

Concentrations métalliques et réponses biologiques in situ : Validation de l'utilisation de la dreissène en surveillance active sur le bassin de l'Orge

Sandrine Pain-Devin¹, Catherine Gourlay-Francé^{2*}, Emmanuelle Kuhn², Odile
Dedourge-Geffard¹, Alain Geffard¹, Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin²

¹ Université de Reims Champagne Ardenne, Unité de recherche Vignes et Vins de
Champagne EA 2069, Laboratoire d'éco-toxicologie.

² UR Hydrosystèmes et Bioprocédés, Cemagref Antony.

* catherine.gourlay@cemagref.fr

1. Introduction	1
2. Matériels et méthodes.....	2
2.1. Sites	2
2.2. Prélèvements	3
2.2.1 Organisation des prélèvements.....	3
2.2.2 Echantillonnage des métaux	3
2.2.3 Préparation et déploiement des DGT	3
2.3. Exposition des organismes	3
2.4. Traitement des échantillons au laboratoire.....	4
2.4.1 Mesure des concentrations en métaux.....	4
2.4.2 Réponses biologiques	4
Indice de condition	4
Biomarqueurs d'exposition	4
Biomarqueur d'effets sur le métabolisme digestif.....	5
3. Résultats et discussion.....	6
3.1. Faisabilité du suivi chimique et de la transplantation d'organismes sur le BV de l'Orge.....	6
3.1.1 Succès et limites de l'échantillonnage passif	6
3.1.2 Succès de l'encagement des dreissènes.....	6
3.2. Contamination métallique du milieu	7
3.3. Contamination des organismes.....	9
3.3.1 Validation du protocole d'analyse des dreissènes sur une contamination multi-élémentaire.....	9
3.3.2 Contamination métallique des moules transplantées.....	9
3.4. Réponses biologiques	10
Biomarqueurs d'exposition	10
Biomarqueur d'effets sur le métabolisme digestif.....	11
4. Perspectives	11
5. Bibliographie.....	11

1. Introduction

L'analyse approfondie de l'imprégnation chimique de sites-atelier et des impacts de cette multi-contamination sur les écosystèmes aquatiques soumis à une pression urbaine est un objectif fort de la phase 5 du PIREN-Seine. Cette analyse suppose l'application in situ de différentes méthodes de mesure (chimiques et biologiques), à coordonner entre les équipes de recherche du PIREN-Seine impliquées.

En 2007, nous avons cherché à valider la faisabilité d'une étude approfondie sur un des sites atelier, un petit bassin très urbanisé, le bassin versant de l'Orge. Il s'agissait donc de déployer, de façon concertée, des échantillonneurs intégratifs qui permettent une estimation moyenne de la contamination dissoute biodisponible (Tusseau-Vuillemin et al. 2004), de transplanter des dreissènes encagées, et de suivre durant cette campagne sur une durée de un mois, la contamination du milieu par des prélèvements ponctuels réguliers. Les objectifs de cette campagne étaient plus particulièrement

- de valider les méthodologies d'étude d'un site par échantillonnage intégratif et prélèvements ponctuels
- de vérifier la résistance des dreissènes à la transplantation sur l'Orge
- de fournir un aperçu de la contamination métallique des eaux de l'Orge et de ses affluents, et des différentes réponses biologiques (biomarqueurs et bioaccumulation) sur la dreissène.

2. Matériels et méthodes

2.1. Sites

Cinq sites ont été étudiés sur le bassin versant de l'Orge, dont trois directement sur l'Orge (Figure 1) :

- 1 : Orge aval, à Athis-Mons, juste avant la confluence avec la Seine
- 3 : Orge en amont de l'Yvette
- 4 : Orge amont, intitulé Orge aval Rémarde dans les graphiques suivants, à Saint-Germain-lès-Arpajon

Et deux sur des cours d'eaux annexes du bassin :

- 2 : l'Yvette, juste avant la confluence avec l'Orge
- 5 : La Prédecelle, en amont du bassin.

Les critères de choix ont reposé sur l'observation d'un gradient d'urbanisation, les possibilités d'accès et de déploiement des échantillonneurs passifs, et la sécurisation des sites. En effet, les échantillonneurs passifs restant déployés jusqu'à quinze jours, il est préférable de les installer sur des zones à accès limité.

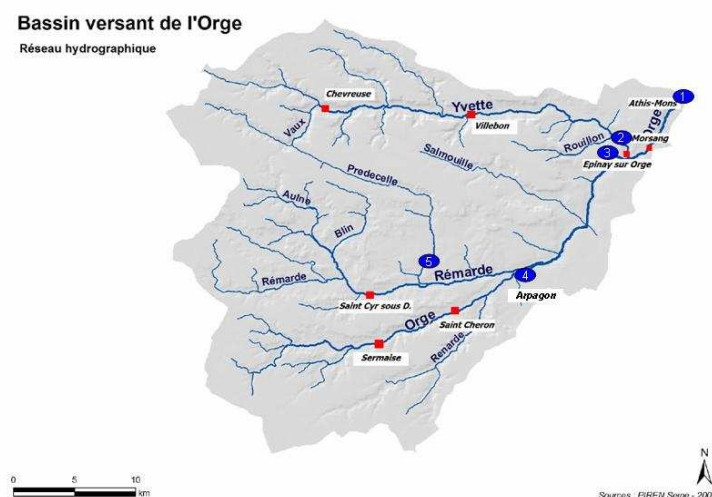


Figure 1: Bassin versant de l'Orge et sites d'études

2.2. Prélèvements

2.2.1 Organisation des prélèvements

La campagne de mesure s'est déroulée sur 4 semaines (du 25 septembre au 23 octobre 2007), au cours desquelles 5 prélèvements espacés d'une semaine ont été réalisés. A chaque point, le pH, la température et la conductivité ont été mesurés in situ, des prélèvements ponctuels pour mesure de métaux totaux et dissous, COD, et COP, chlorophylle ont été effectués. Les ions majeurs et le hydrogénéocarbonates (TAC) ont été analysés sur 2 points de prélèvement. Les métaux labiles ont été évalués par le déploiement de DGT (DGT Research, Davison et Zang, 1994) en 2 séries de 2 semaines.

2.2.2 Echantillonnage des métaux

Les échantillons destinés à l'analyse des métaux totaux et dissous ont été prélevés dans des tubes coniques Sarstedt de 50 mL en Polypropylène à usage unique, n'ayant pas subi de traitement. La filtration pour l'évaluation du métal dissous a été faite in situ sur filtre seringue PES Whatman GD/XP de porosité 0,45 µm.

2.2.3 Préparation et déploiement des DGT

Les dispositifs DGT sont constitués de gels de résine chelex-100, associés à des gels de diffusion restrictifs d'épaisseur 0,8 mm, et deux membranes filtrantes (Membranes PES Pall de porosité 0,45 µm et membranes PC Whatman nucleopore de porosité 0,4 µm, Figure 2).

Pour un site et une série de 2 semaines, 6 DGT sont déployées. Trois sont retirées au bout d'1 semaine, les 3 suivantes au bout de 2 semaines. De plus, au cours de la première série, 3 DGT supplémentaires sont déployées pendant la deuxième semaine, portant le nombre de DGT déployées simultanément à 6.

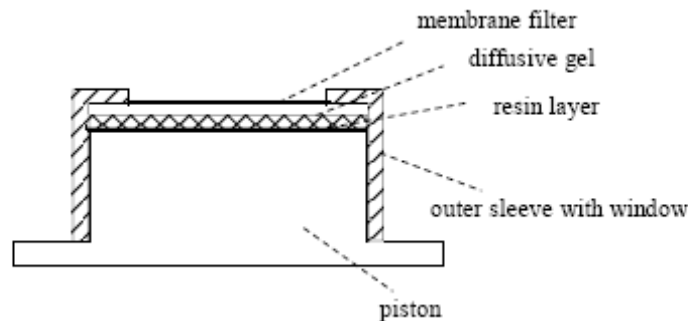


Figure 2 : Dispositif de déploiement de la DGT

2.3. Exposition des organismes

Les dreissènes (18-26mm) ont été prélevées dans le canal de l'Est Branche Nord (Meuse, 18/09/07) par section des byssus qui les maintiennent fixées sur les blocs localisés sur les bords du canal. Elles ont été ramenées au laboratoire et maintenues pendant quelques jours dans l'eau du site de prélèvement qui a été renouvelée tous les deux jours (stockage de l'eau à l'obscurité à 4°C).

Des dreissènes ont été extraites du lot et traitées pour constituer un témoin avant implantation, selon les protocoles décrits dans la section 2.4.

La veille de la transplantation sur les sites du bassin de l'Orge (24/09/07), les dreissènes ont été mises en cage à raison de 60 dreissènes par cage (10 cages au total, 2 par site) et laissées dans l'eau de leur site d'origine jusqu'au transfert.

Les cages de dreissènes ont ensuite été transférées sur les 5 sites d'étude, à raison de 2 cages par site (25/09/07). Elles ont été placées dans la colonne d'eau et attachées aux arbres de la rive par un

fil de fer. Après un mois d'exposition (23/10/07), les cages ont été récupérées et ouvertes sur site afin de comptabiliser les individus morts. Les dreissènes vivantes ont été réparties dans des bidons contenant l'eau du site et ramenées au laboratoire pour les analyses.

2.4. Traitement des échantillons au laboratoire

2.4.1 Mesure des concentrations en métaux

De retour au laboratoire, les prélèvements de métaux dissous et totaux sont acidifiés respectivement à 1% et 10% (v/v) avec HNO₃ suprapur à 65% sous hotte à flux laminaire de classe 100. Les blancs de filtration et acide sont réalisés lors de cette étape. Les échantillons sont analysés par ICP-AES.

A la fin du temps de déploiement, les DGT ont été ramenées au laboratoire et démontées. La résine Chelex a été éluée pour un minimum de 24 h dans un volume connu d'acide nitrique 1 mol.L⁻¹. Cet éluat est ensuite dilué et analysé par ICP-AES. La concentration en métaux labiles est déduite de l'équation suivante :

$$C_{\text{labile}} = \frac{M\Delta g}{DtA}$$

Où M est la masse de métal accumulée sur la résine, Δg est l'épaisseur de diffusion, D le coefficient de diffusion du métal dans le gel, t le temps d'immersion et A l'aire exposée.

Les moules ont été récupérées en fin de campagne, congelées à -80°C au retour au laboratoire, puis lyophilisées. Des pools de 3 à 4 organismes ont été constitués, donnant 2 à 4 pools par site. Ces pools ont subi une digestion acide en micro-onde fermé par un mélange de 5 mL d'HNO₃ suprapur Merck et 3 mL d'H₂O₂ suprapur Merck. Après refroidissement, les minéralisats ont été transférés dans des tubes Sarstedt et ajustés à 50 mL. Le matériau de référence certifié Mussel tissue ERM-CE278 a été traité dans les mêmes conditions. Les échantillons ont ensuite été analysés par ICP-AES.

2.4.2 Réponses biologiques

Indice de condition

L'indice de condition donne une idée de l'état de santé global de l'organisme en illustrant le taux de remplissage de la coquille, c'est-à-dire le rapport entre le poids des tissus mous et le poids total de l'organisme (comprenant la coquille). Après avoir nettoyé et séché les coquilles, les dreissènes sont pesées entières, puis disséquées sur glace afin d'extraire la totalité des tissus mous, qui sont également séchés rapidement sur papier absorbant afin d'éliminer l'eau palléale, puis pesés. Le rapport poids des tissus mous/poids total, exprimé en pourcentage, donne l'indice de condition.

Biomarqueurs d'exposition

La défense multixénobiotique MXR fait référence à un système membranaire de rejet d'une grande variété de composés chimiques comprenant notamment une large gamme de contaminants couramment rencontrés dans les rivières. En limitant l'accumulation cellulaire de ces composés potentiellement toxiques, le MXR agit comme une protection anti-toxique des organismes (Kurelec, 1992 ; Minier et al., 1999). Dans la mesure où une activation de ce système de défense rend compte de l'exposition de l'organisme considéré à des molécules substrats potentiellement toxiques, le MXR est utilisé ici en tant que biomarqueur d'exposition des dreissènes à la contamination des sites du bassin de l'Orge.

Pour chacune des conditions étudiées, 3 lots de 5 dreissènes ont été utilisés pour évaluer l'activité de défense MXR. La mesure est effectuée sur deux jours. Dans un premier temps, les dreissènes sont exposées à un colorant fluorescent, la rhodamine B, pendant 4 heures à la concentration de 5μM. Dans ces conditions, elles filtrent le colorant et l'accumulent dans leurs tissus. Après une étape de lavage destinée à éliminer le surplus de colorant adsorbé sur les organismes

(coquille et manteau), les dreissènes sont replacées dans de l'eau où le processus de rejet du colorant peut être évalué. On mesure ainsi la vitesse de rejet du colorant en contrôlant l'évolution de sa concentration dans le milieu d'efflux. Etant donné que le MXR n'est pas le seul mécanisme impliqué dans l'augmentation de la concentration du colorant dans le milieu (désorption, diffusion passive...), on réitère cette évaluation le lendemain dans les mêmes conditions, mais en mesurant l'évolution de la concentration rejetée dans un inhibiteur du MXR (Vérapamil 30µM). Ainsi, par différence entre les deux situations, on estime l'activité de rejet liée au fonctionnement de la défense MXR (Parant et Pain, 2001).

Les métallothionéines (MT), ou protéines type métallothionéines, sont des protéines cytosoliques de faible poids moléculaire capables de chélater les métaux, les empêchant ainsi d'exercer leur activité toxique (Amiard et al 2006). Ces protéines interviennent dans la physiologie normale des organismes dans la mesure où elles participent à la régulation homéostatique des métaux essentiels, mais elles sont également impliquées dans la gestion des métaux non essentiels qui sont toxiques. L'induction des métallothionéines est couramment utilisée en tant que biomarqueur d'exposition à la contamination métallique et de nombreux travaux ont été réalisés pour comprendre les modalités de cette réaction de défense, notamment chez les Bivalves (Baudrimont et al 1997, Geffard et al 2001, 2005, Amiard et al 2006).

Pour chaque condition testée, 10 dreissènes ont été utilisées pour l'évaluation par polarographie du taux de métallothionéines. Ce travail fait actuellement l'objet du stage de Mlle Amandine Maréchal (L3 Sciences et Vie de la Terre, Université de Reims, stage volontaire). Les données sont en cours d'acquisition.

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

Pour chaque condition étudiée, 10 dreissènes ont été disséquées afin d'isoler la glande digestive, organe qui est le siège de la plupart des réactions enzymatiques de défense cellulaire. Les glandes digestives ont ensuite été broyées individuellement. Après centrifugation des broyats, les surnageants contenant les enzymes cytosoliques recherchées sont utilisés pour doser l'activité GST selon la méthode de Habig et al. (1974) (évaluation de la capacité de l'extrait enzymatique à conjuguer du glutathion sur une molécule substrat, le CDNB).

Ce travail fait actuellement l'objet du stage de M^{elle} Amandine Maréchal (L3 Sciences et Vie de la Terre, Université de Reims, stage volontaire). A l'heure actuelle, l'ensemble des échantillons a été broyé et préparé pour l'analyse et les dosages d'activité GST sont en cours de réalisation.

Biomarqueur d'effets sur le métabolisme digestif

Le métabolisme digestif constitue un processus clé pour les organismes car il conditionne leur approvisionnement en énergie, énergie qui est consommée pour son maintien, sa croissance et sa reproduction. En ce sens, une perturbation du métabolisme digestif affectera directement l'assimilation des nutriments et donc indirectement la quantité et/ou la qualité de l'énergie indispensable à la réalisation des autres grandes fonctions biologiques (Dedourge et al., 2008). Les travaux développés sur le sujet font l'objet de la tâche 2b de ce rapport et se focalisent sur l'activité de certaines enzymes digestives impliquées dans les processus de digestion chez la dreissène. Afin de valider les protocoles de dosages qui sont en cours de mise au point dans une situation d'exposition concrète sur le terrain, des dreissènes exposées dans l'Orge ont été conservées (organes cibles congelés à -80°C) pour le dosage des enzymes digestives.

3. Résultats et discussion

3.1. Faisabilité du suivi chimique et de la transplantation d'organismes sur le BV de l'Orge

Même si l'encagement de mollusques bivalves et le déploiement des échantillonneurs intégratifs tels que les DGT sont des méthodes déjà éprouvées et généralement couronnées de succès (Bervoets et al, 2005; Tuseau-Vuillemin et al, 2007), il s'agissait au cours de cette étude de vérifier la faisabilité d'un tel protocole dans les conditions d'étude définies, c'est-à-dire, dans les petits cours d'eau anthropisés du bassin de l'Orge, au niveau des sites choisis, pour certains non protégés, dans des zones fortement peuplées et avec beaucoup de passage de promeneurs.

3.1.1 Succès et limites de l'échantillonnage passif

Sur l'ensemble des cinq sites étudiés, deux séries de déploiement de DGT sur 2 semaines, respectivement de 9 et de 6 DGT étaient prévues. Sur les 75 DGT déployées au total, 46 DGT n'ont pas pu être analysées pour différentes raisons

- les dispositifs ont été retirés de la rivière par les équipes d'entretien ou des promeneurs
- les DGT ont subi des détériorations liées en partie aux mauvaises conditions de déploiement (perte du filtre ou gel endommagé, DGT hors de l'eau pendant une période de l'exposition car cordes enroulées ...)

Il a été possible d'évaluer une teneur de métal labile à partir des DGT sur 4 sites ; les DGT exposées au point 4, (l'Orge à l'aval de la Rémarde) étaient malheureusement toutes inexploitable. Par ailleurs, deux sondes de température ont disparu pendant la durée de déploiement des dispositifs.

Il faudra donc pour les campagnes à venir revoir un certain nombre de points pratiques dans le déploiement des DGT in situ. Ces observations nous ont néanmoins permis de tirer quelques enseignements pour les prochaines campagnes in situ :

- sur le choix des sites de déploiements : il est indispensable d'avoir un accès protégé, en concertation avec les équipes d'entretien de la rivière.
- sur l'accrochage des DGT : il faudra probablement revoir le dispositif de déploiement dans l'eau, de façon à ce que les DGT restent face au courant, tout en n'étant pas accrochées simplement par des cordes, trop apparentes et qui s'enroulent avec la vitesse de l'eau
- les seuils, souvent pratiques car ouvragés et sécurisés, ne semblent pas nécessairement fournir de bonnes conditions hydrauliques pour l'exposition des DGT

3.1.2 Succès de l'encagement des dreissènes

L'expérimentation d'encagement de dreissènes s'est avérée positive dans la mesure où l'encagement a permis de maintenir pendant un mois un stock de dreissènes sur chacun des sites, sans mortalité excessive, sauf sur le site Prédecelle (Tableau 1). En effet, les taux de mortalités sont restés globalement faibles et relativement homogènes sur les autres sites. Une mortalité plus importante a cependant été constatée sur la Prédecelle mais s'explique par le fait que la moitié inférieure de la cage a été retrouvée partiellement envasée lors du prélèvement après 30 jours, ce qui a entraîné la mort des dreissènes localisées dans cette partie de la cage et explique la perte plus importante de matériel biologique sur ce site.

Tableau 1: Taux de mortalité des dreissènes dans les cages transplantées dans le bassin de l'Orge

	Taux de mortalité (%)
Prédecelle	25,2
Orge Aval Rémarde	4,8
Orge Amont Yvette	7,4
Orge Aval	7,8
Yvette	7,6

L'indice de condition donne une idée de l'état de santé global de l'organisme en illustrant le taux de remplissage de la coquille, c'est-à-dire le rapport entre le poids des tissus mous et le poids total de l'organisme (comprenant la coquille). Ce paramètre peut être affecté par des mauvaises conditions de nutrition, des conditions de stress liées à l'encagement ou autre facteur affectant les organismes lors de l'encagement. Les résultats obtenus montrent que l'indice de condition s'est maintenu durant toute la période d'étude, indiquant que l'encagement n'a entraîné aucune perte de poids significative de l'organisme qui aurait pu affecter les réponses biologiques plus fines que nous avons étudiées en relation avec la contamination (Figure 3 ; ANOVA, $p=0,77$).

En conclusion, les paramètres mesurés n'ont pas indiqué de stress apparent chez les organismes étant donné que l'indice de condition n'a pas évolué durant la période étudiée et que la mortalité est restée faible, à l'exception de la Prédecelle, soulignant la nécessité de correctement placer les cages dans la colonne d'eau afin qu'elles ne s'ensavent pas. Enfin, il est également apparu indispensable de cacher les cages afin de limiter au maximum la survenue de tout acte de vandalisme.

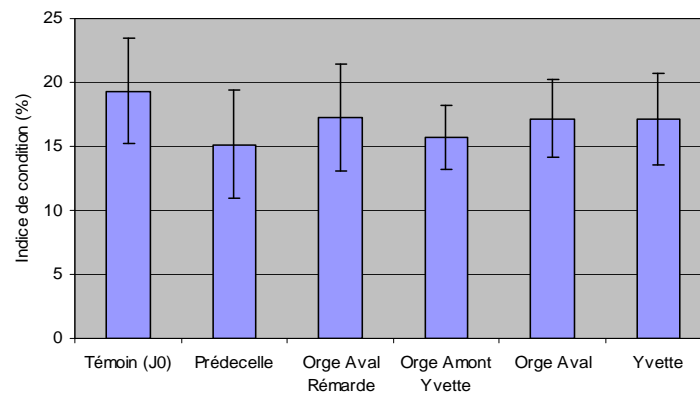


Figure 3 : Evolution de l'indice de condition (%) après 30 jours d'exposition sur les 5 sites du bassin de l'Orge.

3.2. Contamination métallique du milieu

Sur chaque site d'étude, quatre prélèvements ponctuels d'eau ont été réalisés, pour l'analyse des métaux totaux et dissous. L'analyse en ICP-AES n'a pas permis de mesurer de cadmium, de cobalt, de chrome ni de plomb dans les eaux de l'Orge ou de ses affluents. Dans les témoins de filtration, les métaux analysés étaient tous inférieurs aux limites de quantification, à l'exception du zinc pour certains (toujours inférieur à 1,5 µg/L).

Les concentrations mesurées pour les autres métaux ne présentent pas d'évolution significative dans le temps. Les eaux de la Prédecelle semblent légèrement plus contaminées que les sites en aval. Les 4 sites aval, sur l'Yvette et sur l'Orge présentent une contamination "homogène", que ce soit pour les métaux totaux (Figure 4) ou dissous (Figure 5).

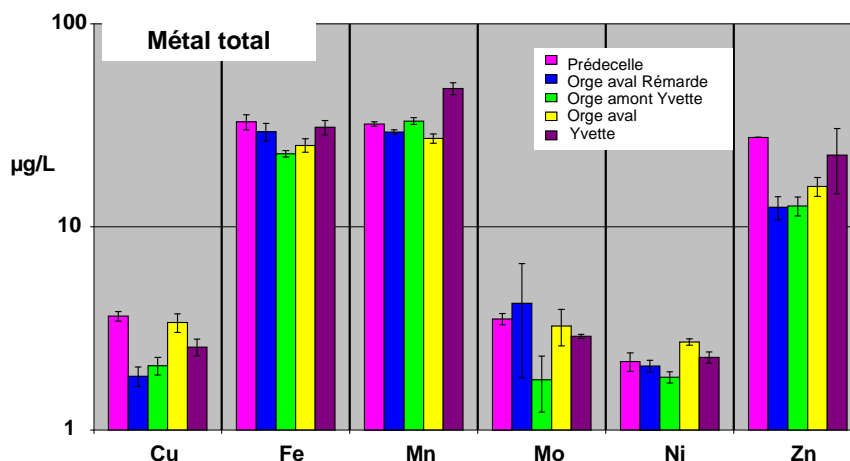


Figure 4 : Concentrations en métaux totaux dans l'eau du bassin versant de l'Orge (moyenne et écart-type sur 4 échantillons)

L'urbanisation relativement récente du bassin versant de l'Orge implique que le milieu aquatique est quasiment exclusivement soumis aux sources diffuses de contamination. En effet, l'Orge, dans sa partie aval (à partir de St Germain-lès-Arpajon, point 4) reçoit les eaux de ruissellement de son bassin versant, pour la plupart sur des surfaces urbaines imperméabilisées dans des zones très urbanisées, alors que l'ensemble des eaux usées domestiques est redirigé vers la station de Valenton. A l'inverse, la Prédécelle reçoit les rejets de petites stations d'épuration, en particulier celle de Briis-sous Forges, quelques kilomètres en amont du point de prélèvement. Bien que des mesures complémentaires soient nécessaires pour conclure de façon définitive sur ce point, les concentrations observées sur les cinq sites d'étude semblent refléter :

- d'une part, sur la Prédécelle, la contamination métallique d'une petite rivière impactée par un rejet ponctuel de station d'épuration, potentiellement chargé en métaux (Buzier, 2005)
- d'autre part, sur les 4 autres sites, la contamination d'une rivière fortement urbanisée, qui est alimentée par les eaux de ruissellement sur un sol très imperméabilisé d'un territoire densément peuplé. Ces eaux de ruissellement constituent une source diffuse de contamination métallique, répartie sur l'ensemble du bassin, conduisant à une contamination de l'Orge sans gradient de concentration d'amont en aval.

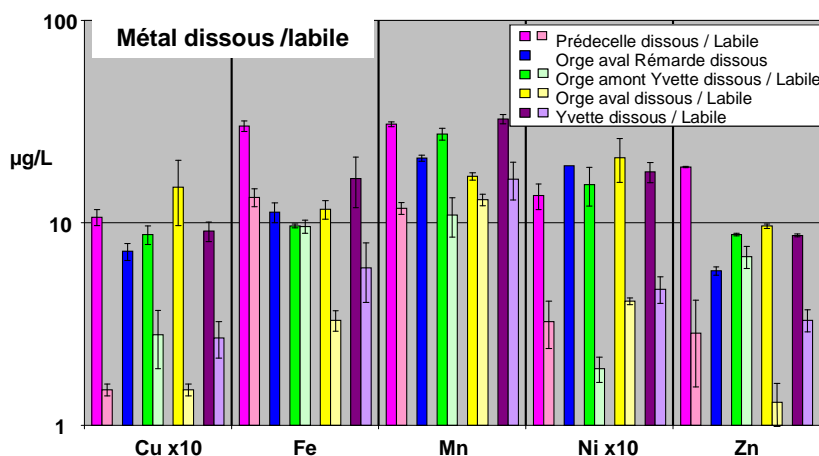


Figure 5 : concentrations en métaux dissous et métaux labiles (évalués par DGT) sur les sites du bassin versant de l'Orge

Les concentrations en métaux labiles sont très variables entre les sites. Les teneurs accumulées dans les DGT au cours de l'exposition sont souvent en limite de quantification de l'ICP-AES pour le cuivre et le nickel, ce qui peut engendrer une incertitude importante sur les concentrations labiles. On vérifie aussi que certains métaux sont beaucoup plus labiles (concentrations proches des concentrations totales) que d'autres ; ainsi, le cuivre, qui se complexe fortement avec les matières organiques dissoutes pour former des complexes non labiles, est généralement moins labile que le zinc. Ces premières interprétations restent cependant bruitées à la fois par le manque de données exploitable de DGT, et par les incertitudes sur les faibles valeurs mesurées, souvent proches des limites de quantification. Une analyse en ICP-MS, qui permettrait de baisser les limites de quantifications, est à envisager pour le suivi des concentrations en métaux totaux, dissous, mais aussi labiles dans le milieu aquatique.

3.3. Contamination des organismes

3.3.1 Validation du protocole d'analyse des dreissènes sur une contamination multi-élémentaire

L'analyse du matériau certifié ERM-CE278 au cours de cette étude nous a permis de tester l'ensemble de notre protocole (digestion acide micro-onde + ICP-AES) sur plusieurs métaux. Les recouvrements obtenus sont satisfaisants (Tableau 2) et les blancs obtenus acceptables, en particulier sur les métaux les plus sensibles (Al, Fe, Zn).

Tableau 2: concentrations métalliques ($\mu\text{g/g}$ tissu sec) et recouvrement (% valeur nominale) sur du matériau biologique certifié ERM-CE278 et dans des témoins (blanc d'acide ramené au $\mu\text{g/g}$ de tissu sec, moyenne de 4 blancs)

Métal	<i>Al</i>	<i>Fe</i>	<i>Zn</i>	<i>Cu</i>	<i>Mn</i>	<i>Ni</i>	<i>As</i>	<i>Cd</i>	<i>Co</i>	<i>Cr</i>	<i>Pb</i>
Valeur certifiée	-	-	83,1	9,45	7,69	-	6,07	0,348	-	0,78	2,00
Valeur mesurée	38,0	135,6	89,5	9,62	8,18	1,5	6,85	0,376	0,29	0,72	2,65
Recouvrement (%)			108	102	106		113	108		92	133
Moyenne blancs	6,0	2,2	0,4	0,45	N.Q	N.Q	N.Q	N.Q	0,1	N.Q	0,1

3.3.2 Contamination métallique des moules transplantées

Il a été possible de quantifier les teneurs en métaux dans les dreissènes (Figure 6) même pour les métaux qui ne pouvaient pas être quantifiés dans les eaux ou les DGT. Comme pour les teneurs dans l'eau, il semble que les dreissènes exposées aux eaux de la Prédecelle soient légèrement plus contaminées que les autres organismes. Ce résultat confirme l'intérêt d'utiliser la dreissène pour son caractère accumulateur. Il permet en effet de mieux cerner la contamination des milieux qui est souvent multiple, diffuse et en faibles concentrations.

Notons que la forte contamination en manganèse observée dans les dreissènes exposées sur le site de l'Orge aval est très probablement due à l'expérience de marquage de coquilles de dreissènes effectuée sur des dreissènes engagées toutes proches. Ces organismes marqués ont très probablement dépuré pendant l'exposition, contaminant la cage voisine.

On observe une augmentation de la contamination des organismes en plomb d'amont en aval du bassin versant. Pour les autres métaux, au contraire, il semble qu'il y ait une légère décroissance d'amont en aval, qui n'est pas liée aux teneurs en métaux relevées dans le milieu.

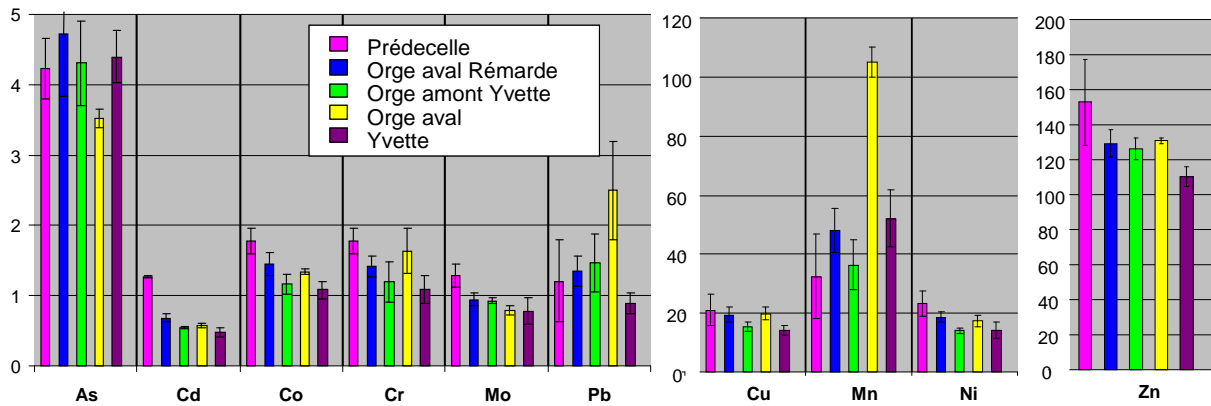


Figure 6 : concentrations en métaux dans les dreissènes transplantées pendant 1 mois sur les sites du bassin versant de l'Orge (en µg/g de poids sec)

Il n'est pas possible d'observer de relation directe entre la contamination des organismes et les concentrations en métaux, total, dissous ou même labiles. En effet, la contamination des organismes résulte de processus d'accumulation par voie dissoute (respiration, filtration) et par voie trophique, chaque forme métallique n'a pas la même biodisponibilité ni les mêmes échanges cinétiques avec les organismes (voir rapport de l'action 2a). Une compréhension du lien entre la contamination du milieu et celle des organismes vivants passe nécessairement par une étude de ces facteurs de contrôle, environnementaux et intrinsèques à l'organisme modèle.

3.4. Réponses biologiques

Biomarqueurs d'exposition

Concernant la défense multixénobiotique MXR, les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 7. La transplantation des dreissènes pendant 30 jours sur les sites étudiés dans le bassin de l'Orge a engendré une induction de la défense MXR (Anova, $F=4,03$; $p=0,022$), cette induction étant significative par rapport au témoin dans le cas des sites Orge Aval Rémarde et Yvette (HSD Tukey, $p<0,05$). En revanche, aucune différence de réaction n'est apparue entre les différents sites. Ces résultats sont cohérents avec les conclusions des analyses chimiques et indiquent que la transplantation dans le bassin de l'Orge a bien occasionné une exposition des dreissènes à une contamination, mais le niveau d'exposition semble équivalent sur tous les sites, malgré une amplitude apparaissant plus importante au regard du témoin sur deux des sites étudiés.

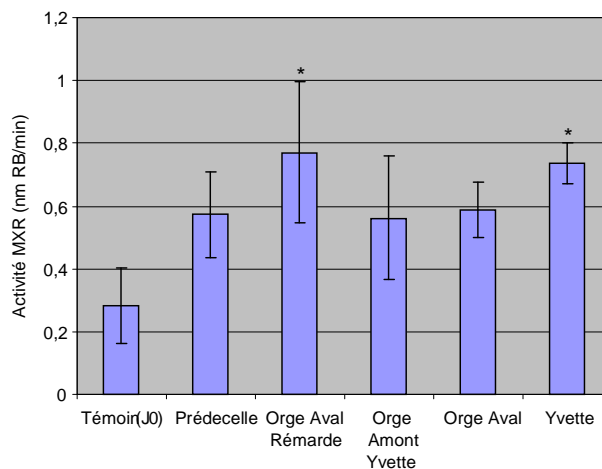


Figure 7 : Evolution de l'activité MXR exprimée en nanomoles de rhodamine B rejetée par minute) après 30 jours d'exposition sur les 5 sites du bassin de l'Orge. * indique une différence significative par rapport au Témoin (Test HSD Tukey post ANOVA, $p<0,05$)

Les données concernant les métallothionéines (MT) et l'activité des Glutathion-S-Transférases (GST) sont en cours d'acquisition. Ce travail fait actuellement l'objet du stage de Melle Amandine Maréchal (L3 Sciences et Vie de la Terre, Université de Reims, stage volontaire). A l'heure actuelle, l'ensemble des échantillons a été broyé et préparé pour le dosage des activités GST.

Biomarqueur d'effets sur le métabolisme digestif

Des dreissènes exposées sur les différents sites de l'Orge ont été conservées pour le dosage des enzymes digestives selon les protocoles mis en place en 2b. Elles seront utilisées pour valider la méthode de dosage dans une situation d'exposition concrète sur le terrain et complèteront ainsi la batterie de réponses biologiques disponibles.

4. Perspectives

La campagne menée en 2007 sur les cinq sites du bassin versant de l'Orge a permis de démontrer la faisabilité de la transplantation de dreissènes encagées dans ce milieu. Les organismes ont résisté à la transplantation et ont accumulé de façon significative les métaux sur la période d'un mois. Différents biomarqueurs ont pu être mesurés. Pour la suite, l'étude de la réponse des biomarqueurs sera donc intégrée aux suivis de terrain mis en place dans le cadre du programme PIREN-Seine. Dans ce contexte, il est envisagé de suivre les biomarqueurs d'exposition déjà utilisés lors des travaux présentés ici et de compléter cette approche par l'étude sur le terrain des enzymes digestives et du cycle reproducteur, aspects développés en 2b. Conjointement à cette démarche, les réserves énergétiques seront également mesurées parce qu'elles sont en lien direct avec les processus de digestion et de reproduction et permettront ainsi de mieux cerner les réponses obtenues.

Pour pouvoir mener à bien un suivi chimique en parallèle, le déploiement d'échantillonneurs intégratifs doit être amélioré, que ce soit dans le choix de sites plus sécurisés ou la façon d'exposer les DGT. Si cette première campagne a permis de montrer les difficultés de travailler en milieu très urbanisé, les protocoles devraient pouvoir être adaptés pour assurer un suivi pour les prochaines campagnes.

En dehors du site très particulier de la Prédecelle, la contamination de l'Orge est apparue comme assez homogène, reflétant une occupation du territoire (urbain dense) bien particulière. De part son occupation du sol et la gestion des eaux urbaines et usées, l'Orge apparaît comme un site-atelier très intéressant. Néanmoins, pour la suite, il sera intéressant de choisir un site bien plus en amont sur l'Orge, pour lequel l'occupation du sol et la gestion des eaux est différente, et le milieu moins contaminé.

5. Bibliographie

- Amiard JC., Amiard-Triquet C., Barka S., Pellerin J. et Rainbow PS. (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers, *Aquatic Toxicology*, **76**:160-202.
- Baudrimont M., Lemaire-Gony S., Ribeyre F., Métivaud J. et Boudou A. (1997). Seasonal Variations of Metallothionein Concentrations in the Asiatic Clam (*Corbicula fluminea*), *Comparative Biochemistry and Physiology*, **118C**:361-367.
- Bervoets, L., J. Voets, et al. 2005. Use of transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) to assess the bioavailability of microcontaminants in Flemish surface waters. *Environ. Sci. Technol.* **39**: 1492-1505
- Buzier R. (2005) *Evolution de la spéciation des métaux au cours du traitement en boues activées*. 208 p. Thèse de doctorat. Université Paris 12.
- Davison, W. et Zhang H. (1994). In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin film gels. *Nature* **367**: 546-548.

- Dedourge O., Geffard A. et Amiard C. (2008). Origine des perturbations du métabolisme énergétique. Amiard J.C. et Amiard-Triquet C Coord. *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques*. Lavoisier Tec & Doc, Paris, 241-271
- Geffard A., Amiard-Triquet C. et Amiard JC. (2005) Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, *Mytilus edulis* ? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **61**:209-220.
- Geffard A., Amiard-Triquet C., Amiard JC. et Mouneyrac C. (2001). Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters (*Crassostrea gigas*) from a clean and a metal-rich site, *Biomarkers*, **6**:91-107.
- Habig WH., Pabst MJ., Jokoby WB. (1974). Glutathione S-transferase. the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249:7130–7139.
- Kurelec B. (1992). The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Critical Reviews in Toxicology*, **22**(1):23-43.
- Minier C., Eufemia N. et Epel D. (1999). The multi-xenobiotic resistance phenotype as a tool to biomonitor the environment, *Biomarkers*, **4**:442-454.
- Parant M. et Pain S. (2001). Potential use of multixenobiotic defense mechanism (MXDM) in *Dreissena polymorpha* as a biomarker for the monitoring of freshwater pollution, *Water Research*, **35**(15):3743-3748.
- Tusseau-Vuillemin, M. H.; Gourlay, C.; Lorgeoux, C.; Mouchel, J. M.; Buzier, R.; Gilbin, R.; Seidel, J. L.; Elbaz-Poulichet, F. (2007) Dissolved and bioavailable contaminants in the Seine river basin. *Science of the Total Environment* **375**:244-256
- Tusseau-Vuillemin M-H, Gilbin R, Bakkaus E, Garric J (2004) Performance of diffusive Gradient in Thin Films in evaluating the toxic fraction of copper to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**:2154–2161