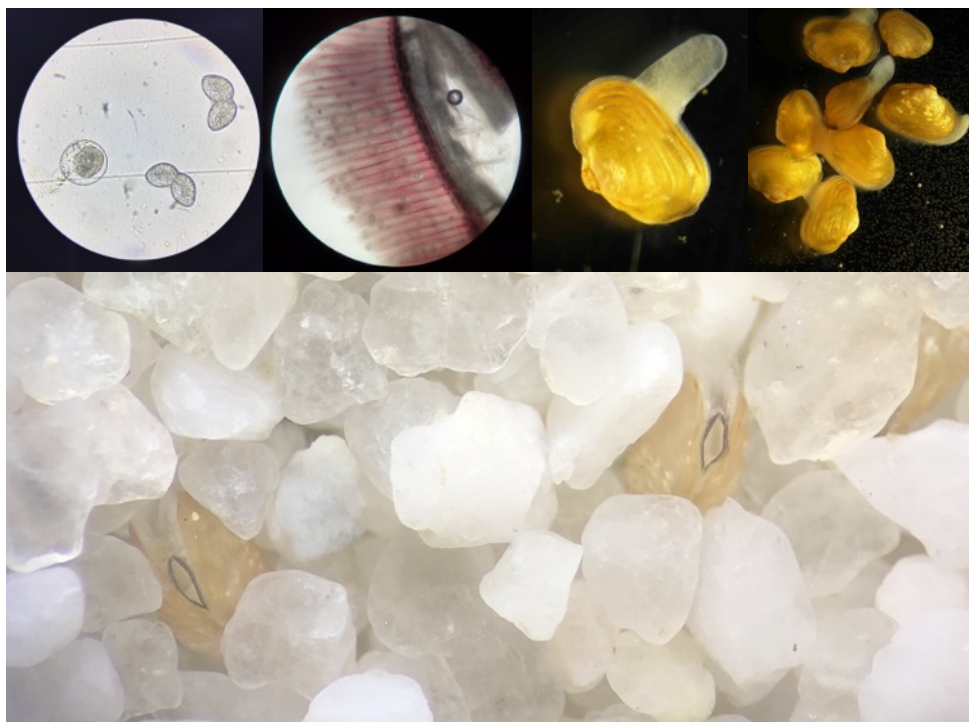


Étude de la sensibilité des juvéniles de moule perlière (*Margaritifera margaritifera*) aux facteurs environnementaux et de contamination



Juin 2019

Tiare BELAMY

Participants : Thomas FAURÉ, Bruno ETCHEVERRIA, Magalie BAUDRIMONT, Alexia LEGEAY

Université de Bordeaux – UMR EPOC 5805 CNRS
Équipe Écotoxicologie Aquatique
Place de Dr Peyneau, Station Marine, 33120 Arcachon
tiare.belamy@u-bordeaux.fr

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	3
LISTE DES TABLEAUX	4
INTRODUCTION	5
I. TRANSPORT ET CONDITIONS DE MAINTIEN EN LABORATOIRE.....	6
A. TRANSPORT DES ORGANISMES	6
B. MAINTIEN DES JUVENILES EN LABORATOIRE	6
II. ÉTUDE DE LA SENSIBILITE DES GLOCHIDIES AUX FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ET DE CONTAMINATION	8
A. RECOLTE DES GLOCHIDIES	8
B. DEVELOPPEMENT DE PROTOCOLE	8
C. PREMIERS RESULTATS	9
D. TRANSPORT ET CONSERVATION DES LARVES AU LABORATOIRE	10
III. ÉTUDE DE LA SENSIBILITE DES JUVENILES AUX FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ET DE CONTAMINATION	11
A. CONTAMINANTS ETUDIES	11
B. TEST DE TOXICITE AIGÛE	12
i. <i>Protocole d'expérimentation (juvéniles fraîchement décrochés)</i>	12
ii. <i>Optimisation du protocole</i>	12
a. <i>Validation du test avec un toxique de référence</i>	13
b. <i>Validation de l'utilisation de substrat dans les expériences (NaCl et Cd)</i>	14
iii. <i>Résultats</i>	16
a. <i>Juvéniles fraîchement décrochés</i>	16
b. <i>Juvéniles âgés d'au moins 10 mois</i>	17
C. TEST DE TOXICITE CHRONIQUE	18
i. <i>Protocole d'expérimentation</i>	19
ii. <i>Critères d'évaluation</i>	20
a. <i>Expression des gènes</i>	20
b. <i>Comportement des organismes</i>	20
iii. <i>Résultats</i>	21
a. <i>Effets chroniques d'une exposition de 21 jours au Cadmium et à l'Arsenic</i>	21
b. <i>Effets chroniques (14 jours) d'une exposition à différentes températures et concentrations en oxygène dissous</i>	22
D. EXPERIENCE MULTIFACTORIELLE	24
IV. TRAVAUX ENVISAGES	26
A. EXPERIMENTATIONS AU STADE LARVAIRE	26
B. EXPERIMENTATIONS AU STADE JUVENILE	26
V. VALORISATION DES RESULTATS	27
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	28
ANNEXE I	29

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Photographies du dispositif permettant le maintien des juvéniles de <i>M. margaritifera</i> en laboratoire.....	6
Figure 2 : Photographie d'une moule perlière adulte après ponte	8
Figure 3 : Photographie de larves de <i>M. margaritifera</i> (glochidies) au microscope optique (x100) ..	8
Figure 4 : Méthode utilisée pour l'évaluation de la viabilité des larves de <i>M. margaritifera</i> (d'après ASTM E2455, 2006)	9
Figure 5 : Représentations schématiques des expérimentations réalisées sur les larves de <i>M. margaritifera</i> . a) exposition à différentes températures et b) exposition avec ou sans aération. D'après Wang et al., 2007.	9
Figure 6 : Nombre moyen de larves comptées en fonction des conditions après 24 heures et 48 heures d'exposition. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type.	10
Figure 7 : Protocole expérimental pour les tests de toxicité aiguë réalisés sur les juvéniles fraîchement décrochés.....	12
Figure 8 : Protocole d'expérimentation du test de toxicité aiguë où les juvéniles de <i>M. margaritifera</i> sont exposés à différentes concentrations en NaCl pendant 48 heures.....	13
Figure 9 : 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.....	14
Figure 10 : Viabilité des juvéniles de <i>M. margaritifera</i> âgés de 22 mois après exposition de 96 heures à différentes concentrations en NaCl en fonction de la présence ou non de substrat.	15
Figure 11 : Protocole d'expérimentation pour les tests de toxicité chronique où les juvéniles de <i>M. margaritifera</i> sont exposés à différentes concentrations en Arsenic ou Cadmium pendant 21 jours	19
Figure 12 : 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.	22
Figure 13 : Schéma du protocole expérimental mis en place pour étudier l'effet de la température et de la quantité d'oxygène sur les juvéniles de moule perlière âgés de 19 mois.	23
Figure 14 : Protocole expérimentale de l'expérience multifactorielle. (T : témoin ; N : nitrates ; P : phosphates).....	24

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Paramètres physico-chimiques mesurés dans les aquariums de septembre 2017 à avril 2018. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type.	7
Tableau 2 : Liste des contaminants étudiés dans ce rapport.	11
Tableau 3 : Concentrations réelles en cadmium($\mu\text{g/L}$) mesurées lors de l'expérimentation conduite avec et sans substrat	15
Tableau 4: Résumé des concentrations nominales étudiées pour les expérimentations réalisées sur des juvéniles de moule perlière fraîchement décrochés.....	16
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. (Les valeurs sont exprimées en concentrations nominales)	16
Tableau 6 : Résumé des différentes concentrations d'exposition (C1 à C5) pour les tests de toxicité aigüe	17
Tableau 7 : Concentrations létales à 50% (CL ₅₀) de différents contaminants obtenus après une exposition de 96 heures des juvéniles de <i>M. margaritifera</i> âgés de 10 à 28 mois	18
Tableau 8 : Liste des gènes étudiés et leurs fonctions associées	20
Tableau 9: Pourcentage de viabilité des juvéniles de <i>M. margaritifera</i> à différents temps en fonction des différentes conditions d'exposition (n = nombre d'individu à chaque temps ; T = témoin ; C1 = concentration 1 ; C2 = concentration) ; *100% pour n=8.....	21
Tableau 10 : Moyennes ($\pm$ écart-type) sur 14 jours des températures et de la quantité d'oxygène dissous pour chaque condition.....	23

Introduction

La moule perlière ou *Margaritifera margaritifera*, est un mollusque bivalve d'eau douce aujourd'hui menacé d'extinction en Europe (Liste rouge IUCN). Autrefois prisée pour sa production de perle, l'origine de sa disparition serait due à partir du 20^{ème} siècle, à l'altération de la qualité de l'eau, la destruction des habitats ou encore à la pollution en général. Actuellement en France, environ 100 000 individus ont été répertoriés où la plus grande population de moules a été recensée dans la Dronne en Dordogne (soit environ 16 000 individus). Dans le cadre du projet LIFE européen LIFE13/NAT/FR/000506 « Préservation de *Margaritifera margaritifera* et restauration de la continuité écologique de la Haute Dronne » (2014-2020), une ferme aquacole a été mise en place en juillet 2016 dans la commune de Firbeix (Dordogne – France) pour produire artificiellement de nouvelles moules. Ces juvéniles seront réintroduits dans le milieu naturel et une partie de cette production sera dédiée aux études écotoxicologiques.

À l'heure actuelle, les connaissances sur cette espèce sont encore très rares, notamment sur sa sensibilité aux facteurs environnementaux et de contamination. Le long de la Dronne, la présence de barrages et de seuils constitue un frein à la continuité écologique de la rivière. En effet, ces barrières physiques empêchent la libre circulation des poissons hôtes telles que les truites *fario* (dont la présence est obligatoire pour le développement de la moule perlière) et peuvent ainsi induire un impact sur la survie de l'espèce. Ces barrières constituent également un frein à l'écoulement sédimentaire, ce qui entraîne la formation de plan d'eau stagnant en amont de ces barrages, conduisant à l'accumulation de la matière organique et à la formation de vase dans le lit de la rivière. Ces zones sont impropres à la survie des moules perlières. En été, l'accumulation de la matière organique et le faible renouvellement de ce plan d'eau stagnant entraînent une augmentation de la température et donc une diminution de la quantité d'oxygène dissous, pouvant ainsi conduire à une eutrophisation du milieu. Des travaux sont réalisés au niveau de ces barrages pour permettre la restauration de la continuité écologique de la Dronne par la destruction de ces barrières physiques. En parallèle, des expérimentations en conditions contrôlées de laboratoire sont réalisées dans le but de cibler les zones de réintroduction des nouvelles moules.

L'objectif de cette thèse est donc d'évaluer la sensibilité des juvéniles de moule perlière (considérés comme le stade de vie le plus sensible de l'espèce) face aux facteurs environnementaux tels que la température, les nutriments (nitrates et phosphates) ou encore la quantité d'oxygène dissous mais aussi face aux facteurs de contamination (essentiellement métalliques). Pour répondre à cet objectif, les seuils de toxicité sont déterminés pour chaque facteur étudié et l'effet de ces facteurs est évalué à différents niveaux (expression génétique, croissance ou comportement) afin d'améliorer nos connaissances sur *Margaritifera margaritifera*.

I. Transport et conditions de maintien en laboratoire

a. Transport des organismes

La distance entre la ferme aquacole où sont produites les moules perlières (Firbeix – France) et le laboratoire où sont effectuées les expérimentations (Arcachon – France) est de 253 kilomètres. Une étude sur l'effet du transport des mulettes entre la ferme d'élevage et le laboratoire a donc été réalisée avant de commencer les travaux.

Les mulettes sont transportées dans une boîte en plastique d'un volume de 500 mL contenant de l'eau de la ferme aquacole (eau prélevée dans un affluent de la Dronne). La boîte est munie d'un bulleur à pile permettant l'aération de l'eau et ne contient aucun sédiment. L'ensemble est placé dans une glacière contenant des packs de froid permettant de transporter les mulettes à une température de 12°C. Une fois au laboratoire, la viabilité des juvéniles (mouvement du pied du bivalve) est vérifiée à la loupe binoculaire.

Cette étude a été réalisée lors des trois premiers transports et a permis de montrer que le transport n'affectait pas la viabilité des jeunes moules perlières.

b. Maintien des juvéniles en laboratoire

Les individus sont maintenus en laboratoire dans des aquariums en verre de 50 litres à l'aide d'un système de circulation d'eau fermé. L'eau est filtrée en permanence grâce à une pompe filtrante dont la sortie d'eau est munie d'une canne percée permettant une bonne oxygénation de l'eau. Pour faciliter la manipulation des juvéniles, ceux-ci sont placés dans des boîtes de pétri contenant du sable d'un diamètre compris entre 0,8 et 1,2 mm, elles même placées dans l'aquarium. Pour maintenir l'eau des aquariums à 16°C, ceux-ci sont placés dans un bain marie. L'eau est renouvelée à 50% une fois par mois avec de l'eau provenant de la ferme aquacole. Cette eau est stockée au laboratoire dans une chambre froide à 4°C à l'abri de la lumière.



Figure 1 : Photographies du dispositif permettant le maintien des juvéniles de *M. margaritifera* en laboratoire

Les jeunes mulettes sont nourries tous les deux jours avec un mélange (en proportion 1 : 3) de 3 souches d'algue verte d'eau douce qui sont directement cultivées au laboratoire : *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris* et *Stichococcus bacillaris*. Les quantités de cellule d'algue données aux mulettes sont inconnues. Cependant en mai 2018, des droites d'étalonnages ont été déterminées pour chaque souche d'algue. Pour déterminer ces droites, la densité optique est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 750 nm et en parallèle, la concentration cellulaire est déterminée par comptage sur cellule de nageotte. La relation entre la densité optique et la concentration cellulaire est déterminée à l'aide d'une droite de tendance. L'équation de cette droite permet, en fonction de la densité optique mesurée, de connaître la concentration algale d'une solution.

Plusieurs paramètres physico-chimiques sont mesurés pour suivre la qualité de l'eau : le pH, la conductivité, la quantité d'oxygène dissous, la température, les nitrates et les nitrites. Les valeurs résumées dans le tableau 1 sont mesurées à l'aide d'une sonde pour le pH, la conductivité, la température et l'oxygène, et à l'aide de tests colorimétriques pour les nitrates et les nitrites.

Tableau 1 : Paramètres physico-chimiques mesurés dans les aquariums de septembre 2017 à avril 2018.
Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type.

Conductivité (μ S/cm)	pH	O ₂ dissous (mg/L)	Température (°C)	Nitrates (mg/L)	Nitrites (mg/L)
102 $\pm$ 29	7,36 $\pm$ 0,42	8,33 $\pm$ 0,76	16,49 $\pm$ 0,12	<12,5	<0,01

II. Étude de la sensibilité des glochidies aux facteurs environnementaux et de contamination

Une étude préliminaire sur les larves de moule perlière (glochidies) a été réalisée en début de thèse. Bien que la thèse soit ciblée sur les juvéniles de *Margaritifera margaritifera*, il paraît intéressant d'étudier les effets des facteurs environnementaux et des facteurs de contamination sur les larves de ces moules d'eau douce. Cette étude pourrait permettre d'optimiser les techniques lors de la mise en contact des larves avec les poissons mais également d'approfondir nos connaissances sur le premier stade de vie de la mulette perlière.

a. Récolte des glochidies

Lors de la période de ponte qui se manifeste entre les mois d'Août et d'Octobre, les glochidies sont récoltées directement dans le milieu naturel. Les moules adultes sont prélevées dans la rivière puis placées dans des boîtes (figure 2). Lorsque les moules pondent au sein de la boîte, le stade de développement des larves est vérifié à l'aide d'un microscope de terrain. Seules les larves ayant atteint le stade de maturité sont récoltées dans des tubes.



Figure 2 : Photographie d'une moule perlière adulte après ponte



Figure 3 : Photographie de larves de *M. margaritifera* (glochidies) au microscope optique (x100)

b. Développement de protocole

Des tests préliminaires ont été effectués dans le but de développer un protocole d'expérimentation et notamment pour déterminer les meilleures conditions pour la réalisation de ces expériences (détermination du nombre de larve par unité d'expérimentation, température adéquate, présence ou non d'aération, utilisation d'eau reconstituée). Les expérimentations qui ont été effectuées sont basées sur d'autres études menées sur des larves de moule d'eau douce (Wang et al., 2007). Ces premiers tests ont été effectués à la ferme aquacole de Firbeix en raison de la faible durée de vie de ces larves.

Les larves d'une taille moyenne de 50 microns, sont comptées sur cellule de nageotte pour connaître la concentration cellulaire. La viabilité des larves est ensuite évaluée à l'aide d'une solution saturée en NaCl à 240 g/L et selon le protocole présenté par la figure 4.



Figure 4 : Méthode utilisée pour l'évaluation de la viabilité des larves de *M. margaritifera* (d'après ASTM E2455, 2006)

Les larves sont réparties dans une microplaque de 24 puits à raison de 300 larves par microplaque. La viabilité est déterminée à l'aide d'un calcul comprenant le nombre de larves ouvertes et fermées avant ajout de sel et après ajout de sel. En effet, en contact avec la solution de sel, les larves vont directement se refermer indiquant ainsi qu'elles sont viables. Les glochidies qui sont fermées avant ajout de sel et ouvertes après ajout de sel sont considérées comme mortes (Wang et al., 2007). Le calcul permettant de déterminer les pourcentages de viabilité des larves est donné par la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de viabilité} = 100 \times \frac{(\text{nb de larves fermées après ajout de NaCl} - \text{nb de larves fermées avant ajout de NaCl})}{\text{Nombre total de larves ouvertes ET fermées après ajout de NaCl}}$$

Une fois la viabilité vérifiée, où un pourcentage supérieur à 90% est nécessaire pour valider la réalisation des expériences sur larves, les glochidies sont réparties dans plusieurs bocal contenant de l'eau de la ferme aquacole à raison de 1000 larves par unité d'expérimentation. Elles sont exposées à différentes conditions : températures (18°C, 20°C et 24°C) et avec ou sans aération (Figures 5a et 5b respectivement). L'exposition aux différentes températures est réalisée dans des bacs contenant des résistances permettant de contrôler la température de l'eau et chaque unité d'expérimentation est aérée à l'aide d'un bulleur. Pour chaque condition, 3 réplicats sont mis en place. Après 24h d'exposition, la viabilité des larves est déterminée avec la même méthode utilisée avant de débiter l'expérience.

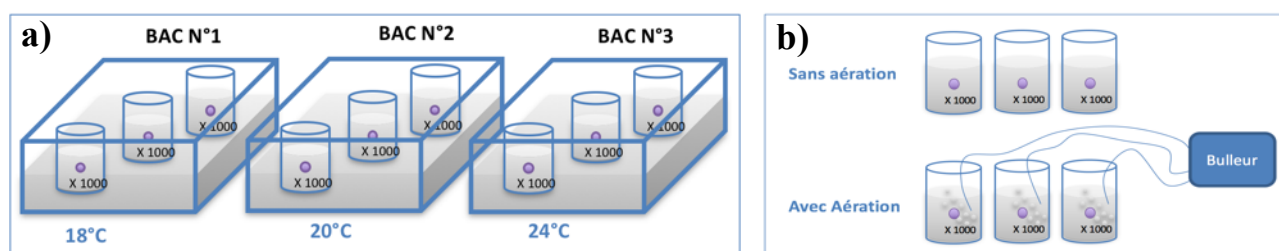


Figure 5 : Représentations schématiques des expérimentations réalisées sur les larves de *M. margaritifera*. a) exposition à différentes températures et b) exposition avec ou sans aération. D'après Wang et al., 2007.

c. Premiers résultats

Ces premières expériences ont été réalisées dans le but développer un protocole d'expérimentation adapté aux larves de moule perlière mais quelques optimisations doivent encore être réalisées avant d'obtenir des résultats exploitables. Quelques observations ont cependant pu être

notées lors du développement du protocole. En effet, la figure 6 présente le nombre moyen de larves comptées par réplicat en fonction des conditions après 24 heures et 48 heures d'exposition.

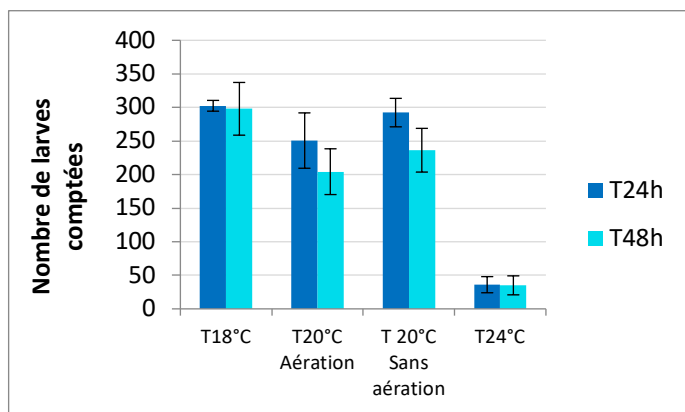


Figure 6 : Nombre moyen de larves comptées en fonction des conditions après 24 heures et 48 heures d'exposition. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type.

Les résultats montrent tout d'abord que la température semble avoir un effet sur la viabilité des larves puisque le nombre de larves prélevées diffère en fonction de la température. En effet, lorsque les larves sont exposées à 18°C, le nombre de larves prélevées est en moyenne de 300, à 20°C aux alentours de 200 larves et à 24°C, moins de 50 larves sont récoltées. Plus la température est élevée, plus la viabilité des glochidies semble être affectée notamment par une dégradation rapide de celles-ci. Une optimisation sur la méthode de détermination

de la viabilité des larves doit donc être effectuée puisque le pourcentage de viabilité est calculé à partir du nombre de larves récoltées. Ce nombre étant faussée, la viabilité réelle des larves est donc biaisée. Ces résultats montrent également que l'absence d'aération sur les unités d'expérimentation ne semble pas avoir d'effet sur le nombre de larves prélevées. Pour conclure sur les expérimentations réalisées sur les larves de moule perlière, le protocole a été développé mais quelques optimisations doivent être effectuées.

d. Transport et conservation des larves au laboratoire

Dans l'optique de réaliser ces mêmes expériences au laboratoire, l'effet du transport des larves jusqu'au laboratoire a été étudié. Elles sont transportées dans des tubes en plastique de 50 mL placés dans une glacière contenant des sacs réfrigérants et permettant de garder les larves à une température de 12°C. La viabilité est mesurée avant le transport et 16h après le transport. Un pourcentage de viabilité de 98,5 % a été déterminé avant le transport et 98,2 % après le transport. Cette étude montre donc que le transport n'a aucun effet sur la viabilité des larves transportées. Une fois au laboratoire, les larves sont conservées au réfrigérateur à 6°C dans des tubes de 50 mL contenant de l'eau de la ferme aquacole. La viabilité a été mesurée 5 jours après la ponte et un pourcentage de 94% a été déterminé. Ce résultat montre que les larves survivent plus de 48h à de basses températures. Cela pourrait permettre d'améliorer les techniques de mise en contact des larves avec les poissons, effectuées à la ferme aquacole de Firbeix. En effet, les larves pourraient être conservées à basse température et ainsi permettre une mise en contact des larves avec les poissons en décalé. **Une étude plus approfondie sera menée en Août 2019 dans le but de déterminer la durée de vie des larves à différentes températures.**

III. Étude de la sensibilité des juvéniles aux facteurs environnementaux et de contamination

Dans l'objectif de cibler les zones de réintroduction dans le milieu naturel des moules perlières produites à la ferme aquacole mais également pour améliorer nos connaissances sur l'espèce, une étude sur la sensibilité des juvéniles est réalisée. Pour répondre à ces objectifs, des expérimentations en conditions contrôlées de laboratoire ont été effectuées sur des juvéniles âgés d'une semaine à 28 mois après leur décrochage des branchies. Différents contaminants sont étudiés, seuls ou en mélange, afin de déterminer les effets létaux et sub-létaux de ceux-ci à l'aide des tests de toxicité aigüe et de toxicité chronique respectivement.

A. Contaminants étudiés

Les différents contaminants étudiés dans ce rapport sont présentés dans le tableau 2. La composition et la préparation de la solution mère ainsi que le choix de chacun de ces contaminants sont également présentés dans ce tableau.

Tableau 2 : Liste des contaminants étudiés dans ce rapport.

Contaminants	Espèce chimique	Solution mère (Préparation)	Formule	Choix du contaminant
Nitrates	NO_3^-	Sels + eau	NaNO_3	Seuils fixés sur observations dans le milieu naturel très faibles dans la littérature (Moorkens 2006)
Phosphates	PO_4^{3-}	Sels + eau	Na_2HPO_4	
Arsenic	As	Ampoule + eau	As_2O_5	Concentration en As relativement élevée dans la Dronne : max 35 $\mu\text{g/L}$ mesurée dans la Dronne en 2017
Cadmium	Cd	Ampoule + eau	CdCl_2	Métal de référence pour comparer les résultats obtenus avec l'Arsenic. Effet du Cadmium sur les bivalves très étudié dans le laboratoire
Aluminium	Al	Ampoule + eau	AlCl_3	Concentration en Al relativement élevée dans la Dronne : max 120 $\mu\text{g/L}$ mesurée dans la Dronne en 2018
Chlorure de sodium	NaCl	Sels + eau		Utilisé en tant que toxique de référence (recommandation du guide standard ASTM E225)
Nickel	Ni	Ampoule + eau	NiCl_2 ?	Métaux que l'on peut retrouver dans les pesticides ou les STEP's mais aussi à titre de comparaison avec l'étude menée par K.Nakamura sur les juvéniles de <i>M. auricularia</i> (non publiée)
Cuivre	Cu	Ampoule + eau	CuSO_4 ?	

B. Test de toxicité aigüe

Le test de toxicité aigüe est un bioessai réalisé dans des conditions contrôlées de laboratoire durant une période brève (inférieur ou égal à 96 heures) lors duquel les organismes sont exposés à une large gamme de concentrations létales en contaminant. Ce test permet d'établir une courbe représentant la viabilité des organismes en fonction de la concentration en contaminant (courbe dose-réponse). Cette courbe permet de déterminer différents seuils de toxicité dont la concentration létale à 50% (CL₅₀), concentration à laquelle la viabilité de 50 % de la population est affectée.

i. Protocole d'expérimentation (juvéniles fraîchement décrochés)

Ce protocole est basé sur le guide standard pour conduire des tests de toxicités sur des moules d'eau douce (ASTM 2006). Les organismes mesurant environ 200 micromètres sont récoltés lors du décrochage puis transportés jusqu'au laboratoire dans des boîtes hermétiques de 500 ml contenant de l'eau de la ferme aquacole. Afin de conduire l'expérience selon les recommandations du guide standard, de l'eau reconstituée est fabriquée à l'aide de différents sels : NaHCO₃, CaSO₄, MgSO₄ et KCl. Les juvéniles sont acclimatés dans un mélange d'eau de la ferme aquacole (a) et d'eau reconstituée (b) : 75% (a) / 25% (b) puis 50/50 et enfin 25/75 pendant 2 heures pour chaque proportion de mélange. L'expérience est réalisée dans des boîtes de pétri de 30 ml contenant 25 ml d'eau reconstituée. Pour chaque contaminant, 5 concentrations sont étudiées plus un témoin sans contaminant, avec 3 réplicats par condition (Figure 7). En parallèle, une condition témoin est mise en place avec de l'eau de la ferme aquacole. Les organismes sont exposés pendant 96 heures puis leur viabilité est vérifiée. Les paramètres physico-chimiques sont mesurés en début et en fin d'expérience pour les conditions témoins, C1, C3 et C5. L'expérience est réalisée dans une étuve à 16°C.

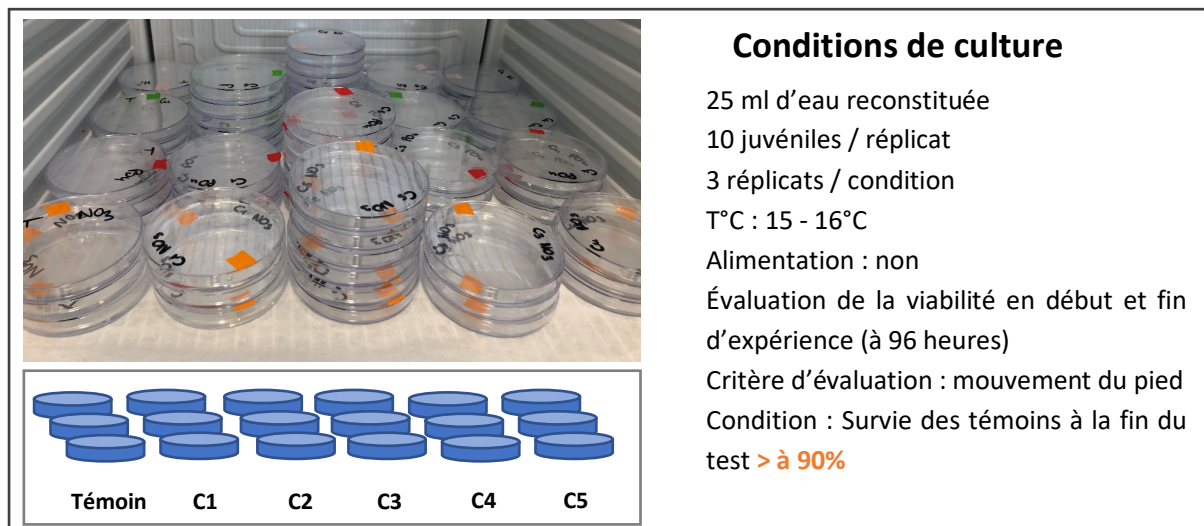


Figure 7 : Protocole expérimental pour les tests de toxicité aigüe réalisés sur les juvéniles fraîchement décrochés

ii. Optimisation du protocole

Dans le cadre du projet dans lequel est inscrit cette étude, une optimisation du protocole est réalisée dans l'optique de reproduire au mieux les conditions environnementales. En effet, le « Guide standard pour réaliser des expérimentations sur des moules d'eau douce » (ASTM (American Society

of Testing Materials), 2006) recommande de réaliser l'expérience avec de l'eau reconstituée et sans utiliser de substrat. Donc quelques modifications de ce protocole sont effectuées pour la mise en place des expérimentations sur des juvéniles âgés de plus de 10 mois après décrochage des branchies des poissons. De la silice d'un diamètre compris entre 0,8 et 1,2 millimètres est utilisée en tant que substrat et l'eau provenant de la ferme aquacole est utilisée à la place de l'eau reconstituée pour les expérimentations. Pour valider le protocole optimisé, une première expérience est effectuée avec un toxique de référence, un contaminant dont l'effet sur la moule d'eau douce est certain. Le toxique choisis est le chlorure de sodium (NaCl). Ensuite, une deuxième expérience visant à comparer les effets de la présence de substrat dans les expérimentations est mise en place en exposant les juvéniles à des concentrations croissantes en NaCl et en cadmium.

a. Validation du test avec un toxique de référence

Un test de toxicité a été réalisée où les juvéniles sont exposés à différentes concentrations en NaCl. Le protocole d'expérimentation est présenté par la figure 8.

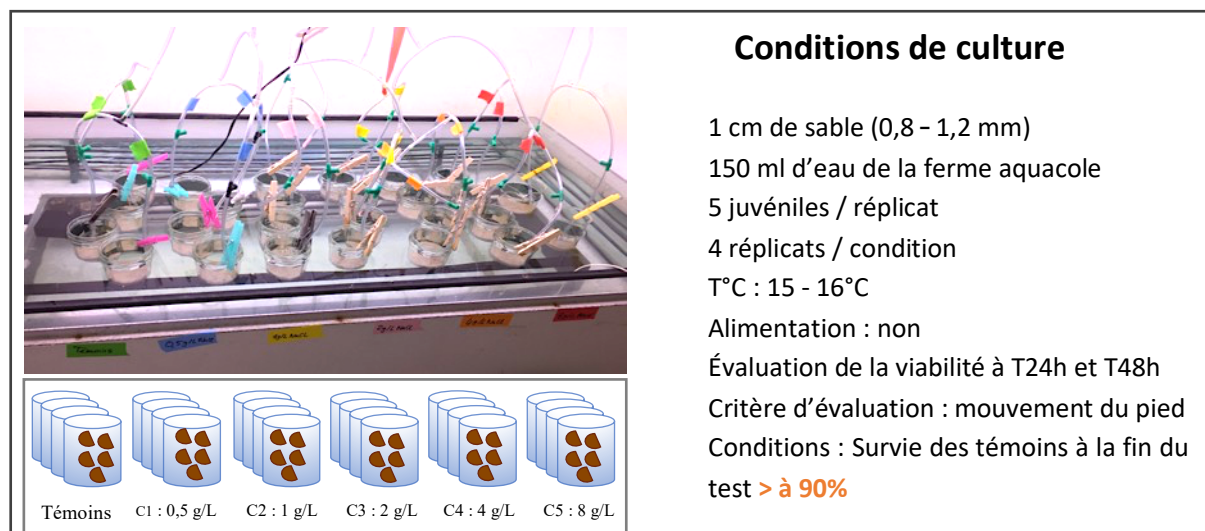


Figure 8 : Protocole d'expérimentation du test de toxicité aiguë où les juvéniles de *M. margaritifera* sont exposés à différentes concentrations en NaCl pendant 48 heures.

Les juvéniles âgés de 10 mois sont exposés à différentes concentrations en sel : 0.5, 1, 2, 4 et 8 g NaCl /L ainsi qu'à une condition témoin où aucun contaminant n'est ajouté. Les jeunes moules sont placées dans des bocaux en verre de 300 ml contenant environ 1 cm de sable d'un diamètre compris entre 0,8 et 1,2 mm et 150 ml d'eau de la ferme aquacole dans un système statique signifiant que l'eau de culture n'est pas renouvelée pendant l'expérience. Chaque unité d'expérimentation est aérée et placée dans un bain marie permettant de garder les muettes à une température comprise entre 15 et 16°C. Chaque condition est répétée en 4 réplicats avec 5 individus par unité d'expérimentation. Les juvéniles ne sont pas nourris pendant l'expérience. La viabilité est évaluée en début d'expérience, après 24 heures et 48 heures d'exposition et celle-ci est mesurée par observation du mouvement du pied pendant une période de 5 minutes. Le test n'est validé que si la survie des juvéniles chez les témoins est supérieure à 90%.

La figure 9 présente le pourcentage de mortalité des juvéniles de moule perlière en fonction de la concentration en Chlorure de sodium, soit une courbe dose-réponse. Lorsque les jeunes moules sont

exposées pendant 48 heures à une concentration en NaCl de 2 g par litre, 100 % des individus (soit 20 pour une condition) sont affectés. Le même phénomène est observé pour des concentrations en sel de 4 et 8 g/L. Une **CL₅₀ à 48h de 1,1 g NaCl /L** a été déterminée avec un intervalle de confiance à 95% compris entre 0,87 et 1,33.

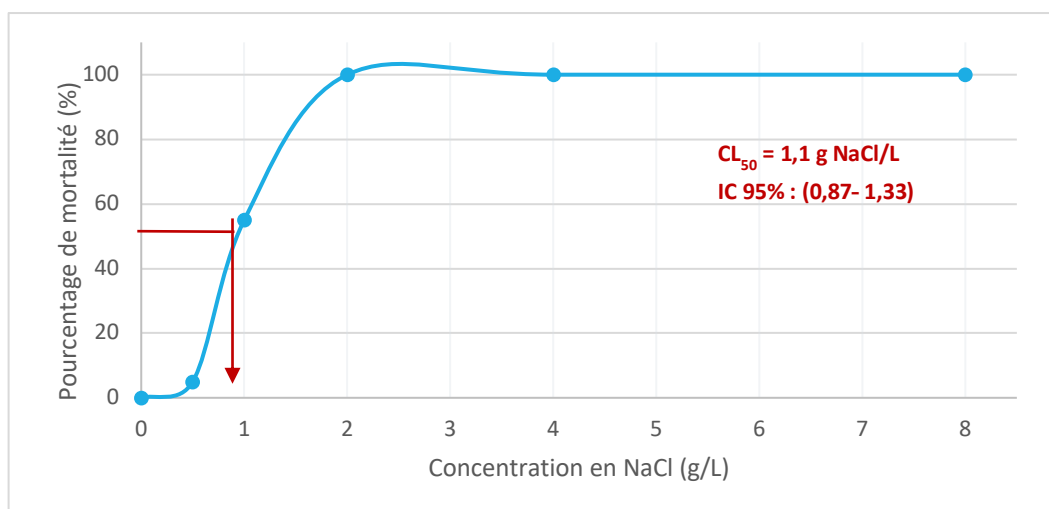


Figure 9 : Pourcentage de mortalité des juvéniles de *M. margaritifera* (âgés de 13 mois) en fonction de la concentration en sel (en g/L) pour une durée d'exposition de 48 heures

Le pourcentage de viabilité chez les témoins est de 100% et celle-ci semble suivre une tendance dose dépendante en fonction des différentes concentrations étudiées. Le protocole d'expérimentation pour le test de toxicité aigüe sur juvéniles de *M. margaritifera* a donc pu être validé.

b. Validation de l'utilisation de substrat dans les expériences (NaCl et Cd)

Pour valider l'utilisation de silice en tant que substrat lors des expérimentations, deux expériences sont mises en place en exposant les juvéniles à différentes concentrations en NaCl et en cadmium en se basant sur le protocole présenté en figure 8. En parallèle, une condition avec du substrat est mise en place pour chaque contaminant. La figure 10 présente la viabilité des juvéniles âgés de 22 mois après 96 heures d'exposition à différentes concentrations en NaCl. Les concentrations létales à 50% obtenues sont de 1.33 et 1.19 g NaCl/ L pour les conditions avec substrat et sans substrat respectivement. Bien que ces valeurs semblent différentes, les analyses statistiques ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative pour ces deux valeurs. Ainsi, l'utilisation de substrat ne semble pas impacter les résultats obtenus. En ce qui concerne l'exposition au Cadmium, le pourcentage de viabilité à la fin de l'expérience étant de 100% pour chaque condition (avec ou sans substrat), la comparaison des seuils de toxicité n'a pas pu être réalisée. Cependant, les concentrations réelles en cadmium dans les unités d'expérimentation ont été mesurées et sont présentées par le tableau 3. De manière globale, les concentrations moyennes semblent légèrement plus élevées en absence de substrat, cependant les tests statistiques ont montré qu'il n'y avait aucune différence dans les concentrations en cadmium pour chaque condition avec ou sans substrat.

Viabilité (% $\pm$ SD) des juvéniles de *M. margaritifera* âgés de 22 mois en fonction de différentes concentrations en sel après une exposition de 96 heures avec et sans substrat.

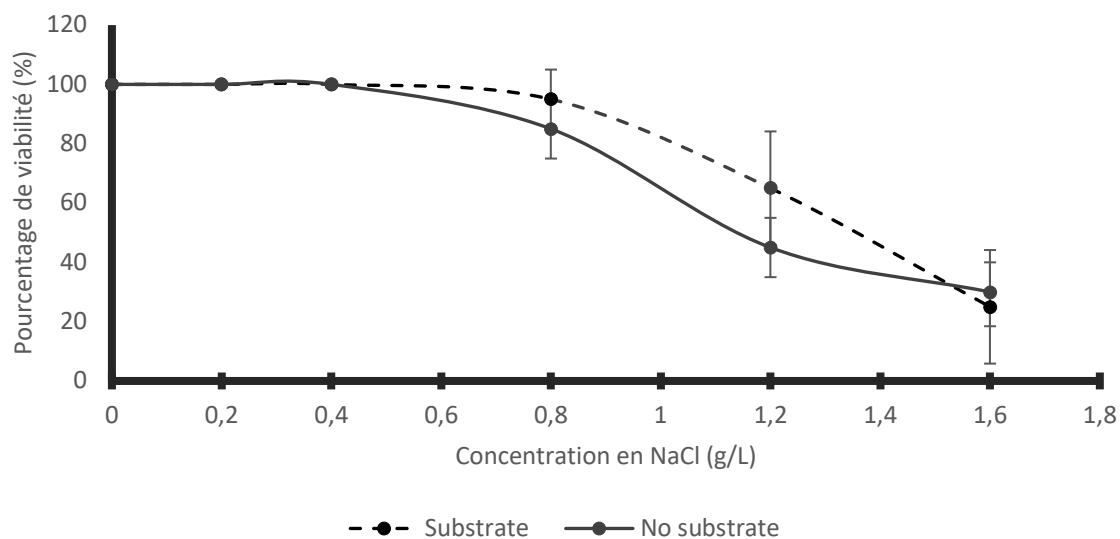


Figure 10 : Viabilité des juvéniles de *M. margaritifera* âgés de 22 mois après exposition de 96 heures à différentes concentrations en NaCl en fonction de la présence ou non de substrat.

Tableau 3 : Concentrations réelles en cadmium($\mu\text{g/L}$) mesurées lors de l'expérimentation conduite avec et sans substrat

Concentrations nominales ($\mu\text{g/L}$)	Concentrations réelles en Cadmium ($\mu\text{g/L} \pm \text{SD}$)	
	<i>Avec substrat</i>	<i>Sans substrat</i>
0	0.61 ± 0.44	0.22 ± 0.32
5	2.99 ± 1.82	3.04 ± 1.09
15	7.99 ± 5.03	11.53 ± 6.65
30	22.83 ± 10	33.9 ± 15.96
60	48.91 ± 15.07	70.57 ± 41.41
120	110.78 ± 31.72	147.51 ± 92.28

Ces résultats permettent ainsi de valider le protocole d'expérimentation mis en place puisque la présence de silice en tant que substrat ne semble pas impacter les résultats obtenus.

iii. Résultats

a. Juvéniles fraîchement décrochés

Plusieurs contaminants sont étudiés : Les nitrates (N), les phosphates (P), arsenic (As), cadmium (Cd), Aluminium (Al), cuivre (Cu) et le nickel (Ni). Les concentrations nominales en contaminant testées sont présentées dans le tableau 4 et les seuils de toxicité obtenus dans le tableau 5.

Tableau 4: Résumé des concentrations nominales étudiées pour les expérimentations réalisées sur des juvéniles de moule perlière fraîchement décrochés

Contaminants	Unités	C1	C2	C3	C4	C5
Nitrates	mg/l	128	256	512	1024	2048
Phosphates	mg/l	0,2	1	2	4	6
Arsenic	µg/l	15	30	60	80	120
Cadmium	µg/l	15	30	60	80	120
Aluminium	µg/l	120	250	500	750	1000
Cuivre	µg/l	40	60	80	100	120
Nickel	µg/l	100	200	400	500	600

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

Contaminants	CL50 (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 que les juvéniles fraîchement décrochés présentent une sensibilité relative au contaminant testé. En effet, les juvéniles de moins de 5 jours sont sensibles au cadmium, au cuivre et au nickel puisque des seuils de toxicité de 35.3, 33.55 et 105.24 µg/L respectivement ont été déterminés. Alors que pour les phosphates, l'aluminium et l'arsenic, ces seuils sont supérieurs aux plus grandes concentrations testées, montrant une certaine tolérance des juvéniles à ces différents facteurs. En ce qui concerne les nitrates, un seuil de 1006 mg NO₃-/L a été déterminé, ce qui montre que les juvéniles sont très tolérants à ce contaminant puisque ces valeurs sont très largement supérieures à celles retrouvées dans l'environnement. Une sensibilité similaire au cadmium et au nickel est observée pour les juvéniles de *Margaritifera auricularia* (K.Nakamura ; résultats non publiés). En effet, K. Nakamura détermine un seuil de 38,85 µg/L et de 124,6 µg/L pour le cadmium et le nickel respectivement. En ce qui concerne le cuivre, *M. margaritifera* est l'espèce la plus sensible des deux puisque pour les juvéniles de *M. auricularia*, le seuil de toxicité pour le cuivre est de 58,64 µg/L contre 33.55 µg/L pour *M. margaritifera*.

b. Juvéniles âgés d'au moins 10 mois

À la suite du développement du protocole d'expérimentation, des tests de toxicité aigüe ont été réalisés avec différents contaminants et le choix de ces contaminants est indiqué dans le tableau 2. Le tableau 6 résume les concentrations en contaminant étudiées.

Tableau 6 : Résumé des différentes concentrations d'exposition (C1 à C5) pour les tests de toxicité aigüe

Conditions	C1	C2	C3	C4	C5
<i>Nitrates (mg/L)</i>	128	256	512	1024	2048
<i>Phosphates (mg/L)</i>	0,2	0,6	1,6	3	6
<i>Cadmium (µg/L)</i>	5	15	30	60	120
<i>Arsenic (µg/L)</i>	5	15	30	60	120
<i>Aluminium (µg/L)</i>	120	250	500	750	1000
<i>NaCl (g/L)</i>	0,5	1	2	4	8
<i>NaCl (g/L)</i>	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6

Le choix des concentrations d'exposition pour les phosphates s'est porté sur le caractère de pollution de ce contaminant. En effet, des concentrations supérieures à 2 mg PO₄³⁻/L correspondent à une pollution excessive (Genin, Chauvin, & Ménard, 2003). Pour l'Arsenic, une large gamme de concentration allant de 5 à 120 µg/L a été choisie avec une concentration intermédiaire de 30 µg/L correspondant à la concentration la plus élevée mesurée dans la Dronne (35µg/L). À titre de comparaison, les mêmes concentrations en cadmium sont étudiées bien que le cadmium mesuré dans la Dronne soit inférieur à la limite de détection. Pour les nitrates, les concentrations étudiées sont très élevées et sont susceptibles de ne jamais être retrouvées dans le milieu naturel mais cette gamme a été choisie par rapport aux données de la littérature (Soucek & Dickinson, 2012). Cette étude a permis de déterminer des CL₅₀ à 96h de 357 et 937 mg/L pour des juvéniles de moule d'eau douce : *Lampsilis siliquoidea* et *Megaloniais nervosa* respectivement. Pour chaque expérience, les concentrations réelles des contaminants étudiés sont mesurées (sauf pour NaCl). Les valeurs réelles exprimées en moyenne ± écart-type sont présentées en ANNEXE I. Plusieurs paramètres physico-chimiques sont mesurés en début et en fin d'expérience pour les conditions témoins, C1, C3 et C5 : le pH, la conductivité, la quantité d'oxygène dissous et la température.

Les seuils de toxicité déterminés à l'aide des tests de toxicité aigüe pour les différents facteurs étudiés sont présentés dans le tableau 7. La présence de substrat, le nombre d'organisme utilisé et l'âge des juvéniles sont également présentés dans ce tableau.

Tableau 7 : 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)	Substrat	Nombre d'organisme	CL ₅₀ (48h)	CL ₅₀ (96h)	Unités
NaCl	Chlorure de sodium	10	Oui	120	1.1 (0,87 - 1,33)	ND ^a	g/L
NaCl	Chlorure de sodium	22	Non	120	> 1,6 ^b	1,19 (1,11 - 1,28)	g/L
NaCl	Chlorure de sodium	22	Oui	120	1,5 (1,35 - 1,66)	1,33 (1,24 - 1,42)	g/L
NO ₃ ⁻	Nitrates	13	Oui	120	> 2290 ^b	1000 – 1500 ^c	mg/L
PO ₄ ³⁻	Phosphates	13	Oui	120	> 5.01 ^b	> 5.01 ^b	mg/L
CdCl ₂	Cadmium	16	Oui	120	> 112 ^b	> 112 ^b	µg/L
CdCl ₂	Cadmium	22	Non	120	> 147 ^b	> 147 ^b	µg/L
CdCl ₂	Cadmium	22	Oui	120	> 110 ^b	> 110 ^b	µg/L
As ₂ O ₅	Arsenic	17	Oui	96	> 127 ^b	> 127 ^b	µg/L
AlCl ₃	Aluminium	28	Oui	120	> 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

Les résultats obtenus montrent que les juvéniles de *M. margaritifera* âgés de 10 à 28 mois sont faiblement sensibles aux contaminants étudiés puisque les seuils de toxicités sont majoritairement supérieurs aux plus grandes concentrations testées. Cependant, il est important de noter que ces expérimentations ne sont réalisées que sur une période de temps courte (96 heures) et ayant un métabolisme très lent, les effets de ces contaminants sur les juvéniles de moule perlière pourraient ne pas être représentatifs, d'autant plus que ces organismes pourraient mettre en place un moyen d'échapper à la contamination en minimisant la filtration de l'eau. Ce type de test permet donc de comparer la sensibilité de l'espèce par rapport à d'autres espèces de moule d'eau douce mais aussi de déterminer des seuils de toxicité comme les CL₂₀ ou les CL₁₀ (concentrations létales où 20 ou 10 % des organismes sont décédés) qui peuvent être utilisés pour étudier les effets à plus long terme de ces mêmes contaminants. D'autres études doivent être réalisées en parallèle sur des périodes de temps plus longue et à des concentrations plus proches des conditions environnementales. Ce type d'étude est réalisé à l'aide d'un test de toxicité chronique.

C. Test de toxicité chronique

Le test de toxicité chronique est un bioessai réalisé dans des conditions contrôlées de laboratoire durant une longue période (plusieurs semaines voire quelques mois) lors duquel les organismes sont exposés à des concentrations non létales en contaminant ou des concentrations environnementales. Ce test permet d'étudier l'effet d'une exposition chronique aux facteurs étudiés. Ces effets peuvent être évalués à différents niveaux : au niveau moléculaire en étudiant l'expression génétique induite par ces facteurs, au niveau de l'organisme par ses capacités de filtration, de bioaccumulation ou encore du comportement des organismes. Ce test permet ainsi, comparé au test de toxicité aiguë, de déterminer les effets et les mécanismes de toxicité des facteurs étudiés et donc d'améliorer nos connaissances sur *Margaritifera margaritifera*.

i. Protocole d'expérimentation

Comme pour le test de toxicité aigüe, ce protocole est basé sur le « guide standard pour réaliser des expérimentations sur des moules d'eau douce » (ASTM (American Society of Testing Materials), 2006) avec certaines modifications. Pour ce test, le même protocole est utilisé à l'exception de quelques conditions qui sont résumées dans la figure 11. En effet, le système mis en place est un système semi-statique où l'eau est renouvelée à 50% tous les 3 jours. Aussi, les juvéniles sont nourris tous les deux jours avec un mélange de 3 algues où cette fois, les quantités d'algues données sont connues soit $3,19 \cdot 10^6$ cellules tous les deux jours. Les juvéniles sont placées dans des bocaux en verre de 300 mL contenant 1 cm de sable et 200 ml d'eau de la ferme aquacole. Ces unités d'expérimentation sont aérées et placées dans un bain marie à 15-16°C.

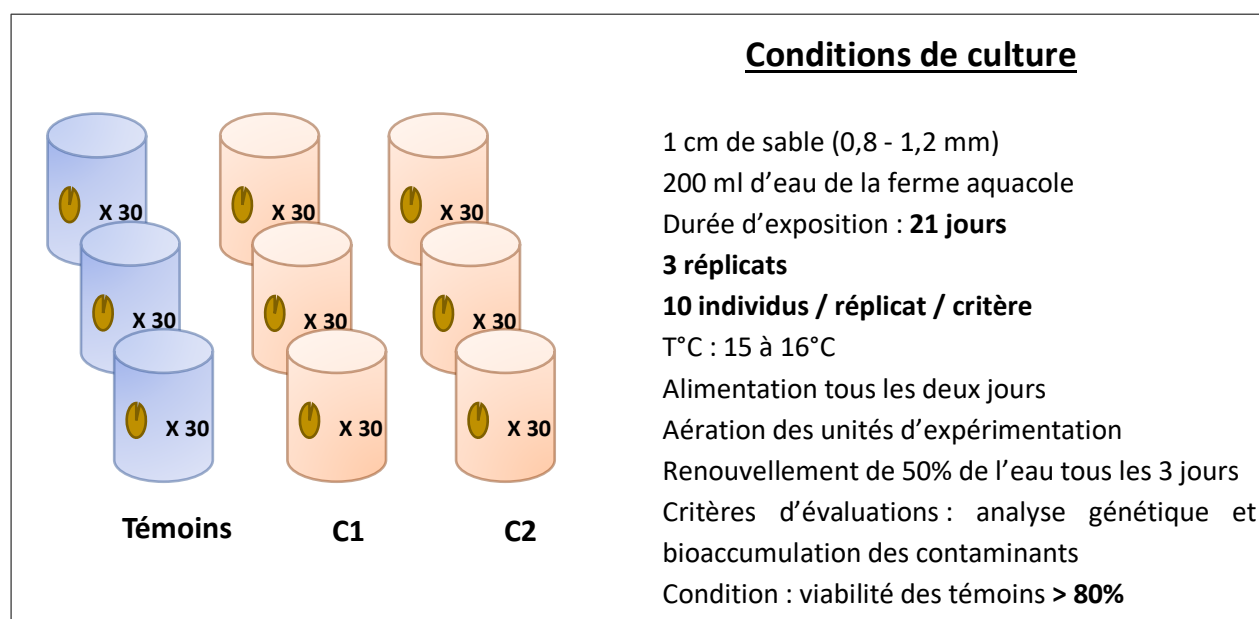


Figure 11 : Protocole d'expérimentation pour les tests de toxicité chronique où les juvéniles de *M. margaritifera* sont exposés à différentes concentrations en Arsenic ou Cadmium pendant 21 jours

Dans cette étude, deux critères d'évaluation sont étudiés : l'expression des gènes et la bioaccumulation des contaminants par ces organismes. Ainsi, pour chaque critère, 5 individus par unités d'expérimentation sont prélevés après 4, 7 et 21 jours d'exposition. La viabilité est également évaluée à 4, 7, 14 et 21 jours. Les paramètres physico-chimiques (pH, conductivité, quantité d'oxygène dissous et température) sont mesurées en début et fin d'expérience, et chaque semaine. Les contaminants contenus dans les unités d'expérimentation peuvent diminuer par adsorption ou par évaporation pendant l'exposition. Les concentrations sont réajustées par ajout compensé en fonction des pertes. Le test est validé si la viabilité des témoins à la fin de l'expérience est supérieure à 80%.

ii. Critères d'évaluation

Contrairement aux tests de toxicité aiguë pour lesquels le critère d'évaluation est essentiellement la viabilité des juvéniles, d'autres critères sont étudiés pour les tests de toxicité chronique. En effet, le but d'un test de toxicité chronique est de déceler les effets sub-létaux du contaminant étudié c'est-à-dire les effets n'induisant pas la mortalité des organismes. Ces critères peuvent être observés à différentes échelles par exemple au niveau moléculaire par l'étude de l'expression des gènes ou encore au niveau de l'organisme par l'étude du comportement de celui-ci.

a. Expression des gènes

Dans cette étude, l'expression des gènes impliqués dans diverses fonctions et processus biologiques sont étudiés et présentés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Liste des gènes étudiés et leurs fonctions associées

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

L'effet d'une exposition à l'arsenic et au cadmium sur l'expression des 21 gènes dont 3 gènes de références (actine, RPL7 et EF1) est étudié. Cette analyse permettra de connaître les impacts d'une exposition aux contaminants étudiés sur l'expression des gènes impliqués dans le stress oxydant, le métabolisme des mitochondries, dans les processus de détoxication ou encore de mort cellulaire. Il est important de rappeler que l'expression des gènes ne conduit pas forcément à effet délétère mais constitue les premières réponses à la suite d'une exposition à un contaminant.

b. Comportement des organismes

Le comportement des juvéniles apparaît comme un indicateur important puisqu'un impact sur le comportement de ces organismes peut se traduire par une incapacité des juvéniles à s'enfouir dans le sédiment. Dans la littérature, aucune étude n'a encore été menée sur l'étude du comportement des juvéniles de moule d'eau douce. Un protocole d'expérimentation est actuellement en développement pour permettre d'utiliser ce critère d'évaluation. Un premier test a permis de montrer que la distance parcourue et la vitesse de déplacement des juvéniles âgés de 10 mois exposés au NaCl pendant 24 heures, étaient réduites comparées aux juvéniles non contaminés. Une fois que le protocole sera mis en place, l'effet des différents contaminants étudiés dans ce rapport sera étudié sur le comportement des juvéniles.

iii. Résultats

a. Effets chroniques d'une exposition de 21 jours au Cadmium et à l'Arsenic

Les juvéniles âgés de 17 mois sont exposées à trois conditions : une condition témoin et deux concentrations en métal : 2 et 5 µg/L pour le cadmium et 10 et 35 µg/L pour l'arsenic. Le choix de ces concentrations s'est porté sur les concentrations étudiées lors d'une étude interne réalisée en 2012 sur des moules perlières adultes (Baudrimont, 2012) où les moules sont exposées pendant 7 jours à 2 et 5 µg/L de cadmium et 10 µg/L pour l'arsenic. Pour la concentration à 35 µg /L d'arsenic, le choix s'est porté sur la concentration la plus élevée en arsenic mesurée dans la Dronne.

Viabilité des juvéniles pendant l'expérience

Tableau 9: Pourcentage de viabilité des juvéniles de *M. margaritifera* à différents temps en fonction des différentes conditions d'exposition (n = nombre d'individu à chaque temps ; T = témoin ; C1 = concentration 1 ; C2 = concentration) ; *100% pour n=8

		T0 jours (n=30)	T7 jours (n=20)	T14 jours (n=10)	T21 jours (n=10)
Cadmium	T	100	100	100	100
	C1	100	98	100	100
	C2	100	100	100	100
Arsenic	T	100	100	100	100
	C1	100	100	100	100
	C2	100	100	93	100*

Le tableau 9 présente le pourcentage de viabilité des juvéniles pendant l'expérience. La viabilité est calculée sur le nombre total d'individu à chaque temps, avec n correspondant au nombre d'individu dans chaque unité d'expérimentation. La viabilité des juvéniles n'est pas affectée pendant l'expérience sauf pour la condition à 2µg/L en cadmium où une mortalité de 2% est observée après 7 jours d'exposition et pour la condition à 35 µg/L en arsenic où une mortalité de 7% est déterminée après 14 jours d'exposition. Ces pourcentages de mortalité restent très faibles et le test est validé puisque la viabilité pour les témoins est de 100%.

Effets sur l'expression des gènes après 4, 7 et 21 jours d'exposition

La figure 12 présente les résultats obtenus pour l'expression des gènes des juvéniles âgés de 22 mois après exposition au cadmium et à l'arsenic pendant 4, 7 et 21 jours. 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. 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 12, seuls les résultats statistiquement significatifs sont présentés. Les gènes Bcl2, p53, Bak et Caspase3 ont un rôle dans le processus d'apoptose (mort cellulaire). Les gènes MT et MXR ont un rôle dans le processus de détoxification.

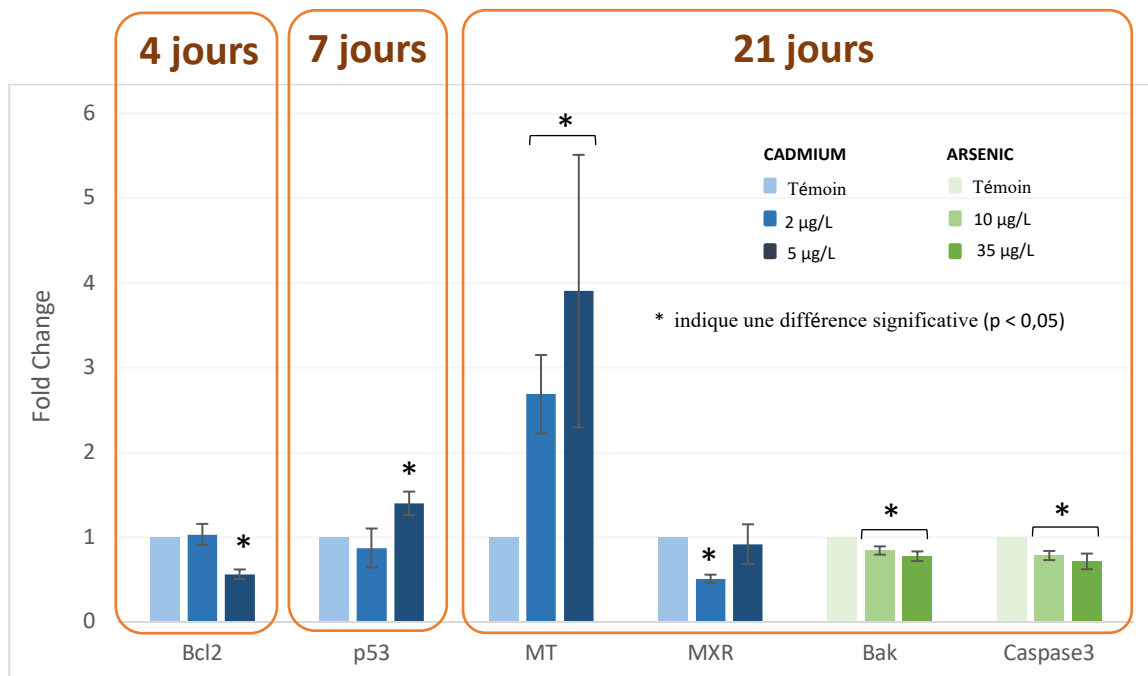


Figure 12 : Expression de différents gènes par rapport aux témoins après 4, 7 et 21 jours d'exposition des juvéniles de *M. margaritifera* âgés de 17 mois à différentes concentrations en cadmium et en arsenic.

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 et que l'expression des gènes MT et MXR montre 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.

Les résultats obtenus montrent ainsi que bien qu'aux mêmes concentrations, la viabilité des juvéniles ne soit pas affectée (tableau 10), des effets peuvent être observés à l'échelle moléculaire, ce qui souligne l'importance de la mise en place d'expérimentation en concentrations environnementales et à plus long terme.

b. Effets chroniques (14 jours) d'une exposition à différentes températures et concentrations en oxygène dissous

Les juvéniles âgés de 19 mois sont exposés pendant 14 jours à différentes températures (16°C, 21°C et 26°C) et en présence ou en absence d'aération (figure 13). Les juvéniles sont placés dans des bocaux en verre de 300 ml contenant 200 ml d'eau de la ferme aquacole. Chaque unité d'expérimentation contient environ 1 cm de substrat et 5 juvéniles. Chaque condition est répétée 3 fois. Les juvéniles sont nourris 2 fois par semaine et l'eau est renouvelée à 50% tous les 3 jours. La viabilité est vérifiée chaque semaine. Les paramètres physico-chimiques (O₂, T°C, pH, Conductivité) sont mesurés tous les 3 jours. Les juvéniles sont gardés à la fin de l'expérience pour une analyse ultérieure de l'expression des gènes.

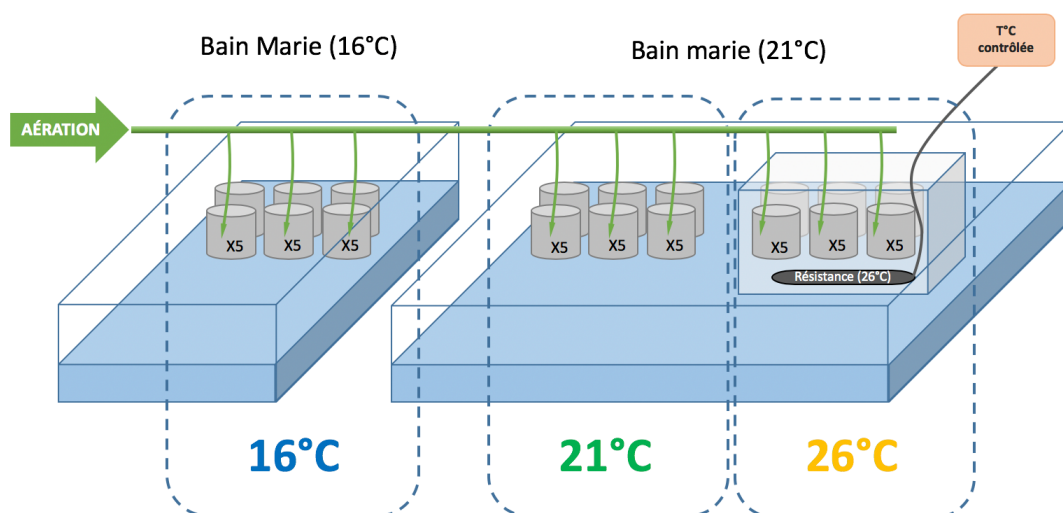


Figure 13 : Schéma du protocole expérimental mis en place pour étudier l'effet de la température et de la quantité d'oxygène sur les juvéniles de moule perlière âgés de 19 mois.

Viabilité des juvéniles

A la fin de l'expérience, la viabilité des juvéniles âgés de 19 mois est de 100% pour chaque condition.

Moyennes des températures et de la quantité d'oxygène dissous

Le tableau 10 présente les moyennes des températures et de la quantité d'oxygène dissous pour chaque condition.

Tableau 10 : Moyennes ($\pm$ écart-type) sur 14 jours des températures et de la quantité d'oxygène dissous pour chaque condition

Conditions	Oxygène (mg/L)	Temp (°C)
16° avec O2	9,11 $\pm$ 0,34	15,78 $\pm$ 0,27
16°C sans O2	7,85 $\pm$ 0,65	15,86 $\pm$ 0,39
21°C avec O2	7,62 $\pm$ 0,25	22,07 $\pm$ 0,27
21°C sans O2	7,09 $\pm$ 0,27	22,21 $\pm$ 0,31
26°C avec O2	6,94 $\pm$ 0,42	25,51 $\pm$ 0,19
26°C sans O2	6,27 $\pm$ 0,20	25,52 $\pm$ 0,22

Analyse de l'expression des gènes

L'analyse de l'expression des gènes ne sera pas présentée dans ce rapport. Les données sont actuellement en cours de traitement.

D. Expérience multifactorielle

À la suite des résultats obtenus avec les tests de toxicité aigüe pour les nitrates et les phosphates, avec des seuils de toxicité montrant une certaine résistance des juvéniles à de très fortes concentrations, une expérience à plusieurs facteurs a été réalisée. Cette expérience est effectuée avec des concentrations représentatives du milieu naturel et permettra d'évaluer les potentiels effets synergiques d'une exposition à plusieurs facteurs.

Les juvéniles sont exposés pendant 96 heures à différents facteurs en mélange : une condition témoin, deux températures (15°C et 22°C), trois concentrations en nitrates (5, 10 et 50 mg/L) et 3 concentrations en phosphates (0.05, 0.22 et 1 mg/L) soit 32 conditions différentes avec 3 réplicats par condition. Le choix des concentrations étudiées se porte sur des données environnementales : 5 et 10 mg /L pour les nitrates correspondant aux concentrations minimum et maximale retrouvées dans la Dronne et 50mg/L correspondant à la norme de potabilité. Pour les phosphates, 0.05 et 0.22 correspondent aux concentrations minimum et maximale mesurées dans la Dronne et 1 mg/L correspond à une concentration inférieure à une pollution excessive en phosphates. Pour les températures, le choix s'est basé sur la température la plus élevée mesurée en été dans la Dronne (22°C) contre 16°C, température à laquelle les mulottes sont élevées à la ferme aquacole et gardées au laboratoire. La représentation schématique du protocole expérimental est présentée par la figure 14.

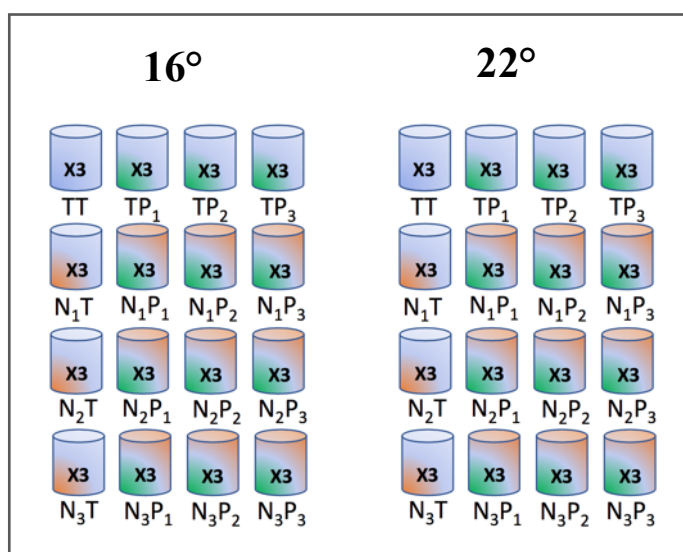


Figure 14 : Protocole expérimentale de l'expérience multifactorielle.
(T : témoin ; N : nitrates ; P : phosphates)

Les conditions d'expérimentation sont identiques au test de toxicité aigüe. Les individus sont placés dans des bocaux en verre (5 individus par unité d'expérimentation) contenant 1 cm de sable et 150 ml d'eau de la ferme aquacole. Ces bocaux sont placés dans un bain marie à 16°C ou à 22°C. Les mulottes ne sont pas nourries pendant l'expérience et d'un point de vue pratique, les unités d'expérimentation ne sont pas aérées mais la quantité d'oxygène dissous est supérieure à 5,5 mg/L.

La viabilité des individus est évaluée après 48h d'exposition et à la fin de l'expérience (96 heures). Pour cette expérience où les juvéniles sont exposées à des concentrations non létales, l'expression

des gènes sera étudiée. Après 96h d'exposition, les jeunes moules sont stockées au congélateur à -20°C pour être analysées ultérieurement.

À la fin de l'expérience, quelle que soit la condition, 100% des individus sont viables. En ce qui concerne l'expression des gènes, l'analyse n'ayant pas encore été réalisée, les résultats ne seront pas présentés dans ce rapport.

IV. Travaux envisagés

Ce chapitre concerne les travaux qui seront réalisés à partir du mois d'Août 2019 sur différents stades de vie de la moule perlière.

a. Expérimentations au stade larvaire

Comme indiqué dans le premier chapitre sur les expérimentations réalisées sur les larves de moule, quelques optimisations doivent être effectués, notamment sur la détermination de la viabilité des larves. Les conditions optimales seront déterminées dans le but d'obtenir le même nombre de larves récoltées à chaque prélèvement. Une condition témoin sera alors mis en place à l'aide de ces conditions optimales pour comparer le nombre de larves récoltées et permettra ainsi de déduire le nombre de larves dégradées pendant l'exposition. La mise en place de ce « témoin » permettra d'obtenir un pourcentage de viabilité non faussé.

Une fois le protocole optimisé et la durée de vie des larves déterminée, les seuils de toxicité (CL_{50}) pour les nitrates, les phosphates, le cadmium et l'arsenic seront déterminés à l'aide de test de toxicité aigüe.

b. Expérimentations au stade juvénile

Au stade juvénile, l'impact sur l'expression des gènes sera analysé pour l'expérience multifactorielle et pour le test de toxicité chronique à différentes températures et concentrations en oxygène.

Un nouveau critère d'évaluation pour étudier l'effet des facteurs choisis dans cette thèse sera développé. Il s'agit ici de mettre au point un protocole d'expérimentation permettant d'étudier le comportement des juvéniles. En effet, des études sont menées sur le comportement des larves d'huître au sein du laboratoire EPOC. L'objectif est donc de développer un protocole adapté aux juvéniles de moule perlière. Il faudra alors déterminer le comportement « témoin » avant de pouvoir étudier l'impact des facteurs. Grâce à ce type d'étude, la vitesse de déplacement ou encore la distance parcourue par les moules pourront être évalués.

Au cours du mois d'Août 2019, les effets chroniques des phosphates et des nitrates seront étudiés à l'aide d'un test de toxicité chronique de 21 jours. Les contaminants seront étudiés seuls mais également en mélange. Ce test permettra de déterminer l'effet des nutriments seuls ou en mélange sur l'expression des gènes.

Une expérience multi-facteurs sera mis en place dans le but de reproduire au mieux les conditions environnementales. Les juvéniles seront exposés à différents facteurs en mélange : nitrates + phosphates + arsenic + aluminium + cuivre + nickel. Les contaminants seront testés à des concentrations environnementales (notamment celles retrouvées dans la Dronne) et à différentes températures pour mimer les potentiels effets du réchauffement climatique. Cette expérience permettra de comprendre ou d'améliorer nos connaissances sur l'impact des conditions environnementales sur les juvéniles de moule perlière.

V. Valorisation des résultats

PRESENTATIONS AFFICHEES

- **SETAC Europe, Mai 2018 (Rome – ITALIE)** : « Sensibility of freshwater pearl mussel juveniles (*Margaritifera margaritifera*) to environmental and contamination factors »



- **ECOBIM, Mai 2018 (Bordeaux – FRANCE)** : « Sensibilité des juvéniles de moule perlière (*Margaritifera margaritifera*) aux facteurs environnementaux et de contamination »



- **SETAC Europe, Mai 2019 (Helsinki – FINLANDE)** : « Acute toxicity of different toxicants to Freshwater Pearl Mussel juveniles »



PRESENTATIONS ORALES

- **Freshwater Mollusk Conservation Society, Septembre 2018 (Verbania – ITALIE)**:
« Ecotoxicological studies on juvenile of *Margaritifera margaritifera* for reintroduction of this endangered species »



- **Workshop Freshwater mussels : Search for resettlement habitats and evaluation of protection measures, Mars 2019 (Dresden – ALLEMAGNE)** : « Acute toxicity of Sodium Chloride, Nitrates, Phosphates Cadmium and Arsenic to Freshwater Pearl Mussel juveniles (*Margaritifera margaritifera*) »



Références bibliographiques

- 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 Novembre 2012* (Vol. 33).
- Genin, B., Chauvin, C., & Ménard, F. (2003). *Cours d'eau et indices biologiques. Pollutions - méthodes - IBGN*.
- Moorkens, E. (2006). *Irish non-marine molluscs - an evaluation of species treat status. Bulletin of the Irish Biogeographical Society*.
- Soucek, D. J., & Dickinson, A. (2012). Acute toxicity of nitrate and nitrite to sensitive freshwater insects, mollusks, and a crustacean. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 62(2), 233–242. <https://doi.org/10.1007/s00244-011-9705-8>
- Wang, N., Ingersoll, C. G., Hardesty, D. K., Ivey, C., Kuntz, J. L., May, T. W., ... Barnhart, M. C. (2007). Acute toxicity of copper, ammonia, and chloride to glochidia and juveniles of freshwater mussels (Unionidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(10), 2036–2047. <https://doi.org/10.1897/06-523R.1>
- 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>

ANNEXE I

*Concentrations réelles mesurées dans les unités d'expérimentation lors des tests de toxicité aigüe réalisés sur des juvéniles de *M. margaritifera*.
Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type, en mg/L pour les nitrates et les phosphates et en $\mu\text{g/L}$ pour le cadmium, l'arsenic et l'aluminium.*

	Témoins		C1		C2		C3		C4		C5	
	[C°] nominales	[C°] réelles	[C°] nominales	[C°] réelles	[C°] nominales	[C°] réelles	[C°] nominales	[C°] réelles	[C°] nominales	[C°] réelles	[C°] nominales	[C°] réelles
Nitrates	0	4 $\pm$ 0,4	128	130 $\pm$ 1,4	256	246 $\pm$ 8,3	512	493 $\pm$ 13	1024	1026 $\pm$ 51,5	2048	2290 $\pm$ 85,7
Phosphates	0	0,02 $\pm$ 0,01	0,2	0,08 $\pm$ 0,11	0,6	0,32 $\pm$ 0,22	1,6	1,12 $\pm$ 0,29	3	2,30 $\pm$ 0,31	6	5,01 $\pm$ 0,33
Cadmium	0	0,08	5	3,95 $\pm$ 3,59	15	11,56 $\pm$ 11,76	30	23,06 $\pm$ 24,48	60	51,96 $\pm$ 45,42	120	112,55 $\pm$ 80,55
Arsenic	0	4,89 $\pm$ 0,70	5	9,84 $\pm$ 0,85	15	21,65 $\pm$ 2,69	30	34,64 $\pm$ 2,62	60	68,46 $\pm$ 12,83	120	127,25 $\pm$ 22,76
Aluminium	0	221,3 $\pm$ 17,55	125	361,99 $\pm$ 86,16	250	408,16 $\pm$ 79,53	500	566,92 $\pm$ 147,3	750	773,51 $\pm$ 272,6	1000	953,97 $\pm$ 457,9