

# Impact de la contamination chimique sur des dreissènes : de la bioaccumulation aux indicateurs d'effets

Catherine Gourlay-Francé<sup>1</sup> \*, Adeline Bourgeault<sup>1</sup>, Cécile Michel<sup>1</sup>, Emmanuelle Uher<sup>1</sup>, Françoise Vincent-Hubert<sup>1</sup>, Frédéric Palais<sup>2</sup>, Alain Geffard<sup>2</sup>, Odile Dedourge-Geffard<sup>2</sup>, Sandrine Pain-Devin<sup>3</sup>, Judith Trapp<sup>3</sup>, Cindy Priadi<sup>4</sup>, Sophie Ayrault<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Cemagref, UR Hydrosystèmes et Bioprocédés, Parc de Tourvoie, Antony et FIRE FR-3020, 4 place Jussieu, Paris

<sup>2</sup> Université de Reims Champagne Ardenne, Unité de recherche Vignes et Vins de Champagne-Stress Environnement EA 2069, Laboratoire d'Eco-Toxicologie.

<sup>3</sup> LIEBE, Université Paul Verlaine, Metz - CNRS UMR 7146

<sup>4</sup> LSCE

\*personne à contacter [catherine.gourlay@cemagref.fr](mailto:catherine.gourlay@cemagref.fr)

## 1 Introduction

Un des objectifs de la phase 5 du PIREN-Seine consiste à observer et à comprendre l'impact des micropolluants métalliques et organiques sur les organismes du milieu. Pour cela, nous nous sommes attachés à utiliser un organisme aquatique modèle (la dreissène) largement présent dans le bassin, sédentaire et résistant aux perturbations des milieux aquatiques, pour en faire un outil de biomonitoring actif (transplantation). La mesure de différentes réponses biologiques sur cet organisme a été développée de façon à pouvoir les suivre in situ et évaluer les possibilités de les interpréter en termes de contamination chimique. Ainsi, au cours de ce travail, nous nous sommes principalement intéressés au développement de la mesure et aux processus qui modulent :

- la bioaccumulation (Cemagref, thèse d'Adeline Bourgeault, soutenue en décembre 2010)
- l'activité des enzymes digestives (Université de Reims, thèse de Frédéric Palais, soutenance prévue au printemps 2011) et d'autres enzymes du métabolisme de défense (Université de Reims et de Metz)
- les dommages à l'ADN (Cemagref, thèse de Cécile. Michel, soutenance prévue en novembre 2011)

Après une première phase de développement de méthodes de mesure au laboratoire (Vincent-Hubert et al., 2009; Palais et al., 2010; Bourgeault et al., 2010a; Vincent-Hubert et al., 2011) une campagne de transplantations de dreissènes sur deux mois sur deux sites contrastés du bassin versant de l'Orge a été réalisée en 2008, au cours de laquelle l'ensemble de ces mesures a été réalisée. L'analyse des résultats a montré l'importance de considérer un ensemble de réponses écotoxicologiques, plus ou moins spécifiques de la contamination par les micro-contaminants. En particulier, les petites rivières urbaines sont caractérisées par une contamination chimique accompagnée d'un changement de la qualité physico-chimique du milieu. Ce travail a suggéré une modulation des réponses en lien avec une différence de pression chimique (Bourgeault et al., 2009; Bourgeault et al., 2010b). Cependant, l'ensemble des réponses peuvent également être modulées par l'action de paramètres environnementaux autres que chimique tels que le niveau trophique et la croissance des organismes.

Cette première approche a été complétée par une expérimentation sur un cycle saisonnier et reproducteur complet de la dreissène sur deux systèmes hydriques différents présentés dans le rapport PIREN précédent (Gourlay-Francé et al., 2010). En complémentarité avec le rapport d'activité 2010 qui présentait l'ensemble des résultats des campagnes de transplantation, ce présent travail s'attache

principalement à faire une comparaison des réponses biologiques obtenues sur les périodes communes entre les individus présents sur la Seine et ceux de la Vesle.

## 2 Matériels et méthodes

### 2.1 Expérimentations

Les différentes conditions expérimentales ont été précisées dans le précédent rapport (Gourlay-Francé et al., 2010) et sont présentés dans les Tableaux 1 et 2. De façon synthétique, des dreissènes provenant d'un site considéré comme contrôle (Canal de l'Est à Commercy) ont été transplantées en Novembre 2008 sur

- trois sites de la Seine : Marnay, Bougival et Triel
- quatre sites du bassin versant de la Vesle : Bouy et Sept-Saulx sur la Vesle en amont de Reims ; Fismes en aval de Reims et un point sur un affluent de la Vesle, L'Ardre.

La contamination métallique des organismes a été suivi mensuellement sur tous les sites. Les réponses biologiques ont été mesurées sur des organismes exposés sur les différents sites de ces deux systèmes hydriques à l'exception de la génotoxicité qui n'a été évaluée que chez les dreissènes exposées en Seine. Initialement les prélèvements ont été mensuels sur le bassin versant de la Vesle et saisonniers sur la Seine. Afin de comparer les réponses mesurées sur ces deux structures nous prendrons en considération principalement les réponses sur la base d'un pas de temps saisonnier. Il est à noter que la forte mortalité enregistrée en fin d'été sur les dreissènes transplantées en Seine n'a pas permis d'obtenir des résultats pour l'automne. Si l'interprétation le nécessite, les fluctuations temporelles plus fines mesurées à l'échelle du mois seront présentées pour certains paramètres.

Tableau 1: Organisation des prélèvements et du suivi chimique des sites sur l'ensemble de la campagne Seine

	Date	Prélèvement de dreissènes bioaccumulation*	Prélèvement de dreissènes génotox	Prélèvement de dreissènes marqueurs biochimiques	Suivi chimique**
M0	22.10.08	Pose cages			x
M1	25.11.08	x		x	x
M2	16.12.08	x			x
M3	20.01.09	x	x	x	x
M4	24.02.09	x			x
M5	24.03.09	x			x
M6	22.04.09	x	x	x	x
M7	09.06.09	x			x
M8	22.06.09	x	x		x
M9	22.07.09	x		x	x
M10	19.08.09	x - mortalité 70%			x
M11	29.09.09	x - mortalité 90%			x
M12	22.10.09				x

\*: bioaccumulation des métaux, des HAP, taux de filtration et indice de condition

\*\* : métaux dissous, HAP dissous et particulaires sur l'eau brute, matières en suspension (MES), carbone organique dissous et particulaire (COD et COP), chlorophylle, phéopigments, ions majeurs et hydrogénocarbonates (TAC), pH, métaux labiles moyens sur un mois (DGT), métaux particulaires moyens sur un mois (trappes à sédiments). HAP labiles (SPMD). La température est suivie en continu à l'aide de sondes.

Tableau 2 : Organisation des prélèvements et du suivi chimique des sites sur l'ensemble de la campagne Vesle

	Date	Prélèvement de dreissènes Marqueurs biochimiques bioaccumulation	Suivi chimique**
M0	Nov 08	Pose cages	
M1	Dec 08	x	
M2	Jan 09	x	
M3	Fev 09	x	x
M4	Mar 09	x	
M5	Avr 09	x	x
M6	Mai 09	x	
M7	Jui 09	x	
M8	Juil 09	x	
M9	Aou 09	x	x
M10	Sep 09	x	
M11	Oct 09	x	x

\*\* métaux dissous et totaux sur eau brute, les MES, le COD, le COP, ions majeurs et hydrogénocarbonates (TAC), métaux labiles moyens sur 1 mois (DGT)

En 2010, des suivis complémentaires ont été réalisés sur la Seine, en se focalisant sur les réponses génotoxiques. Deux campagnes de transplantation de 2 mois ont été réalisées en mars 2010 et en septembre 2010 et transplantées pour une durée de 2 mois sur les 3 sites de la Seine et un site en aval de la Marne

## 2.2 Traitement des dreissènes au laboratoire

### 2.2.1 Analyses chimiques

Les tissus frais sont prélevés, pesés, congelés à -80°C puis lyophilisés et broyés. Une partie est minéralisée pour la mesure de la bioaccumulation des métaux alors que le restant est utilisé pour l'analyse des HAP et la détermination du taux de lipide. Les métaux sont analysés par ICP-MS au LSCE et les HAP (les 13 composés les plus hydrophobes de la liste de l'US EPA) par GC-MS.

### 2.2.2 Mesures biologiques :

Différents indices globaux de santé ont été calculés :

$$\text{L'indice de condition (IC)} : IC = \frac{\text{Masse tissus frais}}{\text{Masse tissus frais} + \text{masse coquille}}$$

$$\text{L'indice gonado-somatique (IGS)} : IGS = \frac{\text{Masse gonade}}{\text{Masse tissus frais}}$$

$$\text{L'indice hépato-somatique} : IHS = \frac{\text{Masse hépatopancreas}}{\text{Masse tissus frais}}$$

### 2.2.3 Taux de filtration

Dès le retour au laboratoire, le taux de filtration est estimé avec de l'eau du site préalablement filtrée et dopée en algues dans une pièce thermostatée réglée sur la température de l'eau du site. La mesure est effectuée en suivant la décroissance en algue dans le milieu due à la filtration des dreissènes. Le protocole est détaillé dans un précédent rapport (Bourgeault et al., 2009).

### 2.2.4 Marqueurs de génotoxicité

Les dommages à l'ADN ont été mesurés dans les tissus de branchies. Les protocoles du test Comète et du test des micro-noyaux ont été adaptés pour les dreissènes (Vincent-Hubert et al, 2011). Le test des

Comète permet de quantifier les cassures de l'ADN dans les cellules. Le test de micro-noyaux permet de mesurer les cassures chromosomiques. Là encore, sa mise en œuvre est décrite dans un précédent rapport.

En 2010, un test complémentaire a été mis en œuvre : le test Comète –hOGG1. Le test comète seul permet de quantifier les cassures de l'ADN dans les cellules. Le test comète-hOGG1 apporte des informations supplémentaires sur le type de dommages induits : l'enzyme hOGG1 (Human 8-oxoguanine DNA Glycosylase) va créer des cassures supplémentaires grâce à sa fonction d'excision des lésions 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxodG), qui se produisent à la suite d'une exposition à des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ce test nous permet donc de quantifier le niveau de stress oxydatif induit par le milieu.

### **2.2.5 Marqueurs biochimiques**

Les méthodologies employées pour mesurer les différentes réponses biologiques (méthodes : métallothionéines : MT, glutathion S-transférase : GST, enzymes digestives) ont été détaillées dans le rapport PIREN (Gourlay-Francé et al., 2010).

Le dosage des réserves en glycogène et en lipide a été réalisé à partir de tissus digestifs et gonadiques broyés à froid dans de l'azote liquide, puis homogénéisés dans une solution tampon d'acide acétique (0.1 M, pH 5.0). La quantification des réserves en glycogène a été réalisée selon la méthode colorimétrique décrite par Carr & Neff (1984), le glycogène (extraits d'huître) étant utilisé comme standard. La quantification des réserves en lipides a été réalisée selon la méthode colorimétrique décrite par Frings et al. (1972), l'huile d'olive étant utilisée comme standard.

## **3 Résultats et discussion**

### **3.1 Bioaccumulation dans les dreissènes : reflet de la contamination chimique de l'eau ?**

#### **3.1.1 Résultats**

Sur la Vesle, la contamination métallique des tissus mous des dreissènes reflète la contamination de l'eau, mesurée par la technique DGT. Les teneurs métalliques mesurées dans les tissus mous des dreissènes présentes sur les différents sites du BV de la Vesle nous indiquent clairement un gradient amont/aval pour les différents éléments métalliques sauf pour le Cd (pas montré). Même si la quantification métallique n'a pas été établie sur l'ensemble des tissus mous (absence de la glande digestive), ces mesures reflètent le degré d'exposition et d'imprégnation des organismes sur les différents sites d'études. Il existe un organotropisme fort, notamment chez les bivalves, avec des teneurs métalliques décroissantes selon les organes considérés dans l'ordre suivant : glande > branchies > reste (manteau + muscle adducteur + gonade). Cependant, les teneurs métalliques au niveau de ces différents organes ou groupes d'organes sont corrélées positivement entre elles (Geffard et al., 2004). On note cependant que les différences sont atténuées entre les sites pour le signal de bioaccumulation par rapport à l'ampleur des variations pour les métaux labiles.

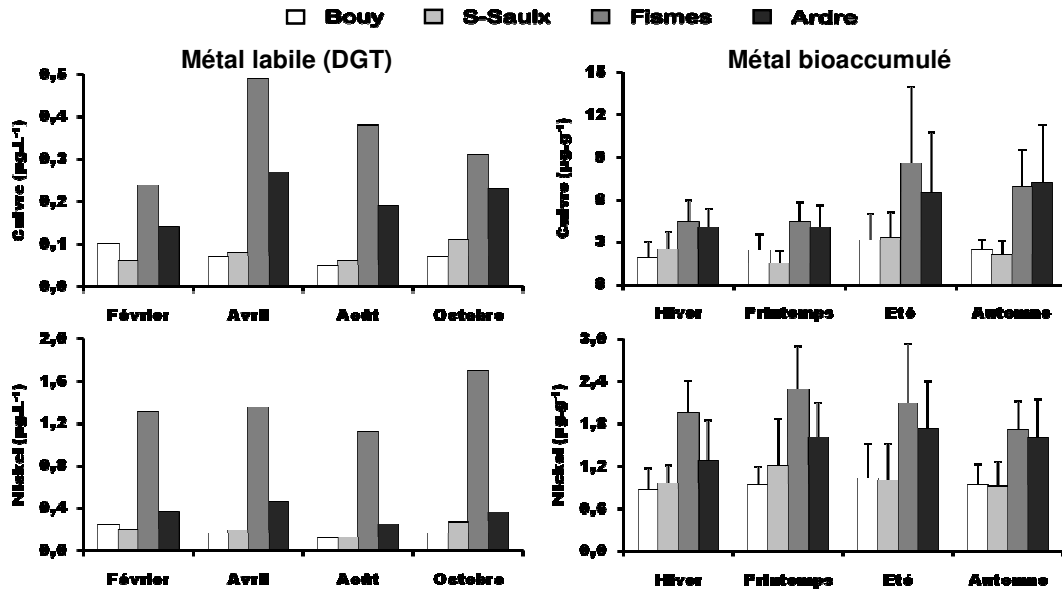


Figure 1 : cuivre et nickel labile mesuré dans l'eau par la technique DGT et cuivre et nickel bioaccumulés dans les dreissenés transplantées sur les quatre sites du bassin versant de la Vesle

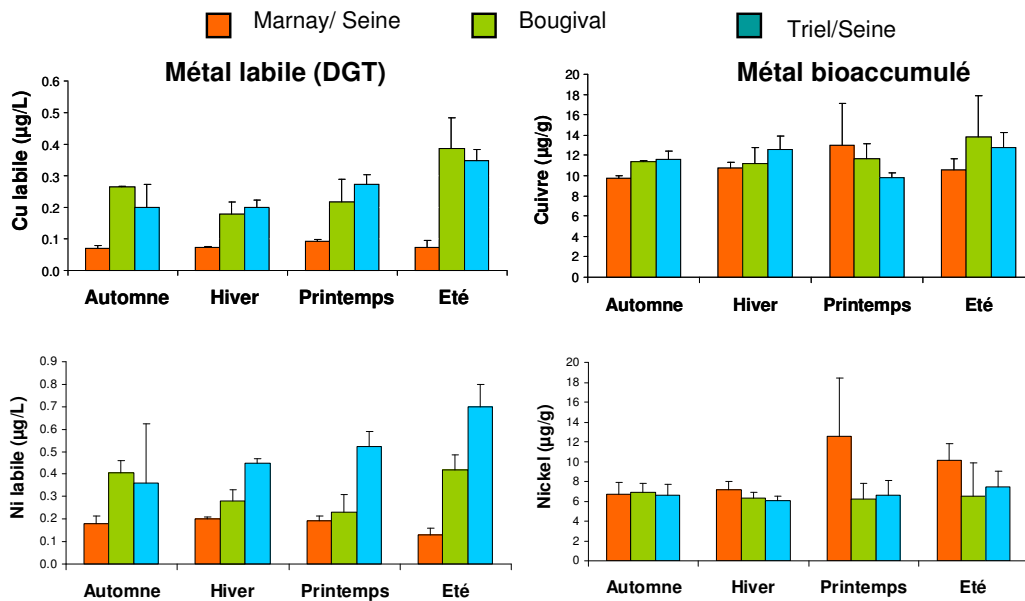


Figure 2 : cuivre et nickel labile mesuré dans l'eau par la technique DGT et cuivre et nickel bioaccumulés dans les dreissenés transplantées sur les trois sites de la Seine

En revanche, en Seine, malgré une différence de contamination significative du milieu entre l'amont et l'aval, le suivi de la contamination métallique dans les organismes n'a pas permis d'observer de différence entre les sites (test de Kruskal and Wallis,  $p > 0.05$ ). De plus, bien que le bassin de la Seine soit soumis à une pression anthropique forte, les concentrations métalliques mesurées dans les tissus de dreissenés ont été similaires à celles reportées dans d'autres études sur des sites considérés comme de référence (Camusso et al., 2001; De Lafontaine et al., 2000; Voets et al., 2006). Ceci souligne la complexité des sites sur lesquels cette étude a été menée, et sur les sites urbains de façon plus générale, puisqu'ils sont caractérisés par des concentrations faibles en divers contaminants où les paramètres physicochimiques et biologiques conditionnent largement la réponse des organismes.

Pour mieux comprendre le lien quantitatif entre la bioaccumulation et la contamination du milieu, nous avons utilisé le modèle toxico-cinétique de bioaccumulation, le modèle biodynamique. Il a été appliqué

au suivi mensuel sur les sites de la Seine, pour lesquels le jeu de données de contamination du milieu était le plus important.

### 3.1.2 Comment prédire la bioaccumulation métallique ? Le modèle biodynamique

Les modèles toxico-cinétiques ont pour objectif de prédire la bioaccumulation à partir de la contamination du milieu. Le modèle biodynamique se révèle bien adapté aux métaux (Luoma and Rainbow, 2005). Son équation générale s'écrit sous la forme :

$$\frac{dC_{org}}{dt} = k_u \cdot C_d + AE \cdot IR \cdot C_p - (k_e + g) \cdot C_{org}$$

où  $C_{org}$  est la concentration dans les tissus ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ),  $C_d$  représente la concentration en métal dans l'eau ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) et  $C_p$  la concentration en métal dans les MES ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), AE l'efficacité d'assimilation (%),  $k_e$  la constante d'élimination ( $\text{j}^{-1}$ ) et IR le taux d'ingestion ( $\text{g.g}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) et  $g$  le taux de croissance ( $\text{j}^{-1}$ ).

Afin d'appliquer le modèle biodynamique aux données mensuelles, les équations de base du modèle ont été intégrées entre les dates  $t_{i-1}$  et  $t_i$ . Nous avons supposé que les paramètres ( $k_u$ , AE,  $g$ ) et les variables ( $C_d$ ,  $C_p$  et IR) du modèle étaient constants sur chaque mois mais différents d'un mois à l'autre. La relation utilisée pour la modélisation est alors :

$$C_{org}(t_i) = C_{org}(t_{i-1}) \cdot e^{-(k_e+g)(t_i-t_{i-1})} + C_{org\_ss} \cdot (1 - e^{-(k_e+g)(t_i-t_{i-1})}) \quad (3)$$

$$\text{avec } C_{org\_ss} = \frac{k_u \cdot C_d + AE \cdot IR \cdot C_p}{k_e + g} \quad (4)$$

Dans ce cas,  $C_{org\_ss}$  est la concentration dans les tissus à l'équilibre ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ),  $C_d$  représente la concentration en métal biodisponible entre  $t_{i-1}$  et  $t_i$  ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ),  $C_p$  la concentration particulaire entre  $t_{i-1}$  et  $t_i$  ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), IR est défini comme le produit de la concentration en MES ( $\text{g.L}^{-1}$ ) et du taux de filtration FR ( $\text{L.g}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ). Le taux de croissance  $g$  ( $\text{j}^{-1}$ ) est calculé à partir de l'évolution du poids sec des tissus.

Pour son application, aux données de la Seine, les constantes du modèle ont été obtenues à partir de la littérature (Tableau 3), avec le souci, lorsque plusieurs constantes étaient disponibles, de prendre la constante se rapprochant le plus des conditions d'expositions (i.e. seston naturel, concentration en MES ou chlorophylle). Notons que les constantes d'accumulation par voie dissoute, dans le cas du Cd et du Ni, ont été déterminées en laboratoire et exprimées en fonction de la concentration en Ca et/ou Zn. La spéciation du Cr n'ayant pas été déterminée lors de la campagne, nous avons utilisé une constante d'accumulation par voie dissoute ( $k_u$ ) moyenne à partir des données sur le Cr(III) et le Cr(VI) (Roditi and Fisher, 1999).

Tableau 3: Paramètres biodynamiques utilisés dans les différentes modélisations.

	AE (%)	$k_u$ ( $\text{L.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$ )	$k_e$ ( $\text{d}^{-1}$ )
Cd	26 <sup>a1</sup>	$k_u = FR \cdot \left( \frac{0.134}{1 + 10^{3.5} \cdot [Ca] + 10^{7.4} \cdot [Zn]} \right)^b$	0.012 <sup>a3</sup>
Cr	1.5 <sup>a2</sup>	1.15 <sup>a</sup>	0.015 <sup>a3</sup>
Zn	32 <sup>c1</sup>	1.047 <sup>c2</sup>	0.018 <sup>c3</sup>
Ni	-	$k_u = FR \cdot \left( \frac{0.043}{1 + 10^{3.6} \cdot [Ca]} \right)^b$	0.019 <sup>d</sup>
Cu	-	0.163 <sup>b</sup>	0.022 <sup>e</sup>

<sup>a</sup>: (Roditi and Fisher, 1999)

<sup>a1</sup>: AE faisant référence au seston naturel B de la rivière Hudson qui présentait une concentration en MES de  $11 \text{ mg.L}^{-1}$

<sup>a2</sup>: AE faisant référence au seston naturel A de la rivière Hudson qui présentait une concentration en MES de  $28 \text{ mg.L}^{-1}$  (l'AE du seston B n'étant pas disponible pour le Cr)

<sup>a3</sup>: moyenne entre les  $k_e$  obtenues suite à une contamination des organismes par voie dissoute et trophique du Cr III et du Cr IV

<sup>b</sup>: (Bourgeault et al., 2010) Valeurs obtenues suite aux expositions par voie dissoute en laboratoire. Dans le cas du Cu, des essais avaient été réalisés au laboratoire mais n'apparaissent pas ici puisqu'aucun facteur de contrôle n'avait été testé pour ce métal

<sup>c</sup>: (Wang et al., 1996). Données obtenues chez *M. edulis*

<sup>c1</sup>: AE faisant référence au seston naturel du 11 Mars pour lequel la concentration en chlorophylle était de 11,7 µg.L<sup>-1</sup>

<sup>c2</sup>:  $k_{in}$  moyen

<sup>c3</sup>: moyenne entre les  $k_e$  obtenues suite à une contamination des organismes par voie dissoute et trophique

<sup>d</sup>: (Zarogian and Johnson, 1984) chez *M. edulis*

<sup>e</sup>: (Mersch et al., 1993)  $k_e$  estimé à partir des données de contamination des tissus de dreissène pendant une période de déuration

### Les extractions chimiques peuvent-elles mimer la biodisponibilité des métaux particuliers ?

Une première simulation a eu pour objectif d'évaluer la capacité des extractions séquentielles à représenter la biodisponibilité des métaux particuliers. Ainsi, nous avons comparé les données de contamination mesurées dans les tissus des organismes à celles prédites par le modèle, en considérant une efficacité d'assimilation de 100% quel que soit le site, la date et le métal considéré. Pour cette simulation, nous avons considéré que la contamination métallique était la fraction échangeable seule, souvent supposée représenter la fraction biodisponible.

Les résultats, représentés sur la Figure 3-A, ont montré que les valeurs prédites sont du même ordre de grandeur que les valeurs mesurées si l'on considère que la contamination métallique particulière biodisponible correspond à la concentration mesurée dans la fraction échangeable seule. Cependant, l'adéquation n'est pas parfaite. En effet, 35% des valeurs prédites sont 3 fois plus élevées ou 3 fois plus faibles que les valeurs mesurées. L'incapacité des extractions chimiques séquentielles à évaluer la biodisponibilité des métaux particuliers souligne le rôle fondamental du paramètre AE

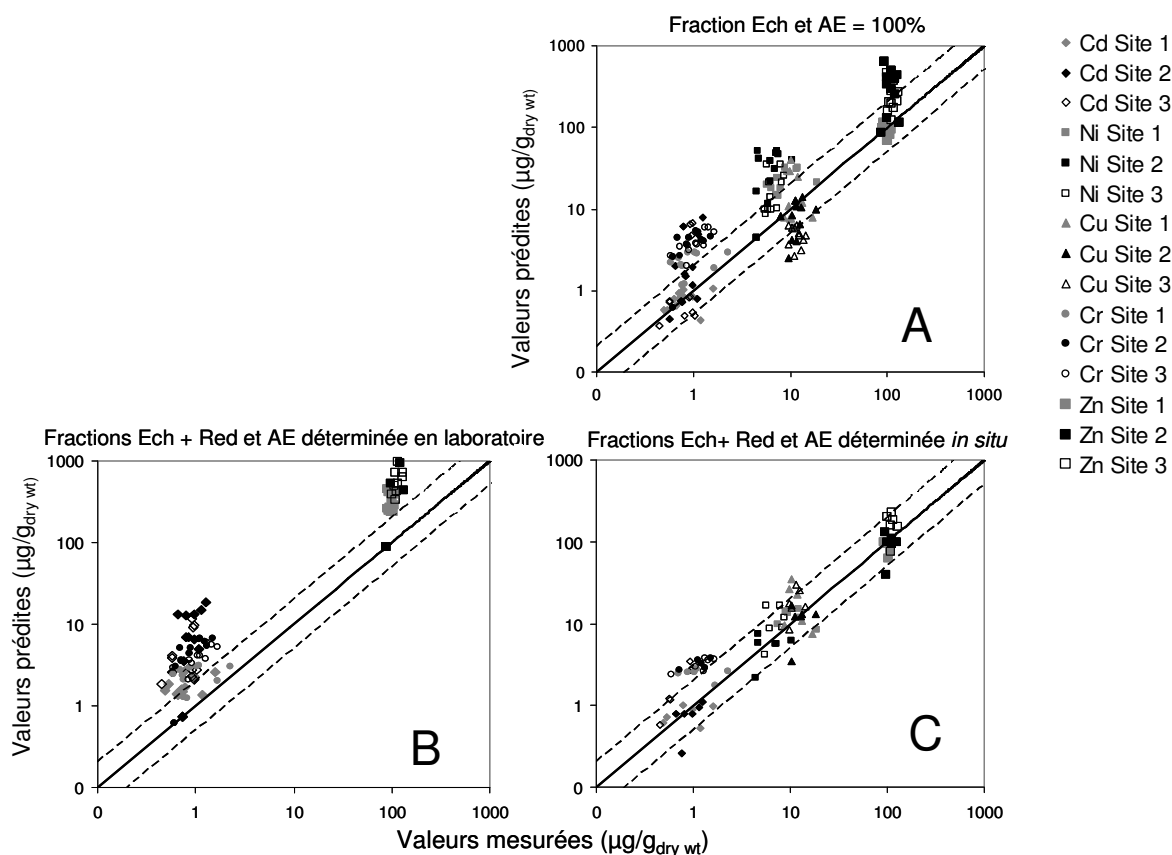


Figure 3: Relation entre les concentrations métalliques mesurées dans les tissus de dreissène et les concentrations prédites par le modèle (µg/g) en considérant différentes concentrations métalliques et différentes efficacités d'assimilation. L'efficacité d'assimilation AE est soit de 100% (A), soit

déterminée en laboratoire (B) ou à partir des données in situ (C). Les lignes en pointillées représentent une déviation d'un facteur 2 par rapport à la droite 1:1.

### Prédire la bioaccumulation en appliquant les efficacités d'assimilation (AE) de la littérature

Dans une seconde simulation, nous avons évalué la capacité prédictive du modèle biodynamique en utilisant les paramètres préexistants dans la littérature, y compris les efficacités d'assimilation. La contamination métallique particulière retenue pour les calculs est la concentration mesurée dans les fractions Ech+Red afin de se rapprocher au plus des extractions HCl recommandées par Luoma (1989).

L'application du modèle biodynamique avec les paramètres de la littérature conduit à une surestimation de l'accumulation de métaux dans les organismes (Figure 3-B). La surestimation est plus importante dans les Sites 2 et 3 que sur le Site 1. Ainsi, les concentrations de Cd dans les dreissènes sont surestimées en moyenne par un facteur 3, 13 et 6 sur les sites 1, 2 et 3 respectivement. Les propriétés des métaux particuliers et le comportement biologique des organismes, qui varient probablement entre les sites, peuvent expliquer les différences de prédiction entre les sites. Une modélisation de la bioaccumulation basée sur une valeur d'AE propre à chaque site est donc susceptible de fournir une bonne prédiction des concentrations observées dans les organismes.

### Une méthode *in situ* permettant d'estimer l'AE

L'utilisation d'une AE optimisée par site et par métal permet d'obtenir une bonne adéquation entre les concentrations prédites et mesurées (Figure 3-C). Les AE optimisées pour chaque site à partir des données des 5 premiers mois d'exposition sont reportées dans le Tableau 4. L'application de ces AE sur les données des 6 derniers mois de l'exposition a permis de rendre compte des différences entre les sites et d'améliorer la prédiction du modèle. Ainsi, 86% des valeurs prédites sur les 6 derniers mois d'exposition sont en accord avec les valeurs mesurées à un facteur 2 près.

Plutôt que d'estimer l'AE en laboratoire, nous proposons par cette méthode d'estimer l'AE à partir de données terrain, c'est-à-dire en intégrant le plus fidèlement possible les conditions environnementales des sites et la physiologie de l'organisme. L'optimisation des AE, réalisée à partir des données des 5 premiers mois de l'exposition, a montré des résultats comparables à une optimisation réalisée sur l'année complète. Ainsi une campagne in situ de quelques mois permet de calibrer le paramètre AE d'un site donné.

En dépit des différences amont/aval observées, aucune corrélation, que ce soit par l'Analyse en Composante Principale (ACP) ou par la Partial Least Square (PLS), n'a pu être établie<sup>1</sup> entre les efficacités d'assimilation de chaque site et les caractéristiques physico-chimiques des particules. .

*Tableau 4: Efficacités d'assimilation optimisées à partir du jeu de données des six premiers mois d'exposition. Les fractions prises en compte dans l'évaluation de la contamination métallique particulière sont les fractions échangeable et réductible.*

	Site 1	Site 2	Site 3
Cd	9 %	1 %	7 %
Cr	0 %	0 %	0 %
Zn	5 %	0 %	0 %
Ni	13 %	3 %	14 %
Cu	27 %	2 %	8 %

Le modèle de bioaccumulation nous a permis de calculer le pourcentage de métal accumulé par voie trophique (Tableau 5). Ces résultats ont montré que la voie trophique est une voie majoritaire d'accumulation pour le Cd, le Ni et le Cu alors que le Cr n'est pas accumulé par voie trophique. La part de Zn accumulé par voie trophique semble dépendante du site considéré.

<sup>1</sup> Données log-transformées.



Tableau 5: Pourcentage de métal accumulé par voie trophique selon les estimations du modèle biodynamique (moyenne sur l'année).

	Site 1	Site 2	Site 3
Cd	95 %	88 %	96 %
Cr	0 %	0 %	0 %
Zn	64 %	0 %	0 %
Ni	89 %	70 %	83 %
Cu	94 %	77 %	83 %

### 3.1.3 Bioaccumulation des HAP (en Seine)

Les contaminations en HAP dissous et labiles (mesurés par SPMD) sont présentées sur la Figure 4. Ici l'ensemble des HAP analysés a été sommé (le profil de contamination entre les 3 sites étant globalement le même pour chacun des HAP pris individuellement). Il apparaît nettement que Marnay est le site le moins contaminé alors que Bougival l'est le plus.

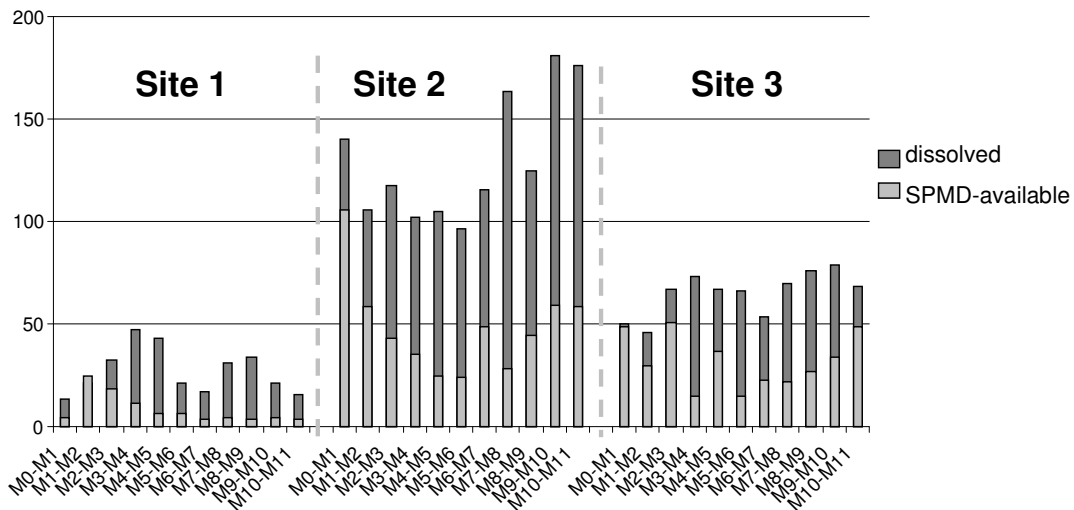


Figure 4: Concentration en  $\Sigma 13$  HAP dissous (ng/L) sur les trois sites étudiés entre octobre 2008 et septembre 2009

La contamination en HAP des tissus mous des dreissènes reflète globalement la contamination de l'eau : les dreissènes transplantées à Marnay sont moins contaminées que celle sur Triel et sur Bougival. Sur les trois sites, on observe une diminution de la contamination en avril, qui correspond très probablement à la ponte des organismes, les gonades étant plus contaminées par les substances hydrophobes et lipophiles que le reste des tissus mous.

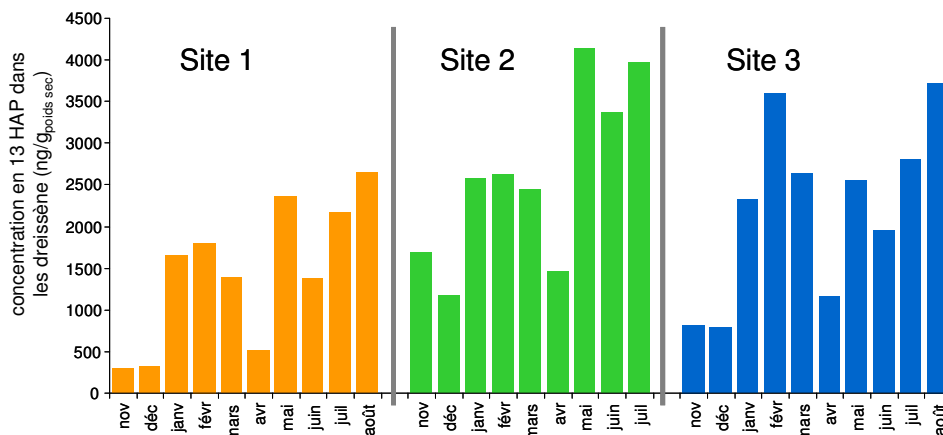


Figure 5: Concentration en  $\Sigma$ HAP dans les tissus de dreissène (ng/g poids sec) à Marnay (ton orangé), Bougival (ton bleu) et Triel (ton vert).

Cependant, le lien entre la bioaccumulation et la contamination de l'eau n'est pas direct puisque l'on n'observe pas de corrélation entre la contamination des dreissènes mesurée chaque mois et celle de l'eau (Figure 6). Ces données devront être interprétées en prenant en compte les conditions physico-chimiques du milieu et la physiologie de l'organisme. Cependant, les modèles biodynamiques proposés pour prédire la contamination métallique des organismes ne sont pas encore aussi aboutis pour ce qui concerne les contaminants organiques.

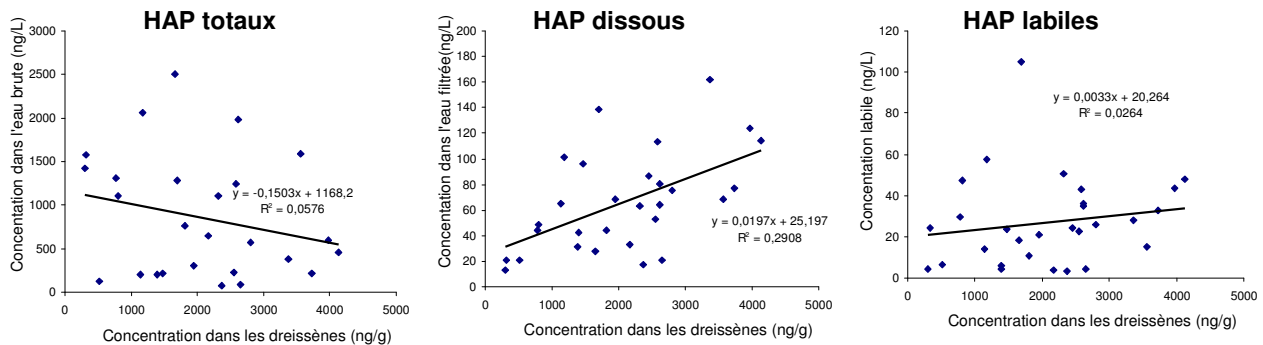


Figure 6: relations entre la concentration en  $\Sigma$ HAP dans les tissus de dreissène (ng/g poids sec) et celles mesurées dans l'eau (en ng/L), que ce soit en HAP totaux, dissous ou labiles mesurés par SPMD.

## 3.2 Marqueurs biologiques

### 3.2.1 Les marqueurs d'exposition, MT et GST

Les teneurs en métallothionéines (Figure 7) ne présentent pas de différences importantes entre les sites ainsi qu'aucune corrélation avec la charge métallique des individus (Figure 8A). Seules des teneurs légèrement plus importantes sont enregistrées chez les dreissènes présentes en Vesle à partir du printemps (principalement en Amont de Reims) par rapport aux individus contrôles de Commercy mais également vis-à-vis de ceux présents sur la Seine. Ces différences peuvent clairement être mises en lien avec des indices de condition plus faibles chez les individus présents sur les sites amont de la Vesle (Bouy et Sept-Saulx) par rapport aux individus présents sur les autres sites (PIREN, Gourlay et al., 2010). Les fluctuations saisonnières d'indice de condition sont particulièrement liées au cycle de reproduction des organismes, ce qui est particulièrement vrai pour les mollusques bivalves (Geffard et al., 2001). Cette absence d'augmentation de l'IC chez les individus présents sur les sites amont de la Vesle est due à une absence de maturation sexuelle qui a pu être mise en évidence à l'aide d'observations histologiques (Figure 9). A l'inverse chez les individus des autres sites (Vesle aval, Ardre et Seine), l'augmentation du poids des tissus mous, et donc de l'IC, a pu conduire à un phénomène de « dilution biologique » de la MT expliquant l'absence de relation directe entre la charge métallique des individus et leurs teneurs en MT. Ce phénomène de dilution biologique est particulièrement connu vis-à-vis des teneurs en éléments traces métalliques chez les invertébrés et tout particulièrement chez les mollusques bivalves (Geffard et al., 2001).

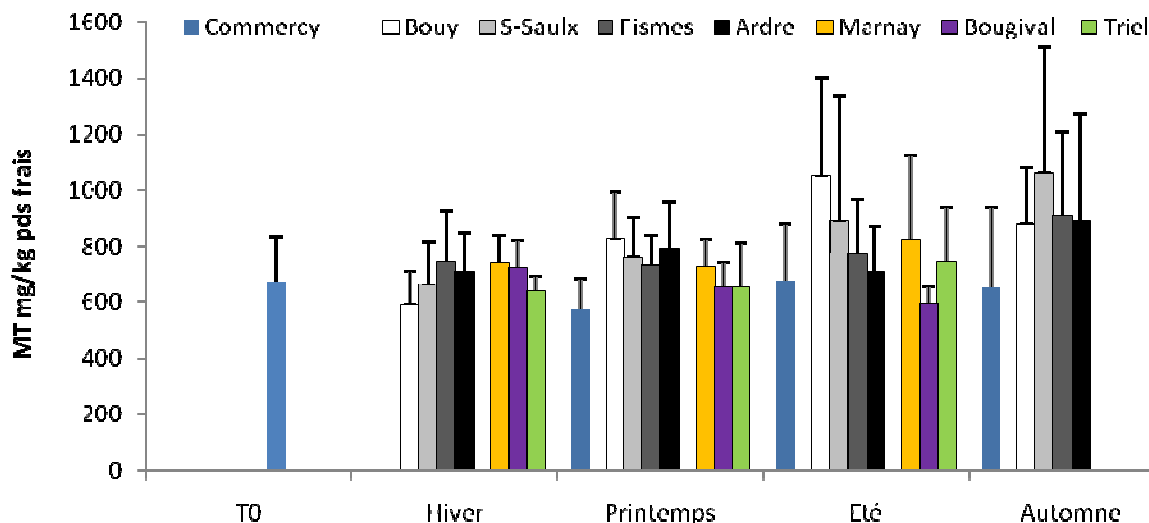


Figure 7 : Concentrations en MT mesurées au niveau de la glande digestive des dreissènes exposées sur les différents sites de la Seine et du BV de la Vesle.

Cette anomalie de la mise en place de la gamétogénèse chez les organismes présents sur les sites amont de la Vesle semble être liée à une présence de nourriture (estimée sur la base de la teneur en Chlorophylle) très basse (résultats non montrés).

La prise en considération d'une variable moins fluctuante que le poids des tissus mous, le poids de la coquille, pour exprimer la teneur en métallothionéine permet de mieux discriminer les différents sites en fonction du degré d'exposition métallique (PIREN Gourlay et al., 2010) et d'observer une relation positive et significative entre ces paramètres (Figure 8B). Ces résultats soulignent la capacité de la teneur en métallothionéines à renseigner sur une exposition des organismes à des contaminants métalliques mais traduisent également l'importance des facteurs biotiques sur la mesure de ces protéines.

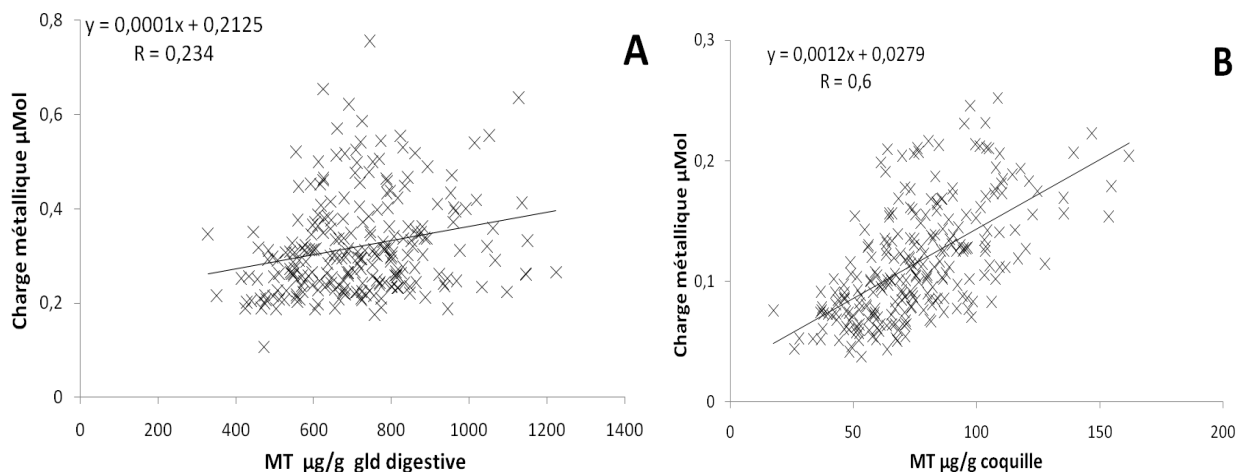


Figure 8 : Relation entre la charge métallique totale (Zn+Cu+Ni+Cd) mesurée au niveau des restes de tissus mous des dreissènes et la teneur en MT mesurée au niveau de la glande digestive. A : résultats exprimés en fonction du poids des tissus mous concernés ; B : résultats exprimés en fonction du poids de la coquille.

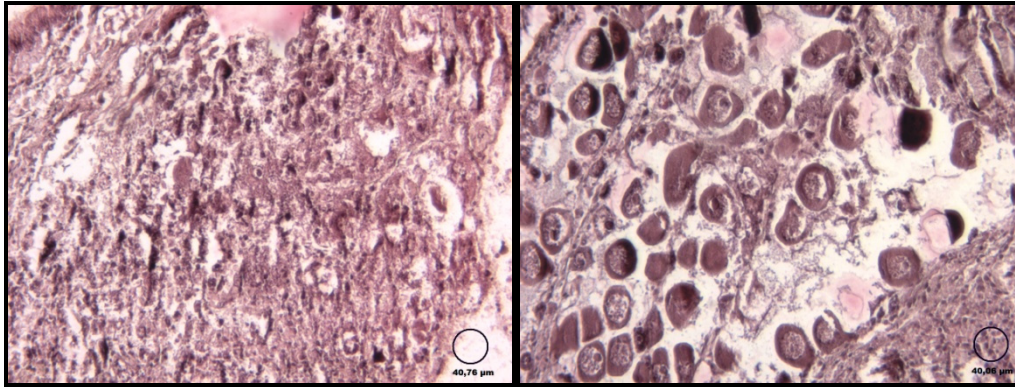


Figure 9 : Coupe histologique au niveau de la gonade de dreissènes femelles exposées sur un site amont, Bouy, (gauche) ou aval, Fismes, du BV de la Vesle. Les individus ont été prélevés en mai qui correspond au maximum de gamétogénèse.

Les activités de la glutathion S-transférase mesurées chez les individus exposés aux différents sites et pour chaque saison sont présentées sur la Figure 10. L'activité de la GST apparaît stable en fonction de la saison (individus de Commercy). Concernant les différences intersites, les niveaux d'activités mesurées chez les individus présents sur le BV de la Vesle sont similaires à ceux de la population contrôle, particulièrement pour les sites amonts. En effet pour les sites aval une augmentation de l'activité est observée en été et à l'automne. Les individus exposés sur les différents sites de la Seine présentent de façon générale des activités supérieures aux autres groupes (population contrôle et BV de la Vesle). Cette activation du mécanisme de détoxification chez les individus présents en Seine peut traduire une exposition plus importante de ces derniers à différentes molécules organiques.

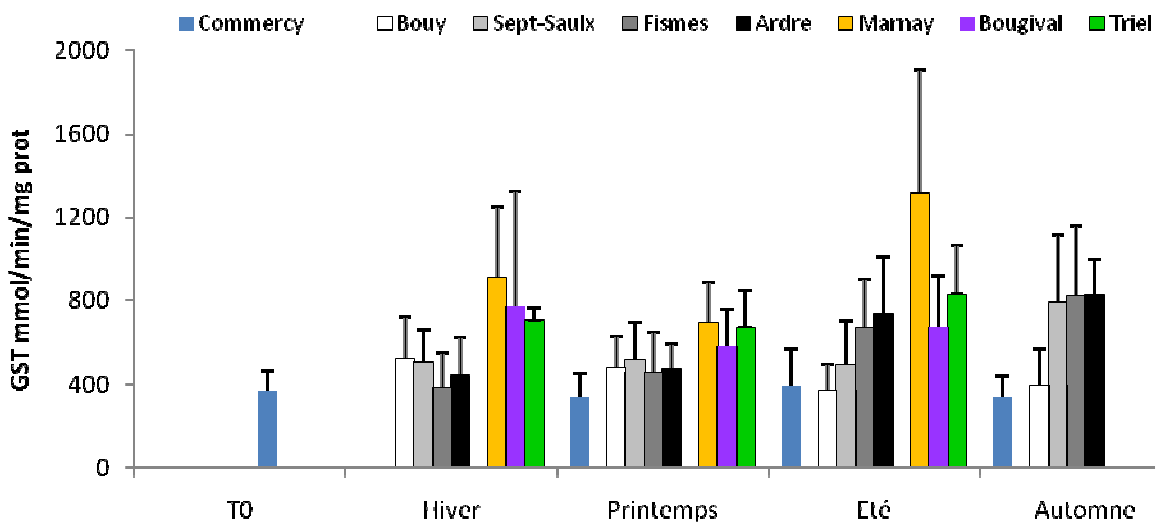


Figure 10 : Activités GST mesurées chez les dreissènes de la population contrôle ou exposées aux différents sites de la Seine ou du BV de la Vesle.

### 3.2.2 Les marqueurs de la physiologie digestive et des réserves énergétiques

Comme nous l'avons stipulé au niveau d'un précédent rapport (Palais et al., 2008), le processus digestif des mollusques bivalves se déroule en deux phases distinctes. La première étape se fait à l'aide d'un stylet cristallin qui va permettre le broyage et le mélange des aliments ingérés à des enzymes digestives : on parle de digestion extracellulaire. Ensuite, les particules sont intégrées par endocytose au niveau des cellules des tubules digestifs permettant ainsi une digestion intracellulaire. Ainsi les mesures d'activité des enzymes digestives ont été réalisées au niveau du stylet cristallin et de la glande digestive. Parmi les enzymes digestives, un intérêt particulier a été porté aux enzymes permettant la dégradation des sucres de structure

des cellules végétales, la cellulose avec une endoglucanase parmi les cellulases et, pour les sucres de réserve, l'amidon avec l'amylase.

Les activités cellulolytiques (endoglucanase) mesurées au niveau du stylet cristallin des dreissènes exposées aux différents sites de la Seine et du BV de la Vesle sont présentées en Figure 11. De façon globale il est enregistré des activités plus élevées chez les dreissènes présentes en Vesle par rapport à la population contrôle et ce particulièrement au printemps. A l'inverse, les activités mesurées chez les dreissènes de la Seine sont toujours inférieures à celles des dreissènes du BV de la Vesle mais également à celles de la population contrôle (sauf pour Bougival en hiver et au printemps). Cette différence d'évolution conduit à différentes hypothèses en lien avec différents paramètres. En effet l'induction des activités observée chez les individus présents sur le BV de la Vesle, particulièrement dans les sites amont, peut être liée à la faible quantité de nourriture (faible teneur en chlorophylle) mesurée sur ces mêmes sites. En effet différentes études ont pu montrer qu'un stress lié à la quantité de nourriture pouvait conduire à une induction des activités afin d'optimiser au maximum les capacités digestives et retirer le maximum d'énergie du peu de nourriture présente (Le Vay et al., 2001 ; Gutow et al., 2006). A l'inverse pour les individus présents en Seine, l'inhibition d'activité, vis-à-vis de la population contrôle, peut suggérer un impact lié à la présence de contaminants. En effet, nous avons déjà pu constater chez ces mêmes individus des activités de GST plus élevées traduisant leur exposition à des molécules organiques. Différentes études ont pu souligner l'impact de contaminants sur les capacités digestives et notamment sur l'activité des enzymes (Dedourge et al., 2009).

Les résultats concernant l'amylase au niveau du stylet cristallin suivent un schéma assez similaire à celui de l'endoglucanase avec cependant des différences intersites moins marquées (non montré).

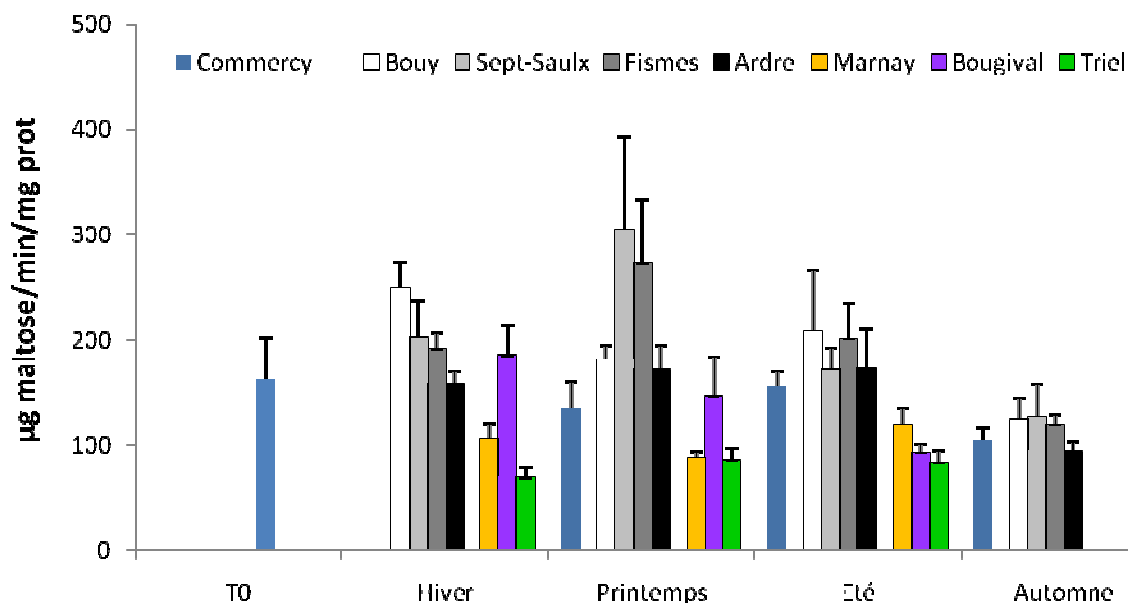


Figure 11 : Activité cellulolytique (endoglucanase) mesurée au niveau du stylet cristallin de dreissènes exposées sur les différents sites de la Seine et du BV de la Vesle.

Au niveau de la glande digestive peu de différences intersites des activités endoglucanase et amylase sont observées au cours des quatre saisons. De plus ces différences ne traduisent pas une tendance particulière (non montré). A l'inverse une fluctuation saisonnière importante est notée. Pour illustrer ces variations sur un pas de temps plus fin, les activités amylase mesurées chaque mois au niveau de la glande digestive des dreissènes présentes sur les différents sites du BV de la Vesle sont présentées sur la Figure 12. Les résultats soulignent l'importante fluctuation temporelle de l'activité amylase. Les activités augmentent fortement entre mars et août ce qui correspond à la période de maturation et d'émission des gamètes. Cependant, le niveau d'activité ne diminue pas entre août et octobre alors que la reproduction est terminée. Il

apparaît donc que le niveau d'activité des enzymes digestive suit particulièrement la température. Sur ce suivi, il peut également être noté des différences intersites avec notamment des activités plus faibles au niveau du site de l'Ardre. Le même type de résultat est observé pour la cellulase avec cependant une différence d'amplitude d'activité moins élevée entre l'hiver et l'été par rapport à celle observée pour l'amylase. L'influence de paramètres biotiques et/ou abiotiques tel que la température complique la comparaison des résultats obtenus chez les dreissènes présentes sur la Seine et le BV de la Vesle aux différentes saisons. En effet les températures de la zone amont/aval des cours d'eau sont différentes au cours du temps.

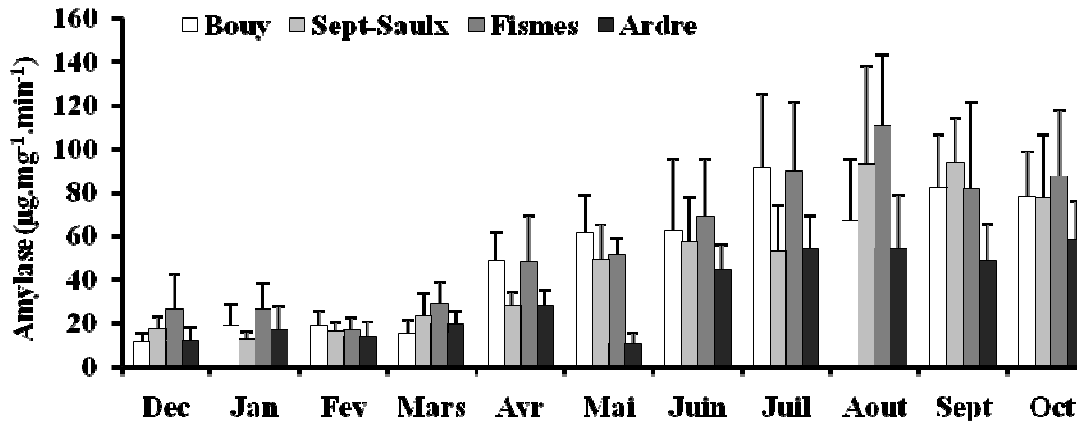


Figure 12 : Activité amylase mesurée chaque mois au niveau de la glande digestive de dreissènes exposées sur les différents sites du BV de la Vesle.

Le même type d'observation a pu être fait en ce qui concerne les réserves énergétiques des dreissènes présentes sur les différents sites de la Seine et du BV de la Vesle (Figure 13). En effet si on reste à l'échelle de la saison, des réserves en glycogènes inférieures sont observées chez les individus présents en Seine durant l'hiver alors que la situation est inversée au printemps. Les teneurs en glycogènes sont inférieures chez les individus transplantés par rapport à la population contrôle et été. Une situation identique est observée pour la teneur en lipides. Les réserves sont fortement dépendantes de la capacité des organismes à mettre de l'énergie en réserve durant l'automne et l'hiver précédent le printemps, période de gamétogénèse et d'investissement de l'énergie dans la production de gamètes. Les différences intersites, variables en fonction des saisons, peuvent en partie s'expliquer par le fait d'une mise en place et d'un déroulement de la gamétogénèse sensiblement variable d'un site à l'autre en fonction de la différence de température du site.

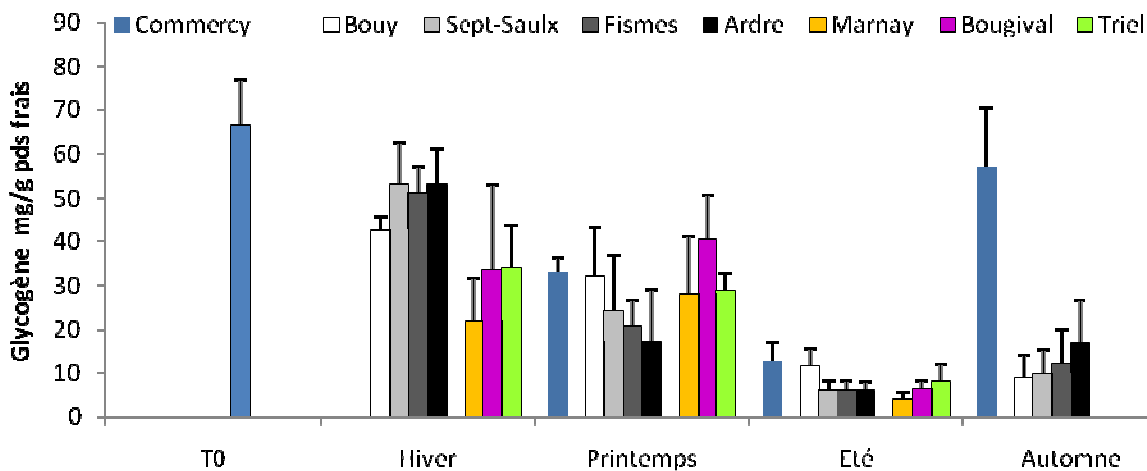


Figure 13 : Glycogène au niveau de la gonade des dreissènes exposées aux différents sites de la Seine et du BV de la Vesle.

### 3.3 Effets toxiques de la contamination sur les organismes la génotoxicité

Les résultats présentés sur les Figure 14 et Figure 15 montrent que les moules transplantées sur le site de Marnay ont moins de dommages à l'ADN et de dommages chromosomiques que les moules transplantées sur les deux autres sites, situés plus en aval, et cela quelle que soit la saison.

En ce qui concerne les saisons, les résultats du test comète montrent qu'en janvier, les moules ont un faible taux de dommages à l'ADN. En hiver, les températures de l'eau sont basses (5°C), ce qui se traduit par une diminution du métabolisme et un taux de filtration relativement bas ( $\approx 25\text{ml/dreissène/h}$ ). Ce faible taux de filtration pourrait entraîner une diminution de l'exposition aux micropolluants et donc une génotoxicité plus faible. La forte augmentation de la génotoxicité observée en avril, pourrait être liée à une augmentation du taux de filtration (25 à 80 ml/dreissène/h) en lien avec l'augmentation de la température de l'eau (15°C). De plus, cette augmentation du taux de filtration pourrait être en lien avec l'activation de la reproduction, comme l'indique le GSI. L'augmentation du taux de filtration provoquerait alors une plus grande exposition aux contaminants. En juin, le taux de dommages à l'ADN diminue après la ponte suite à la diminution du taux de filtration ( $\approx 30\text{ml/dreissène/h}$ ), tout en restant supérieur à celui du mois de janvier, du à des températures encore relativement élevées.

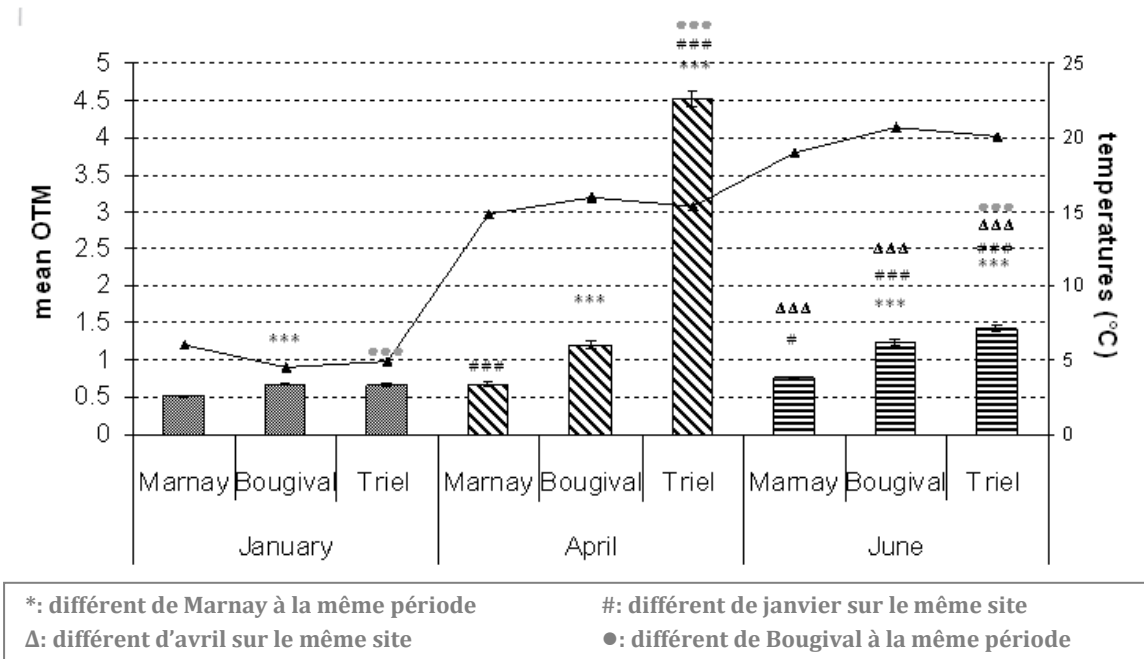


Figure 14 : OTM moyen dans les cellules de branchies de moules transplantées sur les trois sites de la Seine, prélevées à 3 saisons différentes (moyennes  $\pm$  SE)



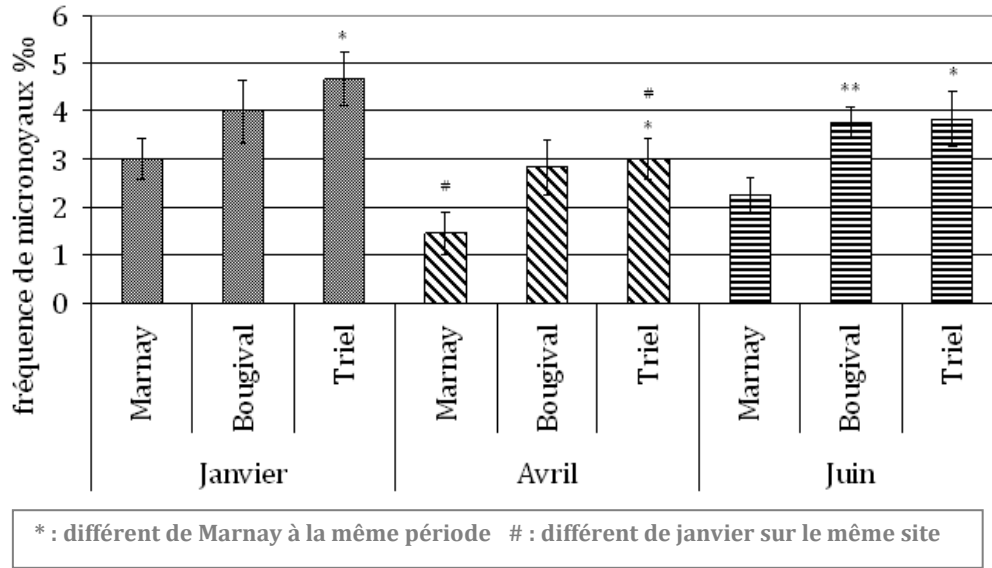


Figure 15: Fréquence des micronoyaux dans les cellules des branchies de moules transplantées sur les trois sites de la Seine, prélevées à 3 saisons différentes (moyennes ± SE)

Afin d'améliorer la significativité du test comète, nous avons déterminé la part de cassures de l'ADN résultant de lésions oxydantes par rapport à l'ensemble des cassures. Pour cela, nous avons amélioré le test-comète par l'ajout de hOGG1 (développement méthodologique 2009) et réalisé un nouveau caging au printemps 2010.

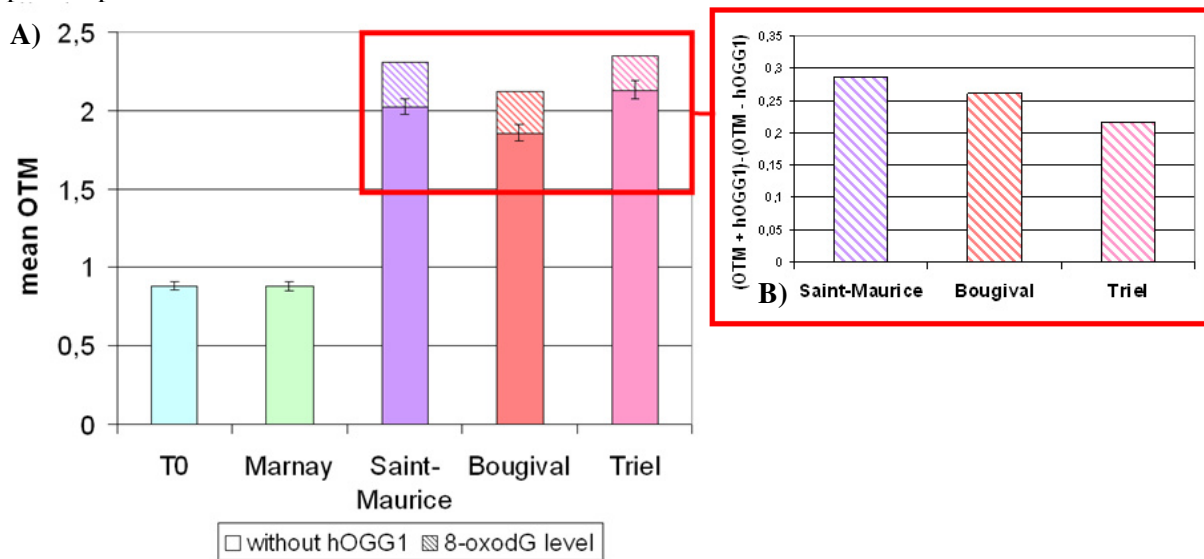


Figure 15: A: OTM moyen dans les cellules de branchies de moules transplantées sur quatre sites au printemps 2010 (moyennes ± SE) et B: OTM moyen lié aux bases oxydées de l'ADN

L'OTM mesuré sur le site de Marnay n'est significativement pas différent de celui obtenu à T0. Les moules présentes sur le site de Marnay présentent, en revanche, un OTM significativement inférieur aux trois autres sites ( $p < 0.001$ ). Un effet génotoxique amont/aval peut donc être mis en évidence, confirmant les résultats obtenus lors du suivi annuel en 2008/2009 sur les sites de Marnay, Bougival et Triel. Aucune différence statistique n'est détectée entre les trois sites urbains.

Le test comète-hOGG1 permet de mettre en évidence un niveau de bases oxydées résultant d'un stress oxydatif représenté sur la figure 15A par les barres hachurées et sur la figure 15B. Ce niveau semble être très légèrement décroissant de Saint-Maurice à Triel, mais aucun test statistique ne peut être réalisé. Le Impact de la contamination chimique sur des dreissènes : de la bioaccumulation aux indicateurs d'effets



niveau de 8-oxodG est compris entre 0,21 et 0,26. L'apparition de dommages oxydatifs pourrait être liée à l'augmentation de la filtration et donc de la respiration suite à l'augmentation des températures (Rajagopal et al., 2005). En effet, l'augmentation de la consommation d'oxygène pourrait engendrer l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) responsable du stress oxydatif (Bigot et al., 2009; Verlecar et al., 2007).

L'augmentation des bases oxydées, révélée par l'augmentation du taux de 8-oxodG, résultant d'un stress oxydant, pourrait être en lien avec une plus forte exposition aux polluants. Ceci montre clairement un effet pré-mutagène. D'autre part, la période d'étude correspondant à la pré-ponte, c'est-à-dire à une période où le métabolisme est activé, laisse supposer une métabolisation plus importante des polluants qui engendre un stress oxydant accru.

La fréquence de MN, cellules binucléées et cellules en apoptose a été déterminé par le protocole du test des micronoyaux, ce test a été réalisé sur ces mêmes organismes au printemps 2010, les résultats sont représentés dans la figure 16. Les résultats montrent une augmentation de la fréquence de micronoyaux entre l'amont et l'aval de Paris. Les moules présentes sur le site de St-Maurice présentent une fréquence de micronoyaux, noyaux bourgeonnants et de cellules binucléées plus élevées que sur les trois autres sites. On observe aussi un fort taux d'apoptose à Bougival.

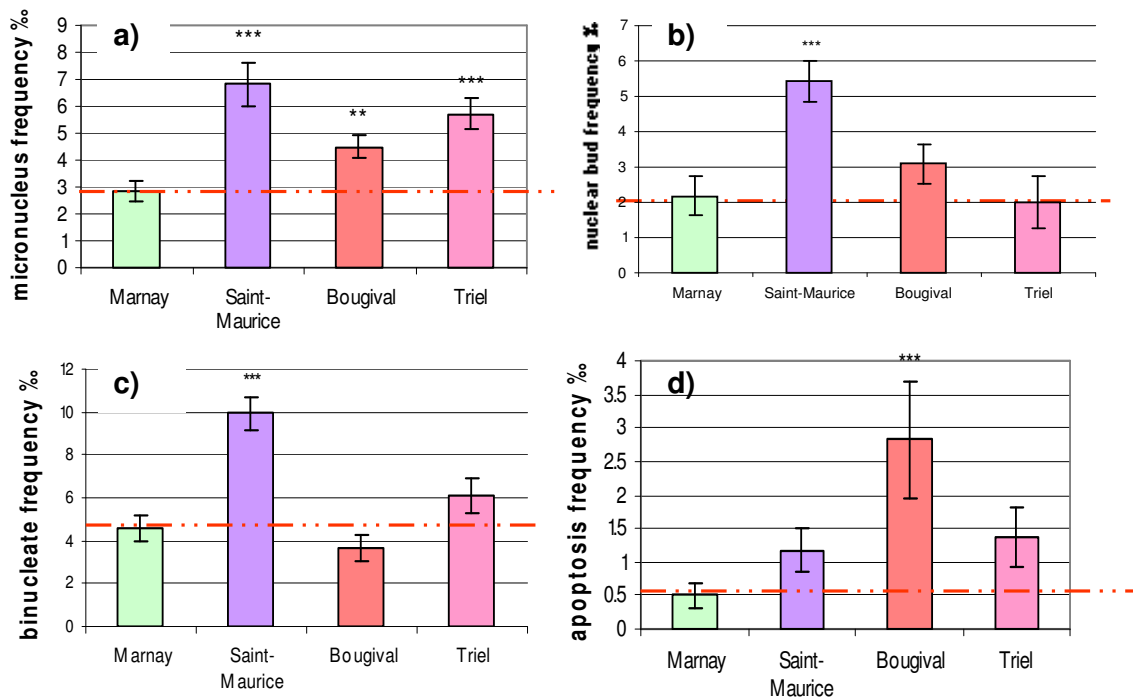


Figure 16: Fréquence des a) micronoyaux b) micronoyaux bourgeonnants c) cellules binucléées et d) cellules en apoptoses dans les branchies de moules transplantées sur les 4 sites au printemps 2010 (moyennes ± SE)

Le suivi saisonnier de 2008-2009 nous a montré que la réponse génotoxique est faible lorsque la température de l'eau est faible (5°C). Au printemps, avec l'augmentation de la température, l'activation du métabolisme, de la reproduction et donc du taux de filtration, la réponse génotoxique augmente suite, probablement, à une plus forte exposition aux micropolluants. Cette tendance est confirmée par l'exposition au printemps 2010. Une augmentation de la réponse génotoxique et l'induction de dommages oxydatifs de l'ADN à l'aval de la Seine sont confirmées en 2010. L'augmentation de la réponse génotoxique peut être reliée à une plus forte exposition aux contaminants en lien avec le gradient de contamination chimique amont-aval de Paris. En effet les bases oxydées sont détectées uniquement sur les sites urbains très perturbés (St-Maurice, Triel et Bougival).

## 4 Conclusion

Les campagnes de transplantation réalisées en 2009-2010 illustrent que l'ensemble des mesures chimiques ou biologiques réalisées sur un organisme transplanté dans un milieu est le reflet à la fois de l'état du milieu mais aussi de la physiologie propre de l'organisme. Grâce au travail préalable de laboratoire sur la caractérisation de ces réponses en fonction des pressions chimiques et à la connaissance des sites, il est possible pour plusieurs des réponses mesurées de pouvoir discriminer ce qui est dû à la contamination chimique des autres variations environnementales.

Ainsi, la contamination métallique de la dreissène reflète la contamination du milieu sous réserve de disposer d'un modèle de toxico-cinétique robuste. Ce travail a aussi montré l'importance majeure de la contamination métallique des particules dans le transfert vers les organismes du milieu, alors même que les normes appliquées aujourd'hui se basent sur les mesures de métaux dissous dans l'eau. De la même façon que nous sommes capables d'anticiper la biodisponibilité des métaux dissous en fonction des conditions physico-chimiques de l'eau, un travail doit être fait aujourd'hui pour comprendre la biodisponibilité des métaux associés aux matières en suspension, dont on a vu par ce travail qu'elle était largement dépendante des sites.

Les résultats biologiques soulignent une exposition à des contaminants des organismes présents sur la Seine et un impact possible au niveau des capacités digestives. Cependant l'influence de paramètres biotiques (quantité de nourriture...) et abiotiques (température...) semble également importante et peut largement biaiser l'interprétation des résultats obtenus sur des sites très éloignés dont les conditions de vie sont différentes. Afin d'assurer une interprétation plus fine des différences intersites, il apparaît important de préciser en conditions contrôlées l'amplitude de fluctuation de ces réponses biologiques lorsque les organismes sont soumis à un gradient de température ou sous l'influence d'un jeun plus ou moins sévère. De plus la période de reproduction semble être une période de grande modification physiologique. Ainsi afin de limiter l'influence de ce paramètre sur nos réponses biologique, il serait intéressant de prendre en considération des stades de cycle de vie non soumis à la reproduction, à savoir les stades embryonnaire et larvaire.

## 5 Bibliographie

- Bigot A., Doyen P., Vasseur P., Rodius F., 2009. Metallothionein coding sequence identification and seasonal mRNA expression of detoxification genes in the bivalve *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 382-387.
- Bourgeault A., Gourlay-Francé C., Tusseau-Vuillemin M. H., 2010a. Modelling the effect of water chemistry on the bioaccumulation of waterborne Cd in zebra mussels. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 2182-2189.
- Bourgeault A., Gourlay-Francé C., Vincent-Hubert F., Palais F., Geffard A., Biagianti-Risbourg S., Pain-Devin S., Tusseau-Vuillemin M. H., 2010b. Lessons from a transplantation of zebra mussels in a small urban river : an integrated ecotoxicological assessment. *Environmental Toxicology* 25, 468-478.
- Bourgeault A., Palais F., Arini A., Biagianti-Risbourg S., Geffard A., Gourlay-Francé C., Pain-Devin S., Uher E., Vincent-Huubert F., 2009. Impact du milieu urbain sur un organisme modèle : réponses biologiques chez les dreissènes transplantées dans le bassin de l'Orge. Rapport annuel d'activité du PIREN-Seine 2008.
- Camusso M., Balestrini R., Binelli A., 2001. Use of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) to assess trace metal contamination in the largest Italian subalpine lakes. *Chemosphere* 44, 263-270.
- Carr, R.S., Neff, J.M., 1984. Quantitative semi-automated enzymatic assay for tissue glycogen. *Comp. Biochem. Physiol.*, B 77, 447-449.

- De Lafontaine Y., Gagné F., Blaise C., Costan G., Gagnon P., Chan H. M., 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology* 50, 51-71.
- Frings, C.S., Fendley, T.W., Dunn, R.T., Queen, C.A., 1972. Improved determination of total serum lipids by the sulfophosphovanillin. *Clin. Chem.*, 18, 673-674.
- Geffard A., Amiard-Triquet C., Amiard JC., 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 sites. *Biomarkers*. 6 : 91-107.
- Geffard A., Jeantet A., Amiard J.-C., Le Pennec M., Ballan Dufrançais C., Amiard-Triquet C., 2004. Comparative study of metal handling strategies in bivalves *Mytilus edulis* and *Crassostrea gigas*: a multidisciplinary approach. *J. Mar. Biol. Ass. UK*. 84, 641-650.
- Gourlay-Francé C., Bourgeault A., Michel C., Uher E., Vincent-Huubert F., Tusseau-Vuillemin M.-H., Palais F., Biagiante-Risbourg S., Geffard A., Pain-Devin S., 2010. Utilisation de la dreissène pour l'évaluation de la qualité écotoxicologique de différents hydrosystèmes du bassin versant de la Seine Rapport annuel d'activité du PIREN-Seine 2009.
- Gutow L, Strahl J, Wiencke C, Franke H-D, Saborowski R, 2006. Behavioural and metabolic adaptations of marine isopods to the rafting life style. *Mar Biol*, 149 : 821-828.
- Le Vay L, Jones DA, Puello-Cruz AC, Sangha RS, Ngamphongsai C, 2001. Digestion in relation to feeding strategies exhibited by crustacean larvae. *Comp Biochem Phys A*, 128 : 623-630.
- Luoma S. N., 1989. Can we determine the biological availability of sediment-bound trace elements? *Hydrobiologia* 176-177, 379-396.
- Luoma S. N., Rainbow P. S., 2005. Why is metal bioaccumulation so variable ? *Biodynamics as a unifying concept. Environmental Science and Technology* 39, 1921-1931.
- Mersch J., Morhain E., Mouvet C., 1993. Laboratory accumulation and depuration of copper and cadmium in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* and the aquatic moss *Rhynchostegium riparioides*. *Chemosphere* 27, 1475-1485.
- Palais F., Jubeaux G., Dedourge-Geffard O., Biagiante-Risbourg S., Geffard A., 2010. Amylolytic and cellulolytic activities in the crystalline style and the digestive diverticulae of the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) *Molluscan Research* 30, 29-36.
- Rajagopal S., van der Velde G., Jansen J., van der Gaag M., Atsma G., Janssen-Mommen J. P. M., Polman H., Jenner H. A., 2005. Thermal tolerance of the invasive oyster *Crassostrea gigas*: Feasibility of heat treatment as an antifouling option. *Water Research* 39, 4335-4342.
- Roditi H. A., Fisher N. S., 1999. Rates and routes of trace element uptake in zebra mussels. *Limnology and Oceanography* 44, 1730-1749.
- Verlecar X. N., Jena K. B., Chainy G. B. N., 2007. Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. *Chemico-Biological Interactions* 167, 219-226.
- Vincent-Huubert F., Arini A., Gourlay-Francé C., 2011. Early genotoxic effects in gill cells and hemocytes of *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium, and a combination of B[a]P and Cd. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. accepté
- Vincent-Huubert F., Palais F, Arini A., Biagiante-Risbourg S., Dedourge-Geffard O., Geffard A., 2009. Développement de réponses du métabolisme digestif et de génotoxicité chez la dreissène: validation en laboratoire par des contaminants modèles. Rapport annuel d'activité du PIREN-Seine 2008.
- Voets J., Talloen W., de Tender T., van Dongen S., Covaci A., Blust R., Bervoets L., 2006. Microcontaminant accumulation, physiological condition and bilateral asymmetry in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from clean and contaminated surface waters. *Aquatic Toxicology* 79, 213-225.
- Wang W. X., Fisher N. S., Luoma S. N., 1996. Kinetic determinations of trace element bioaccumulation in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series* 140, 91-113.
- Zaroogian G. E., Johnson M., 1984. Nickel uptake and loss in the bivalves *Crassostrea virginica* and *Mytilus edulis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 13, 411-418.