

## Etude de faisabilité d'une méthode non destructive d'analyses des impacts d'une contamination chez le bivalve *Corbicula fluminea*



### **Structure d'accueil :**

UMR EPOC, équipe Écotoxicologie Aquatique  
Station Marine d'Arcachon, Place du Dr Peyneau

### **Maîtres de stage :**

BAUDRIMONT Magalie  
LEGEAY Alexia

**DEMAILLY Floriane**

M1 EXCE 2014-2015

## Remerciements

Je remercie en premier lieu Jean- Charles MASSABUAU pour son accueil au sein de la station marine et de l'équipe EA.

Merci à toute l'équipe EA de m'avoir accueilli. Je les remercie de leur sympathie et de cette bonne ambiance dans le laboratoire.

Je remercie mes maîtres de stage, Magalie BAUDRIMONT et Alexia LEGEAY pour leur encadrement, leur enseignement et de m'avoir fait confiance durant ce stage.

Je souhaite remercier particulièrement Alexia LEGEAY pour son aide lors de la pêche au lac de Cazaux-Sanguinet, car je ne suis pas très douée en pêche à la corbi... Je tiens à la remercier également pour sa sympathie, sa patience et toute son aide, lors des journées « prise d'hémolymphe et dissection ».

Merci à Cerise et Patrice GONZALEZ de m'avoir initié aux techniques de biologie moléculaire. Je remercie particulièrement Patrice GONZALEZ pour sa pédagogie et sa patience.

Merci à Pierre-Yves GOURVES pour son aide, pour tout le temps passer avec moi à surveiller le spectromètre quand rien n'allait. Je le remercie aussi pour son investissement, à répondre à mes mails à 23h et à refaire mes graphiques pour vérifier la cohérence de mes données.

Je remercie également Agnès FEURTET-MAZEL pour sa grande sympathie, sa gentillesse et sa bonne humeur.

Merci à Bruno ETCHEVERIA pour son aide concernant l'aspect technique de mes microcosmes.

Je remercie tous les stagiaires de leur bonne humeur en particulier Eliska, Giovanni, Thibaud et Sandra. Je remercie Giovanni pour tous les bons petits plats qu'il a préparé avec amour (même si parfois nous ne mangions pas avant minuit à cause des lasagnes...). Merci à Giovanni et Eliska pour tous les fous-rire, les longues discussions, les moments sur la plage, les longues soirées de travail (voir même nuit), merci de leur soutien et enfin merci de leur sympathie. Ce stage était merveilleux et c'est en particulier grâce à vous.

Pour finir, merci à ma famille et à mes amies de m'avoir soutenu quand c'était difficile mais surtout merci à Maxime qui me soutient depuis tout ce temps.

## Liste des abréviations

**12s** : Gène ribosomique, marqueur du nombre de mitochondries

**ADNc** : Acide désoxyribonucléique complémentaire

**ARN** : Acide ribonucléique

**cat** : Gène codant pour la catalase

**Cd** : Cadmium

**cox I** : Gène codant pour la sous-unité I de la cytochrome c oxydase.

**ES** : Erreur standard

**gst** : Gène codant pour la glutathion-s-transférase.

**HNO<sub>3</sub>** : Acide nitrique

**IUCN**: International Union for Conservation of Nature

**MTs** : Métallothionéines

**mt** : Gène codant pour les métallothionéines.

**Ni** : Nickel

**Pb** : Plomb

**PCR** : *Polymerase Chain Reaction*, réaction d'amplification en chaîne de l'ADN

**PS** : poids sec

**Q-PCR** : PCR quantitative en temps réel

**ERO** : Espèce réactive de l'oxygène

**R-T** : Rétro-transcription

**sod** : Gène codant pour la superoxyde dismutase à manganèse mitochondrial.

**UE** : Unité expérimentale

# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	<b>4</b>
<b>Matériels et méthodes</b> .....	<b>5</b>
a. Collecte et acclimatation des organismes.....	5
b. Conditions expérimentales .....	5
✚ Structure des systèmes expérimentaux et contrôle des paramètres physico-chimiques	
✚ Plan expérimental et contamination des UEs.....	5
c. Techniques d'analyse.....	6
✚ Dosage des métaux dans les tissus et l'hémolymphe .....	6
✚ Etude de l'expression génétique dans l'hémolymphe .....	6
d. Analyses statistiques.....	7
<b>Résultats</b> .....	<b>7</b>
a. Paramètres d'exposition.....	7
✚ Paramètres physico-chimiques .....	7
✚ Pressions de contamination .....	8
b. Comparaison des niveaux de bioaccumulation des métaux dans l'hémolymphe et les tissus des organismes .....	8
✚ Bioaccumulation du cadmium .....	8
✚ Bioaccumulation du Plomb .....	8
✚ Bioaccumulation du Nickel .....	9
c. Réponses génétiques dans l'hémolymphe .....	10
<b>Discussion</b> .....	<b>11</b>
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	<b>13</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>14</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>15</b>
<b>Résumé de l'étude / Abstract</b> .....	<b>16</b>

## Introduction

Depuis de nombreuses années, l'action de l'Homme perturbe les écosystèmes en dispersant des polluants dans les milieux terrestres ou aquatiques. Parmi ces polluants, les métaux sont régulièrement retrouvés dans les écosystèmes aquatiques et certains d'entre eux font d'ailleurs l'objet de suivis réglementaires (cadmium, mercure, Directive cadre sur l'eau). Les métaux suscitent de nombreuses inquiétudes auprès de l'Homme car ils peuvent engendrer des impacts toxiques. Cette toxicité va dépendre de leur disponibilité pour les organismes. En effet, dans les milieux aquatiques, les métaux se retrouvent soit sous forme particulaire ou sous forme dissoute. C'est principalement sous cette dernière forme qu'ils sont les plus biodisponibles et qu'ils s'accumulent d'avantage dans les organismes. Les bivalves filtreurs tels que *Corbicula fluminea* peuvent rendre compte de cette biodisponibilité. Effectivement, par leur grande capacité de filtration de la colonne d'eau à des fins respiratoires et nutritionnelles (Baudrimont et al., 1997 ; Tran et al., 2001), ces organismes accumulent fortement les polluants présents dans l'eau. Sédentaires, ils se révèlent donc être d'excellents indicateurs de la contamination d'un milieu donné et sont souvent utilisés pour des suivis *in situ* (bio-surveillance). De plus, leur facilité de maintien en laboratoire et leur résistance aux stress chimiques font qu'ils représentent des modèles biologiques de choix pour les études en écotoxicologie.

Cependant les techniques utilisées pour suivre la contamination ou révéler des impacts sur ces bivalves sont destructives. Si les suivis sur *C. fluminea*, considérée comme espèce invasive, ne posent pas de problème, l'utilisation d'espèces protégées montre la nécessité de mettre au point



Figure 1: Photographie de *Margaritifera margaritifera*

des techniques d'étude non destructives. Notre étude s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche LIFE13 NAT/FR/000506 visant, entre autres, à la restauration des populations de moules perlières *Margaritifera margaritifera*. Cette espèce étant protégée (En danger d'extinction - Liste Rouge IUCN), les études écotoxicologiques prévues dans le programme devront être effectuées sans entrainer la mort des organismes, en réalisant les analyses à partir de prélèvements d'hémolymphe.

Le but de ce stage est de tester la faisabilité des dosages de métaux (suivi d'une contamination) et des réponses génétiques (suivi des impacts toxiques) dans l'hémolymphe de bivalve. Ces mises au point seront réalisées sur les bivalves *Corbicula fluminea* soumis à 3 niveaux de contamination polymétallique (Cadmium, Plomb et Nickel) *via* la colonne d'eau (contamination directe).

Les métaux seront dosés dans l'hémolymphe ainsi que dans les tissus afin de comparer les niveaux d'accumulation et certains gènes d'intérêt (révélateurs de stress) seront étudiés dans l'hémolymphe en utilisant la Q-PCR (PCR quantitative en temps réel).

## I. Matériels et méthodes

### a. Collecte et acclimatation des organismes

Cette expérience a été réalisée à partir de 150 bivalves filtreurs d'eau douce, *Corbicula fluminea* (figure 2 ; annexe 1), mesurant  $26,2 \pm 0,18$  mm, prélevés le 07/05/15 au lac de Cazaux-Sanguinet (port de l'Estey) en Gironde. Les animaux ont été acclimatés pendant 6 jours dans l'animalerie du laboratoire en circuit ouvert et nourris avec une culture mono-algale de *Scenedesmus subspicatus* deux fois par jour. Six jours avant le début de l'expérience, les bivalves ont été répartis équitablement dans 3 unités expérimentales (UE) et les apports de nourriture ont été interrompus afin de ne pas entraîner de contamination trophique.



Figure 2: Photographie de *Corbicula fluminea*

### b. Conditions expérimentales

- ✚ Structure des systèmes expérimentaux et contrôle des paramètres physico-chimiques

*Corbicula fluminea*, organisme épi-benthique, nécessite deux compartiments dans les UEs : le substrat (permettant l'enfouissement) et la colonne d'eau. Chaque UE correspond à un aquarium en verre (50x30x40 cm), dont les parois internes sont recouvertes d'un film plastique (figure 3) évitant leur contamination. Le substrat se compose de sable ultra-pur (sable SILAQ, 0,8-1,4 mm), préalablement rincé abondamment pour éliminer toutes les poussières. Une couche d'environ 3 cm d'épaisseur est déposée dans chaque UE. Ce substrat artificiel permet de s'affranchir de la présence de contaminants supplémentaires qui complexifieraient l'interprétation des réponses biologiques. Quarante-cinq litres d'eau du réseau, déchlorée par aération, sont ajoutés dans les UEs et des bains-marie maintiennent les conditions expérimentales constantes à l'aide d'un système mixte autonome de chauffage et de refroidissement. La température des UEs est maintenue à 15°C et la photopériode a été fixée à 12 heures d'éclairage par jour grâce à des horloges programmées et des sources de lumière artificielle. La saturation en oxygène dissous dans la colonne d'eau, est assurée par un système de bullage. Tout au long de l'expérience, une mesure quotidienne de la température, du pH, et de l'oxygène dissous dans la colonne d'eau est effectuée dans chaque UE.



Figure 3: Dispositif expérimental

- ✚ Plan expérimental et contamination des UEs

Trois conditions de contamination polymétallique sont testées (tableau I). Les pressions de contamination sont maintenues pendant 7 jours par la méthode dite des ajouts compensés. En effet, de nombreux facteurs tendent à diminuer les concentrations en métaux dans la colonne d'eau (adsorption à des sites de fixation sur les parois de l'aquarium, transfert vers le substrat, bioaccumulation par les organismes). Aussi est-il nécessaire de compenser ces pertes. Chaque matin, des volumes de solutions métalliques de Cd, Pb, Ni sont ajoutés afin de compenser deux fois les pertes.

A T1, T2, T3 et T7 des suivis sont réalisés en prélevant 10mL d'eau dans chaque UE puis en ajoutant 0,250mL d'acide nitrique, pour pouvoir faire l'analyse au spectrophotomètre d'absorption atomique.

Tableau 1 : Trois conditions de contamination; Témoin; Condition de contamination 1 (C1), condition de contamination 2 (C2)

UEs/ [Métaux]	[Cd] (µg/L)	[Pb] (µg/L)	[Ni] (µg/L)
Témoin	0	0	0
C1	2	4	4
C2	10	20	40

A T7, 40 organismes sont prélevés aléatoirement dans chaque UE. Vingt- quatre sont utilisés pour l'analyse de la bioaccumulation des métaux dans les tissus et dans l'hémolymphe (4 pools de 6 organismes) et 16 sont utilisés pour l'analyse génétique (4 pools de 4 organismes).

### c. Techniques d'analyse

#### ✚ Dosage des métaux dans les tissus et l'hémolymphe

Des prélèvements d'hémolymphe dans le muscle adducteur postérieur sont effectués sur chaque organisme (figure4, annexe 2). Quatre cent à huit cent microlitres sont prélevés par organisme. Après avoir regroupé l'hémolymphe de 6 organismes, 3,4mL en sont prélevés puis séchés dans une étuve durant 48h à 44°C. Directement après la prise d'hémolymphe, chaque organisme est disséqué afin de prélever le corps mou. Chaque corps mou est pesé puis séché à l'étuve 48h00 à 50°C. Une fois secs, les tissus sont broyés afin d'obtenir une poudre pour le dosage des métaux. Le dosage des métaux est effectué à l'aide d'un spectromètre d'absorption atomique (modèle : 240Z AA Agilent Technologie). Après séchage, 0,250mL et 3mL d'acide nitrique (HNO<sub>3</sub>) sont ajoutés respectivement à l'hémolymphe et aux tissus séchés (environ 70mg). Par la suite, la minéralisation est effectuée pendant 3h00 à 100°C afin de dégrader toute matière organique. Les digestats sont dilués 5 fois à l'eau ultrapure pour pouvoir être analysés par l'appareil. Des blancs et des échantillons certifiés sont réalisés permettant respectivement de vérifier des contaminations potentielles lors de la minéralisation et de détecter d'éventuels dysfonctionnements de l'appareil.



Figure 4: Photographie du prélèvement d'hémolymphe

#### ✚ Etude de l'expression génétique dans l'hémolymphe

A partir de 4 organismes, 2 ml d'hémolymphe prélevés dans le muscle adducteur postérieur sont conservés dans la glace. Après centrifugation des échantillons d'hémolymphe qui permet d'éliminer le plasma, les ARNs totaux extraits (Kit : SV Total RNA Isolation System ; Promega). Ceux-ci subissent ensuite une reverse-transcription (Kit : GoScript Reverse Transcription System ; Promega) qui permet de les transformer en ADN complémentaire (ADNc), afin de les stabiliser et de pouvoir les quantifier. Les ADNc ainsi obtenus peuvent être utilisés lors d'analyses par Q-PCR (Kit : Brilliant III Ultra Fast SYBR Green QPCR Master Mix ; Stratagène-Agilent) qui permettent de quantifier le niveau d'expression des gènes en

suivant en temps réel l'amplification des ADNc grâce à l'ajout d'un agent intercalant fluorescent dans le milieu réactionnel : le SyberGreen. La fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle. Ainsi la quantité de fluorescence mesurée permet de déterminer la quantité d'ADNc initial. Les réactions de PCR sont réalisées dans des microplaques de 96 puits contenant chacun 17  $\mu\text{L}$  de mix réactif 2X dilué (tampon d'activité, Taq polymérase,  $\text{MgCl}_2$ , dNTP et le Syber green), 2  $\mu\text{L}$  du mix amorce (2  $\mu\text{M}$  d'amorces sens et 2  $\mu\text{M}$  d'amorces antisens) et 1  $\mu\text{L}$  d'ADNc. Le niveau d'expression de chaque gène est déterminé par rapport à celui du gène de référence ( *$\beta$ -actine*). La différence des moments de sortie ( $\Delta\text{Ct}$ ) entre le gène de référence et le gène d'intérêt est calculée. Ensuite, il est calculé le  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  qui correspond au nombre de copies finales. Puis le rapport de celui-ci chez les organismes exposés et les témoins donne le facteur d'expression génétique. Lorsque celui-ci est inférieur à 0,5 le gène est dit réprimé ; s'il est supérieur à 2 celui-ci est dit surexprimé.

Les gènes étudiés par Q-PCR sont les suivants :

- *$\beta$ -actine* : gène de référence. Ce gène se trouve impliqué dans de nombreux mouvements cellulaires et est un élément fondamental du cytosquelette.
- Le gène des MTs (*mt*) et le gène de la glutathion s transférase (*gst*) sont impliqués dans la détoxification des métaux.
- Le gène de la superoxyde dismutase cytoplasmique (*sod*) et de la catalase (*cat*), codent pour des enzymes impliquées dans la lutte contre le stress oxydatif cytoplasmique.
- Les gènes du métabolisme mitochondrial (*coxI*) et (*12s*) codent respectivement pour la sous unité 1 de la cytochrome C oxydase et le petit ARN ribosomique.

#### d. Analyses statistiques

Les résultats sont traités par des analyses statistiques à l'aide du logiciel Graphpad. Un t-test est appliqué pour comparer la moyenne de deux échantillons indépendants avec un risque de 0,005 ( $p < 0,05$ ). Ainsi, une différence significative entre deux échantillons est justifiée par une p-value inférieure à 0,05.

## II. Résultats

### a. Paramètres d'exposition

#### Paramètres physico-chimiques

Les paramètres physico-chimiques sont maintenus constants durant les 7 jours d'exposition (Tableau II).

Tableau II: Valeurs moyennes des mesures des paramètres physico-chimiques effectuées quotidiennement (Moyenne  $\pm$  ES,  $n=5$ )

UE / Paramètres	Température	O <sub>2</sub>	pH
Témoin	15,04 $\pm$ 0,02	10,002 $\pm$ 0,05	7,7736 $\pm$ 0,01
C1	15,06 $\pm$ 0,04	10,112 $\pm$ 0,04	7,7826 $\pm$ 0,01
C2	15 $\pm$ 0,03	10,058 $\pm$ 0,05	7,7516 $\pm$ 0,03

## ✚ Pressions de contamination

Le suivi des niveaux de concentrations en métaux réalisé dans les UEs au cours de l'expérience montre que les conditions de contamination C1 pour le Cd, Ni et Pb sont maintenues constantes tout au long de l'expérience. En ce qui concerne les conditions de contamination C2, la concentration en cadmium est maintenue constante tout au long de l'expérience, cependant celles en nickel et plomb sont respectivement au-dessus et en dessous de la concentration théorique mais restent proches des valeurs désirées (Tableau III).

Tableau III: Concentrations métalliques moyennées sur la durée de l'exposition sur la durée de l'exposition pour chaque condition (Moyenne  $\pm$  ES,  $n=7$ , (concentration théorique))

UE/ Métaux	[Cadmium] ( $\mu\text{g/L}$ )	[Plomb] ( $\mu\text{g/L}$ )	[Nickel] ( $\mu\text{g/L}$ )
Témoin	0	0	0
C1	$2,03 \pm 0,30$ (2)	$3,50 \pm 0,80$ (4)	$4,50 \pm 0,8$ (4)
C2	$10,2 \pm 0,30$ (10)	$18,0 \pm 3,40$ (20)	$43,40 \pm 5,03$ (40)

### b. Comparaison des niveaux de bioaccumulation des métaux dans l'hémolymphe et les tissus des organismes

#### ✚ Bioaccumulation du Cadmium

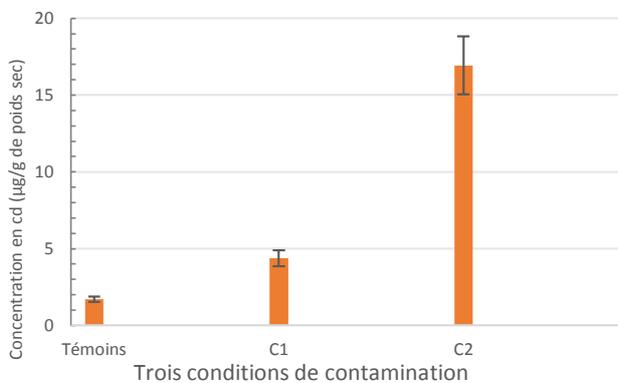


Figure 5: Bioaccumulation du cadmium dans les tissus aux trois conditions de contamination ( $m \pm es$ ;  $n=4$ )

La bioaccumulation du cadmium dans les tissus par les organismes aux trois conditions de contamination est représentée sur la figure 5. On note que plus la concentration en cadmium augmente plus la bioaccumulation dans les tissus augmente. En effet, la bioaccumulation entre les témoins et la condition de contamination C1 est multipliée par 2,6 et celle entre les conditions de contamination C1 et C2 est environ multipliée par 4. En ce qui concerne l'hémolymphe, les valeurs mesurées se révèlent trop proches des limites de détection de l'appareil et manquent de fiabilité. Une plus grande quantité d'hémolymphe serait nécessaire pour doser ce métal.

#### ✚ Bioaccumulation du Plomb

La figure 6 présente la bioaccumulation du plomb par les organismes dans l'hémolymphe et les tissus aux trois conditions de contamination. Un zoom est effectué sur les concentrations en Pb dans l'hémolymphe. Contrairement au Cd, les concentrations en Pb sont quantifiables dans l'hémolymphe par notre méthode d'analyse. Par ailleurs, on note que la bioaccumulation du plomb par les organismes est plus importante dans les tissus par rapport à l'hémolymphe. Il est possible de déterminer un rapport des concentrations de Pb dans les tissus et dans

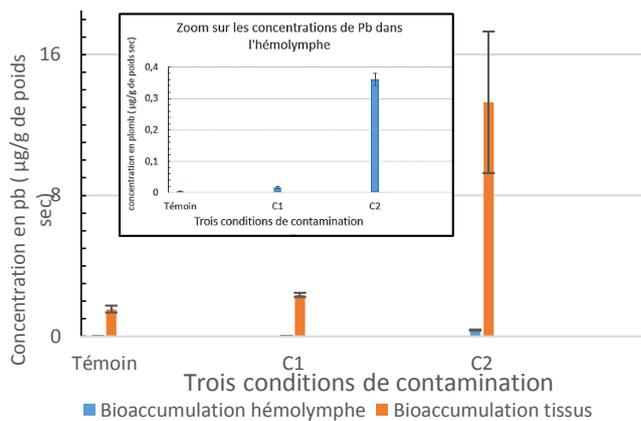


Figure 6: Bioaccumulation du Pb par les organismes aux différentes conditions de contamination ( $m \pm es$ ;  $n=4$ )

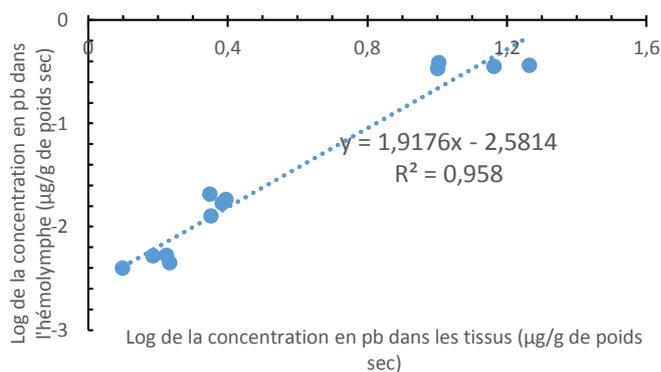


Figure 7: Log de la concentration du plomb dans l'hémolymphe en fonction de celle dans les tissus

### Bioaccumulation du Nickel

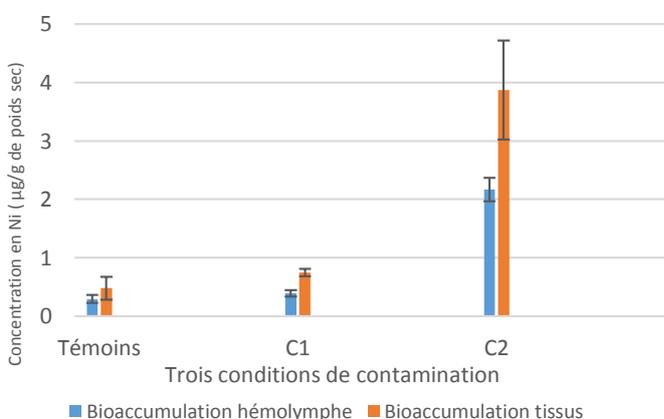


Figure 8: Bioaccumulation du nickel par les organismes aux trois conditions de contamination ( $m \pm es$ ;  $n=4$ )

La figure 8 représente la bioaccumulation du nickel par les organismes aux trois conditions de contamination. Tout comme le Pb, on note qu'il est possible de doser le nickel dans l'hémolymphe et que les concentrations mesurées sont inférieures à celles retrouvées dans les tissus. Les rapports de concentration en Pb entre tissus et hémolymphe sont de 1,6 pour les témoins, 1,9 pour la condition de contamination C1 et d'environ 1,8 pour la condition C2. Ainsi, contrairement aux rapports calculés pour le plomb qui diminuaient avec les concentrations, nous remarquons que les rapports pour le nickel sont constants. Une bonne corrélation est retrouvée pour les concentrations en Ni dans les tissus et dans l'hémolymphe (Figure 9,  $R^2= 0,9284$ ). Comme pour

l'hémolymphe. Ce rapport est d'environ 330 chez les témoins, ce qui revient à dire que la bioaccumulation du plomb est environ 330 plus importante dans les tissus que dans l'hémolymphe. Pour la condition de contamination C1, ce rapport est d'environ 138 et pour la condition de contamination C2 celui-ci est d'environ 37. La figure 7 démontre qu'il existe une bonne corrélation entre la bioaccumulation dans les tissus et dans l'hémolymphe ( $R^2= 0,958$ ), ce qui confirme le fait que la concentration en plomb dans les tissus est liée à celle dans l'hémolymphe. Dans les tissus, les concentrations en Pb sont multipliées par 1,6 entre les témoins et la condition de contamination C1 et par 5,5 entre les conditions de contamination C1 et C2. Dans l'hémolymphe, ces facteurs sont de 4 (témoins vs C1) et 21 (C1 vs C2).

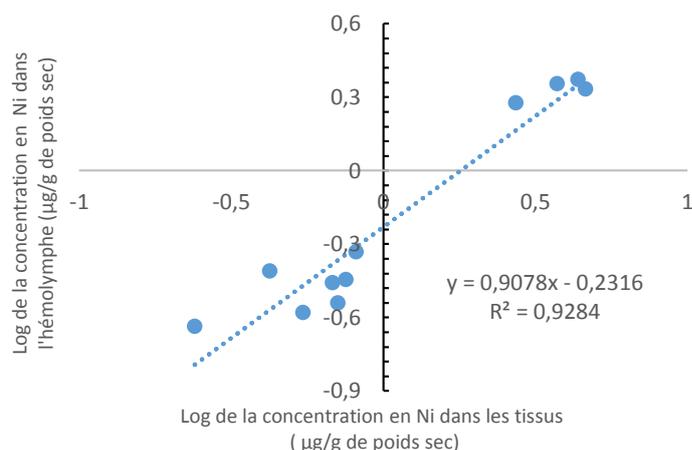


Figure 9: Log de la concentration du nickel dans l'hémolymphe en fonction de celle dans les tissus ( $m \pm es$ ;  $n=4$ )

le Pb et le Cd un effet gamme est retrouvé dans les tissus avec un accroissement des concentrations de 1,6 entre les témoins et la condition de contamination C1 et d'environ 4,9 entre les conditions C1 et C2. Cet effet gamme est retrouvé dans l'hémolymphe avec des ordres de grandeur proches de ceux observés dans les tissus (1,3 entre les témoins et la condition C1 et 5,5 entre les conditions C1 et C2).

### c. Réponses génétiques dans l'hémolymphe

L'expression des gènes par Q-PCR a pu être réalisée à partir des prélèvements d'hémolymphe sans adaptation particulière du protocole (Tableau 4). Aucune réponse du gène des méthalthionéines (*mt*) n'est observée durant l'exposition polymétallique quelles que soient les conditions de contamination (C1 et C2).

En revanche, en ce qui concerne le métabolisme mitochondrial, les deux gènes (*cox* et *12s*) présentent une surexpression importante pour les niveaux d'exposition maximaux (C2).

Concernant les gènes luttant contre le stress oxydant, les réponses sont différentes suivant les gènes : le gène de la superoxyde dismutase (*sod*) est réprimé de façon significative par rapport aux témoins pour les 2 conditions de contamination C1 et C2. Cependant il n'y a pas de différence significative d'expression entre ces deux conditions ( $p < 0,005$ ).

Le gène de la catalase (*cat*) est lui réprimé uniquement en condition de contamination C1. Il devient surexprimé par rapport aux témoins en condition de contamination C2.

Enfin, le gène *gst* est surexprimé uniquement en C2.

Tableau 1: Variations de l'expression différentielle des gènes des organismes exposés aux différentes conditions de contamination comparées aux témoins

Gènes (fonction) / Condition de contamination	C1	C2
<i>cox</i> (métabolisme mitochondrial)	2,20	14,09
<i>12s</i> (métabolisme mitochondrial)	/	20,12
<i>sod</i> (stress oxydant)	0,05	0,04
<i>cat</i> (stress oxydant)	0,13	2,08
<i>gst</i> (détoxication des métaux)	/	3,70
<i>mt</i> (détoxication des métaux)	/	/

/ : Identique au niveau des témoins ; 0,5 < répression ; 2 > surexpression

### III. Discussion

Lors d'une contamination par voie directe, les polluants pénètrent dans les organismes *via* les branchies avant d'être distribués à l'ensemble du corps par le système circulatoire. Chez les mollusques, ce transport est effectué par le plasma et les hémocytes (Robinson and Ryan, 1988). Ainsi, l'hémolymphe doit pouvoir rendre compte d'une contamination dans le milieu. C'est pourquoi le premier objectif de ce travail est de doser les métaux dans celle-ci. Cette étude préliminaire montre qu'il est possible non seulement de doser des métaux mais également de suivre des réponses génétiques dans l'hémolymphe de bivalves. Par ailleurs, ces prélèvements n'ont pas affecté la survie des animaux dans les 2 mois qui ont suivi ces prélèvements. En revanche, la quantité initialement prélevée (3,4mL) s'est révélée insuffisante pour le dosage de Cd. Des tests complémentaires s'avèrent donc nécessaires pour déterminer le volume minimal à prélever pour cette analyse.

Le deuxième objectif de notre étude était de mettre en évidence un éventuel lien entre la concentration de métal mesurée dans l'hémolymphe et celle mesurée dans les tissus. En effet, des études réalisées pour d'autres métaux, d'autres tissus, d'autres organismes montrent des rapports stables qui permettent de prédire, à partir de la mesure d'une concentration, les niveaux retrouvés dans un autre compartiment. C'est le cas par exemple pour le rapport entre la concentration de mercure dans les cheveux et dans le sang chez l'Homme qui est de 250/1 (Liberda et al., 2014), ce qui signifie que les cheveux contiennent 250 fois plus de mercure que le sang. En revanche, à notre connaissance, la bibliographie concernant les niveaux d'accumulation de polluants dans l'hémolymphe de bivalves est inexistante.

Dans notre étude, nos résultats montrent que les concentrations en Pb et en Ni dans les tissus sont toujours supérieures à celles mesurées dans l'hémolymphe et que les niveaux d'accumulation augmentent avec les conditions de contamination (effet de gamme). Si l'on compare à des expériences de contamination avec un seul métal, alors les concentrations mesurées dans notre étude se révèlent excessivement faibles. En effet, après 7 jours d'exposition à 4 et 40 µg/L de Ni, *C. fluminea* présentaient des niveaux d'accumulation de 14,8 et 29,5 µg/g PS dans l'étude menée par Dranguet (Dranguet, 2012), soit des valeurs nettement supérieures à celles mesurées ici (0,7 et 3,9 µg/g PS). De la même façon, des corbicules exposées 7 jours à des concentrations de Pb de 4 et 20 µg/L présentaient des niveaux d'accumulation de 8 et 52 µg/g respectivement (Payton, 2013) alors qu'elles sont de 2 et 13.3 µg/g dans notre étude. Ces différences pourraient s'expliquer par le fait que nous avons exposé les organismes à une contamination polymétallique. En condition d'exposition combinée, des interactions entre métaux peuvent avoir lieu au niveau des différentes composantes des processus de bioaccumulation : l'absorption, la séquestration, et l'excrétion (Baudrimont, 1997 ; Shi D et al., 2004; Wang et al., 2005). Ces interactions pourraient limiter l'entrée des métaux dans les organismes.

Notre étude montre pour Ni et Pb qu'il existe une forte corrélation entre les concentrations mesurées dans les tissus et celles mesurées dans l'hémolymphe (figures 7 et 9). En revanche les rapports des concentrations montrent un comportement différent pour les deux métaux (Pb et Ni). Concernant le plomb, nous constatons que les rapports  $\frac{[Pb]_{tissus}}{[Pb]_{hémolymphe}}$  diminuent quand la concentration en métal augmente alors que ceux concernant le nickel, restent dans l'ensemble constants. Pour le plomb, cela peut s'expliquer par le fait qu'au bout d'une trop forte concentration en métal dans l'eau, les voies d'entrées des organismes saturent, ainsi une plus faible quantité de plomb rentre dans l'organisme et le rapport de bioaccumulation du métal dans les tissus par rapport à l'hémolymphe diminue. A l'inverse, ces rapports sont constants pour le nickel aux trois conditions de contamination. Cela peut s'expliquer par le fait que même à de faibles concentrations en métal dans l'eau, les voies d'entrées des organismes saturent et les quantités de nickel rentrant dans l'organisme restent faibles.

Dans les conditions de contamination C2 ([Cd]= 10 µg/L; [Pb] = 20µg/L ; [Ni]=40 µg/L), les concentrations mesurées dans les tissus et l'hémolymphe sont respectivement de 13,3 µg/g PS et 0,4 µg/g PS pour le Pb et 3,9 et 2 µg/g PS pour le Ni. Bien que deux fois plus concentré dans l'eau, le Ni s'accumule trois fois moins dans les tissus que le Pb. L'hypothèse faite est que le nickel s'accumule moins dans les tissus que le Pb et se retrouve en plus forte concentration dans l'hémolymphe contrairement au Pb qui semble pénétrer plus facilement dans les tissus. Cela laisse suggérer que l'entrée du Pb dans l'organisme, contrairement au Ni est plus efficace et/ou que les mécanismes d'excrétion de ce métal sont plus faibles dans nos conditions (Payton., 2013).

Si la quantification de contaminants métalliques dans l'hémolymphe est réalisable, il va être en revanche impossible de relier ces concentrations à des niveaux d'accumulation dans les tissus sans réaliser d'études complémentaires, d'autant plus que les métaux peuvent présenter des cinétiques d'accumulation dans l'hémolymphe très variables.

Par ailleurs, notre étude démontre qu'il est possible de suivre les variations d'expression de gènes d'intérêt dans l'hémolymphe de *Corbicula fluminea*.

Après 7 jours d'exposition à un cocktail de contaminants modéré (C1), la majorité des gènes étudiés ne modifient pas leur niveau d'expression (3/6 gènes). Seuls les gènes *sod* et *cat*, impliqués dans les réponses au stress oxydant sont réprimés. Une exposition métallique étant souvent associée à un stress oxydant, on peut faire l'hypothèse que la surexpression des gènes concernés a pu avoir lieu de façon plus précoce. Par ailleurs, il est possible que les métaux, une fois internalisés, demandent une énergie accrue à la cellule et ainsi favorisent la diminution d'expression des gènes. La répression du gène *sod* a pour conséquence une diminution de la catalyse de l'enzyme permettant la dismutation de l'ion superoxyde et provoque un stress oxydant dans la cellule. Concernant l'exposition aux fortes concentrations (C2), nous observons cette fois que 3/6 gènes sont fortement surexprimés : *cox*, *12s*, et *gst*. Concernant le gène du métabolisme mitochondrial (*cox*), celui-ci code pour la sous-unité 1 de la cytochrome c oxydase, qui est la dernière enzyme de la chaîne de transfert des électrons dans la mitochondrie,

essentielle à la production d'ATP. Dans le cas d'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire, la production d'ATP est alors mise à mal. De plus, ces dysfonctionnements entraînent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), très nuisibles à l'intégrité cellulaire. Pour compenser une perturbation de la chaîne respiratoire mitochondriale, très classiquement observée lors d'une contamination au Cd, la mitochondrie met en place des mécanismes adaptatifs en augmentant l'expression du gène *cox* (Wang et al, 2005), ainsi il est constaté une surexpression de ce gène lors de cette condition de contamination. La surexpression du gène *12s*, montre une augmentation du nombre de mitochondries dans la cellule qui va également contribuer à limiter la diminution d'ATP dans les cellules.

Le gène de la *gst* est une enzyme de détoxification des métaux (et des polluants organiques) qui catalyse la fixation du glutathion sur ces contaminants de façon à les éliminer essentiellement au niveau du rein. Alors que la *sod* est toujours réprimée dans ces conditions d'exposition (même hypothèse que pour C1 : la surexpression du gène est peut-être plus précoce), la *gst* montrerait une réponse de détoxification complémentaire à celle des MTs qui a probablement eu lieu plus précocément..

Quelles que soient les conditions, aucune réponse génétique n'est observée concernant le gène *mt* après 7 jours d'exposition. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Dranguet (2012) alors qu'il est connu qu'une contamination au cadmium ou au plomb entraîne une augmentation de la quantité de MT (Baudrimont et al., 1997 ; Payton, 2013). Il est possible que, pour répondre à cette demande accrue en protéines, le gène ait été surexprimé de façon précoce avant de diminuer à nouveau à 7 jours. Ce fonctionnement par « pulse » a déjà été décrit chez les bivalves (Paul-Pont et al., 2010).

## Conclusion et perspectives

Cette étude nous a permis de confirmer qu'il est possible de doser certains métaux dans l'hémolymphe (Pb, Ni) mais aussi de faire des analyses génétiques sur celle-ci sans pour autant affecter l'état de santé des organismes (pas de mortalité observée). Les analyses de l'expression de gènes permettront de détecter des impacts toxiques à partir de petites quantités d'hémolymphe ce qui est particulièrement intéressant pour travailler sur une espèce protégée telle que *Margaritifera margaritifera*. Des études sur le bivalve *Mercenaria mercenaria* ont montré qu'il existait une relation exponentielle entre le volume d'hémolymphe et la longueur de la coquille du type  $Y=5.71 \times 10^{-5} X^{3.0678}$  avec Y le volume sanguin en mL et X, la longueur de la coquille en mm (Robinson and Ryan, 1986). Si on extrapole cette relation à *M margaritifera* dont la taille moyenne est de 120 mm on estime le volume sanguin à 14 mL, ce qui nous permettra de prélever des volumes suffisamment importants sans impacter les individus. A partir des dosages réalisés dans l'hémolymphe de *M. margaritifera* et l'eau de son milieu de vie nous pourrions mettre en évidence d'éventuelles contaminations, sans toutefois les relier au niveau d'accumulation dans les tissus, notre étude montrant que les rapports des concentrations entre ces compartiments sont variables suivant les métaux et en fonction des conditions d'exposition.

## Références bibliographiques

**Baudrimont M.**, (1997). Étude du rôle des métallothionéines à l'égard des mécanismes de bioaccumulation du cadmium, du mercure et du zinc par les organismes aquatiques (mollusque bivalve d'eau douce : *Corbicula fluminea*, poissons Cyprinidés) – Approches expérimentales et in situ. Université Bordeaux 1, Talence, Thèse de Doctorat.

**Dranguet P.**, (2012). Effets isolés et combinés de l'exposition de *Corbicula Fluminea* à l'hypoxie et au Ni par voie directe en laboratoire. Université Bordeaux 1, rapport de stage.

**Liberda E.N.**, Tsuji L.J.S., Martin I.D., Ayotte P., Dewailly E., Nieboer E (2014): The complexity of hair/blood mercury concentration ratios and its implication. *Envir. Research* 134, 286-294

**Paul-Pont I.**, Gonzalez P., Baudrimont M., Nili H. and de Montaudouin X. (2010). Short-term metallothionein inductions in the edible cockle *Cerastoderma edule* after cadmium or mercury exposure: discrepancy between mRNA and protein responses. *Aquatic toxicology*, 97:260-267.

**Payton L.**, (2013). Effets isolés et combinés de l'exposition de *Corbicula fluminea* au nickel et au plomb par voie directe en laboratoire.

**Robinson**, W.E. and D.K. Ryan, (1988): Transport of cadmium and other metals in the blood of the bivalve mollusk *Mercenaria mercenaria*. *Marine Biology*, volume 97, Issue 1, pp 101-109

**Shi D.**, Wang W.-X., (2004). Modification of trace metal accumulation in the green mussel *Perna viridis* by exposure to Ag, Cu, and Zn. *Environment Pollution*, 132, pp.265-277.

**Tran D.**, Boudou A., Massabuau J.C., (2001). How water oxygenation level influences cadmium accumulation pattern in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: a laboratory and field study. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, pp.2073-2080.

## Annexes

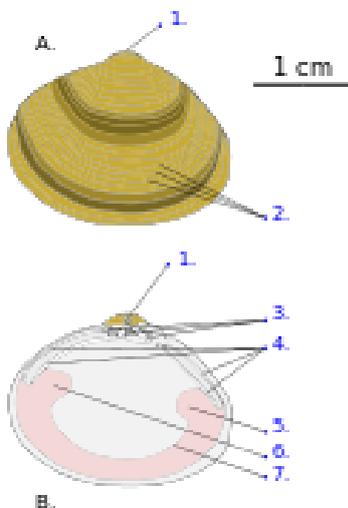
### Annexe 1 : Description de la composante biologique *Corbicula fluminea*

*Corbicula fluminea* ou palourde asiatique est un bivalve d'eau douce fouisseur vivant à l'interface entre le substrat et la colonne d'eau. Elle a été décrite par Müller en 1774. Endémique des zones tropicales et subtropicales, il s'agit d'une espèce invasive qui a été décrite pour la première fois dans le sud-ouest de la France (estuaire de la Gironde) en 1978 (Mouthon, 1981). La systématique de cette espèce est présentée en annexe. C'est une espèce mixohaline qui supporte des salinités allant de 0 à 8 pour mille.

<b>Systématique de <i>Corbicula fluminea</i> (MÜLER 1774)</b>	
<b>Embranchement</b>	Mollusque
<b>Classe</b>	Bivalve
<b>Ordre</b>	Eulamellibranche
<b>Sous-ordre</b>	Hétérodonte
<b>Super-famille</b>	Corbiculiacea
<b>Famille</b>	Corbiculidae
<b>Genre</b>	<i>Corbicula</i>
<b>Espèce</b>	<i>fluminea</i>

### Annexe 2 : Schémas représentant la coquille de *Corbicula fluminea*

*Corbicula fluminea*



A : Face dorsale valve gauche

B : Face ventrale valve droite

1 : Umbo

2 : Côtes d'accroissement

3 : Dents cardinales (idem pour la valve gauche)

4 : Deux paires de dents latérales (1 seule paire sur la valve gauche)

5 : Insertion du muscle adducteur postérieur

6 : Insertion du muscle adducteur antérieur

7 : Ligne palléale

## Résumé de l'étude

Afin de vérifier la faisabilité de méthodes d'analyse non destructives sur bivalve ; trois niveaux de contamination (Témoin, C1 et C2) polymétalliques (Cd, Pb et Ni) sont testés sur *Corbicula fluminea* durant 7 jours. Dans un premier temps, les métaux sont dosés dans l'hémolymphe et dans les tissus pour vérifier si une relation des concentrations en métaux existe entre ces deux compartiments. En effet si un rapport de concentration en métal existe entre celle dans l'hémolymphe et celle dans les tissus, le dosage de l'hémolymphe nous permettrait de détecter une contamination dans un milieu et d'appréhender la bioaccumulation dans les tissus. Deuxièmement, l'analyse génétique de l'hémolymphe est réalisée dans le but de savoir si à partir de ce compartiment, la détection d'un stress chez un bivalve est faisable. Les résultats montrent que s'il est possible de doser le Pb et le Ni dans l'hémolymphe, le volume prélevé n'a pas pu permettre de détecter le Cd. De plus, les comportements des métaux diffèrent dans l'organisme entraînant des rapports de bioaccumulation variables. Concernant l'analyse génétique, on note qu'il est possible de détecter la variation d'expression de certains gènes d'intérêt dans l'hémolymphe. Finalement, le dosage de l'hémolymphe permet de détecter une éventuelle contamination dans le milieu mais ne permet pas de prédire la bioaccumulation des métaux dans les tissus dû à la variabilité des rapports de bioaccumulation. En revanche, les analyses génétiques sur l'hémolymphe démontrent qu'il est possible de détecter l'état de stress d'un organisme seulement en prélevant quelque millilitre d'hémolymphe.

## Abstract

The aim of this study was to verify the reliability of non-destructive analysis of bivalves. Three concentrations (control, C1, C2) of Cd, Pb and Ni were observed in *Corbicula fluminea* during a 7 day laboratory assessment. At the beginning, the metals have been determined in the haemolymph and in the soft tissues to verify the correlation of metal concentration between these two compartments. Indeed, if this is verified, the haemolymph can be used to assess the contamination and the bioaccumulation in the clams. Moreover, the genetic expression analysis in the haemolymph may further compliment the evaluation of stress. The results show, unlike for Cd, that Pb and Ni are in fact detectable in the haemolymph, although the bioaccumulation ratios may fluctuate. Regarding the genetic analysis, some genes are assessable in the haemolymph. In conclusion the determination of metals in the haemolymph allows the detection of the eventual contamination in the environment. However it doesn't provide us with the information on the presence of metals in the soft tissues due to variable ratios of bioaccumulation. Finally, the presence of the stress is detectable by genetic analysis only with few mililitres of haemolymph.