications de protéines. Enfin, le Ni réprime le transport et le plomb le métabolisme protéique.

Tableau 1 : Fonctions des gènes différentiellement exprimés en fonction de chaque facteur étudié.

Facteur	GO-ID	Term	Category	FDR	nb of séquences
Age	GO:0006278	RNA-dependent DNA replication	P	1.94E-11	37
	GO:0006352	DNA-templated transcription, initiation	P	3.08E-3	9
	GO:0015074	DNA integration	P	1.49E-2	12
I.C.	GO:0008083	growth factor activity	F	3.78E-2	4
	GO:0030246	carbohydrate binding	F	3.78E-2	9
Cr	GO:0042981	regulation of apoptotic process	P	7.63E-8	19
	GO:0006955	immune response	P	6.61E-4	11
Zn	GO:0006412	translation	P	2.29E-11	42
Cd	GO:0050896	Response to stimulus	P	-	31
	GO:0006464	Protein modification process	P	-	20
Ni	GO:0006810	Transport	P	-	10
Pb	GO:0019538	Protein metabolism	P	-	13

Afin d'étudier plus en détail l'influence de l'âge, les moules ont été séparées en 3 classes d'âge ce qui a permis de montrer que celles-ci ne sont pas affectées par les mêmes paramètres. En particulier, elles n'ont pas la même sensibilité aux pollutions métalliques, selon leur âge, avec une meilleure réponse à l'âge adulte comparé aux stades juvénile ou plus âgé (Bertucci et al, 2017).

3. Développement d'une méthode non invasive d'analyse du transcriptome de *Margaritifera margaritifera in situ*

De façon à pouvoir continuer l'analyse de l'état de santé des moules perlières dans la Dronne en fonction des habitats ou des sources de contamination ponctuelles que l'on pourrait identifier, mais sans sacrifier de nouveaux individus, il est nécessaire de pouvoir développer une méthode non invasive de prélèvement d'hémolymphe contenant notamment les hémocytes circulants qui sont les cellules immunitaires des bivalves. Sur ces cellules, des analyses transcriptomiques pourraient être développées à partir du choix a priori de gènes d'intérêt tels qu'identifiés lors du séquençage haut débit. Ces analyses n'ont pas encore été commencées sur la moule perlière, mais des mises au point ont été réalisées sur une autre espèce : *Corbicula fluminea* (stage de Master 1 de Floriane Demailly, 2015 ; annexe 4). Les premières analyses semblent prometteuses sur la pertinence de travailler sur ce tissu, car les réponses semblent représentatives de celles mesurées sur d'autres tissus.

4. Analyse de l'effet du cadmium sur *Margaritifera margaritifera*

Suite aux prélèvements de moules réalisés en juillet 2009, nous avons pu étudier spécifiquement en laboratoire l'effet du cadmium sur l'expression quantitative de plusieurs gènes d'intérêt dans les branchies, la masse viscérale et les reins, ainsi que son potentiel rôle de perturbateur endocrinien. En effet, les moules ont été prélevées en pleine maturité sexuelle.

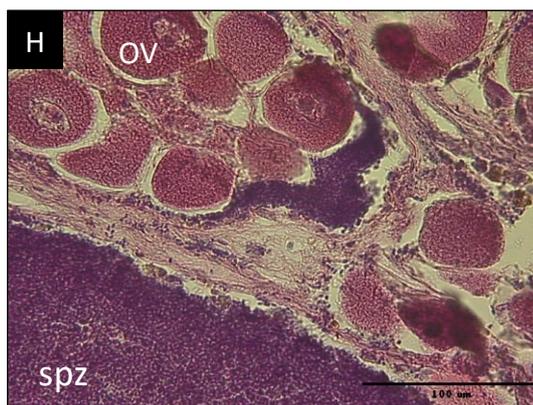
Les principaux résultats obtenus suite à une exposition de 7j au Cd à 2 et 5 µg/L ont montré que la moule perlière était capable d'accumuler fortement le Cd, notamment dans ses branchies, sans que celles-ci ne puissent pour autant synthétiser les protéines de détoxification de ce métal (les métallothionéines). Ces résultats semblent montrer une certaine lenteur de réponse physiologique à la présence de ce métal comparativement à d'autres espèces de mollusques bivalves, ce qui pourrait traduire une mauvaise capacité d'adaptation de l'espèce à la contamination métallique (Baudrimont et al, 2019 ; annexe 5). En termes de réponses transcriptomiques, l'exposition à ce métal provoque dans la masse viscérale un stress oxydant et dans les 3 organes étudiés, une perturbation du métabolisme mitochondrial et une induction de la détoxification. Ces réponses sont classiquement observées chez les organismes aquatiques exposés à ce métal.

Parallèlement à ces réponses, une analyse histologique des gonades des moules perlières a été menée. Les individus témoins ont tous montré des gonades hermaphrodites (Figure 6). Or, il est généralement admis que les moules perlières ont des sexes séparés. Cependant, en cas de mauvaises conditions (mauvaise qualité d'eau ou faible densité de la population), les individus femelles peuvent développer de l'hermaphrodisme pour maintenir leur reproduction (Bauer, 1987). Concernant les moules de la Dronne, il semble que nous soyons dans cette situation, ce qui est positif dans le sens où ces individus sont capables de se reproduire (gonades matures avec ovocytes et spermatozoïdes). Cependant, ces résultats suggèrent une réaction ou adaptation des populations de cette rivière, ce qui peut être jugé de manière plutôt défavorable. Ainsi, lors de l'exposition des moules au Cd, une féminisation des individus est observée, allant jusqu'à 33% des individus à la plus forte concentration d'exposition à ce métal (5 µg/L), mimant exactement l'effet observé en présence d'œstradiol (témoin positif de l'expérience). Le Cd s'est ainsi révélé être un perturbateur endocrinien chez la moule perlière, comme observé précédemment chez l'anguille européenne par exemple (Pierron et al, 2008).

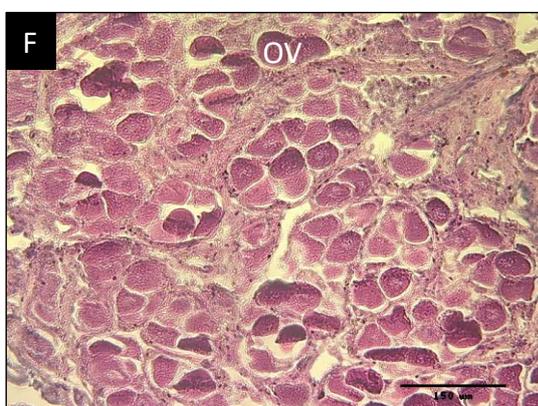
Témoin Amont



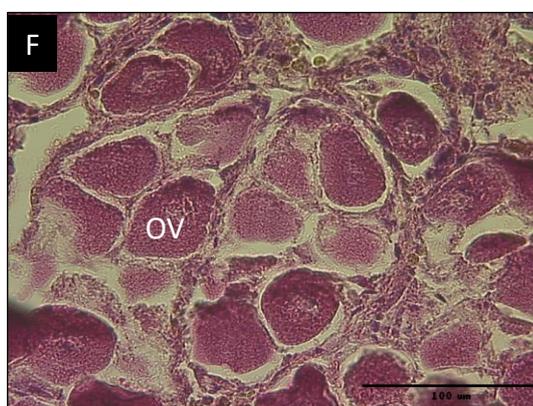
Témoin Amont



Oestradiol



Oestradiol



Cd 5 µg/L



Cd 5 µg/L

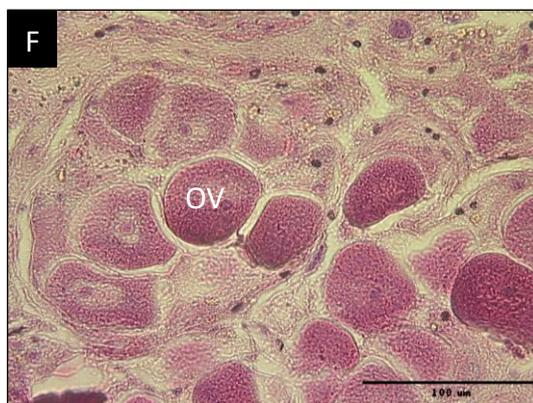


Figure 6 : Analyses histologiques des gonades de moules perlières des conditions témoins, œstradiol et Cd à 5 µg/L. H : hermaphrodite. F : femelle. OV : ovocytes. SPZ : spermatozoïdes (Baudrimont et al, 2019).

Ces travaux ont également fait l'objet de présentations scientifiques lors de réunions ou de colloques internationaux (Tableau 2).

Tableau 2 : Liste des présentations issues des résultats obtenus sur les études écotoxicologiques menées sur les individus adultes de *Margaritifera margaritifera*.

Evènement	Date	Titre et auteurs	Type de présentation
Réunion scientifique Life	20 juin 2017, Firbeix, France	Bertucci A. Séquençage du transcriptome de <i>M. margaritifera</i> – Réponses à une pollution métalliques	Oral
		Vieira J. Détermination de l'âge et des vitesses de croissance de moules perlières originaires de Dronne par analyse sclérochronologique des coquilles et analyse des éléments traces métalliques	Oral
Colloque International SETAC	13-17 Mai 2018, Rome, Italie	Bertucci A. , Pierron F., Thébault J., Klopp C., Bellec J., Gonzalez P. and Baudrimont M. Transcriptomic responses of the endangered freshwater mussel <i>Margaritifera margaritifera</i> to trace metal contamination	Oral
Colloque International FMCS	16-20 Septembre 2018, Verbania, Italie	Bertucci A., Pierron F., Thébault J., Klopp C., Bellec J., Gonzalez P. and Baudrimont M. Transcriptomic responses of the endangered freshwater mussel <i>Margaritifera margaritifera</i> to trace metal contamination	Oral

Conclusion

Les principaux résultats obtenus lors de ces études menées sur les individus adultes ont permis de caractériser l'âge des individus prélevés dans la Dronne en 2009 et 2010 grâce à l'analyse des coquilles, ainsi que leur taux de croissance. Les individus de la Dronne montrent une croissance relativement rapide jusqu'à l'âge de 12 ans et la taille maximale est atteinte aux alentours de 25 ans. Cette stagnation de croissance ensuite ne permet pas une bonne estimation de l'âge des individus à partir de la simple mesure de la longueur des coquilles (âge de 25 à 67 ans pour une même taille de coquille). La vitesse de croissance maximale semble se situer aux alentours de 3 ans. D'autre part, les coquilles incorporent au cours de leur croissance des éléments traces métalliques en fonction des conditions physico-chimiques du milieu, notamment la température qui elle-même peut être retracée à partir de l'analyse du $\delta_{18}O$. Les premières analyses de ce paramètre ont été menées avec succès.

Les analyses génétiques développées ont permis de caractériser pour la première fois le transcriptome de l'espèce et de déterminer sa sensibilité de réponse à la contamination métallique en fonction de l'âge des individus. Ce paramètre est ainsi déterminant dans la capacité des moules perlières à réagir à la contamination métallique, avec les individus d'âge moyen parfaitement capables de se défendre face aux métaux, alors que les individus les plus jeunes sont très sensibles et les plus âgés semblent répondre de moins en moins bien aux métaux.

D'autre part, suite à l'exposition des individus adultes au Cd en laboratoire en pleine maturité sexuelle des individus, nous avons pu mettre en évidence d'une part, que les individus provenant de la

Dronne sont majoritairement hermaphrodites ce qui est signe d'un mauvais état de la population ou de la qualité du milieu ; d'autre part, l'effet toxique du Cd sur les réponses moléculaires ; et enfin, le rôle perturbateur endocrinien du Cd qui conduit à une féminisation des individus exposés. Ces résultats semblent montrer un état assez dégradé de la population de moules perlières en Dronne, mais avec la capacité des individus à pouvoir encore réagir à cet état de dégradation et surtout à pouvoir se reproduire (les gonades arrivent à maturité). Ceci nous conforte dans l'idée de mettre les efforts sur la conservation de la mulette perlière en Dronne, qui représente la population la plus importante de France et la rivière dans laquelle nous avons encore des habitats favorables à son développement.

Perspectives

Concernant les analyses de coquilles de *M. margaritifera*, des analyses de $\delta_{18}\text{O}$ seront poursuivies, et de nouvelles analyses d'ETM par ablation laser-ICP-MS seront développées sur ces mêmes coquilles avec une sensibilité d'analyse supérieure à celles précédemment réalisées afin d'affiner les résultats obtenus.

Pour les analyses génétiques, il reste maintenant à définir de nouveaux marqueurs génétiques d'intérêt pour qualifier l'état de santé des moules perlières en Dronne. Pour cela, étant donné qu'il ne semble pas envisageable de pouvoir prélever de nouveaux individus adultes pour les sacrifier, il sera mis en œuvre la méthode non invasive de prélèvement d'hémolymphe afin d'étudier par expression quantitative les gènes d'intérêt liés à leur état de santé en fonction de leur âge, et en fonction de leur positionnement dans la Dronne (selon les différents types d'habitats qu'elle occupe ou en fonction de la présence de rejets tels que ceux de stations d'épuration des eaux usées). Ces études permettront de pouvoir étendre les analyses non invasives sur d'autres populations européennes de *M. margaritifera* afin d'évaluer leur état de santé et d'identifier les zones sensibles à leur développement.

[2. Sensibilité des stades juvéniles de *Margaritifera margaritifera* aux micropolluants et à la qualité de l'eau en Dronne](#)

Objectifs

L'objectif de cette partie est de caractériser la sensibilité des stades juvéniles de moules perlières aux conditions physico-chimiques et de contamination du milieu de façon à accroître nos connaissances sur l'espèce et à optimiser les stratégies de réintroduction des juvéniles en milieu naturel. Cette action est directement conditionnée par la mise en place de la station d'élevage qui nous a permis d'obtenir des individus juvéniles âgés de 1 à 3 ans. Dans le cadre de cette ferme d'élevage mise en place en juin 2016, nous avons actuellement produit plus de 343 000 mulettes que nous avons mises en élevage depuis le début du projet. Le tableau 3 résume la production actuelle. La 4^{ème} année de production est en cours. A ce jour, le nombre total de mulettes relâchées dans la Dronne est estimé à 250 000 environ, âgées de 0 à 3 ans.

Nous avons d'autre part utilisé à des fins de recherche 3421 mulettes de la première cohorte et 608 mulettes de la deuxième cohorte. Parmi les individus de la première cohorte, 801 ont été ramenés à la ferme (individus témoins non exposés). A ce jour, nous avons donc sacrifié 3228 individus sur les 4000 prévus initialement. Cela représente moins de 1% des effectifs totaux mis en élevage.

D'un point de vue scientifique, cette étude a pour objectif de déterminer les seuils de tolérance des moules perlières juvéniles à plusieurs facteurs environnementaux : salinité, température, oxygène, taux de nitrates, etc..., et de documenter leur sensibilité aux contaminants essentiellement métalliques. D'un point de vue opérationnel, cette étude permettra en outre de guider les meilleures stratégies de réintroduction des juvéniles, et d'affiner ou de modifier d'année en année les zones choisies pour la réintroduction et l'âge de la réintroduction.

Tableau 3 : Bilan de la mise en élevage des jeunes moules et de leur réintroduction dans le milieu naturel.

Cohorte	2016	2017	2018
Taille à l'excystement	250-300 microns	320-340 microns	320-350 microns
Degrés-jours à l'excystement	1600-2450	1600-2450	1743-2046
Nombre d'individus mis en élevage	96 000	97 950	150 000
Taille actuelle des moules	5,25 mm	2 mm	0,48 mm
Survie après 1 an	14.6 % * (7-31%)	3% (0-8,6%)	
Nombre de moules relâchées sur truitelles	-	52 000	83 000
Nombre de moules relâchées directement après excystement	-	68 000	47 000
Nombre de moules relâchées après 1 an	54	-	
Nombre de moules relâchées après 2 ans	1830		
Nombre de moules relâchées après 3 ans	2000		

* Taux de survie entre 18 et 30 mois : 93%

Résultats attendus

Il est attendu ici de caractériser finement le degré de tolérance ou de résistance de la moule perlière à différents facteurs abiotiques et de contamination potentiellement rencontrés en milieu naturel et de mettre en place grâce à cela les meilleures stratégies de réintroduction des juvéniles en milieu naturel.

Résultats obtenus

Cette action a démarré au 1^{er} juin 2017 avec le recrutement de Tiare Belamy, étudiante en Thèse de doctorat pour 3 ans, sur l'Étude de la sensibilité des juvéniles de moule perlière aux facteurs environnementaux et de contamination. L'encadrement de cette Thèse est assuré par Magalie Baudrimont et Alexia Legeay, de l'UMR EPOC, université de Bordeaux.

Les premiers travaux de la Thèse ont permis de mettre au point dans un premier temps les conditions de transport et de stabulation des glochidies et des juvéniles de moules perlières en laboratoire à Arcachon, de manière à pouvoir ensuite développer toutes les expérimentations en conditions contrôlées.

Les premières études de tolérance des juvéniles de moules perlières à différents facteurs de l'environnement ont ainsi pu débuter, avec tout d'abord des tests d'évaluation de la mortalité des juvéniles en fonction d'une gamme de concentrations du facteur étudié (tests de toxicité aiguë). Ces approches ont permis de pouvoir mesurer les premières CL50 (concentrations létales pour 50 % de la population) de l'espèce et les comparer à la littérature. Par exemple, la CL50 pour la salinité, utilisée comme toxique de référence dans plusieurs tests sur organismes aquatiques d'eau douce, a pu être déterminée à 0,96 g/L après 48h00 (Figure 7), ce qui est très faible comparativement à d'autres espèces de moules d'eau douce (Figure 8).

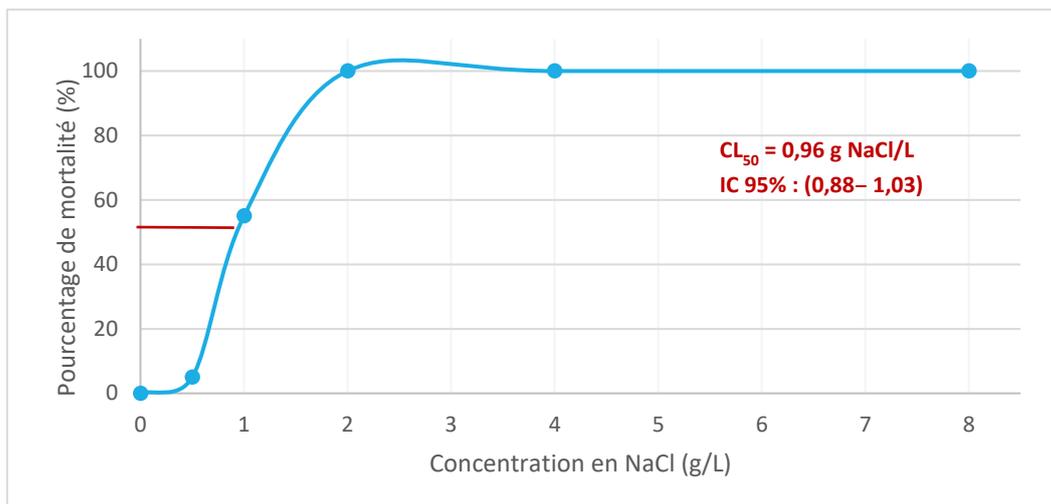


Figure 7 : Pourcentage de mortalité des juvéniles de *M. margaritifera* (âgés de 13 mois) en fonction de la concentration en sel (en g/L) pour une durée d'exposition de 48 heures.

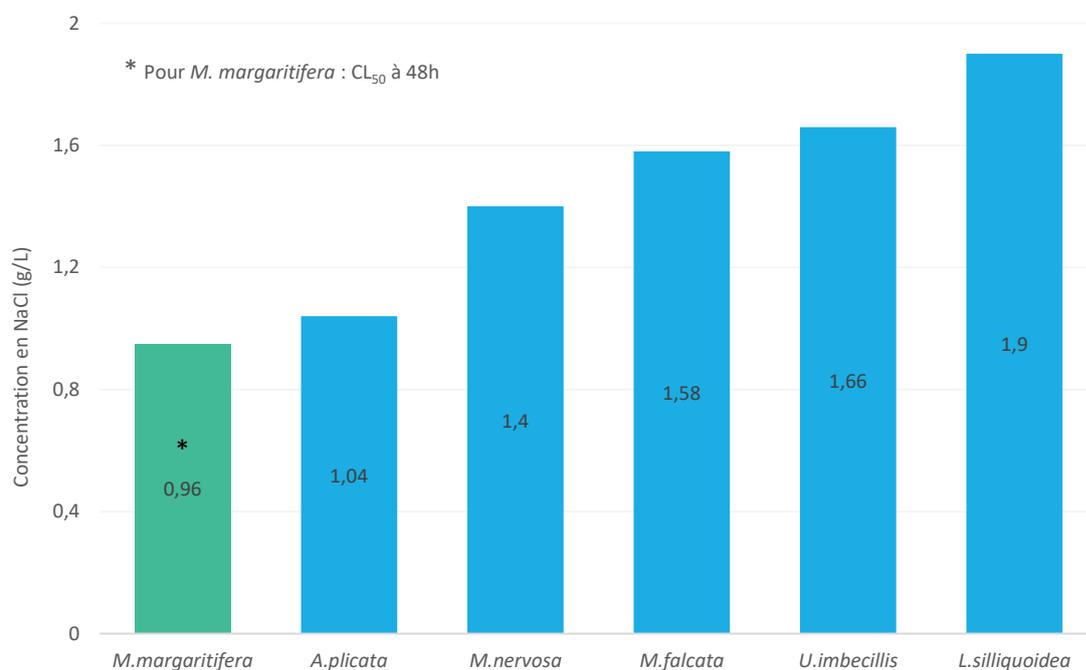


Figure 8 : Comparaison des CL50 pour le NaCl à 96h00 sur juvéniles de différentes espèces de moules d'eau douce (d'après Wang et al, 2017).

Les mêmes types de tests ont été menés avec les nitrates et les phosphates, et les résultats montrent une grande tolérance des juvéniles de moules perlières à ces 2 paramètres, avec une CL50 mesurée à 1023 mg/L de nitrates et aucune mortalité jusqu'à une concentration de 6 mg/L de phosphates, qui sont des concentrations très rarement retrouvées en milieu naturel et *a fortiori* dans la Dronne.

Dans la suite de ces travaux, différents tests de mortalité ont été réalisés en laboratoire de manière à évaluer les seuils de tolérance des jeunes mulettes à la salinité en fonction de l'âge des individus et de la présence ou non de substrat pendant l'expérimentation, selon le guide ASTM (American Society of Testing Materials), 2006 (Standard Guide for Conduction Laboratory Toxicity Tests with Freshwater Mussels. E2455-06. In *Annual Book of ASTM Standards, Volume. 11.06*). Ces expérimentations ont été

complétées par l'analyse de leur tolérance aux métaux, notamment au cadmium, à l'arsenic et à l'aluminium qui sont potentiellement retrouvés dans la Dronne. Les seuils de toxicité obtenus sont répertoriés dans le tableau suivant (Tableau 4).

Tableau 4: Concentrations létales à 50% (CL50) de différents contaminants obtenus après une exposition de 96 heures des juvéniles de *M. margaritifera* âgés de 10 à 28 mois

Contaminants		Âge des juvéniles (mois)	CL ₅₀ (48h)	CL ₅₀ (96h)	Unités
NaCl	Chlorure de sodium	10	1.1 (0,87 - 1,33)	ND ^a	g/L
NaCl	Chlorure de sodium (1)	22	> 1,6 ^b	1,19 (1,11 - 1,28)	g/L
NaCl	Chlorure de sodium	22	1,5 (1,35 - 1,66)	1,33 (1,24 - 1,42)	g/L
NO ₃ ⁻	Nitrates	13	> 2290 ^b	1000 – 1500 ^c	mg/L
PO ₄ ³⁻	Phosphates	13	> 5.01 ^b	> 5.01 ^b	mg/L
CdCl ₂	Cadmium	16	> 112 ^b	> 112 ^b	µg/L
CdCl ₂	Cadmium (1)	22	> 147 ^b	> 147 ^b	µg/L
CdCl ₂	Cadmium	22	> 110 ^b	> 110 ^b	µg/L
As ₂ O ₅	Arsenic	17	> 127 ^b	> 127 ^b	µg/L
AlCl ₃	Aluminium	28	> 954 ^b	> 954 ^b	µg/L

^aND = non déterminé

^bMortalité insuffisante pour déterminer un seuil de toxicité

^cGamme de valeur pour le seuil de toxicité, facteur trop élevé entre deux concentrations d'exposition (1)Expériences réalisées sans substrat (ASTM, 2006).

Les résultats montrent une très faible sensibilité des juvéniles âgés de 10 à 28 mois aux différents facteurs étudiés (hormis la salinité) puisque les seuils de toxicité sont supérieurs aux plus grandes concentrations étudiées, celles-ci étant largement supérieures à celles retrouvées dans l'environnement. Une sensibilité supérieure des individus les plus jeunes est cependant retrouvée, notamment pour la salinité. D'autre part, la présence ou l'absence de substrat pour réaliser ces tests n'influe pas sur les résultats obtenus, ce qui a permis de valider le protocole que nous avons choisi, à savoir d'utiliser un substrat afin que les jeunes mulettes soient dans les conditions les plus proches possible de leur habitat naturel.

Les résultats obtenus pour des juvéniles âgés de moins de 5 jours après décrochage (Tableau 5) montrent une sensibilité plus grande pour les plus jeunes, notamment pour le cadmium et les nitrates. Par exemple pour le cadmium, un seuil de 35.3 µg/L est déterminé pour des juvéniles de 5 jours contre un seuil supérieur à 120 µg/L pour des juvéniles de plus de 16 mois. En ce qui concerne les autres facteurs comme l'aluminium ou les phosphates, les seuils de toxicité sont toujours supérieurs aux plus grandes concentrations testées même pour les très jeunes juvéniles.

Tableau 5 : Seuils de toxicité (CL50) obtenus pour les juvéniles de *M. margaritifera* fraîchement décrochés (< 5 jours) après exposition à différentes concentrations en contaminant pendant 96 h. (Les valeurs sont exprimées en concentrations nominales)

Contaminants	CL50 – 96h (IC 95%)
Cadmium (µg/L)	35.3 (30.22 - 40.38)
Nitrates (mg/L)	1006.14 (844.19 - 1168.03)
Cuivre (µg/L)	33.55 (30.08 - 37.03)
Nickel (µg/L)	105.24 (99.5 - 110.99)
Phosphates (mg/L)	> 6
Aluminium (µg/L)	> 1000
Arsenic (µg/L)	> 120

Ces résultats montrent finalement que les juvéniles de moule perlière sont relativement tolérants à de fortes concentrations en contaminants. Cependant, bien que ces facteurs en fortes concentrations n'affectent pas la viabilité des organismes, des effets chroniques ou sub-létaux peuvent être observés.

C'est pour cela que dans un deuxième temps, les effets chroniques des différents facteurs sont étudiés par l'analyse de l'expression des gènes (Tableau 6) ou encore par l'étude du comportement des juvéniles.

Tableau 6 : Liste des gènes étudiés et leurs fonctions associées

Fonctions	Gènes	Fonctions	Gènes	Fonctions	Gènes
Stress oxydant	<i>Sod1</i>	Apoptose	<i>Casp 3</i>	Immunité	<i>C3</i>
	<i>Sod2</i>		<i>Casp 8</i>	Références	<i>Actine</i>
	<i>Sod3</i>		<i>Bak</i>		<i>RPL7</i>
	<i>Cat</i>		<i>CARD11</i>		<i>EF1</i>
Mitochondrie	<i>Cox1</i>		<i>P53</i>		
	<i>12S</i>		<i>Bcl2</i>		
Détoxication	<i>mt1</i>	Réparation de l'ADN	<i>RAD51</i>		
	<i>MXR</i>		<i>XRCC4</i>		
	<i>GSTpi</i>	Traduction	<i>EIF2</i>		

Les premiers tests ont permis de montrer que l'exposition des juvéniles à des concentrations environnementales en cadmium et en arsenic induisait un changement dans l'expression des gènes impliqués dans les processus de mort cellulaire et de détoxication. Les résultats sont exprimés en « fold change » correspondant au facteur d'expression du gène par rapport à l'expression du même gène chez le témoin (Figure 9). Un « fold change » supérieur à 1 correspond à une surexpression du gène par rapport aux témoins et lorsque celui-ci est inférieur à 1, à une répression du même gène. Dans la figure 9, seuls les résultats statistiquement significatifs sont présentés.

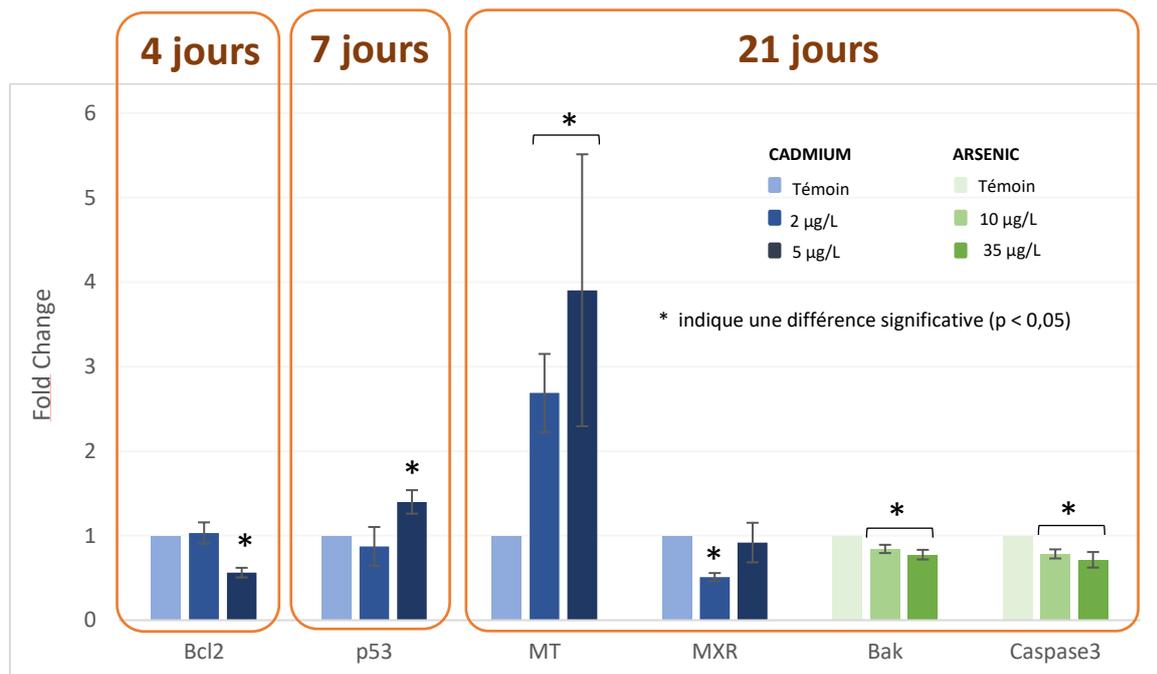


Figure 9 : Expression de différents gènes par rapport aux témoins après 4, 7 et 21 jours d'exposition des juvéniles de *M. margaritifera* âgés de 17 mois à différentes concentrations en cadmium et en arsenic.

Ces résultats montrent qu'une exposition à de faibles concentrations en cadmium et en arsenic peut induire un impact sur l'expression de gènes impliqués dans les processus d'apoptose et de détoxication et que cet impact diffère en fonction du temps. Une différence dans l'expression des gènes Bcl2, p53, Bak et Caspase3 chez les individus exposés comparé aux individus témoins, montre que le processus de mort cellulaire pourrait être activé ou inhibé. L'expression des gènes MT et MXR montre quant à elle que le processus de détoxication est enclenché ou stoppé. Il est important de noter que l'expression d'un gène ne conduit pas forcément à la production de la protéine impliquée dans les divers processus cités précédemment mais permet d'avoir une idée des premières réponses au stress induit par une contamination au cadmium ou à l'arsenic.

Concernant les études de comportement, des juvéniles préalablement exposés au NaCl pendant 24 heures ont montré une réduction dans leur vitesse de déplacement ou dans la distance parcourue par les organismes. Ces premiers résultats permettent d'apporter de nouvelles réponses ou connaissances sur l'effet des facteurs étudiés sur les juvéniles de moule perlière. D'autres expérimentations seront réalisées en exposant les juvéniles à un cocktail de contaminants pour se rapprocher au mieux des conditions environnementales. L'ensemble plus détaillé des résultats obtenus est contenu dans l'annexe 6.

Les résultats obtenus ont déjà fait l'objet de plusieurs présentations en congrès (Tableau 6).

Tableau 6 : Liste des présentations issues des résultats obtenus sur les études écotoxicologiques menées sur les juvéniles de *Margaritifera margaritifera*.

Evènement	Date	Titre et auteurs	Type de présentation
Journées d'échange scientifique EPOC	4-5 Avril 2018, Bordeaux	Belamy T. , Baudrimont M.,_Etcheverria B. et Legeay A. Sensibilité des juvéniles de moule perlière (<i>Margaritifera margaritifera</i>) aux facteurs environnementaux et de contamination	Poster
Colloque International SETAC	13-17 Mai 2018, Rome	Belamy T. , Legeay A., Etcheverria B. and Baudrimont M. Sensitivity of freshwater pearl mussel juveniles (<i>Margaritifera margaritifera</i>) to different environmental and contamination factors	Poster
Colloque international ECOBIM	22-25 Mai 2018, Bordeaux	Belamy T. , Legeay A., Etcheverria B. et Baudrimont M. Sensibilité des juvéniles de moule perlière (<i>Margaritifera margaritifera</i>) aux facteurs environnementaux et de contamination	Poster
Colloque international FMCS	16-20 Septembre 2018, Verbania, Italie	Belamy T. , Baudrimont M., Etcheberria B. and Legeay A. Ecotoxicological studies on juvenile of <i>Margaritifera margaritifera</i> for reintroduction of this endangered species	Oral
International workshop on freshwater mussels : Search for resettlement habitats and evaluation of protection measures	25-27 mars 2019, Dresden, Germany	Belamy T. , Legeay A., Etcheverria B. and Baudrimont Acute toxicity of sodium chloride, nitrates, phosphates, cadmium and arsenic to freshwater pearl mussel juveniles (<i>Margaritifera margaritifera</i>)	Oral
SETAC Europe 29th annual meeting	26-30 may 2019, Helsinki, Finland	Belamy T. , Legeay A., Etcheverria B. et Baudrimont. Acute toxicity of different toxicants to freshwater pearl mussel juveniles (<i>Margaritifera margaritifera</i>)	Poster

Conclusion

Les résultats obtenus après la mise en place des tests de toxicité aiguës développés sur les juvéniles de moules perlières âgées de 5 jours à 22 mois, montrent d'une part une sensibilité des individus en fonction de leur âge (plus ils sont jeunes, plus ils sont sensibles aux facteurs testés), et d'autre part une relative grande tolérance à la plupart des facteurs testés (nitrates, phosphates, Cd, As, ...), hormis le NaCl, pour lequel la moule perlière se révèle être plus sensible que d'autres espèces de mollusques bivalves d'eau douce.

Les premiers résultats obtenus suite à une exposition chronique des individus à l'As ou au Cd à des doses environnementales, montrent au contraire des réponses transcriptomiques précoces induisant des

processus d'apoptose (mort cellulaire) ou modulant les processus de détoxification. Les études de comportement semblent montrer également une forte sensibilité des juvéniles de moules perlières au NaCl qui diminue la vitesse de déplacement des individus et également la distance parcourue.

Perspectives

La suite de la Thèse va être consacrée à la poursuite d'études de toxicité plus chroniques visant à étudier les réponses essentiellement génétiques des moules juvéniles face aux métaux et aux variations des facteurs environnementaux, étudiés de façon individuelle ou couplée. Ces approches seront couplées à des études épigénétiques qui s'intéresseront notamment au rôle de ces paramètres lors de la croissance des individus, ainsi que lors des expositions aux contaminants métalliques. De plus, certains biomarqueurs biochimiques plus classiques seront également suivis, tels que la synthèse de protéines de détoxification ou la peroxydation des lipides membranaires.

D'autre part, seront développées des analyses du comportement des juvéniles de moules perlières après exposition aux différents facteurs d'intérêt, notamment leur capacité à se déplacer ou à s'enfouir dans le sédiment. Ce sont des paramètres complémentaires de suivi des impacts sur les juvéniles qui peuvent se révéler parfois plus sensibles que certains autres paramètres.

3. Caractérisation des niveaux de contaminants métalliques de la Dronne (eau, sédiment, bryophytes)

Objectifs

L'objectif de cette caractérisation est de déterminer les niveaux de contamination métallique de la rivière Dronne dans l'eau, les sédiments et les bryophytes, au niveau des points de suivi de la qualité physico-chimique du milieu, en relation avec les actions d'aménagement prévues au cours du projet. En effet, la dangerosité des micropolluants vis-à-vis des organismes aquatiques est largement documentée dans la littérature, et compte tenu de la sensibilité toute particulière de la moule perlière à la qualité de l'eau, cette caractérisation s'avère indispensable afin de vérifier l'innocuité des travaux d'aménagement qui seront opérés vis-à-vis de la libération éventuelle de contaminants présents dans les sédiments et également pour vérifier la bonne qualité chimique de la rivière Dronne au niveau des zones à *Margaritifera margaritifera*.

Cette action permettra en outre de guider les stratégies de réintroduction des juvéniles de moules perlières dans les zones les plus favorables à leur développement, en couplant ces données de contamination métallique à celles de suivi de la qualité physico-chimique des eaux et à la caractérisation du degré de tolérance des juvéniles aux différents facteurs environnementaux ou de contamination.

Résultats attendus

Les résultats attendus de cette action concernent la caractérisation spatio-temporelle de la contamination métallique de la Dronne au cours des travaux d'aménagement réalisés, de façon à identifier les zones critiques pour le développement ou la survie des moules perlières déjà présentes, ainsi que pour la réintroduction des juvéniles issus de la ferme d'élevage.

Résultats obtenus

1. Résultats avant travaux

La première campagne de prélèvements d'échantillons d'eau et de sédiments (amont et aval des seuils) a été réalisée avant le début des travaux entre fin octobre et début novembre 2015 sur 10 sites (Figure 10) : Bussières-Galant aval Ribières, Forge de Firbeix, Moulin du Blé, Moulin de la Maque, Moulin du Pont, Moulin de Mézières, Bussière-Galant RD59, Digue de Pagnac, Tannerie St Pardoux et St Pardoux centre. Quant aux bryophytes, elles n'ont pu être échantillonnées que sur les 6 premiers et à l'aval de chaque ouvrage.

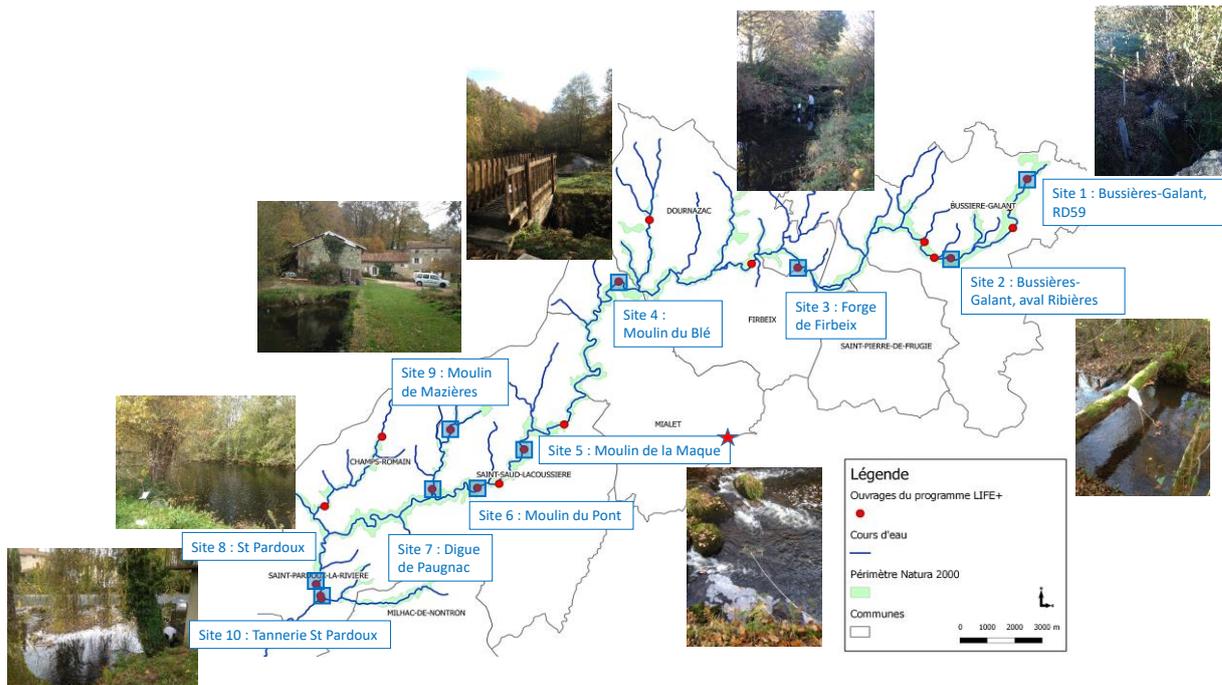


Figure 10 : Localisation des différents sites échantillonnés pour les analyses de métaux dans l'eau, les sédiments et les bryophytes

Des capteurs passifs de métaux (DGT : Diffusive gradient gel in thin films) ont aussi été immergés sur chacun des sites durant 15 jours. Les quantifications de As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Se, V, Zn, Al, Fe et Mn ont été réalisées par ICP-OES pour les bryophytes et par ICP-MS pour l'eau, les sédiments et les DGT. De plus, les dosages du Ba, Mo, Sb, Sn, Sr, Th et U ont uniquement été opérés pour les sédiments à l'ICP-MS. Un exercice d'intercalibration entre les deux techniques d'analyses a été réalisé pour vérifier la validité de nos méthodes de dosages.

Excepté pour l'Ag qui n'a pas été détecté par l'appareil, les premiers résultats des analyses montrent des profils d'accumulation similaires entre les métaux, à savoir des concentrations métalliques dans les bryophytes en moyenne 2 à 3 fois supérieures à la Forge de Firbeix et au Moulin de Mézières par rapport au Moulin du Pont, Moulin de la Maque, Moulin du Blé et Bussière Galant (aval Ribière). On notera cependant que les teneurs en As et Fe au Moulin du Blé et en Cu à Bussière (aval de Ribière) sont aussi importantes qu'aux deux sites où les mousses ont le plus accumulé.

Les concentrations métalliques dans l'eau sont faibles et inférieures aux PNEC (« Predicted No Effect Concentration », plus forte concentration de la substance sans risque pour l'environnement) exceptées pour **(1) Al et Mn** à tous les sites avec des valeurs jusqu'à 15000 fois supérieures pour l'Al et 45 fois pour le Mn à Bussière Galant (RD 59), **(2) As** à Bussière Galant (aval Ribières et RD 59) où les

concentrations à l'aval de Ribière sont les plus élevées et 8 fois supérieures à la PNEC, à Firbeix, Moulin du Blé, au Moulin de la Maque, au Moulin du Pont, à St Pardoux et à la Tannerie, **(3)** Co à Firbeix (rejet) et à Bussière-Galant (RD 59), **(4)** Cu à Bussière-Galant (aval Ribières et RD59) et au Moulin de Mézière, **(5)** V à Bussière-Galant (RD59).

Les analyses montrent ensuite des concentrations métalliques supérieures dans les sédiments situés à l'amont des ouvrages à la Tannerie, à la Forge de Firbeix, au Moulin de Mazière et du Blé avec des niveaux pouvant atteindre respectivement 5 fois ceux de l'aval pour le Cd, 2,5 fois pour le Pb, 3 fois pour le Mo ou encore 3 fois pour le Ni. Le Moulin de la Maque et St Pardoux font figure d'exception avec des concentrations majoritairement plus élevées à l'aval des seuils avec par exemple un rapport de 5 pour Cr et V pour le premier et un rapport de 2 pour As et Sn pour le second. Dans la fraction fine (63 µm) qui concentre les métaux, les concentrations en Mo, V, Cr, Ni, Co, Cd, Cu, Th, Ag, U, Zn et As sont plus importantes à Firbeix, à St Pardoux, à la Tannerie, au Moulin du Pont, de la Maque et du Blé alors que le Ba, Sr et Sb sont plus élevés à Bussière-Galant (RD59), Firbeix, Tannerie, Moulin du Pont et Moulin du Blé. Enfin, les niveaux de Pb et Sn dans cette fraction sont supérieurs à la Digue de Pagnac, Moulin de Mézières, St Pardoux. Lorsqu'on compare ces données avec les seuils réglementaires, les concentrations en As à l'amont des ouvrages à la Forge de Firbeix, au Moulin du Blé, Moulin de la Maque et en Pb à la Digue de Pagnac dépassent respectivement les 30 mg/kg et des 100 mg/kg fixés par la référence S1 de l'arrêté interministériel qui permet d'apprécier la qualité des sédiments extraits des cours d'eau.

Les niveaux de contamination métallique dans la Dronne ont enfin été étudiés à travers l'immersion de capteurs passifs DGT. Ces dispositifs permettent d'accumuler sur une période donnée les métaux dissous « labiles » (forme ionique libre, organique ou inorganique) considérés comme les plus biodisponibles.

Parmi les substances classées comme prioritaires dans la DCE, la concentration en Ni est deux fois plus élevée à Bussière-Galant qu'aux autres sites et le Pb présente un gradient décroissant d'accumulation de l'amont vers l'aval dans les DGT. Trois groupes se distinguent **(1)** « *Bussière Galant et Forge de Firbeix* », **(2)** « *Moulin du Blé, Moulin de la Maque et Moulin du Pont* » et **(3)** « *Digue de Pagnac et St Pardoux* » avec le groupe 1 ayant des concentrations en Pb 2 fois supérieures au groupe 2 qui a lui-même des concentrations 7 fois supérieures au groupe 3. Les teneurs en Zn, classé comme substance pertinente dans la DCE, sont très variables et présentent peu de différences significatives entre les sites. Nous constatons néanmoins que le Zn est 5 fois moins concentré dans les DGT au Moulin de Mézière (0.15 µg/L) qu'au Moulin de la Maque (0.81 µg/L). Les profils d'accumulation de l'Al et du Fe labiles sont très similaires avec des concentrations plus fortes à Bussière-Galant qui décroissent jusqu'au Moulin du Blé, elles sont ensuite multipliées par 2,5 au Moulin de la Maque pour enfin décroître en aval de la Dronne. Contrairement au Fe, l'Al augmente à nouveau au Moulin de Mézière situé sur un affluent de la Dronne et à la Tannerie. Les concentrations en Mn très variables le long du linéaire permettent de regrouper les sites selon des niveaux croissants d'accumulation : **(1)** « *Moulin du Blé, Moulin du Pont, St Pardoux et la Tannerie* » ($[Mn]_{\text{moyenne}} = 3,1 \mu\text{g/L}$), **(2)** « *Bussière-Galant (RD59), Forge Firbeix, Moulin de la Maque et de Mézière, la digue de Pagnac* » ($[Mn]_{\text{moyenne}} = 8,6 \mu\text{g/L}$) et **(3)** « *Bussière-Galant (aval Ribière)* » ($[Mn]_{\text{moyenne}} = 29,1 \mu\text{g/L}$). De plus, les sites de Bussière-Galant sont caractérisés par des niveaux en As et V potentiellement biodisponibles supérieurs et confirment nos observations dans l'eau. Les résultats de ces analyses sont présentés en annexe 7.

2. Résultats pendant et après travaux

Concernant les suivis pendant et après travaux, seuls 4 sites ont pu être échantillonnés durant les travaux : Saint Pardoux (novembre 2016), Moulin de la Maque (novembre 2016), Firbeix (février 2017) et la Tannerie de St Pardoux (juin 2019). Les autres travaux ayant été repoussés, ils restent prévus pour 2019-

2020. Pour le suivi après travaux, les 3 premiers sites ont pu être échantillonnés en juillet 2018, soit plus d'un an après travaux (Figure 11).

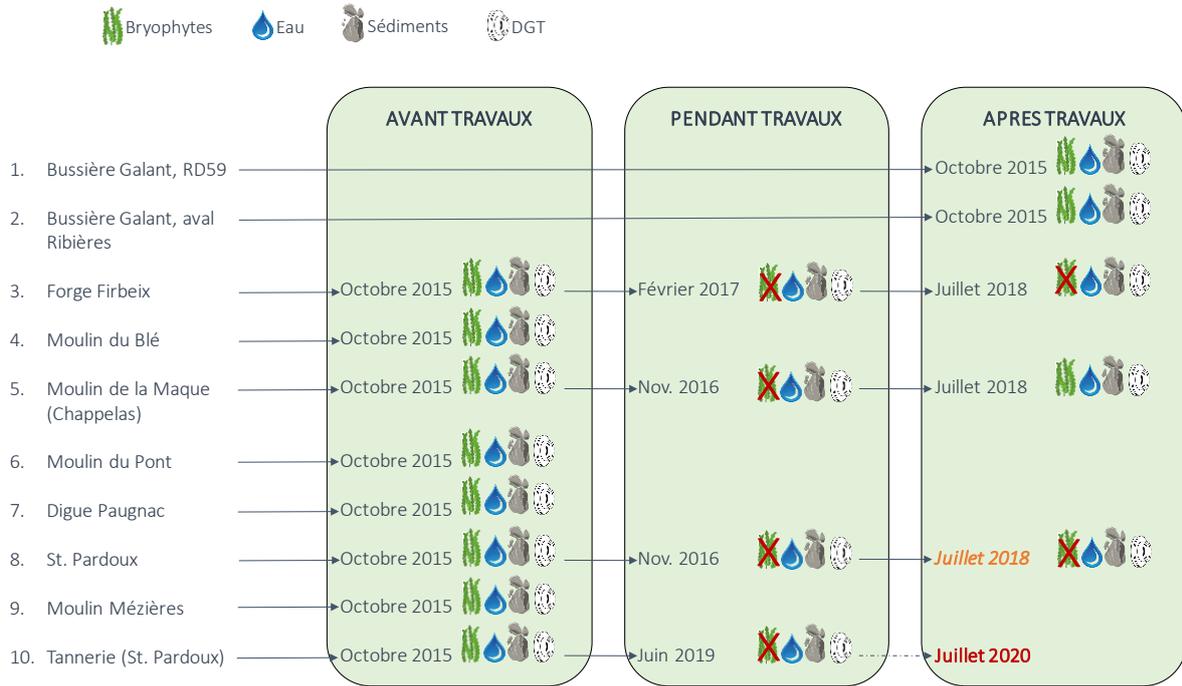


Figure 11 : Bilan des prélèvements réalisés avant, pendant et après travaux sur les principaux ouvrages.

Concernant les résultats obtenus sur les bryophytes échantillonnées uniquement sur le Moulin de la Maque, nous constatons qu'après travaux, une majorité de métaux sont encore au-dessus des concentrations initiales, notamment le Cd, alors que le Cr voit ses concentrations diminuées (Figure 12).

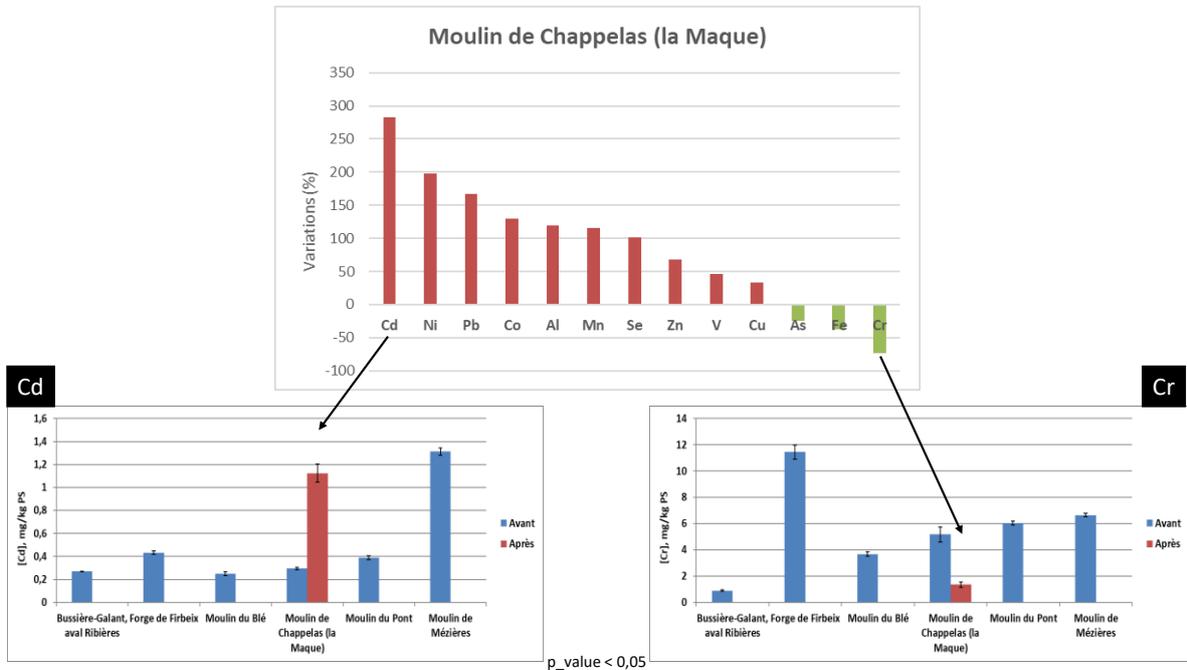


Figure 12 : Pourcentages de variation des métaux après travaux comparativement à avant et concentrations de Cd et de Cr mesurées dans les bryophytes.

Concernant les premières analyses de métaux labiles obtenues grâce aux DGT, nous constatons globalement la même chose, à savoir que la majorité des métaux voient leur concentration pendant et même après travaux toujours plus élevée que celle avant travaux (Al, As, Co, Cu, Mn, Ni, V) (Figure 13), alors que d'autres voient leur concentration revenir au niveau d'origine (Cr, Fe, Zn), voire à un niveau inférieur (Pb).

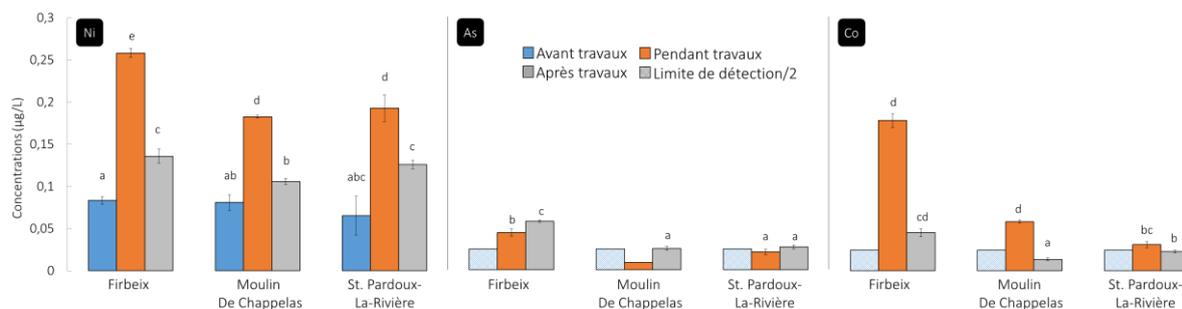


Figure 13 : Concentrations métalliques labiles de Ni, As et Co avant, pendant et après travaux pour les 3 principaux sites suivis : Firbeix, Moulin de la Maque (Chappelas) et St Pardoux.

Les résultats de ces suivis ont été présentés sous forme de poster lors du colloque final du projet Life en novembre 2019 (annexe 8).

Conclusion

L'ensemble de ces résultats montre que les travaux ont perturbé momentanément les taux de métaux biodisponibles dans la rivière Dronne, mais que la tendance est à la réduction des apports au cours du temps. Ces effets ont néanmoins été considérablement amoindris par les précautions prises durant les travaux pour limiter au maximum le relargage de sédiments fins et donc de métaux vers l'aval de chaque ouvrage, comparativement à l'éventualité d'une rupture accidentelle de ces ouvrages.

Perspectives

Concernant les analyses des prélèvements après travaux de la tannerie de St Pardoux, l'échantillonnage devrait se faire en juillet 2020, et l'obtention des résultats d'analyses d'ici fin 2020. Il aurait été intéressant de poursuivre les prélèvements après travaux sur plus long terme (après 2 voire 3 ans après travaux), afin de vérifier le retour de la contamination en métaux à l'état initial pour les différents ouvrages concernés.

CONCLUSION GENERALE

Les différentes études menées dans le cadre de ce volet d'amélioration des connaissances sur la biologie et l'écotoxicologie de la moule perlière *Margaritifera margaritifera* du projet Life+ Nature portant sur la préservation de la moule perlière et la restauration de la continuité écologique de la Haute Dronne, nous ont apporté de nouvelles données à plusieurs niveaux.

Dans un premier temps, nous avons pu caractériser grâce à des analyses sclérochronologiques de la coquille, la courbe et la vitesse de croissance des individus adultes de moule perlière de la Dronne. Celle-ci est relativement rapide sur les premiers 12 ans et se rapproche de celle mesurée sur des populations en Espagne. Ensuite, la croissance en longueur stagne à partir de 25 ans, ne permettant pas une analyse précise

de l'âge des individus par la simple mesure de la longueur de la coquille. Au cours de leur vie, les coquilles témoignent également des modifications des conditions environnementales dans lesquelles se trouvent les moules (température, physico-chimie, contamination métallique) par l'enregistrement d'éléments traces métalliques dans les coquille (analyses par sclérochimie) ou par mesure isotopique du $\delta_{18}O$, témoin de la température de l'eau.

Dans un deuxième temps, ces études ont permis pour la première fois de déterminer le transcriptome de l'espèce par séquençage haut débit, à partir des individus de moules perlières adultes préalablement prélevés en 2009 et 2010. L'analyse de ces réponses génétiques a permis de mettre en évidence un très fort effet de l'âge sur les réponses des individus à la pollution métallique. Les individus les plus jeunes sont par exemple très sensibles au Cu, les plus âgés répondent surtout au facteur âge, et les individus d'âge intermédiaire sont les mieux armés pour lutter contre la pollution métallique. D'autre part, nous avons pu montrer à partir d'expérimentations en laboratoire l'impact spécifique du Cd sur l'espèce, qui montre des perturbations du métabolisme mitochondrial et du stress oxydant cellulaire, mais aussi le rôle de perturbateur endocrinien de cet élément (féminisation des individus). Ceci montre que les moules perlières de Dronne sont sensibles à la pollution métallique et que cette sensibilité est très dépendante de leur âge.

Dans un troisième temps, nous nous sommes intéressés à l'impact des contaminations métalliques mais également de différents facteurs environnementaux ou des nutriments sur les stades les plus jeunes de développement des moules perlières (entre 5 jours et 28 mois de vie). Ces études ont pu être menées grâce à la production de juvéniles au niveau de la ferme aquacole de Firbeix qui a été mise en place en début de projet. Les premiers résultats semblent montrer, lors de tests de toxicité aigüe à court terme (48 à 96h00), que la moule perlière juvénile est relativement résistante aux facteurs testés (Cd, As, nitrates, phosphates, ...), mais qu'elle est au contraire très sensible au NaCl. Lors de tests de toxicité plus chroniques (de 7 à 21j), après exposition au Cd ou à l'As à des doses environnementales, les jeunes moules voient leurs expressions génétiques modulées par ces métaux, en termes de mort cellulaire ou de détoxication, ce qui peut poser des questions sur leur résistance à long terme face à la présence de ces éléments. Des études de comportement sont également développées afin d'évaluer de façon précoce les effets chroniques des différents facteurs étudiés, seuls ou en mélange.

Enfin, la caractérisation de la contamination métallique de la rivière Dronne avant, pendant et après travaux, nous a permis de suivre l'évolution de l'imprégnation en métaux de l'eau, des sédiments et des bryophytes collectés. A l'amont de plusieurs ouvrages, la présence de particules fines ($< 0,63 \mu m$) a permis l'accumulation d'éléments traces métalliques dépassant parfois les critères de qualité requise pour les sédiments, notamment pour l'As et le Pb. Suite aux travaux, un accroissement des concentrations en métaux labiles dans l'eau ou dans les bryophytes a été observé pour la plupart des éléments, avec une tendance à un retour aux concentrations initiales, mais qui s'avère assez lent, puisque cet état initial est rarement atteint même 12 à 18 mois après travaux. Un suivi supplémentaire dans 1 à 2 ans serait nécessaire pour confirmer ou non le retour à la normale des concentrations et accumulations métalliques observées.

Références citées

- Albaredes H. (2019). Analyses isotopiques de moules d'eau douce. Rapport de stage de Licence 3, Université de Bordeaux, 21p.
- ASTM (American Society of Testing Materials). (2006). Standard Guide for Conduction Laboratory Toxicity Tests with Freshwater Mussels. E2455-06. In *Annual Book of ASTM Standards, Volume. 11.06*.
- Baudrimont M. (2012). Etude écotoxicologique de la sensibilité aux contaminants métalliques de la moule perlière *Margaritifera margaritifera* en Dronne amont, Dordogne. Rapport scientifique, Université de Bordeaux, 49 p.
- Baudrimont M., Gonzalez P., Mesmer-Dudons N. and Legeay A. (2019). Sensitivity to cadmium of the endangered freshwater pearl mussel Bauer, G. 1987. Reproductive strategy of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera*. *Journal of Animal Ecology*, 56: 691-704. from the Dronne River (France): experimental exposure. *Environmental Science and Pollution, Reserahc*, in press. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05025-0>
- Bauer G. (1987). Reproductive strategy of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera*. *Journal of Animal Ecology*, 56: 691-704.
- Bauer G. (1992). Variation in the life span and size of the freshwater pearl mussel. *Journal of Animal Ecology* 61: 425-436.
- Bertucci A., Pierron F., Thébault J., Klopp C., Bellec J., Gonzalez P. and Baudrimont M. (2017). Transcriptomic responses of the endangered freshwater mussel *Margaritifera margaritifera* to trace metal contamination in the Dronne River, France. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(35):27145-27159. doi: 10.1007/s11356-017-0294-6.
- Demailly F. (2015). Etude de faisabilité d'une méthode non destructive d'analyses des impacts d'une contamination chez le bivalve *Corbicula fluminea*. *Stage de Master 1 Ecotoxicologie et Chimie de l'Environnement*, 16 p.
- Dunca E., Söderberg H., Norrgrann O. (2011). Shell growth and age determination in the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* in Sweden: natural versus limed streams. *Ferrantia* 64: 48-58.
- Genin, B., Chauvin, C., & Ménard, F. (2003). *Cours d'eau et indices biologiques. Pollutions - méthodes - IBGN*.
- Hartmut F., Gerstmann S. (2007). Declining populations of freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*) are burdened with heavy metals and DDT/DDE. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 36: 571-574.
- Hunt G., Roy K. (2006). Climate change, body size evolution, and Cope's Rule in deep-sea ostracodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103: 1347-1352.
- Miguel E.S., Monserrat S., Fernández C., Amaro R., Hermida M., Ondina P., Altaba C.R. (2004). Growth models and longevity of freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*) in Spain. *Canadian Journal of Zoology* 82: 1370-1379.
- Moorkens E.A. (1999). Conservation Management of the Freshwater Pearl Mussel *Margaritifera margaritifera*. Part 1: Biology of the species and its present situation in Ireland (No. 8). *Irish Wildlife Manuals*.
- Moorkens, E. (2006). Irish non-marine molluscs - an evaluation of species treat status. *Bulletin of the Irish Biogeographical Society*.
- Munch S.B., Salinas S. (2009). Latitudinal variation in lifespan within species is explained by the metabolic

theory of ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106: 13860–13864.

Pierron F., Baudrimont M., Dufour S., Elie P., Bossy A., Baloche S., Mesmer-Dudons N., Gonzalez P., Bourdineaud J-P. and Massabuau J-C. (2008). How cadmium could compromise the completion of the European eel's reproductive migration. *Environmental Science and Technology*, 42: 4607–4612.

Vieira J. (2017). Détermination de l'âge et des vitesses de croissance de moules perlières originaires de Dronne par analyse sclérochronologique des coquilles et analyse des éléments traces métalliques. Rapport de stage de Master 2 en Sciences de la Mer, 37 p.

Wang, N., Ivey, C. D., Ingersoll, C. G., Brumbaugh, W. G., Alvarez, D., Hammer, E. J., ... Barnhart, M. C. (2017). Acute sensitivity of a broad range of freshwater mussels to chemicals with different modes of toxic action. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(3), 786–796. <https://doi.org/10.1002/etc.3642>

Liste des annexes

- Annexe 1 :** Vieira J. (2017). Détermination de l'âge et des vitesses de croissance de moules perlières originaires de Dronne par analyse sclérochronologique des coquilles et analyse des éléments traces métalliques. Rapport de stage de Master 2 en Sciences de la Mer, 37 p.
- Annexe 2 :** Albaredes H. (2019). Analyses isotopiques de moules d'eau douce. Rapport de stage de Licence 3, Université de Bordeaux, 21p.
- Annexe 3 :** Bertucci A., Pierron F., Thébault J., Klopp C., Bellec J., Gonzalez P. and Baudrimont M. (2017). Transcriptomic responses of the endangered freshwater mussel *Margaritifera margaritifera* to trace metal contamination in the Dronne River, France. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(35):27145-27159. doi: 10.1007/s11356-017-0294-6.
- Annexe 4 :** Demailly F. (2015). Etude de faisabilité d'une méthode non destructive d'analyses des impacts d'une contamination chez le bivalve *Corbicula fluminea*. *Stage de Master 1 Ecotoxicologie et Chimie de l'Environnement*, 16 p.
- Annexe 5 :** Baudrimont M., Gonzalez P., Mesmer-Dudons N. and Legeay A. (2019). Sensitivity to cadmium of the endangered freshwater pearl mussel Bauer, G. 1987. Reproductive strategy of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera*. *Journal of Animal Ecology*, 56: 691-704. from the Dronne River (France): experimental exposure. *Environmental Science and Pollution, Reserahc*, in press. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05025->.
- Annexe 6 :** Belamy T. (2019). Étude de la sensibilité des juvéniles de moule perlière (*Margaritifera margaritifera*) aux facteurs environnementaux et de contamination. Rapport d'avancement de Thèse, juin 2019, 29 p.
- Annexe 7 :** Gourves P.Y. et Baudrimont M. (2017). Caractérisation des niveaux de contamination métallique de la Haute Dronne - Travaux réalisés avant les travaux d'aménagement. Rapport d'avancement du projet Life, septembre 2017, 20 p.
- Annexe 8 :** Gourves P.Y., Coynel A., Etcheverria B., Pichon C., Legeay A., Dumont J., Dassié E. and Baudrimont M. (2019). Caractérisation des concentrations métalliques dans l'eau, les sédiments et les bryophytes de la Haute Dronne avant, pendant et après travaux sur les ouvrages pour restauration de la continuité écologique. Colloque final du projet Life+ Nature LIFE13 NAT/FR/000506 : Préservation de *Margaritifera margaritifera* et restauration de la continuité écologique de la Haute Dronne, 5-8 novembre 2019, Périgueux.