

## La dreissène comme indicateur de contamination biologique dans la Seine

Aurélie Bigot-Clivot\*, Emilie Lance, Alexandra Lepoutre, Sarah Jean, Mélissa Palos-Ladeiro, Marc Bonnard, Alain Geffard

Université de Reims Champagne-Ardenne (URCA), UMR-I 02 INERIS-URCA-ULH SEBIO (Stress Environnementaux et Biosurveillance des Milieux Aquatiques), Campus Moulin de la Housse, 51100 Reims

\* aurelie.bigot@univ-reims.fr

### Résumé

*D'avril à juillet 2016 (hautes eaux) puis de novembre à décembre 2016 (basses eaux), des dreissènes ont été encagées au niveau de trois sites de l'axe Seine : Marnay-sur-Seine, Bougival et Triel-sur-Seine dans le but d'évaluer une éventuelle bioaccumulation en protozoaires et en cyanotoxines. Des oocystes de *Toxoplasma gondii* ont été détectés dans les tissus mous des dreissènes encagées sur les 3 sites et pour toutes les dates, excepté à Marnay sur Seine durant la période de basses eaux. *G. duodenalis* a été détecté uniquement chez les bivalves encagés 3 semaines à Bougival en novembre. Une corrélation entre la contamination en protozoaires et la saison + pluviométrie a été observée : hautes eaux > basses eaux. Des hépatotoxines microcystines ont été détectées sous forme libre et liée aux protéines dans les tissus de *D. polymorpha*, démontrant la présence de cyanobactéries toxiques dans les communautés phytoplanctoniques des 3 sites de Marnay, Bougival et Triel aux mois de mai, novembre et décembre 2016, et uniquement à Triel, aval de Paris, en juillet 2016. Cependant, ces valeurs d'accumulation, de l'ordre du  $\text{ng g}^{-1}$  poids sec, sont modérées par rapport aux résultats obtenus dans nos développements en laboratoires (i.e., plusieurs dizaines de  $\mu\text{g g}^{-1}$  poids sec), montrant que les densités de cyanobactéries dans la colonne d'eau ont probablement été limitées, sans phénomène de prolifération intense (bloom), en cohérence avec l'hydrologie des sites (i.e., forts débits de la Seine).*

*Ces résultats montrent l'intérêt de l'utilisation d'organismes intégrateurs pour révéler la présence de toxines et de pathogènes présents en faibles concentrations dans un milieu courant comme la Seine.*

### Points clefs

- ✓ Contamination saisonnière à *Toxoplasma gondii* dans les eaux de Marnay-sur-Seine, Bougival et Triel-sur-Seine.
- ✓ Développement de cyanobactéries productrices d'hépatotoxines microcystines dans les trois sites et lors des deux campagnes 2016, à des niveaux de prolifération bas.
- ✓ Le caractère intégrateur de *Dreissena polymorpha* permet de considérer ce bivalve d'eau douce comme espèce sentinelle de la contamination biologique.

## Introduction

L'augmentation des pressions d'origine anthropique sur les écosystèmes a mené à une augmentation de la fréquence des pollutions par des agents biologiques. Parmi ces pollutions, la contamination fécale des environnements aquatiques touche de nombreuses régions dans le monde avec des risques avérés pour la santé humaine. Trois parasites protozoaires sont clairement identifiés comme des priorités de santé publique : *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* et *Toxoplasma gondii*, et sont mentionnées dans le groupe B de la directive 2003/99/CE du parlement européen. *Cryptosporidium* et *Giardia* sont responsables respectivement de la cryptosporidiose et de la giardiose. Ces protozoaires prolifèrent dans l'intestin de mammifères (humains et/ou animaux), et sont expulsés avec les fèces sous forme d'oocystes et de kystes et qui pourront contaminer de nouveaux hôtes (Borowski *et al.* 2010). Ils peuvent causer une morbidité importante chez les immunocompétents et le décès de patients immunodéprimés pour *Cryptosporidium*. Dans le cas de *T. gondii*, une infection lors de la grossesse peut entraîner de graves malformations chez le fœtus. Chez l'humain, le principal vecteur de ces contaminants biologiques est l'eau contaminée par des fèces humaines ou animales, et servant ensuite à la boisson ou l'irrigation des cultures (Castro-Hermida *et al.*, 2015).

Leurs stades parasitaires de transmission, i.e. oocystes et kystes, sont très robustes dans l'environnement et ubiquitaires dans les habitats aquatiques. Les dangers pour la santé humaine représentés par les pathogènes zoonotiques dans les eaux restent mal compris et représentent des défis particuliers pour les autorités chargées de maintenir la qualité des eaux de surface utilisées pour les loisirs et comme sources d'eau potable. Les cas d'épidémies parasitaires d'origine hydrique sont tout de même de plus en plus recensés dans le monde. *Cryptosporidium* sp. et *G. duodenalis* sont les protozoaires parasites pathogènes pour l'homme les plus souvent impliqués dans des épidémies liées à l'eau (ingestion d'eau de boisson ou ingestion accidentelle d'eau contaminée lors d'une activité nautique). Ainsi, depuis 2001, 107 épidémies à *Cryptosporidium* (25 000 cas de cryptosporidiose), 23 épidémies à *Giardia* (5 000 cas de giardiose) et 4 épidémies à *Toxoplasma gondii* (300 cas de toxoplasmose) ont été recensées.

L'évaluation de la qualité biologique des eaux repose sur des indicateurs comme *Escherichia coli* et autres coliformes fécaux et totaux (Figueras et Borrego 2010) bien qu'ils puissent être rapidement éliminés de l'environnement et soient plus sensibles que les protozoaires aux stress environnementaux et aux traitements de désinfection (Chauret *et al.*, 1995). Ainsi, ces indicateurs bactériologiques ne reflètent pas, ou peu, la qualité sanitaire globale (Gomez-Couso *et al.*, 2003, Pachepsky *et al.*, 2014).

Les protozoaires sont difficiles à détecter dans le milieu aquatique. Les techniques de filtration d'eau et de purification utilisées peuvent produire des résultats variables selon la qualité de l'eau, le lieu et la période d'échantillonnage. De nombreuses études ont permis de souligner l'intérêt des bivalves dans la surveillance des milieux aquatiques. En effet, ces organismes sont sédentaires, possèdent un fort taux de filtration et sont caractérisés par leur capacité à accumuler des contaminants environnementaux. Des expositions en laboratoire ont permis de montrer que le bivalve d'eau douce *Dreissena polymorpha* est capable de bioaccumuler des oocystes de *C. parvum* et *T. gondii* mais également de retenir les oocystes de *T. gondii* dans ses tissus à des quantités proches de celles retrouvées au bout de 14 jours d'exposition (Palos-Ladeiro *et al.*, 2014, 2015). De plus, une étude *in situ* a permis la détection d'oocystes de *T. gondii* via des dreissènes engagées pendant 1 mois sur différents sites en amont et aval de stations d'épuration (Kerambrun *et al.*, 2016).

Une autre problématique grandissante liée à l'eutrophisation des écosystèmes aquatiques continentaux et au changement climatique, est l'augmentation de la fréquence et de l'intensité des proliférations de cyanobactéries dans les eaux douces utilisées à des fins récréatives ou pour l'adduction d'eau potable. Ces organismes photosynthétiques appartenant à la communauté phytoplanctonique produisent des endotoxines (neurotoxines, hépatotoxines, dermatotoxines) et constituent un danger pour les organismes cibles dont l'Homme. Ces propriétés toxiques engendrent des problèmes à la fois économiques (*e.g.*, perturbation du traitement des eaux d'alimentation, des activités de pêche ou de loisirs), écologiques (mortalités massives d'animaux), et de santé publique (nombreux malades sur tous les continents et parfois des morts) (Wiegand & Pflugmacher, 2005 ; Puschner & Humbert, 2007). Parmi les cyanotoxines, les hépatotoxines microcystines (MCs) sont les plus couramment rencontrées en eaux douces et produites par de nombreux genres de cyanobactéries. Elles s'accumulent préférentiellement dans le foie des vertébrés et la glande digestive des

invertébrés (e.g., Lance et al, 2006 ; 2008) au sein desquels elles engendrent des déstructurations tissulaires (e.g., Lance et al, 2010b) potentiellement mortelles. Des études épidémiologiques menées en Chine suggèrent l'implication de l'exposition chronique aux MCs via l'eau de boisson dans l'augmentation de l'incidence des carcinomes hépatiques (Puschner & Humbert, 2007). La  $\beta$ -N-méthylamino-L-alanine (BMAA), que nous étudions également dans ce projet, est une neurotoxine émergente produite par du phytoplancton dont des cyanobactéries, suspectée d'être impliquée, par intoxication chronique, dans des pathologies humaines neuro-dégénératives comme le complexe Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) / Parkinsonisme / démence, aussi appelé maladie de Charcot (Cox *et al.*, 2005). Une accumulation significative de BMAA a été démontrée dans le cerveau humain, notamment chez des sujets décédés de SLA sur l'île de Guam (océan Pacifique), mais aussi de Parkinson en Amérique et au Canada (Banack *et al.*, 2006 ; Pablo *et al.*, 2009). Cette neurotoxine montre une forte aptitude à la biomagnification dans les chaînes trophiques (Brand *et al.*, 2010; Jonasson *et al.*, 2010) et est retrouvée dans des organismes aquatiques, y compris ceux consommés par l'homme (Lance et al., 2018). Dans une démarche de surveillance sanitaire, les prélèvements ponctuels de phytoplancton pour dénombrement cellulaire ou dosage de toxines ne révèlent pas toujours la contamination du milieu en raison de leur caractère circonstanciel. En effet, il existe une grande variabilité spatio-temporelle à court terme dans la localisation des populations de cyanobactéries. De plus, la densité de cyanobactéries dans l'eau n'est pas proportionnelle au risque de toxicité car certaines espèces produisent des toxines, d'autres non, et au sein d'une même espèce potentiellement productrice coexistent des souches productrices et des souches non productrices. Par contre, la bioaccumulation par les organismes intègre de manière temporelle la biodisponibilité du contaminant. Parmi les différentes espèces présentant des caractéristiques d'organismes sentinelles utilisables en biosurveillance des cyanotoxines, les mollusques bivalves ont été sélectionnés dans le cadre de cette démarche en raison de nos précédentes études ayant mis en évidence une bioaccumulation significative de microcystines et de BMAA chez des bivalves dulcicoles, dont la moule zébrée invasive *D. polymorpha* et la moule native *Anodonta anatina* (Lepoutre et al., 2018 ; unpublished data). Par ailleurs, la fréquence des intoxications animales et humaines est actuellement sous-estimée en raison d'un manque de méthodologies permettant de détecter l'ensemble des cyanotoxines, libres dans les cellules (comme celles détectées actuellement) et liées aux protéines (jamais évaluées mais qui représentent une large proportion des toxines présentes dans les cyanobactéries et dans les organismes accumulateurs). Un des objectifs de ce travail était d'améliorer les méthodologies d'extraction et de détection des microcystines et BMAA totales (libres + liées) chez les bivalves, et de comparer les résultats obtenus avec les mesures de microcystines libres effectuées classiquement par test d'immunodétection ELISA.

Ainsi, il paraît intéressant d'utiliser cette capacité de bioaccumulation des bivalves dans le but de déterminer les risques potentiels de contamination biologique ce qui permettrait de traduire l'écodynamique des protozoaires et des cyanotoxines, ainsi que le risque potentiel de transfert vis-à-vis des organismes supérieurs.

## 1. Matériels et méthodes

### 1.1 Transplantation des dreissènes sur les sites d'étude et retour au laboratoire

Les dreissènes utilisées dans le cadre de cette étude sont issues d'une même population provenant d'un site référence (lac du Der - 51), qui est suivie depuis plusieurs années par l'UMR-I 02 SEBIO dans le cadre des activités de recherche. Après avoir été calibrées en laboratoire et réparties en différents lots ou cages de 200 individus, les dreissènes ont été transplantées sur trois sites ateliers le long de l'axe Seine suivant un gradient amont-aval : Marnay-sur-Seine, Bougival et Triel-sur Seine (Figure 1). Deux campagnes de transplantation ont été réalisées au cours de l'année 2016, prenant en considération des régimes hydrologiques différents :

> **une campagne de « hautes eaux »** avec la transplantation des dreissènes sur les sites d'étude durant 3 semaines (mai 2016) et 13 semaines (juillet 2016) ; l'évènement de crue de la Seine nous ayant contraint à reporter la seconde récupération des dreissènes, initialement programmée après 8 semaines, en raison de l'inaccessibilité des sites d'étude.

> **une campagne de « basses eaux »** avec la transplantation des dreissènes sur les sites d'étude durant 3 semaines (octobre 2016) et 7 semaines (décembre 2016).

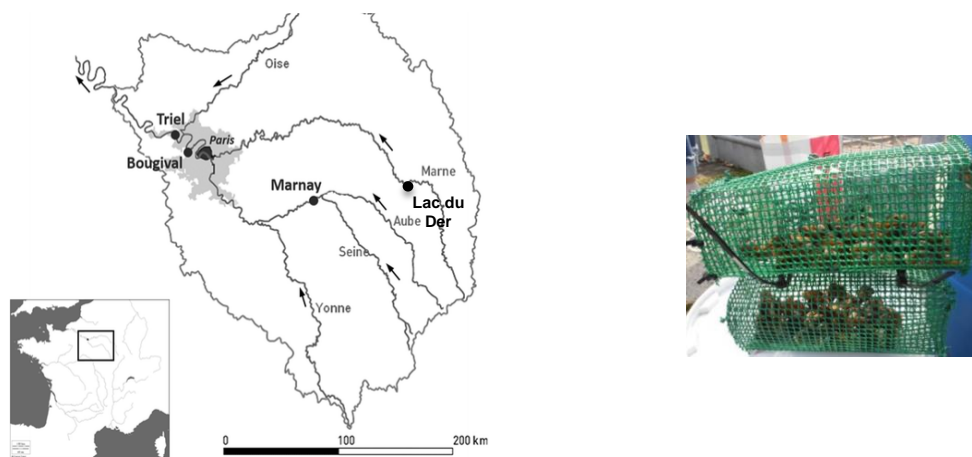


Figure 1. Cartographie des sites d'étude (Marnay-sur-Seine, Bougival, Triel-sur-Seine et site référence : lac du Der) et dispositif d'encagement des dreissènes.

À chaque point/site de prélèvement, les paramètres physico-chimiques de l'eau (nitrite, nitrate, ammonium, DBO, DCO, MES, pH, O<sub>2</sub>, température, conductivité) ont été mesurés (données non présentées).

Les dreissènes sont rapportées au laboratoire et stabulées dans l'eau du site sous oxygénation et en chambre thermostatée, jusqu'au traitement des échantillons biologiques le lendemain pour la mesure du taux de mortalité des dreissènes dans les cages et de l'indice de condition des individus (IC = poids tissus mous / poids individu entier, N=20) et pour la détection des protozoaires et des cyanotoxines dans les tissus mous des dreissènes (N=10).

## 1.2 Analyse des échantillons biologiques

### 1.2.1. Détection des protozoaires dans les tissus de *D. polymorpha*

L'analyse des protozoaires dans les tissus mous des dreissènes a été réalisée à l'heure actuelle sur la première campagne de prélèvement de « hautes eaux ». Les tissus mous de 10 dreissènes par site ont été prélevés dans le but de mesurer une éventuelle bioaccumulation en parasites protozoaires (*T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis*). La détection des protozoaires dans les tissus de dreissène est réalisée par biologie moléculaire. Dans un premier temps les tissus sont broyés dans de la trypsine 1x puis les échantillons sont incubés 1h30 à 37°C sous agitation. L'ADN est extrait grâce au kit FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals). Les oocystes des protozoaires sont recherchés et quantifiés par PCR en temps réel (TaqMan) en ciblant pour *Toxoplasma gondii*, un fragment de 529 pb répété plus de 200 fois dans le génome de *T. gondii* (Reischl et al., 2003), pour *Cryptosporidium parvum*, un fragment de 452 pb spécifique de la séquence génomique de *C. parvum* (Fontaine et Guillot, 2002) et pour *Giardia duodenalis* un fragment d'une petite sous-unité ribosomique (like-16S) (Verweij et al., 2003).

### 1.2.2. Quantification des cyanotoxines microcystines et BMAA dans les tissus de *D. polymorpha*

Les microcystines accumulées sous forme totales (libres et liées aux protéines) dans les tissus ont été extraites sur tissus lyophilisés grâce à l'optimisation d'une procédure d'hydrolyse (oxydation de Lemieux) sur la base de précédents travaux (Lance et al., 2010a ; Neffling et al., 2010). L'oxydation des microcystines (coupure sur le groupement Adda) produit une molécule, l'acide 3-méthoxy-2-méthyl-4-phénylbutyrique MMPB, dosée par Chromatographie Liquide couplée à Spectrométrie de Masse en tandem (LC-MS/MS). La caractérisation de la méthode a été menée en utilisant des matrices de bivalves saines dopées avec des étalons de microcystines et de MMPB afin de déterminer l'efficacité d'hydrolyse (% de transformation des

microcystines en MMPB) et l'efficacité d'extraction du MMPB, en fonction de l'utilisation de différents solvants et méthodes d'extraction (extraction sur cartouches ou liquide-liquide). Après optimisation de la méthode, les Limites de Détection (LD) et de Quantification (LQ) ont été déterminées. Les microcystines libres ont été dosées par méthode d'immuno-détection Elisa après une extraction classique au méthanol.

Les teneurs en BMAA totales ont également été évaluées dans le cadre d'une collaboration avec un laboratoire Neerlandais. La BMAA totale est extraite grâce à une hydrolyse (HCl 6M) des tissus, puis quantifiée par LC-MS/MS. La caractérisation de la méthode a été menée en utilisant des matrices de bivalves saines dopées avec des étalons de BMAA afin de déterminer l'efficacité d'extraction.

## 2. Résultats et discussion

### 2.1 Mesure de l'indice de condition

La figure 2 représente l'indice de condition moyen ( $\pm$  écart-type) des dreissènes après transplantation sur les trois sites d'étude lors des campagnes de hautes et basses eaux. De manière générale, aucun effet du site d'étude n'a été constaté sur l'indice de condition mais un effet de la « saison » (ou temps de transplantation), signifiant que, par temps de transplantation, les dreissènes sur les trois sites d'étude seraient à des stades physiologiques similaires. La diminution de l'indice de condition des dreissènes après 13 semaines de transplantation lors de la campagne de hautes eaux (juillet 2016) traduirait l'émission des gamètes dans le milieu externe où a lieu la fécondation, et généralement un épuisement des ressources énergétiques, en comparaison des indices mesurés après trois semaines (mai 2016). Lors de la campagne de basses eaux, l'augmentation de l'indice de condition des dreissènes après 7 semaines (décembre 2016) traduirait une reprise de la gamétogénèse, avec une variabilité inter-individuelle plus importante qu'aux autres dates, et notamment en comparaison de novembre 2016 où les dreissènes sont en stade de repos sexuel pour la reconstitution des réserves énergétiques.

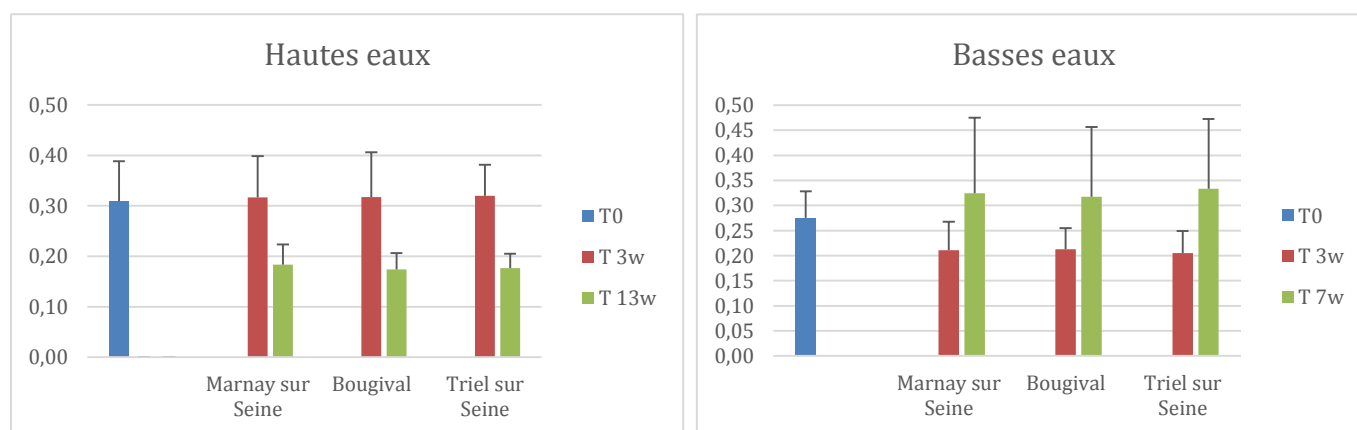


Figure 2. Indices de condition de *Dreissena polymorpha* ( $N=20$ ) mesurés lors des campagnes de hautes eaux (après 3 et 13 semaines de transplantation) et de basses eaux (après 3 et 7 semaines de transplantation) au niveau des sites de Marnay-sur-Seine, Bougival et Triel-sur-Seine, ainsi que sur le site référence du lac du der ( $T_0$ ).

### 2.2 Détection des protozoaires dans les tissus de *D. polymorpha*

Une étudiante de Master 2 (Mme Sarah JEAN) a été recrutée sur la période janvier-juin 2018 afin de traiter les échantillons de bivalves pour la détection des protozoaires.

Durant la période de hautes eaux *T. gondii* a été détecté au sein des tissus de dreissène au niveau des trois sites d'étude et pour les deux temps d'encagement (Figure 3). Ainsi, après 3 et 13 semaines d'encagement, *T.*

*gondii* a été retrouvé respectivement dans 8/10 et 4/10 dreissènes engagées à Marnay-sur-Seine, 8/10 et 2/10 dreissènes engagées à Bougival, 3/10 et 6/10 engagées à Triel-sur-Seine.

Durant la période de basses eaux, *T. gondii* a été retrouvé dans une dreissène sur dix à Bougival pour les deux durées d'engagement (3 et 7 semaines), et à Triel avec une dreissène positive sur dix à T3, et deux dreissènes positives sur dix à T7. *G. duodenalis* n'a été retrouvé que dans une dreissène sur dix à T3 à Bougival.

*C. parvum* n'a été retrouvé dans aucun des échantillons.

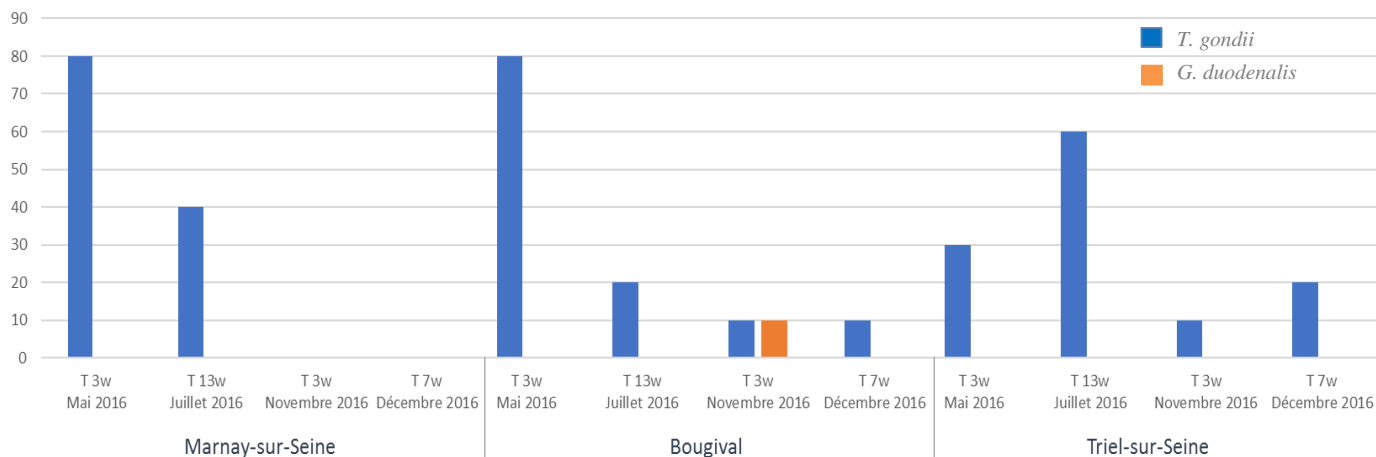


Figure 3. Pourcentage de dreissènes positives à *T. gondii* ou *G. duodenalis* (N=10) lors des campagnes de hautes eaux (après 3 et 13 semaines de transplantation - Mai et juillet 2016) et de basses eaux (après 3 et 7 semaines de transplantation - Novembre et décembre 2016) sur les sites de Marnay-sur-Seine, Bougival et Triel-sur-Seine.

Bien que moins documentée que pour la détection de *C. parvum* et *G. duodenalis*, la capacité de la dreissène à accumuler *T. gondii* lors d'expérimentations *in situ* a précédemment été observée lors d'engagement sur différents cours d'eau (Kerambrun et al. 2016), ainsi qu'une absence de stress des individus durant la période d'engagement. La présente étude conforte ces observations avec une détection bien plus importante pour ce protozoaire par rapport à *G. duodenalis*, qui n'a été détecté que dans une dreissène, et *C. parvum* qui n'a pas été mis en évidence. De plus, la contamination des eaux par *T. gondii* semble être observée aussi bien dans un milieu rural (Marnay-sur-Seine) que dans un milieu urbain (Bougival et Triel). Les félinés sont les hôtes définitifs pour *T. gondii*. Or l'abondance des félinés (chats domestiques) est corrélée positivement avec le nombre de fermes et également avec la forte anthropisation, paramètres qui peuvent expliquer les résultats obtenus.

Selon nos résultats, la contamination des eaux par *T. gondii* semble plus importante durant la période de hautes eaux par rapport à la période de basses eaux. Cette différence de contamination pourrait être expliquée par la saisonnalité des contaminations des eaux par les protozoaires. En effet, il a été mis en évidence une augmentation de la contamination des eaux lors des épisodes de fortes pluies et de crues (Wilkes et al. 2009).

Une très faible (*G. duodenalis*) et absence (*C. parvum*) de contamination a été observée pour les deux autres protozoaires recherchés. Or, de précédentes études ont montré la capacité d'accumulation des kystes et oocystes de ces parasites par la dreissène (Graczyk et al. 2001, Graczyk et al., 2003 ; Palos Ladeiro et al. 2014). Ainsi, les résultats observés pourraient indiquer une absence de contamination des eaux par ces deux protozoaires durant les périodes d'engagement de la présente étude.

### 2.3 Quantification des cyanotoxines microcystines (libres et totales) chez *D. polymorpha*

Le dosage des microcystines libres dans les tissus de la dreissène montre une accumulation principalement au mois de mai 2016 dans les trois sites, avec une teneur maximale de 3.22 ng g<sup>-1</sup> poids sec sur le site de Bougival (Figure 4). Des microcystines sont également retrouvées en novembre chez les bivalves de Marnay et de Triel, mais à des concentrations proches de la limite de détection de la méthode d'immuno-détection Elisa.

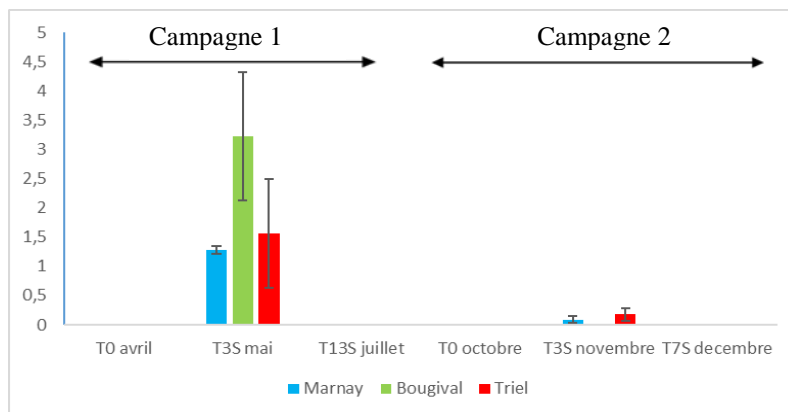


Figure 4. Accumulation de microcystines libres (ng g<sup>-1</sup> poids sec) chez *D. polymorpha* lors des deux campagnes d'encagement de 2016 sur les sites de Marnay-sur-Seine, Bougival et Triel-sur-Seine.

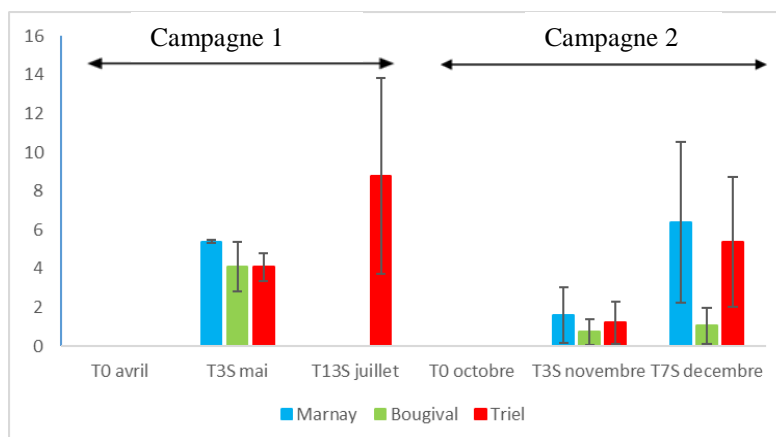


Figure 5. Accumulation de microcystines totales (libres et liées aux protéines) (ng g<sup>-1</sup> poids sec) chez *D. polymorpha* lors des deux campagnes d'encagement de 2016 sur les sites de Marnay-sur-Seine, Bougival et Triel-sur-Seine.

L'efficacité d'hydrolyse des microcystines totales est d'en moyenne 39% et l'efficacité d'extraction du MMPB obtenus dans les tissus de 86%. Les résultats montrent une accumulation de microcystines totales à 3 semaines d'encagement pour les deux campagnes. Les valeurs d'accumulation sont globalement plus importantes lors de la campagne 1 versus campagne 2 mais les différences ne sont pas significatives. La concentration maximale de microcystines totales atteint 8.77 ng g<sup>-1</sup> poids sec en juillet à Triel pour la campagne 1, et 6.41 ng g<sup>-1</sup> poids sec en décembre à Marnay pour la campagne 2. Les concentrations de microcystines totales sont supérieures à celles de microcystines libres pour tous les mois d'exposition. Ces données de toxines totales permettent de mettre en évidence une contamination du milieu en juillet et en décembre, non révélée par le dosage des toxines libres. Après ingestion de cyanobactéries, les microcystines sont rapidement accumulées sous forme libre dans les cellules, forme éliminée par les systèmes de biotransformation impliquant les glutathion-S-transférase. Ainsi, les cinétiques de contamination par les microcystines libres montrent des détoxications rapides de l'ordre de la semaine et reflètent la contamination

du milieu à court terme (Lance et al., 2006, 2008). Par contre, une part des microcystines se lieent aux protéines de manière covalente et ne sont probablement éliminées que lors du turn over naturel de ces dernières, reflétant des contaminations plus anciennes (Lance et al., 2010a). Ainsi les teneurs en toxines libres et liées dans les tissus de la dreissène au 16 novembre 2016 montrent que des cyanobactéries ont été présentes dans les 3 sites de Marnay, Bougival et Triel lors des 2 premières semaines de novembre. En revanche, au 13 décembre, seules des microcystines totales sont relevées dans les tissus, à de plus fortes teneurs à Marnay et Triel qu'à Bougival et à des plus fortes teneurs qu'en novembre pour ces deux sites, suggérant une contamination du milieu par les cyanobactéries ayant eu lieu entre le 16 novembre et le tout début du mois de décembre uniquement.

Globalement, ces valeurs d'accumulation restent de l'ordre du  $\text{ng g}^{-1}$  poids sec et sont donc modérées par rapport aux teneurs reportées dans la littérature, allant jusqu'à plusieurs dizaines de  $\mu\text{g g}^{-1}$  poids sec. Ces résultats montrent donc la présence de cyanobactéries productrices de microcystines dans tous les sites aux mois de mai, novembre et décembre, et uniquement à Triel en juillet 2016. Cependant, les densités de cyanobactéries dans la colonne d'eau ont probablement été limitées, sans phénomène de prolifération intense (bloom). Ces résultats sont cohérents avec l'hydrologie de ces sites. En effet, les forts débits de la Seine limitent les développements intenses des cyanobactéries comme on peut les observer en milieux stagnants. Ces résultats montrent l'intérêt de l'utilisation d'organismes intégrateurs pour révéler la présence de toxines présentes en faibles concentrations dans un milieu courant comme la Seine, et l'intérêt de prendre en compte les deux fractions de toxines accumulées pour une analyse temporelle plus fine.

Les résultats d'accumulation de la neurotoxine BMAA chez les moules engagées lors des deux campagnes de terrain 2016 seront disponibles au premier semestre 2019.

Le caractère intégratif de la contamination du milieu chez le bivalve *D. polymorpha* associé à une certaine résistance aux cyanotoxines et à une facilité d'utilisation *in situ* (approches actives basées sur la transplantation d'organismes), constituent des critères forts pour son utilisation dans le cadre d'une biosurveillance du risque cyanotoxines dans les eaux douces, permettant la mise en évidence de cyanobactéries productrices de toxines lorsque cette présence ne peut être détectée dans le cadre de mesures ponctuelles dans les écosystèmes aquatiques. Cependant, nous avons observé une variabilité inter-individuelle dans les capacités de bioaccumulation de la dreissène, avec une moyenne d'un individu positif aux microcystines sur 3, en lien avec sa capacité particulièrement développée à excréter les cyanotoxines comparé à d'autres espèces de bivalves (Contardo Jara et al., 2015). Suite à un développement en laboratoire et *in situ*, un autre modèle de bivalve (*Anodonta anatina*) ayant des capacités de bioaccumulation des cyanotoxines importantes (démontrées dans le cadre d'un doctorat 2015-2018, A. Lepoutre, Univ Reims), est actuellement testé lors de la campagne 2018. De plus, cette espèce est inféodée aux sédiments en milieu naturel et peut potentiellement être utilisée dans les colonnes d'eau peu profondes et vaseuses dans lesquelles la dreissène ne survit pas. L'intégration de ce second modèle dans le projet semblait donc intéressante en vue d'une comparaison de la pertinence des deux bivalves comme organismes sentinelles capables d'intégrer de manière temporelle la biodisponibilité des toxines dans le milieu et de révéler les niveaux de contamination de la Seine.

Le bivalve *A. anatina* a été déployé dans la Seine, à Paris quai de Conti, entre juin et novembre 2018, période de prolifération des cyanobactéries. Les premiers résultats montrent une accumulation de microcystines libres dans les tissus de l'anodonte en août et en septembre 2018, avec des teneurs comprises entre 60 et 140  $\text{ng g}^{-1}$  poids sec (Figure 6). Ces valeurs restent modérées et témoignent d'une présence de cyanobactéries dans le milieu à des densités limitées, ne présentant pas de risques pour la santé animale ou humaine. Ces concentrations en microcystines libres observées en 2018 dans les tissus du bivalve *A. anatina* sont cependant plus fortes que celles observées en 2016 chez le bivalve *D. polymorpha* (teneur maximale de 3.22  $\text{ng g}^{-1}$  poids sec sur le site de Bougival en 2016), démontrant un développement plus important de cyanobactéries probablement en lien avec la saison considérée (période estivale en 2018 versus printemps et automne 2016).



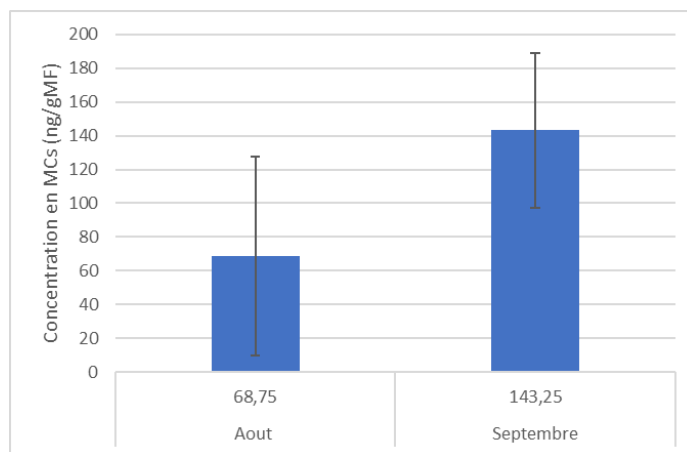


Figure 6. Accumulation de microcystines libres (ng g<sup>-1</sup> poids sec) chez *A. anatina* lors de la campagne d'encagement de 2018 sur le site quai de Conti, Paris (premiers résultats)

Le dosage des microcystines totales dans les tissus de la glande digestive sont en cours de réalisation. Un dosage des toxines dans l'eau a également été réalisé. Les résultats complémentaires (mois d'octobre et novembre) seront disponibles en fin d'année 2018.

### 3. Perspectives

Une troisième campagne de transplantation est en cours le long de l'axe Seine (Marnay-sur-Seine, Bougival et Triel-sur Seine). Ainsi des dreissènes ont été engagées au niveau des trois sites en septembre 2018, pour une durée de 3 et 8 semaines. Différentes analyses seront effectuées : mesure de la mortalité et de l'indice de condition des bivalves, recherche de contaminants chimiques et biologiques (protozoaires et cyanotoxines) dans les tissus des dreissènes ainsi que dans l'eau des sites, mesure de paramètres de cytotoxicité, d'immunotoxicité et de génotoxicité autour des hémocytes de la dreissène.

En complément de l'imprégnation des dreissènes en organismes pathogènes et de la mesure des effets toxiques, des intégrateurs passifs (de type POCIS) de contaminants organiques dans la colonne d'eau ont été disposés durant les trois premières semaines des campagnes de terrain sur les trois sites d'étude.

### Bibliographie

- Banack, S.A., *et al.* (2006). Neurotoxic flying foxes as dietary items for the Chamorro people, Marianas Islands. *J. Ethnopharmacol.*, 106, 97–104.
- Borowski, H., Thompson, R.C.A., Armstrong, T., Clode, P.L. (2010). Morphological characterization of *Cryptosporidium parvum* life-cycle stages in an *in vitro* model system. *Parasitology* 137, 13-26.
- Brand, L.E., *et al.* (2010). Cyanobacterial blooms and the occurrence of the neurotoxin, beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA), in South Florida aquatic food webs. *Harmful Algae*, 9, 620-635.
- Castro-Hermida, J.A., González-Warleta, M., Mezo, M. (2015). *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* as pathogenic contaminants of water in Galicia, Spain: The need for safe drinking water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 218, 132-138.
- Chauret, C., Armstrong, N., Fisher, J., Sharma, R., Springthorpe, S., Sattar, S. (1995). Correlating *Cryptosporidium* and *Giardia* with microbial indicators. *American Water Works Association* 87, 76-84.
- Contardo-Jara, V., *et al.*, (2014). Response of antioxidant and biotransformation systems of selected freshwater mussels (*Dreissena polymorpha*, *Anadonta cygnea*, *Unio tumidus*, and *Corbicula javanicus*) to the cyanobacterial neurotoxin  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine. *Toxicol. Env. Chem.* 96, 451-465.
- Figueras, M.J., Borrego, J.J. (2010). New perspectives in monitoring drinking water microbial quality. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7, 4179–4202.

- Fontaine, M., Guillot, E. (2002). Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*. FEMS Microbiology Letters 214, 13-17.
- Jonasson, S., *et al.* (2010). Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure. Proceed. Nation. Acad. Sci. USA. 107(20), 9252-7.
- Gómez-Couso, H., Freire-Santos, F., Martínez-Urtaza, J., García, M., O., Ares-Mazás, M.E. (2003). Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium* oocysts: the need for new quality control standards. International Journal of Food Microbiology 87, 97-105.
- Graczyk, T.K., Marcogliese, D.J., De Lafontaine, Y., Da Silva, A.J., Mhangami-Ruwende, B., Pieniazek, N.J. (2001). *Cryptosporidium parvum* oocysts in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): Evidence from the St. Lawrence River. Parasitology Research 87, 231-234.
- Graczyk, T.K., Conn, D.B., Marcogliese, D.J., Graczyk, H., De Lafontaine, Y. (2003). Accumulation of human waterborne parasites by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*). Parasitology Research 89, 107-112.
- Kerambrun, E., Palos Ladeiro, M., Bigot-Clivot, A., Dedourge-Geffard, O., Dupuis, E., Villena, I., Aubert, D., Geffard, A. (2016). Zebra mussel as a new tool to show evidence of freshwater contamination by waterborne *Toxoplasma gondii*. Journal of Applied Microbiology 120, 498-508.
- Lance, E., *et al.* (2006). Interactions between Cyanobacteria and Gastropods. I. Ingestion of toxic *Planktothrix agardhii* by *Lymnaea stagnalis* and the kinetics of microcystin bioaccumulation and detoxification. Aquat. Toxicol. 79, 140-148.
- Lance, E., *et al.* (2008). Consumption of toxic cyanobacteria by *Potamopyrgus antipodarum* (Gastropoda, Prosobranchia) and consequences on life traits and microcystin accumulation. Harmful Algae 7, 464-472.
- Lance, E., *et al.* (2010a). Accumulation of free and covalently bound microcystins in tissues of *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda) following toxic cyanobacteria or dissolved microcystin-LR exposure. Environ. Pollut. 158, 674-680.
- Lance, E., *et al.* (2010b). Histopathology and microcystin distribution in *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda) following toxic cyanobacteria or dissolved microcystin-LR exposure. Aquat. Toxicol. 98, 211-220.
- Lance, E., Arnich, N., Maignien, T., Biré, R. (2018). Occurrence of  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and Isomers in Aquatic Environments and Aquatic Food Sources for Humans. Toxins 10(2), 83.
- Lepoutre, A., Milliote, N., Bonnard, M., Palos-Ladeiro, M., Rioult, D., Bonnard, I., Bastien, F., Faassen, E., Geffard, A., Lance E. (2018). Genotoxic and cytotoxic effects on the immune cells of the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* exposed to the environmental neurotoxin BMAA. Toxins 10(3), 106.
- Neffling, M.-R., Lance, E., Meriluoto, J. (2010). Detection of free and covalently bound microcystins in animal tissues by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Environmental Pollution 158, 948-952.
- Pachepsky, Y.A., Blaustein, R.A., Whelan, G., Shelton, D.R. (2014). Comparing temperature effects on *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Enterococcus* survival in surface waters. Letters in Applied Microbiology 59, 278-283.
- Palos Ladeiro, M., Aubert, D., Villena, I., Geffard, A., Bigot, A. (2014). Bioaccumulation of human waterborne protozoa by zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): Interest for water biomonitoring. Water Research 48, 148-155.
- Palos Ladeiro, M., Bigot-Clivot, A., Aubert, D., Villena, I., Geffard, A. (2015). Assessment of *Toxoplasma gondii* levels in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) by real-time PCR: an organotropism study. Environmental Science and Pollution Research 22, 13693-13701.
- Puschner, B., Humbert, J.F. (2007). Cyanobacterial toxins. In Veterinary Toxicology, Basic and clinical principles. Ed. R. Gupta, Academic Press.
- Reischl, U., Bretagne, S., Krüger, D., Ernault, P., Costa, J.-M. (2003). Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. BMC Infectious Diseases 3, 1-9.
- Verweij, J.J., Schinkel, J., Laeijendecker, D., van Rooyen, M.A.A., van Lieshout, L., Polderman, A.M. (2003). Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. Molecular and Cellular Probes 17, 223-225.

- Wiegand, C., Pflugmacher, S. (2005). Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 201-218.
- Wilkes, Graham, et al. (2009). Seasonal relationships among indicator bacteria, pathogenic bacteria, *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and hydrological indices for surface waters within an agricultural landscape. *Water Research* 43 (8), 2209–2223.