



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Laboratoire Interdisciplinaire des
Environnements Continentaux (LIEC)
UMR 7360 CNRS Université de Lorraine
Metz

Ecole Doctorale Sciences et Ingénieries
Ressources Procédés Produits Environnement
(RP2E) ED 410
Nancy

THESE

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Lorraine
Spécialité : Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes

Marine POTET

**De l'acclimatation à l'adaptation : mécanismes évolutifs,
conséquences populationnelles et implication en biosurveillance**

Soutenue le 21 Décembre 2017 devant la commission d'examen :

Directeurs de thèse :

Laure Giambérini	Professeur	LIEC, UMR CNRS 7360, Université de Lorraine
Simon Devin	Professeur	LIEC, UMR CNRS 7360, Université de Lorraine

Rapporteurs :

Claudia Wiegand	Professeur	ECOBIO, UMR CNRS 6553, Université de Rennes I
Frédéric Silvestre	Professeur associé	Lab. of Evolutionary and Adaptive Physiology, Univ. de Namur

Examineurs :

Elise David	Maître de Conférences	SEBIO, Université de Reims-Champagne Ardenne
Arnaud Chaumot	Chargé de Recherche	Laboratoire d'écotoxicologie, IRSTEA

Membres invités :

Sandrine Pain-Devin	Maître de Conférences	LIEC, UMR CNRS 7360, Université de Lorraine
Olivier Perceval	Chargé de mission	Agence Française pour la Biodiversité

*A mes parents,
pour leur soutien inconditionnel.*

*Et à « SaP »,
parce que je n'ai pas mieux comme « merci ».*

J'avais promis un bilan comptable, le voici...

Je tiens tout d'abord à remercier mes **2** encadrants pour ces **3** années de thèse mémorables. Laure et Simon, merci pour votre confiance, votre disponibilité, votre complémentarité et votre enthousiasme. Vous voyez toujours le verre à moitié plein, quand je le vois à moitié vide, mais je crois que mon pichet de connaissances s'est bien rempli durant ces années à vos côtés. Laure, merci pour ta franchise, ton dynamisme et pour l'attention que tu portes à tes étudiants. Simon, pas de bol ton bureau était plus proche, et je crois que j'en ai pas mal profité ! Merci pour ta bonne humeur, tes moult compétences dans tous les domaines et pour avoir si souvent éclairé ma lanterne. Je n'aurais pas pu t'offrir Trends, mais je crois que c'est mon seul regret sur ces trois ans, donc ça va. Merci surtout de m'avoir confié ce sujet tellement vaste et passionnant. A défaut d'être allée faire un tour en Seine-et-Marne, je me suis sentie comme une Cendrillon dans ses petits souliers.

Il y a aussi une personne à qui je dois un nombre **infini** de « mercis ». Sandrine, même si tu as été « l'encadrante masquée » de ce travail, c'est grâce à toi que j'en suis là, à rédiger ces remerciements. Je ne vais pas énumérer toutes tes qualités ici, ce serait trop long et tu sais tout le bien que je pense de toi. Simplement, merci d'avoir cru en moi (sur un bref entretien téléphonique) et d'avoir fait ressortir le meilleur de moi-même, sans que je m'en rende compte.

J'ai conscience que cette thèse, c'est une part de chance, une part de travail, et de bonnes décisions prises au bon moment. Et si c'était à refaire, je ne changerais absolument rien. Certaines personnes connaissent des moments très difficiles pendant leur thèse, et se demandent pourquoi elles se lèvent le matin. Ça n'a jamais été mon cas, et je pense que c'est grâce à vous. Vous formez un sacré trio, fédérateur, stimulant et bienveillant à la fois. La Team Moules, c'est un peu comme une famille de substitution, et ce n'est pas pour rien qu'entre nous on vous appelle « Papa », « Maman » et « Tata ». Alors merci à tous les trois de m'avoir prise sous vos ailes, et de m'avoir fait grandir, scientifiquement et personnellement.

Je voudrais remercier sincèrement les **5** membres du jury : Claudia Wiegand, Frédéric Silvestre, Elise David, Arnaud Chaumot et Olivier Perceval, pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Pour mes **5 années** passées au sein du LIEC, stages inclus, je tiens à remercier Fabien Thomas et Pascale Bauda pour leur accueil chaleureux.

A la louche, j'ai passé **40 jours** sur le terrain, notamment en compagnie d'une personne. Philippe, merci pour les bons moments que nous avons partagés. Merci pour tes connaissances, tes conseils culinaires et touristiques, pour les discussions plus ou moins profondes et pour les rigolades. Je n'aurais pas réussi à t'emmener au McDo, mais chanter à tue-tête avec toi et Carole dans le camion valait tout l'or du monde.

Après quelques calculs, il semblerait qu'Albert (le Konélab) ait permis la mesure de **29549** biomarqueurs (si si). Merci à Danièle et Carole pour les précieux jours que vous m'avez fait gagner. Danièle, merci pour ta rigueur et ton organisation (qui finissent par être contagieuses, et c'est tant mieux). Merci pour ton implication, merci de ne pas compter tes heures, et surtout, merci de te préoccuper autant des autres.

A **7h**, on peut quand même croiser du monde dans les couloirs. Jean François, merci pour ta bonne humeur et merci pour tous les coups de mains. Les manip seraient beaucoup plus compliquées sans toi et je resterai admirative de tes multiples talents. Nathalie, merci pour ton sourire tôt le matin et pour toutes ces attentions en périodes de fêtes (et en dehors) qui font tellement de bien au moral.

Pour toutes les analyses physico-chimiques (je compte **132 L** de flotte, sans les dosages de nickel en labo), merci à Philippe Rousselle, pour ta gentillesse, pour ton amour de la transmission. Merci pour les sorties astro partagées avec toi, c'était plus que génial. Tu es une personne passionnée et passionnante. J'en profite pour remercier ton voisin de bureau, Etienne. Merci pour ta disponibilité et ta gentillesse.

Je n'ai peut-être pas été la plus guillerette des camarades ces derniers temps, mais un GRAND MERCI à toutes les autres personnes que j'ai côtoyées pour les soirées, les discussions, le soutien, les repas partagés à la cafèt ou ailleurs, ou simplement pour avoir travaillé avec vous ou vous avoir croisé au détour d'un couloir. Aux docs et post-docs : Jennifer, Carole, Fannouille (future doc en cet instant), Evelyne, Papo, Maël, Romain P., Alice, Pierre, Adeline, Andréina, Crocnier, Imad, Emilie, Vincent B., Kevin, Morgane, Anne, Vanessa, David, Romain C., Olivier, Floriane, Albin, Ana, Laetitia. Aux stagiaires : Marc, Antoine, Audrey, Adrien, Eva, Mégane, Cécile et Lucie. Aux autres membres du labo : Quentin, Alex, Michael, Florence, Jean-François M., Sylvie, Delphine, Eric, Davide, Carole C., Vincent F., Vincent R., Elise, Pascal, François R., Marie, François G., Elisabeth, Baba, Béné, Clément B., Maximilien, Jonathan, Christophe, Maryline, Catherine, Valérie, Nathalie K., Alison, Justine, Muriel. Aux inclassables : Faustine, Jonas, Claire et Bastien. Ces remerciements seraient beaucoup trop longs si je devais dire ce qui m'a marqué chez chacun de vous, alors pour me faire pardonner je vous fais à tous une bise platonique ! Ça en fait 69 quand même, ça me demande un effort considérable. Et puis il y a toujours des personnes dont on est un peu plus proches. Elles se reconnaîtront dans les fous rires, les pleurs, les soirées filles, les chansons endiablées, les Student Parties, Fashing, la confection de pizzas, les dougoudous, Guitar Hero, les gossips et j'en passe. Même si nos vies vont diverger, qu'on va peut-être se perdre un peu de vue, il y aura toujours une place pour vous dans mon canap', avec des bières au frais et du sauciflard.

Je suis sincèrement heureuse d'avoir partagé un bout de chemin avec vous tous. Merci d'avoir rendu ce long séjour en Lorraine si agréable. Quand je partirai, ce sera avec beaucoup de nostalgie.

Merci aussi aux copains qui sont loin, ma Bibi, Tillète et Tristan. Ça fait toujours tellement bien de s'installer en terrasse aux pieds des montagnes avec vous !

Il paraît que les thésards ne sont pas toujours faciles à vivre, alors pour m'avoir supportée, merci Dan. Cette thèse aurait été différente si tu n'avais pas été à mes côtés, mais certainement dans le mauvais sens du terme. Donc merci d'être là, et puisqu'il est tombé à point nommé cet album, qu'ils le donnent à d'autres le paradis.

568. C'est le nombre de kilomètres qui m'éloignaient de ma famille. Papa, Maman, merci. Merci d'être des parents géniaux, merci de m'avoir laissé vivre ce projet, même si ça impliquait l'éloignement. Merci de nous avoir toujours fait confiance à Thibault et à moi, et de nous laisser notre liberté « tant qu'on avait des bonnes notes à l'école ». J'admire votre courage et votre persévérance, et je m'en suis inspirée du mieux possible. Bref, je vous aime. J'en profite pour remercier mes mamies, oncles, tantes, cousins et cousines, qui même s'ils ne comprennent pas toujours ce que je fais, sont toujours là pour moi. Ca y est, fini « l'école et les exams » !

Un merci tout spécial aux **2582** moules sacrifiées sur l'autel de la science (sans compter les dommages collatéraux liés au Moulemix...).

Et comme dirait Bon Scott, "That's how it goes, playing in a band..."

Sommaire

Liste des abréviations.....	XIII
Liste des figures	XV
Liste des tableaux	XIX
Liste des publications et communications / Valorisation scientifique.....	XXI
Enseignement et formations	XXIII
Introduction	1
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique – L’utilisation des biomarqueurs en biosurveillance.....	5
Partie I : Evaluation de l’état de santé des écosystèmes aquatiques.....	7
1. Evaluation de l’état chimique : monitoring chimique et notion de biodisponibilité	7
1.1. Détection des contaminants dans le milieu.....	8
1.2. Biodisponibilité et bioaccumulation.....	9
1.3. Lien entre état chimique et effets sur le biote.....	19
2. Evaluation de l’état écologique : bioindication et outils disponibles aux échelles supra-individuelles	22
2.1. Au niveau écosystémique.....	23
2.2. Aux niveaux des communautés et des populations	23
3. Marqueurs au niveau individuel	25
Partie II : Les biomarqueurs au niveau sub-individuel : des outils précoces et intégrateurs de la contamination du milieu	28
1. Définition.....	28
2. Biomarqueurs de défense	29
2.1. Enzymes de biotransformation	29
2.2. Activité MXR	31
2.3. Phosphatase acide.....	31
2.4. Métallothionéines	32
2.5. Protéines de stress	33
2.6. Biomarqueurs de stress oxydant.....	33
3. Biomarqueurs de dommage	36

3.1. Acétylcholinestérase.....	36
3.2. Peroxydation lipidique.....	37
3.3. Activité apoptotique	37
3.4. Dommages à l'ADN.....	38
3.5. Vitellogénine	38
3.6. Activité lysosomale	38
3.7. Marqueurs immunologiques.....	38
3.8. Les dommages cellulaires, tissulaires et aux organes.....	39
4. Le métabolisme énergétique.....	39
4.1. Le système de transport d'électrons mitochondrial	41
4.2. La lactate déshydrogénase	42
5. Les omiques.....	42
6. Intérêt d'une approche multi-marqueurs	43
7. Difficultés d'application des biomarqueurs.....	46
7.1. Facteurs confondants.....	46
7.2. Réponse biphasique	48
7.3. Extrapolation aux niveaux supérieurs.....	49
Partie III : Le phénomène de tolérance aux contaminants : implications en biosurveillance.....	51
1. Définition de la tolérance	51
2. Mécanismes d'acquisition de la tolérance	52
2.1. Acclimatation physiologique.....	52
2.2. Adaptation génétique.....	52
3. Mécanismes de défense impliqués dans la tolérance.....	53
4. Variabilité de la tolérance.....	54
4.1. Variabilité inter-spécifique de la tolérance.....	54
4.2. Variabilité intra-spécifique de la tolérance.....	55
4.3. Tolérance et espèces invasives	55
5. Conséquences de l'acquisition de tolérance	56
5.1. Diminution de la diversité génétique.....	57

5.2. Augmentation de la diversité génétique	58
5.3. Autres conséquences	58
Partie IV : L'utilisation des biomarqueurs dans notre contexte	61
Chapitre 2 : Présentation des organismes et éléments méthodologiques	65
Partie I : Les dreissenidés comme organismes sentinelles	67
1. Systématique	67
2. Origine, historique et répartition géographique.....	68
2.1. En Europe.....	68
2.2. En Amérique du Nord	70
3. Densités des populations et inversion de la dominance.....	71
4. Morphologie et Anatomie.....	72
4.1. Morphologie	72
4.2. Anatomie	74
4.3. Différenciation des deux espèces	76
5. Physiologie	77
5.1. Filtration et alimentation	77
5.2. Circulation et respiration	78
5.3. Système immunitaire et hémocytes	78
5.4. Système lysosomal	79
5.5. Sécrétion du byssus	80
5.6. Métabolisme énergétique et croissance	81
6. Reproduction et cycle de vie	82
7. Ecologie.....	85
7.1. Facteurs abiotiques	85
7.2. Interactions biotiques.....	92
8. Caractère invasif et rôle fonctionnel dans les écosystèmes	95
9. Synthèse comparative des deux espèces.....	97
10. Intérêt comme organismes sentinelles.....	99
Partie II : Présentation des sites de prélèvement	101

Partie III : Matériel et méthodes.....	107
1. Mesure des paramètres abiotiques sur les sites étudiés	107
1.1. Paramètres physico-chimiques	107
1.2. Contamination sédimentaire.....	112
2. Echantillonnage des organismes et acclimatation aux conditions de laboratoire.....	116
3. Accumulation des contaminants par les organismes	117
4. Biomarqueurs mesurés	117
4.1. Préparation des tissus avant mesure	117
4.2. Biomarqueurs mesurés sur le broyat	118
4.3. Biomarqueurs mesurés sur la fraction cytosolique.....	122
4.4. Autres biomarqueurs	127
Partie IV : Démarche d'analyse des données	131
Chapitre 3 : Variabilité des biomarqueurs <i>in situ</i>.....	135
Partie I : Description du jeu de données.....	137
Partie II : Variabilité temporelle des biomarqueurs.....	139
1. Echelle saisonnière	139
1.1 Chez <i>D. polymorpha</i>	139
1.2 Chez <i>D. r. bugensis</i>	141
2. Echelle journalière (publication n°1).....	143
Partie III : Variabilité inter et intra-spécifique	159
1. Variabilité inter-spécifique.....	159
2. Variabilité intra-spécifique (inter-populations).....	161
3. Variabilité intra-spécifique, intra-site : le cas des « Big Zebra » de Condé-sur-l'Escaut.....	163
Partie III : Réponses des biomarqueurs au regard de la contamination des sites	167
1. Caractérisation de la contamination des sites	167
2. Caractérisation de la physico-chimie des sites étudiés	169
3. Bioaccumulation des contaminants <i>in situ</i>	170
4. Caractérisation des réponses biologiques.....	171
4.1. La contamination des sédiments expliquée par les biomarqueurs.....	172

4.2. La bioaccumulation expliquée par les biomarqueurs	175
4.3. La contamination des sédiments expliquée par la bioaccumulation.....	175
Partie IV : Conclusion	177
Chapitre 4 : Tolérance et mécanismes d'acclimatation ou d'adaptation des organismes	181
Partie I : Comparaison inter-spécifique de la modulation des réponses des biomarqueurs en conditions de stress croisé (publication n°2).....	183
Partie II : Différences inter-populationnelles et inter-spécifiques en terme de tolérance au stress (publication n°3).....	197
Partie II. Tolérance à un stress aigu (publication n°4)	221
Partie III : Le rôle du système MXR dans la tolérance des organismes	243
1. Expérimentation LT ₅₀ -MXR.....	243
1.1. Valeurs de LT ₅₀ obtenues	243
1.2. Accumulation du Ni dans les tissus mous	244
1.3. Réponses des biomarqueurs	245
2. Discussion et conclusion	246
Chapitre 5 : Etude intégrée de toutes les données acquises	249
Partie I : Effort de prélèvement des organismes.....	251
Partie II : Réponses observées sur le terrain et en laboratoire.....	253
1. Description des réponses	253
2. Typologie des sites et relations entre réponses biologiques	257
2.1. Relations entre biomarqueurs chez <i>D. polymorpha</i>	258
2.2. Relations entre biomarqueurs chez <i>D. r. bugensis</i>	260
3. Conclusion sur les relations entre biomarqueurs	261
Partie III : Variabilité des biomarqueurs observée <i>in situ</i> et en conditions stressantes	263
1. Variabilité des biomarqueurs chez <i>D. polymorpha</i>	263
2. Variabilité des biomarqueurs chez <i>D. r. bugensis</i>	266
Partie IV : Discussion autour de l'exploration des données	269
Chapitre 6 : Discussion générale	273
Partie I : Que faire de la variabilité naturelle des biomarqueurs ?	275

Partie II : Comment se comportent les deux espèces dans le milieu naturel et en réaction à un/des stress ?	281
Partie III : Peut-on, à l'heure actuelle, utiliser les biomarqueurs chez ces espèces dans un contexte de surveillance des milieux ?	287
Conclusion générale et perspectives.....	289
Bibliographie.....	293
Annexes	327
Résumé en anglais	337
Résumé en français.....	338

Liste des abréviations

AChE	Acétylcholinestérase
ACP	Phosphatase acide (Acid Phosphatase en anglais)
ACP	Analyses en Composantes Principales
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
CAT	Catalase
CEn	Concentration entraînant un Effet pour n% de la population
Chol	Cholestérol
CLn	Concentration Létale pour n% de la population
Csp	Caspases
CYP450	Cytochrome P450
DBO	Demande Biochimique en Oxygène
DCE	Directive Cadre sur l'Eau (WFD pour Water Framework Directive en anglais)
DCSMM	Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (MSFD pour Marine Strategy Framework Directive en anglais)
DEB	Dynamic Energy Budget
ERA	Environmental/Ecological Risk Assessment
EROD	Ethoxyrésorufine-O-dééthylase
ETS	Système de transport d'électrons mitochondrial (Electron Transport System en anglais)
GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-transférase
HAP	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
HSP	Heat Shock Protein
IBR	Integrated Biomarker Response
IC	Indice de Condition
LDA	Linear Discriminant Analysis
LDH	Lactate déshydrogénase
LOOH	Hydroperoxydes lipidiques
LPO	Lipoperoxydation (= peroxydation lipidique)
LTn ou TLn	Lethal Time (= Temps Létal pour n% de la population)
MT	Metallothionéines
MXR	Résistance multixénobiotique (Multixenobiotic Resistance)
NQE	Normes de Qualité Environnementale (EQS pour Environmental Quality Standard en anglais)

PCB	Polychlorobiphényles
PEC	Predicted Environmental Concentration
P-gp	P-glycoprotéine
pH	Potentiel hydrogène
PLS	Partial Least Squares
PLSDA	Partial Least Square Discriminant Analysis
PNEC	Predicted No Effect Concentration
Prot	Protéines
ProtB	Concentration en protéines dans le broyat
ProtFC	Concentration en protéines dans la fraction cytosolique
QM	Moule quagga (Quagga Mussel), <i>Dreissena rostriformis bugensis</i>
ROS	Espèces reactive de l'oxygène (Reactive Oxygen Species en anglais)
SfG	Allocation énergétique à la croissance et la reproduction (Scope for Growth en anglais)
SOD	Superoxyde dismutase
SSD	Species Sensitivity Distributions
TAC	Capacité antioxydante totale (Total Antioxydant Capacity en anglais)
Tri	Triglycérides
VIP	Variable Importance in the Projection
VTG	Vitellogénine
WoE	Weight of Evidence
ZM	Moule zébrée (Zebra Mussel), <i>Dreissena polymorpha</i>

Liste des figures

Figure 1 : Facteurs influençant la biodisponibilité et la bioaccumulation d'un contaminant (d'après Férard et Blaise, 2013)	13
Figure 2 : Evaluation des effets des contaminants à différents niveaux d'organisation biologique (d'après Amiard et al., 1998)	22
Figure 3 : Effets des contaminants à différents niveaux d'organisation et leur durée (d'après Chapman et al., 1996).....	25
Figure 4 : Mécanismes de biotransformation des xénobiotiques cellulaires - Rôle de la GST.....	30
Figure 5 : Voies métaboliques de l'oxygène, d'après (Lushchak, 2011).....	34
Figure 6 : Principaux systèmes antioxydants chez les organismes aquatiques (d'après Lushchak, 2011).....	35
Figure 7 : Biomarqueurs en lien avec le métabolisme énergétique selon le niveau d'organisation biologique (d'après Durou et al., 2008)	41
Figure 8 : Représentation schématique de l'effet d'un polluant sur les différents biomarqueurs mesurés au niveau sub-cellulaire	46
Figure 9 : Réponse biphasique (d'après Férard et Blaise, 2013)	49
Figure 10 : Profils de réponses généralisés des différents types de biomarqueurs à un stress d'intensité croissante (d'après Dagnino et al., 2007; Férard et Blaise, 2013).....	54
Figure 11 : Liens entre contamination, variabilité génétique, tolérance et conséquences sur les communautés (d'après Weis, 2011).....	57
Figure 12 : Systématique des espèces du genre <i>Dreissena</i>	67
Figure 13 : Répartition et expansion de <i>D. polymorpha</i> et <i>D. r. bugensis</i> en Europe (d'après Morton, 1993 ; van der Velde et al., 2010)	69
Figure 14 : Carte des grands lacs (a) et répartition de <i>D. polymorpha</i> (b) et <i>D. r. bugensis</i> (c) en Amérique du Nord (https://nas.er.usgs.gov consulté le 2.10.17)	71
Figure 15 : Caractéristiques morphologiques de <i>D. polymorpha</i> (à gauche) et <i>D. r. bugensis</i> (à droite) (d'après Claudi et Mackie, 1994).....	73
Figure 16 : Différents morphotypes de <i>D. polymorpha</i> (en haut) et <i>D. r. bugensis</i> (en bas) observés lors des campagnes de prélèvements.....	74
Figure 17 : Vue de la région postérieure du manteau et des siphons, d'après Smith (1999).....	75
Figure 18 : Schéma (A) et photographie (B, crédit photo : D. Coacolo) montrant la localisation des principaux organes internes de <i>D. polymorpha</i> (d'après Claudi et Mackie, 1994).....	76
Figure 19 : Cycle de reproduction de la dreissène d'après Ackerman (1994) ; Claudi et Mackie (1994)	84
Figure 20 : Localisation des sites de prélèvement des dreissènes.....	102
Figure 21: Décomposition de l'azote organique dans les milieux aquatiques	108

Figure 22 : Echantillonnage sur le terrain.....	116
Figure 23 : Spectrophotomètre automatisé Konélab 20XTi.....	118
Figure 24 : Différentes étapes de la mesure de l'activité de filtration.....	127
Figure 25 : Représentation schématique de la mesure de l'activité MXR.....	128
Figure 26 : Mesures pour le calcul de l'indice de condition (© Florian Lamousse).....	129
Figure 27 : Variabilité temporelle des biomarqueurs chez <i>D. polymorpha</i> pour les 4 dates d'échantillonnage pour les sites de Montigny, Nantua, Riaucourt, Scey et St Mihiel.....	140
Figure 28 : Variabilité temporelle des biomarqueurs chez <i>D. polymorpha</i> pour 3 dates d'échantillonnage (octobre 2015, avril 2016, février 2017) pour les sites de Condé, Madine, Montigny, Nantua, Oise, Riaucourt, Scey, St Mihiel.....	141
Figure 29 : Variabilité temporelle des biomarqueurs chez <i>D. r. bugensis</i> pour 3 dates d'échantillonnage (avril 2015, octobre 2015, avril 2016) pour les sites de Seurre et St Mihiel	142
Figure 30 : Plans factoriels de trois analyses de co-inertie des ACP individus x biomarqueurs réalisées pour <i>D. r. bugensis</i> en octobre 2015, avril 2016 et février 2017.....	143
Figure 31 : Variabilité inter-spécifique des biomarqueurs pour les populations des deux espèces échantillonnées en avril 2016 et février 2017	159
Figure 32 : Variabilité inter-spécifique des biomarqueurs pour les 3 stations où les deux espèces sont présentes en sympatrie échantillonnées en avril 2016.....	160
Figure 33 : Variabilité inter-spécifique des biomarqueurs pour les 4 stations où les deux espèces sont présentes en sympatrie échantillonnées en février 2017	161
Figure 34 : Variabilité inter-populationnelle des biomarqueurs pour les populations de <i>D.</i> <i>polymorpha</i> échantillonnées en octobre 2015 et février 2017	162
Figure 35 : Variabilité inter-populationnelle des biomarqueurs pour les populations de <i>D. r. bugensis</i> échantillonnées en octobre 2015 et février 2017	163
Figure 36 : Deux morphotypes de <i>D. polymorpha</i> présents sur le site de Condé-sur-l'Escaut.....	163
Figure 37 : Variabilité intra-site des biomarqueurs pour les deux morphotypes de <i>D. polymorpha</i> de taille standard (ZM) et élevée (BZM) échantillonnés en octobre 2015, avril 2016 et février 2017 sur le site de Condé-sur-l'Escaut	164
Figure 38 : Indices de condition (IC) et volumes de coquilles (Vol. coq.) pour les deux morphotypes de <i>D. polymorpha</i> de taille standard (ZM) et élevée (BZM) échantillonnés en octobre 2015, avril 2016 et février 2017 sur le site de Condé-sur-l'Escaut.....	165
Figure 39 : Résultats de l'ACP du tableau de contamination des sédiments pour les 29 contaminants mesurés pour 12 sites x 2 saisons (octobre 2015 : Oct.15 ; février 2017 : Fev.17), sauf pour le site Montigny – Canal de Metz analysé uniquement en février 2017	169
Figure 40 : Résultats de l'ACP du tableau de physico-chimie de la colonne d'eau pour les 20 paramètres mesurés pour 12 sites x 2 saisons (octobre 2015 : Oct.15 ; février 2017 : Fev.17), sauf pour le site Montigny – Canal de Metz analysé uniquement en février 2017	170

Figure 41 : Résultats de l'ACP du tableau de physico-chimie de la colonne d'eau pour les 20 paramètres mesurés pour 12 sites x 3 saisons, plus le site de Montigny – Canal de Metz analysé uniquement en avril 2016 et février 2017.....	170
Figure 42 : Résultats de l'ACP sur les données de bioaccumulation par les organismes (15 stations x 28 contaminants) pour février 2017.....	171
Figure 43 : LT_{50} obtenues pour les deux espèces soumises à une exposition au Ni seul (Ni) ou au Ni + Vérapamil (Ni-Ver), exprimées en moyenne $\pm$ écart type	244
Figure 44 : Concentration en Ni dans les tissus mous (moyenne $\pm$ écart type, $n = 3$) pour les différentes conditions expérimentales	245
Figure 45 : ACP représentant les réponses des biomarqueurs chez les organismes exposés aux différentes conditions expérimentales (LT_{50} -MXR)	246
Figure 46 : ACP représentant la variabilité des réponses des biomarqueurs en condition terrain (Terrain), pour les témoins utilisés en laboratoire (Témoin) et pour les organismes exposés à un stress en laboratoire (Stress), chez <i>D. polymorpha</i> (ZM) et <i>D. r. bugensis</i> (QM), toutes populations confondues.....	254
Figure 47 : ACP représentant la variabilité des réponses des biomarqueurs en condition terrain (Terrain), pour les témoins utilisés en laboratoire (Témoin) et pour les organismes exposés à un stress en laboratoire (Stress), chez <i>D. polymorpha</i> (ZM) et <i>D. r. bugensis</i> (QM), pour les populations de Montigny – Canal de Jouy uniquement.....	255
Figure 48 : ACP représentant la variabilité des réponses des biomarqueurs en condition terrain (Terrain), pour les témoins utilisés en laboratoire (Témoin) et pour les organismes exposés à un stress en laboratoire (Stress), chez <i>D. polymorpha</i> (ZM) et <i>D. r. bugensis</i> (QM), pour les populations de Saint Mihiel uniquement.....	256
Figure 49 : Corrélations entre les réponses des biomarqueurs pour l'ensemble des individus de <i>D. polymorpha</i>	258
Figure 50 : Corrélations entre les réponses des biomarqueurs pour les individus de <i>D. polymorpha</i> non-stressés sur le terrain (a), stressés sur le terrain (b), témoins en laboratoire (c) et stressés en laboratoire (d)	259
Figure 51 : Corrélations entre les réponses des biomarqueurs pour l'ensemble des individus de <i>D. r. bugensis</i>	260
Figure 52 : Corrélations entre les réponses des biomarqueurs pour les individus de <i>D. r. bugensis</i> non-stressés sur le terrain (a), stressés sur le terrain (b), témoins en laboratoire (c) et stressés en laboratoire (d)	261
Figure 53 : Plots représentant la variabilité observable in situ lors des différentes campagnes de prélèvements (en vert) et la variabilité potentielle observée en laboratoire (en rouge) pour les différents biomarqueurs	265

Figure 54 : Plots représentant la variabilité observable in situ lors des différentes campagnes de prélèvements (en vert) et la variabilité potentielle observée en laboratoire (en rouge) pour les différents biomarqueurs	268
Figure 55 : Réponses de 3 populations de bivalves A, B et C présentant des capacités de tolérance différentes à un stress	284

Liste des tableaux

Tableau I : Différents outils de monitoring chimique (adapté de Allan et al., 2006a, 2006b).....	12
Tableau II : Principales études portant sur les capacités d'accumulation des deux espèces de dreissènes	17
Tableau III : Utilisation des biomarqueurs en laboratoire chez les dreissènes.....	44
Tableau IV : Application des biomarqueurs chez les dreissènes in situ.....	48
Tableau V : Impacts positifs (+) et négatifs (-) liés à l'invasion par les dreissènes	96
Tableau VI : Synthèse des principales différences entre <i>D. polymorpha</i> et <i>D. r. bugensis</i>	98
Tableau VII : Présentation des sites de prélèvement de dreissènes	102
Tableau VIII : Plan d'échantillonnage des différentes populations de <i>D. polymorpha</i> et <i>D. r. bugensis</i> in situ.....	137
Tableau IX : p-valeurs des différentes analyses de co-inertie des ACP individus x biomarqueurs réalisées pour chaque saison pour les différentes populations de <i>D. polymorpha</i>	140
Tableau X : p valeurs des différentes analyses de coinertie des ACP individus x biomarqueurs réalisées pour 3 saisons pour deux populations de <i>D. r. bugensis</i>	142
Tableau XI : Contamination sédimentaire au regard du Tableau IV de l'article 1er de l'Arrêté du 9 aout 2006 concernant les niveaux relatifs aux éléments et composés traces pour les sédiments extraits de cours d'eau ou canaux.....	167
Tableau XII : Classement par rang des 13 sites étudiés réalisé sur les paramètres de contamination des sédiments.....	168
Tableau XIII : Résultats des 18 co-inerties réalisées pour étudier les co-structures des jeux de données disponibles.....	171
Tableau XIV : Résultats des régressions PLS concernant le lien entre biomarqueurs et contamination sédimentaire (a) et le lien entre biomarqueurs et accumulation des contaminants dans les tissus mous (b)	174
Tableau XV : Résultats de la régression PLS concernant le lien entre l'accumulation des contaminants dans les tissus mous et la contamination sédimentaire.....	176
Tableau XVI : Synthèse du nombre de différences significatives entre sous-échantillons aléatoires tirés au sort au sein de chaque population, pour différentes valeurs de n.....	251
Tableau XVII : Estimation des frais de fonctionnement pour une campagne à large échelle (30 populations, à raison de 12 organismes par population), sur le long terme (3 ans, à raison d'un échantillonnage tous les 2 mois)	279
Tableau XVIII : Deux études (sur trois publiées) concernant les différences inter-spécifiques chez les dreissènes en terme de réponse des biomarqueurs	285

Liste des publications et communications / Valorisation scientifique

• Publications internationales

POTET M., DEVIN S., PAIN-DEVIN S., ROUSSELLE P., GIAMBÉRINI L., 2016. Integrated multi-biomarker responses in two dreissenid species following metal and thermal cross-stress. *Environmental Pollution* n° 218, pp. 39-49. DOI : <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.025>

POTET M., GIAMBÉRINI L., PAIN-DEVIN S., LOUIS F., BERTRAND C., DEVIN S. Differential tolerance to nickel between *Dreissena polymorpha* and *Dreissena rostriformis bugensis* populations. *Reports*. DOI : 10.1038/s41598-018-19228-x

POTET M., DEVIN S., GIAMBÉRINI L., PEDEN R., BERTRAND C., PAIN-DEVIN S. Investigating circadian rhythms in biomarker responses, a key challenge for biomonitoring. En preparation.

POTET M., GIAMBÉRINI L., PAIN-DEVIN S., CATTEAU A., PAULY D., DEVIN S. Impact of multiple stressors on biomarker responses in sympatric dreissenid populations. En preparation.

• Communications orales internationales

POTET M., BERTRAND C., LOUIS F., PAIN-DEVIN S., GIAMBÉRINI L., DEVIN S. Variabilité interpopulationnelle de la tolérance de *Dreissena* sp. à un stress métallique: implications pour la biosurveillance. 13ème Colloque du réseau ÉcoBIM /2ème Colloque du RÉAQ, 29-31 mai 2017, Rimouski, Québec, Canada.

DEVIN S., **POTET M.**, BERTRAND C., LOUIS F., GIAMBÉRINI L., PAIN-DEVIN S. Les indices multimarqueurs dans les programmes de biosurveillances. 13ème Colloque du réseau ÉcoBIM /2ème Colloque du RÉAQ, 29-31 mai 2017, Rimouski, Québec, Canada. **Conférence invitée.**

POTET M., GIAMBÉRINI L., ROUSSELLE P., PAIN-DEVIN S., DEVIN S. Multi-biomarker responses between two dreissenid species in a global change context. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC Europe), 26th annual meeting, du 22 au 26 mai 2016, Nantes, France.

POTET M., DEVIN S., PAIN-DEVIN S., GIAMBÉRINI L. Multi-biomarker evaluation of a multi-stress exposure in two freshwater bivalves. Young Environmental Scientists (YES) Meeting, du 28 février au 2 mars 2016, Gainesville, Floride, USA.

• Communications orales nationales

LOUIS F., PAIN-DEVIN S., **POTET M.**, DAVID E., DEVIN S., GIAMBÉRINI L. Allocation énergétique chez les moules d'eau douce (*Dreissena polymorpha* et *Dreissena rostriformis bugensis*) : Scope for Growth et cadmium. Colloque de la Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA), 29 et 30 juin 2017, Lille, France.

POTET M., GIAMBÉRINI L., PAIN-DEVIN S., LOUIS F., WAGNER P., ROUSSELLE P., PAULY D., BERTRAND C., DEVIN S. Tolérance à un stress métallique chez *Dreissena* sp : variabilité interpopulationnelle et implications pour la biosurveillance. Réunion plénière du GDR Ecotoxicologie Aquatique, 22 et 23 juin 2017, Lyon, France.

POTET M., BERTRAND C., LOUIS F., PAIN-DEVIN S., GIAMBÉRINI L., **DEVIN S.** Acquisition de tolérance aux métaux de *Dreissena* sp. dans les hydrosystèmes contaminés. Journées Scientifiques de la Zone Atelier Moselle, 23-24 Mai 2017, Nancy, France.

POTET M., DEVIN S., PAIN-DEVIN S., GIAMBÉRINI L. Variabilité saisonnière des biomarqueurs chez les bivalves du genre *Dreissena* et implications pour le biomonitoring. Forum EcoTox de la fondation Rovaltain, 11 au 13 octobre 2016, Valence, France.

CATTEAU A., **POTET M.**, DEVIN S., GIAMBÉRINI L., PAIN-DEVIN S. Variations interpopulationnelles de la sensibilité et de la vulnérabilité de *Dreissena polymorpha* et *Dreissena rostriformis bugensis*. Colloque de la Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA), 29 et 30 juin 2016, Reims, France.

POTET M., DEVIN S., PAIN-DEVIN S., GIAMBÉRINI L. Multi-biomarker evaluation of a multi-stress exposure in two freshwater bivalves. Journée des doctorants LIEC, 19 avril 2016, Metz, France.

POTET M., DEVIN S., PAIN-DEVIN S., GIAMBÉRINI L. Outils d'évaluation de la qualité des eaux de surface : biomonitoring passif à l'aide du bivalve *Dreissena spp.* Journées de la Zone Atelier Moselle, 12 mai 2015, Metz, France.

POTET M., GIAMBÉRINI L., DEVIN S. : De l'acclimatation à l'adaptation : mécanismes évolutifs, conséquences populationnelles et implication en biosurveillance. Journée des doctorants LIEC, 28 novembre 2014, Metz, France.

- **Communications affichées internationales**

POTET M., ANDREÏ J., MARCHAL B., GARAUD M., DEVIN S., FELTEN V., GIAMBÉRINI L., GUÉROLD F., PAIN-DEVIN S. MultiXenobiotic Resistance vs. Nanoparticles: is MXR a good biomarker of exposure? An overview with zebra mussels and gammarids exposed to Ag and TiO₂ nanoparticles. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC Europe), 25th annual meeting, du 3 au 7 mai 2015, Barcelone, Espagne.

- **Communications affichées nationales**

POTET M., WAGNER P., ROUSSELLE P., PAIN-DEVIN S., DEVIN S., GIAMBÉRINI L. Réponse multi-biomarqueurs chez le genre *Dreissena* à l'échelle nationale. Congrès de la Société d'Ecologie Fondamentale et Appliquée (SEFA), 29 et 30 juin 2016, Reims, France.

LOUIS F., DEVIN S., **POTET M.**, WAGNER P., ROUSSELLE P., GIAMBÉRINI L., PAIN-DEVIN S. *Dreissena polymorpha* et *Dreissena rostriformis bugensis* : comparaison des LT50 (temps létal pour 50% des individus testés) suite à une exposition au nickel. Société d'Ecologie Fondamentale et Appliquée (SEFA), juin 2016, Reims, France.

POTET M., WAGNER P., ROUSSELLE P., PAIN-DEVIN S., DEVIN S., GIAMBÉRINI L. Réponse multi-biomarqueurs chez le genre *Dreissena* à l'échelle nationale. Séminaire annuel de l'école doctorale RP2E, 28 janvier 2016, Nancy, France.

POTET M., PAIN-DEVIN S., WAGNER P., ROUSSELLE P., DEVIN S., GIAMBÉRINI L. From acclimatization to adaptation: evolutionary mechanisms, populational consequences and involvement in biomonitoring. Journée des doctorants, juin 2015, Nancy, France.

Enseignement et formations

- **Formation scolaire et universitaire**

10/2014 – 12/2017 : Doctorat en Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes

Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC), UMR 7360 Université de Lorraine, CNRS, Metz.

De l'acclimatation à l'adaptation : mécanismes évolutifs conséquences populationnelles et implication en biosurveillance.

Thèse s'insérant dans le programme BIOMICS, en collaboration avec l'ONEMA.

Mots clés : Ecotoxicologie aquatique, biomarqueurs, dreissénidés, approches populationnelles, écologie

Encadrement : Simon Devin (Pr.) et Laure Giambérini (Pr.).

2012 - 2014 : Master Biodiversité, Ecologie, Environnement, Université Joseph Fourier, Grenoble.

Stage de 6 mois (de janvier à juillet 2014), LIEC, Université de Lorraine - CNRS, Metz. Encadrement Sandrine Pain-Devin et Laure Giambérini. Dans le cadre de l'ANR P2N MESONNET (Coord. Jean-Yves Bottero) GDRi-CEINT. *Réponses d'invertébrés d'eau douce à l'exposition aux nanoparticules ; recherche de nouveaux marqueurs pertinents (MXR digestif et mitochondrial).*

Stage de 7 semaines (du 8 avril au 31 mai 2013), LIEC, Université de Lorraine - CNRS, Metz. Encadrement Sandrine Pain-Devin. Dans le cadre de l'ANR P2N MESONNET (Coord. Jean-Yves Bottero) GDRi-CEINT. *Etude de l'impact de différentes nanoparticules sur le système de transport MXR chez la dreissène.*

2009 - 2012 : Licence de Biologie Générale, Université Joseph Fourier, Grenoble.

2009 : Baccalauréat Scientifique, spécialité physique-chimie, Lycée Pierre du Terrail, Pontcharra.

- **Formations suivies**

Analyse de cycle de vie et application aux bioproduits

Les tests d'écotoxicité au service de l'évaluation des risques

Prévention et secours civiques niveau 1 (PSC1)

Formation à la communication orale et corporelle en milieu professionnel

Initiation à l'enseignement universitaire : construire un cours, l'animer, l'évaluer

Innovations pédagogiques et outils numériques

Médiation scientifique (option « Science Académie »)

Ma thèse en 180 secondes (finaliste régionale de l'Université de Lorraine, le 23 mars 2017 à Nancy)

Journée sur les métadonnées organisée par la Zone Atelier Moselle

- **Enseignements**

Contrat de Doctorant Contractuel Chargé d'Enseignement (DCCE) sur la période 2014-2017, soit 192h d'enseignement (TP de zoologie et d'histologie niveau L1, TD de génétique des populations niveau L2, CM sur le lien entre le système MXR et les protéines transmembranaires niveau L1, CM statistiques (analyses multivariées) niveau M2).

- **Encadrements**

Audrey Catteau (Master 2, 6 mois), Fanny Louis (Master 1, 3 mois ; Master 2, 6 mois).

Encadrement de deux stagiaires de 1^{ère} dans le cadre de la Science Académie (Association Paris-Montaigne) : Lucie Klein et Cécile Chaxel du 11 au 15 avril 2016.

- **Autres**

Membre élue du conseil de laboratoire, représentante du collège des non-permanents, mandat 2015-2017.

Participation à la Fête de la Science, du 12 au 15 octobre 2016, Campus Bridoux, Metz, Atelier « La vie dans nos rivières ».

Accompagnement personnalisé avec 14 élèves de seconde : présentation de la vie dans les rivières et des outils de biosurveillance (9 mai 2017, durée : 1h15). Projet « Ouverture Sciences » entre le LIEC (Mme Sylvie COTELLE) et le lycée de la Communication de Metz (Mme GILLET-SAMUEL).

Introduction

A l'heure actuelle, notre planète fait face à ce qu'on pourrait qualifier de « pollution globalisée » : aucun endroit sur Terre n'est exempt de pollution. L'industrie, l'agriculture, l'urbanisation, le transport, le tourisme et la vie quotidienne sont autant d'activités anthropiques à l'origine de la production de nombreux polluants, liquides, solides et gazeux, qui vont pénétrer tous les compartiments de la biosphère. Différents mécanismes favorisent les échanges de polluants entre ces compartiments, mais leur destination finale demeure le compartiment aquatique. Ils y pénètrent par différentes voies (pluie, retombées atmosphériques, lessivage des sols, des routes, des zones industrielles et agricoles, pollutions ponctuelles, rejets de station d'épuration...).

La protection de ces milieux et des bénéfices qu'ils nous rendent (rôle dans le cycle des nutriments, production primaire, réservoirs d'eau, de nourriture, de biodiversité, ressources, activités récréatives, tourisme, esthétique...) se retrouve désormais au cœur des préoccupations gouvernementales. Afin de préserver ou de restaurer les milieux impactés, différents réseaux de surveillance et d'évaluation du risque lié aux polluants ont été mis en place, et soutenus sur le plan législatif. Sur le continent américain, on peut citer le « Clean Water Act » en 1972 et « Toxic Substances Control Act » en 1976 ou encore l'« Oceans Act » en 1996. En Europe, la DCE (Directive Cadre sur l'Eau) a été développée pour les eaux continentales et côtières en 2000, REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) en 2006 et la DCSMM (Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin) pour le milieu marin en 2008.

L'écotoxicologie est définie par Newman (2015a) comme « la science des contaminants dans la biosphère et leurs effets sur les constituants de la biosphère, incluant les humains ». La question des effets des contaminants peut se poser à tous les niveaux d'organisation biologique, tout comme la question de leur devenir et de leur transport. Le développement de cette discipline s'est fait sous la pression de devoir évaluer rapidement le risque engendré par un polluant, et s'est donc focalisé en premier lieu sur des descripteurs rapides et peu coûteux comme les tests de toxicité ou les biotests, qui constituent le squelette de l'écotoxicologie, mais présentent de nombreuses limites. Le besoin s'est rapidement fait sentir de développer des méthodologies plus pertinentes pour évaluer et/ou caractériser l'état de santé des écosystèmes aquatiques, mais aussi permettre leur suivi sur le long terme afin d'évaluer l'efficacité des mesures adoptées. Pour répondre aux exigences législatives, différents outils de surveillance ont donc été développés. En premier lieu, l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques reposait essentiellement sur la mesure de paramètres physico-chimiques, hydromorphologiques, sur le monitoring chimique des polluants et les caractéristiques des communautés (monitoring écologique). Mais l'intégration d'éléments intermédiaires de qualité biologique est devenue essentielle, pour permettre de détecter les effets des polluants sur les organismes, avant que des

répercussions n'apparaissent aux niveaux d'organisation supérieurs (Allan et al., 2006b ; Amiard et al., 1998).

Les biomarqueurs constituent de bons candidats pour ce type d'approche, car ils se situent à des niveaux intermédiaires (individu, population) et permettent d'intégrer non seulement l'état de contamination du milieu, mais aussi ses effets sur le biote. Toutefois, il est désormais acquis qu'outre les contaminants, ces biomarqueurs sont aussi influencés par les caractéristiques structurales des milieux aquatiques (température, cycle saisonnier, minéralisation de l'eau...), mais également par des facteurs intrinsèques aux populations comme le cycle reproducteur, les caractéristiques génétiques ou encore le parasitisme. En définitive, l'utilisation des biomarqueurs en tant qu'outils pour évaluer l'état de santé de populations *in situ*, exposées à des pollutions multiples et des facteurs environnementaux changeants, reste encore complexe malgré des déploiements croissants, aussi bien en milieu marin que d'eau douce.

Le **Chapitre 1** de ce manuscrit présente les différents outils évoqués précédemment, et plus particulièrement les biomarqueurs. Les exemples qui illustrent les différentes parties seront, dans la mesure du possible, orientés sur les bivalves, et sur le genre *Dreissena* en particulier. En effet, l'organisme modèle choisi pour ces travaux est la moule zébrée, *Dreissena polymorpha*, fréquemment utilisée pour le suivi de la qualité des cours d'eau et des masses d'eau lentiques. Son caractère filtreur lui confère un rôle fonctionnel dans les écosystèmes aquatiques (flux d'oxygène, de matières, de contaminants et d'énergie) et la rend intégratrice de la contamination de la colonne d'eau (phases dissoutes et particulaires). Cette espèce présente des traits bioécologiques très intéressants : une large aire de répartition, une disponibilité toute l'année, une taille adéquate facilitant son échantillonnage et fournissant suffisamment de tissus pour les mesures de différents marqueurs, une vie sessile. Elle présente une bonne longévité, est résistante aux conditions de laboratoire, et répond aux changements de la contamination. Sa physiologie, son anatomie, son écologie et son éthologie sont également bien connues. A l'origine, ces travaux devaient s'articuler autour de cette seule espèce. Cependant en Europe, depuis plus d'une dizaine d'années maintenant, les populations de *D. polymorpha* sont en déclin et une autre espèce de dreissène, la moule quagga, *Dreissena rostriformis bugensis*, colonise nos milieux. De nombreuses différences, qui font l'objet du **Chapitre 2**, existent entre les deux espèces, et nous ont conduits à réaliser nos travaux sur les deux espèces en parallèle. L'inconvénient majeur à leur utilisation réside dans leur caractère hautement invasif, ce qui peut compliquer leur utilisation en biosurveillance active et l'interprétation de leurs réponses biologiques par rapport à des organismes natifs. De plus, les informations concernant *D. r. bugensis* sont surtout focalisées sur des paramètres tels que sa croissance et sa dynamique de dispersion, dans le but de prédire son invasion. Les études sur ses réponses biochimiques sont assez rares à l'heure actuelle, tout comme le sont les études comparant les deux espèces.

L'objectif de cette thèse est d'identifier les rôles relatifs des paramètres des milieux aquatiques, des pressions anthropiques et des caractéristiques des populations sur les réponses des biomarqueurs des deux espèces, *D. polymorpha* et *D. r. bugensis*. Le but est de mieux comprendre les facteurs influençant les réponses des biomarqueurs, et la signification de ces derniers en termes de sensibilité et de vulnérabilité des populations. La présence d'une espèce invasive supplémentaire a également soulevé de nombreuses interrogations : comment vont se comporter les populations de *D. polymorpha* potentiellement menacées par l'arrivée de *D. r. bugensis* ? Pourra-t-on remplacer notre espèce modèle par cette nouvelle invasive dans nos études ? Les deux espèces présentent-elles des traits biochimiques et physiologiques similaires ? Peut-on appliquer les connaissances déjà acquises sur *D. polymorpha* à *D. r. bugensis* ? Pour répondre à ces différentes questions, une batterie de biomarqueurs représentatifs de grandes fonctions physiologiques comme les défenses antitoxiques et antioxydantes, le métabolisme énergétique, a été suivie chez nos organismes modèles. Deux angles ont été envisagés. Le premier, qui correspond au **Chapitre 3** de ce manuscrit, est axé sur l'évaluation de la variabilité intra et inter-populationnelle ; pour y répondre, des approches *in situ* ont été menées afin de mesurer les réponses des organismes dans leur environnement naturel. Le second, qui correspond au **Chapitre 4**, concerne les mécanismes de tolérance, d'acclimatation et d'adaptation des organismes, qui ont été évalués au travers d'expérimentations en laboratoire, en les exposant à des éléments métalliques. Le **Chapitre 5** vise à intégrer l'ensemble des données acquise *in situ* et en laboratoire dans une approche holistique pour tenter de répondre de manière plus précise aux objectifs énoncés ci-dessus. L'ensemble de ces résultats seront discutés dans le **Chapitre 6**.

Ces travaux ont été financés par une allocation ministérielle et par la convention BIOMICS (Surveillance intégrée pour les écosystèmes dulçaquicoles : Biomarqueurs et Omics chez le bivalve d'eau douce *Dreissena polymorpha*) réalisée en collaboration avec l'ONEMA, aujourd'hui Agence Française pour la Biodiversité (Responsables : Simon Devin (Université de Lorraine) et Olivier Perceval (ONEMA)). Ce programme s'étend de 2015 à 2017, et les objectifs sont communs avec ceux du présent manuscrit. Cette thèse porte uniquement sur l'approche biochimique (biomarqueurs), et les travaux seront complétés par une approche de génomique environnementale (transcriptomique, protéomique), qui permettra d'améliorer les connaissances sur les mécanismes d'action toxique des contaminants chez nos organismes. Le séquençage du transcriptome des deux espèces de dreissènes a été réalisé pour interpréter et exploiter au mieux les réponses moléculaires des organismes. Cette partie « Omiques » fait l'objet d'un post-doctorat, actuellement en cours, réalisé par Romain Péden.

A terme, ces travaux devraient valider (ou invalider) l'utilisation de ces espèces en écotoxicologie et fournir des grilles de lecture pour les réponses de leurs biomarqueurs, permettant d'interpréter avec plus de finesse les réponses mesurées chez une population autochtone ou transplantée, et de proposer de nouveaux outils, plus intégrateurs, applicables en biosurveillance.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique – L'utilisation des biomarqueurs en biosurveillance

Ce chapitre a pour but de présenter les outils d'évaluation de la qualité chimique et biologique des milieux aquatiques. L'accent sera mis sur l'intérêt des biomarqueurs sub-individuels à faire partie de ces outils, leurs avantages et leurs inconvénients. Les facteurs à prendre en compte pour les utiliser de manière pertinente et fiable seront évoqués à la fin de ce chapitre. Le phénomène de tolérance aux contaminants, généralement peu étudié, sera notamment développé. Comme mentionné dans l'introduction, les exemples porteront dans la mesure du possible sur le genre *Dreissena* (le terme « dreissènes » désignera indifféremment les deux espèces) et sur les métaux, puisque nos expérimentations en laboratoire ont été réalisées avec du nickel.

Partie I : Evaluation de l'état de santé des écosystèmes aquatiques

Un stressor¹ est défini comme « toute entité chimique, physique, ou biologique pouvant induire des effets néfastes sur les composants écologiques, c'est-à-dire les individus, les populations, les communautés ou les écosystèmes » (Norton et al., 1992). A ce titre, les polluants sont des stressors pouvant entraîner des perturbations allant d'atteintes moléculaires à la perte de fonctions écosystémiques. Le but de l'évaluation du risque environnemental (ERA, pour Environmental/Ecological Risk Assessment) est de déterminer la nature et la probabilité des effets des polluants sur les écosystèmes et leurs composantes en utilisant une approche fondée sur des preuves (WoE pour Weight of Evidence ; Galloway et al., 2004 ; SETAC, 1997). On essaye dans ce cas de collecter un maximum d'informations complémentaires pour aboutir à une évaluation fiable de la situation (Benedetti et al., 2011).

Que ce soit pour faire de la surveillance (observer un milieu et ses éventuels changements d'état) ou de l'évaluation du risque plus poussée, des outils pertinents, fiables, et utilisables de la même façon par tous sont nécessaires. Le choix de ces outils dépendra de la complexité de leur mise en œuvre, de leur coût, de leur fiabilité, de leur sensibilité, et du type d'information que l'on veut en obtenir. Par ailleurs, certains outils sont mieux adaptés que d'autres à certaines situations ou certains sites.

Brièvement, le monitoring chimique peut se faire de manière continue ou *via* des prélèvements ponctuels d'échantillons sur différentes matrices. Le monitoring écologique se fait plutôt à l'aide d'outils spécifiques et d'indices. La biosurveillance (monitoring biologique, ou biomonitoring) consiste en l'utilisation d'organismes vivants (ou de leurs réponses) pour évaluer l'état ou les changements d'état de leur milieu (Oertel et Salanki, 2003). Les outils à employer pour évaluer les éléments de qualité chimique, biologique et écologique ne sont pourtant pas spécifiés dans la DCE (Allan et al., 2006a) et chaque pays membre est libre d'appliquer ses propres réglementations.

1. Evaluation de l'état chimique : monitoring chimique et notion de biodisponibilité

Différents seuils réglementaires constituent à l'heure actuelle les outils majeurs de protection de l'environnement et de la santé humaine. L'évaluation du risque conventionnelle vise à identifier le danger, l'exposition (PEC, Predicted Environmental Concentration), à caractériser le danger (PNEC, Predicted No Effect Concentration) et le risque (RQ, Risk Quotient) pour les organismes (Amiard et Amiard-Triquet, 2015a). A partir de ces éléments sont calculées des Normes de Qualité Environnementale (NQE ; Amiard et Amiard-Triquet, 2015b) pour l'eau, les sédiments ou le biote.

¹ Un stress représente les réponses physiologiques d'un organisme essayant de se maintenir en cas de perturbation, pour augmenter ses chances de survie ; c'est une force qui pousse les processus physiologiques normaux en dehors de leurs limites, et qui peut toucher tous les niveaux d'organisation biologique (Férard et Blaise, 2013)

Lorsque ces seuils de qualité sont dépassés, il est nécessaire d'identifier les sources de pollution et de réduire la décharge de contaminants (Allan et al., 2006a). L'utilité des NQE pour le biote peut cependant être mise en cause, puisqu'ils ne précisent pas quelle espèce utiliser, à quel niveau trophique et quel stade de vie. On pourra donc se retrouver en dessous ou au-dessus de ce seuil, selon l'espèce considérée et sa capacité à accumuler le polluant ciblé (Lepom et al., 2012).

Dans le cadre de la DCE, le monitoring chimique est concentré sur la quantification de 45 substances prioritaires, sélectionnées selon leur degré de persistance, leur toxicité et leur capacité de bioaccumulation (UE, 2013). Cette liste est revue tous les 4 ans. A chaque substance sont associées des NQE pour l'eau et le biote, mais pas pour les sédiments (UE, 2000).

1.1. Détection des contaminants dans le milieu

Différentes analyses chimiques (chromatographie, spectrophotométrie...) permettent la détection et la quantification précise des polluants, à partir d'échantillons réduits, aussi bien dans les matrices physiques que biologiques (eau, sédiment, végétaux, animaux ; Chapman et al., 1996). Ces mesures sont indispensables pour savoir si les concentrations présentes dans l'environnement respectent les standards établis par la législation. Elles informent sur la présence et la distribution spatiale des polluants et sur l'évolution temporelle de la contamination.

Cependant, elles sont souvent focalisées sur des contaminants faciles à analyser, et certains composés ne peuvent être dosés par les méthodes actuelles ou coûtent cher. C'est le cas par exemple de certains métabolites ou des polluants émergents² pour lesquels les techniques analytiques classiques sont souvent inadaptées, avec un manque de spécificité et des limites de détection trop hautes (Vorkamp et McGeer, 2015). Le fait qu'un polluant soit en dessous des limites de détection ne veut pas dire que cette faible concentration n'est pas toxique pour les organismes (Allan et al., 2006a). Certaines molécules sont créées intentionnellement pour avoir une action toxique sur une cible biologique (produits phytosanitaires, médicaments, pesticides). Elles circulent à l'état dissout dans le milieu et peuvent exercer leur effet même à de très faibles concentrations. Enfin, du fait de la diversité des contaminants (et de leurs produits de dégradation/transformation), il est impossible de quantifier simultanément tous les polluants d'un échantillon. Un polluant pris individuellement peut ne pas dépasser un seuil, mais un mélange peut entraîner des effets (Di Poi et al., 2017; Heys et al., 2016). Dans la DCE, le « statut chimique » se réfère à quelques polluants prioritaires qui ne représentent qu'une petite portion de la pollution générale. On conclue souvent à un bon état chimique si on se réfère aux NQE, mais une diminution de la contamination ne veut pas dire que le biote n'est plus sous pression.

² Hydrophobes : plastifiants, ignifugeants, NBFR (= Novel Brominated Flame Retardants) retardateurs de flamme bromés qui remplacent les PBDE (PolyBrominated Diphenyl Ethers) désormais interdits ; hydrophiles : produits pharmaceutiques, produits cosmétiques, médicaments ; nanomatériaux ; microplastiques

Outre le fait de pouvoir mesurer et/ou prédire la concentration en polluants dans le milieu, il faut également déterminer quelle fraction des polluants est susceptible d'entrer en contact et d'exercer une action toxique sur les organismes.

1.2. Biodisponibilité et bioaccumulation

La biodisponibilité d'un polluant désigne sa capacité à interagir avec les organismes, à s'accumuler dans les organismes et éventuellement à entraîner des effets (Férard et Blaise, 2013) ; une molécule est dite biodisponible quand elle peut interagir ou passer au travers de la membrane cellulaire (Ortega-Calvo et al., 2015). Sur un plan écotoxicologique, ce paramètre apporte donc des informations plus pertinentes sur les polluants que le simple fait de les quantifier. Certaines études ont d'ailleurs montré qu'il n'y avait pas systématiquement de lien entre la concentration en polluants dans l'eau ou les sédiments et la concentration dans les organismes (Benito et al., 2017; Schaller et Planer-Friedrich, 2017), notamment parce que le taux d'élimination des contaminants par les organismes peut diminuer avec le temps (Becker van Slooten et Tarradellas, 1994). La biodisponibilité est un mécanisme qui se produit à l'interface entre le milieu et l'organisme et dépend à la fois du polluant, de son devenir dans l'environnement et de la physiologie de l'organisme (Amiard et al., 1998).

La bioaccumulation correspond à l'accumulation nette des contaminants dans et sur un organisme à partir de différentes sources (eau, air, nourriture, sédiment, particules en suspension). La bioconcentration ne concerne que les contaminants accumulés à partir de l'eau (Newman, 2015b). L'entrée et la sortie des contaminants dans un organisme peuvent se faire par différentes voies, au niveau de l'enveloppe externe, des surfaces respiratoires et du système digestif : adsorption, diffusion passive ou facilitée à travers la membrane plasmique, transport actif (protéines de transport ou canaux), échange, endocytose (Newman, 2015b). Une fois dans l'organisme, les contaminants peuvent subir différents processus comme (1) des réactions de biotransformation et de détoxification afin de protéger l'organisme (élimination, séquestration, redistribution) ou (2) des phénomènes d'activation (production de métabolites secondaires plus toxiques que les molécules mères ; Newman, 2015b). La bioaccumulation résulte de ces différents processus.

1.2.1. Comment évaluer la biodisponibilité des contaminants ?

La mesure de la contamination par les méthodes d'analyses chimiques classiques ne permet pas d'évaluer la biodisponibilité des polluants, et une concentration mesurée dans l'environnement n'est pas forcément représentative de l'exposition des organismes aux polluants. Mais il est possible de le faire, *via* des mesures chimiques (mesure des différentes formes de contaminants dans le milieu, de leur distribution sous forme aqueuse, dissoute ou particulaire pour les organiques ou de leur spéciation pour les métaux) ou l'étude des réponses biologiques (réponses toxiques, enzymatiques, physiologiques

induites par le polluant qui incorporent tous les facteurs influençant la biodisponibilité du contaminant ; Férard et Blaise, 2013).

Pour évaluer la fraction biodisponible d'un polluant, on peut modéliser le comportement des toxiques (prédire les formes toxiques, leurs interactions biologiques) avec par exemple les modèles géochimiques pour la spéciation des métaux, qui prennent en compte l'influence de l'environnement local sur l'abondance des formes toxiques à l'équilibre. Cela a conduit à la création du modèle de l'ion libre (ou Free Ion Activity Model, FIAM) permettant de prédire les concentrations en ions métalliques libres, leur absorption et leur toxicité (Morel, 1983). Dans ce modèle, les cations métalliques se fixent sur les ligands chargés négativement à la surface cellulaire ; ce taux de fixation dépendra donc de la présence d'autres ligands négatifs en solution (Vorkamp et McGeer, 2015). Le modèle de l'ion libre suppose que le nombre de sites membranaires occupés par le métal sera proportionnel à l'effet biologique observé (Férard et Blaise, 2013). Ce modèle a été élargi pour construire le modèle du ligand biologique (BLM pour Biotic Ligand Model) qui prédit la liaison à court terme des ions libres au site de toxicité (ligand biotique ; Di Toro et al., 2001 ; Paquin et al., 2000). Il permet d'identifier la cible d'action au sein de l'organisme, de prédire le degré d'accumulation du contaminant et donc sa toxicité potentielle (Amiard-Triquet, 2015). Le BLM prend en compte les interactions compétitives avec les cations (Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , H^+), qui peuvent eux aussi se lier au ligand biotique, et réduire la fixation et la toxicité des métaux (Vorkamp et McGeer, 2015).

Bourgeault et al. (2011) ont testé ce type de modèle biodynamique pour quelques métaux (Cd, Cr, Cu, Ni, Zn) chez *D. polymorpha*, en prenant en compte différents paramètres (concentration du métal dans l'organisme, temps d'exposition, constante d'absorption, concentration en métaux dans la phase dissoute (biodisponible), efficacité d'assimilation³ du métal, taux d'ingestion, concentration en métal dans la nourriture, taux d'efflux, taux de croissance de l'organisme). Ce modèle biodynamique, établi sur des mesures obtenues à partir d'expositions contrôlées en laboratoire, pour lesquelles la biodisponibilité des polluants est plus élevée qu'en milieu naturel plus complexe, surestime la bioaccumulation par rapport aux valeurs réelles mesurées sur des organismes transplantés *in situ* (Bourgeault et al., 2011). Leurs résultats soulignent ainsi l'influence des conditions du milieu sur l'efficacité d'assimilation, et donc la nécessité de déterminer et de prendre en compte l'efficacité d'assimilation propre à chaque population lorsqu'on cherche à évaluer la biodisponibilité des contaminants.

Pour les contaminants organiques, on utilise plutôt les QSARs (Quantitative Structure-Activity Relationships) qui se basent sur les propriétés d'une molécule (lipophilicité, conformation stérique, ionisation, polarité) pour prédire son activité biologique (biodisponibilité ou toxicité ; Newman, 2015c). Ce type de modèle a été utilisé par Kwon et al. (2006) mais s'est avéré inefficace pour prédire la bioaccumulation des PCB par *D. polymorpha*.

³ Fraction de métal ingérée qui est retenue dans les tissus

La deuxième approche pour évaluer l'exposition aux contaminants, en relation avec les impacts biotiques, consiste en des estimations directes. Depuis les années 90, des appareillages permettent de détecter et caractériser les formes accessibles et/ou toxiques des contaminants *in situ*, principalement dans la colonne d'eau (Férard et Blaise, 2013). Ces outils sont présentés dans le Tableau I. Parmi eux, les échantillonneurs passifs séparent les contaminants selon leur capacité de diffusion (et donc leur activité chimique, qui est reliée à leur potentiel impact toxique). Ils sont placés dans le milieu pour une durée définie et permettent d'extraire et concentrer les polluants présents dans le milieu, abaissant ainsi les limites de détection et de quantification. Les polluants s'accumulent par diffusion et sorption, et le système se met à l'équilibre avec la concentration en contaminants dans le milieu (Amiard et Amiard-Triquet, 2015b ; Vorkamp et McGeer, 2015). Ces méthodes peuvent permettre de savoir sous quelle(s) forme(s) se trouve le polluant dans le milieu, et d'identifier la biodisponibilité de chaque forme. En revanche, s'ils sont bien représentatifs de la phase dissoute, ces outils sont moins adaptés à la phase particulaire (exposition alimentaire) ; les particules associées aux polluants ne diffusent généralement pas dans les échantillonneurs alors qu'elles peuvent être ingérées par les organismes filtreurs, donc ils sous estiment l'exposition. Ces dispositifs permettent donc d'obtenir des mesures précises, mais qui n'intègrent pas la variabilité liée à l'organisme.

Tableau I : Différents outils de monitoring chimique (adapté de Allan et al., 2006a, 2006b)

Outil & principe de fonctionnement	Rôle(s)	Avantage(s)	Désavantage(s)
Monitoring continu			
Analyse 24/24 des composés présents dans l'eau	Mesurer les concentrations en polluants organiques	Alerte rapide en cas de dépassement des NQE	Besoin d'énergie pour fonctionner et d'un site-laboratoire sécurisé
Echantillonneur passif			
Echantillonnage bio-mimétique par équilibration ; pour composés polaires, non-polaires et métaux	Symbolise la bioaccumulation par les organismes aquatiques ; mesure intégrée dans le temps des concentrations en polluants (évolution de la contamination) ; criblage des polluants (présence/absence) et identification des sources de pollution ; spéciation des contaminants	Peut être déployé sur plusieurs jours/mois ; utilisable pour la plupart des masses d'eau ; peu coûteux ; bonnes limites de détection ; pas d'énergie	Problèmes de biofouling ; besoin d'une calibration poussée
<i>Exemples d'échantillonneurs passifs :</i> - DGT et DET (Diffusive Gradient/Equilibration in Thin films) ; séparation des métaux libres et liés à la matière organique ou inorganique - SLM (Supported Liquid Membrane) ; spéciation des métaux - SPMD (Semi-Permeable Membrane Device) et LPDE (Low-Density Polyethylene Tube) ; composés organiques hydrophobes - échantillonneurs polaires (POCIS pour Polar Organic Chemical Integrative Sampler) ; composés organiques hydrophiles (détergents, alkylphénols, pesticides, composés pharmaceutiques). - et d'autres outils (Ecoscope® sampler pour localiser les sources de pollution, Chemcatcher® pour les contaminants prioritaires et émergents, PalmSens® pour un screening rapide des métaux)			
Senseur (électro)chimique			
Détection et quantification des polluants sur la base de leurs caractéristiques physico-chimiques	Détermination rapide des concentrations en polluants (métaux, HAP et certains pesticides) ; cartographie de la pollution ; sélection des molécules requérant une étude plus approfondie	Manipulation aisée	Ne s'applique pas à tous les polluants
<i>Exemples de senseurs :</i> - Electrode en graphite enrobée au mercure ; éléments traces métalliques - Electrode en carbone enrobée au bismuth ; chrome VI - Film immunosenseur sur une électrode en graphite ; atrazine - Oligonucléotides simple brins immobilisés sur électrodes en graphite ; hybridations de l'ADN et adduits			
Biosenseur			
Appareillage combinant une composante biologique (événement de reconnaissance) et une composante physique (transduction de la reconnaissance en signal mesurable)	Concentrations totales et biodisponibles en polluants prioritaires ; mesures de toxicité, génotoxicité et cytotoxicité possibles uniquement pour les polluants organiques		Ne s'applique pas à tous les polluants
<i>Exemples de biosenseurs :</i> - YETI (Yeast Environmental Toxicity Indicator) ; composés génotoxiques et cytotoxiques - CellSense® ; toxicité générale - SOS-LUX et LAC-FLUORO ; génotoxicité et cytotoxicité des éléments traces métalliques			
Immunotest			
Extraction et/ou quantification des polluants basée sur les réaction antigène/anticorps	Détermination rapide des concentrations en polluants (la plupart des polluants organiques, certains métaux) ; cartographie de la pollution ; sélection des molécules requérant une étude plus approfondie	Rapide ; facile ; sensible ; sélectif ; peu coûteux	Réactivité croisée avec des analogues et des métabolites pouvant mener à des faux-positifs ; nécessite analyses complémentaires

1.2.2. Facteurs influençant la biodisponibilité et la bioaccumulation

De nombreux facteurs vont compliquer la mesure de la fraction biodisponible d'un contaminant. Les relations entre la présence, la biodisponibilité d'un contaminant dans l'environnement, sa bioaccumulation et sa toxicité pour un organisme sont représentés en Figure 1. Les principaux facteurs influençant ces paramètres sont décrits à la suite.

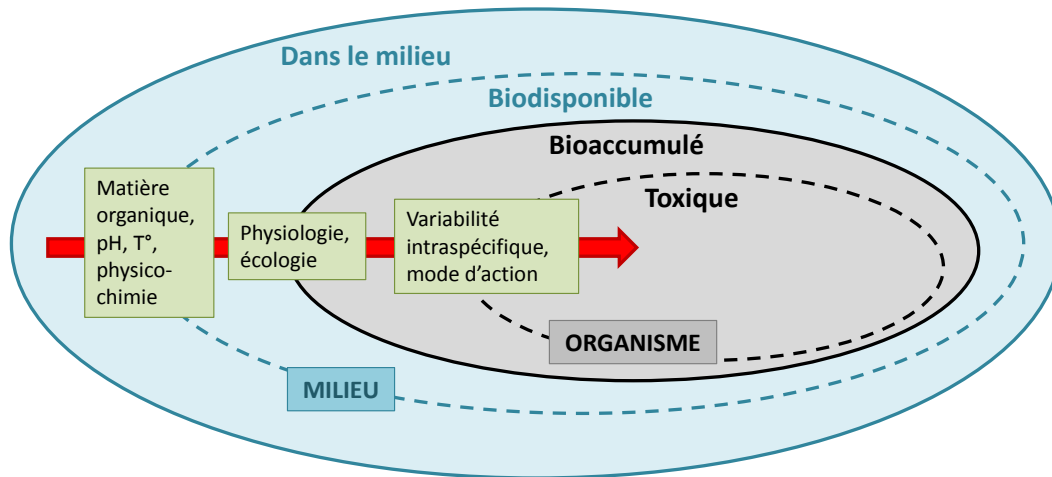


Figure 1 : Facteurs influençant la biodisponibilité et la bioaccumulation d'un contaminant (d'après Férard et Blaise, 2013)

La forme chimique du polluant considéré (métallique ou organique) et ses interactions avec le milieu

Dans la colonne d'eau, les variations temporelles de la contamination peuvent être liées à l'irrégularité des rejets urbains et industriels, à des pollutions accidentelles ou à une pollution ponctuelle et plus ou moins limitée dans le temps (par exemple lors de la période d'application de pesticides en agriculture). La contamination au niveau des sédiments peut varier suite à leur remobilisation, lors de mouvements tidaux, d'inondations, de tempêtes, ou encore avec le trafic nautique, le dragage et le chalutage, qui vont entraîner la resuspension du sédiment (Amiard et Amiard-Triquet, 2015c). On notera également que cette resuspension est plus importante dans les rivières que dans les lacs, du fait des courants plus importants et de la turbulence, ce qui augmente la biodisponibilité des métaux (Matthews et al., 2015).

La biodisponibilité des métaux est influencée par la salinité, le pH, le potentiel oxydoréducteur, l'alcalinité, l'oxygène dissous, la composition du sédiment (minéralogie, taille du grain, ...), les forces de liaison entre les métaux et les phases solides, leur spéciation et leur concentration dans le milieu (Newman, 2015c ; Rainbow, 2002). Les métaux peuvent s'adsorber sur les particules et les colloïdes, se complexer avec la matière organique dissoute, et se dissoudre en ions libres. La quantité totale de métal dans le milieu n'est pas informative, puisque toutes les formes chimiques ne sont pas biodisponibles, et ce sont surtout les ions métalliques libres qui sont toxiques (Di Toro et al., 2001). Les ligands

inorganiques (F^- , Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , CO_3^{2-} , HPO_4^{2-}) réduisent la disponibilité des ions métalliques libres en les complexant. La matière organique naturelle présente aussi des charges négatives (groupements carboxyles, phénoliques, sulphidiques, protéines) susceptibles de complexer les métaux, et de réduire leur disponibilité. C'est le cas pour le mercure (Kraemer et al., 2013). En été, on observe souvent une déplétion de l'azote et du carbone dans les milieux aquatiques, associée à une diminution des ratios C/N chez *D. polymorpha* et une diminution des réserves lipidiques (surtout constituées de carbone) ; pour autant, la bioaccumulation du mercure est toujours supérieure en été, car elle dépend aussi des modifications du régime alimentaire, de la variation en matière organique du milieu et des réserves énergétiques des organismes (Kraemer et al., 2013). Les métaux traces ont aussi une forte affinité pour les atome N et S, abondants dans les protéines, ce qui facilite leur liaison aux biomolécules (Rainbow, 2002 ; Voets et al., 2009).

La biodisponibilité des contaminants organiques dépend de leur hydrophobicité, du nombre de cycles aromatiques, de leur taille, de leur planarité, de leur teneur en carbone organique, de leur potentiel redox, du pH, et des autres molécules organiques présentes dans le milieu (Amiard et Amiard-Triquet, 2015c). Les matières organiques peuvent piéger les contaminants organiques hydrophobes, les rendant indisponibles pour les organismes (Haitzer et al., 1998). Cette capacité de piégeage dépend des caractéristiques de la matière organique (hydrophobie, taille des particules, biodégradabilité). Ce n'est pas forcément avantageux pour les bivalves qui filtrent énormément, y compris la matière organique qui aura fixé les polluants. Le pH et la force ionique influencent peu la forme chimique et la biodisponibilité des contaminants organiques, mais peuvent en revanche modifier la physiologie des organismes.

L'organisme considéré, son état physiologique ou son stade de développement

Les paramètres physico-chimiques affectent les polluants et leur comportement, mais ils peuvent aussi influencer directement les organismes, notamment l'intégrité et l'efficacité des barrières muqueuses et des épithéliums, et influencer ainsi l'entrée (active ou passive) des contaminants. La température modifie le métabolisme des organismes (filtration, assimilation de la nourriture), et donc les processus associés à la bioaccumulation : en général, elle augmente conjointement avec la température (Mubiana et Blust, 2007 ; Newman, 2015c), comme l'ont montré Del Piero et al. (2012) chez *D. polymorpha* exposée au fluore, et aussi avec la profondeur pour certains composés (Cu, Cd, K, Na, Ni, Zn ; Mills et al., 1993b). La capacité oxydoréductrice du milieu va aussi influencer la capacité d'immobilisation et de remobilisation des éléments par les bivalves (Schaller et Planer-Friedrich, 2017).

Les organismes vivants peuvent bioaccumuler les contaminants directement à partir de l'eau, *via* leur alimentation, ou lorsqu'ils entrent en contact avec le sédiment (déposé ou en suspension). Pour les bivalves, la quantité de nourriture dans le milieu influence fortement les taux de clairance et d'ingestion, et donc la bioaccumulation des contaminants (Cho et al., 2004).

Les organismes indigènes intègrent généralement mieux la contamination que les organismes transplantés (Richman et Somers, 2005). Outre les facteurs vus précédemment, de nombreux facteurs

biologiques influencent la bioaccumulation des polluants dans les organismes : le groupe taxonomique (les crustacés par exemple possèdent de l'hémocyanine qui favorise la bioaccumulation du cuivre ; Rainbow, 2002), le rôle biologique des métaux essentiels et non-essentiels, les différences interspécifiques, l'âge (polluants cumulés), les spécificités biologiques (mue, teneur en lipides), le sexe, le régime alimentaire.

Le statut reproducteur est un important facteur confondant de la bioaccumulation chez les bivalves : pour les métaux (sauf les organométalliques), qui ne se lient pas aux lipides, l'augmentation du poids liée à la gamétogénèse peut diluer les concentrations en métaux. La disponibilité en nourriture influence la condition, le poids total et la teneur en lipides des bivalves, avec des répercussions sur la concentration en contaminants.

1.2.3. La bioaccumulation chez les dreissènes

La mesure de la concentration en polluant accumulé dans un organisme exposé est une autre méthode, à la fois chimique et biologique, qui permet d'évaluer la biodisponibilité et la bioaccumulation des contaminants. Le biote constitue en effet une excellente matrice intégrative ; il permet de détecter des contaminants qui seraient classiquement en dessous des limites de détection, ou des contaminations antérieures et complémente ainsi le monitoring chimique (Benito et al., 2017 ; Richman et Somers, 2005). Ce type de mesure permet également de s'intéresser à des composés interdits depuis plusieurs années (DDT, certains PCB), qui ne sont plus forcément pris en compte lors du monitoring chimique, mais qui sont toujours présents/libérés dans l'environnement et qui continuent d'être bioaccumulés par les organismes (Riva et al., 2008).

Les espèces bioaccumulatrices, et les bivalves en particulier, sont très employées en biosurveillance comme indicateurs de la contamination des milieux naturels. Les espèces sélectionnées pour ce type de mesure sont généralement sessiles (représentatives de l'aire d'échantillonnage), abondantes localement, fournissent assez de tissus pour l'analyse, sont relativement résistantes aux toxiques (les contaminants doivent être accumulés sans entraîner la mort de l'organisme), d'une durée de vie suffisante (qui permet un suivi sur le long terme et une intégration des variations temporelles de la contamination), et tolérer les conditions de laboratoire (pour permettre un suivi cinétique par exemple) (Amiard et al., 1998 ; Phillips et Rainbow, 1994). Bien que *D. polymorpha* ait été plus largement utilisée, les deux espèces de dreissènes étudiées constituent de bons biomoniteurs de pollution organique et minérale, aussi bien en laboratoire qu'*in situ* (Tableau II), et la quantité de polluants qu'elles accumulent suit en général le gradient de contamination auquel elles sont soumises (Benito et al., 2017 ; Bervoets et al., 2004 ; Johns et Timmerman, 1998 ; Marie et al., 2006a ; Richman et Somers, 2005 ; Voets et al., 2009 ; Wiesner et al., 2001). *D. polymorpha* peut même accumuler les polluants à des concentrations bien supérieures à celles retrouvées dans l'eau ou les sédiments, pour les éléments les moins bien régulés (Benito et al., 2017 ; Schaller et Planer-Friedrich, 2017). D'aucun ont même montré que l'assimilation

des contaminants par *D. polymorpha* pouvait être plus efficace que celle de *Mytilus edulis*, couramment utilisée en milieu marin (Roditi et Fisher, 1999).

Dans le Tableau II, on peut remarquer que *D. r. bugensis* est utilisée surtout sur le continent américain, du fait de son invasion qui fut plus précoce qu'en Europe de l'Ouest. On voit aussi que les deux espèces peuvent être utilisées pour leurs capacités de bioaccumulation aussi bien en laboratoire qu'*in situ*, mais que les mesures concernent très souvent les métaux, notamment le Cu, le Zn et le Cd.

Tableau II : Principales études portant sur les capacités d'accumulation des deux espèces de dreissènes

Espèce	Lieu	Composé(s) mesuré(s)	Condition	Référence
ZM	Pays Bas	Cu, Zn, Cd, Pb	<i>In situ</i>	Kraak et al., 1991
ZM	France	Ag	Laboratoire	Berthet et al., 1992
ZM	Pays Bas	Cd, Cu, Zn	Laboratoire	Kraak et al., 1993
ZM et QM	USA	Métaux, nutriments (Ca, Fe, K, Mg, Na, P)	<i>In situ</i>	Mills et al., 1993b
ZM	Suisse	TBT	<i>In situ</i>	Becker van Slooten et Tarradellas, 1994
ZM	Pays Bas	Cd, Cu, Zn	Laboratoire	Kraak et al., 1994
ZM	Allemagne	Organo-étains	<i>In situ</i>	Stäb et al., 1995
ZM et QM	USA	Cd, Cu, Zn	<i>In situ</i>	Johns et Timmerman, 1998
ZM et QM	USA	Métaux	<i>In situ</i>	Rutzke et al., 2000
ZM	Allemagne	Cd, Pb, Hg	<i>In situ</i>	Wiesner et al., 2001
ZM	Belgique	PCB, PBDE, HCB, métaux	<i>In situ</i>	Bervoets et al., 2004
ZM	Belgique	PCB, HCB, DDE, métaux	<i>In situ</i>	Bervoets et al., 2005
ZM et QM	USA	Métaux, PCB, HAP, HCB, organochlorés, dioxines, furanes	<i>In situ</i>	Richman et Somers, 2005
ZM	USA	PCB	<i>In situ</i>	Kwon et al., 2006
ZM	France	Cd, Zn	<i>In situ</i>	Marie et al., 2006a
ZM	Belgique	PCB, Cd, Cu, Ni, Pb, Zn	<i>In situ</i>	Voets et al., 2006
ZM	Italie	PCB, DDTs, HCB, HCH	<i>In situ</i>	Riva et al., 2008
ZM	Belgique	Cd, Cu, Zn	Laboratoire	Voets et al., 2009
ZM	France	Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, HAP	<i>In situ</i>	Bourgeault et al., 2010
QM	USA	Cd, Cu, Zn	<i>In situ</i>	Johns, 2011
ZM	France	Cd, Cr, Cu, Ni, Zn	<i>In situ</i>	Bourgeault et al., 2011
ZM	Pays Bas	Métaux	<i>In situ</i>	Yen Le et al., 2011
ZM	France	BaP	Laboratoire	Chatel et al., 2012
ZM	Italie	Fluoride (F-)	Laboratoire	Del Piero et al., 2012
ZM	USA	Cd, Cu, Zn	<i>In situ</i>	Johns, 2012
ZM et QM	Allemagne	PCB, HCB, HCH, DDX	Laboratoire	Schäfer et al., 2012
ZM	Canada	Hg	<i>In situ</i>	Kraemer et al., 2013
ZM et QM	Pays Bas	Métaux	<i>In situ</i>	Matthews et al., 2015
ZM et QM	France	Ni, Cr	Laboratoire	Potet et al., 2016
ZM	Allemagne	As, Cu, Pb, U, Fe, P, Si, Zn	Laboratoire	Schaller et Planer-Friedrich, 2017
ZM	Espagne	Composés inorganiques (66)	<i>In situ</i>	Benito et al., 2017

Légende : TBT = tributylétain ; PCB = polychlorobiphényles ; PBDE = polybromodiphényléthers ; HCB = hexachlorobenzène ; DDE = dichlorodiphényldichloroéthylène ; HAP = hydrocarbures aromatiques polycycliques ; DDT = dichlorodiphényltrichloroéthane ; HCH = hexachlorohexanes ; BaP = benzo(a)pyrène ; DDX = dichlorodiphényl-X

Pour ces deux espèces de dreissènes, les résultats concernant la bioaccumulation sont assez contradictoires sur de nombreux points. Rutzke et al. (2000) n'observent pas de différence de concentration en métaux dans les tissus mous en fonction de l'espèce, ni en fonction du point d'échantillonnage, et pas non plus de relation avec la taille des organismes. A l'inverse, Mills et al. (1993b) reportent une bioaccumulation plus importante pour le Cr, le Mo et le Zn chez *D. polymorpha*, contrairement au V qui est plus élevé chez *D. r. bugensis*, mais des concentrations similaires entre les deux espèces pour les autres contaminants analysés (B, Cd, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, Se). Johns et

Timmerman (1998) trouvent aussi une bioaccumulation plus importante du Zn pour *D. polymorpha*, mais contrairement à Mills et al. (1993b), trouvent aussi une bioaccumulation du Cu plus importante pour cette espèce. Les résultats pour le Cu et le Zn obtenus par Johns et Timmerman (1998) sont en accord avec ceux de Richman et Somers (2005). Si on s'intéresse aux études sur un élément non essentiel comme le Cd, sa bioaccumulation peut être plus importante chez *D. r. bugensis* (Johns et Timmerman, 1998), ou bien similaire entre les deux espèces (Rutzke et al., 2000). Kwon et al. (2006) ont quant à eux mis en évidence que *D. polymorpha* était une bonne sentinelle pour évaluer une contamination aux PCB, mais qu'elle n'accumulait pas les mêmes congénères que d'autres organismes, comme les poissons.

Yen Le et al. (2011) ont établi un modèle pour comprendre les différences de bioaccumulation et de tolérance aux métaux entre *D. polymorpha* et *D. r. bugensis*, qui pourraient expliquer les changements de structure des communautés de dreissènes, et en évaluer les conséquences trophiques. De manière générale, les concentrations prédites sont inférieures aux concentrations mesurées dans les organismes, et les facteurs de bioconcentration (BCF) et de bioamplification (BAF) sont plus forts pour *D. polymorpha* que pour *D. r. bugensis*, suggérant un transfert trophique plus important pour la première.

La bioaccumulation est aussi reliée à l'allométrie : il est commun de penser que plus les organismes sont gros (et âgés), plus ils accumulent (Newman, 2015c ; Yen Le et al., 2011). Cependant, Mills et al. (1993b) n'observent pas ou peu de relation entre la taille de la coquille et la concentration en métaux dans les tissus mous des deux espèces de dreissènes, à l'exception du Cd et du Mn (plus forte concentration en Cd dans les grosses moules, en accord avec Richman et Somers (2005) ; plus fortes concentration en Mn dans les petites, en désaccord avec Richman et Somers (2005)). Johns et Timmerman (1998) n'observent pas non plus de lien entre longueur de la coquille et bioaccumulation pour les deux espèces. Toujours chez cette espèce, Wiesner et al. (2001) observent une influence de la taille sur la bioaccumulation du Pb, mais pas sur celle du Hg et du Cd. Pour les métaux, l'effet espèce semble avoir une plus grande influence que l'effet taille, l'idéal serait donc de choisir une seule espèce, avec dans l'idéal une taille relativement constante (Richman et Somers, 2005).

Concernant les composés organiques, Stäb et al. (1995) montrent que pour la plupart des organo-étains testés et leurs produits de dégradation, la bioaccumulation est plus importante dans les spécimens de *D. polymorpha* les plus gros ; les auteurs justifient ce résultat par le fait que la croissance est plus rapide chez les petites moules, donc qu'elles ont un effet dilution plus important que les grosses. Cet effet dilution a également été mis en évidence par Bourgeault et al. (2010) chez des individus de *D. polymorpha* transplantés *in situ*, pour lesquels la bioaccumulation de métaux et de HAP est plus faible sur le site le moins contaminé, car la nourriture y est plus abondante, et que les moules croissent plus vite. Ces mêmes auteurs (Bourgeault et al., 2011) ont mis en évidence cet effet dilution pour les métaux en période de croissance maximale des moules, avec une augmentation de la bioaccumulation après la période de largage des gamètes (perte de l'effet dilution). On peut légitimement supposer que cet effet dilution sera plus important pour *D. r. bugensis*, qui présente une croissance plus rapide (Matthews et al., 2015). La teneur en lipides semble avoir un rôle important dans la bioaccumulation des contaminants

hydrophobes, il semble donc important de collecter les échantillons à la même date pour éviter les variations de la teneur en lipides liées à la période de reproduction (Kraak et al., 1991 ; Richman et Somers, 2005). Une solution peut aussi être de rapporter les concentrations bioaccumulées à la teneur en lipides (Riva et al., 2008).

Chez les bivalves, la coquille peut elle aussi servir d'organe bioaccumulateur, et stocker les polluants sous forme inactive de façon transitoire (Wiesner et al., 2001). Schaller et Planer-Friedrich (2017) mettent en évidence une concentration légèrement supérieure (mais non significative) en métaux dans la coquille de *D. polymorpha* par rapport aux tissus mous, tout comme Gundacker (1999), qui ajoute même qu'une portion des contaminants peut être accumulée dans le byssus. A l'inverse, Del Piero et al. (2012) trouvent une accumulation beaucoup plus importante dans les tissus mous que dans la coquille, tout comme Cho et al. (2004) pour les PCB.

A l'opposé, les dreissènes sont capables d'altérer l'éco-dynamique des contaminants dans le milieu, en les bioconcentrant ou en favorisant leur redéposition à partir de la colonne d'eau (Cho et al., 2004) ; ce phénomène est d'autant plus vrai lorsque leurs densités sont importantes.

Tous les facteurs évoqués précédemment sont à l'origine des variations inter-annuelles, interspécifiques et saisonnières de la bioaccumulation observées chez les bivalves. Wiesner et al. (2001) par exemple mettent en évidence une variation saisonnière de la bioaccumulation, avec une diminution de la bioaccumulation du Cd, Pb, et Hg en été chez *D. polymorpha*, suite à la disparition des individus les plus âgés (et donc les plus contaminés) à cette période. Johns et Timmerman (1998) mettent en évidence une variabilité saisonnière de la bioaccumulation du Cd, Cu et Zn chez les deux espèces, en lien avec le cycle reproducteur, ainsi qu'une variabilité interannuelle plus importante pour *D. polymorpha*. Dans la mesure où les deux espèces diffèrent dans leur capacité de bioaccumulation, une différenciation fiable des deux espèces est de rigueur.

1.3. Lien entre état chimique et effets sur le biote

Dans les milieux aquatiques, différents processus physiques (transport, diffusion, adsorption), chimiques (dégradation, liaisons covalentes) et biologiques (biodégradation, accumulation, métabolisation) peuvent transformer les polluants, qui deviendront plus ou moins accessibles et plus ou moins dangereux. Cependant, beaucoup de mécanismes interviennent avant que les contaminants n'atteignent leur cible biologique. Les bivalves par exemple peuvent fermer leur coquille pour limiter l'absorption du polluant. Ils possèdent aussi des mécanismes de tri au niveau des branchies, des palpes labiaux et du système digestif qui sélectionnent les particules selon leur taille, et affectent donc la biodisponibilité des contaminants présents dans la nourriture.

Si le contaminant parvient à pénétrer dans les cellules, l'organisme peut réguler sa biodisponibilité intracellulaire en le métabolisant pour favoriser son élimination, le stocker, le chélater à l'aide de protéines spécifiques (Amiard-Triquet, 2015 ; Rainbow, 2002). Dans les organismes, la distribution intracellulaire des métaux se répartit entre la fraction détournée/stockée (granules, HSP et MT) et la fraction disponible (susceptible de porter atteinte aux organites et aux protéines ; Rainbow, 2002 ; Voets et al., 2009), sans qu'il existe de corrélation entre ces deux fractions. La toxicité survient quand les métaux de la fraction disponible dépassent un certain seuil. Donc lorsqu'on mesure la bioaccumulation totale, sans distinguer ces deux fractions, on ne considère pas uniquement la fraction susceptible d'exercer une action toxique (Rainbow, 2002). Même si la contribution de la fraction détournée est généralement plus importante sur les sites pollués, elle reste souvent insuffisante pour empêcher l'apparition d'effets toxiques (Cain et al., 2004 ; Voets et al., 2009). D'ailleurs, lorsqu'on utilise des organismes provenant d'un milieu naturel pour des expositions en laboratoire, les organismes ont généralement leur fraction détournée au maximum : l'exposition à des contaminants supplémentaires, souvent à des concentrations supérieures à celles du milieu, va entraîner une toxicité puisque le métal partira directement dans la fraction disponible pour exercer des effets, d'où la nécessité d'une phase d'acclimatation/dépuration (Rainbow, 2002).

Différentes techniques existent pour lier les concentrations internes et les effets toxiques, comme les approches CBR (Critical Body Residue approach) et TRA (Tissue Residue Approach) (Amiard et Amiard-Triquet, 2015b ; Voets et al., 2009). La TRA suppose que pour qu'un effet toxique soit observé, le polluant doit avoir atteint son site d'action (pour les composés dont la concentration globale est proportionnelle à la concentration au site d'action, la mesure de la concentration totale bioaccumulée donne une idée de la toxicité).

Les processus de détoxification vont définir la distribution tissulaire et intracellulaire des contaminants, et seront aussi responsables d'un éventuel transfert trophique des contaminants si l'organisme favorise le stockage plutôt que l'élimination (Amiard et Amiard-Triquet, 2015c ; Amiard-Triquet, 2011 ; Bervoets et al., 2005). Au vu des résultats cités en 1.2.3 (p15), il semblerait que ce transfert trophique chez les dreissenés dépende surtout des contaminants en question, et qu'il soit difficile de dégager une tendance générale. Une étude plus récente (Matthews et al., 2015) montre aussi des différences inter et intra-spécifiques chez les dreissenés, en lien avec l'habitat (profondeur, régime de température) et la physiologie (dépense énergétique, filtration, taux de croissance). Cette étude ne met pas non plus en évidence d'influence de la taille sur la concentration accumulée : si la croissance augmente l'effet dilution, la préférence des prédateurs pour des proies plus grosses n'augmentera pas le transfert trophique (Matthews et al., 2015). Ces mêmes auteurs suggèrent que si la dominance des dreissenés va en faveur de *D. r. bugensis*, on devrait *a priori* avoir une réduction du transfert trophique (Matthews et al., 2015).

Dans tous les cas, une forte concentration dans l'organisme ne veut pas forcément dire effets toxiques (Berthet et al., 1992 ; Rainbow, 2002). L'enjeu de la biosurveillance est de caractériser à la

fois le danger (en identifiant les sources potentielles de dommages, comme les méthodes présentées précédemment) et le risque pour les organismes (la probabilité qu'ils en subissent les effets), et qu'à terme l'écosystème entier en soit affecté (Vasseur et Cossu-Leguille, 2003). Plusieurs démarches de modélisation tentent de faire le lien entre danger, risque et effet.

Les modèles TKTD (Toxicokinetic Toxicodynamic) permettent de simuler les processus aboutissant à des effets toxiques pour les organismes (Figure 2). La toxicocinétique (TK) transpose une concentration externe en une concentration interne en prenant en compte les processus d'assimilation, le temps d'exposition et d'élimination. La toxicodynamique (TD) permet de relier quantitativement une concentration interne avec les effets individuels à long terme (Attig et al., 2010 ; Jager et al., 2011). Les TKTD permettent d'inclure simultanément tous les effets observés, d'extrapoler les effets observés entre différents scénarios d'exposition et facilitent les comparaisons des mécanismes d'action des polluants sur différentes espèces à différents stades de vie (Jager et al., 2011). Les modélisateurs sont cependant libres, pour un facteur donné (e.g. mortalité), de choisir arbitrairement les paramètres utilisés dans la construction de leur modèle pour répondre à leur hypothèse ; à chaque question posée correspondra donc un modèle différent. La comparaison de modèles TKTD avec d'autres modèles de survie (CBR, DEBtox) a donc conduit au développement d'un modèle plus généraliste, le GUTS (General Unified Threshold Model ; Jager et al., 2011). Ce type de modèle nécessite cependant une compréhension approfondie des mécanismes d'action des polluants, et de la façon dont ils sont régulés par les organismes.

La présence simultanée de contaminants dans le milieu peut entraîner des effets synergétiques ou antagonistes. Le dosage indépendant de chaque polluant peut mener à la conclusion qu'il n'y a pas de danger, si on les compare aux seuils réglementaires. En revanche, seule l'évaluation des effets biologiques d'un mélange de polluants permettra de dire si leur combinaison est dangereuse ou non pour les organismes (Oertel et Salanki, 2003). A l'heure actuelle, la modélisation ne permet pas de prédire avec certitude l'accumulation et la toxicité des contaminants. Il apparaît alors nécessaire de compléter le monitoring chimique avec des approches écologiques et biologiques plus intégratives, et parfois plus faciles à mettre en place et moins coûteuses (Allan et al., 2006b). Ces indicateurs permettent de mesurer les réponses du biote à une exposition toxique, chacun présentant ses propres avantages et inconvénients. Ils doivent être choisis avec soin, selon la question posée et les moyens financiers (Allan et al., 2006a ; Figure 2).

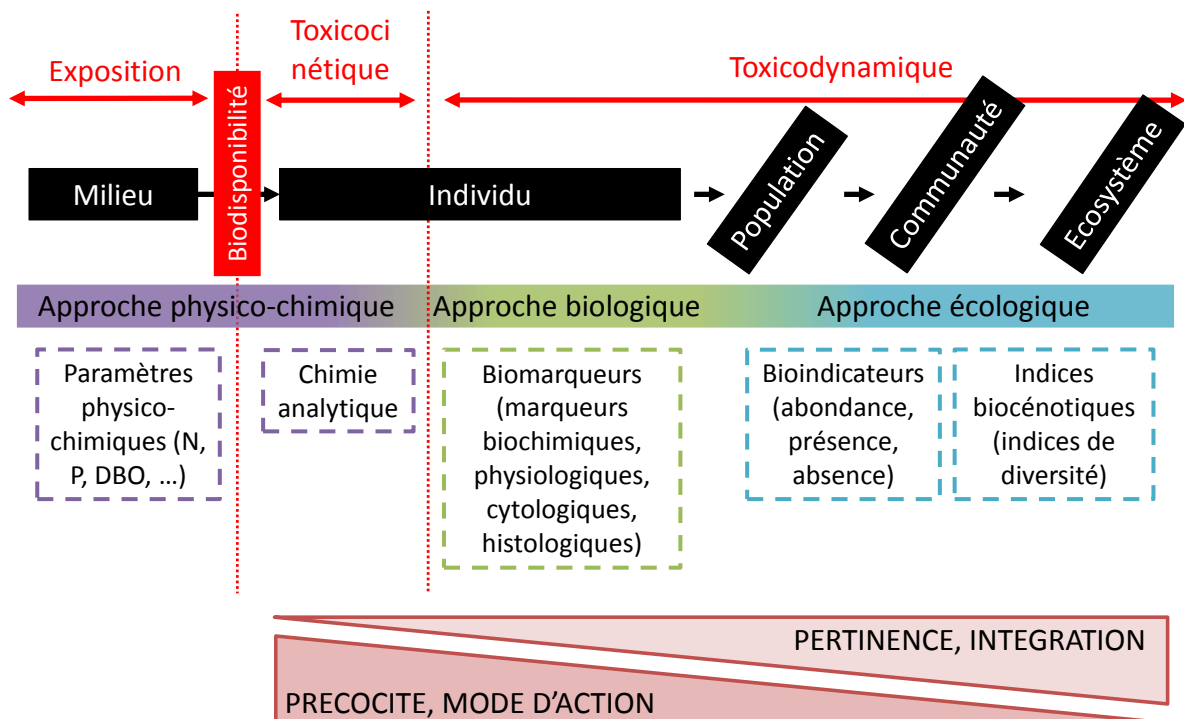


Figure 2 : Evaluation des effets des contaminants à différents niveaux d'organisation biologique (d'après Amiard et al., 1998)

2. Evaluation de l'état écologique : bioindication et outils disponibles aux échelles supra-individuelles

Contrairement au monitoring chimique, le monitoring biologique (biomonitoring ou biosurveillance⁴) permet d'intégrer l'effet des contaminants sur les organismes. Il est en général moins onéreux et nécessite moins d'équipements sophistiqués. S'intéresser à la présence d'espèces bioindicatrices, ou à leur état de santé, permet d'évaluer l'état écologique des milieux et de mettre en évidence les effets de stress subis sur le long terme et de changements brutaux (Amiard et al., 1998 ; Li et al., 2010). Une espèce sentinelle est un type particulier d'organisme indicateur, susceptible d'être utilisée en tant qu'indicateur de la présence et de la toxicité d'au moins un contaminant, et qui permet d'évaluer les effets potentiels de ce contaminant sur la santé humaine ou celle de l'environnement (Amiard et al., 1998).

Les mesures réalisées dans le cadre de la biosurveillance peuvent se faire à n'importe quel niveau d'organisation biologique. Historiquement, les outils développés se sont d'abord focalisés sur les niveaux hiérarchiques les plus hauts (population, communauté, écosystème ; Chapman et al., 1996 ; Li et al., 2010). Différentes méthodes existent, selon les objectifs à atteindre fixés par la réglementation.

⁴ Utilisation du vivant (organisme ou ensemble d'organismes, à tous les niveaux d'organisation biologique) pour surveiller l'évolution des modifications, des altérations ou la stabilité de la qualité d'un milieu (IRSTEA, 2010)

2.1. Au niveau écosystémique

Au niveau écosystémique, il est possible de quantifier la biomasse, ou des processus écosystémiques tels que la productivité, la décomposition de la matière organique ou encore la dynamique des nutriments. Les cycles des nutriments et des minéraux, ainsi que les flux de matière et d'énergie peuvent être modifiés, par exemple si les assemblages de producteurs/consommateurs/décomposeurs sont modifiés (Lindeman, 1942). Des mesures plus fonctionnelles permettent aussi de mettre en évidence les effets des contaminants sur un écosystème, comme la diminution de l'activité photosynthétique du phytoplancton ou le ralentissement de la décomposition de la litière par les détritivores (Colas et al., 2013 ; Newman, 2015d). Ce niveau écosystémique est le plus intégrateur et permet de s'assurer (ou non) de leur bon fonctionnement.

2.2. Aux niveaux des communautés et des populations

Les communautés représentent l'intégrité écosystémique dans son ensemble puisqu'elles sont le reflet des facteurs physiques, chimiques et biologiques qui agissent sur le système (Connon et al., 2012). Elles intègrent les effets au niveau des populations et peuvent permettre de prédire les effets au niveau écosystémique.

La mesure d'assemblage d'espèces est couramment réalisée pour évaluer les effets de la pollution. Les mesures les plus communes sont la richesse spécifique (nombre d'espèces présentes dans une communauté, qui permet d'observer la disparition d'espèces, S), l'uniformité (répartition uniforme du nombre d'individus au sein de chaque espèce, qui permet d'observer la dynamique de la communauté, une modification dans sa structure, même si aucune espèce ne disparaît, Pielou J) et l'abondance (nombre total d'individus présents). Ces paramètres contribuent à la diversité spécifique (souvent associée à l'hétérogénéité), qui peut être quantifiée à l'aide de différents indices de diversité (Shannon-Wiener H', Brillouin, Simpson D, Margalef Dm ; Johnston et Roberts, 2009). La composition en espèces peut être modifiée suite à différents stress et ces indices ont tendance à diminuer en présence de polluants. On peut par exemple comparer le nombre d'espèces présentes dans un site contaminé par rapport à un site de référence, et observer la présence ou l'absence d'espèces bioindicatrices qui témoigneront de la qualité du site ; un site pollué contient généralement moins d'espèces que son homologue non pollué, et les contaminants peuvent réduire significativement la diversité et l'uniformité des écosystèmes (Johnston et Roberts, 2009). La réponse peut être directe (perte d'espèces sensibles, modification de la structure de la communauté) ou indirecte (modification des interactions intra et interspécifiques telles que la compétition et la prédation ; Clements et al., 2000). Cependant, dans leur revue sur le milieu marin, Johnston et Roberts (2009) notent que dans 20% des études reportées, les contaminants ne modifient pas la structure des communautés.

Différents indices ont été créés pour évaluer la richesse, l'abondance et la structure de différents groupes taxonomiques dont les plus utilisés sont le périphyton, les macroinvertébrés benthiques et les poissons (Li et al., 2010). Historiquement, on utilisait l'indice saprobique ou l'indice de Trent, le BMWP (Biological Monitoring Working Party score), qui étaient plutôt basés sur la présence d'espèces clés que sur l'échantillonnage complet de tous les taxons présents (Chapman et al., 1996). Pour le périphyton, constitué de producteurs primaires à cycle de vie court et à reproduction rapide, il existe l'IBD (Indice Biologique Diatomées). Pour les macroinvertébrés, très importants dans le réseau trophique, l'IBGN (Indice Biologique Global Normalisé) et l'I2M2 (Indice Invertébrés Multimétrique) et enfin l'IPR (Indice Poissons Rivières) pour les poissons. Il existe également l'indice oligochètes et l'IBMR (Indice Biologique Macrophytes Rivière).

Au niveau populationnel, d'autres paramètres sont évalués tels que l'occurrence, l'abondance, le succès reproducteur, la structure des classes d'âge/taille, la mortalité, la réduction de l'abondance et de la biomasse, la structure génétique (Clements et al., 2000 ; Oertel et Salanki, 2003).

De nouvelles méthodologies ont également été développées, comme le SSD (Species Sensitivity Distributions ; Forbes et Calow, 2002 ; Posthuma et al., 2002) qui combine les distributions de la sensibilité de différentes espèces à un composé et permet de déterminer la concentration qui va protéger x% des espèces présentes ou le SPEAR (Species at Risk) un indice basé sur les attributs biologiques (traits) des espèces, plutôt que sur la taxonomie, pour détecter les contaminants. L'emploi des traits bio(éco)logiques, qui décrivent à la fois la physiologie, la morphologie, l'histoire de vie, le comportement, permettent de prendre en compte les interactions entre les espèces et leur écosystème (Borja et al., 2015). Les FFG (Functional Feeding Groups) sont basés sur les mécanismes d'acquisition de nourriture plutôt que sur le groupe taxonomique. Certains auteurs suggèrent aussi une approche populationnelle, basée sur la comparaison de la niche théorique et la niche réalisée, en utilisant des traits tels que l'habitat, les habitudes alimentaires et la taille ; certains taxons vont modifier ces traits en présence de contaminants, ce qui permet d'identifier les espèces vulnérables et de prédire les effets de perturbations aux niveaux supérieurs (Colas et al., 2014).

Des approches multimétriques existent et permettent d'intégrer un ensemble de réponses (richesse, abondance, dominance, tolérance à la pollution...). L'IBI (Index of Biotic Integrity) combine plusieurs éléments de qualité (composition et richesse en espèces, caractéristiques trophiques, abondance...) et permet de générer un indice de qualité pour un site donné (Newman, 2015d). Dans le cadre de la DCE, l'utilisation de l'IBMWP (Biological Monitoring Working Party Score System) est recommandée.

Ces indices cependant ne considèrent pas l'identité des espèces (polluo-tolérantes ou polluo-sensibles), ni l'altération de la structure des communautés qui peut masquer certains effets (on peut avoir

une modification des espèces, sans qu'il y ait une modification du nombre d'espèces présentes ; Johnston et Roberts, 2009). De plus, si l'échantillon est trop petit, on peut passer à côté d'espèces rares.

Une détérioration, révélée par des approches écologiques, est en général due à des stressseurs qui ont commencé à impacter les écosystèmes bien des années avant (Figure 3 ; Vasseur et Cossu-Leguille, 2003). Des modifications dans la structure des communautés sont d'une grande pertinence écologique et peuvent témoigner d'une modification du milieu, mais peinent à en identifier les causes précises (eutrophisation, pollution, dégradation de l'habitat) et ne fournissent pas d'explication mécanistique à la réponse observée (Connon et al., 2012 ; Vasseur et Cossu-Leguille, 2003). D'autres outils sont recommandés, tels que l'utilisation des réponses biologiques à d'autres niveaux d'organisation, en tant que biomarqueurs de présence/d'effets des contaminants (Allan et al., 2006b ; Amiard et al., 1998).

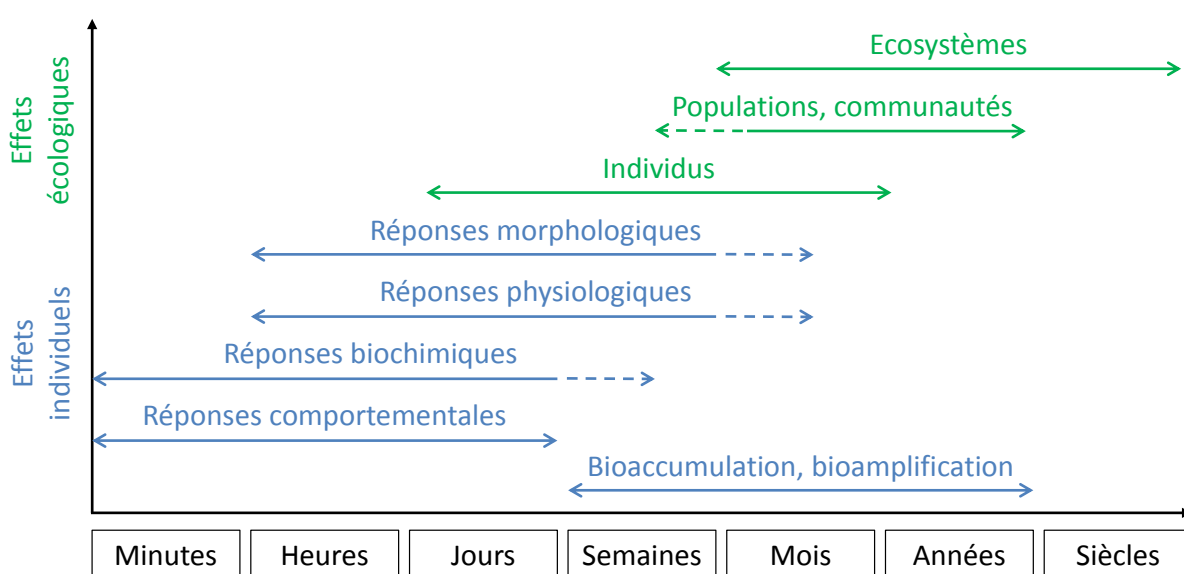


Figure 3 : Effets des contaminants à différents niveaux d'organisation et leur durée (d'après Chapman et al., 1996)

3. Marqueurs au niveau individuel

Au niveau individuel, on réalise généralement des tests de toxicité ou des biotests.

Les tests de toxicité aigüe sont généralement effectués en laboratoire pour évaluer la Concentration Létale⁵ d'un composé. En pratique, la mort des individus peut cependant être provoquée de manière indirecte lors d'une exposition sublétales (augmentation de la prédation, problème pour l'accouplement ; Newman, 2015e).

Les biotests prennent généralement en compte des paramètres sub-létaux pour des conditions définies (un intervalle de temps, une température), et peuvent être effectués *in situ* ou en laboratoire à partir d'échantillons d'eau et de sédiments collectés sur le terrain. Les biotests permettent la

⁵ CL_n = concentration d'un toxique entraînant la mort de n% d'individus dans une population donnée, pendant un temps donné, dans des conditions données (IRSTEA, 2010)

détermination des CE_n (Concentration entraînant un Effet pour n% de la population) et peuvent concerner des paramètres physiologiques (production d'oxygène, alimentation, activité de filtration, respiration, excrétion, osmorégulation, bioénergétique), développementaux (croissance, asymétrie), reproductifs (changements mâle/femelle, comportement sexuel, fertilité) ou biochimiques (inhibition d'enzyme, bioluminescence ; Chapman et al., 1996).

Le comportement des organismes peut aussi être affecté en présence de polluants ; ils peuvent modifier leurs préférences, ou éviter certains facteurs (lumière, température, salinité, courant), modifier leur activité (léthargie, hyperactivité), leur alimentation, leur performance (comportement natatoire), et autres (apprentissage, activité respiratoire, prédation, compétition, interactions sociales). Les mesures comportementales sont parfois difficile à quantifier, présentent beaucoup de variabilité, et sont de fait souvent effectuées en laboratoire.

L'indice de condition (IC) est aussi un bon indicateur d'état de santé global des organismes ; chez les bivalves, il illustre le taux de remplissage de la coquille. La diminution de l'IC est principalement reliée à une perte de masse, qui peut être due à une perte de poids suite à la libération des gamètes ou à une croissance plus faible (réallocation énergétique pour lutter contre un stress toxique). Il donne ainsi une idée du statut nutritionnel et du stress subi par les organismes. Un IC élevé est en général associé à un meilleur état des individus, mais Bourgeault et al. (2010) trouvent un meilleur IC pour les individus de *D. polymorpha* vivant sur le site le plus pollué, car il y a plus de nourriture disponible. Cela met en évidence, à cette échelle aussi, la difficulté d'établir un lien direct entre contamination et effet, du fait de la multitude d'interactions, directes et indirectes, ayant lieu au sein d'un écosystème.

Ces modifications, qui résultent de causes sub-individuelles, mettent en évidence les effets d'une contamination ; ils sont directement liés à la dynamique des populations et des communautés et peuvent permettre de prédire les effets sur la fitness et le risque aux échelles supérieures. Ils sont pertinents pour déterminer la toxicité relative de différents composés, et pour comparer la toxicité des molécules entre différents groupes taxonomiques (Newman, 2015e).

Chez les dreissènes, l'activité de filtration est couramment utilisée comme marqueur d'état de santé individuel. Alors que la théorie associe une baisse de cette activité comme un marqueur de stress, Kraak et al. (1993) montrent que la mortalité de *D. polymorpha* augmente avec le temps d'exposition à Cu, Zn, Cd, pris séparément ou en mélange, sans qu'il n'y ait d'effet sur l'activité de filtration. Leur étude prouve que les effets des contaminants sur la survie et la filtration sont indépendants, et qu'on ne peut pas toujours prédire les effets à long terme (e.g. survie) à partir d'effets à court terme (e.g. filtration).

Les tests de toxicité et les biotests sont généralement réalisés sur des espèces modèles, avec différents paramètres mesurés. On peut citer *Vibrio fischeri*, *Pseudomonas sp.* (bioluminescence, croissance, statut métabolique), des algues comme *Selenastrum sp.*, *Raphidocelis subcapitata*⁶ (activité

⁶ Anciennement nommée *Pseudokirchneriella subcapitata*

photosynthétique, inhibition croissance), des invertébrés comme *Gammarus sp.*, *Hyalella sp.*, des chironomes, des daphnies, *Crassostrea gigas* (développement larvaire, mortalité, croissance), des poissons (*Danio rerio* ; Allan et al., 2006b). Mais ces espèces sont souvent absentes des écosystèmes que l'on cherche à protéger. De plus, lorsque les lignées sont élevées au laboratoire, cela entraîne une diminution de la variabilité génétique, et les différences de tolérance entre des organismes de laboratoire et des populations naturelles adaptées à leur milieu compliquent l'application des résultats obtenus (Amiard-Triquet, 2015 ; Giesy et Graney, 1989). Si les organismes utilisés en laboratoire proviennent à l'origine d'un site pollué, ou s'ils ont été exposés sur plusieurs générations à des contaminants, ils seront plus résistants et les CL₅₀ déterminées sous estimeront le danger encouru par les populations naturelles. Pour pallier à ces différences, des facteurs de correction sont souvent apportés aux seuils de toxicité (Férard et Blaise, 2013). Klerks et Weis (1987) soulignent aussi que l'acquisition de la tolérance peut avoir des conséquences importantes au niveau des biotests et de la biosurveillance. En effet, si les standards de qualité environnementale sont établis sur des populations tolérantes, alors il y a un biais (Johnston, 2011). De plus, les polluants sont testés isolément, alors qu'ils sont présents en mélange *in situ*, où leurs effets peuvent se combiner ou s'annihiler. Enfin, ils se déroulent en conditions contrôlées et ne rendent pas compte des contraintes naturelles auxquelles sont soumises les organismes dans leur milieu naturel.

Partie II : Les biomarqueurs au niveau sub-individuel : des outils précoces et intégrateurs de la contamination du milieu

Les espèces bioindicatrices peuvent, au travers de l'abondance des individus, rendre compte de la qualité du milieu. Mais même s'ils sont présents dans le milieu, l'état de santé des taxons bioindicateurs peut être affecté par les polluants. Les outils biologiques, c'est-à-dire les mesures réalisées du niveau cellulaire au niveau comportemental et incluant les biomarqueurs, permettent de détecter les effets de l'ensemble des contaminants qui pourraient ne pas être détectés individuellement lors du monitoring chimique (Allan et al., 2006a). Ils peuvent aussi indiquer d'éventuelles lésions ou dysfonctionnements physiologiques chez ces individus et permettre d'anticiper des effets délétères pouvant affecter la dynamique de population (e.g. en modifiant la capacité à se reproduire ou la fécondité ; Amiard et al., 1998). En effet, les contaminants commencent par affecter les biomolécules avant que des effets plus visibles ne se répercutent à des niveaux d'organisation supérieurs (Figure 3). Identifier les mécanismes sub-individuels qui sont affectés par les contaminants permet de 1) comprendre la cause des effets observés aux niveaux supérieurs et 2) de prédire les effets de contaminants ayant des modes d'action similaires. Les modifications observées au niveau sub-individuel sont indicatrices de l'exposition à des contaminants biodisponibles et peuvent être utilisées comme des biomarqueurs (Newman, 2015f).

1. Définition

De multiples définitions de ce terme coexistent dans la littérature. Celle que nous retiendrons ici est celle de Depledge (1994) : les biomarqueurs sont définis comme des paramètres biochimiques, cellulaires, physiologiques ou comportementaux qui peuvent être mesurés dans les tissus ou les fluides d'un organisme ou sur l'organisme entier, pour mettre en évidence l'exposition à, ou les effets, d'un ou plusieurs contaminants. Ils permettent d'intégrer l'exposition à plus ou moins long terme à un contaminant et reflètent la manière dont les organismes sont affectés (Contardo-Jara et al., 2009 ; de Lafontaine et al., 2000 ; van der Oost et al., 2003). Ils permettent de savoir si la qualité d'un milieu s'améliore ou se dégrade, d'identifier les causes de perturbations observées à des niveaux supérieurs (communautés), ou encore d'identifier une pollution spécifique (Vasseur et Cossu-Leguille, 2003). Utilisés *in situ*, ils sont des manifestations directes de l'exposition simultanée des organismes à tous les facteurs de stress du milieu.

Comme les changements au niveau sub-individuel sont détectables avant que des effets délétères n'apparaissent aux niveaux supérieurs, l'approche par biomarqueurs est souvent considérée comme un signal d'alarme (de Lafontaine et al., 2000 ; Depledge, 1994 ; Newman, 2015f ; Vasseur et Cossu-Leguille, 2003). Cependant, leur réalisme écologique est réduit par rapport aux indicateurs basés sur la

richesse spécifique ou le potentiel reproductif. Malgré tout, comme nous le verrons par la suite, les biomarqueurs chez *D. polymorpha*, sont fréquemment utilisés pour évaluer les effets des polluants, aussi bien en laboratoire qu'*in situ*.

Ils peuvent être utilisés dans un contexte de biosurveillance, comme outil de diagnostic (lorsqu'ils mettent en évidence des effets au niveau individuel) ou comme outil prédictif (lorsqu'ils présagent de perturbations au niveau populationnel ; den Besten, 1998 ; Depledge et Fossi, 1994 ; Vasseur et Cossu-Leguille, 2003), et sont au cœur de nombreux programmes de recherche, notamment en milieu marin où leur application est plus développée qu'en eau douce (Allen et Moore, 2004 ; Lam et Gray, 2003). Les biomarqueurs présentés ici peuvent être mesurés à différentes échelles sub-individuelles (tissu, organe, cellule) et permettent une meilleure compréhension du mode d'action des polluants lorsqu'ils pénètrent dans les organismes.

2. Biomarqueurs de défense

Les biomarqueurs de défense permettent aux organismes de faire face à la présence de contaminants. Ils ont généralement un rôle dans la tolérance des organismes, puisqu'ils détoxifient les contaminants bioaccumulés, limitent leur assimilation et/ou facilitent leur excrétion. Ils permettent de minimiser la présence de polluants dans la cellule, qui pourraient endommager différentes cibles cellulaires (Newman, 2015f).

2.1. Enzymes de biotransformation

Les enzymes de biotransformation jouent un rôle dans l'homéostasie, la détoxification et l'excrétion des xénobiotiques (Faria et al., 2009 ; Habig et al., 1974).

Le cytochrome P450 1A appartient à la grande famille des oxygénases à fonction mixte. Son activité (activité EROD, éthoxyrésorufine-O-dééthylase) permet de biotransformer les polluants hydrophobes en composés hydrosolubles, préservant ainsi l'intégrité cellulaire. Cette enzyme est peu exprimée en temps normal, mais fortement inductible en présence de polluants. Elle participe à la phase I de biotransformation des xénobiotiques (Roméo et Giambérini, 2008) et présente une faible spécificité de substrat puisqu'elle est inductible par de nombreux polluants organiques (PCB, HAP, dioxines, DDT, pesticides ; Lagadic et al., 1994 ; Vasseur et Cossu-Leguille, 2003). D'autres molécules que les oxygénases peuvent aussi intervenir dans ces réactions de phase I (époxydes hydrolases, estérases, amidases).

Les glutathion S-transférases (GST) sont des enzymes cytosoliques de phase II qui catalysent la conjugaison des composés toxiques, ayant généralement subi les réactions de phase I, avec un groupement -SH (issu le plus souvent du glutathion) (Figure 4). L'ajout de ce groupement va neutraliser les sites électrophiles des xénobiotiques, les rendant plus hydrosolubles et donc plus facilement

excrétables (Contardo-Jara et al., 2009 ; Faria et al., 2009 ; Habig et al., 1974). D'autres enzymes peuvent également intervenir lors de cette phase II, en conjuguant d'autres groupements endogènes (dérivés de glucides, acides aminés, sulfate) sur les molécules étrangères. Les uridinediphospho glucuronosyltransférases (UDP GT) sont les plus importantes et conjuguent de l'acide glucuronique sur le xénobiotique pour aboutir à un composé polaire ; les sulfotransférases (SULT) conjuguent des groupements sulfates (Newman, 2015f).

Ce système peut parfois être à l'origine de la production de métabolites encore plus réactifs, voire mutagènes, que la molécule mère ; il devient délicat de parler de détoxification dans ce cas.

Les activités de biotransformation chez les invertébrés et leur induction sont faibles comparé à celles observées chez les vertébrés. L'activité de la GST est toutefois très utilisée comme biomarqueur de pollution organique (Cajaraville et al., 2000 ; Robillard et al., 2003). Chez les bivalves, les GST sont généralement considérées comme des biomarqueurs d'exposition sensibles à de nombreux contaminants ; cependant, les réponses observées peuvent varier en fonction des espèces ou des tissus cibles (Faria et al., 2009). L'activité des GST peut aussi être augmentée en cas de stress oxydant, car elles contribuent à la biotransformation des peroxydes lipidiques. L'activité des GST peut donc être induite directement ou indirectement par la présence d'un composé toxique (Contardo-Jara et al., 2014).

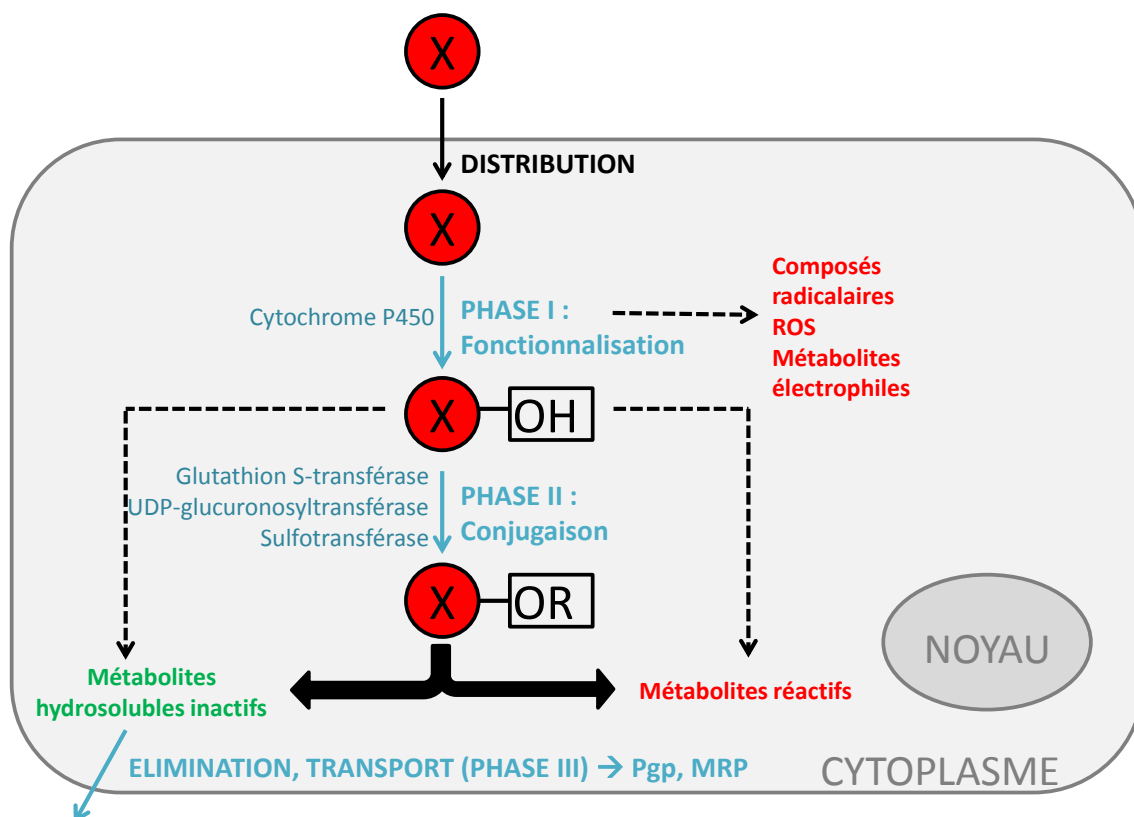


Figure 4 : Mécanismes de biotransformation des xénobiotiques cellulaires - Rôle de la GST

2.2. Activité MXR

Différents mécanismes permettent d'expulser les polluants ou leurs métabolites (issus des phases I et II) afin de protéger la cellule (Achard, 2004 ; Epel, 1998 ; Pain et Parant, 2003a). Chez les organismes aquatiques, ces mécanismes ont été regroupés sous le vocable de MXR (Multixenobiotic Resistance ou résistance multixénobiotique ; Bard, 2000 ; Smital et al., 2000).

Le MXR repose sur l'activité de transporteurs membranaires de la famille des ABC (ATP-Binding Cassette), qui vont, en hydrolysant de l'ATP, expulser une grande variété de composés en dehors de la cellule (phospholipides, ions, peptides, acides biliaires, polysaccharides, nutriments, toxines, xénobiotiques ; Bard, 2000 ; Leslie et al., 2005 ; Smital et al., 2000).

Deux types de protéines sont principalement responsables de ce phénomène : la P-glycoprotéine (P-gp ou MDR1), qui prend en charge des molécules modérément hydrophobes, amphiphiles, chargées positivement ou neutres, et les MRP (Multidrug Resistance associated Protein) qui transportent des anions organiques et des anions conjugués issus de la voie de biotransformation des xénobiotiques (Bard, 2000 ; Leslie et al., 2005).

Les transporteurs MXR sont présents dans les différents règnes et sont généralement exprimés dans des tissus ayant une fonction de barrière ou impliqués dans la sécrétion et l'absorption, et particulièrement exposés à la pollution (Bard, 2000 ; Pain et Parant, 2003a).

Le système MXR agirait donc comme une ligne de défense en cas de pénétration de xénobiotiques dans les cellules, et peut de ce fait être considéré comme la phase III de détoxification des polluants (Bard, 2000 ; Epel, 1998 ; Smital et al., 2000 ; Figure 4). De nombreuses études ont montré que les protéines responsables de l'activité MXR sont inductibles par un large panel de contaminants environnementaux, mais également par des facteurs de stress plus généraux relatifs aux conditions biotiques et abiotiques du milieu. Leurs niveaux d'expressions sont d'ailleurs souvent intimement liés aux concentrations en polluants (Pain et Parant, 2003a ; Tutundjian et Minier, 2007). Le large spectre de substrats qu'elle peut prendre en charge et son inductibilité font de l'activité MXR un biomarqueur généraliste de pollution assez couramment utilisé dans les études de surveillance environnementale (Achard, 2004 ; Pain et Parant, 2003a ; Smital et al., 2000).

Ce système serait moins efficace pour l'expulsion des métaux que pour les composés organiques (Minier et al., 1993) et il peut être inhibé par certaines molécules comme des polluants émergents, des substances naturelles (Luckenbach et al., 2004 ; Smital et al., 2004) ou des antidépresseurs (Magni et al., 2017) ; on parle d'effet chimiosensibilisant.

2.3. Phosphatase acide

Les phosphatases sont des enzymes que l'on retrouve chez tous les organismes, des archées aux mammifères, confirmant le rôle fondamental de ces protéines dans les processus biochimiques. Elles

appartiennent à la classe des hydrolases et catalysent l'hydrolyse des liaisons esters en formant du phosphate inorganique. Elles sont classées selon leur pH optimum en phosphatase alcaline ($\text{pH} > 8$) ou phosphatase acide ($\text{pH} < 6$; Seitkalieva et al., 2015).

La phosphatase acide (ACP, pour Acid Phosphatase), est une enzyme lysosomale jouant un rôle dans la dégradation de nombreuses molécules biologiques et dans la détoxification des polluants (Giambérini et Pihan, 1997 ; Suresh et Mohandas, 1990). Lorsque la capacité de stockage des lysosomes est dépassée, ou qu'ils sont trop endommagés, ils éclatent et libèrent les enzymes lysosomales (dont l'ACP) dans le cytoplasme et l'environnement extracellulaire. La mesure quantitative de ces enzymes est utilisée comme marqueur de stress toxique.

Selon Suresh et Mohandas (1990), certains polluants métalliques peuvent augmenter indirectement l'activité ACP, en favorisant la peroxydation lipidique des membranes lysosomales, et donc la libération d'ACP dans le cytosol. En général, cette déstabilisation des membranes se produit au début de l'exposition, donc l'activité ACP atteint un plateau assez tôt. A de faibles concentrations, la présence d'ions métalliques provoque une augmentation de la disponibilité des ACP lysosomales pour métaboliser et séquestrer les ions métalliques. L'hypersynthèse et la libération d'ACP des hémocytes vers l'hémolymphe quand les mollusques sont exposés à un stress métallique a déjà été reportée (Suresh et Mohandas, 1990).

La réponse de l'activité des ACP dépend de l'organe et de l'espèce dans lesquels on la mesure, mais aussi du mode de vie, de l'habitat et de l'alimentation des organismes (Seitkalieva et al., 2015). Dans leur étude sur *Henricia sp.* et *Ceramaster patagonicus*, Seitkalieva et al. (2015) ont montré que l'activité spécifique des ACP est plus élevée que celle des phosphatases alcalines (ALP). Ils ont également montré que l'activité au niveau du système digestif est 1.5 à 3 fois plus élevée que dans les gonades, confirmant ainsi le rôle des phosphatases dans la dégradation des biopolymères et le rôle important de cette enzyme dans le processus de digestion des invertébrés marins.

2.4. Métallothionéines

Les metallothionéines (MT) sont des protéines riches en cystéines, de faible poids moléculaire (12-15 kDa) qui lient les ions métalliques (Amiard et al., 2006). Elles participent à la régulation (homéostasie) des métaux essentiels (Zn, Cu) et à la détoxification des métaux non essentiels (Cd, Hg, Ag) chez de nombreux organismes (bactéries, champignons, invertébrés, vertébrés ; Newman, 2015f ; Roméo et Giambérini, 2008). Elles peuvent aussi agir comme des piègeurs de radicaux libres et de métabolites réactifs de l'oxygène, grâce à leurs groupements thiols. Leur forte affinité pour beaucoup de métaux empêche ces derniers de se lier à d'autres fragments cellulaires, évitant ainsi leur effet toxique. Elles participent à la spéciation intracellulaire des métaux et sont inductibles lors d'une exposition métallique (Marie et al., 2006a).

Toutefois, Voets et al. (2009) montrent que chez *D. polymorpha* les MT cytosoliques ne sont pas saturées par le Cu, le Zn et le Cd, prouvant ainsi que leur efficacité dépend de leur affinité pour certains métaux, et qu'elles n'empêchent pas toujours la liaison des métaux aux fractions sensibles.

2.5. Protéines de stress

Les protéines de stress (ou chaperonnes) sont induites en cas de lésions des biomolécules, pour reconnaître les protéines dénaturées ou agrégées, les réparer et restaurer leur fonction ; si le dommage est trop grand, elles font en sorte de les éliminer. Elles ont été découvertes dans des organismes soumis à un stress thermique, d'où leur ancien nom HSP (Heat Shock Protein ; Amiard-Triquet, 2011), mais en réalité elles réagissent à de nombreux stress (anoxie, métaux, UV, xénobiotiques, stress oxydant). Certaines (les HSP 70 par exemple) sont exprimées de manière constitutive et ont un rôle dans l'homéostasie des protéines (Newman, 2015f).

2.6. Biomarqueurs de stress oxydant

Les radicaux libres sont des atomes, des molécules ou des ions possédant des électrons non appariés, rendant ces composés très réactifs ; ils sont souvent assimilés aux ROS (Reactive Oxygen Species, ou espèces réactives de l'oxygène en français). Il faut noter que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) bien que n'étant pas un radical, reste une espèce plus réactive que l'oxygène moléculaire (Lushchak, 2011).

Il existe différents mécanismes de formation des ROS au sein des systèmes biologiques, mais la plupart sont issus de la réduction partielle de l'oxygène. Chez les eucaryotes, la majeure partie (90 %) de l'oxygène moléculaire est réduite par 4 électrons au niveau de la chaîne mitochondriale de transport d'électrons, afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP. Pour les 10 % restants, l'oxygène sera réduit par un seul électron (oxygène singulet), entraînant la production en chaîne de ROS (anion superoxyde, $O_2^{\cdot-}$), qui est ensuite réduit en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et finalement en radical hydroxyle ($\cdot OH$) et anion hydroxyle (OH^- ; Livingstone et al., 1992 ; Lushchak, 2011). La chaîne se termine par la production d'eau, après l'ajout d'un électron et/ou d'un proton (Figure 5). Les ROS peuvent aussi être produits, dans une moindre mesure, par la chaîne de transport d'électrons du réticulum endoplasmique, par les cytochromes P450/les oxygénases (réactions d'oxydoréduction lors du catabolisme des xénobiotiques ; transfert d'électrons lors de la phase I de détoxification ; Faria et al., 2009), par l'action d'oxydases cytosoliques ou peroxysomales, par l'autooxydation de certains composés cellulaires, les réactions d'oxydoréduction, la radiolyse, la photosensibilisation des pigments, les métaux de transition et d'autres systèmes spécifiques (NADPH-oxydase, NO-synthase ; Livingstone et al., 1992 ; Lushchak, 2011). Les ROS sont donc produits de manière permanente, en tant que produits secondaires du métabolisme aérobie (Lushchak, 2011).

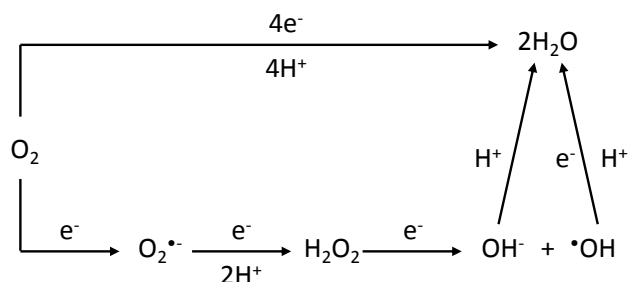


Figure 5 : Voies métaboliques de l'oxygène, d'après (Lushchak, 2011)

Certains paramètres environnementaux sont capables d'induire la production de ROS chez les organismes aquatiques. Les augmentations de température affectent tout particulièrement les organismes ectothermiques, puisqu'en stimulant les processus métaboliques, la consommation d'oxygène va augmenter, parallèlement à la production de ROS. La génération d'oxyradicaux est courante, et pourrait être augmentée en cas d'hypoxie ou d'hyperoxie, de recouvrement post-anoxique, dans les environnements sulfidiques et en cas d'ingestion de toxiques (Livingstone et al., 1992). Les métaux peuvent aussi affecter les organismes en interférant avec les cycles oxydoréducteurs, entraînant la production de ROS (Marasinghe Wadige et al., 2014).

Du fait de leur réactivité, les ROS peuvent interagir avec les composants cellulaires et extracellulaires, tels que l'ADN, les protéines et les lipides, provoquant peroxydation lipidique, dommages à l'ADN, inactivation d'enzymes, dégradation des protéines et parfois perturbation de la synthèse de l'ATP et au final, la mort cellulaire (Livingstone et al., 1992). Ils peuvent parfois avoir des effets bénéfiques, en attaquant les pathogènes et protégeant ainsi les organismes des infections (Lushchak, 2011).

Le métabolisme des ROS est donc sous contrôle très fin, grâce à l'action de molécules antioxydantes, et leurs concentrations dépassent rarement 10^{-8} M (Halliwell et Gutteridge, 1989). Lorsque la balance entre la production de ROS et leur élimination est perturbée, la concentration en ROS augmente, le statut oxydoréducteur est perturbé et des dommages cellulaires apparaissent. C'est ce qu'on appelle le stress oxydant (ou stress oxydatif ; Lushchak, 2011), qui peut apparaître chez toutes les formes de vie aérobie (van der Oost et al., 2005). Les organismes aquatiques sont capables de générer et de dégrader les radicaux libres, et de réparer les composés oxydés et endommagés. Mais la forte pollution présente dans leur écosystème peut perturber ces processus et favoriser le stress oxydant (Lushchak, 2011), soit en modifiant les mécanismes de gestion du stress oxydant, soit en contribuant à la génération de radicaux libres (Newman, 2015f).

Les systèmes antioxydants chez les organismes aquatiques, présentés en Figure 6, comprennent à la fois des composés de haut et bas poids moléculaire (Livingstone, 2001).

Les antioxydants de faible poids moléculaire incluent des agents réducteurs hydrosolubles comme le glutathion réduit, l'acide ascorbique (vitamine C), l'acide urique, les catécholamines, et des

radicaux piégeurs liposolubles comme les caroténoïdes (dont le β -carotène), le rétinol (vitamine A) et l' α -tocophérol (vitamine E ; Contardo-Jara et al., 2009). Ils opèrent généralement comme des piégeurs de radicaux libres, mais d'autres mécanismes peuvent être impliqués. Le glutathion, par exemple, peut servir de cofacteur pour les enzymes antioxydantes, comme les peroxydases glutathion-dépendantes ou les glutathion S-transférases.

Les antioxydants de haut poids moléculaire comprennent des protéines spécifiques et non-spécifiques. Les spécifiques incluent les enzymes antioxydantes : superoxyde dismutases (SOD), catalases (Cat), glutathion peroxydases (GPx), DT-diaphorase et les enzymes associées qui fournissent les cofacteurs comme la glutathion réductase (GR) et la glucose-6-phosphate deshydrogénase (G6PDH ; Contardo-Jara et al., 2009). Les non-spécifiques sont représentées par les protéines qui vont prévenir la formation de ROS en liant les métaux de transition (Fe et Cu), comme les métallothionéines et la ferritine (Lushchak, 2011).

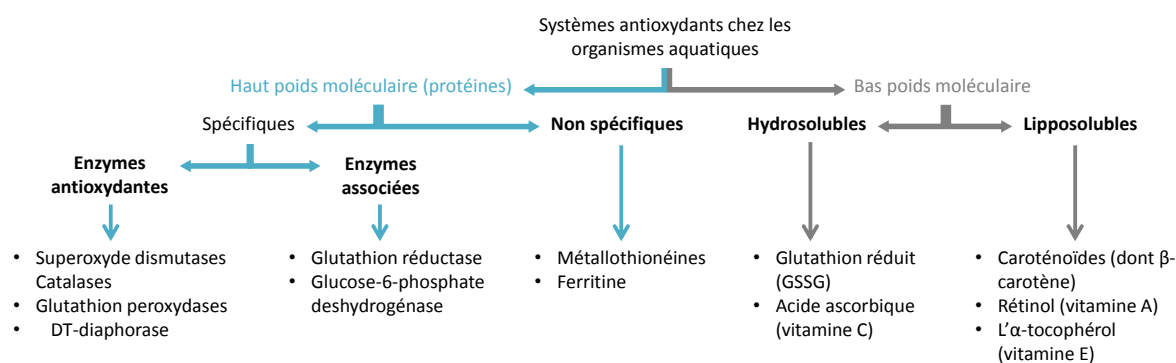


Figure 6 : Principaux systèmes antioxydants chez les organismes aquatiques (d'après Lushchak, 2011)

Le niveau des antioxydants est régulé par la balance entre leur absorption/synthèse, transport, métabolisation, inactivation, excrétion. Certains antioxydants comme le tocophérol et les caroténoïdes sont obtenus *via* la nourriture alors que la plupart sont synthétisés par les organismes. Les travaux de Livingstone et al. (1992) ont permis d'étudier la distribution cellulaire, l'activité et les propriétés de différentes enzymes (Cat, SOD, GPx) grâce à des méthodes spectrophotométriques et cytochimiques, mais également d'optimiser les méthodes de mesure des différentes activités. La SOD est présente dans les mitochondries et le cytosol et permet de réduire l'anion superoxyde O_2^- ($2O_2^- + 2H^+ = H_2O_2 + O_2$; Livingstone et al., 1992). La GPx est présente dans le cytosol pour éliminer H_2O_2 et les autres hydroperoxydes. La catalase est présente dans les peroxysomes et élimine l' H_2O_2 . Ces enzymes, pour la plupart inductibles, existent sous de multiples formes et ont des rôles et des localisations cellulaires complémentaires (Livingstone et al., 1992). Il faut cependant noter que la nature et la localisation des défenses antioxydantes pourraient être différentes chez les organismes euryoxiques et sténoxiques (Livingstone et al., 1992).

Certains de ces systèmes antioxydants peuvent être utilisés en tant que biomarqueurs de stress oxydatif pour le monitoring des écosystèmes marins et d'eau douce. Des modifications de ces activités

enzymatiques sont en effet souvent observées chez des organismes vivants dans des sites contaminés ou exposés à des contaminants en laboratoire. Des modifications des défenses antioxydantes enzymatiques (SOD, Cat, GPx) sont de bons biomarqueurs pour révéler des conditions prooxydantes (Livingstone, 2001; Regoli et al., 2002) et ont été décrites comme des biomarqueurs de stress oxydatif liés aux métaux (Marasinghe Wadige et al., 2014).

Chez *Mytilus edulis*, les enzymes antioxydantes sont retrouvées dans tous les tissus mais ont une activité plus importante dans la glande digestive (hépatopancréas) ; la glande digestive est aussi le site majeur d'accumulation des xénobiotiques et des enzymes de biotransformation (Livingstone et al., 1992).

Sroda et Cossu-Leguille (2011) ont montré des différences d'activités enzymatiques entre mâles et femelles chez le gammare, soulignant l'importance de l'effet genre. Les variations saisonnières de stress oxydatif seraient influencées par les facteurs abiotiques (température, oxygène) et biotiques (statut reproducteur, alimentation). Selon Viarengo et al. (1991), les diminutions des défenses antioxydantes l'hiver chez *M. edulis*, parallèlement à une augmentation de la peroxydation lipidique, seraient liées à la diminution de la disponibilité en nourriture et au ralentissement métabolique. Dans leur étude sur *D. polymorpha*, Faria et al. (2009) montrent une augmentation de l'activité de la SOD (qui constitue la première ligne de défense antioxydante), alors que Cat et GPx ne bougent pas. Une diminution des activités de la Cat et de la GPx peut aussi être observée lors d'une production de ROS (un excès de ROS, non pris en charge par la SOD, peut inhiber les autres enzymes antioxydantes ; Binelli et al., 2011).

Comme nous l'avons expliqué précédemment, les organismes régulent les ROS grâce à des réactions enzymatiques ou non. Il est possible d'évaluer l'activité ou la concentration des différents agents antioxydants pris séparément, mais ces méthodes sont souvent longues, coûteuses et compliquées (Lushchak, 2011). Comme les effets de ces antioxydants sont additifs, on peut mesurer la capacité antioxydante totale (TAC pour Total Antioxidant Capacity⁷ ; Erel, 2004 ; adapté chez *Dreissena* par Garaud et al., 2016).

3. Biomarqueurs de dommage

Les biomarqueurs de dommage ont pour but de révéler les effets délétères des contaminants.

3.1. Acétylcholinestérase

L'inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) atteste principalement de l'exposition aux composés organophosphorés et aux carbamates, et entraîne la paralysie et la mort des organismes. C'est une enzyme neuronale qui régule un neurotransmetteur, l'acétylcholine, permettant

⁷ Aussi appelée TAA (Total Antioxidant Activity), TAOP (Total Antioxidant Power), TAS (Total Antioxidant Status), TAR (Total Antioxidant Response)

ainsi aux neurones de revenir à un état de repos après la transmission du message. L'inhibition de cette enzyme peut entraîner des dysfonctionnements respiratoires, neurologiques et entraîner un dérèglement du comportement (Palais et al., 2011 ; Ricciardi et al., 2006).

3.2. Peroxydation lipidique

Les phospholipides sont les constituants majeurs des membranes cellulaires. Les acides gras (polyinsaturés) qui les constituent contiennent des doubles liaisons facilement oxydables, pouvant être la cible des ROS. L'oxydation des lipides *via* la formation de peroxydes est appelée lipoperoxydation (ou peroxydation lipidique, LPO). C'est une des principales formes de dommage résultant du stress oxydatif et elle est fréquente chez les organismes aquatiques qui présentent généralement de fortes teneurs en lipides (Arab et Steghens, 2004 ; Lushchak, 2011).

La peroxydation lipidique contribue à diverses physiopathologies et anomalies cellulaires et tissulaires (Jiang et al., 1991) et peut poser un problème lors de la formation et du stockage des graisses (Eymard et Genot, 2003). Elle peut conduire à la perte des fonctions cellulaires. Par exemple, (1) la peroxydation des membranes microsomaux mène à une perte de calcium et à une activation incontrôlée des protéases et des lipases calcium-dépendantes, et (2) la peroxydation et la perméabilisation des membranes mitochondriales entraînent une modification du métabolisme énergétique cellulaire (Hermes-Lima et al., 1995). Les effets toxiques dépendent de la biodisponibilité des polluants mais aussi de l'efficacité des systèmes de détoxification à éliminer les xénobiotiques et leurs métabolites. Si les défenses antioxydantes sont induites et efficaces, les organismes sont capables de résister au stress, sinon un échec des systèmes de défense peut être lié à une augmentation de la peroxydation lipidique révélant des conséquences néfastes pour les organismes (Sroda et Cossu-Leguille, 2011).

La peroxydation lipidique commence par la production de composés instables, dérivés des acides gras insaturés, comme les radicaux libres, les conjugués diéniques, les kétodiènes et les hydroperoxydes lipidiques (LOOH). Ces produits primaires de nature radicalaire ont une courte durée de vie et sont donc rapidement dégradés en produits secondaires, principalement des aldéhydes cytotoxiques, comme le malondialdéhyde (MDA) ou le 4-hydroxynonanal (Arab et Steghens, 2004 ; Eymard et Genot, 2003 ; Lushchak, 2011).

En définitive, les hydroperoxydes lipidiques sont des produits d'oxydation primaire, qui vont soit se décomposer en produits secondaires, soit réagir avec les substances présentes dans la nourriture (entraînant une perte de valeur nutritionnelle) ou le matériel biologique. La mesure des hydroperoxydes lipidiques, concomitamment avec les ROS, est utilisée comme indicateur de stress oxydant.

3.3. Activité apoptotique

L'apoptose est une forme de mort cellulaire programmée qui joue un rôle dans de nombreux processus biologiques, mais également en cas de maladie. Elle peut être induite par divers stimulus,

mais aboutit toujours au même résultat, à savoir la mort de la cellule (Gurtu et al., 1997). Les caspases sont des protéases à cystéine jouant un rôle dans le processus apoptotique, qui vont cliver les substrats après les résidus aspartate (Gurtu et al., 1997). L'induction des caspases laisse supposer que les cellules ont subi des dommages et entament leur processus de mort cellulaire.

Chez *D. polymorpha*, l'induction des caspases a été mise en évidence lors d'une exposition à un mélange de drogues (Parolini et al., 2016) ou à la fluoxétine (Magni et al., 2017).

3.4. Dommages à l'ADN

Les xénobiotiques et leurs métabolites peuvent aussi endommager le matériel génétique (génotoxicité). Les ROS peuvent provoquer des cassures de la molécule d'ADN et oxyder les bases azotées. Les xénobiotiques peuvent même se lier directement sur l'ADN pour former un adduit, modifiant ainsi la stabilité et le fonctionnement de l'ADN. Différentes méthodes existent pour détecter ces anomalies : observation microscopique, cytométrie couplée à de la fluorescence pour détecter un nombre anormal de chromosomes, présence de micronoyaux, test comètes pour détecter les cassures (Newman, 2015f).

L'exposition de *D. polymorpha* à un mélange de drogues (cocaïne, amphétamine, morphine,...) entraîne une fragmentation de l'ADN et la formation de micronoyaux (Parolini et al., 2016). Chez cette espèce, les dommages à l'ADN sont souvent mesurés dans les hémocytes (Binelli et al., 2007 ; Riva et al., 2007), bien que les cellules branchiales y soient aussi très sensibles (Bourgeault et al., 2010).

3.5. Vitellogénine

La vitellogénine (VTG) est une protéine impliquée dans la reproduction, qui met en évidence une contamination du milieu par les œstrogènes et les xénoestrogènes, et une perturbation des hormones sexuelles (Quinn et al., 2004). La VTG joue un rôle important dans la reproduction et varie de façon saisonnière chez les dreissènes, avec des niveaux plus bas en automne, après la période de ponte (Ács et al., 2016).

3.6. Activité lysosomale

Les lysosomes sont des organites intracellulaires impliqués dans le maintien de l'homéostasie. Lorsqu'ils sont atteints par les contaminants, on peut avoir une perte de l'intégrité cellulaire couplée à des modifications physiologiques. La stabilité de la membrane lysosomale ou l'élargissement des lysosomes sont donc couramment utilisés comme biomarqueurs de dommage (Cajaraville et al., 2000 ; Giambérini et Pihan, 1997).

3.7. Marqueurs immunologiques

Les hémocytes sont des cellules impliqués dans la réponse immunitaire (défense contre les pathogènes) et le métabolisme des métaux (les granulocytes particulièrement). Leur viabilité et leur fonctions (notamment leur activité phagocytotique) peuvent être affectées en présence de contaminants (Evariste et al., 2017 ; Giambérini et al., 1996).

3.8. Les dommages cellulaires, tissulaires et aux organes

L’histopathologie est l’étude des modifications cellulaires et tissulaires, parfois dues à l’exposition et aux effets des xénobiotiques. Les lésions surviennent souvent dans des tissus cibles, notamment la glande digestive ou les reins. La cytotoxicité (toxicité entraînant la mort cellulaire) peut être détectée en cas de nécrose (modification de la conformation du noyau, désintégration du noyau, augmentation des granules cytoplasmiques, inflammation, coagulation des protéines), d’apoptose, et si la cellule présente une forme irrégulière. L’accumulation de lipofuscine dans les cellules est aussi utilisée comme marqueur d’effet toxique ; ce mélange de protéines et de lipides s’accumule avec l’âge dans certains types cellulaires, et augmente aussi lors d’une exposition à des contaminants (Newman, 2015f).

Chez *D. polymorpha*, des lésions au niveau de la glande digestive et des ovaires peuvent être observées suite à l’exposition à des contaminants organiques et métalliques (Mantecca et al., 2010), ou encore à l’atrazine (Zupan et Kalafatic, 2003).

4. Le métabolisme énergétique

L’énergie qu’un organisme est capable d’allouer à la croissance et à la reproduction dépend de sa balance énergétique (apport d’énergie *via* l’alimentation et l’assimilation, et perte d’énergie par le métabolisme et l’excrétion). L’énergie disponible dans un organisme peut être estimée en déterminant ses réserves énergétiques (lipides, glucides, protéines ; Voets et al., 2010). Une portion de l’énergie acquise par l’organisme est utilisée pour ses besoins métaboliques. Les demandes métaboliques incluent l’énergie utilisée pour le métabolisme, perdue pendant l’excrétion, ou perdue en tant que nourriture non assimilée dans les fèces (Voets et al., 2010).

La balance énergétique varie avec les facteurs environnementaux tels que la température et la disponibilité en nourriture, dont les variations peuvent affecter la part d’énergie allouée à la reproduction. L’exposition à des polluants peut aussi influencer la balance énergétique, en augmentant les coûts de maintenance (activation des défenses ou des mécanismes de réparation), diminuant ainsi l’énergie disponible pour la reproduction. Lors d’un stress sévère, la balance énergétique peut devenir négative, contraignant les moules à consommer leurs réserves (glycogène et lipides ; Palais et al., 2011).

L’approche physiologique basée sur l’allocation énergétique à la croissance et à la reproduction est couramment nommée Scope for Growth (SfG ; Smolders et al., 2004a ; Voets et al., 2010). De Coen

et Janssen (1997) ont proposé une alternative biochimique au SfG (qui est plutôt physiologique) nommée AEC (Allocation Énergétique Cellulaire) qui correspond au budget énergétique cellulaire net. Dans cette approche, les réserves énergétiques disponibles (représentées par le glycogène, les lipides et les protéines) et la consommation d'énergie (ETS) sont mesurées au niveau cellulaire et intégrées dans un indicateur de stress général (Fanslow et al., 2001). Les xénobiotiques peuvent affecter le budget énergétique des organismes, entraînant une dépense énergétique supplémentaire, et donc une diminution du SfG. Le CEA (Charge Énergétique en Adénylates) reflète plutôt le transfert d'énergie entre les processus cataboliques et anaboliques, mais est de moins en moins utilisé (Newman, 2015e).

Les biomarqueurs reliés au métabolisme énergétique peuvent être affectés directement (modification du comportement alimentaire, des enzymes digestives) ou indirectement (coût énergétique lié aux mécanismes de défense, diminution du nombre de proies) en présence de polluants. Ils peuvent être mesurés à différents niveaux d'organisation. Cependant, ces biomarqueurs sont très dépendants du cycle reproducteur ; il est donc nécessaire de bien connaître leur variation naturelle. Beaucoup d'études ont montré un effet négatif de la pollution sur le budget énergétique des organismes, suite à une diminution de l'absorption d'énergie dans les milieux pollués, mais aussi à une augmentation des coûts de maintenance (Voets et al., 2010). L'augmentation des coûts de maintenance correspond à la perte d'énergie due aux dommages (ou pour réparer les dommages) et aussi à l'énergie investie dans la détoxification et/ou l'élimination des toxiques. Ces facteurs contribuent à la diminution de l'énergie disponible pour la croissance et la reproduction (Voets et al., 2010). C'est ce qu'on appelle l'hypothèse du coût métabolique : l'activité métabolique augmente chez les organismes soumis à des stressseurs, afin d'activer les mécanismes de défense (Calow, 1991 ; Sibly et Calow, 1989). Une diminution des réserves énergétiques est donc souvent observée chez les organismes exposés à des contaminants, aussi bien en laboratoire que sur le terrain. Cette dépense énergétique varie selon les espèces et les types de stressseurs (Mouneyrac et al., 2011), et peut entraîner des effets sur la croissance et la reproduction. Le SfG permet d'analyser le budget énergétique des organismes et de tester cette hypothèse (De Coen et Janssen, 1997).

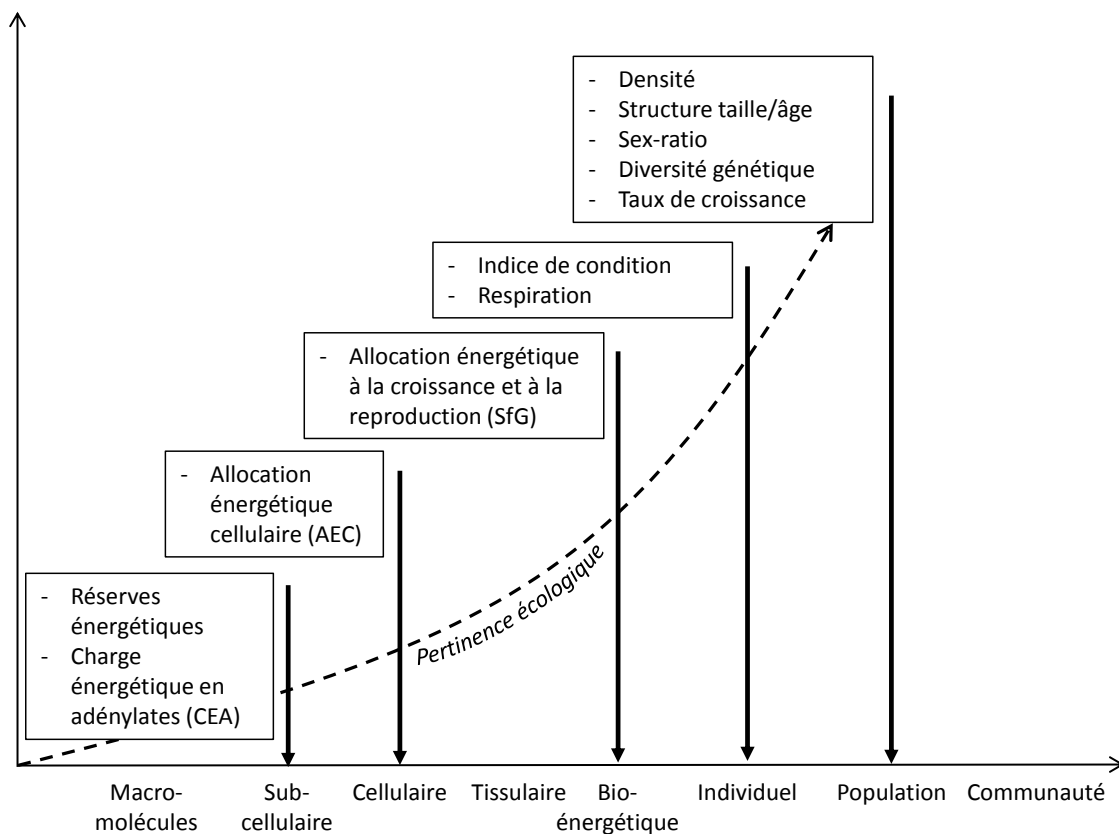


Figure 7 : Biomarqueurs en lien avec le métabolisme énergétique selon le niveau d'organisation biologique (d'après Durou et al., 2008)

Les composants du budget énergétique pour les dreissenés (comme la consommation, la croissance somatique, la fécondité et les coûts métaboliques (respiration et excrétion)) ont été étudiés sous différents régimes environnementaux (notamment nourriture et température), à la fois *in situ* et en laboratoire (Stoeckmann, 2003 ; Voets et al., 2006 ; Walz, 1978).

4.1. Le système de transport d'électrons mitochondrial

L'ETS (Electron Transport System) est retrouvé dans la cellule au niveau des mitochondries et des microsomes. Il consiste en une chaîne complexe de cytochromes, de flavoprotéines et d'ions métalliques qui transportent les électrons vers l'oxygène lors du catabolisme des nutriments (Fanslow et al., 2001 ; Packard, 1968). Puisque la synthèse et la dégradation de ces macroenzymes est fonction des besoins respiratoires de l'organisme, la mesure de l'ETS donne une idée du taux maximal d'absorption d'oxygène (Smolders et al., 2004b). L'ETS ne mesure donc pas le taux de respiration de l'organisme, mais le potentiel de respiration qui peut être exécuté par la machinerie enzymatique existante (Owens et King, 1975). En effet, lorsqu'on étudie des populations naturelles, notamment de bivalves, l'étude de l'activité métabolique des organismes est compliquée car elle dépend de multiples facteurs (masse, température...). La mesure de l'activité ETS permet d'estimer cette activité métabolique, car elle suppose que les processus de consommation d'oxygène chez tous les organismes

sont accomplis *via* la chaîne respiratoire enzymatique (Fanslow et al., 2001 ; Madon et al., 1998a). Les populations de *D. polymorpha* peuvent altérer les flux d'énergie et modifier le fonctionnement des réseaux trophiques, c'est pourquoi il peut être utile d'estimer le taux métabolique des individus *in situ* (Fanslow et al., 2001).

La relation entre l'ETS et le taux de respiration n'est pas influencée par la taille des moules ou la quantité de nourriture, suggérant que l'ETS peut être un prédicteur fiable de la respiration chez *D. polymorpha* en conditions naturelles (Fanslow et al., 2001). La mesure de l'ETS est simple et sensible, contrairement à la mesure de la consommation d'oxygène qui est longue et peu pratique. De plus, la réponse de l'ETS à un changement environnemental implique la synthèse et la dégradation de macroenzymes, elle est donc plus longue que la réponse de la respiration et permet ainsi d'éviter les stress liés à l'échantillonnage des organismes, les artefacts et les variations à court terme. Selon Madon et al. (1998a), il faudrait 7 jours pour qu'elle se stabilise chez *D. polymorpha*.

4.2. La lactate déshydrogénase

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytoplasmique de transfert de l'hydrogène qui joue un rôle important dans le cycle glycolytique ; elle catalyse la réduction réversible du pyruvate en lactate. Chez l'Homme, son dosage dans le plasma permet de diagnostiquer des lésions aux niveaux cellulaire, tissulaire et au niveau de l'organe, mais ce potentiel est encore peu exploité chez les invertébrés aquatiques (Ribeiro et al., 1999). C'est une enzyme glycolytique importante, présente dans tous les tissus, et qui participe au métabolisme anaérobie des cellules.

Son activité peut être utilisée en tant que biomarqueur de stress lié à la quantité d'oxygène. L'activité LDH augmente en cas d'hypoxie et constitue donc une réponse biochimique à un faible niveau d'oxygène (Falfushynska et al., 2014 ; Wu et Lam, 1997).

Mais une augmentation de la concentration en LDH peut aussi être une réponse à un stress général de l'organisme qui augmente son métabolisme énergétique pour y faire face. Des altérations de l'activité LDH apparaissent après une exposition au chlorure de zinc chez *Daphnia magna* (Diamantino et al., 2001). Chez *D. polymorpha*, la LDH est inversement proportionnelle à la teneur en oxygène du milieu, avec une activité faible en hiver et au printemps, qui augmente en été et à l'automne (Faria et al., 2014).

5. Les omiques

Les techniques omiques (génomique, transcriptomique⁸, protéomique⁹, métabolomique¹⁰) offrent aussi un nouveau potentiel dans l'évaluation du risque écologique (Connon et al., 2012). Les

⁸ Analyse globale de l'expression des gènes

⁹ Résultat de l'expression des gènes (protéines et peptides)

¹⁰ Mesure la concentration de métabolites endogènes (produits terminaux des processus cellulaires) ou les xénométabolites (qui décrivent l'activité enzymatique dirigée contre les substances étrangères)

polluants affectent généralement en premier lieu l'ADN, sa transcription et les protéines synthétisées. L'expression d'un gène particulier est théoriquement reliée à un type de stress et répond rapidement (heure à jour), comparé aux échelles d'organisation supérieures. Ces omiques permettent aussi d'élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse aux polluants (Calzolari et al., 2007). Les techniques omiques sont bien développées chez le genre *Mytilus* (Ciacci et al., 2012 ; Franzellitti et al., 2012), mais restent en développement chez les dreissènes, notamment à cause de l'absence de séquençage (Bultelle et al., 2002 ; Contardo-Jara et Wiegand, 2008 ; Navarro et al., 2011).

6. Intérêt d'une approche multi-marqueurs

Le Tableau III reporte certaines études ayant utilisé différents types de biomarqueurs chez les dreissènes. Ce tableau permet plusieurs constats. On remarque que le nombre de biomarqueurs utilisés augmente avec le temps, tout comme l'intégration des effets au niveau individuel avec l'activité de filtration ou la mortalité par exemple. En effet, les perturbations sont souvent liées à des causes multifactorielles, et seul un panel d'outils complémentaires et pertinents peut aider à les identifier (Guerlet et al., 2007 ; Vasseur et Cossu-Leguille, 2003). Bien que l'effet d'un mélange ne puisse pas être prédit à partir de l'effet des contaminants pris séparément (Kraak et al., 1994, 1993), les polluants sont testés de manière isolée, et rarement en mélanges. Enfin, on peut constater que la plupart de ces études ont été réalisées sur *D. polymorpha*, très peu sur *D. r. bugensis*, et qu'elles sont généralement réalisées sur une seule population.

Tableau III : Utilisation des biomarqueurs en laboratoire chez les dreissenés

Etudes utilisant des paramètres biochimiques					
Espèce	Pop(s)	Lieu	Polluant(s) testé(s)	Biomarqueur(s) mesuré(s)	Référence
ZM	1	France	Clastogènes (4)	MN	Mersch et al., 1996
ZM	1	Québec	Cd	MT	Tessier et Blais, 1996
ZM	1	France	Pb, Zn	Lysosomes	Giamberini et Pihan, 1997
ZM	1	Québec	Cd	MTLP	High et al., 1997
ZM	1	Suisse	Cu, TBT	HSP	Clayton et al., 2000
ZM	1	Croatie	Pentachlorophenol	Domage ADN (comètes)	Pavica et al., 2001
ZM	1	France	Aroclor 1254, 3MC, chrysène, atrazine	ARNm	Bultelle et al., 2002
ZM	1	France	Fuel-2 oil	MXR	Pain et Parant, 2003b
ZM	5	Croatie	Fuel-2 oil	MXR	Smital et al., 2003
ZM	1	France	Cu, Cd	MT	Lecoeur et al., 2004
ZM	1	Irlande	PE	VTG, IC, cholestérol	Quinn et al., 2004
ZM	1	Italie	Désinfectants	MN, Comètes	Bolognesi et al., 2004
ZM	1	Italie	Paraquat	Histologie, MN	Mantecca et al., 2006
ZM	1	Irlande	Nonylphenol	VTG, mortalité, attachement, IC, cholestérol	Quinn et al., 2006
ZM	1	France	HAP	Adduits ADN	Le Goff et al., 2006
ZM	1	France	Cd, Zn	MT, MTcDNA	Marie et al., 2006b
ZM	1	UK	Cu, As	MT, LPO, NaK ATPase	Bouskill et al., 2006
ZM	1	Pays Bas	HAP, PCB	DT diaphorase, cytochrome c reductase, GST, Cat, GSH	Osman et al., 2007
ZM	1	Espagne	Clofibrate	Acides gras (33), lipides, triglycérides, IG	Lazzara et al., 2012
ZM	1	Italie	Triclosan	Protéomique, LPO	Riva et al., 2012
ZM	1	France	Ni + parasitisme	ROS, phagocytose, stabilité lysosomale, Cat, Lipofuscine, LN	Minguez et al., 2012a
ZM	1	Espagne	Dacthal, Hg	Expression ARNm MXR + mesure fonctionnelle	Navarro et al., 2012
ZM	1	France	nTiO ₂	Hémocytes (viabilité, phagocytose, phosphorylation des MAPK)	Couleau et al., 2012
ZM	1	Italie	Métabolites de la cocaïne	Cytotoxicité, SOD, Cat, GPx, GST, LPO, PCC, MN, comètes	Parolini et Binelli, 2013
ZM	1	Allemagne	Cyanotoxine (BMAA)	GST, Cat, GR, GPx	Contardo-Jara et al., 2014
ZM	1	France	HAPs (1-nitropyrene)	Adduits à l'ADN, expression des gènes codant pour Cat, SOD, GST, HSP70, AHR, Pgp, MT	Châtel et al., 2014
ZM	1	France	nCeO ₂	Activité Na/K ATPase, paramètres ioniques, GPx, Cat, GST, LPO, glycogène, lipides, lysosomes	Garaud et al., 2015
ZM	1	Italie	Drogues	Comètes, apoptose, MN	Parolini et al., 2016
ZM	1	Italie	Antidépresseurs	SOD, Cat, GPx, GST, LPO, PCC, MN, MXR	Magni et al., 2017
Etudes incluant de plus hauts niveaux d'organisation					
Espèce	Pop(s)	Lieu	Polluant(s) testé(s)	Biomarqueur(s) mesuré(s)	Référence
ZM	1	France	Cu, Hg	Filtration	Mouabad et Pihan, 1993
ZM	1	Pays bas	Cu, Zn, Cd	Filtration	Kraak et al., 1994
ZM	1	Pays bas	Ni	Filtration	Stuijzand et al., 1995
ZM	1	Allemagne	Pentachlorophénol	Mouvement valvaire	Borcherding et Jantz, 1997
ZM	1	Pays bas	Acridine	Filtration, mortalité	Kraak et al., 1997
ZM	2	Allemagne	Cd, pentachlorophénol, nitroaniline	Mouvement valvaire	Borcherding et Wolf, 2001
ZM	1	Croatie	Atrazine	Histologie, mortalité	Zupan et Kalafatic, 2003
ZM	2	France	HAP, ETM	Indice gonadique, prévalence parasitaire, histologie	Minguez et al., 2009
ZM	1	France	BaP	Indice de condition, ARN, adduits	Châtel et al., 2012
ZM	1	Italie	Morphine	Filtration, cytotoxicité, SOD, Cat, GPx, GST, LPO, PCC, MN	Magni et al., 2014
ZM	1	Italie	MDMA	Filtration, cytotoxicité, SOD, Cat, GPx, GST, LPO, PCC, MN	Parolini et al., 2014
ZM	1	France	nCeO ₂	Filtration, ARN, hémocytes, biomarqueurs sub-cellulaires	Garaud et al., 2016
ZM et QM	1 x 2 espèces	France	Ni, Cr	Filtration, biomarqueurs sub-cellulaires	Potet et al., 2016

Légende : MN = micronoyaux ; MT = métallothionéines ; HSP = heat shock protein ; MTLP = métallothionéine-like protein ; IC = indice de condition ; IG = indice gonadique ; EROD = activité de CYP450 ; LPO = peroxydation lipidique ; VTG = vitellogénine ; MXR = résistance multixénobiotique ; SOD = superoxyde dismutase ; Cat = catalase ; GPx = glutathion peroxydase ; GST = glutathion-S-transférase ; PCC = protéine carbonyl content ; AHR = aryl-hydrocarbon receptor ; Pgp = P-glycoprotéine ; GSH = glutathion ; ROS = reactive oxygen species ; LN = lipides neutres ; MAPK = mitogen activated protein kinase

En utilisant des combinaisons de biomarqueurs (approche multi-biomarqueurs), on obtient une évaluation intégrée de l'impact d'un polluant et de son mode d'action (Magni et al., 2017). Cela peut aussi permettre d'évaluer les effets engendrés par des mélanges de contaminants, même si en pratique ils sont peu souvent utilisés avec cet objectif lors d'études en laboratoire (CF Tableau III ; Parolini et al., 2016).

Des outils existent pour ensuite intégrer l'ensemble des réponses mesurées au niveau individuel en un indice intégrateur. Ils permettent de résumer les réponses des biomarqueurs et simplifier leur

interprétation. C'est le cas de l'IBR (Integrated Biomarker Response ; Beliaeff et Burgeot, 2002) et du BRI (Biomarker Response Index) développé pour *M. edulis* par Hagger et al. (2008). Ces outils permettent de comparer les niveaux de stress entre plusieurs sites, d'identifier les périodes de l'année où l'impact est le plus fort et la période la plus adaptée pour utiliser les biomarqueurs, ou encore de mettre en évidence la toxicité de polluants pris séparément ou en mélange (Magni et al., 2017). Au fil de leur utilisation, on découvre des biais dans ces indicateurs, qui sont alors revus (Devin et al., 2014a). L'IBR est généralement calculé à partir de marqueurs sub-individuels, mais certaines études y incluent des biomarqueurs individuels. D'autres indices existent également, qui prennent en compte la présence de bioindicateurs aux niveaux des populations et des communautés (Aquatic Ecosystem Health Index, Estuarine Fish Health Index), l'intégration de données de toxicité et de variables environnementales (Integrated Health Responses) mais cette meilleure pertinence écologique se fait au détriment de la praticité, c'est pourquoi l'IBR reste le plus utilisé. Des efforts sont faits pour construire des indicateurs basés sur une combinaison raisonnée de biomarqueurs, susceptibles d'être ensuite associés à des informations chimiques et écologiques (Dagnino et al., 2008, 2007). Les biomarqueurs au niveau sub-cellulaire utilisés au cours de ces travaux sont présentés en Figure 8.

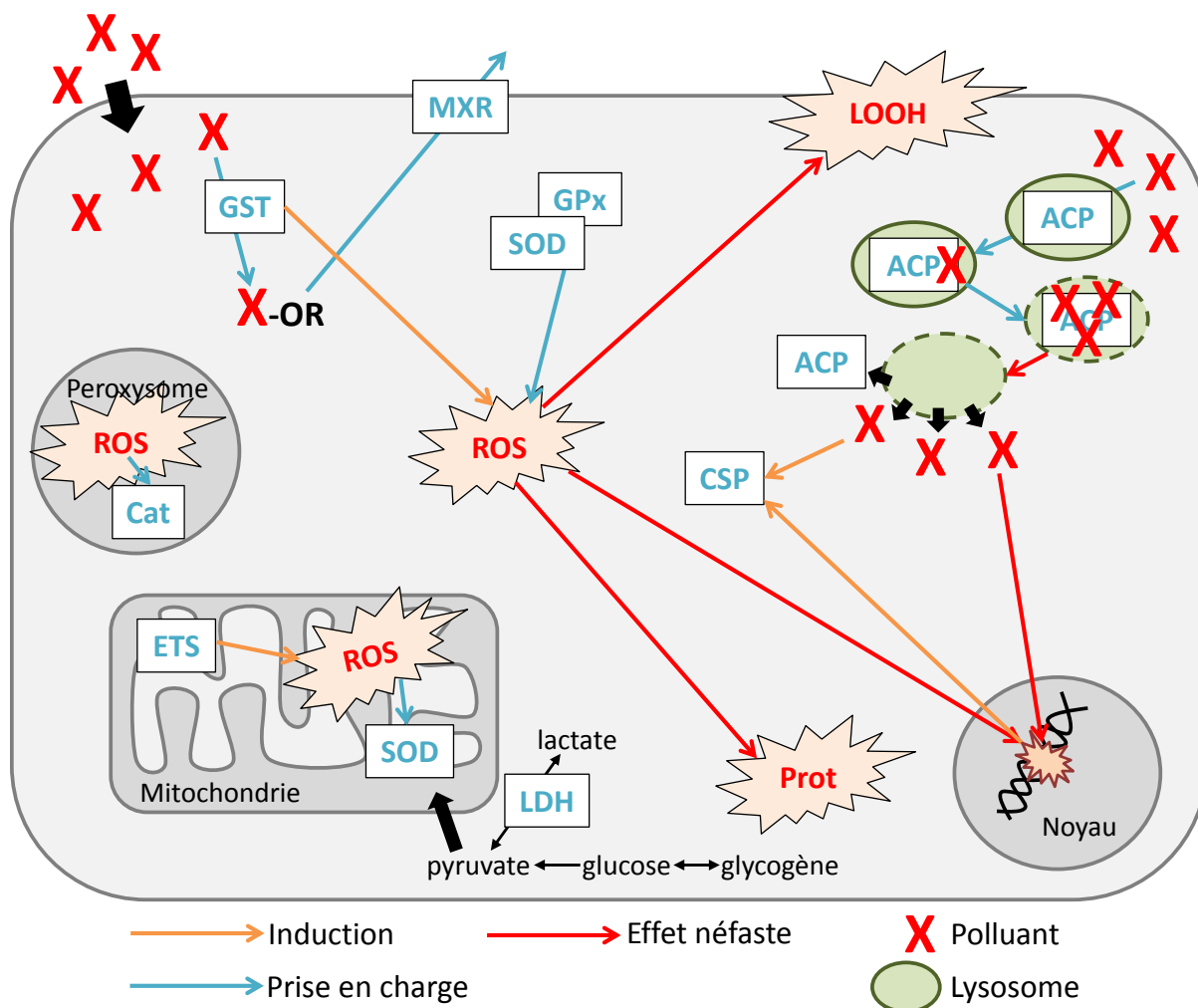


Figure 8 : Représentation schématique de l'effet d'un polluant sur les différents biomarqueurs mesurés au niveau sub-cellulaire

Mais même en utilisant ces approches multi-marqueurs, les biomarqueurs restent critiqués pour leur manque de spécificité et leur manque de pertinence écologique (De Coen et al., 2000 ; Forbes et al., 2006 ; Hagger et al., 2006).

7. Difficultés d'application des biomarqueurs

7.1. Facteurs confondants

Les modifications biologiques observées chez un organisme et utilisées comme biomarqueurs ne sont pas uniquement dues à la présence de contaminants. Une population exposée à un contaminant est en parallèle soumise à des facteurs biotiques et abiotiques changeants, tels que des modifications de l'habitat, la disponibilité en nourriture, la prédation, le parasitisme, le passage d'un stade de vie à un autre, le sexe, l'âge, l'acquisition de la maturité sexuelle, le statut reproducteur... Le rôle de ces facteurs

confondants sur les réponses des biomarqueurs peut être étudié aussi bien en laboratoire que sur le terrain.

Les plus étudiés sont la température, la salinité, et le trio taille/poids/âge. La température peut influencer les biomarqueurs de différentes manières (Sokolova et Lannig, 2008), notamment les activités enzymatiques et la cinétique des contaminants, et entraîner la mort des organismes lorsqu'elle est trop élevée (Del Piero et al., 2012). La salinité peut influencer les espèces euryhalines et la biodisponibilité des contaminants. Le poids et l'âge aussi : plus l'organisme est âgé, plus il aura été exposé, plus la bioaccumulation risque d'être importante. D'autres facteurs entrent également en jeu comme la lumière, le cycle circadien, le régime alimentaire, le pH, la teneur en oxygène. La disponibilité en nourriture peut aussi jouer un rôle sur les réponses des biomarqueurs, et sur des marqueurs plus individuels comme l'indice de condition (Bourgeault et al., 2010).

La plupart des facteurs confondants sont liés à des variations saisonnières naturelles des facteurs biotiques (cycle reproducteur) et abiotiques (température, disponibilité en nourriture, pollution en lien avec les événements hydrologiques, application de pesticides à certaines périodes de l'année). Wojtal-Frankiewicz et al. (2017) ont mis en évidence l'impact de la saisonnalité et de plusieurs facteurs abiotiques (surtout la force ionique, l'oxygène et le pH) sur le stress oxydant chez *D. polymorpha*, suggérant une tolérance limitée aux conditions environnementales changeantes. Bourgeault et al. (2011) observent une variation saisonnière du taux de filtration, qui diminue en décembre et augmente de janvier à août *in situ* du fait de la température ; les auteurs notent aussi que la filtration est plus forte sur le site où il y a moins de nourriture disponible. Dans cette même étude, ils observent une variation saisonnière de l'indice de condition qui augmente d'octobre à mars et diminue fortement jusqu'en septembre.

Les biomarqueurs peuvent aussi répondre à des stress généraux associés à l'échantillonnage (par exemple, la synthèse d'un nouveau byssus nécessite de l'énergie), à l'acclimatation aux conditions expérimentales et sa durée, à l'anoxie, aussi bien pour des études en laboratoire, *in situ*, que pour des transplantations.

Si on ne prend pas en compte ces facteurs environnementaux, on peut aisément surestimer l'effet des contaminants ; une modification d'un biomarqueur n'est en effet pas toujours due à la présence de polluants. Les études en laboratoire permettent de peaufiner et de comprendre les mécanismes responsables des effets écologiques observés (Johnston et Roberts, 2009). Actuellement pour la dreissène, les études en conditions de stress multiples sont assez limitées en laboratoire, et sont plutôt réalisées *in situ* (Tableau IV).

Tableau IV : Application des biomarqueurs chez les dreissènes *in situ*

Espèce	n	Lieu	Facteur de variation	Transplantation	Saison	Biomarqueurs	Référence
ZM	3	Allemagne	Pollution		oui	Métabolisme énergétique complet	Sprung, 1995 (a,b, c)
ZM	2	Allemagne	Pollution	N.D.		Mouvement valvaire (Dreissena-monitor)	Borchering et Jantz, 1997
ZM	1	France	Pollution	oui (1 > 7)		MN, IC, IG	Mersch et Beauvais, 1997
ZM	1	USA	Saisonnalité		oui	Budget énergétique	Stoeckmann et Garton, 1997
ZM	13	Canada	Pollution			MT, EROD, LPO, VTG, cassure ADN	De Lafontaine et al., 2000
ZM	2	USA	Saisonnalité		oui	ETS, taux de respiration	Fanslow et al., 2001
ZM	1	Croatie	Pollution	oui (1 > 1)		Dommage ADN (comètes)	Pavlica et al., 2001
ZM	1	Belgique	Pollution	oui (1 > 5)		IC, SFG	Smolders et al., 2002
ZM	1	Croatie	Pollution	oui (1 > 5)		MN, comètes	Klobucar et al., 2003
ZM	1	France	Pollution	oui (1 > 3)		MXR	Pain et Parant, 2003b
ZM	1	Belgique	Pollution	oui (1 > 5)		AEC (glycogène, lipides, ETS), SFG	Smolders et al., 2004a
ZM	2	Italie	Pollution		oui	IG, histo, Sex ratio	Binelli et al., 2004
ZM	17	Italie	Pollution			EROD, AChE	Binelli et al., 2005
ZM	14	Italie	Pollution			EROD, AChE	Ricciardi et al., 2006
ZM	3	France	Pollution			adduits ADN	Le Goff et al., 2006
ZM	1	France	Pollution	oui (1 > 4)		MT	Marie et al., 2006a
ZM	6	Italie	Pollution			AChE, EROD, comètes	Binelli et al., 2007
ZM	1	France	ABM/PBM	oui (1 > 3)	oui	Histo, IG, lipides	Guerlet et al., 2007
ZM	1	France	Saisonnalité et PhCh	oui (1 > 3)	oui	MXR	Pain et al., 2007
ZM	1	Espagne	Statut reproducteur		oui	Acides gras (33), IG	Lazzara et al., 2012
ZM	8	Italie	Pollution			SOD, Cat, GPx, GST, LPO, PCC, cassures ADN, BRI	Parolini et al., 2013
ZM	11	Espagne	Pollution		oui	SOD, Cat, GSH, GST, MXR, LDH, LPO, cassures ADN, IG, MXR, filtration	Faria et al., 2014
ZM	8	France	Pollution			MT ; IC ; expression gènes codant pour MT, SeGPx, piGST ; lysosomes ; MXR ; LPO ; Protéomique, IBR	Pain-Devin et al., 2014
ZM	1	France	Pollution	oui (1 > 3)		adduits à l'ADN, expression des gènes codant pour Cat, SOD, GST, HSP70, AHR, Pgp, MT	Châtel et al., 2015
QM	5	Hongrie	Pollution		oui	MT, VTG, EROD, LPO, DNAsb, IC	Acs et al., 2016
ZM	2	Pologne	PhCh et cyanobactéries		oui	Cat, GSH, LPO	Wojtal-Frankiewicz et al., 2017
ZM et QM	5	Hongrie	Pollution		oui	MT, VTG, EROD, LPO, DNAsb, IC	Farkas et al., 2017

Légende : MN = micronoyaux ; IC = indice de condition ; IG = indice gonadique ; MT = métallothionéines ; EROD = activité de CYP450 ; LPO = peroxydation lipidique ; VTG = vitellogénine ; ETS = système de transport d'électrons mitochondrial ; SFG = scope for growth ; MXR = résistance multixénobiotique ; AEC = allocation énergétique cellulaire ; AChE = acétylcholinestérase ; SOD = superoxyde dismutase ; Cat = catalase ; GPx = glutathion peroxydase ; GST = glutathion-S-transférase ; PCC = protein carbonyl content ; BRI = biomarker response index ; IBR = integrated biomarker response ; HSP = heat shock protein ; AHR = aryl-hydrocarbon receptor ; Pgp = P-glycoprotéine ; DNAsb = cassure à l'ADN ; GSH = glutathion

Ces études *in situ* sont surtout focalisées sur l'impact de la pollution sur les biomarqueurs, bien que certaines s'intéressent uniquement à la saisonnalité des réponses mesurées, ou à l'impact d'autres facteurs (statut reproducteur, physico-chimie du milieu, cyanobactéries). A la différence des études en laboratoire, elles sont souvent effectuées sur plusieurs populations, et impliquent parfois des transplantations d'organismes (biosurveillance active). En revanche là encore, très peu se sont intéressées aux réponses de *D. r. bugensis*. La prise en compte des multiples facteurs présents dans les milieux naturels est donc possible, même si elle demeure compliquée à comprendre et à analyser d'un point de vue statistique (Faria et al., 2014 ; Heugens et al., 2001).

7.2. Réponse biphasique

Certains biomarqueurs présentent une réponse non monotone, qui complique l'évaluation de l'état de santé de l'organisme étudié. La saturation de la réponse est fréquente pour de nombreux

biomarqueurs (MT, activité EROD, HSP, CAT, GST, SOD) suivant un gradient de pollution ou la cinétique de la mesure par exemple. Ce type de réponse peut aussi être observé dans le cas d'une acclimatation à un stress faible. Dans ce cas la relation entre le niveau d'exposition et l'intensité de la réponse forme une courbe en cloche (Dagnino et al., 2007). Si on se réfère à la Figure 9, on se rend compte du problème posé par ce type de réponse. Pour une faible intensité de stress X_1 (par exemple, une faible pollution), on mesurera la même réponse (Y) que pour un stress fort X_2 (une forte pollution).

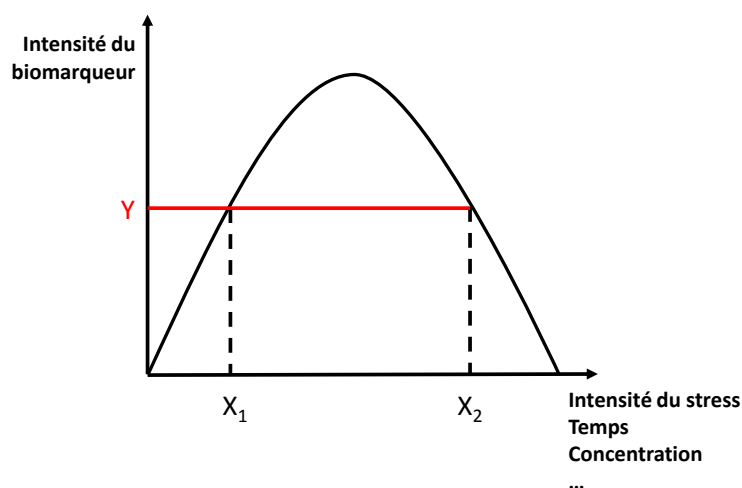


Figure 9 : Réponse biphasique (d'après Férard et Blaise, 2013)

C'est un problème pour les biomarqueurs utilisés en biosurveillance, puisque une même réponse peut être observée à différentes expositions, avant ou après le pic et qu'une faible valeur pour un biomarqueur ne veut pas dire que l'organisme est insensible au stress (Dagnino et al., 2007). La catalase chez *D. polymorpha* répond de cette façon à une exposition aux antidépresseurs, avec une inhibition aux plus fortes concentrations par l'excès d' H_2O_2 (Magni et al., 2017).

7.3. Extrapolation aux niveaux supérieurs

Malgré leur précocité, un des reproches fait aux biomarqueurs sub-individuels est leur manque de pertinence écologique. Il est en effet difficile de faire le lien entre des changements cellulaires précoces, des effets organismiques et l'intégrité des populations ou des communautés, même si certains peuvent malgré tout présager de l'impact aux niveaux supérieurs. L'extrapolation des biomarqueurs aux niveaux supérieurs est rendue difficile notamment à cause des mécanismes compensatoires et de régulation mis en place par les organismes (Forbes et al., 2006 ; Hagger et al., 2006). Toutefois, une atteinte au niveau individuel n'entraînera pas systématiquement de répercussion aux niveaux supérieurs.

Certains biomarqueurs sont cependant capables de présager des effets aux niveaux supérieurs. Les biomarqueurs d'immunotoxicité auraient un bon potentiel, puisqu'une immunodéficience est souvent synonyme de diminution de la fitness. Les modifications comportementales résultent souvent de causes sub-individuelles mais peuvent avoir des conséquences sur les populations et les

communautés. Les dommages à l'ADN, quand ils touchent les cellules germinales, peuvent augmenter la mortalité et les malformations.

C'est le cas aussi des biomarqueurs relatifs aux réserves énergétiques et au métabolisme. En conditions stressantes, les organismes mettent en place un compromis énergétique afin d'allouer de façon optimale leur stock d'énergie pour maximiser leur fitness. Si l'organisme utilise cette énergie pour se maintenir, en activant des mécanismes de défense, il aura moins d'énergie disponible pour croître et se reproduire (Newman, 2015g). L'impact populationnel dépendra aussi du stade de vie qui est le plus touché. A l'heure actuelle, seule la théorie DEB (Dynamic Energy Budget) et le modèle DEBtox qui en découle, permet de faire un lien mécanistique entre polluant, métabolisme énergétique et devenir des populations, et ainsi d'éviter l'écueil des extrapolations empiriques.

Il est donc difficile de discriminer les réponses naturelles des réponses au stress chimique, et d'extrapoler les réponses d'une échelle biologique à une autre, et d'une espèce à une autre. Mais il existe également une variation de la sensibilité au stress chimique d'une espèce à une autre, et parfois entre populations d'une espèce : une même mesure de biomarqueur sur deux espèces différentes, ou deux populations différentes ne reflètera donc pas forcément le même degré de contamination, et ne sera pas indicateur du même niveau de danger/risque pour la population.

Partie III : Le phénomène de tolérance aux contaminants : implications en biosurveillance

1. Définition de la tolérance

La tolérance est définie comme la capacité, pour un organisme, à gérer un stress, aussi bien d'origine naturelle (température, salinité, oxygène, ...) qu'anthropique (contaminants). Cette capacité est présente chez tous les organismes (bactéries, champignons, animaux et végétaux). Le terme de résistance est similaire, mais s'intéresse plutôt à la base génétique de cette tolérance (Férard et Blaise, 2013 ; Morgan et al., 2007 ; Newman, 2015g).

Dans le milieu, les contaminants agissent comme une force sélective au même titre que les facteurs environnementaux, favorisant les individus les plus aptes à la génération suivante, conduisant donc à une augmentation de la tolérance. C'est le cas par exemple pour les insectes résistants aux pesticides (Newman, 2015g), dont les premiers cas ont été étudiés au début des années 1900 (Pimentel et al., 2005). Pour les organismes aquatiques, les premières études sur la tolérance datent des années 1950, et étaient au départ menées sur les algues et les bactéries (Klerks et Weis, 1987).

La tolérance peut s'envisager sous plusieurs angles. Sous l'angle écosystémique, où elle va permettre aux espèces tolérantes de se maintenir et de préserver le fonctionnement de l'écosystème. Sous l'angle populationnel, où chaque population d'une espèce donnée va développer une tolérance aux paramètres auxquels elle est confrontée dans son milieu. Dans notre contexte, c'est plutôt ce niveau populationnel, et le fait que la tolérance puisse être envisagée comme un facteur confondant des réponses des organismes qui nous intéresse. En effet, les paramètres environnementaux et la contamination sont différents d'un site à l'autre : chaque population s'adapte à son milieu, met en place des mécanismes pour lutter contre les stress environnementaux, et seuls les individus tolérants contribueront aux générations suivantes. Différentes populations d'une même espèce auront donc une tolérance différente aux contaminants, et donc des réponses biologiques différentes, qu'il est nécessaire d'évaluer si on envisage de les utiliser en biosurveillance. La tolérance doit être prise en compte quand on veut utiliser des réponses biologiques (biochimiques, comportementales, génétiques, biomarqueurs) pour faire de la biosurveillance. Les niveaux basaux des biomarqueurs sur le terrain sont souvent différents d'une population à une autre, car chaque population est influencée par les conditions environnementales locales et par ses caractéristiques génétiques. Cette divergence entre populations d'une même espèce doit être considérée comme un facteur confondant des réponses des biomarqueurs et souligne la nécessité de connaître en profondeur les populations d'organismes sentinelles pour pouvoir interpréter correctement leurs réponses aux changements environnementaux. Après tout, les études *in situ* ne se font que sur les organismes ayant survécu... Dans la même idée, deux espèces différentes (même très proches phylogénétiquement) n'auront pas, elles non plus, la même tolérance aux contaminants.

2. Mécanismes d'acquisition de la tolérance

Il existe principalement deux façons de devenir tolérant à un contaminant : l'acclimatation physiologique (*via* une exposition sublétales à ce contaminant, sans base génétique et donc non transmissible, sauf par des mécanismes épigénétiques) ou l'adaptation génétique (dans les populations exposées sur plusieurs générations ; sélection naturelle des individus résistants ; transmissible à la descendance) ; ces deux mécanismes ne sont pas exclusifs puisque la capacité d'acclimatation d'un individu est conférée par son génome (Johnston, 2011 ; Klerks et Weis, 1987). L'acclimatation et l'adaptation peuvent survenir simultanément dans une population, mais l'acclimatation est intra-générationnelle alors que l'adaptation implique une transmission verticale.

2.1. Acclimatation physiologique

Dans le cas de l'acclimatation physiologique, l'organisme modifie ses processus biologiques afin de gérer les stress environnementaux (température, salinité, lumière, radiation, pollution) et de maintenir au mieux son homéostasie. En général, l'acclimatation consiste en une régulation d'un mécanisme de défense ou à la mise en place d'un comportement d'évitement ; elle exprime la plasticité phénotypique des individus (Johnston, 2011). Cette forme de tolérance n'est pas transmissible à la descendance, car n'est pas reliée à une modification de la composition génétique ou de la structure démographique d'une population (Newman, 2015h). En général, elle apparaît lors de la première exposition à une dose sublétales d'un contaminant, et elle permet une induction plus rapide des mécanismes de défenses lors d'une exposition ultérieure. Cependant ce phénomène reste concentration-dépendant, et certains contaminants peuvent dès la première exposition entraîner des dommages irréversibles, voir même la mort des individus s'ils sont présents à trop forte concentration (Newman, 2015h). McMahon et al. (1994) montrent par exemple que *D. polymorpha* tolère mieux les températures élevées lorsqu'elle a été acclimatée à ces températures, plutôt qu'à des températures froides.

On prendra soin ici de distinguer ce terme de l'acclimatation aux conditions de laboratoire, qui correspond au temps de stabilisation des organismes nécessaire avant la mise en place d'une expérimentation.

2.2. Adaptation génétique

On parle d'adaptation quand les mécanismes de tolérance sont acquis de manière génétique et peuvent donc être transmis à la descendance. L'exposition chronique (*in situ*) ou multigénérationnelle (en laboratoire) peut mener à une adaptation génétique afin de protéger la progéniture. Dans le cas de l'adaptation, on observe des modifications des fréquences alléliques, de la variabilité génétique, et des locus impliqués dans la tolérance (Bickham et al., 2000). Cette réponse adaptative héritable résulte de la sélection naturelle, qui augmente la fréquence d'individus dont la tolérance est fixée génétiquement

(Johnston, 2011) en opérant sur une grande variété de traits (Bickham et Smolen, 1994 ; Klerks et Weis, 1987 ; van Straalen et Timmermans, 2002). L'adaptation aux métaux est assez bien mise en évidence chez les bivalves (Luoma et al., 1983 ; McMahon, 2002 ; Milan et al., 2016).

L'écotoxicologie évolutive permet d'étudier l'adaptation génétique dans des populations naturelles exposées de manière chronique à des contaminants. Elle permet d'étudier la façon dont les processus évolutifs sont affectés par les contaminants : consanguinité, goulots d'étranglement, sélection préférentielle des locus impliqués dans les mécanismes de défense (Bickham et Smolen, 1994). Pour évoquer la différence génétique entre populations, on parlera de divergence génétique, alors qu'au sein d'une population on parlera plutôt de diversité génétique.

3. Mécanismes de défense impliqués dans la tolérance

Certains mécanismes impliqués dans la tolérance constituent d'excellents biomarqueurs, ce qui rend ces deux éléments interdépendants. Ces mécanismes s'étendent à tous les niveaux d'organisation biologique, et sont plus développés chez les invertébrés que chez les vertébrés, qui eux présentent des mécanismes de régulation moins diversifiés, avec une plus grande homogénéité des stratégies de survie (Amiard-Triquet, 2011). La plupart de ces mécanismes permettent aux organismes de contrer l'effet toxique des polluants au niveau individuel ; ils sont notamment focalisés sur la diminution de l'absorption, la détoxification et l'augmentation de l'excrétion. Lorsque les organismes sont soumis à des stressseurs, des hormones de stress (catécholamine, corticostéroïdes) sont relarguées pour initier les changements métaboliques (Férard et Blaise, 2013). Ensuite les réponses biochimiques se mettent en place, telles que l'induction des métallothionéines, les mécanismes de biotransformation et d'expulsion (MXR), les mécanismes antioxydants, les protéines de stress. Les organismes peuvent aussi limiter l'absorption des contaminants en sécrétant du mucus pour lier les métaux à la surface des cellules, favoriser la spéciation intracellulaire, la biominéralisation, ou l'élimination (Amiard-Triquet, 2011). D'autres réponses plus comportementales peuvent aussi entrer en jeu (éviter, échapper, barrières muqueuses), comme la fermeture de la coquille chez les bivalves, la sélection préférentielle de la nourriture non contaminée, l'enfouissement, ou la diminution de la filtration. Les réponses de ces mécanismes, utilisés en tant que biomarqueurs, peuvent correspondre à différents degrés de contamination selon que les individus se trouvent dans la phase d'acclimatation ou d'exhaustion, et selon qu'ils soient tolérants ou non (Figure 10).

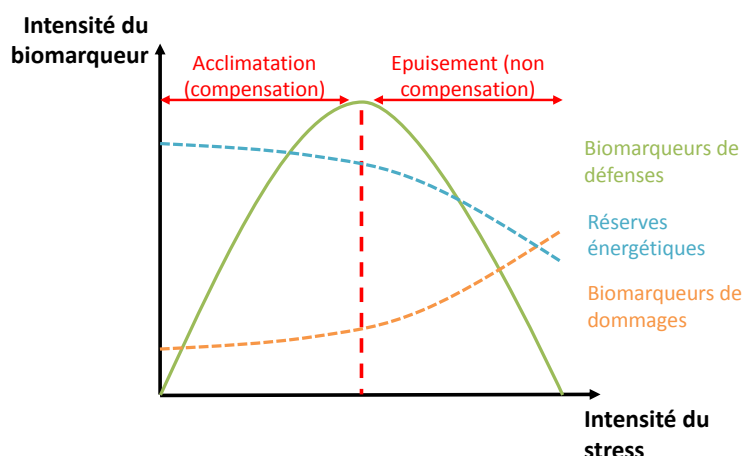


Figure 10 : Profils de réponses généralisés des différents types de biomarqueurs à un stress d'intensité croissante (d'après Dagnino et al., 2007; Férard et Blaise, 2013)

Lorsque le stress dépasse les limites de compensation des organismes, les réponses des biomarqueurs diminuent et peuvent même descendre en dessous des valeurs contrôles. Les biomarqueurs de défense contribuent à la tolérance, alors que les biomarqueurs de dommage vont plutôt révéler que les capacités de tolérance sont dépassées (Berthet et al., 2011). Certains des mécanismes impliqués dans la tolérance à un contaminant peuvent aussi entraîner une tolérance à des contaminants de nature similaire, auxquels la population n'est pas exposée. C'est le phénomène de co-tolérance, qui se met en place notamment lorsque les mécanismes impliqués sont des mécanismes généralistes (monooxygénases, MT).

4. Variabilité de la tolérance

L'acquisition et l'augmentation de la tolérance dépendent de nombreux facteurs génétiques, reproductifs et écologiques. L'acquisition de tolérance par adaptation génétique peut être plus rapide si elle concerne un allèle dominant et si elle est déterminée par un seul gène. Elle peut par contre être ralentie si plusieurs facteurs sélectifs agissent simultanément. Elle sera également plus rapide dans les populations avec un taux d'accroissement rapide et un temps de génération court. L'acquisition de tolérance peut aussi être ralentie par l'immigration d'individus non tolérants et la présence de refuges (e.g. des zones non polluées ; Newman, 2015g).

4.1. Variabilité inter-spécifique de la tolérance

Il existe des différences importantes de tolérance même pour des taxons très proches (comme les bivalves ; Berthet et al., 1992), associées à des différences au niveau des paramètres mesurés (biomarqueurs, survie, croissance ; Brown et al., 2004). Ces différences inter-spécifiques sont d'autant plus marquées chez les invertébrés, qui présentent des processus de gestion du stress très variés.

Berthet et al. (1992) ont montré que *D. polymorpha* était plus tolérante à une exposition à l'argent que certaines bivalves marines, avec un TL_{50} (temps entraînant la mort de 50% des organismes) trois à six fois plus élevé ; malgré cela, les auteurs reportent l'apparition d'effets sublétaux (pas de réattachement, lésions stomacales, dégénération des ovocytes...).

La variabilité inter-spécifique de la tolérance est à la base du concept de PICT (Pollution Induced Community Tolerance ; Blanck, 2002) : lorsqu'une communauté est exposée à des contaminants, les individus les plus sensibles disparaissent au profit des individus tolérants ; la nouvelle communauté ainsi formée est donc globalement plus tolérante

4.2. Variabilité intra-spécifique de la tolérance

L'existence de populations tolérantes vs sensibles a été montrée pour de nombreuses espèces, et les dreissènes n'échappent pas à la règle. Becker van Slooten et Tarradellas (1994) montrent que les individus de *D. polymorpha* indigènes sont mieux adaptés au TBT que les individus transplantés, puisqu'ils le bioaccumulent moins, ce qui leur permet de vivre sur ce site contaminé. De même, Bervoets et al. (2004) mettent en évidence que les organismes indigènes peuvent être acclimatés ou adaptés aux conditions locales, et présentent donc des différences de bioaccumulation et d'effets des contaminants comparé à des organismes transplantés. Ces différences intra-spécifiques dépendront aussi des paramètres intrinsèques à chaque population, comme les proportions mâles/femelles et adultes / juvéniles (Berthet et al., 2011). La présence de métapopulations pourra également jouer un rôle dans l'état des populations et leur tolérance aux contaminants, si une partie de la population vit sur un site contaminé, et l'autre pas par exemple (Farkas et al., 2017).

Ces différences intra-spécifiques de tolérance expliquent aussi la difficulté d'extrapoler vers le milieu naturel des résultats obtenus sur des individus élevés au laboratoire (Barata et al., 2002 ; Devin et al., 2014b).

Dans le contexte de nos travaux, ces deux types de variabilité seront à prendre en compte afin de comparer les différences de tolérance entre les deux espèces de dreissènes, et évaluer les différences de tolérance inter-populationnelles au sein de chaque espèce, qui peuvent constituer des facteurs confondants dans l'interprétation des biomarqueurs chez ces espèces invasives.

4.3. Tolérance et espèces invasives

Le phénomène de tolérance est assez particulier dans le cas des espèces invasives. Lorsqu'une espèce envahit un milieu, elle présente une faible diversité génétique (effet fondateur). Cette variabilité génétique augmente par la suite, grâce notamment à d'autres événements d'introduction qui vont ramener de nouveaux génotypes et augmenter ainsi le potentiel adaptatif. Les espèces invasives ou cosmopolites, de par leur succès de colonisation, sont suspectées d'être plus tolérantes aux polluants que

les espèces natives. C'est le cas par exemple pour *Sinanodonta woodiana* (invasive) qui gère mieux les conditions défavorables que *Anodonta anatina* (native), avec des systèmes MXR et ETS plus actifs, et moins d'altérations des systèmes de défense (Bielen et al., 2016). C'est le cas également pour *D. polymorpha* qui présente un meilleur succès que deux espèces natives (*Anodonta cygnea* et *Unio tumidus*) grâce à sa meilleure capacité de biotransformation des polluants (Contardo-Jara et al., 2014). En revanche, Faria et al. (2010) montrent que l'espèce native *Psilunio littoralis* accumule plus de mercure mais présente un meilleur potentiel antioxydant que *D. polymorpha* qui accumule peu et dont les défenses sont peu actives, mais qui subit des dommages oxydatifs. McMahon (2002) constate lui aussi une moins bonne tolérance chez *D. polymorpha* par rapport aux unionidés natives, mais en relation avec des facteurs physico-chimiques (température, hypoxie, émigration, pH).

Les espèces invasives ont du succès dans les environnements dégradés, car elles ont l'occasion de remplir une niche vacante, mais leur tolérance n'est pas forcément liée à leur invasivité, comme le montrent les exemples précédents. En effet, elles ne sont pas forcément plus tolérantes, mais ont des traits différents. La plupart des invasives suivent en effet une stratégie « r », avec une croissance rapide des individus et de la population, une forte fécondité et une grande capacité de dispersion ; ces caractéristiques leur permettent de coloniser des environnements instables, de récupérer plus rapidement après un épisode catastrophique et de mieux résister aux réductions régulières des effectifs dans les populations naturelles (McMahon, 2002 ; Sibly et Calow, 1989).

Dans le cas où elles sont effectivement plus tolérantes, cela peut être lié au fait qu'une fois installées, elles s'adaptent plus rapidement aux conditions locales pour maximiser leur succès reproducteur et leur dispersion (Faria et al., 2010). Cela peut aussi être lié à une pré-adaptation qui se serait produite dans leur aire de répartition d'origine (trait spécifique de l'espèce), ou le résultat d'une adaptation durant le processus d'invasion (trait spécifique de la population ; Lenz et al., 2011).

5. Conséquences de l'acquisition de tolérance

L'acquisition de tolérance peut avoir des conséquences positives ou négatives, à tous les niveaux d'organisation biologique. Parfois, les changements sont si soudains que la mise en place de la tolérance n'est pas possible, entraînant une extinction de certaines espèces (Klerks et Weis, 1987). Dans le cas où ils ne font pas disparaître la population, les polluants peuvent agir comme une force sélective et, selon le type de réponse, diminuer ou augmenter sa diversité génétique (Figure 11).

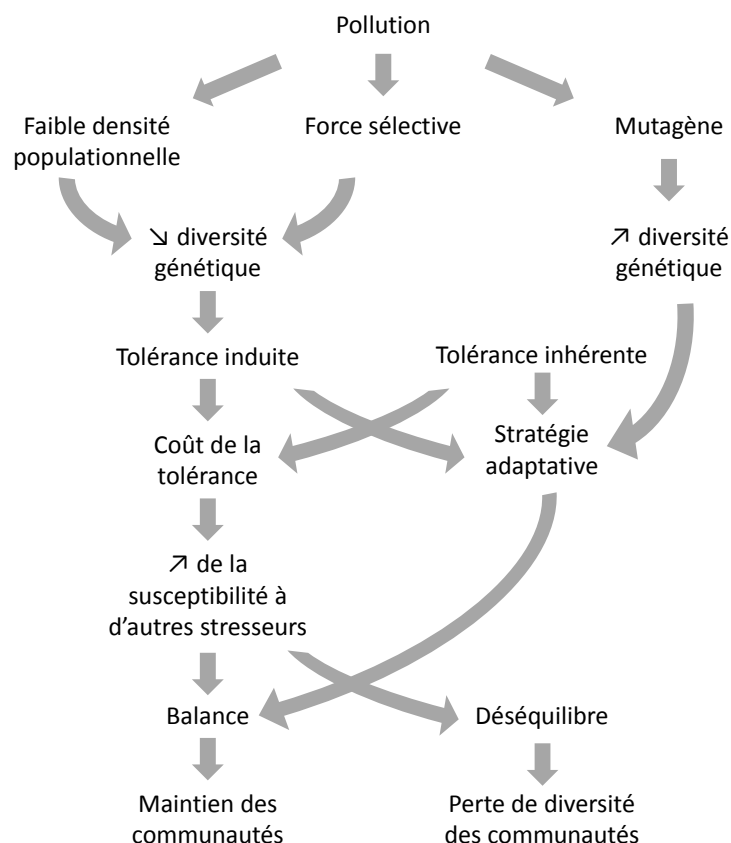


Figure 11 : Liens entre contamination, variabilité génétique, tolérance et conséquences sur les communautés (d'après Weis, 2011)

5.1. Diminution de la diversité génétique

Les organismes survivant en milieu pollué sont sélectionnés pour leur tolérance. Les individus capables de survivre et de se reproduire présentent des taux d'hétérozygotie élevée (Newman, 2015g). L'augmentation de la fréquence des génotypes résistants favorise le maintien de l'intégrité de l'ADN, mais la diversité génétique diminue dans les populations soumises à une forte pression toxique.

Les polluants peuvent modifier les qualités génétiques d'une population de façon moins directe que la simple sélection. Un polluant peut réduire la taille effective¹¹ d'une population, résultant en une perte de diversité génétique. Un goulot d'étranglement apparaît si trop peu d'individus sont disponibles pour qu'un allèle soit transmis aux générations suivantes. Cette réduction de taille de population peut aussi entraîner la perte d'allèles rares et accélérer la dérive génétique¹² (dans les petites populations les allèles peuvent vite être perdus ou au contraire devenir dominants ; Bickham et al., 2000). Les conséquences de la pollution, en absence de sélection naturelle, peuvent être la perte d'allèles spécifiques ou une diminution générale de la diversité génétique.

¹¹ Le nombre d'individus contribuant au pool génétique de la génération suivante

¹² Modification aléatoire de la fréquence d'un allèle dans une population

La plupart des études s'accordent à dire que lorsqu'on observe une diminution de la diversité génétique dans une population, les génotypes restants sont associés à une meilleure tolérance. Toutefois, le lien entre la diversité génétique et la tolérance n'est pas très étudié (Weis, 2011) et une diminution de la diversité génétique associée à une augmentation de la tolérance a déjà été observée, chez des isopodes par exemple (Ross et al., 2002).

Comme la diversité génétique est la matière première du changement évolutif, sa diminution peut réduire la capacité d'une population à s'adapter et à survivre à de futurs changements dans son environnement, et augmenter la sensibilité à de nouveaux stress (Newman, 2015g).

5.2. Augmentation de la diversité génétique

Même si les organismes survivent, les polluants peuvent entraîner des dommages à l'ADN (adduits, aberrations chromosomiques, oxydations de l'ADN) et des mutations, si le polluant est mutagène. Les mutations ont en général des effets délétères sur la reproduction, la viabilité et la survie des organismes (Bickham et al., 2000), mais peuvent dans certains cas conférer un avantage sélectif en créant de nouveaux génotypes, augmentant par la même occasion la diversité génétique (Férard et Blaise, 2013).

Les flux de gènes peuvent aussi augmenter la diversité en apportant de nouveaux gènes, mais doivent être limités pour qu'une adaptation globale de la population soit possible (Férard et Blaise, 2013).

5.3. Autres conséquences

Ces altérations de la diversité génétique au niveau populationnel sont précurseuses d'effets sur la diversité communautaire, mais sont moins étudiées (Johnston et Roberts, 2009). Les modifications de la diversité génétique dans les populations qui composent une communauté peuvent avoir des conséquences positives (conservation des communautés) et/ou négatives (perte de diversité des communautés) aux niveaux supérieurs.

La tolérance au niveau individuel entraîne des coûts pouvant avoir des répercussions aux niveaux supérieurs. En effet, une augmentation de la dépense énergétique peut se faire au détriment d'autres grandes fonctions, telles que la croissance et la reproduction, réduisant ainsi la fitness des individus et correspondant à l'hypothèse du coût métabolique évoquée précédemment (Partie II :4, p39 ; Calow, 1991 ; Heugens et al., 2001). Cependant il est difficile de distinguer les changements dus aux coûts de la tolérance de ceux liés aux effets toxiques directs des contaminants, et rares sont les études qui quantifient précisément cette réallocation énergétique (Amiard-Triquet, 2011).

La tolérance à un type de stresser peut également augmenter la sensibilité à des facteurs de stress additionnels, ou auxquels les organismes ne sont pas habitués. Chez *Crassostrea gigas*, le

métabolisme est plus actif chez les organismes vivant en milieu pollué, ce qui leur permet de maintenir leurs mécanismes de défense actifs, mais réduit leur capacité à faire face à un stress thermique (Lannig et al., 2006). C'est aussi vrai pour les communautés de macroinvertébrés qui ont été historiquement exposées aux métaux et sont moins tolérantes aux ultra-violets que des communautés n'ayant pas été pré-exposées (Kashian et al., 2007). La capacité des organismes à compenser ces coûts énergétiques dépend donc de leur historique d'exposition et de l'énergie disponible pour lutter contre le ou les stressseurs.

La tolérance peut être perdue si le contaminant disparaît : si le coût métabolique associé à cette tolérance confère un désavantage sélectif en l'absence du contaminant, la sélection naturelle opère à nouveau pour éliminer cette tolérance inutile (Mouneyrac et al., 2011). Parfois la tolérance ne se met pas du tout en place car elle n'est pas avantageuse par rapport aux coûts qu'elle engendre (Kovatch et al., 2000 ; Rainbow, 2002).

D'autres conséquences peuvent être observées : une espèce tolérante à un polluant peut disparaître suite à la disparition d'une espèce clé qui aurait, elle, été éliminée ; si une espèce disparaît, une autre peut remplacer la fonction qu'elle occupait (redondance fonctionnelle ; Amiard-Triquet, 2011). La tolérance peut aussi conférer un avantage compétitif à certaines espèces, notamment les invasives, ou entraîner des modifications des interactions trophiques (la disparition d'une proie ou d'un hôte peut entraîner une disparition des prédateurs ou des symbiotes). Et enfin, elle peut conduire à une diminution générale de la biodiversité (Johnston et Roberts, 2009).

Partie IV : L'utilisation des biomarqueurs dans notre contexte

Pour répondre à la menace liée à l'introduction de nombreux polluants dans l'environnement, l'évaluation du risque s'est historiquement focalisée sur des mesures simples pour détecter rapidement leur présence et leur risque dans les écosystèmes. D'autres outils se sont développés petit à petit. Le monitoring chimique permet de mesurer le niveau de pollution et d'évaluer le danger encouru par les organismes dans un milieu donné. La qualité biologique d'un milieu, mesurée à l'aide de différents indices de diversité, reflète son statut écologique. Et les biomarqueurs au niveau infra-individuel fournissent des indicateurs précoces, sensibles et peu coûteux des effets des contaminants et de leur mode d'action. Tous ces outils sont complémentaires (Chapman, 2002 ; Smolders et al., 2004b) mais la nécessité de développer des stratégies de biosurveillance des milieux effectivement applicables par les gestionnaires a conduit à appliquer des approches raisonnées, avec un souci de ratio coût/efficacité le plus favorable possible. L'accent a donc souvent été mis sur le monitoring chimique et les indices de diversité, au détriment des biomarqueurs dont la variabilité est très mal connue et comprise. Depuis leur description dans les années 90, les biomarqueurs sont tenus de répondre à un certain nombre de critères (Newman, 2015f) :

- ils doivent permettre d'identifier les effets des contaminants avant que des conséquences n'apparaissent aux niveaux supérieurs
- leur cinétique de réponse doit être connue (relation concentration/effet)
- leur mesure doit être rapide, peu coûteuse, et suffisamment simple pour être largement utilisée, y compris *in situ*
- ils doivent être spécifiques d'un contaminant ou d'une classe de contaminants
- ils doivent être applicables à une large gamme d'espèces
- dans l'idéal, ils doivent renseigner sur le statut physiologique et la performance des individus
- les facteurs pouvant confondre leurs réponses doivent être identifiés (variabilité inhérente)

Cette liste de critères est longue (et pourrait être rallongée), et rares sont les biomarqueurs susceptibles d'y répondre complètement. Contrairement au milieu marin où une certaine structuration se développe (Burgeot et al., 2017 ; Vethaak et al., 2017), il n'existe pas particulièrement de stratégie raisonnée pour le choix des biomarqueurs, le choix des espèces, ni sur la mise en place de protocoles adaptés à la biosurveillance en eau douce. Mais sachant le potentiel de ce type d'outils, de nombreuses méthodes ont été développées pour tenter de gommer ces incertitudes, et promouvoir leur intégration dans une stratégie raisonnée de biosurveillance des eaux douces (Besse et al., 2012 ; Connon et al., 2012 ; Martinez-Haro et al., 2015 ; Wernersson et al., 2015).

La clé du succès réside majoritairement dans la compréhension des facteurs confondants qui affectent la plupart des biomarqueurs utilisés en écotoxicologie. En effet dans un milieu naturel

complexe, les organismes sont soumis à des stress multiples, à des mélanges de contaminants, impliquant différents mécanismes de toxicité, à des conditions physico-chimiques fluctuantes et parfois défavorables (température, salinité, oxygène dissout, pollution, parasites). Traditionnellement, une réponse élevée est interprétée comme un stress, alors qu'en réalité elle peut simplement correspondre à une variation normale pour l'organisme en question et n'entraîner aucun impact sur sa fitness. L'idée est de réussir à identifier les causes naturelles et anthropiques responsables de la variabilité des réponses mesurées, et de connaître l'amplitude des réponses attendue dans un contexte physiologique normal (Baird et Burton, 2001).

Deux approches sont possibles pour l'utilisation des biomarqueurs *in situ* pour évaluer la qualité des milieux. La biosurveillance active est réalisée grâce à des transplantations : des organismes sont prélevés dans une population source, et transplantés (encagés) sur les sites dont on veut évaluer la qualité. La biosurveillance passive elle est réalisée en utilisant les organismes naturellement présents sur le site.

La biosurveillance active permet de sélectionner des organismes standardisés (taille homogène, sexe, poids, âge, statut reproducteur) avec une histoire de vie similaire, et donc de garder un contrôle sur les caractéristiques bio-écologiques de la population (Amiard et Amiard-Triquet, 2015a). Comme les individus transplantés partent tous théoriquement des mêmes valeurs initiales, une modification des valeurs des biomarqueurs pourra plus facilement être reliée à une modification de la contamination du milieu, si l'influence des autres facteurs physico-chimiques sur ces marqueurs est connue. Cette méthode permet de décider du temps d'exposition, de détecter des contaminations récentes, et d'évaluer la réaction d'une même population d'origine sur différents sites. Toutefois elle présente deux inconvénients majeurs. D'abord, lorsque l'espèce indicatrice sélectionnée est invasive et/ou qu'elle n'est pas présente spontanément sur le site, le transfert est impossible ce qui constitue un frein méthodologique. Mais même dans le cas d'une espèce autochtone, les transplantations peuvent modifier le phénomène migratoire et les flux de gènes. Il faut donc s'assurer de réaliser les transplantations hors période de reproduction (surtout quand on utilise des espèces aussi dynamiques que les dreissènes) et que les organismes encagés ne peuvent pas s'échapper. D'autre part, cette méthode néglige le phénomène d'adaptation génétique : les réponses des individus encagés, même si elles mettent en évidence une contamination, ne seront pas forcément représentatives de celles des individus autochtones qui auraient pu développer une tolérance suite à une exposition chronique (Berthet et al., 2011). La question de la transition entre effets individuels et populationnels restera en suspend.

La biosurveillance passive, elle, intègre de manière explicite les mécanismes d'acclimatation et d'adaptation puisque, par principe, il faut qu'une population se maintienne dans l'écosystème pour pouvoir être échantillonnée. En se débarrassant de la contrainte de la transplantation et en intégrant l'adaptation, la difficulté principale qui émerge est l'interprétation des valeurs prises par les biomarqueurs. En effet, les processus adaptatifs peuvent conduire à des valeurs radicalement différentes

pour un biomarqueur entre 2 populations, sans que la fitness de chaque population ne soit affectée. Il s'agira alors de chercher à définir une gamme de variation pour chaque biomarqueur, au-delà de laquelle les processus adaptatifs ne peuvent être les seuls impliqués. Cette méthode nécessite toutefois que les organismes soient présents en nombre suffisant sur les sites sélectionnés.

Cette synthèse bibliographique met en exergue la complexité du travail sur les biomarqueurs, et souligne l'interdépendance de nombreux facteurs à prendre en compte pour les utiliser de manière pertinente.

L'objectif de ce travail de thèse est de comprendre l'influence de ces facteurs de variations (paramètres biotiques et abiotiques, réponses biphasiques, phénomène de tolérance) sur les réponses des biomarqueurs chez les dreissènes, afin d'évaluer la faisabilité de leur utilisation en biosurveillance.

Les travaux ont été réalisés aux niveaux sub-individuel (avec la mesure d'une batterie de biomarqueurs), individuel (avec des marqueurs tels que l'activité de filtration ou l'indice de condition), et populationnel (en travaillant sur plusieurs populations de chaque espèce afin de comparer leurs réponses et leur capacité de tolérance). Les échelles étudiées dépendent de la question posée, avec en toile de fond le besoin de pouvoir déterminer à partir de simples mesures de biomarqueurs si le milieu est pollué ou non.

Pour tester la fiabilité de ces biomarqueurs, leurs réponses aux facteurs confondants, et tenter de donner aux dreissènes un statut de sentinelles de l'environnement, et non plus de simples invasives, différentes approches ont été mises en place.

Des approches *in situ* ont été réalisées sur plusieurs populations des deux espèces, à différentes périodes de l'année, pour tenter d'établir une gamme de variation « normale » des biomarqueurs en réponse aux fluctuations saisonnières, tout en intégrant les facteurs intrinsèques aux différents milieux.

Le couplage d'analyses physico-chimiques et de réponses cellulaires et biochimiques *in situ* devrait permettre de détecter les effets des facteurs abiotiques, dont les contaminants, sur les organismes, tout en examinant les relations de cause à effet. Ces études *in situ* permettront aussi d'évaluer la variabilité intra et inter-populationnelle des réponses des organismes dans leur environnement naturel, et de voir si *D. r. bugensis* est aussi apte que sa congénère à être utilisée en biosurveillance.

En laboratoire, des expositions à un contaminant en particulier, le nickel, ont permis d'observer les régulations des mécanismes de défense chez les deux espèces, mais également leur tolérance à ce contaminant. En effet chez les dreissènes, on s'intéresse plus volontiers à la tolérance aux paramètres physico-chimiques (Garton et al., 2014 ; Karatayev et al., 1998), pour pouvoir prédire leur invasion (Cohen et Weinstein, 2001 ; Ramcharan et al., 1992 ; Whittier et al., 2008), qu'à leur tolérance aux contaminants, pour les utiliser de façon pertinente en biosurveillance. Des études en conditions de stress multiples ont aussi été réalisées (température, nourriture, durée d'exposition, nickel), pour se rapprocher des stress subis par les organismes dans leur milieu naturel, et mieux comprendre leurs réponses à ces facteurs.

Chapitre 2 : Présentation des organismes et éléments méthodologiques

La question de l'évaluation du risque environnemental ne peut pas être traitée indépendamment de celle concernant les organismes modèles. A toutes les échelles décrites précédemment, la question de la communauté étudiée, du groupe trophique considéré, de l'espèce modèle utilisée sera centrale pour la généralisation des résultats, la fiabilité et la pertinence de l'évaluation réalisée. Ce chapitre présente les différents aspects des organismes étudiés : leur systématique, leur anatomie, leur physiologie, leur dynamique d'invasion, leur écologie et enfin leur intérêt en biosurveillance. Cette présentation des dreissènes est suivie d'une partie plus méthodologique, avec la présentation des sites de prélèvements, les différentes mesures réalisées sur le terrain (physico-chimie des sites et contamination) et en laboratoire (contamination des organismes, biomarqueurs).

Partie I : Les dreissénidés comme organismes sentinelles

1. Systématique

La classification (Figure 12) a été établie à partir du site ITIS (Integrated Taxonomic Information System, <http://www.itis.gov/>, consulté le 7.08.2017).

Règne Animalia
Sous-règne Bilateria
Infra-règne Protostomia
Super-embranchement Lophozoa
Embranchement Mollusca
Classe Bivalvia, Linnaeus, 1758
Sous-classe Heterodonta, Neumayr, 1884
Ordre Veneroida, H. Adams et A. Adams, 1856
Super-famille Dreissenoidea, Gray, 1840
Famille Dreissenidae, Gray, 1840
Genre *Dreissena*, van Beneden, 1835
Espèce *Dreissena polymorpha* Pallas, 1771 ; nom vernaculaire : moule zébrée
Espèce *Dreissena bugensis* Andrusov, 1897 ; nom vernaculaire : moule quagga

Figure 12 : Systématique des espèces du genre *Dreissena*

Les bivalves d'eau douce (qui sont tous eulamellibranches) présentent des caractéristiques spécifiques : deux valves caractérisées par la position du crochet (umbo), présence de muscles adducteurs dont les impressions palléales sont bien visibles sur les valves, deux cténidies (branchies) constituées chacune de deux lamelles doubles (Tachet et al., 2000). Les dreissenoidea (ou dreissenacea) dérivent probablement d'un ancêtre du genre *Mytilopsis* qui vivait en zone estuarienne ; ils sont présents en eau douce seulement depuis la fin du 18^{ème} siècle (Tachet et al., 2000).

La moule zébrée, *Dreissena polymorpha*, tire son nom vernaculaire des zébrures présentes sur sa coquille ; « polymorpha » fait référence aux nombreux morphes qui existent au sein de cette espèce, notamment en termes de coloration. *Dreissena rostriformis bugensis* est couramment appelée « moule quagga », en référence à une sous-espèce de zèbre aujourd'hui éteinte (*Equus quagga quagga*), dont les zébrures sont beaucoup moins marquées (May et Marsden, 1992).

De nombreuses discordances existent quant à la taxonomie des dreissènes et l'existence de plus de deux espèces (May et Marsden, 1992 ; van der Velde et al., 2010), selon le type et la quantité de marqueurs utilisés. Rosenberg et Ludyanskiy (1994) présentent la classification de 7 espèces au sein du genre *Dreissena*, et admettent que leur plasticité morphologique est trop importante pour les distinguer et que des études moléculaires plus approfondies sont nécessaires pour stabiliser la taxonomie. Des analyses génétiques plus récentes (Stepien et al., 2014) ont permis d'établir une nouvelle classification composée de trois sous-genres : *Dreissena* (comprenant l'espèce *D. polymorpha*), *Pontodreissena* et *Carinodreissena*. Ces auteurs soulignent que *D. r. bugensis* serait en fait une sous-espèce de *D.*

rostriformis qui appartiendrait au genre *Pontodreissena*. On retrouve désormais dans la littérature la dénomination « *D. rostriformis*, Deshayes 1838 » pour la moule quagga. Dans la mesure où les autres sous-espèces sont plutôt endémiques de la mer caspienne, nous avons fait le choix de conserver l'appellation *D. r. bugensis*, Andrusov 1987.

2. Origine, historique et répartition géographique

Dreissena polymorpha et *Dreissena rostriformis bugensis* sont des espèces très proches, toutes deux originaires de la région Ponto-Caspienne (Quinn et al., 2014). Les ancêtres des dreissènes seraient apparus dans le Tethys (-420 à -250 millions d'années) au moment de la Pangée, puis se seraient diversifiés lors de la formation du Paratethys il y a environ 30 millions d'années (Morton, 1993). Le premier représentant du genre *Dreissena* serait âgé de 10.6 millions d'années (Stepien et al., 2014).

La dispersion des dreissènes est médiée par des mécanismes naturels (le courant, les oiseaux et les autres animaux) ou anthropiques (la construction de canaux, la navigation, la pêche, le ballast, les hydravions, les activités de recherche...) qui sont expliqués en détail par Carlton (1993). Cette dispersion est facilitée par l'existence du byssus qui leur permet de se fixer sur des supports rigides, comme des coques de bateaux (Tachet et al., 2000). Selon les mécanismes, ce sont les larves, les juvéniles ou les adultes qui vont être transportés, aussi bien à l'échelle locale que globale (Carlton, 1993 ; Pollux et al., 2010).

2.1. En Europe

Suite aux épisodes glaciaires du quaternaire, *Dreissena polymorpha* s'est retrouvée confinée aux eaux saumâtres des mers Caspienne et d'Aral, et aux eaux plus douces des mers Noire et d'Azov (Morton, 1993 ; van der Velde et al., 2010 ; Figure 13). Elle s'est dispersée en Europe au début du 19^{ème} siècle (Figure 13), principalement *via* les systèmes de canaux bâtis en Europe de l'Ouest (Cohen, 2007 ; Quinn et al., 2014 ; Ram et al., 2012 ; van der Velde et al., 2010). Dès 1820, on la retrouve dans les régions baltiques, mais aussi en Grande Bretagne et aux Pays-Bas, où elle a probablement été importée sur du bois flotté destiné au chauffage ou à la construction (Ram et al., 2012 ; van der Velde et al., 2010). Elle est arrivée dans le delta du Rhin en 1826 (Schäfer et al., 2012). Dès 1860, elle est présente dans toute l'Europe au nord des Alpes (Ram et al., 2012).

Sa dispersion s'est fortement ralentie entre la fin du 19^{ème} siècle et le début du 20^{ème}, probablement à cause de la révolution industrielle et de la pollution et de la perte d'habitats qui y furent associés (Ram et al., 2012 ; van der Velde et al., 2010).

Une seconde vague d'expansion a eu lieu dans la seconde moitié du 20^{ème} siècle/début 21^{ème}, dans des régions jusque-là préservées par les barrières naturelles (deltas, montagnes...), devenues franchissables avec la facilitation de la circulation en Europe (van der Velde et al., 2010). *D. polymorpha* est dès lors retrouvée dans les régions alpines et en Europe du sud : dans les lacs alpins et subalpins dans

les années 1960 (Pollux et al., 2003), en Irlande en 1997 (Burlakova, 2006), au nord-ouest de l'Espagne en 2001 (Navarro et al., 2006) et en 2006 (Quinn et al., 2014), et enfin au sud de l'Italie en 2006 (Lori et Cianfanelli, 2006). Elle est désormais présente dans toute l'Europe, excepté en Norvège et en Islande (van der Velde et al., 2010).

Cette période (20/21^{ème} siècle) voit aussi la dispersion de *D. r. bugensis* (Ram et al., 2012), qui était jusqu'en 1940 confinée au Boug méridional (Southern Bug) et au Dniepr (Dnieper), deux fleuves ukrainiens qui se jettent dans la Mer Noire (Son, 2007 ; van der Velde et al., 2010 ; Figure 13).

Entre 1964 et 1989, elles s'est répandue dans un rayon de 500 km au nord, au sud et à l'est, en empruntant les canaux (Mills et al., 1996). Depuis les années 1980, Elle est apparue dans les bassins du Don et de la Volga, en Russie dans les années 1980 (Orlova et al., 2004 ; Son, 2007), et dans le Danube (Roumanie) en 2004 (Zhulidov et al., 2006). Elle apparait en Europe de l'Ouest en 2006 dans le Hollands Diep, un bras de rivière faisant le lien entre le Rhin et la Meuse (Molloy et al., 2007) et dans la rivière Main (van der Velde et Platvoet, 2007). Bien que l'expansion de *D. r. bugensis* en Europe ait été beaucoup plus tardive, elle n'en est pas pour autant moins lente.



Figure 13 : Répartition et expansion de *D. polymorpha* et *D. r. bugensis* en Europe (d'après Morton, 1993 ; van der Velde et al., 2010)

2.2. En Amérique du Nord

L'invasion nord-américaine fut beaucoup plus tardive que l'invasion européenne, mais sur ce continent les deux espèces sont arrivées quasi-simultanément, dans les années 1980 (Ram et al., 2012). La dispersion des dreissènes apparaît être liée au remplissage des ballasts de navires transatlantiques avec de l'eau douce contenant des larves véligères ou de jeunes individus. La vidange des ballasts dans un des grands lacs américains a assuré, involontairement, la colonisation du continent nord-américain (Carlton, 1993 ; Tachet et al., 2000 ; Figure 14). Les dreissènes nord-américaines ne présentent pas d'effet fondateur mais de hauts niveaux de variabilité génétique, témoignant d'invasions multiples par des individus provenant de diverses populations (Ram et al., 2012 ; Stepien et al., 2014).

D. polymorpha est apparue dans la région des grands lacs en 1986. Elle fut tout d'abord observée dans les lacs St Clair et Erié (voir Figure 14), puis en 1987 dans le lac Michigan (Carlton, 2008 ; Mackie et Schloesser, 1996 ; Ram et al., 2012). Ces dates ne sont liées qu'à des observations visuelles puisque les premiers prélèvements effectifs, ayant pour but de l'étudier, n'ont commencé qu'en 1988 dans le lac St Clair (Hebert et al., 1989). Elle s'est ensuite répandue à l'est dans les rivières Hudson et Mahawk, et au sud vers le Mississippi (Mills et al., 1996 ; Quinn et al., 2014). Des individus ont été identifiés sur la côte ouest dans le réservoir San Justo, près de San José en 2008 (Benson, 2014).

Des spécimens de *D. r. bugensis* ont été découverts en 1991 dans le canal Erié et le lac Ontario, où les deux espèces coexistaient, ainsi que dans le fleuve St Laurent (May et Marsden, 1992 ; Mills et al., 1996 ; Ram et al., 2012 ; Spidle et al., 1994), suggérant que l'espèce serait arrivée en 1989. Une étude réalisée par Mills et al. (1993a) révèle d'ailleurs sa présence en 1989 à Port Colborne, à l'est du lac Erié, bien qu'il existe un doute sur son identification. On la retrouve dans la rivière Ohio en 1994 et dans la partie nord du Mississippi en 1995. Cette espèce a colonisé seule une partie de la côte ouest américaine : elle est observée dans le lac Mead en 2007, puis dans d'autres lacs tributaires du Colorado en Californie, au Nevada et en Arizona (Benson, 2014 ; Cohen, 2007).

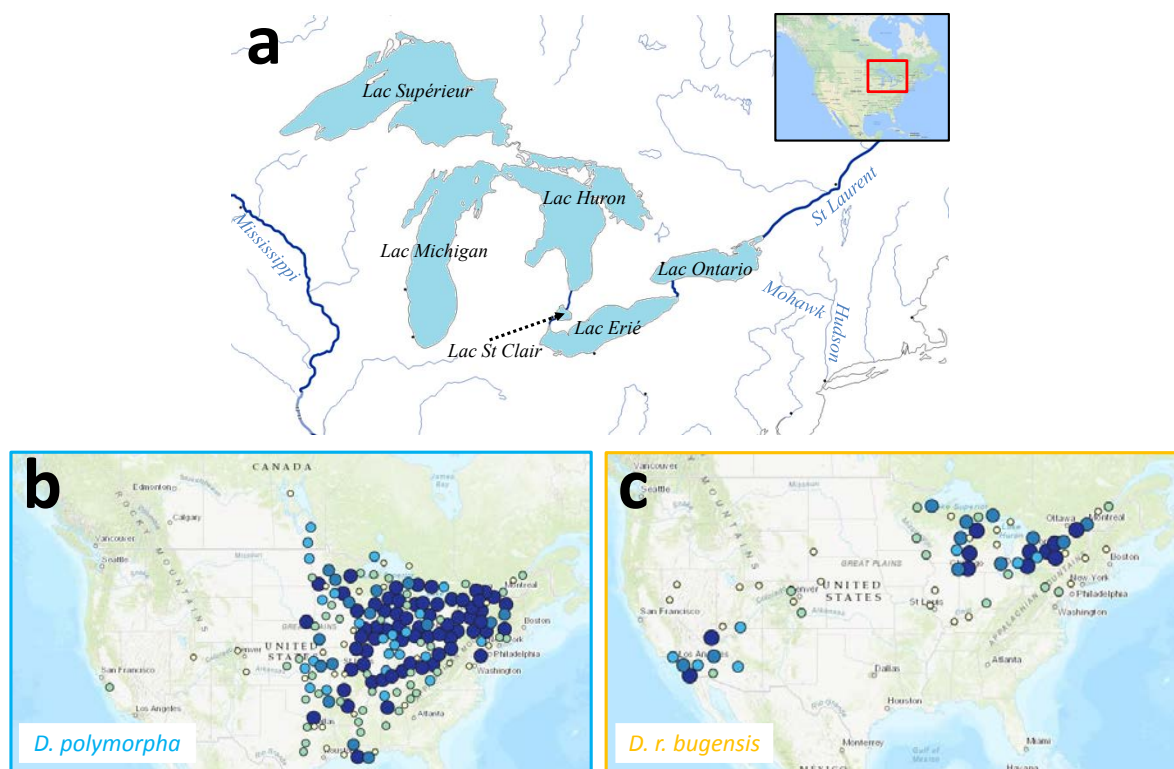


Figure 14 : Carte des grands lacs (a) et répartition de *D. polymorpha* (b) et *D. r. bugensis* (c) en Amérique du Nord (<https://nas.er.usgs.gov> consulté le 2.10.17)

3. Densités des populations et inversion de la dominance

Les deux espèces ont donc une expansion asynchrone. Dans les milieux (hors de leur aire de répartition naturelle) où *D. polymorpha* est déjà établie, *D. r. bugensis* tend à la remplacer en quelques années, en Europe comme en Amérique du Nord (Karatayev et al., 2015 ; Orlova et al., 2004 ; Ram et al., 2012 ; Ricciardi et Whoriskey, 2004 ; Stoeckmann, 2003 ; Wilson et al., 2006). Dans la Meuse et en Belgique, les abondances relatives de *D. r. bugensis* sont passées de 2.9% à 43.1% entre 2011 et 2013 par rapport à *D. polymorpha* (Marescaux et al., 2015). En Allemagne et aux Pays Bas, le remplacement de *D. polymorpha* par *D. r. bugensis* se fait à un taux de 26% par an (Heiler et al., 2013). Dans le lac IJsselmeer, aux Pays Bas, bij de Vaate et al. (2014) ont d'ailleurs rapporté une augmentation de 1% à 94% d'abondance relative entre 2007 et 2011 pour cette espèce.

Le retour à un équilibre entre les deux espèces au bout de quelques années est peu rapporté dans la littérature du fait du manque de suivi sur le long terme. Toutefois, Zhulidov et al. (2010) en compilant les données de plusieurs articles sur les densités de *D. r. bugensis* dans la Volga retrouvent cette tendance, avec des densités inférieures à 20% de 1986 à 1995 qui augmentent à partir 1996 pour atteindre 80% en 1997, puis un retour aux densités de départ (20%) est observé entre 2002 et 2003. Ces mêmes auteurs ont montré que suite à la fermeture de la centrale de Tchernobyl, les densités de *D. r. bugensis* dans les bassins de refroidissements sont passées de 2 à 84-100%. Sur ces 3 années de travaux, nous

avons également constaté empiriquement cette tendance sur certains de nos sites, avec des inversions drastiques des densités des deux espèces, parfois d'une année sur l'autre.

Ces inversions sont problématiques pour la biosurveillance. A l'heure actuelle, la plupart des données écotoxicologiques concernent *D. polymorpha* : si cette espèce vient à disparaître au profit de sa consœur, il sera nécessaire d'effectuer le même travail d'acquisition des connaissances sur *D. r. bugensis*, pour s'assurer qu'elle peut elle aussi être utilisée en tant que sentinelle. Comme nous allons le voir dans les parties suivantes, les deux espèces ont des exigences environnementales similaires, mais différent au niveau de leur métabolisme et de leur allocation énergétique, suggérant qu'elles présentent une physiologie différente.

4. Morphologie et Anatomie

4.1. Morphologie

Les dreissènes sont des bivalves, leur corps est donc enfermé dans une coquille à deux valves, sécrétée par le manteau (Thorp et Covich, 2010), et composée de carbonate de calcium (CaCO_3). La coquille de *D. polymorpha* est aplatie sur la face ventrale, avec une légère courbure concave, et présente un angle ventro-latéral aigu. La face ventrale de *D. r. bugensis* est plutôt convexe et son angle ventro-latéral arrondi (Figure 15). L'ouverture permettant l'extension du byssus est plus antérieure chez *D. r. bugensis*.

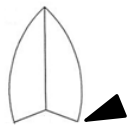
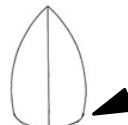
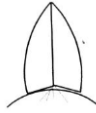
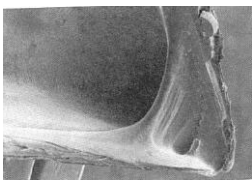
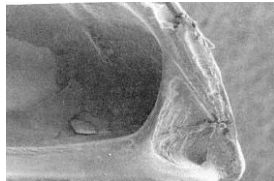
	<i>D. polymorpha</i>	<i>D. r. bugensis</i>
Vue de derrière	 Côté ventral concave. Angle ventro-latéral caréné (flèche).	 Côté ventral convexe. Angle ventro-latéral arrondi (flèche).
Mode de vie épifaunal		
Vue des plaques myophores		

Figure 15 : Caractéristiques morphologiques de *D. polymorpha* (à gauche) et *D. r. bugensis* (à droite) (d'après Claudi et Mackie, 1994)

Leur forme est tout à fait adaptée à leur mode de vie : la forme de leur face ventrale et la fixation grâce au byssus les rendent difficilement préhensibles, le crochet améliore leur stabilité, et leur coquille est comme aiguisée afin de limiter la prédation (Claudi et Mackie, 1994).

Comme le montre la Figure 16, il existe une forte variabilité morphologique inter et intra-spécifique.



Figure 16 : Différents morphotypes de *D. polymorpha* (en haut) et *D. r. bugensis* (en bas) observés lors des campagnes de prélèvements

De nombreuses études se sont penchées sur ces différences morphologiques entre les deux espèces. Pavlova et Izyumov (2014) comparent des populations européennes et nord-américaines et mettent en évidence ces différences morphologiques et pigmentaires ; comme nous, ils constatent que les ratios hauteur/longueur et hauteur/largeur sont plus faibles et que le ratio largeur/longueur est plus élevé chez *D. polymorpha*. Ils constatent également que la variabilité morphologique est plus importante chez *D. r. bugensis* et montrent que la croissance en largeur est plus rapide que la croissance en hauteur. Spidle et al. (1994) identifient un spécimen de *D. bugensis* vivant en profondeur (qu'ils nomment « profunda ») mais confirment grâce à l'étude des allozymes qu'il s'agit simplement d'un variant phénotypique de *D. r. bugensis*, et non d'une nouvelle espèce. Il n'existerait donc pas une multitude d'espèces de dreissènes, mais simplement une forte variabilité phénotypique au sein de ce genre. Cette variabilité morphologique entre les espèces et entre les populations pourrait s'expliquer par le mode de vie épifaunal et fixé des dreissènes, et par l'influence du courant, de la profondeur et de la salinité sur le morphotype (Grutters et al., 2012).

4.2. Anatomie

Au niveau interne (Figure 18), les muscles adducteurs antérieur et postérieur, permettent la fermeture des valves. Le ligament, situé du côté antéro-dorsal, forme une charnière et permet de les ouvrir (Claudi et Mackie, 1994).

Le corps est enveloppé dans le manteau, un fin tissu constitué de deux lobes, qui vont chacun sécréter une valve (Thorp et Covich, 2010). L'intérieur du manteau, qui contient la plupart des organes, est appelé cavité mantellaire. Le manteau s'ouvre en deux endroits ; le premier laisse passer les siphons inhalant et exhalant (Claudi et Mackie, 1994). Le plus large est le siphon inhalant (SI) bordé de 80 à 100 tentacules qui commencent le tri des particules alimentaires. Le siphon exhalant (SE), plus étroit et conique, est positionné dorsalement par rapport au premier (Claudi et Mackie, 1994 ; Morton, 1993). Comme le montre la Figure 17, la zone de papilles est plus étroite et plus haute chez *D. polymorpha* ; cela constitue un autre critère de différenciation des deux espèces, valable surtout pour les individus adultes (> 10 mm ; Smith, 1999).

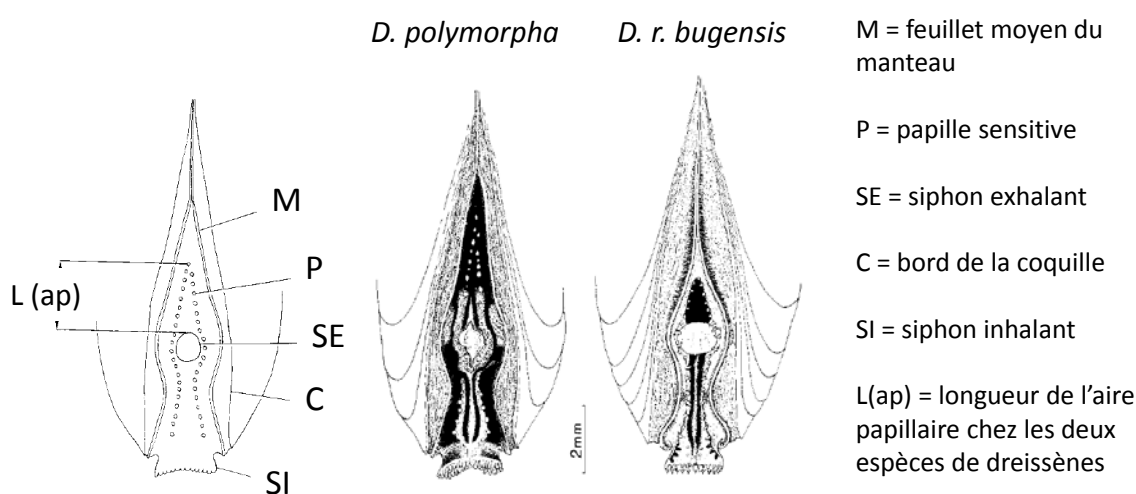


Figure 17 : Vue de la région postérieure du manteau et des siphons, d'après Smith (1999).

Une autre ouverture dans le manteau permet l'extension du pied et du byssus. Les branchies (1 paire de chaque côté) se trouvent entre le pied et le manteau (Claudi et Mackie, 1994). La masse viscérale abrite le système digestif, le système rénal ainsi que le cœur et les gonades (Thorp et Covich, 2010). La bouche forme un orifice entouré d'une paire de palpes labiaux. Elle s'ouvre sur un court œsophage qui aboutit à un estomac, où se situe le stylet cristallin, un organe gélatineux qui sécrète les enzymes digestives. La nourriture passe ensuite dans la glande digestive (Claudi et Mackie, 1994).

Au niveau ventral se trouve le pied, qui permet aux bivalves de se déplacer et qui abrite la glande du byssus (Claudi et Mackie, 1994).

Le courant, produit par les branchies, circule à l'intérieur de la cavité palléale, et permet aux organismes de se débarrasser des déchets et des gamètes, mais aussi de renouveler les apports en oxygène et en nourriture (Thorp et Covich, 2010). Les branchies de *D. polymorpha* sont représentatives des eulamellibranches avec deux lamelles épithéliales entourant un canal où circule l'eau, et elles sont très sensibles aux chocs osmotiques (Silverman et al., 1996).

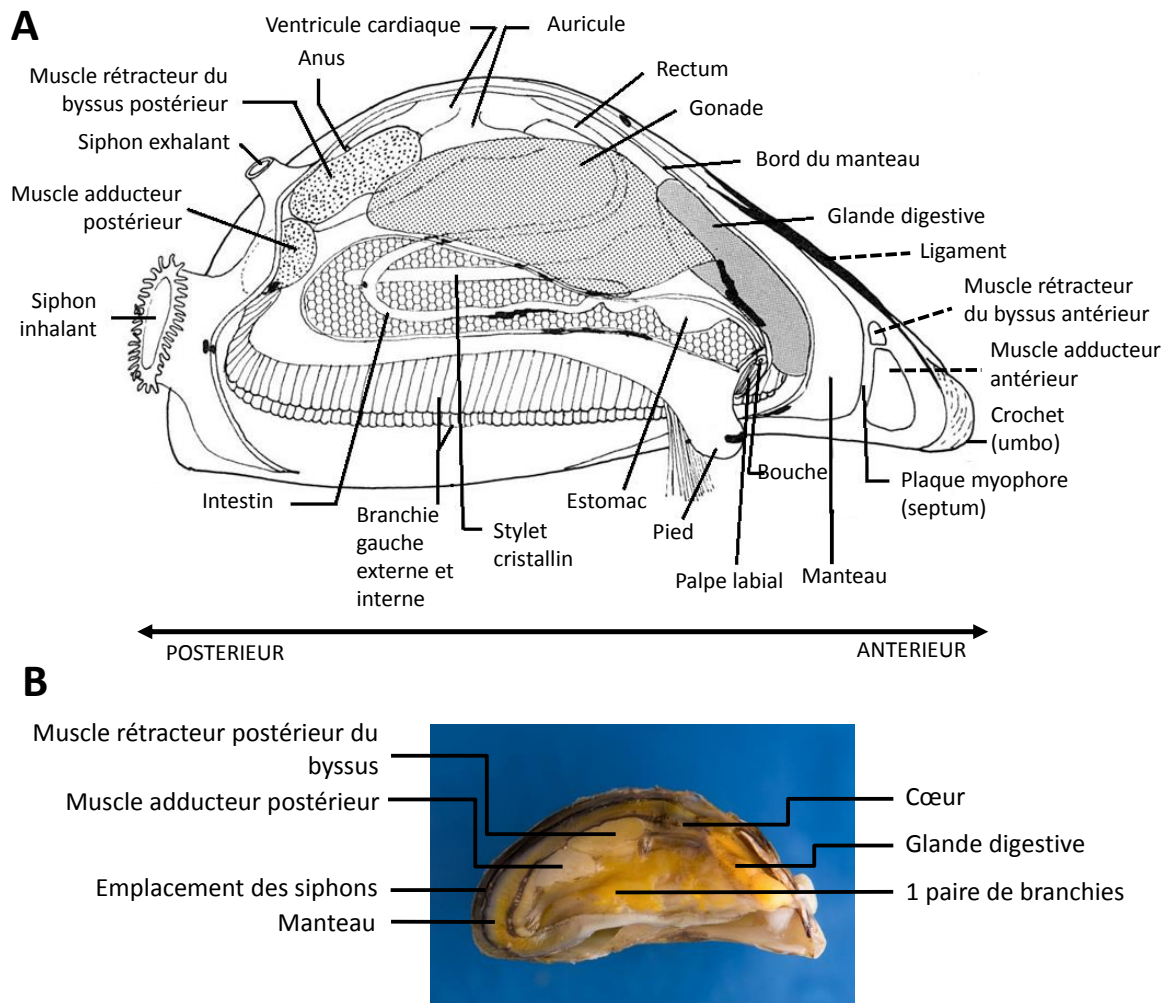


Figure 18 : Schéma (A) et photographie (B, crédit photo : D. Coacolo) montrant la localisation des principaux organes internes de *D. polymorpha* (d'après Claudi et Mackie, 1994)

4.3. Différenciation des deux espèces

La différenciation des dreissènes peut se faire sur la base de critères morphologiques, tels que la forme de la coquille (Molloy et al., 2010 ; Pathy et Mackie, 1993) ou encore l'anatomie des siphons (Smith, 1999). L'angle ventro-latéral est très souvent utilisé pour distinguer visuellement les deux espèces (May et Marsden, 1992 ; Molloy et al., 2007 ; Zhulidov et al., 2010). Mais l'identification sur la seule base de la morphologie externe est assez controversée. Beggel et al. (2015), en comparant les méthodes d'identification morphologiques *versus* génétiques ont mis en évidence un taux d'erreur d'identification des espèces de 17,5%. Toutefois, l'identification morphologique est nécessaire dans les programmes de monitoring, lorsqu'on travaille sur un grand nombre d'individus dans des conditions de terrain. Teubner et al. (2016) ont significativement amélioré le calcul de l'angle ventro-latéral (moins d'1% d'erreur), si toutefois il est effectué par des personnes entraînées (sinon il passe à 8.4%). Mais l'utilisation de marqueurs génétiques reste la seule méthode fiable à 100% (Hoy et al., 2010 ; Marescaux

et Van Doninck, 2013 ; Stepien et al., 1999). Les études ciblées à la fois sur l'identification morphologique et génétique (ADN mitochondrial, allozymes) des différents stades de vie des dreissènes (larves, juvéniles et adultes) ont permis de mieux comprendre leur phylogénie (Claxton et al., 1997 ; Domm et al., 1993 ; May et Marsden, 1992 ; Spidle et al., 1994 ; Stepien et al., 1999).

La similarité génétique entre *D. polymorpha* et *D. r. bugensis* varie selon les études. La distance génétique calculée par May et Marsden (1992) pour 6 populations de *D. polymorpha* et 1 population de *D. r. bugensis*, toutes nord-américaines, est de 1.22. Spidle et al. (1994), en incluant également des populations européennes, obtiennent une distance génétique légèrement supérieure de 1.69. Ces mêmes auteurs (May et Marsden, 1992 ; Spidle et al., 1994) soulignent également que le taux d'hétérozygotie est environ trois fois plus élevé chez *D. polymorpha* ($H = 0.3$) que chez *D. r. bugensis* ($H = 0.1$), impliquant soit que les individus à l'origine des populations de *D. r. bugensis* avaient un faible taux d'hétérozygotie, soit que les populations fondatrices étaient plus petites que celles de *D. polymorpha*.

Ces résultats suggèrent une grande distance génétique entre les deux espèces, laissant penser qu'elles présenteraient des réponses physiologiques et comportementales différentes, et qu'une hybridation serait improbable. Spidle et al. (1995b) sur 350 *D. r. bugensis* et 400 *D. polymorpha*, n'ont retrouvé aucun hybride ; certains allèles présents uniquement chez une espèce sont parfois retrouvés chez l'autre, mais ce sont des résultats sporadiques et non reproductibles. Si une hybridation existe, elle se fait dans une proportion extrêmement faible et/ou les véligères hybrides n'arrivent pas à s'installer et à croître. En revanche en Russie, Voroshilova et al. (2010) ont mis en évidence l'existence d'un individu hybride sur 37 analysés, dont 16 étaient morphologiquement indifférenciables, dans des populations naturelles ; l'hybridation semble donc possible *in situ*. Cette étude met en évidence que les critères morphologiques ne permettent pas de distinguer les individus hybrides (1 seul sur 16 potentiels) et que les morphotypes intermédiaires parfois observés ne sont pas nécessairement des hybrides ; en revanche, elle suggère que l'introgression d'un gène d'une espèce dans le génome de l'autre est possible et pourrait augmenter la variabilité génétique et morphologique chez les dreissènes.

Miller et al. (1994) montrent que l'attraction spermatique chez les dreissènes est espèce-spécifique ; cela pourrait expliquer la faible hybridation entre les deux espèces, puisqu'elle reste possible mais qu'il faut une concentration 100 fois supérieure d'agent attractif pour attirer le sperme de l'autre espèce. Cette forte attraction spermatique pourrait expliquer le fort taux de fécondité chez ces deux espèces. Identifier précisément la molécule responsable de cette attraction pourrait également permettre un meilleur contrôle de ces invasives, sans risque pour les populations de bivalves natifs.

5. Physiologie

5.1. Filtration et alimentation

Les dreissènes sont des bivalves suspensivores : l'eau entre par le siphon inhalant et l'action des cils branchiaux crée un courant à l'intérieur de la cavité mantellaire ; ce mécanisme peut être perturbé en période de reproduction, durant laquelle l'augmentation de la taille des gonades peut perturber le fonctionnement des branchies (Thorp et Covich, 2010). Cette étroite association entre les gonades et le système digestif complique également la séparation des tissus lors des dissections. En plus de faire circuler l'eau, les cils permettent d'en retirer les particules solides (phytoplancton, bactéries, débris organiques fins) dont la nourriture (Tachet et al., 2000). Les particules destinées à être ingérées sont alors redirigées vers la bouche ; les autres sont enrobées dans du mucus sécrété par les cellules branchiales et rejetées sous forme de pseudofécès par le siphon inhalant (Morton, 1993). En plus de la récupération de la matière particulaire, les branchies sont également le siège des échanges gazeux (Thorp et Covich, 2010). *D. polymorpha* peut filtrer entre 10 et 100 mL/individu/heure. Elle préfère les particules comprises entre 15 et 40 μm , mais peut filtrer des particules jusque 0.7 μm (Claudi et Mackie, 1994). La digestion et l'assimilation des nutriments se fait en deux phases. La première a lieu dans l'estomac où la nourriture va être broyée mécaniquement et mélangée avec des enzymes digestives. Quand elles sont suffisamment réduites, les particules de nourriture passent dans la glande digestive, où elles seront digérées dans des cellules phagocytaires. De par sa fonction, la glande digestive est une cible prioritaire pour l'accumulation des polluants, en faisant un organe clé de la défense cellulaire et de la détoxification.

5.2. Circulation et respiration

Les mollusques bivalves ont un système circulatoire ouvert dans lequel le fluide circulant (l'hémolymphe) baigne tous les organes avant de retourner au cœur (Thorp et Covich, 2010). Les dreissènes possèdent une chambre cardiaque, avec un seul ventricule et deux auricules.

Il n'existe pas de protéines de transport d'oxygène chez les bivalves, mais l'oxygène est dissous dans le fluide circulant (Thorp et Covich, 2010).

5.3. Système immunitaire et hémocytes

La portion fluide de l'hémolymphe (appelée plasma ou sérum de l'hémolymphe) contient diverses protéines, incluant des lectines solubles, des enzymes lysosomales et divers peptides antimicrobiens. Les cellules circulantes sont appelées hémocytes et ressemblent aux monocytes/macrophages des vertébrés, tant au niveau de leur structure que de leur fonction (Canesi et al., 2002). Les hémocytes combinent à la fois des processus phagocytotiques, des facteurs de défense humoraux (agglutinines (lectines)), des enzymes lysosomales (ACP, lysozyme), et des peptides antimicrobiens, et peuvent aussi produire des métabolites toxiques (comme des ROS et de l'oxyde nitrique ; Canesi et al., 2002).

Les hémocytes sont recrutés rapidement durant les réactions immunitaires et de défense. Leur rôle multifonctionnel les rend plus sensibles aux facteurs internes et environnementaux que les autres cellules (Binelli et al., 2012). Chez les mollusques, les hémocytes sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques et pathologiques, telles que le transport des nutriments et leur digestion, la réparation de la coquille et des blessures, la défense interne, l'excrétion endogène et exogène. Les hémocytes participent à la clairance du matériel étranger, qu'il soit de nature biotique (bactérie) ou abiotique.

L'étude de la morphologie et de la caractérisation des hémocytes sont nécessaires afin d'étudier (1) les rôles des hémocytes dans l'accumulation et la détoxification des polluants (en particulier métalliques) et (2) les réponses des hémocytes aux stress environnementaux chez les dreissènes (Giambérini et al., 1996). Chez plusieurs espèces de mollusques bivalves, la morphologie des hémocytes a été décrite, notamment grâce à la microscopie électronique. Il existe deux types principaux : les hémocytes granulaires (granulocytes neutrophiles (34%) et hémocytes basophiles larges (26%)) et agranulaires (hyalinocytes (40%) ; Giambérini et al., 1996). Les hémocytes granulaires représentent le type cellulaire le plus présent, mais peuvent varier par leur nombre, leur type ou leur degré d'activité phagocytotique (Canesi et al., 2002). Pour le moment, mis à part une étude sur les dommages à l'ADN des hémocytes (Schäfer et al., 2012), aucune étude ne s'est intéressée à leur morphologie et leur réponse aux contaminants chez *D. r. bugensis*.

5.4. Système lysosomal

Les lysosomes sont des organites intracellulaires, présents dans de nombreux types cellulaires chez les mollusques, et constitués d'une association d'enzymes lysosomales et de granules cytoplasmiques (Giambérini et al., 1996). Dans le compartiment cellulaire (hémocytes ou autres cellules), ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions normales et pathologiques, incluant la compartimentalisation, l'accumulation et la détoxification d'une grande diversité de polluants organiques et métalliques (Giambérini et Cajaraville, 2005 ; Giambérini et Pihan, 1997). Quand les capacités de stockage des lysosomes sont dépassées, les polluants peuvent induire des altérations au niveau du nombre de lysosomes, de leur taille et de leur stabilité membranaire (processus de fusion). Quand ils sont trop abimés, les lysosomes éclatent et libèrent des hydrolases lysosomales dans le cytoplasme et l'environnement extracellulaire. La mesure quantitative de ces enzymes lysosomales est utilisée comme marqueur de stress toxique ; c'est le cas notamment pour l'ACP (Suresh et Mohandas, 1990). Il est admis que les réponses lysosomales, à la fois chez les vertébrés et les invertébrés, correspondent à un biomarqueur cellulaire généraliste, qui répond à la contamination de l'écosystème et aux stress abiotiques environnementaux (Giambérini et Cajaraville, 2005). Le système lysosomal est également sensible aux modifications des environnements intra et extracellulaires, et est donc impliqué

(directement ou indirectement) dans le contrôle de nombreux processus physiologiques et pathologiques (Suresh et Mohandas, 1990).

5.5. Sécrétion du byssus

Le byssus est constitué de filaments protéiques, sécrétés par une glande, qui permettent aux moules de se fixer sur un substrat *via* la présence de plaques adhésives à leur extrémité (Peyer et al., 2009). Le nombre, l'épaisseur, force d'adhésion des brins, ainsi que la composition du substrat, conditionnent la capacité et la force de fixation des moules (Mackie et Schloesser, 1996; Peyer et al., 2009). *D. polymorpha* se fixe indifféremment à l'horizontale ou à la verticale (Eckroat et al., 1993). Les moules sécrètent la majorité des filaments durant la première semaine de fixation, ensuite le taux décroît (Eckroat et al., 1993). Pour se détacher, les moules sécrètent des enzymes qui vont libérer l'intégralité du byssus (Claudi et Mackie, 1994).

Les filaments, sécrétés un par un, sont composés de DOPA (3,4-dihydroxyphenylalanine), un acide aminé présent également chez les mollusques marins. Une moule adulte peut sécréter environ 23 filaments par semaine, mais ce taux varie avec la taille, la température et la qualité de l'eau (Claudi et Mackie, 1994 ; Morton, 1993).

Les dreissènes peuvent produire deux types de filaments, temporaires ou permanents, différenciés par leur longueur, leur épaisseur, leur nombre, leur organisation et la morphologie de la plaque de fixation (Eckroat et al., 1993). Les filaments permanents sont courts et épais et constituent la majeure partie de la masse du byssus. Les filaments temporaires sont longs, fins et peu nombreux (1-6) ; ils participent à la stabilisation de l'organisme, avant ou après la fixation par les filaments principaux (Mackie et Schloesser, 1996 ; Thorp et Covich, 2010). Les petites moules se déplacent plus, car leur byssus est moins fortement fixé, et les plus grosses peuvent également être retenues par les filaments de leurs voisines (Mackie et Schloesser, 1996).

Le fonctionnement de la glande du byssus requiert l'extension du pied (Rajagopal et al., 2002), qui permet également à la moule d'identifier le substrat et de guider les filaments (Eckroat et al., 1993) (la sortie du pied ne veut pas forcément dire qu'il y a formation de byssus). Un indice byssogénique existe qui permet d'exprimer le taux de production du byssus en fonction de l'activité du pied (Rajagopal et al., 2002). La production de byssus nécessite donc l'extension du pied et l'ouverture des valves. Lorsque les moules sont détachées, ce statut n'étant pas normal pour elles, elles essayent systématiquement de se rattacher (Clarke et McMahon, 1996). Elles augmentent donc leur byssogénèse, exposant ainsi leurs tissus mous au milieu environnant et aux contaminants potentiellement présents (Rajagopal et al., 2002). Dans leur étude, Rajagopal et al. (2005) ont d'ailleurs montré l'importance de laisser du temps aux moules pour qu'elles s'attachent, avant de conduire des tests en laboratoire (les moules détachées sont plus sensibles que des moules attachées au début d'une expérimentation). Les moules détachées ont en effet les valves plus ouvertes, fait attesté par une plus forte consommation

d'oxygène, une augmentation des taux de filtration et de l'activité du pied. Si les moules ne sont pas attachées, on surestime la toxicité des composés testés. Ces mêmes auteurs n'observent pas de différence significative entre des moules réattachées et des moules naturellement attachées à leur substrat naturel : le stress n'est donc pas lié au prélèvement, mais bien au fait qu'elles vont essayer de resécréter du byssus et s'exposer.

Concernant les différences inter-spécifiques, Peyer et al. (2009) ont comparé le taux de synthèse du byssus et la force d'attachement entre les deux espèces soumises à différentes vitesses (0, 50, 100, 180 cm/s). Ils mettent en évidence la meilleure plasticité phénotypique de *D. polymorpha*, qui présente un taux de synthèse quasiment deux fois supérieur à sa congénère, et qui est capable d'accroître ce taux de synthèse quand la vitesse du courant augmente (tout comme l'avaient montré Clarke et McMahon, 1996). *D. r. bugensis* est donc plus facilement délogeable. Mais à une vitesse normale sur du plus long terme (3 mois) la force de fixation des deux espèces redevient équivalente (plasticité phénotypique de *D. polymorpha* qui dépense moins d'énergie quand le courant ralenti). Ces différences de capacité de fixation pourraient aussi être dues à une composition du byssus différente, entraînant des propriétés mécaniques différentes (Anderson et Waite, 2002). Le compromis énergétique semble différer entre les deux espèces, et il apparaîtrait que *D. polymorpha* soient plus apte à se maintenir dans les zones à fort courant.

5.6. Métabolisme énergétique et croissance

Le métabolisme énergétique est un des paramètres pour lequel les deux espèces se différencient. *D. r. bugensis* a en général une meilleure croissance de la coquille et des tissus mous que *D. polymorpha* (Mills et al., 1996 ; Stoeckmann, 2003), qu'elles soient nourries avec du seston naturel ou des algues cultivées en laboratoire (Baldwin et al., 2002).

Il faut cependant noter que les taux de croissance sont beaucoup plus élevés *in situ* qu'en laboratoire (MacIsaac, 1994), et que la croissance dépend fortement de la taille (les moules plus petites croissent plus vite). Les individus plus petits (< 15 mm) allouent plus d'énergie à la croissance, alors que les plus gros investissent plutôt dans la reproduction (Stoeckmann, 2003 ; Stoeckmann et Garton, 1997). En revanche pour une même taille, la croissance reste plus élevée de 21 % pour *D. r. bugensis* par rapport à *D. polymorpha*, qui elle aura une masse de gamètes plus importante (Stoeckmann, 2003). De plus, pour une même longueur, *D. r. bugensis* sera plus lourde que *D. polymorpha* (Stoeckmann, 2003). Ces différences sont aussi présentes au stade larvaire : au moment de la fixation, les larves de *D. r. bugensis* sont plus grosses que les larves de *D. polymorpha* (314 μm contre 262 μm au stade prodissoconque II), suggérant que le stade planctonique de *D. r. bugensis* est plus long ou que les larves grossissent plus vite (Martel et al., 2001).

Les demandes métaboliques chez les moules dépendent aussi de la température, de la disponibilité en nourriture et du statut reproducteur (Sprung, 1995a). Stoeckmann (2003) trouve une

corrélation, pour les deux espèces, entre les variations saisonnières de température et les coûts métaboliques. *D. r. bugensis* subit moins de réduction de masse durant la période juin-octobre, suggérant qu'elle serait mieux adaptée à une balance énergétique négative (Casper et Johnson, 2010). *D. r. bugensis* a un meilleur taux de croissance et une meilleure survie, qu'elle soit seule ou mise en compétition avec *D. polymorpha*, à des températures de 12 ou de 6 °C (Karatayev et al., 2011). Ces auteurs montrent également que la taille des moules à l'arrivée de l'hiver conditionnera leur survie (les moules plus grosses ont une meilleure survie). Pour des moules de taille inférieure à 25 mm, la croissance de *D. polymorpha* est plus rapide en période chaude ; en période froide c'est *D. r. bugensis* qui croît plus vite (Thorp et al., 2002). Pour les moules de taille supérieure, aucune différence entre les deux espèces n'a été constatée par ces auteurs. Cependant, *D. r. bugensis* a un plus faible taux de respiration (Stoeckmann, 2003), mais un meilleur taux d'assimilation (Baldwin et al., 2002). Cela lui permet de maintenir ses fonctions vitales (croissance, reproduction) même si la nourriture est peu abondante. Ce coût métabolique réduit lui permet d'avoir plus d'énergie à allouer à la croissance et à la reproduction dans des conditions similaires à *D. polymorpha* (Roe et MacIsaac, 1997).

La croissance des moules est aussi influencée par la quantité et la qualité de la nourriture (Baldwin et al., 2002 ; Madon et al., 1998b ; Stoeckmann et Garton, 2001). La présence de cyanotoxines dans la nourriture peut affecter négativement l'allocation énergétique et la croissance, en diminuant le SfG et en augmentant les coûts de maintenance et la production de pseudofeces (Juhel et al., 2006). Les sédiments en suspension réduisent aussi la qualité de la nourriture et entraînent une diminution de la croissance chez *D. polymorpha* (Madon et al., 1998b). La croissance de *D. polymorpha* est également réduite dans les milieux à faible teneur en Ca^{2+} ou à forte salinité (Casper et Johnson, 2010). La croissance dépend aussi du courant, qui en augmentant va augmenter la disponibilité du seston, et de la concentration en nourriture (MacIsaac, 1994).

En définitive, *D. r. bugensis* a des besoins moins importants et/ou une meilleure efficacité d'assimilation (Digging, 2001), ce qui lui confère une meilleure survie en absence de nourriture. A l'inverse, les besoins métaboliques sont plus importants chez *D. polymorpha* qui utilise une large proportion de son énergie pour les fonctions métaboliques (Stoeckmann et Garton, 1997). Il existe un compromis survie/croissance, et lorsque les deux espèces vivent en sympatrie, la survie de *D. polymorpha* est meilleure. *D. r. bugensis* s'en sortirait mieux dans les zones pauvres en nourriture, grâce à son meilleur taux d'assimilation et ses coûts métaboliques plus faibles (Baldwin et al., 2002). Cela pourrait expliquer la dominance de cette espèce dans les milieux oligotrophiques et mésotrophiques, et leur capacité à coloniser les zones hypolimniques.

6. Reproduction et cycle de vie

Les dreissènes sont des espèces dioïques, les individus mâles et femelles sont donc séparés, et on rencontre généralement un sex ratio de 1:1. Il arrive de trouver des individus hermaphrodites, mais

dans une faible proportion (entre 4 et 8% de la population ; Ackerman, 1994 ; Claudi et Mackie, 1994 ; Ram et al., 1996 ; Sprung, 1993).

Le relargage des gamètes est contrôlé par différents facteurs : sérotonine, phéromones, température, photopériode, disponibilité en nourriture et la présence d'autres dreissènes aux alentours (Ram et al., 1996).

La reproduction des dreissènes est singulière par rapport aux autres bivalves d'eau douce et suit un cycle saisonnier. La maturation des ovaires et des testicules se fait durant l'hiver lorsque les températures descendent sous les 10 °C. De février à avril, le nombre de gamètes produits augmente, augmentant aussi le volume gonadique. Au-delà de cette période, le nombre de gamètes reste fixe, mais leur volume augmente (Pollux et al., 2010). La gamétogénèse, synchrone chez les mâles et les femelles, débute à une température de 12 °C, l'optimum étant 17 °C. Cette synchronisation est très importante pour que la fécondation soit efficace (Borcherding, 1991). La gamétogénèse peut durer entre 2 et 5 mois et s'arrête vers fin septembre mi-octobre. Certaines femelles peuvent produire jusqu'à 1 million d'ovules en un relargage, selon leur taille (Ackerman, 1994 ; Claudi et Mackie, 1994 ; Sprung, 1993). Cette production massive permet de compenser l'absence de soins parentaux, qui existent chez d'autres espèces de bivalves d'eau douce (unionidés, corbicules ; Sprung, 1993). Il peut y avoir plusieurs événements de ponte par saisons, les oocytes sont tous fabriqués au début de la saison reproductive puis les cohortes d'ovocytes deviennent matures et sont relarguées au fur et à mesure (Borcherding, 1991). Le cycle, présenté en Figure 19, débute par la fécondation externe des gamètes, qui sont généralement relarguées dans la colonne d'eau vers la fin du mois de mai (Ackerman, 1994 ; Claudi et Mackie, 1994 ; Tachet et al., 2000). Cette période de l'année correspond aussi aux blooms algaux, qui permettront d'assurer la survie des larves (Ram et al., 1996). Les dreissènes ont une fertilisation externe (facilitée par la proximité des individus et la synchronisation des mâles et des femelles) et une larve nageuse libre, ce qui est assez rare chez les bivalves d'eau douce (Ram et al., 1996).

Après fécondation, le passage à une moule juvénile peut prendre entre 8 et 240 jours (Thorp et Casper, 2003). Ce cycle aboutit à la formation de nouveaux adultes, qui atteindront leur maturité sexuelle au bout de un ou deux ans (taille comprise entre 5 et 15 mm), et pourront atteindre une taille de 40 mm (Claudi et Mackie, 1994 ; Cohen, 2005 ; Pollux et al., 2010 ; Tachet et al., 2000). Selon la température de la masse d'eau considérée, le cycle reproducteur peut démarrer plus ou moins tôt et s'étendre sur une période plus ou moins longue (Pollux et al., 2010).

L'ovule fécondé devient un **embryon**, qui se nourrit grâce aux réserves contenues dans l'œuf, et qui à son tour se transforme en larve nageuse libre dite **trocophore**. Cette larve devient une **larve véligère** lors de la formation du vélum, un organe locomoteur cilié permettant la locomotion et l'alimentation (Sprung, 1993). A ce stade, la première coquille larvaire non ornementée est sécrétée (prodissoconque I), conférant à l'individu une forme en « D ». Par la suite, une deuxième coquille (prodissoconque II) est sécrétée par le manteau ; elle est plutôt arrondie, comme chez les palourdes, et

présente un umbo (crochet). Ce nouveau stade est appelé **véliconche** (Ackerman, 1994 ; Claudi et Mackie, 1994). La croissance se poursuit, le velum se transforme en siphons, des filaments branchiaux apparaissent dans la cavité mantellaire et le système sanguin et de nouveaux organes se développent. Parmi eux, le pied, qui marque le début du stade post-véligère et un changement du comportement de la larve qui devient une **pédivéligère**, capable à la fois de nager et de se déplacer sur le fond. Si le substrat est défavorable, ces jeunes dreissènes se laissent entrainer à nouveau par le courant jusqu'à ce qu'elles trouvent un substrat favorable. Le cycle larvaire (forme pélagique libre) dure environ 4 semaines (Claudi et Mackie, 1994). On notera que les larves de *D. r. bugensis* sont plus grosses lors de la phase de fixation, ce qui leur confère un avantage compétitif (Martel et al., 2001).

Une fois sur un substrat approprié, l'organisme sécrète un byssus ; cette fixation primaire est immédiatement suivie d'une métamorphose en **larve plantigrade**. Les principaux changements morphologiques sont la perte du velum, le développement des branchies, de la bouche et des palpes labiaux, et la sécrétion de la coquille adulte (dissoconque). Cette nouvelle coquille confère à la moule sa forme triangulaire caractéristique et forme et un nouvel axe de croissance le long duquel vont se développer le pied et la bouche. Une fois ses organes complètement formés, la larve plantigrade devient un **juvénile**, qui en continuant de croître et en atteignant la maturité sexuelle deviendra un **adulte** pouvant vivre de 4 à 7 ans (Ackerman, 1994 ; Claudi et Mackie, 1994 ; McMahon, 2002).

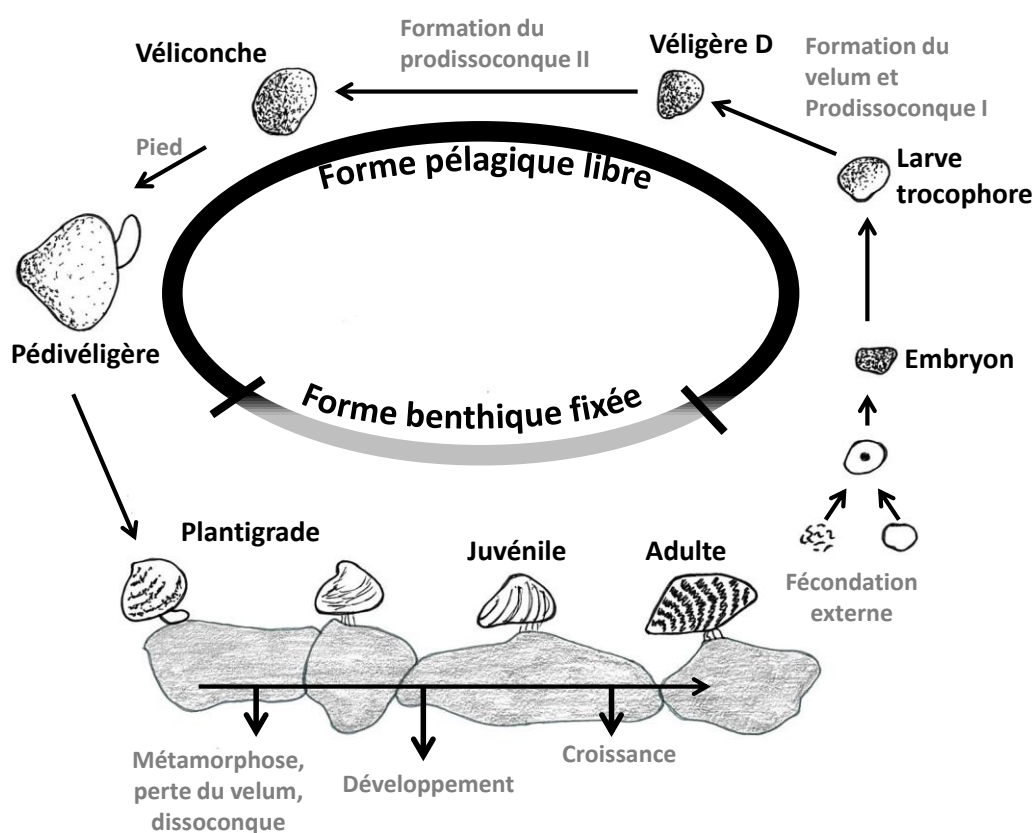


Figure 19 : Cycle de reproduction de la dreissène d'après Ackerman (1994) ; Claudi et Mackie (1994)

A chaque étape de ce cycle, les individus présentent des exigences environnementales différentes. Le développement peut être ralenti à de faibles températures, ou lorsqu'il y a peu de nourriture disponible (Cohen, 2005). Il est donc important de connaître les patrons saisonniers et les facteurs environnementaux pouvant influencer le développement et la distribution des dreissènes (Cohen, 2005). La mortalité des larves peut être due à la prédation, à la présence de bactéries, de maladies, à un manque de nourriture, ou encore à la filtration par des bivalves adultes. La mortalité des larves est à son maximum au moment de la fixation, si elles ne trouvent pas de substrat favorable (Sprung, 1993). La période durant laquelle on peut retrouver des larves dans le plancton varie selon les régions du globe, mais de manière générale, elle s'étend d'avril à octobre (Sprung, 1993).

7. Ecologie

La forte plasticité morphologique évoquée précédemment, couplée aux fortes variabilités génétiques retrouvées à la fois entre les espèces et entre les populations suggèrent une forte plasticité physiologique ainsi qu'une tolérance et des réponses différentes aux niveaux intra et inter-spécifiques (Hebert et al., 1989). On retrouve les dreissènes aussi bien en Suède qu'en Italie, ce qui veut dire qu'elles peuvent vivre dans des environnements très variés, et possèdent de bonnes capacités de compensation et/ou de tolérance pour une large gamme de paramètres environnementaux. Ces différents facteurs ont été revus dans différentes études, et sont généralement utilisés pour comprendre la colonisation des milieux et prédire la dispersion des dreissènes (Cohen, 2005 ; Garton et al., 2014 ; Karatayev et al., 1998 ; McMahon, 1996).

7.1. Facteurs abiotiques

7.1.1. Habitat et substrat

Les dreissènes colonisent les lacs et rivières assez larges, mais aussi les bassins de refroidissement, les gravières, les étangs ; elles peuvent aussi vivre dans les eaux saumâtres et les estuaires (Mackie et Schloesser, 1996). Elles sont épifaunales et leurs larves ont besoin d'un substrat dur pour s'installer (rochers, bois, débris, pipelines...). Leur coquille et leur byssus sont très adaptés à ces types de substrats (Mackie et Schloesser, 1996). L'absence de substrat dur dans les zones estuariennes pourrait d'ailleurs expliquer la faible présence des dreissènes dans ces écosystèmes, en plus du facteur salinité ; l'exposition régulière à l'air et au soleil pourraient aussi être des facteurs importants (Strayer et Smith, 1993). Les moules sont plus abondantes en présence de substrats grossiers, et la densité et la taille des moules diminue quand la taille du grain diminue. Cependant, quand il y a peu de substrat disponible, elles peuvent coloniser roches, graviers, sable grossier, argile, bois, macrophytes, coquilles d'autres bivalves, grâce à leur byssus (Garton et al., 2014) ; elles peuvent également se fixer les unes sur les autres pour former des agrégats (Cohen, 2005). Les dreissènes vivant fixées sur des

unionidées ont d'ailleurs une meilleure croissance que celles attachées aux rochers, probablement grâce à la nourriture apportée par l'activité de filtration des *Unio*.

D. r. bugensis est retrouvée plus volontiers en zone épibenthique, en eaux plus profondes, sur des substrats mous (Dermott et Munawar, 1993). Il est possible que cette espèce modifie l'allométrie de sa coquille pour vivre en zone épibenthique, en devenant plus fine et plus légère, alors que *D. polymorpha* en semble incapable (Mackie et Schloesser, 1996).

Le chevauchement de niche entre les deux espèces est important, car elles ont une histoire évolutive, une biogéographie, et des traits morphologiques et écologiques quasi identiques. Dans un écosystème où elles sont toutes deux présentes, il devrait y avoir compétition interspécifique (Orlova et al., 2005) et à cette compétition inter-spécifique s'ajoute celle avec d'autres espèces comme les spongiaires et les bryozoaires (Tachet et al., 2000). *D. polymorpha* est la première à coloniser de nouveaux habitats, mais peut très vite être remplacée par *D. r. bugensis*. Dans les milieux naturels, une des deux finit toujours par dépasser l'autre : les facteurs biotiques et abiotiques doivent donc certainement affecter les interactions de compétition entre les deux espèces.

7.1.2. Température

Les études concernant la tolérance des dreissènes à la température sont assez contradictoires. D'après Spidle et al. (1995a), la tolérance de *D. r. bugensis* (25 °C) est inférieure à celle de *D. polymorpha* (30 °C) pour des moules provenant du même site et acclimatées à 20 °C, mais d'autres études suggèrent une tolérance similaire (34 °C ; Therriault et Orlova, 2010 ; Verbrugge et al., 2012). Bien que certaines études en laboratoire montrent que *D. r. bugensis* est moins tolérante aux fortes températures, des études en conditions plus naturelles montrent que la croissance et la survie de *D. r. bugensis* est égale, voire meilleure, que celle de *D. polymorpha* (MacIsaac, 1994 ; Thorp et al., 2002).

Les limites de tolérance thermique peuvent différer entre populations européennes (inférieures de 2-3 °C) et nord-américaines (McMahon, 1996), mais ce n'est pas toujours le cas (McMahon, 1996 ; Tourari, 1988). Cela pourrait être dû au fait que les eaux européennes sont globalement plus froides qu'en Amérique (Marsden et al., 1996). Ces tolérances différentielles pourraient aussi être liées à une adaptation génétique, rendant certaines populations plus tolérantes, ou à un facteur écophénotypique (plasticité environnementale).

La tolérance des dreissènes à la température augmente avec la température d'acclimatation (McMahon et Ussery, 1995 ; Spidle et al., 1995a), quand la latitude diminue, quand le statut nutritif s'améliore, et quand la taille augmente. Elle varie aussi avec la saison (la tolérance est meilleure pour des individus collectés en été ; Elderkin et Klerks, 2005 ; Karatayev et al., 1998). La formation d'agrégats de moules peut également faciliter leur tolérance thermique *in situ*. Ces facteurs peuvent aussi expliquer les différences de limites thermiques reportées dans la littérature pour les deux espèces.

Au-delà de ces limites de tolérance, la température influence de nombreux processus chez les dreissènes, aussi bien à l'état larvaire qu'à l'état adulte. Même si les limites de tolérances diffèrent entre espèces et entre populations, les réponses à un changement de température sont généralement similaires (McMahon, 1996).

Elle joue un rôle très important dans la reproduction. En Europe, les températures de relargage des gamètes vont de 10 à 17 °C (Sprung, 1993), mais le seuil moyen reporté est de 12 °C en Amérique du Nord (Garton et Haag, 1993) et en Europe (Borcherding, 1991 ; Karatayev et al., 1998 ; Thorp et Covich, 2010). Le pic de relargage se situe entre 12 et 18 °C, avec un optimum à 17-18 °C. *D. r. bugensis* est toutefois capable d'initier le relargage des gamètes entre 9 et 11 °C, ce qui lui confère un meilleur succès reproducteur dans les zones froides (Claxton et Mackie, 1998). La maturation des gamètes chez *D. r. bugensis* a même été montrée à partir 4.8 °C (Roe et MacIsaac, 1997). La gamétogénèse est inhibée au-delà de 30 °C (Thorp et Covich, 2010). La fécondation nécessite une température supérieure à 10 °C (l'idéal étant entre 12 et 24 °C ; Sprung, 1993). La vitesse de développement des larves et leur fixation sont idéales entre 12 et 24 °C, avec un optimum à 18 °C (Cohen, 2005 ; Thorp et Covich, 2010) et une amélioration nette quand la température augmente de 15 à 21 °C (McMahon, 1996 ; Sprung, 1995a), mais au-delà de 24 °C, leur survie diminue (Wright et al., 1996). La température serait un des principaux facteurs attribué à la variation de densité des véligères en fonction de la profondeur (Mackie et Schloesser, 1996).

La température impacte aussi les fonctions métaboliques des dreissènes, comme la consommation d'oxygène (Alexander Jr et McMahon, 2004) ou la tolérance à l'hypoxie, qui diminue quand la température augmente (Johnson et McMahon, 1998). Le taux de filtration est optimal entre 10 et 22 °C (Reeders et bij de Vaate, 1992), et augmente quand la température augmente jusqu'à un certain seuil (24 °C ; Aldridge et al., 1995), tous comme le taux d'ingestion. La croissance de la coquille et le taux d'ingestion des adultes sont optimaux entre 11-12 °C (Walz, 1978). La croissance des tissus est optimale entre 10 et 15 °C, mais diminue au-delà (Walz, 1978). Des températures inférieures à 3-6 °C inhibent la croissance (Pollux et al., 2010). La température peut aussi affecter l'osmolarité de l'hémolymphe, les concentrations et les flux d'ions. Vers 4-5 °C, on a une diminution des ions Na⁺ et Cl⁻ et une augmentation du Ca²⁺ (McMahon, 1996).

La température affecte aussi la fixation, avec une fixation optimale entre 20 et 25 °C qui décline au-delà (Kobak, 2006), et la tolérance à la salinité (Wright et al., 1996).

En conclusion, on peut considérer que 12 °C est la température minimale pour le maintien des populations de dreissènes, que 30 °C serait la limite pour la survie d'une population (bien que les individus puissent se maintenir à court terme jusque 33 °C ; Cohen, 2005), et que *D. polymorpha* présente un avantage compétitif en surface, contrairement à *D. r. bugensis* qui est plus adaptée aux zones profondes.

7.1.3. Teneur en oxygène et hypoxie¹³

La plupart des bivalves sont peu résistants à l'hypoxie et occupent donc des eaux peu profondes (Tachet et al., 2000). La limite létale pour un spécimen adulte est de 4 mg.L⁻¹ à 18 °C. En conditions anoxiques, les dreissènes peuvent survivre 6 jours à 17-18 °C et 3 jours à 23-24 °C. On les trouve généralement à des saturations en oxygène supérieures à 90% et on observe un stress entre 40-50% de saturation. Une saturation en oxygène de 80-85% serait optimale. Chez *D. polymorpha*, la régulation de l'assimilation d'oxygène est moins bonne quand la concentration en O₂ dans l'eau diminue (Alexander Jr et McMahon, 2004). Un minimum de saturation d'oxygène est requis pour la croissance des larves et la production du byssus (Garton et al., 2014) ; pour le développement des larves, l'oxygène ne doit pas tomber en dessous de 20% (Sprung, 1993).

La tolérance à l'hypoxie dépend de la température (Johnson et McMahon, 1998 ; Matthews et McMahon, 1999) et les besoins en oxygène diminuent quand la température de l'eau diminue (Cohen, 2005).

Bien que *D. r. bugensis* semble moins tolérante à l'hypoxie (Garton et al., 2014), De Ventura et al. (2016) ont montré que la tolérance à la température et à l'oxygène dépendait surtout de l'origine de la population, plutôt que de l'espèce.

7.1.4. Osmorégulation et teneur en ions dans le milieu

L'osmorégulation correspond au maintien de la balance ionique entre l'eau et l'organisme. Chez les bivalves d'eau douce, contrairement aux bivalves marins, la concentration en ions dissous dans le milieu est très faible par rapport à la concentration en ions dans les tissus (Thorp et Covich, 2010).

En Europe, les eaux sont relativement dures avec plus de 20 mg.L⁻¹ de Ca²⁺, et les dreissènes sont présentes dans des eaux dont la dureté est comprise entre 20 et 40 mg.L⁻¹ de calcium. Les densités de dreissènes sont corrélées à la concentration en Ca²⁺ (Jones et Ricciardi, 2005), et le fait que les eaux nord-américaines soient plus douces aurait limité leur expansion sur ce continent ; on les trouve cependant à des concentrations entre 12 et 25 mg.L⁻¹ de calcium (Cohen, 2005). Les besoins en Ca²⁺ ne sont pas les mêmes pour les adultes et les larves, mais les teneurs en Ca²⁺ varient quoi qu'il en soit au fil de l'année (Mellina, 1993).

Le seuil minimum requis pour la croissance de *D. polymorpha* est de 8 mg.L⁻¹ (Claudi et Mackie, 1994 ; Mackie et Schloesser, 1996), contre 12 mg.L⁻¹ pour *D. r. bugensis* (Jones et Ricciardi, 2005). Cet élément est également essentiel pour la reproduction, mais les valeurs seuils varient selon les études (entre 12 et 14 mg.L⁻¹ pour Claudie et Mackie (1994) ; 20 mg.L⁻¹ pour Mackie et Schloesser (1996) ; 40-60 mg.L⁻¹ pour le développement normal des larves selon Sprung (1993)).

¹³ Concentration en oxygène < saturation de l'air

Les limites précises sont donc difficiles à déterminer et une faible teneur en Ca^{2+} dans le milieu peut être compensée par les dreissènes qui sont capables de mobiliser le Ca^{2+} de leur coquille vers l'hémolymphe quand le milieu est trop pauvre (Garton et al., 2014). Le déficit en Ca^{2+} devient surtout problématique lorsqu'il est couplé à un déficit en autres éléments essentiels (Mg, Na, Cl, K ; Dietz et al., 1994).

En laboratoire, l'équilibre métabolique est perturbé en dessous de 15 mg.L^{-1} et les organismes meurent. Différentes études ont montré que les dreissènes sont moins aptes à réguler les concentrations en ions dans l'hémolymphe quand le pH et les concentrations en Ca^{2+} sont trop bas ; elles ont donc besoin d'un pH élevé et d'une certaine teneur en Ca^{2+} pour se maintenir (Cohen, 2005).

Les dreissènes préfèrent les milieux avec de très faibles niveaux de potassium. En milieu naturel, on ne les trouve pas quand la concentration dépasse 39 mg.L^{-1} . La LC_{50} 24 h serait de 100 mg.L^{-1} (Cohen, 2007). Certaines populations vivant dans des milieux particuliers peuvent toutefois tolérer des teneurs en ions très élevées. C'est le cas par exemple dans la mer d'Aral ($\text{Ca}^{2+} = 600$, $\text{Mg}^{2+} = 650$, $\text{K}^+ = 100$, $\text{Na}^+ = 2600$, $\text{SO}_4^{2-} = 3800$, $\text{Cl}^- = 4100 \text{ mg.L}^{-1}$; Strayer et Smith, 1993). Les dreissènes ont également un besoin essentiel en Mg pour assurer leur survie (Dietz et al., 1994).

7.1.5. Salinité

D'après Cohen (2005), la tolérance à la salinité chez les dreissènes dépend, au-delà de la salinité elle-même, de la vitesse à laquelle elle peut varier (moins elle varie, plus la dreissène peut tolérer une salinité élevée ; dans des milieux où la salinité varie fortement, en zone estuarienne par exemple, elle ne supporte que de faibles salinités). La tolérance à la salinité serait également meilleure quand les concentrations en ions Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ et Cl^- sont importantes. Il semblerait que la température joue également un rôle dans la tolérance à la salinité (plus la température sera basse, meilleure sera la tolérance à la salinité ; Cohen, 2005 ; Mackie et Schloesser, 1996). Les concentrations relatives en sodium et potassium ainsi que la vitesse d'acclimatation à la salinité affectent la tolérance des larves et des adultes à ce paramètre (Mackie et Schloesser, 1996).

La gamme de salinité que peut tolérer *D. polymorpha* s'étend de 0.6 à 10 ppt, en fonction de la région du globe, de la population, du type de milieu (Strayer et Smith, 1993) ; elle peut tout de même vivre convenablement à des salinités jusqu'à 12 ppt, dans les mers intérieures notamment (Aral, Caspienne), où les fortes teneurs en ions Ca^{2+} et Mg^{2+} aideraient à mieux supporter la forte salinité (Strayer et Smith, 1993). Elle a disparu de la mer d'Aral lorsque la salinité est passée à 14 ppt, suggérant que cette valeur correspond à la limite létale. Cette espèce peut donc être retrouvée dans les eaux saumâtres oligohalines et en milieux estuariens (Strayer et Smith, 1993).

7.1.6. pH

Là encore, les limites de tolérance au pH diffèrent selon les études, en partie parce qu'elles dépendent fortement de la teneur en Ca^{2+} (Cohen, 2005 ; Garton et al., 2014). Le pH minimum serait compris entre 6.5 et 7.5, bien qu'en dessous de 7, les populations semblent vulnérables (Mackie et Schloesser, 1996) ; le pH maximum serait de 9 à 9.5. L'optimum pour le développement des larves serait de 7.4 à 9.4, avec un pic de succès à 8.4 (Sprung, 1993). Pour qu'il y ait croissance de la population il faut au moins un pH de 7.5-8 (Mackie et Schloesser, 1996).

7.1.7. Turbidité

Il semble que les dreissènes ne soient pas très affectées par la turbidité¹⁴, puisqu'on les retrouve dans le Mississippi à une turbidité supérieure à 80 NTU de solides en suspension totaux (Cohen, 2005).

En revanche, la turbidité pourrait jouer un rôle dans la répartition et la densité des larves avec la profondeur (Mackie et Schloesser, 1996). Summers et al. (1996) ont aussi montré qu'en milieu turbide, les dreissènes pouvaient augmenter la production de pseudofèces, provoquant ainsi une augmentation des coûts métaboliques et une réduction de la croissance (Madon et al., 1998b ; McMahon, 1996). La turbidité impacte la consommation d'oxygène, la fermeture des valves, le taux de filtration (Garton et al., 2014). Deux études (Diggins, 2001 ; Summers et al., 1996) suggèrent que *D. r. bugensis* serait mieux adaptée à la turbidité, grâce à sa capacité à maintenir de meilleurs taux de clairance et de filtration.

7.1.8. Hydromorphologie

La vitesse du courant affecte la fixation et la fécondation. Les larves sont très sensibles à la turbulence et sont incapables de se fixer dans des eaux dont la vitesse dépasse $1.5\text{-}2\text{ m.s}^{-1}$, ce qui limite leur distribution dans de nombreuses rivières ; les remous peuvent aussi endommager ou tuer les larves (Thorp et Covich, 2010). Des vitesses de $0.1\text{ à }1\text{ m.s}^{-1}$ semblent favorables. Entre $1\text{ et }1.5\text{ m.s}^{-1}$, il est plus difficile pour les moules de se nourrir, car le courant déforme les siphons. De ce fait, les populations de dreissènes sont moins denses dans les rivières et dans les milieux lotiques que dans les lacs. En Europe, il est rare de trouver des dreissènes dans des rivières de moins de 30 m de large (plus la largeur diminue, plus la vitesse du courant augmente ; Cohen, 2005). La croissance et la production du byssus ralentissent quand le courant augmente (Clarke et McMahon, 1996). Chez *D. r. bugensis*, les taux de clairance sont affectés par le courant ; ils augmentent de $0\text{ à }9\text{ cm.s}^{-1}$ mais sont inhibés à 19 (Ackerman, 1999). Cette problématique du courant explique aussi la préférence des dreissènes pour les crevasses, les interstices et le dessous des cailloux.

¹⁴ Teneur d'un fluide en matières qui le troublent (MES, particules colloïdales) ; exprimée en UTN (Unité de Turbidité Néphélométrique ou NTU en anglais pour nephelometric turbidity units).

La force du vent peut aussi influencer les courants et jouer sur la distribution des véligères et l'abondance des adultes, en relation avec la profondeur. Plus le vent est fort, plus les moules descendent ; Le vent a un effet plus important quand la surface de l'eau est large. Les variations dans la distribution verticale des véligères sont majoritairement attribuées aux courants engendrés par le vent (Mackie et Schloesser, 1996).

En Europe, on trouve moins de dreissènes dans des lacs dont la taille est inférieure à 0.3 km². Elles sont souvent absentes des zones peu profondes et des lacs à forte productivité, à cause des périodes d'anoxie et/ou de la prédation par les oiseaux aquatiques. Les lacs larges et profonds, présentant des concentrations en algues et en nutriment modérées, auraient des densités de moules plus importantes que les lacs petits, peu profonds et avec de forts taux d'algues et de nutriments (Cohen, 2005).

Comme nous l'avons déjà mentionné au niveau de la température, *D. r. bugensis* est plus à l'aise en profondeur. Elle peut être retrouvée à des profondeurs dépassant 150 m et peut croître et se reproduire en zones profondes où les températures n'excèdent pas 12 °C (Mackie et Schloesser, 1996). Le ratio *D. r. bugensis*/*D. polymorpha* augmente quand la profondeur augmente (Mackie et Schloesser, 1996).

7.1.9. Nutriments (composés azotés et phosphorés)

Les dreissènes préfèrent les eaux avec des niveaux modérés de nutriments, et sont moins présentes ou en plus faibles densités dans les milieux eutrophiques et oligotrophiques. Elles sont peu présentes lorsque les concentrations en nitrates sont inférieures à 0.009 mg.L⁻¹ et les concentrations en phosphates inférieures à 0.05 mg.L⁻¹ (mais on peut quand même en trouver quand les teneurs en phosphate sont de 0.001 mg.L⁻¹). Les dreissènes tendent à disparaître en cas d'eutrophisation. Les densités de dreissènes sont négativement corrélées avec les concentrations en phosphate et en nitrate (Cohen, 2005).

7.1.10. Emersion

L'exposition à l'air constitue une forme extrême de stress osmotique, durant laquelle les bivalves vont fermer leurs valves pour interrompre les échanges avec l'environnement extérieur. Les déchets cellulaires comme l'ammonium et le dioxyde de carbone vont alors stagner à l'intérieur de la coquille. Pour limiter l'effet de ces molécules toxiques, les bivalves peuvent ralentir leur métabolisme et diminuer leur rythme cardiaque. Le calcium présent dans la coquille peut alors être utilisé pour tamponner l'hémolymphe (Thorp et Covich, 2010).

La durée pendant laquelle les dreissènes peuvent supporter cet état varie selon leur taille, la température et l'humidité relative. La tolérance à l'émersion augmente quand l'humidité augmente, la température diminue et la taille des moules augmente (McMahon et al., 1993 ; Ricciardi et al., 1995). Selon ces paramètres, elles peuvent survivre de 10 à 18 jours à l'air, ce qui explique en partie leur

capacité de transport longue distance, fixées sur des supports solides. *D. r. bugensis* semble toutefois avoir une moins bonne tolérance à l'émersion que *D. polymorpha* (Ricciardi et al., 1995).

7.2. Interactions biotiques

En plus des différences de tolérance aux paramètres physico-chimiques, différents facteurs biotiques peuvent influencer les interactions entre espèces et favoriser la dominance d'une espèce par rapport à l'autre.

7.2.1. Régime alimentaire

Les deux espèces sont des filtreuses qui consomment une large variété de matières en suspension pour se nourrir. Elles peuvent utiliser du bactériophytoplancton, du phytoplancton et du zooplancton. *D. polymorpha* est en effet capable de se nourrir de bactéries, tant qu'elles ne constituent pas la seule ressource alimentaire, ce qui lui permet de digérer et d'assimiler directement leurs protéines (Silverman et al., 1996). Mais l'analyse du bol alimentaire chez les bivalves est compliquée, et rend difficile la quantification du chevauchement alimentaire entre les deux espèces. Toutefois, en travaillant sur les isotopes du carbone, Garton et al. (2005) trouvent une diète identique chez les deux espèces, suggérant une compétition pour la nourriture.

La limitation en nourriture peut diminuer le taux de croissance, et dans certains cas entraîner la mort des individus. En absence de nourriture, la masse des tissus diminue, notamment la masse de la glande digestive, suite au catabolisme des lipides ; par la suite d'autres réserves énergétiques (protéines primaires) sont utilisées pour la maintenance (Sprung et Borcharding, 1991). Les moules sont aussi capables de puiser dans leur tissus gonadiques, riches en énergie, pour assurer leurs processus vitaux lorsque les conditions environnementales sont défavorables (Borcharding, 1991). Le manque de nourriture ralentit également la production du byssus (Clarke, 1999), et diminue donc la force d'attachement des moules.

Les caractéristiques du seston affectent la filtration (espèce d'algue, concentration ; Ten Winkel et Davids, 1982) mais la forme des algues n'a pas d'impact. Les particules organiques et minérales diminuent le taux de clairance (Kryger et Riisgard, 1988). La concentration en seston est inversement proportionnelle au taux de clairance, mais proportionnelle à la production de pseudofèces (Reeders et bij de Vaate, 1992 ; Sprung et Rose, 1988 ; Walz, 1978).

Ackerman (1999) met en évidence que les deux espèces ont un taux de clairance (volume d'eau filtrée) similaire ($60\text{-}70 \text{ mL.moule}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour des individus de 11 mm), qui augmente avec la vitesse du courant jusqu'à 20 cm.s^{-1} . Au-delà, le courant exerce probablement une pression trop forte sur les siphons et les valves ; certains organismes peuvent même se détacher. Baldwin et al. (2002) montrent aussi qu'il n'y a pas de différence de taux de clairance entre les deux espèces, mais *D. r. bugensis* utiliserait plus

efficacement la nourriture car elle présente un taux de croissance plus élevé. A l'inverse, Diggins (2001) montre que pour des organismes de 20 mm, le taux de filtration de *D. r. bugensis* est de 37% supérieur à celui de *D. polymorpha* ; cette différence n'est plus valable en hiver, où le taux de filtration est réduit de moitié et quasiment similaire entre les deux espèces. Il semble donc que le taux de clairance dépende de la taille des organismes. Dans les milieux où les dreissènes s'implantent et prolifèrent, on observe une réduction drastique de la quantité de plancton.

7.2.2. Parasitisme

Les études sur le parasitisme se concentrent souvent sur l'hôte final, beaucoup moins sur l'effet des parasites sur l'hôte intermédiaire que constituent les dreissènes. Les bivalves sont les hôtes de nombreux parasites, notamment des trématodes et peuvent héberger des commensaux comme *Chaetogaster*, présent dans la cavité palléale (Tachet et al., 2000). Le parasitisme est très peu étudié chez *D. r. bugensis*, mais Conn et al. (1996) ont montré qu'elle était aussi susceptible à l'infestation par les oligochètes.

Davids et Kraak (1993) se sont concentrés sur deux genres de parasites trématodes : *Phyllodistomum* et *Bucephalus*. *Phyllodistomum* forme des petits bâtonnets jaunâtres, contenant les sporocystes, qui se fixent dans les branchies, compromettent leurs fonctions, et réduisent indirectement la croissance et la reproduction. Cette infestation semble aussi altérer la détoxification et/ou augmenter l'accumulation de métaux lourds dans les tissus mous par rapport à des individus sains. Les sporocystes de *Bucephalus* se trouvent surtout dans les gonades, pouvant entraîner une stérilité des organismes, et parfois dans la glande digestive ou les branchies.

La prévalence de certains parasites chez *D. polymorpha* (*Ophryoglena* spp. et les Rickettsiales-like) est dépendante de la saison (Minguez et Giambérini, 2012), avec une diminution durant les mois chauds. La morphologie des dreissènes peut également faire varier la prévalence de parasites, puisque pour différents morphotypes, les courants d'eau transportant les parasites à l'intérieur de la cavité mantellaire seront modifiés (Minguez et al., 2012b). Ces mêmes auteurs ont aussi mis en évidence une susceptibilité accrue aux parasites chez les organismes exposés au nickel en laboratoire (Minguez et al., 2012a) et ont modélisé une infection par les Rickettsiales-like plus importante *in situ* lors d'une contamination métallique, notamment au nickel et au chrome (Minguez et al., 2013). Le parasitisme constitue donc un facteur confondant, qu'il ne faut pas négliger lors d'études écotoxicologiques.

7.2.3. Prédation

Les espèces prédatrices de dreissènes ne sont pas les mêmes, selon que l'on se trouve en Europe ou en Amérique. Molloy et al. (1997) passent en revue les différents prédateurs (176), parasites (34) et compétiteurs (10) de *D. polymorpha* dans les différentes régions du globe, mais cette liste nécessite d'être actualisée. De manière générale, la prédation est surtout le fait des crustacés tels que les écrevisses

(l'écrevisse américaine, *Orconectes limosus* ; l'écrevisse à taches rouges *Orconectes rusticus*), des poissons (le gardon, *Rutilus rutilus* ; la perche soleil *Lepomis gibbosus* ; le gobie à taches noires, *Neogobius melanostomus* ; *Neogobius gymnotrachelus* ; la brème commune, *Abramis brama* ; la brème bordelière, *Blicca bjoerkna* ; l'ide mélanote *Leuciscus idus* ; la carpe, *Cyprinus carpio* ; la carpe noire, *Mylopharyngodon piceus* ; l'esturgeon de Sibérie, *Acipenser ruthenus*) et des oiseaux (notamment les Ardeidae) et les rats musqués (Kobak et Kakareko, 2009 ; Naddafi et Rudstam, 2013 ; Tachet et al., 2000 ; Zhulidov et al., 2006). Certains organismes comme les bryozoaires ou les éponges peuvent se fixer sur les dreissènes et les étouffer en bloquant l'ouverture des valves.

Les dreissènes sont la cible de prédateurs à tous les stades de leur vie. Les stades larvaires sont appréciés du zooplancton crustacé (e.g. copépodes) et des larves de poissons, mais le pourcentage de mortalité dû à ces prédateurs est difficile à déterminer ; certains auteurs reportent aussi la prédation par le cnidaire *Hydra americana* (Mackie et Schloesser, 1996). Les tissus des dreissènes adultes sont très appréciés des prédateurs pour leur forte valeur nutritionnelle (60.7% de protéines, 12% de lipides, 19% de carbohydrates et 5.9% de résidus minéraux), qui peut varier de manière saisonnière (Mackie et Schloesser, 1996). Les dreissènes peuvent constituer jusqu'à 95-100% du régime alimentaire des gardons dans certains lacs polonais, principalement en automne et en hiver. Malgré tout, cette prédation par les poissons ne permet pas de limiter les densités de dreissènes dans les lacs européens (Mackie et Schloesser, 1996).

Les dreissènes sont des organismes sessiles, incapables de fuir, mais qui ont développé des mécanismes pour augmenter leurs chances de survie. Elles peuvent par exemple renforcer leur fixation, chercher des refuges, ou s'agréger entre elles, même si cela modifie leur environnement local et diminue la quantité de nourriture à leur disposition. Plusieurs études ont montré que la force d'attachement et la capacité d'agrégation des moules entre elles étaient accrues en présence de prédateurs (Kobak et Kakareko, 2009 ; Naddafi et Rudstam, 2013). Les moules sont aussi capables d'opérer des changements morphologiques et physiologiques (augmentation de la dureté de la coquille) pour limiter la prédation. Les dreissènes repèrent la présence de prédateurs en détectant les mouvements d'eau qu'ils créent (qui peuvent aussi être créés par les organismes non-molluscivores), ou les molécules relarguées par les coquilles broyées de leurs congénères (Kobak et Kakareko, 2009 ; Naddafi et Rudstam, 2013).

Les mécanismes de détection des dreissènes par les prédateurs sont assez mal compris : ils pourraient être dus à la production de kairomones par les dreissènes (Kobak et Kakareko, 2009), à une simple détection visuelle, ou encore à leur activité de filtration. Naddafi et Rudstam (2013) ont d'ailleurs montré que les dreissènes pouvaient réduire leur taux de clairance en présence de prédateurs pour éviter d'être repérées.

Concernant les impacts plus généraux de la prédation, Naddafi et Rudstam (2013) mettent en évidence une réponse à la prédation plus forte chez *D. polymorpha*, qui aurait donc des coûts de fitness plus importants, la rendant compétitivement inférieure à *D. r. bugensis* dans les environnements où la

densité de prédateurs est faible. Le déclin de *D. r. bugensis* dans certaines communautés dreissènes pourrait s'expliquer par la prédation sélective. Lorsque la densité de dreissènes augmente, la densité de prédateur molluscivores augmente (Zhulidov et al., 2006) et/ou les prédateurs présents modifient leur régime alimentaire et se focalisent sur les dreissènes, plus abondantes ; dans ce cas, la fragilité de la coquille de *D. r. bugensis* la rendrait plus vulnérable à la prédation ou aux dommages mécaniques, malgré son avantage bioénergétique (Casper et Johnson, 2010 ; Grutters et al., 2012).

8. Caractère invasif et rôle fonctionnel dans les écosystèmes

Les deux espèces présentées ici possèdent des traits d'histoire de vie qui ont permis leur invasion : une forte variabilité génétique, un temps de génération court, une forte fécondité, un stade larvaire facilement dispersable et une large tolérance aux facteurs environnementaux (Garton et al., 2014). En plus des traits propres à ces espèces, les invasions augmentent avec l'augmentation de la population humaine, les déplacements plus rapides, l'altération de l'environnement et les échanges commerciaux (Pimentel et al., 2005). Leurs impacts peuvent se répercuter à différents niveaux et affecter les services écosystémiques dont les humains bénéficient. Bien qu'elles soient souvent pointées du doigt pour leurs impacts négatifs sur les écosystèmes, les espèces invasives peuvent aussi être bénéfiques, notamment dans des écosystèmes fortement dégradés (McLaughlan et al., 2014a).

Les dreissènes peuvent avoir des impacts aussi bien positifs que négatifs sur les écosystèmes ; plusieurs revues existent à ce sujet (Karatayev et al., 1997; McLaughlan et al., 2014a; Pimentel et al., 2005) et le Tableau V en résume les principaux.

Tableau V : Impacts positifs (+) et négatifs (-) liés à l'invasion par les dreissènes

Impact(s)	Référence(s)
- Bioaccumulation, bioamplification et transfert trophique des contaminants	Reeders et bij de Vaate, 1992
- Modification des populations de zooplancton (par consommation directe ou compétition)	McLaughlan et al., 2014a
- Fouling (affecte les infrastructure humaines, obstruction des canalisations) ; le byssus qui reste accroché peut augmenter la corrosion de l'acier et du fer	Orlova et al., 2004 ; Claudi et Mackie, 1994
- Compétition avec les espèces natives (Unionidés, Anodontes) pour la nourriture, l'espace ; se fixent dessus et les étouffent ou les font couler	Sousa et al., 2011 ; Aldridge et al., 2004
- Coquilles coupantes dans les zones récréatives	McLaughlan et al., 2014a
+/- Participe à la clarté et la qualité de l'eau (élimination d'algues et microorganismes) et à la pénétration de la lumière MAIS peut provoquer des blooms alguaux par sélection de son alimentation (eau impropre à la baignade, toxicité)	Sousa et al., 2009 ; Vanderploeg et al., 2001
+/- Ingénieures écosystémiques : biodéposition de matière organique, augmentation de la surface et de la complexité de l'habitat grâce aux coquilles (nouveaux substrats, refuges)	Sousa et al., 2009
+/- Réduction de la concentration de solides en suspension, restructuration des flux d'énergie et de nutriments	Higgins, 2014 ; Reeders et bij de Vaate, 1992
+ Filtration diminue la turbidité : eau plus propre dominée par les macrophytes, qui créent des habitats pour les invertébrés ; fèces = nourriture : le réseau trophique passe de pélagique à planctonique	Sousa et al., 2014 ; Strayer et al., 1999
+ Source de nourriture pour certaines espèces	Molloy et al., 1997
+ Alimentation sélective et efficace (phytoplancton) : déplace le N et le P de la zone pélagique (bioremédiation des eaux eutrophes ?)	Goedkoop et al., 2011

La perte de diversité ainsi que les coûts engendrés par la présence de dreissènes ont conduit au développement de méthodes d'éradication, avec notamment des traitements au chlore, aux courants électriques, aux ultrasons, à la chaleur, aux peintures antifouling. Toutefois ces méthodes sont trop généralistes et affectent également les autres espèces du milieu.

De plus, certains auteurs reportent que malgré leurs impacts négatifs sur les bivalves natifs, les dreissènes semblent favoriser d'autres groupes taxonomiques, notamment les racleurs et les prédateurs (sangsues, planaires, éphéméroptères) en leur fournissant abri et nourriture, même si cette facilitation varie selon les milieux (Ward et Ricciardi, 2007). Ces impacts dépendent aussi du temps : dans une étude réalisée sur 20 ans, Strayer et al. (2011) ont montré une réduction drastique des benthiques natifs, suivie d'un recouvrement après 8 ans de déclin, et un retour aux densités pré-invasion. Enfin, l'inversion de dominance pourrait relâcher la pression exercée sur les bivalves natifs, car dans les milieux où *D. r. bugensis* domine, elle s'y attache beaucoup moins que ne le fait *D. polymorpha* (Burlakova et al., 2014).

Certains auteurs proposent même de les utiliser comme biofiltreurs pour augmenter la clarification de l'eau (Elliott et al., 2008), ou encore en compléments alimentaires pour l'élevage des volailles (apport de calcium ; McLaughlan et al., 2014b).

9. Synthèse comparative des deux espèces

En définitive, même si les informations se font plus rares pour *D. r. bugensis*, les deux espèces sont très proches et vivent dans des habitats similaires en utilisant les mêmes ressources (écologie et niche très proches), ce qui suggère une forte compétition inter-spécifique (Garton et al., 2014). Elles ont les mêmes patrons de reproduction et de dispersion, et sont toutes deux vulnérables aux maladies, à la prédation et au parasitisme. Comme le résume le Tableau VI, elles diffèrent cependant au niveau de la régulation de leur métabolisme, et de leur capacité de filtration et d'assimilation de la nourriture. (Diggins, 2001).

Ces éléments montrent que *D. r. bugensis* allouerait moins d'énergie au maintien de son état physiologique et davantage à la reproduction et à la croissance, ce qui lui donnerait un avantage compétitif sur *D. polymorpha* (Garton et al., 2014). Selon le principe d'exclusion compétitive (Hardin, 1960), l'une des espèces devrait donc finir par remplacer l'autre si les facteurs écologiques sont constants (Ram et al., 2012). Mais en réalité la coexistence des deux est possible grâce aux variations spatio-temporelles inhérentes aux milieux d'eau douce, qui évitent la dominance d'une espèce par rapport à l'autre.

Tableau VI : Synthèse des principales différences entre *D. polymorpha* et *D. r. bugensis*

Facteur	<i>D. polymorpha</i>	<i>D. r. bugensis</i>	Référence(s)
Morphologie	Face ventrale concave ; angle ventro-latéral aigu ; byssus en position médiane ; plus large que haute	Face ventrale convexe ; angle ventro-latéral arrondi ; byssus en position antérieure ; plus haute que large	Claudi et Mackie, 1994
Filtration	-	+	Diggins, 2001
Synthèse du byssus et force d'attachement	+	-	Peyer et al., 2009
Taille des larves	-	+	Martel et al., 2001
Coquille	Plus épaisse et plus lourde	Plus fine et plus légère	Mackie et Schloesser, 1996
Limite thermique supérieure	30 - 32°C en Amérique du Nord	25°C en Amérique du Nord	Elderkin et Klerks, 2005 ; Iwanyzki et McCauley, 1993 ; Spidle et al., 1995a ; McMahon et Ussery, 1995 ; Aldridge et al., 1995
Température de spawning	12 °C	9 °C	Claxton et Mackie, 1998
Calcium	8 mg/L pour croissance	12 mg/L pour croissance	Claudi et Mackie, 1994 ; Jones et Ricciardi, 2005
Salinité	Mortalité à 8-9 psu ; 11-15 avec acclimatation	Mortalité à 4-6 psu ; 8 avec acclimatation	Orlova et al., 1998 dans Garton et al., 2014
Emersion	+	-	Ricciardi et al., 1995
Tolérance au courant	+	-	Ackerman, 1999 ; Clarke et McMahon, 1996
Tolérance à la turbidité	-	+	Diggins, 2001
Croissance	-	+	Mills et al., 1996 ; Stoeckmann, 2003
Taux d'assimilation	-	+	Baldwin et al., 2002
Substrat	Plutôt sur des substrats durs	Peut vivre sur des substrats durs à mous	Dermott et Munawar, 1993
Profondeur	Zones peu profondes	Peut vivre en zone épibenthique et dépasser 150 m de profondeur	Mackie et Schloesser, 1996
Susceptibilité à la prédation	-	+	Casper et Johnson, 2010 ; Grutters et al., 2012

10. Intérêt comme organismes sentinelles

Lors d'une étude à l'échelle individuelle, il est nécessaire de choisir rigoureusement l'organisme modèle qui sera utilisé. Pour être considérée comme « sentinelle », une espèce doit répondre à plusieurs critères : elle doit être représentative du milieu, sédentaire de la zone d'étude, la taille de la population doit être suffisante pour permettre des prélèvements répétés d'individus, l'aire de répartition doit être assez large pour permettre une comparaison des résultats entre différents sites. L'organisme doit présenter une certaine sensibilité aux polluants sans que ceux-ci n'induisent une mort systématique. Il est également nécessaire de bien connaître la biologie de l'espèce afin de pouvoir distinguer les résultats obtenus du bruit de fond (Michel, 2011). Les deux espèces de dreissènes présentées ici possèdent de nombreux traits d'histoire de vie caractéristiques des espèces sentinelles, et semblent toutes indiquées pour la biosurveillance des milieux aquatiques. Elles sont largement répandues dans les eaux douces de l'hémisphère nord et présentent un mode de vie sessile. Elles sont capables d'accumuler tous les types de polluants, notamment à cause de leur forte activité de filtration, et présentent des réponses physiologiques et biochimiques utilisables en tant que biomarqueurs de la contamination des milieux. Ces affirmations sont moins vraies pour *D. r. bugensis*, encore trop méconnue.

Partie II : Présentation des sites de prélèvement

Des données fournies par l'ONEMA nous ont permis de réaliser une cartographie relativement récente (2007 – 2013) de la présence, et parfois de l'abondance, de la dreissène en France. Une quinzaine de sites potentiellement viables ont été sélectionnés et la première vague de prospections a eu lieu en avril 2015. Sur les 13 sites prospectés, seuls 4 se sont avérés appropriés pour nos études (présence de d'individus en abondance suffisante, facilité d'accès, absence de marnage ou de chaumage) : Riaucourt, Scey, Seurre et Nantua. Suite à de fortes pluies, certains sites étaient en crue sur cette période et n'ont pas pu être vérifiés (même si des dreissènes étaient présentes, elles n'étaient pas accessibles par notre mode de prélèvement). A ces 4 populations se sont ajoutées les populations plus locales, déjà connues, de Saint Mihiel et de Montigny (canal de Jouy).

Trois campagnes supplémentaires, en octobre 2015, avril 2016 et février 2017, ont permis l'échantillonnage d'un nombre plus important de sites, ajoutés aux 6 déjà connus (Figure 20). Au niveau local, il s'agit des sites de Liverdun, Jouy aux Arches et du lac de Madine. La population de Verneuil en Halatte (déjà utilisée dans le cadre du projet ANR IPOC « Interactions entre la POLLution et les Changements climatiques : développement d'une nouvelle stratégie de surveillance »), ainsi que deux populations dans le nord de la France (Condé et Courcelles) ont été ajoutées. Il s'est également avéré que le canal de Metz, annexe au site de Montigny – canal de Jouy contenait une population de *D. r. bugensis* différente de celle du canal principal en terme de morphologie. Il faut noter qu'en avril 2016, une population a été modifiée : le site de Verneuil en Halatte sur l'Oise a été remplacé par un site légèrement en amont, Pont Sainte Maxence, suite à l'épuisement de la population sur le premier. Les prospections réalisées sur les sites d'Angers (Loire), de la centrale de Golfech (Garonne) et le lac du Salagou (Hérault) n'ont rien donné de concluant.

La localisation des différents sites de prélèvement des dreissènes est présentée sur la Figure 20. Il est à noter la situation intéressante rencontrée sur plusieurs stations (Meuse à Saint-Mihiel, Canal de Jouy à Montigny, Oise à Verneuil-en-Halatte), où les 2 espèces cohabitent. Le Tableau VII fournit une brève présentation de chaque site (type et nom de la masse d'eau, espèces rencontrées et abondance relative, caractéristiques du site, historique).

Lors des campagnes d'octobre 2015 et de février 2017, sur chaque site, des prélèvements de sédiments ont été réalisés pour mesurer respectivement le niveau de contamination par les PCB, les HAP et les métaux. Par ailleurs, en février 2017, les concentrations en contaminants dans les organismes (HAP, PCB, métaux) ont été quantifiées, quand la masse de matériel biologique collectée le permettait. Les mesures physico-chimiques (charges organiques et minérales) ont été systématiquement réalisées pour toutes les campagnes.

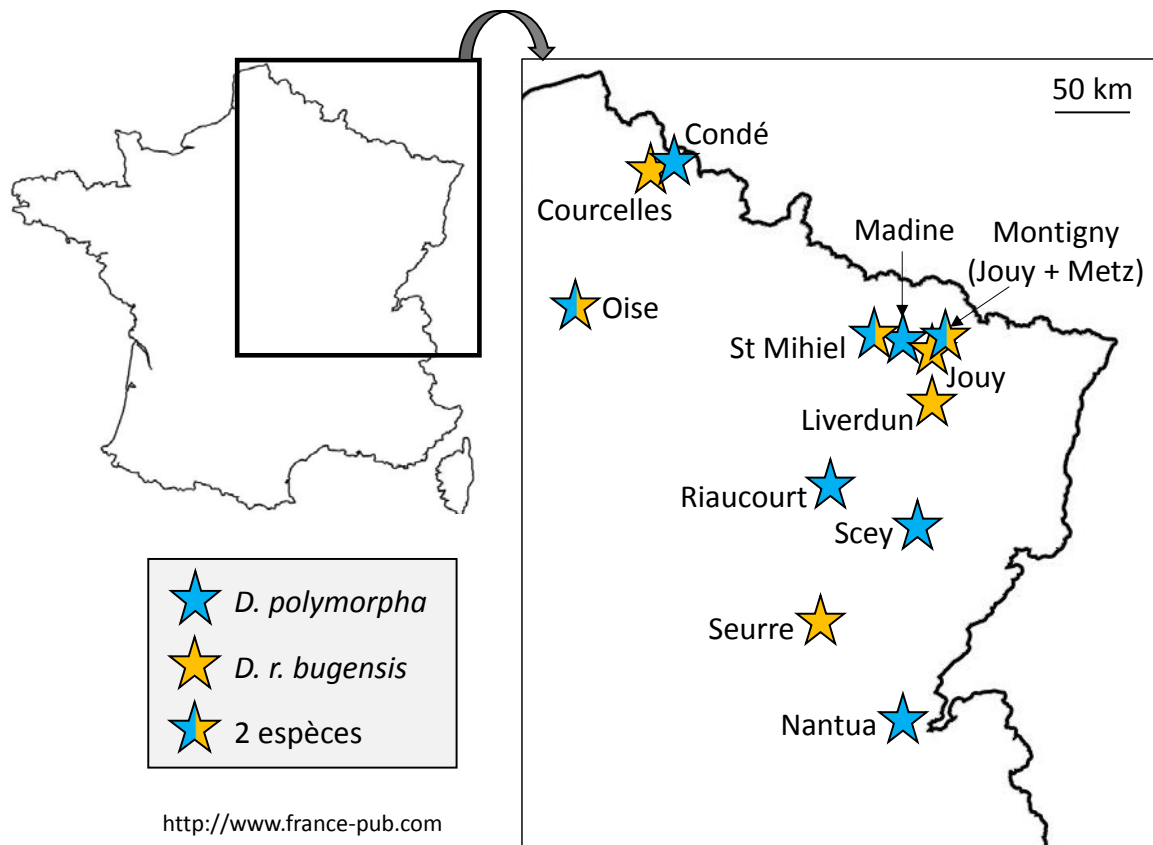


Figure 20 : Localisation des sites de prélèvement des dreissènes

Tableau VII : Présentation des sites de prélèvement de dreissènes

Condé sur l'Escaut (étang Chabaud Latour)

M. Potet

Etang d'affaissement minier situé sur l'Escaut. Présence de *D. polymorpha*, dont certains individus de taille importante (voir photos). Eau noirâtre, le site semble très eutrophe. Situé dans l'ancien bassin minier du Nord Pas de Calais. Cette zone était utilisée pour l'exploitation du charbon au 20^{ème} siècle (fosse Ledoux), jusqu'en 1989¹⁵.

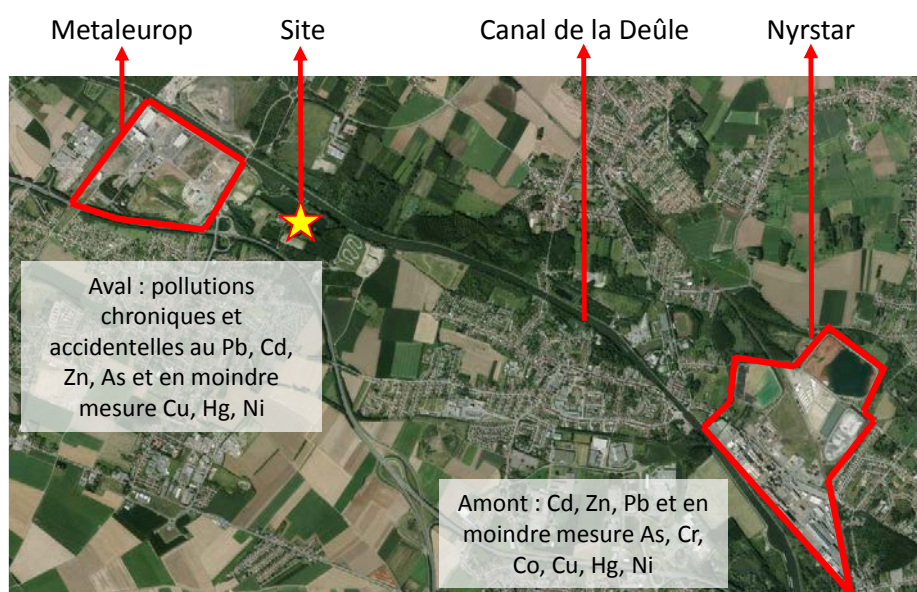
¹⁵ <http://www.s-pass.org/SPASSDATA/ALGEDIM/QOKQWR/D251/D25144.pdf>

Courcelles-lès-Lens



P. Wagner

Créé en 1905 sur le canal de la Deûle, c'était à l'origine un port, qui a été réhabilité en 1977 pour devenir une base de loisirs¹⁶. Présence de *D. r. bugensis*. Le site est situé entre les usines de Metaleurop (démantelée¹⁷) et Nyrstar, connues pour leurs rejets de plomb, cadmium et zinc¹⁸.



Verneuil en Halatte et Pont Sainte Maxence



M. Potet

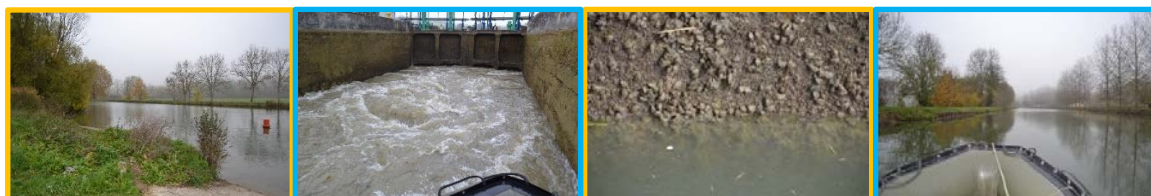
Sites sur l'Oise (canalisée). La zone de prélèvement a été changée entre octobre 2015 et avril 2016, car l'abondance de la population de Verneuil était fortement réduite. Sur les deux sites, *D. polymorpha* et *D. r. bugensis* sont présentes, avec une plus faible abondance pour la dernière. Pas de pollution connue, mais une station d'épuration se situe au niveau de Brenouille (en amont de Verneuil, et en aval de Pont Ste Maxence) ; les eaux usées sont rejetées dans l'Oise. Transport fluvial important pour relier le bassin parisien et le nord de la France.

¹⁶ http://www.courcelles-les-lens.fr/la-gare-d-eau_fr.html

¹⁷ http://www.sante-environnement-travail.fr/minisite.php3?id_rubrique=883&id_article=2873

¹⁸ <http://www.safir-network.com/site-de-metaleurop/>

Saint Mihiel



Potet, Wagner

Canal de l'Est (branche nord). Présence de *D. polymorpha* et *D. r. bugensis* ; les abondances sont très faibles depuis 2 ans. Les moules sont échantillonnées sur les parois de l'écluse, et sont donc fréquemment soumises à l'émersion. Pas de pollution particulière à notre connaissance.

Lac de Madine



Potet, Coacolo

Lac alimenté par un affluent de la Moselle, la Madine. Présence de *D. polymorpha*, mais de taille relativement petite (< 20 mm en général). C'est une base de loisirs, interdite aux bateaux à moteur thermique, qui constitue une réserve d'eau potable pour la ville de Metz.

Montigny lès Metz (canal de Jouy et canal de Metz)



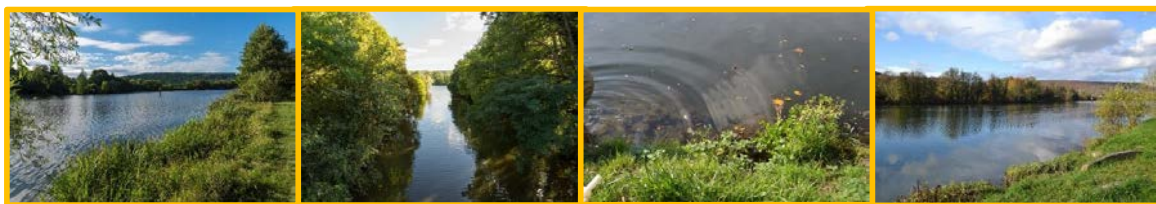
Potet, Pain-Devin

Situé sur la Moselle canalisée (canal de Jouy ; contient *D. polymorpha* et *D. r. bugensis*) ; le canal de Metz correspond à la dérivation de la Moselle qui passe juste à côté du canal (uniquement *D. r. bugensis*). En amont, à Ars sur Moselle, se trouve une usine de traitement de bois (Imprélorraine), utilisant des sels métalliques et de la créosote¹⁹. A Jouy aux Arches, en amont également se trouvait une raffinerie de goudrons, fermée en 1996 (HAP, phénols, naphthalène, créosote)²⁰.

¹⁹ http://basol.developpement-durable.gouv.fr/fiche.php?page=2&index_sp=57.0008

²⁰ <http://infoterre.brgm.fr/rapports/67-DSGR-A-079.pdf> et http://basol.developpement-durable.gouv.fr/fiche.php?page=2&index_sp=57.0095

Jouy aux Arches



Potet, Coacolo

Situé également sur la Moselle canalisée (canal de Jouy), mais légèrement en amont par rapport à Montigny. Présence de *D. r. bugensis*.

Liverdun



M. Potet

Situé sur la Moselle, avant la confluence avec la Meurthe. Présence de *D. r. bugensis*.

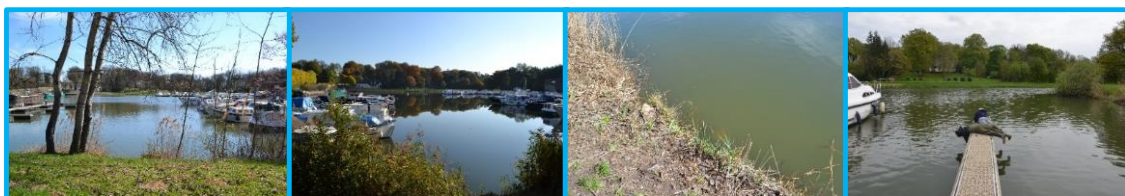
Riaucourt



Potet, Wagner

Canal entre Champagne et Bourgogne, sur la Marne. Présence de *D. polymorpha*. Le niveau d'eau est très fluctuant, et le chômage est fréquent, rendant les prélèvements compliqués.

Scey-sur-Saône-et-Saint-Albin



Potet, Wagner,
Louis

Port de plaisance situé sur la Saône. Présence de *D. polymorpha*, en très grande abondance sous les pontons.

Seurre



Potet, Wagner

Situé dans le port de Seurre, entre la Saône et son canal de dérivation. Présence de *D. r. bugensis*. *D. polymorpha* découverte en avril 2016 sur les pontons uniquement, en très faible abondance. Un bateau a coulé dans le port le 18 septembre 2015²¹ (voir photos), c'est pourquoi les analyses de sédiments ont été faites deux fois (octobre 2015 et avril 2016) afin de voir l'influence de cet événement sur la contamination sédimentaire.

Nantua



Potet, Wagner

Lac d'origine glaciale. Présence de *D. polymorpha*. Classé site naturel protégé depuis 1936²².

²¹ <http://france3-regions.francetvinfo.fr/bourgogne/cote-d-or/dans-le-port-de-seurre-l-epave-d-un-yacht-fait-polemique-897867.html>

²² https://www.legifrance.gouv.fr/affichSarde.do;jsessionid=399517A3A4B358D7660AFC8CB88E06E2.tpdjo09v_1?reprise=true&fastReqId=1201340161&idSarde=SARDOBJT000007104572&page=41

Partie III : Matériel et méthodes

1. Mesure des paramètres abiotiques sur les sites étudiés

Comme mentionné dans le Chapitre 1, l'évaluation de la qualité d'un cours d'eau passe en premier lieu par la mesure de paramètres physico-chimiques et chimiques. La qualité d'un milieu dépend de ces paramètres, mais aussi de la quantité d'eau présente dans la masse d'eau, du régime hydrologique et de la quantité de matières en suspension qui vont conditionner la dilution et la dispersion des polluants dans la masse d'eau (Davie, 2008).

1.1. Paramètres physico-chimiques

Sur chaque site, la température (°C), le pH, la conductivité (μS) et la teneur en dioxygène (en % et en mg.L^{-1}) ont été mesurés à l'aide d'une sonde Multi 3430 SET G (WTW). Ces mesures ont été réalisées à 10 cm sous la surface de l'eau, *in situ*, pour pallier aux variations liées à une mesure différée (Bartram et Ballance, 1996).

Des flacons en polyéthylène de 2 L ont également été remplis avec l'eau de chaque site, transportés au laboratoire dans des glacières à 4 °C à l'obscurité (pour limiter le développement algal). Ces échantillons ont permis des analyses plus approfondies des paramètres physico-chimiques, dont l'intérêt et les méthodes de mesure sont détaillés ci-dessous.

1.1.1. Les matières azotées

Dans l'eau, l'azote peut se trouver sous deux formes. La première est organique et provient du vivant (rejets urbains insuffisamment épurés, excréments) et se compose de molécules telles que les protéines, les acides aminés et l'urée. La seconde est inorganique, et comprend des molécules telles que **l'ammonium (NH_4^+)**, **les nitrites (NO_2^-)** et **les nitrates (NO_3^{2-})**, qui sont issues de la transformation de l'azote organique lors du processus de nitrification (Figure 21 ; Nollet et De Gelder, 2014). Lors de ce processus, des bactéries nitrifiantes vont oxyder successivement les différentes formes d'azote, et donc consommer de l'oxygène (processus aérobie). Si le taux d'oxygène dans le milieu est trop faible (anaérobiose), le processus peut s'inverser, les nitrates sont alors transformés en nitrites, ce qui libère de l'oxygène.

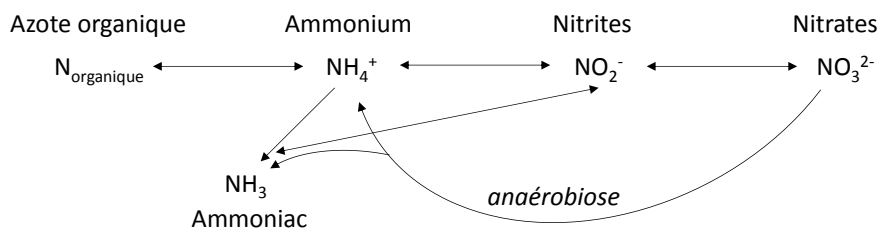


Figure 21: Décomposition de l'azote organique dans les milieux aquatiques

La présence d'**ammonium** traduit une dégradation incomplète de la matière organique. Même s'il peut être présent en grande quantité dans les eaux riches en matières organiques et peu oxygénées, il n'est pas toxique pour les organismes aquatiques. Les **nitrites** constituent le stade intermédiaire entre l'ammonium et les nitrates. Peu stables en rivière (quelques dizaines de mg par litre), on ne les rencontre que lorsqu'il existe un déséquilibre au niveau de l'oxygénation ou de la flore bactérienne de la rivière. Les nitrites proviennent soit d'une oxydation incomplète de l'ammoniac, soit d'une réduction des nitrates sous l'influence d'une action dénitrifiante. Des concentrations élevées en nitrites témoignent d'une qualité de l'eau suspecte (Bartram et Ballance, 1996). Les **nitrates** constituent le stade final d'oxydation de l'azote (Bartram et Ballance, 1996 ; Davie, 2008), mais peuvent aussi être directement libérés dans le milieu *via* l'utilisation d'engrais azotés en milieu agricole. Les nitrates sont un des éléments majeurs des végétaux et leur présence, associée aux autres éléments nutritifs, stimule le développement de la flore aquatique. C'est un des éléments responsables de la croissance algale, et donc de l'eutrophisation (Bartram et Ballance, 1996 ; Davie, 2008).

La présence de nitrates dans l'eau, si la source est organique, atteste que l'auto-épuration a joué son rôle. En revanche, si ce sont les formes « NH » qui dominent, cela laisse supposer que le milieu ne fonctionne pas bien. Cependant, ces molécules ne sont pas toxiques pour les organismes aquatiques. C'est leur transformation en **ammoniac** (NH_3), beaucoup plus soluble, qui constitue un danger (Davie, 2008). En absence d'oxygène, des bactéries anaérobies peuvent transformer les nitrates pour produire de l'ammonium ou de l'ammoniac²³. Des modifications de pH (plus c'est acide, plus l'ammoniac domine ; Alley, 2007) ou de température peuvent aussi engendrer la production d'ammoniac.

Les matières azotées ont été mesurées par chromatographie ionique pour les nitrates et les nitrites, et par spectrométrie d'absorption UV/visible pour l'ammonium. Les résultats sont exprimés en mg d'azote par litre (N mg.L^{-1}).

1.1.2. Les matières phosphorées

Les matières phosphorées proviennent de l'érosion des sols, du lessivage des engrais agricoles, des industries agro-alimentaires et chimiques et des rejets urbains (détergents, lessives). Les phosphates sont moins solubles que les nitrates, et s'attachent plus facilement aux particules sédimentaires (Davie, 2008). Dans l'eau, leurs concentrations sont généralement inférieures à $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Bartram et Ballance, 1996).

Le **phosphore total** (P_{tot}) comprend les orthophosphates, les polyphosphates et les phosphates organiques. Il est mesuré par spectrométrie d'absorption UV/visible et exprimé en mg de phosphore par litre (P mg.L^{-1}).

²³ http://lda.lozere.fr/sites/default/files/upload/chimie_des_eaux.pdf

Pour compléter cette mesure, **les orthophosphates (PO_4^{3-})** sont également dosés par chromatographie ionique, ou par spectrométrie UV/visible si la concentration est inférieure à $0.5 \text{ mg de P.L}^{-1}$. C'est la forme la plus courante des phosphates dans l'eau. Elle provient de la dégradation de phosphates organiques par des bactéries. Ils sont facilement assimilables par les végétaux, pour lesquels ils représentent un nutriment majeur, et jouent donc un rôle d'élément limitant dans les phénomènes d'eutrophisation (Bartram et Ballance, 1996 ; Davie, 2008).

1.1.3. Les éléments en solution - Minéralisation

Les chlorures (Cl^-) peuvent témoigner d'une pollution domestique (sels de lave-vaisselle) ou industrielle ; ils sont aussi utilisés pour désinfecter les eaux potables. Ils peuvent être fortement présents en hiver à cause de leur utilisation dans les sels de déneigement.

Les sulfates (SO_4^{2-}) sont présents dans de nombreuses eaux usées d'origine industrielle. Ils résultent aussi de la dégradation de composés organiques soufrés. Ce sont des ions peu toxiques, dont les concentrations ne doivent pas excéder 500 mg.L^{-1} dans l'eau de boisson (Bartram et Ballance, 1996).

Le **calcium (Ca^{2+})** se retrouve dans tous les types de roches, et est donc quasi-systématiquement retrouvé dans l'eau. Sa teneur est plus importante sur les sols calcaires que sur les sols granitiques ou siliceux. Il contribue à la dureté de l'eau (Bartram et Ballance, 1996).

Le **magnésium (Mg^{2+})** est classiquement retrouvé dans l'eau, particulièrement sur des sols dolomitiques ou calcaires, moins sur les sites granitiques ou siliceux. Il impacte la dureté de l'eau, au même titre que le calcium (Bartram et Ballance, 1996).

La concentration en **potassium (K^+)** est généralement inférieure à 20 mg.L^{-1} (Bartram et Ballance, 1996).

Contrairement aux eaux marines et estuariennes, la concentration en **sodium (Na^+)** est assez faible en eau douce (Bartram et Ballance, 1996).

Les concentrations en ions sont exprimées en mg.L^{-1} et sont mesurées par chromatographie ionique (Cl^- , SO_4^{2-}) ou par spectrométrie d'absorption atomique en flamme (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+).

Ces différents éléments permettent de calculer les quantités d'**anions totaux (TotA)** et de **cations totaux (TotC)**, exprimés en milliéquivalent par litre (meq.L^{-1}), ainsi que la **balance ionique (Bal. Ion.)** qui symbolise l'équilibre entre les anions et les cations et s'exprime en %.

Bien qu'elle n'ait pas été mesurée ici, on peut noter que les ions Ca et Mg sont fortement impliqués dans la dureté de l'eau ; leur présence dépend de la nature des terrains lessivés et permettrait de réduire la toxicité des métaux dans le milieu.

L'alcalinité (TAC pour Titre Alcalimétrique Complet) est mesurée *via* la neutralisation d'un volume d'eau par un acide minéral fort et s'exprime en meq.L^{-1} ($1 \text{ meq.L}^{-1} = 5 \text{ degrés français (d}^\circ\text{f)}$).

Elle correspond à la teneur en hydroxydes libres, en carbonates et en hydrogénocarbonates dans l'eau²⁴. L'alcalinité correspond à la capacité à neutraliser l'acidité. Elle est surtout due aux bicarbonates de calcium et de magnésium (Bartram et Ballance, 1996).

1.1.4. Les matières organiques et oxydables

Les matières organiques sont naturellement présentes dans l'eau, mais à faible concentration. En plus de leur origine naturelle, elles peuvent provenir de rejets domestiques (eaux usées, excréments), agricoles (lisiers) ou industriels (tanneries, abattoirs). La dégradation de ces matières organiques par les microorganismes (auto-épuration) est consommatrice d'oxygène, et permet de calculer différents indices.

La **demande biochimique en oxygène (DBO)** représente la quantité d'oxygène utilisée par les bactéries et d'autres microorganismes pour dégrader les matières biochimiques oxydables, qui constituent leur source de carbone (Nollet et De Gelder, 2014). En définitive, plus la DBO sera élevée, plus la quantité de matières organiques présentes dans l'échantillon sera élevée. Il faut savoir que certaines toxines peuvent inhiber l'activité des bactéries, et donc fausser la valeur de DBO mesurée, et l'estimation de la quantité de matière organique. La DBO₅ exprime la quantité d'oxygène nécessaire à la dégradation des matières organiques, *via* l'action des microorganismes, à 20 °C et à l'obscurité, sur une période de 5 jours. Elle est donc mesurée *via* le suivi de la diminution de la quantité d'oxygène dans l'échantillon entre 0 et 5 jours, et s'exprime en mg d'O₂.L⁻¹. Cette durée se justifie par le fait qu'environ 70% des composés organiques sont généralement dégradés après 5 jours (dégradation complète au bout de 20 jours) et que les bactéries nitrifiantes, qui pourraient fausser la mesure en consommant l'oxygène pour dégrader les composés azotés, ne sont effectives qu'à partir de 8 jours (Bartram et Ballance, 1996 ; Davie, 2008).

Contrairement à la DBO, où la biodégradation de la matière organique se fait lentement par l'action des microorganismes, le **demande chimique en oxygène (DCO)** mesure à la fois la matière organique biodégradable et peu dégradable. La DCO correspond à la quantité d'oxygène consommée par la matière organique lors de ce processus. En effet, dans le cas de la DCO, les matières organiques sont oxydées par l'ajout d'un oxydant, le dichromate de potassium (K₂Cr₂O) en milieu acide. Le dichromate en excès est ensuite titré avec une solution de sulfate de fer (II) et d'ammonium et le résultat est exprimé en mg.L⁻¹ (Bartram et Ballance, 1996). La DCO est un paramètre important pour caractériser la pollution globale d'une eau par des composés organiques, et sa valeur sera toujours plus élevée que celle de la DBO. On peut aussi noter que le rapport DCO/DBO₅ permet d'évaluer le caractère biodégradable de la matière organique.

²⁴ http://lda.lozere.fr/sites/default/files/upload/chimie_des_eaux.pdf

L'**oxygène dissous (O_2)** est indispensable pour la faune et la flore aquatique et l'oxydation des déchets. Plus la concentration en oxygène dissous est proche de la saturation, plus la capacité d'auto-épuration du milieu en cas de pollution sera grande. Cependant, sa teneur varie de façon journalière et saisonnière, en fonction de sa consommation (respiration des organismes, oxydation des polluants et matières organiques) et de sa production (échanges avec l'atmosphère, photosynthèse). Elle dépend également de la pression atmosphérique, de la salinité de l'eau, de la luminosité et de la vitesse du courant. La température influence aussi fortement ce paramètre : lorsqu'elle augmente, les besoins en oxygène des organismes augmentent, tandis que sa dissolution dans l'eau diminue (14.16 mg d' O_2 .L⁻¹ à 0 °C contre 8.11 mg d' O_2 .L⁻¹ à 25 °C). En cas de prolifération végétale soudaine, ou de pollution accidentelle, le stock d'oxygène peut donc être très rapidement consommé. La teneur en oxygène dissous est mesurée à l'aide d'une sonde et s'exprime en mg d' O_2 .L⁻¹, ou bien en % de saturation (rapport entre la teneur effectivement présente dans l'eau et la teneur théorique correspondant à la solubilité maximale pour une température donnée ; Davie, 2008).

1.1.5. Les matières en suspension

Les **matières en suspension totales (MEST)** sont constituées de toutes les particules organiques ou minérales insolubles véhiculées par les eaux (charge en matières solides). Elles peuvent être composées de particules de sable, d'argiles, de limons, de terre et de sédiment arrachées par l'érosion, de débris apportés par les eaux usées ou les eaux pluviales et d'êtres vivants planctoniques. La quantité de MES varie selon les saisons et le régime d'écoulement des eaux/la vitesse du courant. Ces matières affectent la transparence de l'eau et diminuent la pénétration de la lumière (donc la photosynthèse). Elles peuvent aussi gêner la respiration des poissons et accumuler des quantités élevées de matières toxiques. Pour les mesurer, l'eau est filtrée et le poids de matières retenues par le filtre est déterminé par une pesée différentielle après un séchage à 105 °C. Les MEST sont exprimées en mg.L⁻¹ (Davie, 2008).

Les MEST comprennent les matières minérales et les **matières volatiles en suspension (MVS)**, qui représentent la masse de matières particulaires organiques. Les MVS correspondent à la partie des MEST volatilisée après calcination du filtre à 525 °C (les résidus secs correspondants aux matières minérales). Les MVS sont donc exprimées en % (par rapport aux MEST).

1.1.6. Autres mesures

Le **pH** représente le degré d'alcalinité ou d'acidité (concentration en ions H^+) du milieu. L'échelle de pH est logarithmique inverse (base 10), ce qui signifie que si on augmente le pH de 1, on divise par 10 la concentration en H^+ (Davie, 2008). Un pH de 7 est considéré comme neutre ; en dessous, on parle de pH acide, et au-dessus de pH basique (ou alcalin). Les eaux qui traversent des sols plutôt organiques (tourbe) se chargent en acides organiques et ont un pH faible ; au contraire, celles qui

traversent des sols de type calcaire ou crayeux vont se charger en bicarbonates, et avoir un pH alcalin (Davie, 2008). Selon le type de substrat, il peut varier entre 4 et 10, mais il est généralement compris entre 6 et 9 ce qui permet un bon développement de la vie aquatique. Le pH exerce un rôle sur les équilibres ioniques, et peut modifier la dissolution des ions, et donc leur toxicité (un pH acide augmente la présence de métaux sous forme ionique, plus toxique ; un pH basique augmente les concentrations d'ammoniac ; Davie, 2008). Les organismes vivants sont très sensibles aux variations brusques (même limitées) du pH ; les mollusques disparaissent lorsqu'il descend à 5.5 – 6 (Davie, 2008). La mesure du pH dépend de la température et est réalisée par une méthode potentiométrique en mesurant la différence de potentiel entre une électrode de verre et une électrode de référence.

La conductivité électrique est une expression numérique de la capacité d'une solution (sels minéraux) à conduire un courant électrique qui s'exprime en $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$. La conductivité des eaux douces naturelles est généralement comprise entre 50 et 1500 $\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$. La conductivité exprime la relation entre la teneur en sels dissous dans l'eau et la résistance qu'elle oppose au passage d'un courant électrique. Elle permet d'avoir une appréciation des concentrations globales des matières en solution dans l'eau (minéralisation globale de l'eau), puisqu'elle est directement proportionnelle à la concentration en ions dissous (plus il y a d'ions, plus la conductivité est élevée). Elle se mesure en mesurant la conductance de l'eau entre deux électrodes métalliques (Davie, 2008).

La température impacte la solubilité des sels et des gaz dans l'eau. Elle doit être mesurée sur le terrain pour être fiable. Elle s'exprime en degrés Celsius ($^{\circ}\text{C}$). Il existe une relation forte entre la température et la teneur en oxygène dissous. Une température basse affecte l'auto-épuration des rivières en ralentissant les réactions d'oxydation. Une hausse de température accroît les vitesses des réactions chimiques, biochimiques et l'activité métabolique des organismes, entraînant une plus forte consommation d'oxygène dissous. La température influence les réactions chimiques, et une hausse de température accélère ces réactions et peut donc augmenter la dissolution des substances chimiques. Sa valeur peut être influencée par d'éventuels rejets d'eau chaude et des changements brutaux de 3°C ou plus s'avèrent souvent néfastes. Ce type de rejet est fréquent à proximité des centrales thermiques, malgré la présence de processus de refroidissement (Davie, 2008).

1.2. Contamination sédimentaire

Les mesures de paramètres physico-chimiques ont été complétées par l'analyse de la contamination sédimentaire. Les sédiments gardent en mémoire la contamination présente et passée du milieu, notamment les pollutions aux métaux lourds, HAP, PCB, ou encore les matières organiques non biodégradables. L'analyse de la contamination sédimentaire est plus avantageuse que celle de la colonne d'eau. En effet, la plupart des contaminants s'associe préférentiellement avec la matière particulaire en suspension plutôt que de rester en solution. Les problèmes de fluctuations temporelles associés à

l'analyse de la colonne d'eau sont beaucoup moins vrais pour les sédiments. La contamination sédimentaire varie lentement, et reflète les conditions de contamination sur des périodes de plusieurs semaines voire plusieurs mois. Les concentrations en contaminants sont aussi plus élevées dans les sédiments que la colonne d'eau, et donc beaucoup plus facilement détectables (Phillips et Rainbow, 1994). Cependant, la contamination sédimentaire dépend des flux de contaminants, de la quantité de particules en suspension, et de la sédimentation. La rétention des contaminants dépendra de la taille du grain et de la teneur en carbone organique (elle augmente quand la taille du grain diminue, puisque la surface disponible augmente, et quand la teneur en carbone augmente).

Les sédiments régissent la rétention, le relargage et le transfert des nutriments et des contaminants entre les différents compartiments. Ils sont composés d'une phase minérale (provenant de l'érosion du substrat rocheux) et une phase organique (production et décomposition biologique et microbienne). Ici, ce sont les sédiments déposés qui ont été analysés, et non les sédiments en suspension. Sur chaque site, les sédiments ont été prélevés à l'aide d'une benne ou d'une pelle à sédiments en trois points différents, homogénéisés, puis stockés à l'obscurité dans des glacières à 4 °C. Les analyses des concentrations en métaux lourds, HAP et PCB ont été réalisées par le laboratoire La Drome (accréditation Cofrac n° 1-0852). Les différents éléments analysés et les méthodes de mesure relatives à chacun d'eux sont présentés en Annexe 1.

1.2.1. Les éléments-traces métalliques (ETM)

La notion d'« éléments-traces métalliques » (ETM) remplace désormais les métaux lourds ; en effet, les ETM regroupent à la fois des métaux lourds et des métalloïdes plus légers, aussi bien essentiels que non-essentiels. Les éléments mesurés sur nos sites sont les suivants : Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, et Zn. Ils peuvent avoir une origine naturelle (érosion du substrat, lessivage de minerais, volcanisme), mais proviennent surtout de l'industrie et du ruissellement routier ; les boues de stations d'épuration sont aussi très riches en ETM.

Selon leurs concentrations, leurs propriétés, leur spéciation et leur biodisponibilité, ils peuvent être plus ou moins toxiques pour les organismes. Dans le milieu, ils sont présents sous forme dissoute (ionique) et particulaire (adsorbés sur les sédiments, la matière en suspension particulaire ou colloïdale, à la matière organique, aux carbonates, aux complexes Fe/Mn...). Le passage d'une phase à une autre dépend du pH et du potentiel oxydoréducteur du milieu (Nollet et De Gelder, 2014). Les métaux tels que l'Al, le Fe, le Pb et le Mn sont très fortement associés avec la matière particulaire et sont souvent retrouvés en fortes concentrations dans les sédiments. D'autres composés au contraire ont plutôt tendance à rester en solution (As, Cd, Se ; Phillips et Rainbow, 1994).

Leur toxicité décroissante est la suivante : mercure, cadmium, cuivre, zinc, nickel, plomb, chrome, aluminium et cobalt. Le cuivre et le zinc sont les causes de toxicité les plus fréquentes en milieu aquatique (Davie, 2008).

Expositions au nickel en laboratoire

Le nickel a été sélectionné comme contaminant modèle pour les expositions en laboratoire au cours de ces travaux. Ce composé est naturellement présent dans l'environnement, mais les principales sources d'émission sont anthropiques du fait de son utilisation dans les alliages (acier inoxydable, nickelage), les pigments, les céramiques ou dans les batteries (Ni-Cd). Avec le cadmium, le plomb et le mercure, il est un des 4 métaux prioritaires définis par la DCE (UE, 2013). Des valeurs de concentrations létales et de concentrations sans effets sont présentes dans la littérature (INERIS, 2006; Shuhaimi-Othman et al., 2014), et ont permis la construction de modèles SSD et la dérivation PNEC pour ce composé (<http://www.nipera.org/NiPERA>). Toutefois ces données ont été obtenues selon des méthodes standardisées, lors d'expositions chroniques, et en s'intéressant à la survie, la croissance, ou la capacité reproductive des organismes. L'impact du nickel au niveau sub-individuel, ainsi que ses effets sur les mécanismes biochimiques et physiologiques, dans des conditions environnementalement réalistes, sont donc assez mal connus. De plus, bien que ces données aient été acquises sur différents groupes taxonomiques, les invertébrés sont surtout représentés par des cladocères, et contiennent très peu d'informations sur les mollusques bivalves.

Pour la plupart des expérimentations, le nickel a été utilisé à des concentrations de 20 ou 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$, qui correspondent respectivement à la limite Européenne dans les eaux à destination de la consommation humaine (Directive 98/83/CE) et à la limite légale française dans les eaux de décharge (Arrêté du 2 février 1998). La concentration de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ est également comprise entre la NQE-MA (moyenne annuelle) de 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (de nickel biodisponible) et la NQE-CMA (concentration maximale admissible) de 34 $\mu\text{g.L}^{-1}$ fixées par la DCE pour les eaux de surface intérieures. La concentration de 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ correspond également à limite de rejet pour les installations classées et les stations d'épuration (si le rejet dépasse 5 g par jour), fixée par l'Arrêté du 26 décembre 2012 modifiant l'Arrêté du 31 janvier 2008 concernant le registre et la déclaration annuelle des émissions polluantes et des déchets.

De plus, le nickel est aussi un contaminant modèle au LIEC, et fait actuellement partie du programme « Labex-Ressources21 » pour la connaissance et la gestion des métaux stratégiques du 21^{ème} siècle.

1.2.2. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

On peut retrouver plus de 600 composés organiques différents dans les eaux de surface (Davie, 2008). Les HAP (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques) sont composés uniquement de carbone et d'hydrogène, et sont issus de l'assemblage de cycles benzéniques. Ils existent naturellement dans les

gisements de pétrole et de charbon et peuvent être relargués dans l'environnement par les feux de forêts ou le volcanisme. Les HAP sont aussi issus des activités humaines, et notamment de la combustion incomplète de composés organiques (bois, charbon, pétrole, gaz naturel) pour les procédés industriels ou l'usage domestique, dans les moteurs à combustion interne et lors de la combustion de déchets.

Ils sont peu solubles dans l'eau mais présentent une forte lipophilie et un coefficient de partition octanol-eau (K_{ow}) élevé ; ces deux derniers paramètres augmentent avec le poids moléculaire du HAP considéré. Ils s'adsorbent à la matière organique des sédiments et sont facilement ingérés, bioaccumulés et bioconcentrés par les organismes aquatiques (dont les mollusques), mais cependant moins fortement par les organismes situés aux niveaux les plus élevés de la chaîne alimentaire, qui possèdent des mécanismes de biotransformation plus développés. Les HAP de faible poids moléculaire peuvent entraîner des effets toxiques assez variés, alors que les plus lourds sont principalement cancérigènes (Newman, 2015i).

Parmi les 10 HAP mesurés dans notre étude, 7 figurent parmi les substances prioritaires de la DCE (anthracène*, benzo(a)pyrène*, benzo(ghi)perylène*, benzo(k)fluoranthène*, fluoranthène, indéno(1,2,3-cd)pyrène*, naphthalène) et 5 sont considérés comme substance dangereuse prioritaire (*). Les 3 autres sont le benzo(a)Anthracène, le chrysène et le phénanthrène.

1.2.3. Les polychlorobiphényles (PCB)

Les polychlorobiphényles (PCB) sont des contaminants d'origine purement anthropique, produits par chloration du biphényle, dont la fabrication a débuté dans les années 1930 par la société Monsanto. Ils étaient alors utilisés pour leur stabilité, leur ininflammabilité et leurs propriétés anti-conductrices dans les transformateurs et condensateurs, dans les huiles refroidissantes et lubrifiantes, comme plastifiants dans les peintures et comme adjuvants dans les produits phytosanitaires. Ils étaient fréquemment commercialisés, en mélanges, sous le nom « Aroclor », « Clophen », « Kanechlor » ou « Pyralène ». Le degré de chloration détermine la composition, les propriétés et donc l'utilisation des PCB. En théorie, 209 congénères pourraient exister selon ce degré de chloration, mais seuls 150 peuvent effectivement être synthétisés. Cette large utilisation a entraîné un relargage important des PCB dans l'environnement, avant que ne surviennent les inquiétudes et les restrictions les concernant, dans les années 1960 (Walker, 2009 ; INERIS, 2011).

Bien que leur production et leur utilisation soient totalement interdites en France depuis 1987, les PCB sont classés parmi les polluants organiques persistants (POPs) par le Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE). Ils sont lipophiles et très peu solubles dans l'eau (la solubilité diminue quand le degré de chloration augmente). Ils s'adsorbent donc très facilement dans les sédiments et sur la matière organique, restent longtemps mobilisables et sont peu biodégradables (Walker, 2009 ; INERIS, 2011).

Différents textes aux niveaux français, européen et international (OCDE, OSPAR) ont progressivement interdit la fabrication et l'utilisation des PCB et ont permis une meilleure gestion des déchets associés. Les PCB mesurés sur nos sites d'étude (101, 118, 138, 153, 180, 28 et 52) correspondent aux 7 PCB dits « indicateurs » sélectionnés en 1982 par le Bureau Communautaire de Référence de la Commission Européenne. Ils représentent environ 80% des PCB totaux et sont recherchés en priorité dans les matrices organiques, dont les sédiments, du fait de leur abondance, de leur persistance dans l'environnement et de leur toxicité (INERIS, 2011). Ce sont en effet des perturbateurs endocriniens avérés. Seul le PCB 118 figure dans la liste des substances dangereuses prioritaires de la DCE. C'est un PCB de type dioxine ayant des effets tératogènes, mais peu abondant dans l'environnement (INERIS, 2011).

Pour ce qui concerne les seuils réglementaires, l'Arrêté du 9 août 2006, relatif aux niveaux à prendre en compte lors d'une analyse de rejet dans les eaux de surface ou de sédiments marins, estuariens ou extraits de cours d'eau ou canaux, fixe un seuil de référence pour les PCB totaux issus de sédiments de cours d'eau ou de canaux de 0.68 mg.kg^{-1} .

2. Echantillonnage des organismes et acclimatation aux conditions de laboratoire

Pour éviter d'endommager les tissus, les organismes sont prélevés à même le substrat en sectionnant leur byssus à l'aide d'un scalpel. Les individus supposés juvéniles ($< 10 \text{ mm}$ de longueur) ne sont pas prélevés.

Pour les expérimentations *in situ*, les organismes ont été disséqués sur place et leurs tissus furent placés dans des cryotubes et congelés dans de l'azote liquide avant d'être ramenés au laboratoire (Figure 22).

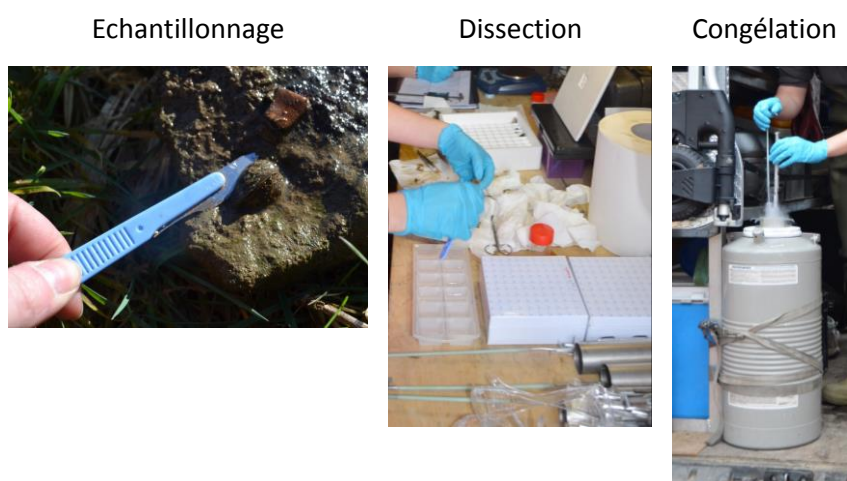


Figure 22 : Echantillonnage sur le terrain

Pour les organismes utilisés en laboratoire, ils ont été ramenés vivants dans des glacières contenant l'eau de leur milieu d'origine, oxygénée ou non selon le temps de transport. Une fois au

laboratoire, les organismes sont acclimatés aux futures conditions expérimentales (photopériode, température, eau Cristaline®).

3. Accumulation des contaminants par les organismes

Lors des expositions au laboratoire (au nickel ou au chrome), les organismes ont été mis à dépurer individuellement dans de l'eau Cristaline® pendant 24 h. Les tissus mous ont ensuite été disséqués (sans le byssus) et congelés. Au moment des dosages, ils ont été décongelés, lyophilisés ou séchés à l'étuve (60 °C, 48 h) selon les cas, et le poids sec a été mesuré. Les tissus secs ont ensuite été digérés dans 5 mL d' HNO_3 à 69% pendant 24 h à 60 °C, et les éléments métalliques dosés par spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) en flamme (Perkin-ELMER Aanalyst 100) ou en four (VARIAN Spectraa 800 avec correction de ZEEMAN). Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec. Un matériel de référence certifié a été utilisé (ERM® - CE 278k, mussel tissue) pour s'assurer de la fiabilité des mesures.

Pour les mesures de contaminants bioaccumulés *in situ* sur les différents sites lors de la campagne de février 2017, les moules ont été disséquées, poolées et congelées immédiatement après leur prélèvement. Au retour au laboratoire, elles ont été séchées à l'étuve à 60 °C durant 48 h, pesées, et envoyées pour analyses à MicroPolluants Technologie S.A. (accréditation Cofrac n° 1-1151). Les différents éléments analysés et les méthodes de mesure relatives à chacun d'eux sont présentés en Annexe 1.

4. Biomarqueurs mesurés

4.1. Préparation des tissus avant mesure

Les mesures de biomarqueurs au niveau sub-cellulaire ont été faites sur la glande digestive, l'organe majeur de détoxification chez les bivalves (Balabaskaran et al., 1986). Les glandes digestives des organismes sont disséquées et congelées à -80 °C (dans de l'azote liquide pour les dissections sur site). Au moment de l'analyse, chaque glande est décongelée, pesée et broyée dans du tampon d'homogénéisation (tampon phosphate 50 mM pH 7.6, supplémenté avec 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) et 1 mM L-serine borate comme inhibiteurs de protéases) à un ratio de 1/8 poids/volume (4000 μL pour 500 mg de glande). Après ajout du tampon, deux billes en acier inoxydable sont placées dans les microtubes et les glandes sont broyées au broyeur électrique (Retsch MM400®) durant 30 secondes à une vitesse de 30 Hz.

Une première centrifugation à 250 x g, 4 °C, 5 min permet d'éliminer les plus gros débris. Une partie du surnageant est récupérée et constitue le broyat brut. Le reste du surnageant est centrifugé à nouveau, 1000 x g, 20 min, 4 °C et à nouveau 20000 x g, 50 min, 4 °C. Le surnageant final correspond à la fraction cytosolique. Le broyat brut est utilisé pour la mesure des protéines (ProtB), des triglycérides

(Tri), du cholestérol (Chol), des activités de la phosphatase acide (ACP), du système de transport d'électrons mitochondrial (ETS) et de la concentration en hydroperoxydes lipidiques (LOOH). La fraction cytosolique est utilisée pour les mesures des activités de la glutathion S-tranf  rase (GST), de la glutathion peroxydase (GPx), de la catalase (Cat), des caspases (Csp), de la lactate deshydrogénase (LDH), de la concentration en protéines (ProtFC) et de la capacité antioxydante totale (TAC).

Sur chaque glande digestive, une batterie de 13 biomarqueurs sub-cellulaires a donc été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre automatisé (Konélab 20XTi  , ThermoScientific), qui réalise le mélange des échantillons et des réactifs, et effectue les lectures d'absorbance (Figure 23). Cette méthodologie de dosage développée au sein du LIEC permet d'obtenir ces 13 valeurs sur un seul organisme, permettant donc de décrire de façon fine les relations à l'échelle individuelle entre l'ensemble de ces réponses, et de pouvoir observer la variabilité inter-individuelle.

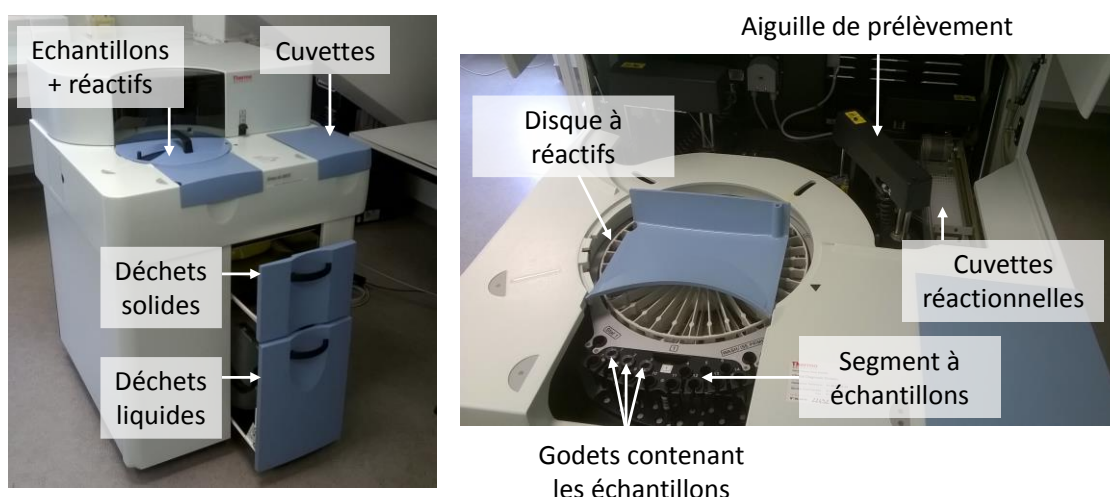


Figure 23 : Spectrophotomètre automatisé Konélab 20XTi

4.2. Biomarqueurs mesurés sur le broyat

4.2.1. Concentrations en protéines, triglycérides et cholestérol

La concentration en protéines est déterminée grâce à un réactif prêt à l'emploi U/CSF protein (ThermoScientific, Ref 981843). Il est normalement utilisé pour mesurer la concentration en protéines dans l'urine et le liquide cérébro-spinal humain. Le complexe rouge de Pyrogallol-molybdate va se lier aux groupements amines des protéines formant un complexe coloré dont on mesure l'absorbance à 600 nm. La couleur est directement proportionnelle à la concentration en protéines. C'  st le seul biomarqueur mesuré sur les deux fractions.

Le réactif est composé de rouge de Pyrogallol 56   M, de molybdate de sodium 40   M, d'acide succinique 50 mM, de benzoate de sodium 3.5 mM, d'oxalate de sodium 1 mM, de méthanol 0.9 M.

Cette mesure est réalisée sur l'homogénat et sur la fraction cytosolique, et l'échantillon est dilué au 1/8^{ème}.

$$\text{Concentration en protéines (g.L}^{-1}\text{)} = \frac{((Abs_{éch.} - Abs_{blanc}) - ORD)}{PENTE} * FD$$

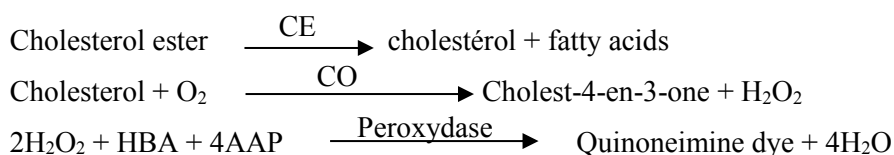
Les triglycérides sont des esters de glycérol avec trois esters d'acides gras. Ils constituent une forme de stockage d'énergie et peuvent être hydrolysés pour libérer du glycérol et des acides gras. La détermination de la concentration en triglycérides se fait à partir d'un réactif prêt à l'emploi (ThermoScientific, Ref 981786). Brièvement, les triglycérides sont hydrolysés par les lipases en glycérol et acides gras puis le glycérol est phosphorylé en glycérol-3-phosphate, lui-même oxydé en phosphate de dihydroxyacétone et H₂O₂. L'H₂O₂ réagit ensuite avec la 4-aminoantipyrine et le 4-chlorophénol pour former de la quinoneimine dont on mesure l'absorbance à 510 nm.

Le réactif contient du tampon de Good pH 7.2 (50 mM), 4-chlorophénol (4 mM), ATP (2 mM), Mg²⁺ (15 mM), Glycérokinase (GK) (> 400 U/L), Péroxydase (POD) (> 2000 U/L), lipoprotéine lipase (LPL) (> 2000 U/L), 4-aminoantipyrine (0.5 mM), glycérol-3-phosphate oxydase (GPO) (> 500 U/L), NaN₃ (< 0.1 %).

$$\text{Concentration en triglycérides (g.L}^{-1}\text{)} = \frac{(Réponse_{éch} - Réponse_{blanc}) - ORD}{PENTE}$$

Les esters de cholestérol sont hydrolysés par des cholestérol-estérases (CE) en cholestérol et acides gras libres. Le cholestérol libéré est ensuite oxydé en cholest-4-en-3-one et H₂O₂ par la cholestérol-oxydase (CO). Finalement, l'H₂O₂ se combine avec l'acide hydrobenzoïque (HBA) et le 4-aminoantipyrine (4AAP) pour former de la quinoneimine, un chromophore dont on mesure l'absorbance à 510 nm.

Le réactif (ThermoScientific, Ref 9891813) est composé de cholestérol oxydase (microbienne) (> 200 U/L), cholestérol estérase (microbienne) (> 500 U/L), peroxydase (raifort) (> 300 U/L), 4-aminoantipyrine (4AAP) (0.25 mM), acide hydroxybenzoïque (HBA) (10 mM), Tampon Mopso (acide 3-(N-morpholino) propanesulfonique) (50 mM), surfactants/tensioactifs, pH 6.7.



$$\text{Concentration en cholestérol (g.L}^{-1}\text{)} = \frac{((Réponse_{éch.} - Réponse_{blanc}) - ORD)}{PENTE}$$

Chacune de ces trois mesures est calibrée avec du Scal (ThermoScientific, Ref 981831) préparé à base de sérum bovin, qui permet de tracer une courbe d'étalonnage et d'en calculer la pente (PENTE) et l'ordonnée à l'origine (ORD). L'utilisation de ces réactifs a été adaptée à la mesure sur les glandes

digestives de moules. En divisant les concentrations obtenues par le taux de dilution des glandes digestives, on peut exprimer les concentrations en protéines, triglycérides et cholestérol en mg.gFW⁻¹.

4.2.2. *Phosphatase Acide (ACP)*

En milieu acide, l'ACP hydrolyse le 4-nitrophenyl phosphate, produisant du phosphate inorganique et du p-nitrophénol. Le p-nitrophénol est ensuite transformé en composé coloré jaune par la basification du milieu (ajout de soude, qui stoppe aussi la réaction). Ce complexe est mesuré par spectrophotométrie à 405 nm.

L'échantillon de broyat brut (dilué au 1/18^{ème}) est mis en présence de 4-nitrophenyl phosphate 1.67 mg.mL⁻¹, dans un volume total de 90 µL tampon citrate 41.7 mM pH 4.8, supplémenté avec 0.16 % de Triton X-100. L'absorbance intermédiaire est lue à 405 nm après 3 minutes, puis on laisse incubé à nouveau 12 minutes. La réaction est ensuite stoppée en ajoutant 125 µL de NaOH 138.7 mM (Cf = 80.6 mM) ; cette basification permet également de révéler le p-nitrophénol produit et on mesure l'absorbance finale à 405 nm. Pour la calibration, une courbe standard de p-nitrophénol (1.56 à 100 µM) est réalisée.

Pour le calcul de l'activité ACP, il faut construire la gamme étalon. Puis calculer les absorbances corrigées pour chaque échantillon :

$$Abs_{corr.} = Abs_{finale} - (Abs_{inter} \times (90/215))$$

Puis on calcule l'activité ACP :

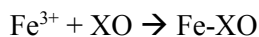
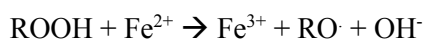
$$ACP (\mu\text{mol.g prot}^{-1}.\text{h}^{-1}) = \frac{\frac{(Abs_{corr} - Abs_{blanc\ corr}) - ORD}{PENTE}}{\frac{t}{[prot]}}$$

Avec (90/215) le rapport des volumes lors des lectures intermédiaire et finale pour correction de l'absorbance due à la turbidité de l'échantillon, ORD et PENTE l'ordonnée à l'origine et le coefficient directeur de la droite d'étalonnage, t le temps d'incubation en h, [prot] la concentration en protéines en g.L⁻¹.

4.2.3. *Hydroperoxydes lipidiques (LOOH)*

La mesure des hydroperoxydes lipidiques (LOOH) dans nos échantillons est basée sur la méthode originale de Jiang et al. (1991) et adaptée à un automate par Arab et Steghens (2004a). Les concentrations finales en réactifs ont cependant été légèrement modifiées. Cette méthode implique l'oxydation des ions ferreux (Fe²⁺) en ions ferriques (Fe³⁺) par les hydroperoxydes à pH acide. Le Fe³⁺ formé est complexé avec du xylénol orange (*o*-cresosulfonephtalein-3,3'-bismethylimino-diacetic acid ; XO), créant un produit violet présentant une absorption maximale entre 550 et 570 nm. Elle est

appelée méthode FOX (pour ferrous oxidation/xylenol orange method ; Arab et Steghens, 2004 ; Bou et al., 2008).



Dans un premier temps, on mélange 25 μL d'échantillon (dilué au 1/5) avec 180 μL de solution de XO 333 mM. On incube durant 3 min et on mesure l'absorbance intermédiaire à 620 nm. Puis on rajoute 45 μL de solution de Fe^{2+} 833 mM, on laisse incuber 20 min (la réaction est totale au bout de 15 min) et on mesure l'absorbance finale à 620 nm (3 fois, 1 fois toutes les 144 sec). Le réactif de dilution pour les solutions de XO et de Fe^{2+} est composé de H_2SO_4 40 mM, glycérol 1.37 mM et d'acide formique 20 mM dans du NaCl 0.9 %. Les concentrations dans le volume final sont les suivantes : 36 mM H_2SO_4 , 1.233 mM glycérol, 18 mM acide formique, 239.76 mM XO et 149.94 mM Fe^{2+} .

La mesure est calibrée avec une gamme de TBH (Tert-butyl hydroperoxyde) (6.25 - 800 μM) dilué dans de l'eau mQ. On construit la droite d'étalonnage du TBH, dont on calcule la pente et l'ordonnée à l'origine. Pour tenir compte de l'absorbance non spécifique de l'échantillon (hausse d'absorbance due à la turbidité de l'échantillon), l'absorbance finale doit être corrigée en retranchant l'absorbance intermédiaire pondérée par le volume introduit au moment de la mesure (205 μL) sur le volume total (250 μL) :

$$\text{Abs}_{\text{éch.corr.}} = \text{moyenne des 3 abs finales} - (\text{abs}_{\text{éch.inter}} \times (205/250))$$

Puis on calcule la concentration en LOOH selon la formule suivante :

$$\text{Concentration en LOOH } (\mu\text{mol TBH.g prot}^{-1}) = \left(\frac{((\text{abs}_{\text{éch.corr.}} - \text{abs}_{\text{blanc corr.}}) - \text{ORD})}{\frac{\text{PENTE}}{[\text{prot}]}} \right)$$

Avec $\text{abs}_{\text{blanc}}$ l'absorbance corrigée du tampon d'homogénéisation, ORD et PENTE l'ordonnée à l'origine et le coefficient directeur de la droite d'étalonnage du TBH, [prot] la concentration en protéines dans l'échantillon en g.L^{-1} .

4.2.4. *Activité du système de transport d'électrons mitochondrial (ETS)*

La mesure de l'activité ETS se fait selon la méthode d'Owens et King (1975), modifiée par De Coen et Janssen (1997). La méthode de base a été mise en place par Packard (1968), qui a montré que l'utilisation du sel de tétrazolium (2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), ou INT, comme accepteur artificiel d'électrons, avec un substrat approprié, permettait la mesure de la consommation d'oxygène. Owens et King ont amélioré cette méthode, notamment par l'ajout de Triton X-100. Le Triton X-100 est un détergent non-ionique qui va solubiliser le formazan, évitant ainsi les

phases d'extractions organiques nécessaires dans les méthodes précédentes. La solubilisation augmente avec la concentration en Triton. Il permet également le suivi spectrophotométrique en continu. Le Triton permet de solubiliser les enzymes membranaires (hydroxylases, deshydrogénases) et les complexes cytochromes (Owens et King, 1975).

L'INT (p-iodonitrotetrazolium) va jouer le rôle d'accepteur final d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale et être réduit, produisant du formazan (INT réduit), qui peut être mesuré spectrophotométriquement à 480 nm.

Le broyat (à raison de 1/35 v/v) est incubé durant 2 minutes avec 15 µM de MgSO₄, 0.16% de Triton X-100, 0.3 g.L⁻¹ PVP (polyvinylpyrrolidone), 1 mM de NADH (nicotinamide adenine dinucleotide) et 0.15 mM de NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) dans du tampon phosphate 80 mM (pH 8.5). Ensuite, on ajoute 0.133 g.L⁻¹ d'INT. On laisse incubé durant 3 minutes, puis on suit l'augmentation de l'absorbance à 480 nm durant 12 min (une mesure toutes les 90 secs soit 9 mesures au total). L'activité ETS est calculée en mesurant la quantité de formazan formée, tout en sachant que pour 2 µmol de formazan formées, 1 µmol d'O₂ est consommée par le système ETS (équivalent oxyenthalpique de 480 kJ/mol d'O₂ ; De Coen et Janssen, 1997).

$$\text{ETS } (\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{g prot}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) = \frac{\left(\frac{(\text{pente éch.} - \text{pente blanc})}{15900} \right) * 1000 * \frac{175}{2} * \frac{60}{2}}{[\text{prot}]}$$

Avec les pentes en min⁻¹, 15900 le coefficient d'extinction de l'INT-formazan (M⁻¹.cm⁻¹), 1 le trajet optique en cm, 1000 le facteur de conversion en mmole, FD le facteur de dilution de l'échantillon (175 µL (volume réactionnel total) / 5 µL (volume d'échantillon) = 35), [prot] la concentration en protéines de l'échantillon (g.L⁻¹), 60 le facteur de conversion des minutes en heures, ½ le facteur de conversion de µmol de formazan en µmol d'O₂.

4.3. Biomarqueurs mesurés sur la fraction cytosolique

4.3.1. Glutathion-S-transférase (GST)

La mesure de l'activité des GST se fait selon la méthode de Habig et al. (1974) par suivi spectrophotométrique à 340 nm de la disparition du CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzène) suite à sa conjugaison avec le GSH (glutathion), grâce à l'activité de la GST (formation de S-2,4 dinitro phenyl glutathion conjugué, qui va provoquer une augmentation de l'absorbance). Cette mesure est réalisée sur la fraction cytosolique et l'utilisation du CDNB permet d'englober l'activité de toutes les isoformes de la GST (Fitzpatrick et al., 1997).

Le milieu réactionnel contient : 1 mM de GSH (réduit), 0.9 mM de CDNB dans du tampon phosphate 65 mM pH 6.5. On ajoute ensuite l'échantillon à raison de 1/40 (v/v) et on réalise la cinétique à 340 nm durant 243 s (1 point toutes les 27 s). A partir des 10 points de mesure, on calcule la pente de

la droite d'augmentation de l'absorbance pour chaque échantillon et pour le blanc (tampon d'homogénéisation). L'activité s'exprime en μmol de CDNB consommé, par g de protéines (ou de poids frais) par minute. Elle est calculée comme suit :

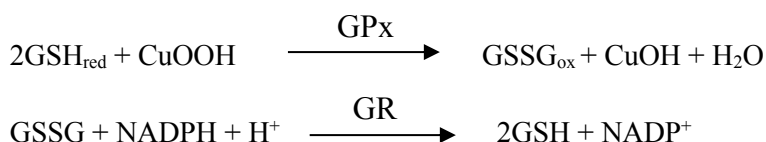
$$\text{GST } (\mu\text{mol CDNB.g prot}^{-1}.\text{min}^{-1}) = \frac{\left(\frac{(\text{pente éch.} - \text{pente blanc}) * 60}{9.6 * 1} \right) * FD * 1000}{[\text{prot}]}$$

Avec les pentes en s^{-1} , x 60 pour la conversion en min^{-1} , 9.6 le coefficient d'absorption molaire du CDNB en $\text{mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, 1 le trajet optique du faisceau en cm, FD le facteur de dilution ($200 \mu\text{L}$ (volume réactionnel total) / $5 \mu\text{L}$ (volume d'échantillon) = 40), [prot] la concentration en protéines dans l'échantillon en g.L^{-1} et 1000 le facteur de conversion des unités.

4.3.2. Glutathion peroxydase (GPx)

La GPx est présente dans le cytosol pour éliminer l' H_2O_2 et les autres hydroperoxydes (ROOH) d'après la réaction suivante : $2\text{GSH}_{\text{red}} + \text{ROOH} = \text{GSSG}_{\text{ox}} + \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$ (Livingstone et al., 1992). La GPx utilise le glutathion comme substrat, et est aussi dépendante de l'activité de la glutathion réductase, qui converti le glutathion oxydé (GSSG) en sa forme réduite (GSH) (Contardo-Jara et al., 2014). L'activité GPx est dépendante du pH et de la température (Livingstone et al., 1992).

La mesure de l'activité GPx se fait selon la méthode de Paglia et Valentine (1967), adaptée par Lawrence et Burk (1976) pour la lecture en microplaque, en suivant à 340 nm la diminution de la concentration en NADPH qui est consommé. La GPx, en réduisant un peroxyde (l'hydroperoxyde de cumène, CuOOH , ici), va oxyder le GSH. Le GSH oxydé (GSSG) va être réduit par la glutathion-réductase (GR), qui parallèlement va oxyder le NADPH.



L'utilisation de l'hydroperoxyde de cumène comme substrat permet de mesurer la somme des activités Se-dépendantes et Se-indépendantes, soit l'activité GPx totale (l' H_2O_2 ne prend en compte que l'activité des GPx Se dépendantes ; Lawrence et Burk, 1976).

Le milieu réactionnel est composé de : 1.125 mM de CuOOH , 0.36 mM de NADPH, 2 mM de GSH, 0.9975 U/mL de GR dans du tampon phosphate 50 mM, auquel on ajoute l'échantillon de fraction cytosolique à raison de 1/10 (v/v). Le suivi cinétique est réalisé à 340 nm durant 126 sec (1 point toutes les 18 sec, soit 8 points au total). L'activité GPx est calculée de la manière suivante :

$$\text{GPx } (\mu\text{mol NADPH.g prot}^{-1}.\text{min}^{-1}) = \frac{\left(\frac{(\text{pente éch.} - \text{pente blanc}) * 60}{6220 * 1} \right) * FD * 10^6}{[\text{prot}]}$$

Avec les pentes en s^{-1} , 60 pour la conversion en min^{-1} , 6220 le coefficient d'absorption molaire du NADPH en $M^{-1}.cm^{-1}$, 1 le trajet optique du faisceau en cm, FD le facteur de dilution ($160 \mu L$ (volume réactionnel total) / $16 \mu L$ (volume d'échantillon) = 10), [prot] la concentration en protéines dans l'échantillon en $g.L^{-1}$ et 10^6 le facteur de conversion des unités.

4.3.3. Mesure de l'activité de la catalase (CAT)

La catalase est présente dans les peroxysomes et réduit l' H_2O_2 en eau selon la réaction suivante : $2H_2O_2 = 2H_2O + O_2$ (Faria et al., 2009 ; Livingstone et al., 1992). La mesure d'une activité de la catalase dans le cytosol serait due à une rupture de la membrane des péroxysomes durant la préparation des différentes fractions subcellulaires (Byczkowski et Gessner, 1988).

L'activité de la catalase est mesurée selon Beers et Sizer (1952), en suivant la diminution de l'absorption de l' H_2O_2 sous UV à 240 nm. La fraction cytosolique est diluée au $\frac{1}{4}$ dans du tampon d'homogénéisation. Puis on 1/10 (v/v) de cette fraction cytosolique diluée dans du tampon phosphate 50 mM pH 7.6 contenant 30 mM d' H_2O_2 . On suit la décomposition du peroxyde d'hydrogène à 240 nm durant 1 min (1 mesure toute les 0.5 sec, soit 121 points). L'activité de la catalase est calculée de la manière suivante :

$$Cat \text{ (mmol } H_2O_2 \cdot g \text{ prot}^{-1} \cdot min^{-1}) = \left(\frac{(-(pente \text{ éch.}) * 60)}{\frac{40 * TO}{[prot]}} \right) * 1000 * FD1 * FD2$$

Avec la pente en s^{-1} , 60 le facteur de conversion en min^{-1} , 40 le coefficient d'extinction de l' H_2O_2 en $M^{-1}.cm^{-1}$, TO le trajet optique en cm, 1000 le facteur de conversion des unités, FD1 le facteur de dilution de la fraction cytosolique ($104 \mu L$ / $26 \mu L$ (volume d'échantillon) = 4), FD2 le facteur de dilution dans le milieu réactionnel ($800 \mu L$ (volume réactionnel total) / $80 \mu L$ (de fraction cytosolique diluée) = 10) et [prot] la concentration en protéines de l'échantillon en $g.L^{-1}$.

4.3.4. Mesure de la capacité antioxydante totale (TAC)

Plusieurs méthodes ont été développées pour mesurer la TAC. Souvent, un type de radical est généré et l'activité antioxydante contre ce radical est mesurée. Les plus courantes sont celles utilisant l'ABTS (2,2'-azinobis-(3(ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)). L'ABTS réduit (incolore) est oxydé en $ABTS^+$ (bleu-vert) ; quand l' $ABTS^+$ est mélangé avec une substance susceptible d'être oxydée, il est réduit en sa forme de départ incolore et l'autre substance est oxydée. L'ABTS réduit peut être oxydé par différents agents oxydants : persulfate de potassium, MnO_2 et ABAP (2,2'-azo-bis(2-aminopropane) parfois un couple H_2O_2 -peroxydase (Erel, 2004). La capacité antioxydante totale est mesurée selon la méthode colorimétrique d'Erel (2004).

L'ABTS réduit est oxydé en $ABTS^{+}$ en utilisant de l' H_2O_2 en milieu acide (tampon acétate 30 mmol.L⁻¹ pH 3.6). Dans ce tampon acétate, les molécules d' $ABTS^{+}$ concentrées (vert profond) restent stables plus longtemps. Les antioxydants présents dans l'échantillon accélèrent le taux de décoloration proportionnellement à leur concentration. Cette réaction peut être évaluée spectrophotométriquement à 660 nm et le taux de décoloration est inversement proportionnel à la TAC de l'échantillon

Dans un premier temps, on mélange 25 µL d'échantillon (dilué au 1/5) avec 180 µL du tampon acétate 0.44 M pH 5.8. On incube durant 4 min et on mesure l'absorbance intermédiaire à 660 nm. Puis on rajoute 20 µL de réactif (ABTS oxydé 10 mM, 2 mM d' H_2O_2 dans du tampon acétate 30 mM pH 3.6), on laisse incuber 345 sec et on mesure l'absorbance finale à 660 nm. Le taux de réaction est calibré avec une gamme de Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) (0.01 – 1.5 mM), un analogue soluble de la vitamine E, dissout dans du tampon phosphate 50 mM pH 7.6. Cela permet de comparer la capacité des antioxydants présents dans l'échantillon avec la capacité antioxydante d'une molécule standard.

Pour tenir compte de l'absorbance non spécifique de l'échantillon, l'absorbance finale doit être corrigée en retranchant l'absorbance intermédiaire pondérée par le volume introduit au moment de la mesure sur le volume total.

$$abs_{corr.éch} = abs_{finale} - (abs_{inter} * \frac{205}{225})$$

On effectue cette correction pour les échantillons, puis on retranche l'absorbance corrigée du blanc (tampon d'homogénéisation seul) à tous les échantillons et on calcule la TAC grâce à la gamme d'étalonnage de Trolox, puis on divise par le temps de suivi (345 sec) exprimé en min. Les résultats sont exprimés en µmol d'équivalent Trolox (Teq) par g de protéines par minute.

$$TAC (\mu mol \text{ Teq.g prot}^{-1}.min^{-1}) = \frac{\left(\frac{((abs_{corr.blanc} - abs_{corr.éch}) - ORD)}{\frac{PENTE}{\frac{342}{60}}} \right) * 1000}{[prot]}$$

Avec ORD et PENTE l'ordonnée à l'origine (sans unité) et la pente (en mM) de la gamme de Trolox, 342/60 le temps d'incubation rapporté en min⁻¹, 1000 le facteur de conversion des unités, [prot] la concentration en protéines dans l'échantillon en g.L⁻¹.

4.3.5. Activité des caspases (Csp)

La première méthode colorimétrique utilisée ici se base sur un térapeptide synthétique, Asp-Glu-Val-Asp (DEVD), qui est un site consensus de clivage par les caspases 3, 1, 4 et 7. Le DEVD est couplé à un chromophore, le pNA (p-nitroanilide). L'activité des caspases est mesurée au

spectrophotomètre par détection du pNA qui aura été clivé du DEVD, et qui absorbe à 405 nm. Cette mesure se fait sur la fraction cytosolique.

On met en présence l'échantillon à raison d'1/7 (v/v) et 23.21 µM de DEVD-pNA, 4.64 mM DTT, 1.86 mM d'EDTA dans du tampon TRIS 9.57 mM pH 7.4 et on réalise un suivi cinétique à 405 nm pendant 60 min (à raison de 1 point toutes les 324 s, soit 12 points au final). A partir des 12 points de mesure, on calcule la droite d'augmentation linéaire de l'absorbance pour chaque échantillon et pour le blanc (tampon d'homogénéisation), et on calcule l'activité de la manière suivante :

$$\text{Csp } (\mu\text{mol pNA.g prot}^{-1}.\text{h}^{-1}) = \frac{\left(\frac{(\text{pente éch.} - \text{pente blanc}) * 3600}{10500 * 1} \right) * FD * 1000000}{[\text{prot}]}$$

Avec les pentes en h⁻¹, 10500 le coefficient d'absorption du pNA (M⁻¹.cm⁻¹) à 405 nm, 1 le trajet optique en cm, 10⁶ le facteur de conversion de mol.L⁻¹ en µmol.L⁻¹ (à passer ensuite en nmol.mL⁻¹), FD le facteur de dilution de l'échantillon lors de l'essai (140 µL (volume réactionnel total) / 20 µL (volume d'échantillon) = 7), et [prot] la concentration en protéines dans l'échantillon en g.L⁻¹.

Pour la deuxième méthode, le DEVD est couplé à un autre fluorochrome l'AFC (7-amino-4-trifluoromethylcoumarin). L'activité des caspases est mesurée en microplaque à fond noir au fluorimètre SAFAS par détection de l'AFC qui aura été clivé du DEVD (émission 400 nm ; excitation 505 nm). Une gamme d'AFC est réalisée en parallèle. Pour 20 µL d'échantillon, 120 µL de réactif (5.4·10⁻³ M de DDT, 2.2·10⁻³ M EDTA, 1.1·10⁻² de tampon Tris pH 7.4, 20 mM de DEVD-AFC) sont ajoutés.

$$\begin{aligned} &\text{Csp } (\mu\text{mol AFC.g prot}^{-1}.\text{h}^{-1}) \\ &= \frac{\left(\frac{[((\text{pente éch.} - \text{pente blanc}) * 60) + (\text{ord. éch.} - \text{ord blanc})] - \text{ord gamme}}{(\text{pente gamme})} \right) * FD}{[\text{prot}]} \end{aligned}$$

Avec les pentes en h⁻¹ (x 60), FD le facteur de dilution de l'échantillon lors de l'essai (140 µL (volume réactionnel total) / 20 µL (volume d'échantillon) = 7), et [prot] la concentration en protéines dans l'échantillon en g.L⁻¹.

4.3.6. Activité de la lactate déshydrogénase (LDH)

La mesure de l'activité LDH dans nos échantillons se fait grâce à un réactif prêt à l'emploi (Thermo Scientific, Kit LDH IFCC ref. 981782). Ce réactif est utilisé pour la quantification *in vitro* de la LDH dans le sérum humain. La mesure se fait sur la fraction cytosolique de la glande digestive (S20 000).



Réactif A : methyl-D-glucamine (405 mmol.L⁻¹), lactate de lithium (63 mmol.L⁻¹), NaN₃ (<0.1%)

Réactif B : NAD (50 mmol.L⁻¹), NaN₃ (<0.1%)

On met 100µL de réactif LDH IFCC A + 15µL d'échantillon. Incubation 300s. Ajouter 25µL de réactif LDH IFCC B. Incubation 120s. Suivi à 340 nm durant 243s (10 points ; 1 point toutes les 27s). A partir des 10 points de mesure, on calcule la pente de la droite d'augmentation linéaire de l'absorbance pour chaque échantillon et pour le blanc TPO4+PMSF, et on calcule l'activité LDH :

$$\text{Activité LDH } (\mu\text{mol NADH.g prot}^{-1}.\text{h}^{-1}) = \frac{\frac{(\text{pente ech} - \text{pente blanc}) * 10^6 * FD}{(6220 * 1)}}{[\text{protéines}]}$$

Avec les pentes en h⁻¹ (x 3600 pour convertir les secondes en heures), 6220 = coefficient d'extinction du NADH en M⁻¹.cm⁻¹ à 340nm, 1 = le trajet optique en cm, 10⁶ le facteur de conversion de mole.L⁻¹ en µmole.L⁻¹ (à passer ensuite en nmol.mL⁻¹), FD le facteur de dilution de l'échantillon lors de l'essai et [protéines] la concentration en protéines dans la FC en g.L⁻¹.

4.4. Autres biomarqueurs

Au-delà de ces biomarqueurs mesurés sur la glande digestive, des paramètres plus intégrateurs ont également été quantifiés sur les organismes entiers.

4.4.1. Taux de filtration

Pour la mesure du taux de filtration, les moules sont placées individuellement dans 50 mL d'une solution de rouge neutre à 5 mg.L⁻¹, dans le noir. Les siphons sont orientés vers le centre, pour éviter leur obstruction. Après 2 h, les organismes sont retirés et la solution de rouge neutre est acidifiée à pH 5 avec de l'HCl à 37%, puis agitée.



Figure 24 : Différentes étapes de la mesure de l'activité de filtration

L'absorbance est lue à 530 nm et la concentration en rouge neutre est calculée grâce à une courbe d'étalonnage. Le taux de filtration (f) est ensuite calculé d'après la formule de Coughlan (1969) :

$$f \text{ (mL.moule}^{-1}.\text{h}^{-1}) = \left(\frac{V}{n * t} \right) * \log \left(\frac{C_0}{C_t} \right)$$

Avec V le volume de solution de rouge neutre, n le nombre d'individus mis dans la solution, t le temps (en h) et C₀ et C_t les concentrations initiale et finale en rouge neutre.

4.4.2. L'activité MXR

La méthode fonctionnelle utilisée pour mettre en évidence l'activité MXR est appelée méthode d'accumulation. Les organismes sont exposés à un substrat fluorescent rose, la Rhodamine B (5 μ M), à raison de 50 mL par individu durant 4 h. Les organismes sont ensuite rincés, leurs branchies disséquées, pesées après élimination de l'excédent d'eau, et congelées à -80 °C.

L'accumulation de ce substrat dans les branchies est mesurée par fluorimétrie, sur une microplaque à fond noir avec un spectrofluorimètre Safas Xenius (Monaco). Après décongélation, les branchies ont été broyées sur glace, dans un Potter en verre de 3mL, dans de l'eau déminéralisée à raison d'un ratio masse (mg)/volume (μ L) de 10, pendant 1 minute. Les broyats sont ensuite centrifugés à 10 000 x g, 10 min, à 4°C. La fluorescence est mesurée dans 200 μ L de surnageant. Une gamme de Rhodamine B (0 – 0,25 – 0,5 – 0,75 – 1 – 2 μ M) est également lue dans le même temps (ex.550 nm, em. 575 nm). Pour chaque échantillon, la fluorescence est rapportée à la quantité de protéines totales dans le surnageant, évaluée par la méthode de Bradford (1976 ; Biorad Quick Start BSA Standard Set pour la gamme). Tous les résultats sont alors exprimés en pmol de RB (accumulée dans les branchies)/mg de protéines.

La même mesure est réalisée en présence d'un inhibiteur du MXR, le Vérapamil, utilisé à concentration saturante (30 μ M). La quantité de substrat accumulée est inversement proportionnelle à l'activité MXR et la différence entre les conditions avec et sans inhibiteur donne une mesure de cette activité (Figure 25). Toutes les manipulations de milieu ou d'échantillons contenant de la rhodamine B ont été faites à l'obscurité ou au moins à l'abri de la lumière directe (Kurelec et al., 2000).

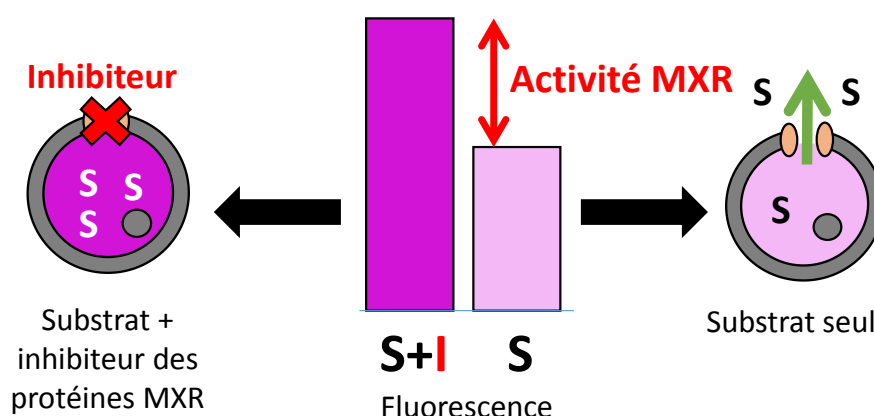


Figure 25 : Représentation schématique de la mesure de l'activité MXR

4.4.3. Indice de condition

L'indice de condition (IC) est calculé après avoir mesuré la longueur, la largeur et la hauteur (en mm, Figure 26) de chaque individu avec un pied à coulisse électronique (Powerfix IAN 30563,

précision 0.01mm) et pesé le poids frais de ses tissus mous (sans le byssus, en mg), selon la formule suivante (Guerlet et al., 2010) :

$$IC \text{ (mg.mm}^{-3}\text{)} = \frac{\text{poids frais}}{\text{longueur} * \text{largeur} * \text{hauteur}}$$

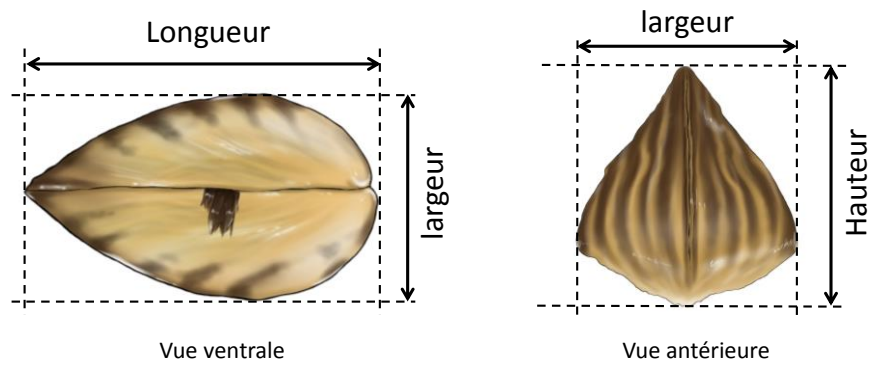


Figure 26 : Mesures pour le calcul de l'indice de condition (© Florian Lamousse)

Partie IV : Démarche d'analyse des données

La question principale à laquelle nous cherchons à répondre est le potentiel des biomarqueurs, chez *Dreissena* sp, à constituer un outil de biosurveillance passive. Nous verrons dans la suite du manuscrit que les résultats acquis pour tenter d'y répondre ont abouti à l'acquisition de jeux de données complexes, notamment suite à l'exposition des organismes à des stress multiples en laboratoire, et à la mesure de plusieurs biomarqueurs pour chaque individu. Nous avons donc principalement opté pour deux stratégies d'analyse de ces données.

La première, plutôt classique, consistait en l'utilisation de tests statistiques paramétriques (tests t de Student, ANOVA) ou non paramétriques (Mann-Withney, Kruskal-Wallis), avec une évaluation préalable de la normalité (Shapiro) et de l'homoscédasticité des données (Bartlett, Levene). Ces tests étaient généralement suivis de tests post-hoc permettant de comparer les groupes expérimentaux 2 à 2 (Tukey HSD, Kruskal MC). Des MANOVA (Multivariate ANOVA) ont aussi été réalisées lorsque nous voulions intégrer un ensemble de variables au sein d'une analyse unique (biomarqueurs principalement).

La seconde stratégie d'analyse, plus complexe et plus graphique, nous a permis d'évaluer l'effet de plusieurs facteurs sur l'ensemble des réponses biologiques mesurées sous formes d'analyses multivariées (ou analyses factorielles). Ce type d'analyses permet la représentation synthétique de l'information contenue dans plusieurs variables, en construisant de nouvelles variables synthétiques. Des analyses non supervisées (Analyses en Composantes Principales, ACP) ont été réalisées, pour lesquelles les groupes, bien que connus *a priori* (chaque individu appartient à un groupe, une condition expérimentale connue), ne participent pas explicitement à la construction du modèle. L'ACP fournit alors une représentation neutre des groupes et de leurs positions relatives dans l'espace multivarié. Dans certaines situations, des analyses supervisées s'avéraient plus pertinentes : dans ce cas, l'appartenance de chaque individu à un groupe donné est une information qui structure la construction du modèle, dont l'objectif est alors de séparer au mieux les groupes sur la base des réponses individuelles obtenues au sein de chaque groupe. Suivant la structure du jeu de données, deux types d'analyses supervisées peuvent être employées :

- lorsque les variables explicatives ne sont pas corrélées, et que le nombre d'individus dans chaque groupe est supérieur aux nombre de variables mesurées, on utilise l'analyse discriminante linéaire (LDA, Linear Discriminant Analysis)
- si les variables sont corrélées et/ou que le nombre de variables dépasse le nombre d'individus dans chaque groupe, on utilise l'analyse discriminante par les moindres carrés partiels (PLSDA, Partial Least Square Discriminant Analysis).

Ces analyses factorielles, souvent réputées pour ne fournir qu'un support graphique, permettent de sélectionner, voire de hiérarchiser les variables (les biomarqueurs par exemple) en fonction de leur importance dans la séparation des groupes. Par ailleurs, pour confirmer les différences inter-groupes,

nous nous sommes appuyés sur le test T^2 de Hotelling, une généralisation du test de Student à plusieurs dimensions ; les p -valeurs étaient systématiquement corrigées par la méthode de Benjamini et Hochberg.

Ces analyses ont été réalisées avec le logiciel R (version 3.3.0). Un seuil de $p \leq 0.05$ était considéré comme significatif.

D'autres outils ont été utilisés ponctuellement, comme des analyses de co-inertie, des régressions linéaires simples et multiples, des régressions PLS (logiciel Tanagra, v1.4), des réseaux de corrélations. Ils seront présentés plus en détail dans les parties concernées.

Note : avant de passer aux chapitres suivants, il convient de préciser que la plupart des résultats présentés dans les Chapitres 3 à 5 seront mis en regard dans la discussion générale (Chapitre 6). Certains points, spécifiques à certaines expérimentations, seront discutés dans les parties correspondantes et ne seront pas repris dans la discussion générale.

Chapitre 3 : Variabilité des biomarqueurs *in situ*

Ce chapitre regroupe l'ensemble des données obtenues lors des différentes campagnes de biosurveillance passive sur les différentes populations de nos deux espèces modèles. Le but est d'étudier les réponses des biomarqueurs en fonction des variations saisonnières, journalières et des facteurs environnementaux (paramètres physico-chimiques et contamination des milieux) afin d'identifier les déterminants de la variabilité des réponses des biomarqueurs *in situ* et quels facteurs environnementaux pourraient entraîner une mauvaise lecture des réponses biologiques. Ce chapitre cherche également à décrire et comprendre la variabilité des réponses observées entre les deux espèces, et entre les différentes populations.

Partie I : Description du jeu de données

Les sites échantillonnés dans le cadre de la convention BIOMICS ont été présentés précédemment. Leur caractérisation physico-chimique n'a pas été effectuée à chaque campagne, et les biomarqueurs n'ont pas non plus pu être mesurés sur chaque site et lors des 4 campagnes d'échantillonnage, faute de disponibilité suffisante en organismes.

Le Tableau VIII résume les paramètres mesurés pour chaque population. De ce tableau découle la stratégie d'analyse des données, le jeu de données conséquent étant subdivisé en fonction de la question à laquelle nous cherchons à répondre.

Tableau VIII : Plan d'échantillonnage des différentes populations de *D. polymorpha* et *D. r. bugensis* *in situ*. Les cellules en gris représentent les données collectées dans le cadre de la convention BIOMICS. On distinguera ici les deux populations de *D. polymorpha* présentant des morphologies distinctes sur le site de Condé (Condé 1 : longueur standard ; Condé 2 : longueur supérieure à 3.5 cm)

		Avril 2015		Octobre 2015				Avril 2016				Février 2017				
		Biomarqueurs	Indice de condition	Biomarqueurs	Indice de condition	Contamination des sédiments	Chimie de l'eau	Biomarqueurs	Indice de condition	Contamination des sédiments	Chimie de l'eau	Biomarqueurs	Indice de condition	Bioaccumulation	Contamination des sédiments	Chimie de l'eau
Espèce	Site															
<i>D. r. bugensis</i>	Courcelles															
	Jouy															
	Liverdun															
	Montigny - Canal de Jouy															
	Montigny - Canal de Metz															
	Oise															
	Seurre															
<i>D. polymorpha</i>	Saint-Mihiel															
	Condé 1															
	Condé 2															
	Liverdun															
	Madine															
	Montigny - Canal de Jouy															
	Nantua															
	Oise															
	Riaucourt															
	Scey															
	Seurre															
	Saint-Mihiel															

Sur la base de ce bilan, nous traiterons les données de la façon suivante :

- la variabilité saisonnière sera étudiée séparément pour les deux espèces, sur les sites où nous disposons de suffisamment d'informations sur les différentes saisons
- la variation journalière, non représentée dans ce tableau, a été étudiée sur le site de Montigny – Canal de Metz pour *D. r. bugensis*, et de Montigny – Canal de Jouy pour *D. polymorpha* et les résultats sont présentés sous la forme d'une publication.
- la variabilité inter-spécifique sera étudiée sur avril 2016 et février 2017, puisque ce sont à ces dates que le plus de sites ont été échantillonnés. Un focus sur Montigny – Canal de Jouy, l'Oise et Saint-Mihiel en avril 2016 sera fait, dans la mesure où les 2 espèces coexistent sur ces trois sites

- la variabilité inter-populationnelle au sein de chaque espèce sera étudiée en octobre 2015 et en février 2017

La dernière partie aura pour but de mettre en relation les réponses des biomarqueurs avec l'accumulation des contaminants dans les organismes et la contamination des sédiments.

Partie II : Variabilité temporelle des biomarqueurs

1. Echelle saisonnière

La variabilité saisonnière de la physiologie des organismes est un mécanisme bien connu, lié notamment au cycle reproducteur, à la température et à la disponibilité des ressources. Néanmoins, dans une optique de biosurveillance, ce qui nous intéresse ici n'est pas la variation en valeur absolue des réponses biologiques en fonction de la saison, mais la stabilité des patrons de réponse. Pour résumer, les réponses biologiques que nous mesurons sont-elles toutes modifiées de la même façon par le facteur saisonnier, auquel cas ce facteur peut-il être considéré comme peu ou pas structurant pour le diagnostic ? Dans le cas contraire, il sera nécessaire de comprendre les modifications physiologiques induites par ce facteur.

1.1 Chez *D. polymorpha*

Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur la réponse de *D. polymorpha* aux 4 dates d'échantillonnage sur les sites de Montigny, Nantua, Riaucourt, Scey et St Mihiel. Une première analyse réalisée sans prendre en compte le facteur « site » met en évidence le gradient de réponse en fonction de la saison (Figure 27). Deux points importants ressortent de cette première analyse : d'une part, en hiver (février 2017), la taille de l'ellipse est très réduite par rapport aux autres saisons, ce qui illustre une diminution de la variabilité inter-populationnelle à ce moment. Nous le reverrons plus tard, d'autres analyses confirment que l'hiver n'est pas une saison à privilégier pour le déploiement des biomarqueurs.

L'autre fait marquant est la variabilité inter-annuelle : en effet, les 2 ellipses d'avril 2015 et 2016 ne se superposent pas du tout. Pour établir des valeurs de référence pour les biomarqueurs, les études s'appuient généralement sur une modélisation de l'influence de facteurs environnementaux sur les valeurs mesurées (température, conductivité, oxygénation...), qui sont fortement reliés aux cycles saisonniers. La divergence des réponses entre les mois d'avril de deux années successives, aux conditions climatiques globalement similaires, pointe une potentielle difficulté à établir des valeurs de référence pour les biomarqueurs chez la dreissène. Pour ces conditions, le partitionnement de la variance indique que la date et le site expliquent respectivement 26 et 10% de la variabilité observée, avec 65% de variance inexpliquée.

Le cercle des corrélations associé à cette ACP révèle que les réserves énergétiques (protéines, triglycérides, cholestérol) sont plus élevées en avril que pour les mois plus froids. En effet, en octobre et en février, le métabolisme énergétique est plus important, tout comme l'activité des marqueurs de défense (GST, TAC).

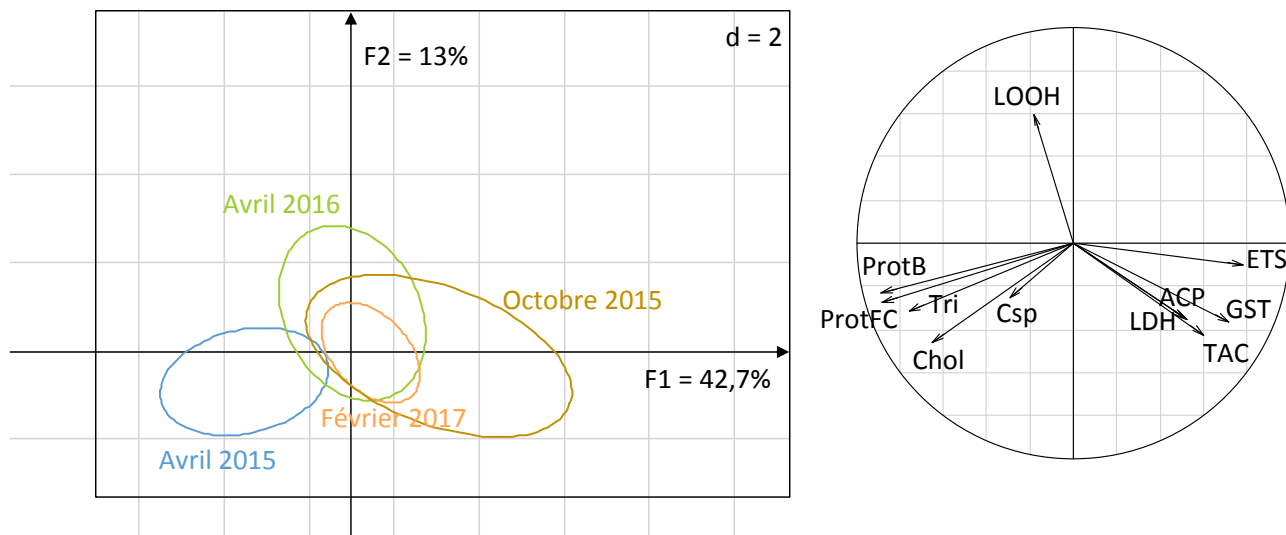


Figure 27 : Variabilité temporelle des biomarqueurs chez *D. polymorpha* pour les 4 dates d'échantillonnage pour les sites de Montigny, Nantua, Riaucourt, Scey et St Mihiel. Plan factoriel F1F2 de l'analyse du tableau individus x biomarqueurs (240 lignes x 11 colonnes) et cercle des corrélations associé

Dans un second temps, nous avons scindé le jeu de données en fonction de la saison. Des ACP ont été réalisées indépendamment à chaque saison, puis l'analyse de la co-structure a été réalisée par une analyse de co-inertie²⁵. Tous les croisements entre 2 saisons ont été étudiés. Il ressort de cette analyse que, malgré les différences entre saisons mises en évidence précédemment, la co-structure est toujours significative (Tableau IX), les patrons de réponses sont donc stables d'une saison à l'autre.

Tableau IX : p-valeurs des différentes analyses de co-inertie des ACP individus x biomarqueurs réalisées pour chaque saison pour les différentes populations de *D. polymorpha*. Les probabilités indiquées correspondent aux résultats des tests de Monte-Carlo réalisés sur la co-structure

	Avril 2015	Octobre 2015	Avril 2016	Février 2017
Avril 2015		0.023	0.013	0.006
Octobre 2015			0.001	0.001
Avril 2016				0.001
Février 2017				

Les mêmes analyses ont été reconduites, uniquement pour 3 dates (octobre 2015, avril 2016 et février 2017), pour lesquelles nous disposons d'un plus grand nombre de sites (Condé, Madine, Montigny, Nantua, Oise, Riaucourt, Scey, St Mihiel ; Figure 28). Les mêmes tendances que précédemment sont retrouvées, mais cette fois le partitionnement de la variance indique que la date et le site expliquent respectivement 21 et 18% de la variabilité observée, avec 62% de variance inexpliquée. Les analyses de co-inertie indiquent là encore que les patrons de réponses sont stables d'une saison à l'autre, même si l'on considère ici un plus grand nombre de sites (octobre/février : $p = 0.001$; octobre/avril : $p = 0.001$; février/avril : $p = 0.006$).

²⁵ Les analyses de co-inertie sont basées sur le croisement de 2 ACP contenant le même nombre de lignes. Elles sont réalisées à l'aide de la fonction « coinertia » du package ade4. Un test de Monte-Carlo (fonction « randtest ») permet ensuite de déterminer si la co-inertie est significative, c'est à dire s'il existe une structure commune aux 2 jeux de données

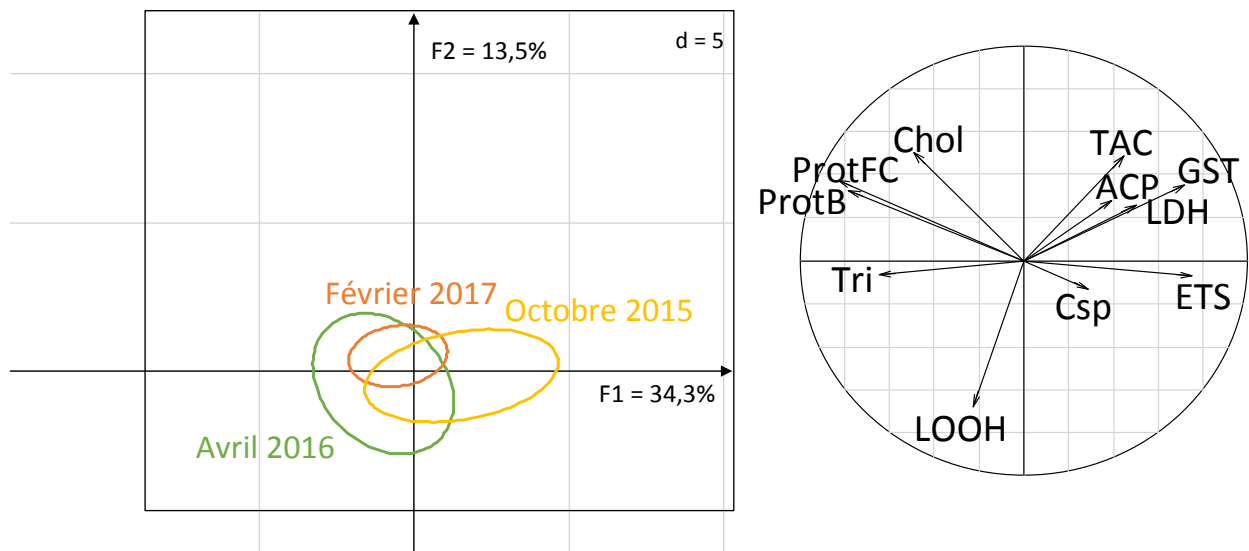


Figure 28 : Variabilité temporelle des biomarqueurs chez *D. polymorpha* pour 3 dates d'échantillonnage (octobre 2015, avril 2016, février 2017) pour les sites de Condé, Madine, Montigny, Nantua, Oise, Riaucourt, Scey, St Mihiel. Plan factoriel F1F2 de l'analyse du tableau individus x biomarqueurs (288 lignes x 11 colonnes) et cercle des corrélations associé

1.2 Chez *D. r. bugensis*

Les mêmes analyses ont été réalisées pour *D. r. bugensis*. Dans un premier temps, pour voir si le phénomène d'inter-annualité était aussi présent chez cette espèce, une ACP a été réalisée sur 2 populations (Seurre et St Mihiel) pour lesquelles on disposait de données en avril 2015, octobre 2015 et avril 2016 (Figure 29). Pour ces conditions, le partitionnement de la variance indique que la date et le site expliquent respectivement 25 et 0% de la variabilité observée, avec 75% de variance inexpliquée.

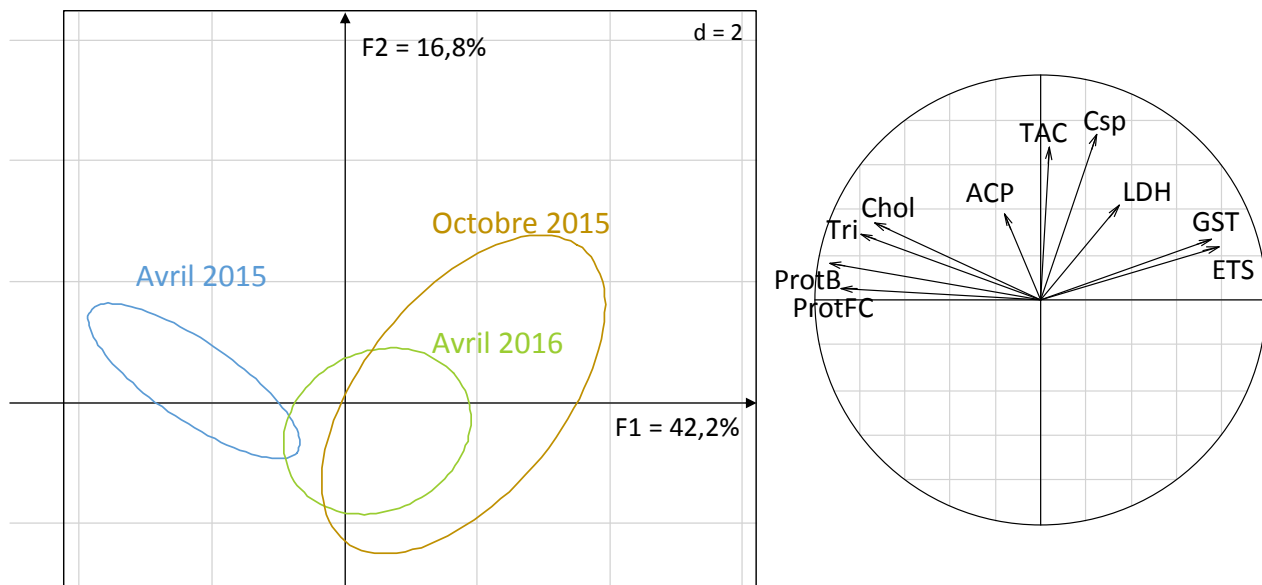


Figure 29 : Variabilité temporelle des biomarqueurs chez *D. r. bugensis* pour 3 dates d'échantillonnage (avril 2015, octobre 2015, avril 2016) pour les sites de Seurre et St Mihiel. Plan factoriel F1F2 de l'analyse du tableau individus x biomarqueurs (72 lignes x 10 colonnes) et cercle des corrélations associé

Les analyses de co-inertie ont aussi été réalisées et mettent en évidence pour cette espèce une absence de co-structure, indiquant que chez *D. r. bugensis* les patrons de réponse ne sont pas stables d'une saison à l'autre (Tableau X).

Tableau X : p valeurs des différentes analyses de co-inertie des ACP individus x biomarqueurs réalisées pour 3 saisons pour deux populations de *D. r. bugensis*. Les probabilités indiquées correspondent aux résultats des tests de Monte-Carlo réalisés sur la co-structure

	Avril 2015	Octobre 2015	Avril 2016
Avril 2015		0.159	0.185
Octobre 2015			0.642
Avril 2016			

En revanche, l'analyse réalisée sur les autres dates (octobre 2015, avril 2016 et février 2017) pour les populations échantillonnées (Courcelles, Jouy, Liverdun, Montigny et Seurre) atteste de la présence d'une co-structure (Figure 30). On peut donc en déduire que les données d'avril 2015 sont particulières. L'analyse des ACP met ainsi en évidence, quelle que soit l'espèce, des valeurs particulièrement élevées des réserves énergétiques. Cette instabilité des réponses, à saison constante, suggère d'une part la nécessité d'acquérir des informations sur le long terme sur les populations étudiées, pour identifier des modifications ponctuelles des réponses biologiques, ou au contraire des tendances temporelles, et d'autre part de collecter systématiquement les données relatives à l'environnement pour être en mesure de construire une grille d'interprétation intégrant les facteurs du milieu à l'instant t, et qu'en intégrant un plus grand nombre de sites dans le jeu de données on obtient des patrons de réponse stables d'une saison à l'autre. Pour ces conditions, le partitionnement de la variance indique que la date et le site expliquent respectivement 18 et 14% de la variabilité observée, avec 69% de variance inexpliquée.

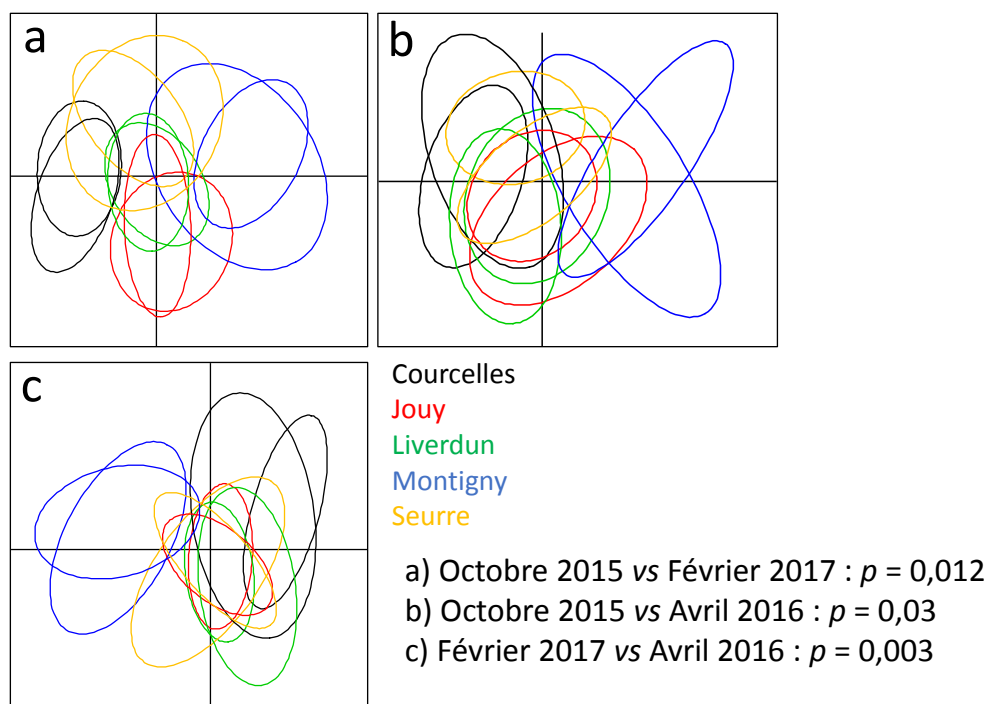


Figure 30 : Plans factoriels de trois analyses de co-inertie des ACP individus x biomarqueurs réalisées pour *D. r. bugensis* en octobre 2015, avril 2016 et février 2017. Seules les ellipses sont représentées. Les probabilités indiquées sur la figure correspondent aux résultats des tests de Monte-Carlo réalisés sur la co-structure

2. Echelle journalière (publication n°1)

La variabilité temporelle, lorsqu'elle est prise en compte dans les études en écotoxicologie, se focalise toujours sur les variations saisonnières. Cette première approche est naturelle, dans le sens où la plupart des processus physiologiques interagissant avec les biomarqueurs sont eux même calqués sur des cycles saisonniers. Cependant, il nous a semblé essentiel de s'intéresser également à de potentielles variations à l'échelle du cycle circadien (la disponibilité en nourriture pouvant suivre par exemple un tel cycle avec les migrations planctoniques dans la colonne d'eau). Cette donnée est essentielle dans le cadre d'un réseau de surveillance, puisque tous les échantillons ne peuvent pas être collectés simultanément. Si l'heure de prélèvement influence les niveaux des biomarqueurs, cela peut être problématique dans l'établissement d'un diagnostic environnemental fiable. Pour étudier ce point, nous avons mesuré l'ensemble de notre batterie de biomarqueurs chez les deux espèces *in situ* pendant 24 h.

Les deux populations étudiées sont celles de Montigny – Canal de Metz (pour *D. r. bugensis*) et de Montigny – Canal de Jouy (pour *D. polymorpha*). Quelques jours avant le début de l'expérience, des individus ont été prélevés au sein de chaque population et mis en panier, toujours sur leur site d'origine. Les paniers ont ensuite été prélevés, à raison d'un échantillon de 12 individus toutes les 2 heures pendant 24 h, de 10 h du matin (J0) à 8 h du matin (J1). Des mesures de température et de luminosité ont été prises en continu, et les mesures de paramètres physico-chimiques ont également été réalisées toutes les deux heures.

L'analyse des données obtenues suite à ce suivi de 24 h ne révèle aucune variation journalière pour les biomarqueurs mesurés, à cette période de l'année (novembre). Parmi les paramètres physico-chimiques mesurés, la luminosité est le seul paramètre avec des variations importantes, mais aucun lien n'a pu être établi avec les réponses des biomarqueurs. Toutefois, la différence inter-spécifique d'expression des biomarqueurs est là encore observable. Ces résultats impliquent que dans un but de biosurveillance, l'heure de prélèvement (à cette période de l'année) n'est pas déterminante, contrairement à l'identification de l'espèce.

INVESTIGATING CIRCADIAN RHYTHMS IN BIOMARKER RESPONSES, A KEY CHALLENGE FOR BIOMONITORING

Marine Potet, Simon Devin, Laure Giambérini, Romain Péden, Carole Bertrand, Sandrine Pain-Devin.

Abstract

Temporal variability of biomarker responses, when taken into account in ecotoxicology studies, always focuses on seasonal variations since most physiological processes interacting with biomarkers are themselves slammed into seasonal cycles. However, it is essential in a monitoring network covering a large geographical area to also focus on potential variations in the circadian cycle, since not all samples can be collected simultaneously. If the time of sampling influences the levels of biological responses, this can be problematic in establishing a reliable environmental diagnosis. This study reports for the first time *in situ* daily variations in sub-cellular biomarker responses for a well-known freshwater biomonitor, the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, and for its recently-arrived conspecific, the quagga mussel, *Dreissena rostriformis bugensis*. Biomarker responses were monitored every two hours during a 24 h experiment, along with physico-chemical parameters. Results indicate no daily variation in biomarker responses for dreissenids in late autumn, but strong inter-specific differences for most biomarkers measured. For biomonitoring purpose, this implies that one must mostly pay attention to the species used, rather than to sampling time.

Keywords

Dreissena, biomarker responses, circadian cycles, biomonitoring

Introduction

The zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) is a widespread invasive bivalve species, commonly found in freshwaters of the northern hemisphere (Karatayev et al., 2012). It is a sedentary filter-feeder, able to tolerate a wide range of environmental contaminants. It is thus currently used in biomonitoring programs, to evaluate both the presence of contaminants through bioaccumulation measurements (Bourgeault et al., 2011; Mills et al., 1993), and their effects through the use of biomarkers, either in the field (Faria et al., 2014; Guerlet et al., 2007; Palais et al., 2012) or in laboratory (Garaud et al., 2016; Magni et al., 2017). This species has recently been considered as the freshwater counterpart to *Mytilus edulis* (Binelli et al., 2015). However in the last few decades, *D. polymorpha* populations have been declining all over the world, and are being replaced by a sister-species, the quagga mussel *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov, 1897) (Nalepa et al., 2010; Matthews et al., 2014; Heiler et al., 2013; Marescaux et al., 2015). The two species have been largely studied and exhibit different anatomical and physiological features (e.g. morphology (Claudi and Mackie, 1994), feeding and growth (Baldwin et al., 2002; Karatayev et al., 2011), reproduction (Claxton and Mackie, 1998), environmental requirements (Jones and Ricciardi, 2005; Karatayev et al., 2015; Ram et al., 2012), bioaccumulation capacities (Matthews et al., 2015; Richman and Somers, 2005; Schäfer et al., 2012)).

If these species are to be used in biomonitoring, several locks must be lifted. First, in case of a dominance shift, the potential use of *D. r. bugensis* as a biomonitor must be investigated. But for now, studies comparing biomarker responses between the two species are very scarce, and few data are available concerning the responses of *D. r. bugensis* to contamination (Farkas et al., 2017; Potet et al., 2016; Schäfer et al., 2012). Second, their biological rhythms, and the associated variations in biomarker

responses, need to be better understood. Indeed, biological rhythms govern behavior and metabolic and physiological functions of living organisms (Bell-Pedersen et al., 2005; Dunlap, 1999; Panda and Hogenesch, 2004) by maximizing their fitness in relation to their environment (Emerson et al., 2008). Biological rhythms necessitate a complex coordination of molecular, cellular and tissue processes, and variations in behavior and physiology are regulated at the molecular and cellular levels (Bell-Pedersen et al., 2005; Panda and Hogenesch, 2004). This rhythmicity is also dependent on external factors such as light and food availability (Tran et al., 2011). It is mainly influenced by the day/night alternation, which drives many processes such as feeding. Indeed, variations in feeding behavior, digestive enzyme activities and nutrient assimilation efficiency have been evidenced in relation to circadian cycle (Ceccaldi, 1998; Hawkins et al., 1983).

Literature have often focused on biological rhythms for marine species (see reviews by Naylor, 2010 and Palmer, 1995), because they are submitted to both circadian and circatidal cycles, with a strong influence of solar, lunar and tidal cycles (Kim et al., 2003; Last et al., 2009). For example, daily rhythms have been reported for *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica* (Brown et al., 1956), *Mytilus galloprovincialis* (Gnyubkin, 2010) and *Mytilus edulis* (Ameyaw-Akumfi and Naylor, 1987) ; these studies concerning bivalves often focus on valve opening. In freshwaters, the influence of such cycles have less been studied, but valve opening in relation to daily cycle have been evidenced for *D. polymorpha* in the context of the Musselmonitor® (Kramer and Foekema, 2001) and Dreissena-Monitor® (Borcherding, 2006). Some authors have shown diurnal variations in valve movements for *D. polymorpha*, especially in spring and summer, with more closed mussels in the morning compared to late afternoon (Anon, 1998 in Kramer and Foekema, 2001), whereas others hardly find a daily pattern, depending on the device used to measure valve gaping (Kramer and Foekema, 2001).

The development of molecular technologies enables to go deeper in the understanding of these processes, which are initiated at the molecular level. The influence of circadian cycles on gene expression has been shown for several marine species (Connor and Gracey, 2011; Tran et al., 2015), thus subsequent variations in biochemical processes within cells should be expected. However, information at intermediate levels such as cellular and biochemical biomarkers is lacking. Temporal variability, when taken into account in ecotoxicology studies, always focuses on seasonal variations (Faria et al., 2014; Farkas et al., 2017). This first approach is natural, in the sense that most physiological processes interacting with biomarkers are themselves slammed into seasonal cycles. However, it is time to also focus on potential variations in the circadian cycle. This is essential in a monitoring network particularly covering a large geographical scale, since not all samples can be collected simultaneously. If the time of sampling influences the levels of biomarkers, this can be problematic in establishing a reliable environmental diagnosis.

In order to test the influence of circadian cycles on biomarker responses, we measured a battery of biomarkers in both species *in situ*, every two hours during 24 h. Sub-cellular biomarkers, such as enzymatic activities and energy reserves, have been targeted since they are currently used as tools in biomonitoring but the influence of circadian cycle on their responses is relatively unknown. Some physico-chemical parameters and chlorophyll *a* concentrations were also monitored along the experiment. Despite the differences in biomarker responses observed between the two species, we were able to demonstrate the absence of influence of the daily cycle on measured biomarkers. The slight variations observed for some biomarkers could not be related to variations in physico-chemical parameters. The implications of these findings for the use of these species in biomonitoring are thus discussed.

Material and methods

1. Mussels sampling and caging

Organisms were hand-collected in November 2016 by section of their byssus, in two different but close waterways located in Montigny-lès-Metz, France. Individuals of *D. polymorpha* (26.7 ± 2.4 mm in length) were sampled on waterway 1 (E06°16'51.2" N49°11'22.1") and *D. r. bugensis* (22.6 ± 2.3 mm in length) on waterway 2 (E06°09'54.5" N49°06'45.4"). Mussels were then caged in their respective waterways, to facilitate the sampling during the 24 hours experiment (Figure 1). For each species, 300 individuals were withdrawn and immediately caged in 12 polyethylene 5 mm-mesh bags (25 organisms per bag). The bags were left on site for seven days, to enable the mussels to reattach and avoid the sampling related stress.



Figure 1: Sampling sites and cages

2. 24 hours experiment

Seven days after caging, we sampled one bag for each species every two hour, during 24 h. Caging also avoided to lose time in sampling, since the mussel were ready to be picked-up in their bags, and enabled to respect the 2 h time interval between each sampling. It also avoided to sample at night, which necessitates to use artificial lightening that can bias potential biological responses to circadian cycle. After the bags have been retrieved from water, mussels were immediately dissected and their digestive glands were frozen individually in liquid nitrogen. A condition index was calculated only for the first sampling time (10:00 AM), according to the following formula (Guerlet et al., 2010):

Condition Index (mg mm^{-3}) = wet weight / (length*width*height)

3. Physico-chemical parameters and chlorophyll *a* concentration

Data-loggers were placed close to mussel-bags to monitor temperature and luminosity during the 24 h experiment (one measurement every 15 min). At each sampling time on each waterway physico-chemical parameters (temperature, oxygen, conductivity and pH) were measured with a Multi 3430 SET G sensor (WTW®) and 2 L of water were placed in opaque bottles to evaluate chlorophyll *a* and pheopigment concentrations in the laboratory. Two liters were also used for supplementary measurements (total suspended matter, nitrogen compounds, phosphates, total phosphorous, chlorine, sulfates and chemical oxygen demand) only at 12:00 PM and 12:00 AM. Chlorophyll *a* and

pheopigments were measured using the Lorenzen spectrophotometric method (Lorenzen, 1967). Suspended matter were determined after water filtration and differential weighing of the filter before and after drying at 105 °C. Nitrogen compounds were measured by ionic chromatography (nitrites and nitrates) or absorption spectrometry (ammonium), phosphates and total phosphorous were measured using absorption spectrometry and chlorine and sulfates concentrations by ionic chromatography. Chemical oxygen demand was measured according to (Bartram et al., 1996) by adding potassium dichromate in an acid medium, to oxidize organic materials. The excess in dichromate was then titrated with a solution of iron(II)sulfate and ammonium.

4. Biomarker measurements

Biomarker responses were measured using an automated spectrophotometer (Konelab 20-XTi, ThermoScientific). This device operates on very small volumes and enables the measurement of the whole set of biomarkers on each digestive gland, which is considered to be the most metabolically active organ in mussels (Balabaskaran et al., 1986).

Digestive glands were defrosted, weighed and crushed in phosphate buffer (50 mM, pH 7.6 supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1 mM L-serine borate mixture as protease inhibitors) at a 4/1 (v/w) ratio. Homogenates were centrifuged at 250 x g for 5 min at 4 °C (crude extract). Homogenates were used for the assays immediately after their preparation. One part of this fraction was used to evaluate triglyceride (Tri), cholesterol (Chol), lipid hydroperoxide concentration (LOOH), electron transport system (ETS) and acid phosphatase (ACP) activities. The other part underwent a differential centrifugation (1,000 x g for 20 min at 4 °C; the supernatant was recovered and centrifuged again at 20,000 x g for 50 min at 4 °C). The final supernatant corresponding to the cytosolic fraction was used to measure total antioxidant capacity (TAC), glutathione-S-transferase (GST), lactate dehydrogenase (LDH), caspase-3 (Csp) and catalase (Cat) activities. Proteins were quantified on both fractions (crude extract (ProtB) and cytosolic fraction (ProtFC)) by the Pyrogallol red colorimetric method, using Scal bovine-based serum as a reference. Biomarker responses were measured following classical methods, adapted for automated measurements in our spectrophotometer. The detailed protocols are available in Garaud et al. (2016), except for Csp and Cat which were slightly modified for microplate measurement in a spectrofluorimeter (SAFAS Xenius, Monaco).

For Csp measurement, 20 µL of cytosolic fraction were placed in a dark microplate, and 120 µL of reagent (Tris 13.4 mM containing 350 µM DEVD-AFC, 5.6 mM DTT, 2.2 mM EDTA) were added. The fluorescence kinetic of AFC (7-amino-4-trifluoromethylcoumarin), cleaved by the caspases, was measured at 400 nm (emission) and 505 nm (excitation) during 30 min. Results are expressed as µmol AFC.g prot⁻¹.h⁻¹, relative to a standard of AFC (from 50 to 0 µM AFC).

For Cat measurement, cytosolic fraction (5 µL) was diluted in homogenizing buffer (130 µL) and placed in a UV-clear transparent microplate. An automated injector added 65 µL H₂O₂ at 92.3 mM, the plate was agitated and the decrease in absorption was followed at 240 nm during 30 seconds. Results are expressed in mmol H₂O₂.g prot⁻¹.min⁻¹.

5. Statistical analysis

Statistical analysis was made using R software (R Development Core Team, version 3.3.0). The influence of species and time on biomarker responses were tested using MANOVA. To evaluate the differences between species and sampling time on each biomarker, normality and homoscedasticity were tested respectively with Shapiro and Levene tests, followed by Student t test or analysis of variance (ANOVA or Kruskal-Wallis, depending on previous tests). Inter-condition differences were evaluated through post-hoc Tukey or KruskalMC tests.

Partial least square discriminant analysis (PLS-DA) was performed to assess which biomarker responses were able to discriminate species and sampling times and the significant biomarkers (variable importance in the projection, VIP > 0.8) are underlined on the graphics. Axes of the PLSDA were then used under Hotelling T² tests to assess significant differences between groups.

For all analysis, a threshold of $p \leq 0.05$ is considered significant and degrees of freedom (df) and residual degrees of freedom (df_{res}) are reported. Data on the graphics are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD).

Results

1. Condition index and shell volume

Condition indices and shell volume were 0.08 ± 0.02 mg.mm⁻³ and 4.51 ± 1.22 cm³ for *D. polymorpha* and were 0.09 ± 0.02 mg.mm⁻³ and 3.58 ± 0.99 cm³ for *D. r. bugensis*. Condition indices and shell volume were not significantly different between species ($p = 0.38$, df = 18, $t = -0.90$ for condition index; $p = 0.16$, df = 18, $t = 1.48$ for shell volume). This means that the two species were in the same health status when the 24 h experiment started.

2. Chlorophyll *a* concentration and physico-chemical parameters

Physico-chemical parameters measured along the 24 h are reported in Table Ia. The other parameters measured only at 12:00 AM and 12:00 PM are reported in Table Ib. Temperature, pH, conductivity and oxygen concentration remained very stable during these 24 h. There are variations in chlorophyll *a* and pheopigment concentrations, but they are sporadic and exhibit no clear time-related pattern.

Table I: Physico-chemical parameters measured in both waterways during the 24 h experiment. Temperature (Temp.), pH, conductivity (Cond.), oxygen concentration (O₂), chlorophyll *a* concentration (Chl. *a*) and pheopigment (Pheo.) were measured every two hours (a). Total suspended matter (SM), nitrogen compounds (NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻), phosphates (PO₄³⁻), total phosphorous (P_{tot}), chlorine (Cl⁻), sulfates (SO₄²⁻) and chemical oxygen demand (COD) were measured only at 12:00 PM and 12:00 AM (b)

a	Waterway 1 (<i>D. polymorpha</i>)						Waterway 2 (<i>D. r. bugensis</i>)					
	Temp.	pH	Cond.	O ₂	Chl. <i>a</i>	Pheo.	Temp.	pH	Cond.	O ₂	Chl. <i>a</i>	Pheo.
	°C		μS.cm ⁻¹	%	μg.L ⁻¹	μg.L ⁻¹	°C		μS.cm ⁻¹	%	μg.L ⁻¹	μg.L ⁻¹
10:00 AM	7.3	7.8	2060	67.8	0.9	1.0	7.6	7.9	1853	85.3	0.6	1.0
12:00 PM	7.3	7.82	2070	70.1	0.7	0.9	7.8	7.88	1850	85.3	1.1	1.8
2:00 PM	7.9	7.79	2060	75.7	1.1	1.8	8.3	7.8	1849	89.3	3.1	8.3
4:00 PM	7.8	7.85	2060	74	1.0	1.8	8.2	7.91	1843	86.5	1.1	3.1
6:00 PM	7.5	7.8	2070	72	1.6	3.5	7.9	7.89	1841	85.2	0.8	1.5
8:00 PM	7.7	7.81	2070	71.8	1.9	3.6	8	7.92	1831	87.4	1.0	2.5
10:00 PM	7.7	7.83	2070	72.3	0.8	2.0	8.1	7.91	1825	89.2	0.4	2.7
12:00 AM	7.8	7.83	2060	74.9	1.5	4.6	8.2	7.92	1821	90.2	0.4	2.2
2:00 AM	7.7	7.8	2070	74	0.9	1.2	8.1	7.82	1820	89.4	1.2	5.2
4:00 AM	7.6	7.9	2070	73.3	0.8	1.5	8	7.9	1821	88	0.4	2.8
6:00 AM	7.7	7.84	2070	72	1.4	6.0	8	7.9	1820	88.6	0.2	3.1
8:00 AM	7.7	7.84	2070	74.1	0.6	1.7	8	7.94	1812	89.6	0.4	2.4

b	SM	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	P _{tot}	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	COD
	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹
	Waterway 1 (<i>D. polymorpha</i>)								
12:00 PM	48.4	0.035	0.035	7.3	0.13	0.60	473	130	55
12:00 AM	3.9	0.040	0.033	7.1	0.14	0.23	470	129	46
	Waterway 2 (<i>D. r. bugensis</i>)								
	SM	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	P _{tot}	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	COD
	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹
12:00 PM	14.4	0.143	0.095	10.7	0.19	0.40	418	115	46
12:00 AM	41.5	0.135	0.092	11.2	0.18	0.56	411	115	48

3. Temperature and light intensity

Temperature and light intensity were monitored along the 24 h using data-loggers (Figure 2). Water temperature is slightly higher in waterway 2, even if it seems to receive less light than waterway 1. Temperatures were very stable in both waterways, without influence of the day/night alternation. Light intensity was null between 5:00 PM and 8:00 AM, and the highest between 11:30 AM and 3:00 PM, with different peaks. Authors also noticed that weather was cloudy between 10:00 AM and 2:00 PM, then sunny (a little windy between 4:00 PM and 9:00 PM). There were also scatter rains during the night, and a strong rain between 6:00 AM and 8:00 AM.

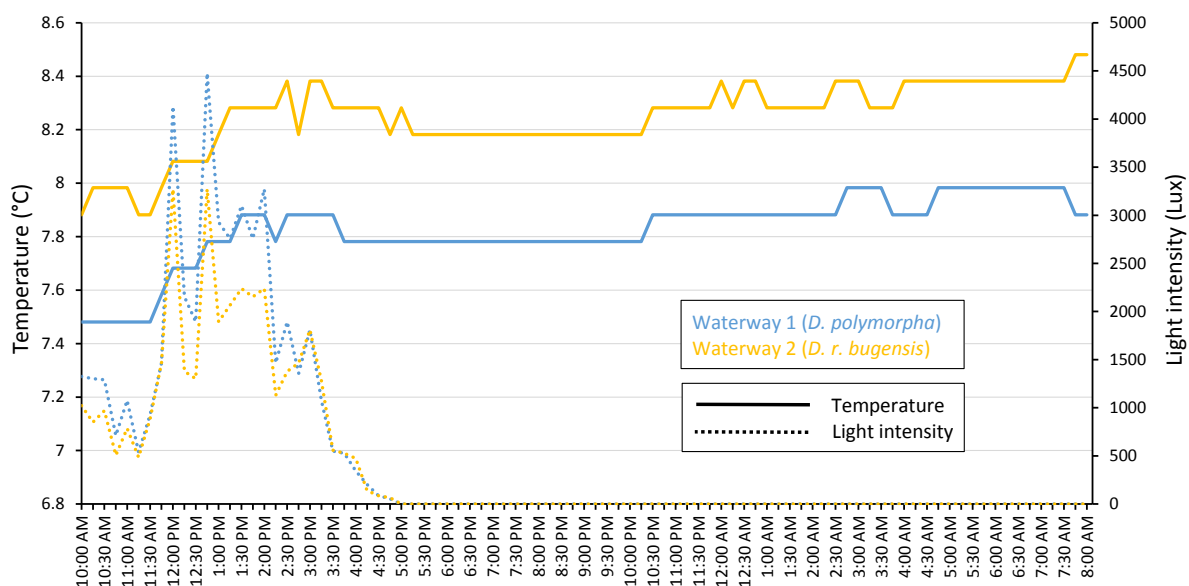


Figure 2: Continuous monitoring (every 15 min) of temperature and light intensity in both waterways

4. Biomarker responses

When looking at the whole battery of biomarker responses, there were no interactive effect of species x time ($p = 0.13$), nor of time alone ($p = 0.28$) but a significant effect of species ($p < 2.10^{-16}$, $F = 91$, $n = 10$, $df = 2$, $df_{res} = 216$). Indeed, if we look at Figure 3, we can see a clear separation of the two species based on their biomarker responses. It seems that *D. polymorpha* presents higher levels of defense biomarkers (GST, TAC) and a higher metabolic activity (ETS) than *D. r. bugensis* which has higher energy reserves (Tri, Chol, Prot) and cellular damages (LOOH).

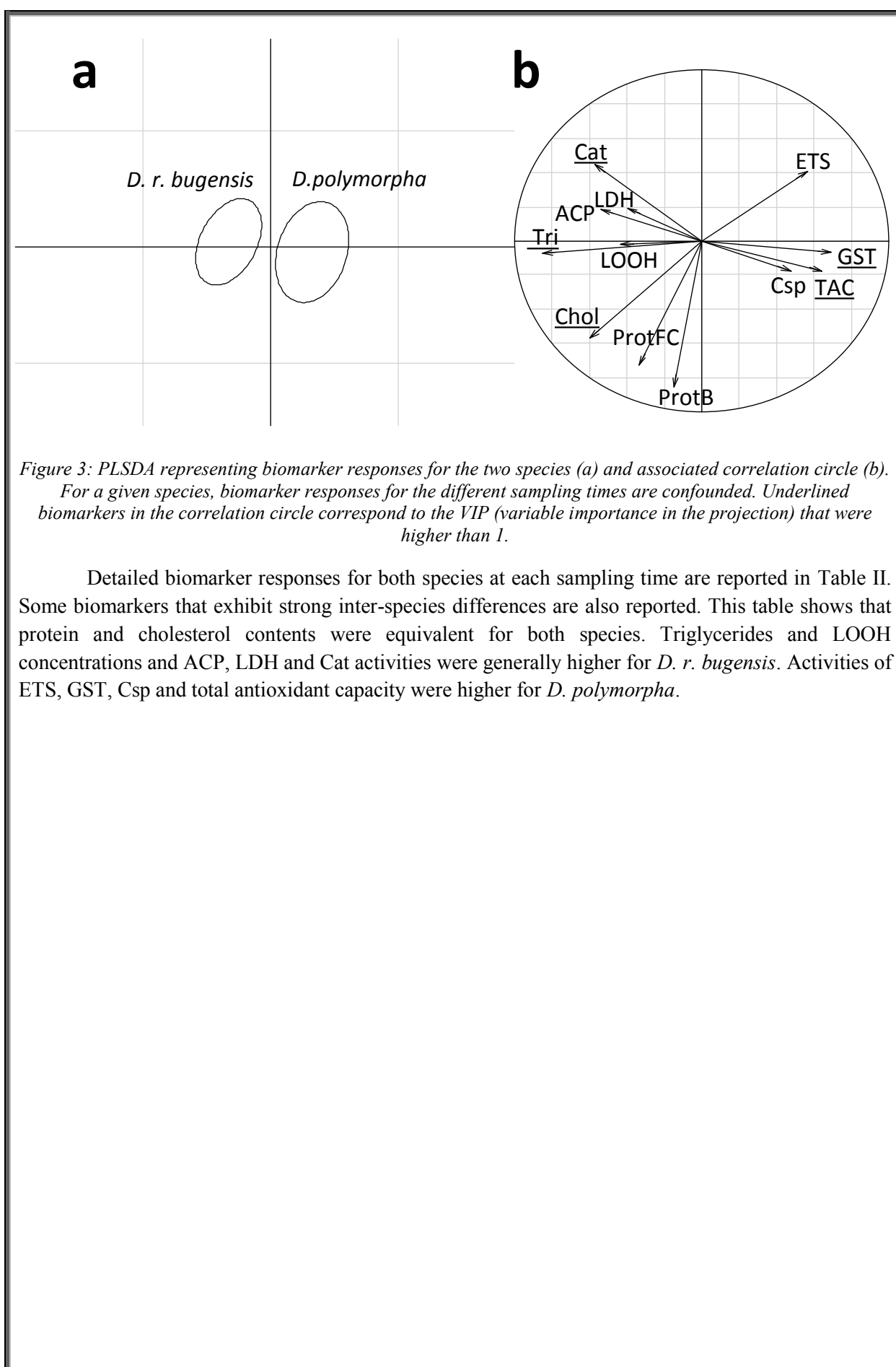


Figure 3: PLSDA representing biomarker responses for the two species (a) and associated correlation circle (b). For a given species, biomarker responses for the different sampling times are confounded. Underlined biomarkers in the correlation circle correspond to the VIP (variable importance in the projection) that were higher than 1.

Detailed biomarker responses for both species at each sampling time are reported in Table II. Some biomarkers that exhibit strong inter-species differences are also reported. This table shows that protein and cholesterol contents were equivalent for both species. Triglycerides and LOOH concentrations and ACP, LDH and Cat activities were generally higher for *D. r. bugensis*. Activities of ETS, GST, Csp and total antioxidant capacity were higher for *D. polymorpha*.

Table II: Daily biomarker responses expressed as mean $\pm$ SD ($n = 10$) for *D. polymorpha* (ZM) and *D. r. bugensis* (QM). Orange frame symbolize significant inter-species differences for a given biomarker at a given sampling time, evidenced by a post-hoc Tukey or Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$).

	10:00 AM	12:00 PM	2:00 PM	4:00 PM	6:00 PM	8:00 PM	10:00 PM	12:00 AM	2:00 AM	4:00 AM	6:00 AM	8:00 AM
QM	Proteins on crude extract (ProtB, mg gFW ⁻¹)											
	49.9 $\pm$ 6.8	51.9 $\pm$ 7.2	49.2 $\pm$ 9.3	56.7 $\pm$ 12.9	46.5 $\pm$ 5.5	53.4 $\pm$ 8.6	46.8 $\pm$ 7.5	53.2 $\pm$ 11.5	55.7 $\pm$ 18.3	49.9 $\pm$ 7.4	47.8 $\pm$ 7.1	49.2 $\pm$ 4.0
ZM	51.2 $\pm$ 12.9	53.4 $\pm$ 6.9	50.0 $\pm$ 13.2	44.4 $\pm$ 14.2	54.6 $\pm$ 11.9	49.7 $\pm$ 6.8	49.0 $\pm$ 10.6	49.1 $\pm$ 5.5	55.5 $\pm$ 10.6	50.0 $\pm$ 6.6	44.9 $\pm$ 12.1	53.7 $\pm$ 10.5
QM	Triglycerides (Tri, mg gFW ⁻¹)											
	9.1 $\pm$ 5.6	11.2 $\pm$ 3.5	6.8 $\pm$ 2.7	9.8 $\pm$ 6.2	8.0 $\pm$ 4.3	9.4 $\pm$ 3.8	8.3 $\pm$ 5.6	10.1 $\pm$ 3.2	9.5 $\pm$ 5.2	8.2 $\pm$ 3.9	9.9 $\pm$ 3.6	10.9 $\pm$ 7.3
ZM	1.2 $\pm$ 0.9	1.0 $\pm$ 0.7	0.9 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 1.1	1.3 $\pm$ 0.8	1.0 $\pm$ 0.6	1.1 $\pm$ 0.7	1.1 $\pm$ 0.5	2.6 $\pm$ 3.8	1.5 $\pm$ 0.7	1.0 $\pm$ 0.5	1.6 $\pm$ 1.3
QM	Cholesterol (Chol, mg g proteins ⁻¹)											
	2.0 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.3
ZM	1.7 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.5
QM	Electron transport system (ETS, μ mol O ₂ g proteins ⁻¹ h ⁻¹)											
	1.0 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.9	0.9 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.1
ZM	1.2 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.7	1.3 $\pm$ 0.5	1.2 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.7	1.3 $\pm$ 0.2
QM	Lipid hydroperoxides concentration (LOOH, μ mol g proteins ⁻¹)											
	17.0 $\pm$ 6.2	30.9 $\pm$ 30.4	33.9 $\pm$ 38.3	56.1 $\pm$ 49.4	24.0 $\pm$ 16.4	27.2 $\pm$ 28.5	29.9 $\pm$ 20.4	31.6 $\pm$ 30.6	27.8 $\pm$ 22.7	22.2 $\pm$ 17.5	32.0 $\pm$ 22.3	27.8 $\pm$ 27.2
ZM	15.1 $\pm$ 9.2	11.6 $\pm$ 3.0	12.2 $\pm$ 5.2	26.1 $\pm$ 27.5	15.8 $\pm$ 9.7	16.1 $\pm$ 9.9	16.7 $\pm$ 9.5	14.4 $\pm$ 3.2	13.9 $\pm$ 4.3	13.3 $\pm$ 4.3	16.9 $\pm$ 8.2	19.1 $\pm$ 10.5
QM	Acid phosphatase activity (ACP, μ mol g proteins ⁻¹ h ⁻¹)											
	90.5 $\pm$ 16.3	94.3 $\pm$ 17.2	94.4 $\pm$ 19.6	89.7 $\pm$ 25.1	81.8 $\pm$ 12.4	83.2 $\pm$ 19.8	87.5 $\pm$ 15.5	93.9 $\pm$ 20.1	84.2 $\pm$ 17.2	95.0 $\pm$ 14.6	98.1 $\pm$ 25.1	90.8 $\pm$ 11.1
ZM	70.7 $\pm$ 26.9	62.2 $\pm$ 11.0	78.4 $\pm$ 26.5	77.0 $\pm$ 11.8	61.1 $\pm$ 17.0	68.5 $\pm$ 16.6	67.1 $\pm$ 13.2	79.6 $\pm$ 23.2	76.0 $\pm$ 18.2	91.9 $\pm$ 23.3	73.5 $\pm$ 13.9	71.3 $\pm$ 15.3
QM	Proteins on cytosolic fraction (ProtFC, mg gFW ⁻¹)											
	36.4 $\pm$ 5.3	39.1 $\pm$ 2.6	37.3 $\pm$ 3.6	38.1 $\pm$ 3.9	35.6 $\pm$ 3.8	35.9 $\pm$ 2.9	35.4 $\pm$ 2.7	38.9 $\pm$ 3.5	37.6 $\pm$ 7.5	37.7 $\pm$ 3.0	37.1 $\pm$ 3.4	35.7 $\pm$ 3.1
ZM	35.1 $\pm$ 5.5	35.5 $\pm$ 6.3	33.8 $\pm$ 5.2	33.3 $\pm$ 10.5	36.9 $\pm$ 4.0	35.2 $\pm$ 4.1	33.4 $\pm$ 8.8	34.6 $\pm$ 6.6	36.8 $\pm$ 3.5	38.2 $\pm$ 3.1	33.9 $\pm$ 5.8	39.9 $\pm$ 10.0
QM	Glutathione S-transferase activity (GST, μ mol CDNB g proteins ⁻¹ min ⁻¹)											
	233.1 $\pm$ 47.9	232.6 $\pm$ 48.9	216.3 $\pm$ 51.3	233.3 $\pm$ 37.0	226.5 $\pm$ 39.6	221.3 $\pm$ 43.2	225.0 $\pm$ 37.9	229.7 $\pm$ 46.7	212.9 $\pm$ 33.6	240.9 $\pm$ 36.4	213.5 $\pm$ 30.4	244.8 $\pm$ 46.0
ZM	350.7 $\pm$ 113.3	380.3 $\pm$ 101.6	406.3 $\pm$ 95.0	310.5 $\pm$ 61.1	335.5 $\pm$ 78.8	386.7 $\pm$ 82.1	299.2 $\pm$ 97.4	415.2 $\pm$ 91.6	343.5 $\pm$ 83.6	319.1 $\pm$ 83.5	354.2 $\pm$ 99.4	325.7 $\pm$ 136.6
QM	Total antioxidant capacity (TAC, μ mol Teq g proteins ⁻¹ min ⁻¹)											
	12.1 $\pm$ 6.9	9.0 $\pm$ 4.2	12.1 $\pm$ 9.0	12.7 $\pm$ 8.6	11.9 $\pm$ 7.1	12.3 $\pm$ 5.6	11.3 $\pm$ 7.2	10.0 $\pm$ 4.9	12.4 $\pm$ 5.9	12.1 $\pm$ 6.7	10.1 $\pm$ 4.6	13.3 $\pm$ 6.3
ZM	20.4 $\pm$ 5.8	21.1 $\pm$ 5.4	21.6 $\pm$ 9.1	18.6 $\pm$ 7.6	22.4 $\pm$ 5.3	22.6 $\pm$ 7.1	21.7 $\pm$ 6.6	21.8 $\pm$ 8.6	20.1 $\pm$ 9.4	19.4 $\pm$ 6.9	23.8 $\pm$ 5.8	21.0 $\pm$ 8.4
QM	Lactate dehydrogenase activity (LDH, μ mol NADH g proteins ⁻¹ min ⁻¹)											
	199.7 $\pm$ 38.3	154.4 $\pm$ 36.8	144.5 $\pm$ 48.8	150.7 $\pm$ 29.0	147.2 $\pm$ 47.1	159.5 $\pm$ 29.5	159.7 $\pm$ 38.4	141.0 $\pm$ 34.5	150.9 $\pm$ 25.4	143.4 $\pm$ 38.1	158.4 $\pm$ 31.8	163.2 $\pm$ 47.6
ZM	98.1 $\pm$ 36.7	119.1 $\pm$ 28.8	122.2 $\pm$ 33.3	111.4 $\pm$ 32.7	120.8 $\pm$ 28.9	132.5 $\pm$ 21.3	128.0 $\pm$ 24.8	130.9 $\pm$ 29.3	135.4 $\pm$ 38.7	113.2 $\pm$ 31.9	122.7 $\pm$ 31.8	124.0 $\pm$ 36.1
QM	Caspase activity (Csp, μ mol AFC g proteins ⁻¹ h ⁻¹)											
	1.6 $\pm$ 1.0	1.3 $\pm$ 0.7	0.8 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 1.1	1.1 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.6
ZM	2.8 $\pm$ 2.6	2.1 $\pm$ 1.9	2.3 $\pm$ 1.5	1.7 $\pm$ 1.1	2.9 $\pm$ 1.3	2.4 $\pm$ 2.0	1.6 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 1.2	1.6 $\pm$ 0.8	1.3 $\pm$ 0.9	1.6 $\pm$ 1.0	1.7 $\pm$ 1.1
QM	Catalase activity (Cat, mmol H ₂ O ₂ g proteins ⁻¹ min ⁻¹)											
	± 6.4	24.4 $\pm$ 2.9	27.6 $\pm$ 4.4	26.8 $\pm$ 8.5	28.8 $\pm$ 6.9	28.2 $\pm$ 4.4	26.9 $\pm$ 4.6	24.9 $\pm$ 5.5	26.4 $\pm$ 8.0	24.4 $\pm$ 6.3	26.5 $\pm$ 4.8	25.5 $\pm$ 5.1
ZM	16.5 $\pm$ 3.9	19.8 $\pm$ 3.5	16.3 $\pm$ 3.6	20.1 $\pm$ 10.7	15.3 $\pm$ 4.2	17.8 $\pm$ 4.5	16.0 $\pm$ 5.6	17.8 $\pm$ 4.1	19.6 $\pm$ 5.5	18.8 $\pm$ 2.2	16.7 $\pm$ 3.2	17.6 $\pm$ 6.8

If we now look at species separately, there is no strong impact of the sampling time on biomarker responses, but only sporadic differences.

Concerning *D. polymorpha*, the MANOVA evidenced no effect of sampling time on biomarker responses ($p = 0.18$). This was confirmed by the PLSDA and associated Hotelling T^2 tests (data not shown) which showed no significant differences in biomarker responses between the different sampling times for this species. When looking at biomarkers individually, only slight variations were observed for ACP and Csp activities and are reported in Figure 4.

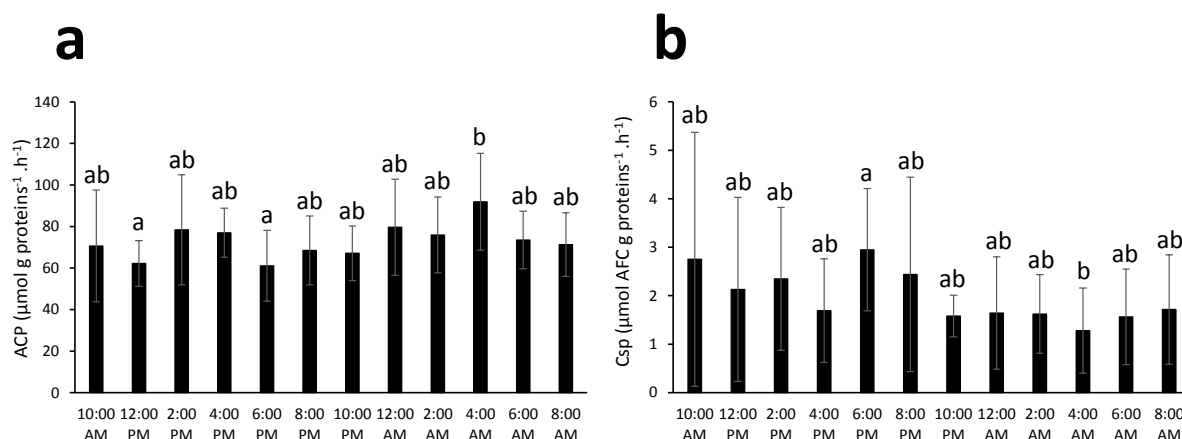


Figure 4: Detailed daily variations in acid phosphatase (ACP, a) and caspase (Csp, b) activities for *D. polymorpha* expressed as mean $\pm$ SD ($n = 10$). Differences between sampling times were evidenced through a post-hoc Tukey test. Values that do not share a common letter are significantly different ($p < 0.05$).

Concerning *D. r. bugensis*, the MANOVA evidenced no effect of sampling time on biomarker responses ($p = 0.35$). This was confirmed by the PLSDA and associated Hotelling T^2 tests (data not shown) which showed only two significant differences in biomarker responses for this species, between 10:00 AM and 2:00 PM ($p = 0.036$) and between 10:00 AM and 6:00 AM ($p = 0.036$). Slight variations were indeed observed for Chol content and LDH activity and are reported in Figure 5.

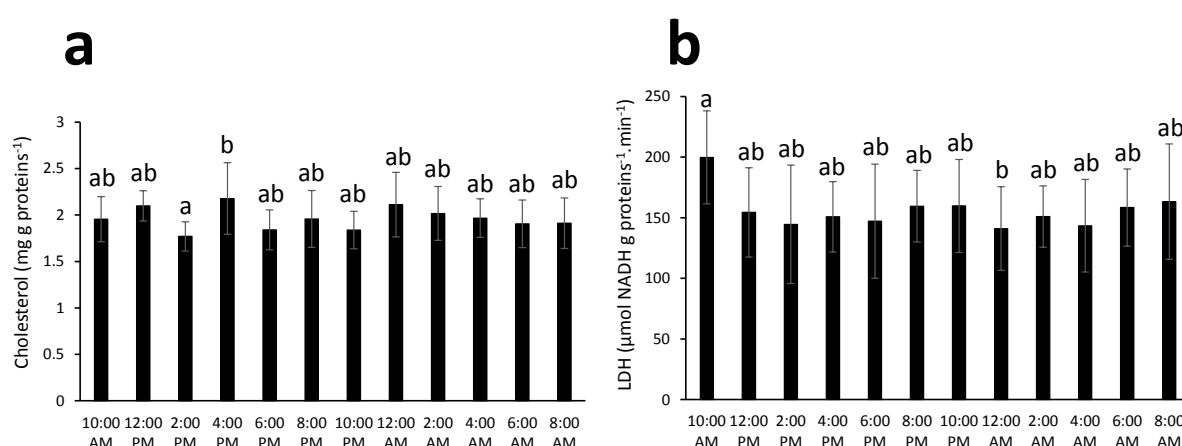


Figure 5: Detailed daily variations in cholesterol content (Chol, a) and lactate dehydrogenase activity (LDH, b) for *D. r. bugensis* expressed as mean $\pm$ SD ($n = 10$). Differences between sampling times were evidenced through a post-hoc Tukey test. Values that do not share a common letter are significantly different ($p < 0.05$).

Discussion

All these results taken together indicate that, for both dreissenid species, there is no daily variation in the different biomarkers measured. The impact of circadian cycle on biochemical responses have barely been tested in the literature, thus the results are hardly comparable with other studies.

One explanation for the absence of daily variations might be the season. Most studies dealing with *D. polymorpha* agree that this species is highly dependent on the season: the reproductive period, during warmer months, influences energy metabolism and allocation and biochemical biomarkers (Faria et al., 2014; Wojtal-Frankiewicz et al., 2017); valve movement also changes in respect with season, temperature and food availability (Borcherding, 2006). Ortmann (2003) also evidenced a circadian rhythm for valve opening in *Corbicula fluminea* during warmer months. Since our experiment was conducted in November, we can assume that physiological processes were slower, more stable, and less dependent on external factors than during late spring or summer, when mussel are more sensitive because of the reproductive period. It would thus be interesting to repeat this experiment at different periods of the year to evaluate the influence of seasonality on daily biological rhythms.

Another factor that could have influenced biomarker responses is caging. Dreissenid mussels possess photoreceptor cells on their mantle and are known to respond to light (Kobak and Nowacki, 2007). Since they generally favor dark places (Kobak, 2001; Kobak and Nowacki, 2007), we can assume that the caging in a brighter area could have disturbed their daily biological rhythm, even one week after caging. Tran et al. (2015) have shown that the presence of toxic dinoflagellate alter daily cycle in *Crassostrea gigas*, with a constant gene transcription throughout the daily cycle, a stable maximal valve opening and a constant crystalline style length, which evidenced a loss of rhythmicity. Maybe in our case, the presence of an unusual stressor (e.g. strong light intensity) could have triggered a loss of rhythmicity. To be sure, it would be interesting to compare biomarker responses between caged and rocky-attached mussels, to see if light intensity could influence biomarker responses.

Borcherding (1992) evidenced a feeding-dependant circadian rhythm for valve movements in *D. polymorpha*. This author also evidenced that this rhythmicity disappears if enough food is provided to the mussels: if the daily food supply is enough, they stayed close at night and were able to maintain their metabolism constant. In our case, we had no clear pattern in chlorophyll *a* concentration within a day. The absence of daily pattern, both for physico-chemical parameters and biomarker responses, impeded the establishment of causal relationships between organismal responses and external factors.

In accordance to our previous studies (Potet et al., 2017, 2016), these results also evidenced strong inter-species differences in biomarker responses. From a monitoring point of view, this means that we need a thorough understanding of biomarker modulations within both species, since they are not equal in their biochemical processes.

In conclusion, even if we do not evidenced any influence of circadian cycle on our battery of biomarkers for both species in late autumn, we evidenced significant differences in biomarker responses between the two dreissenid species *D. polymorpha* and *D. r. bugensis*. For their implementation in biomonitoring, correct identification of the species will thus be more important than the sampling time in the interpretation of their biochemical responses.

Acknowledgements

This work was supported by the French ONEMA (Organisme National de l'Eau et des Milieux Aquatiques) through BIOMICS program, the Agence Nationale de la Recherche through the IPOC program (ANR-12-ISV7-0004) and running costs by CPER Lorraine-ZAM (Contrat Projet Etat Région Lorraine, Zone Atelier Moselle). The authors also wish to thank Philippe Rousselle and Danièle Pauly

for their technical help, and Fanny Louis and Alice Gossiaux for their psychological support during these 24 hours without sleeping.

References

- Ameyaw-Akumfi, C., Naylor, E., 1987. Temporal patterns of shell-gape in *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 95, 237–242.
- Balabaskaran, S., Chew, S., Segaran, M., 1986. Studies on glutathione S-transferase in molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 85, 183–192.
- Baldwin, B.S., Mayer, M.S., Dayton, J., Pau, N., Mendilla, J., Sullivan, M., Moore, A., Ma, A., Mills, E.L., 2002. Comparative growth and feeding in zebra and quagga mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): implications for North American lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59, 680–694. doi:10.1139/f02-043
- Bartram, J., Ballance, R., United Nations Environment Programme, World Health Organization, 1996. *Water quality monitoring: a practical guide to the design and implementation of freshwater quality studies and monitoring programmes*. E & FN Spon, London; New York.
- Bell-Pedersen, D., Cassone, V.M., Earnest, D.J., Golden, S.S., Hardin, P.E., Thomas, T.L., Zoran, M.J., 2005. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nature Reviews Drug Discovery* 4, 1–13. doi:10.1038/nrd1633
- Binelli, A., Della Torre, C., Magni, S., Parolini, M., 2015. Does zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) represent the freshwater counterpart of *Mytilus* in ecotoxicological studies? A critical review. *Environmental Pollution* 196, 386–403. doi:10.1016/j.envpol.2014.10.023
- Borcherding, J., 2006. Ten years of practical experience with the Dreissena-Monitor®, a Biological Early Warning System for continuous water quality monitoring. *Hydrobiologia* 556, 417–426. doi:10.1007/s10750-005-1203-4
- Borcherding, J., 1992. Another Early Warning System for the detection of toxic discharges in the aquatic environment based on valve movements of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*, in: Neumann, D., Jenner, H.A. (Eds.), *The Zebra Mussel Dreissena Polymorpha*, *Limnologie Aktuell Band 4*. Gustav Fischer Verlag, New York, pp. 127–146.
- Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Priadi, C., Ayrault, S., Tusseau-Vuillemin, M.-H., 2011. Bioavailability of particulate metal to zebra mussels: Biodynamic modelling shows that assimilation efficiencies are site-specific. *Environmental Pollution* 159, 3381–3389. doi:10.1016/j.envpol.2011.08.034
- Brown, F.A., Bennett, M.F., Webb, H.M., Ralph, C.L., 1956. Persistent daily, monthly, and 27-day cycles of activity in the oyster and quahog. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 131, 235–262.
- Ceccaldi, H.J., 1998. A synopsis of the morphology and physiology of the digestive system of some crustacean species studied in France. *Reviews in Fisheries Science* 6, 13–39. doi:10.1080/10641269891314177
- Claudi, R., Mackie, G.L., 1994. *Practical manual for zebra mussel monitoring and control*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- Claxton, W.T., Mackie, G.L., 1998. Seasonal and depth variations in gametogenesis and spawning of *Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis* in eastern Lake Erie. *Canadian Journal of Zoology* 76, 2010–2019. doi:10.1139/z98-150
- Connor, K.M., Gracey, A.Y., 2011. Circadian cycles are the dominant transcriptional rhythm in the intertidal mussel *Mytilus californianus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 16110–16115. doi:10.1073/pnas.1111076108
- Dunlap, J.C., 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96, 271–290.
- Emerson, K.J., Bradshaw, W.E., Holzapfel, C.M., 2008. Concordance of the circadian clock with the environment is necessary to maximise fitness in natural populations: brief communication. *Evolution* 62, 979–983. doi:10.1111/j.1558-5646.2008.00324.x
- Faria, M., Ochoa, V., Blázquez, M., Juan, M.F.S., Lazzara, R., Lacorte, S., Soares, A.M.V.M., Barata, C., 2014. Separating natural from anthropogenic causes of impairment in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) populations living across a pollution gradient. *Aquatic Toxicology* 152, 82–95. doi:10.1016/j.aquatox.2014.03.020
- Farkas, A., Ács, A., Vehovszky, Á., Falfusynska, H., Stoliar, O., Specziár, A., Györi, J., 2017. Interspecies comparison of selected pollution biomarkers in dreissenid spp. inhabiting pristine and moderately polluted sites. *Science of The Total Environment* 599–600, 760–770. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.05.033

- Garaud, M., Auffan, M., Devin, S., Felten, V., Pagnout, C., Pain-Devin, S., Proux, O., Rodius, F., Sohm, B., Giambérini, L., 2016. Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Nanotoxicology* 10, 935–944. doi:10.3109/17435390.2016.1146363
- Gnyubkin, V.F., 2010. The circadian rhythms of valve movements in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Russian Journal of Marine Biology* 36, 419–428. doi:10.1134/S1063074010060039
- Guerlet, E., Ledy, K., Meyer, A., Giambérini, L., 2007. Towards a validation of a cellular biomarker suite in native and transplanted zebra mussels: A 2-year integrative field study of seasonal and pollution-induced variations. *Aquatic Toxicology* 81, 377–388. doi:10.1016/j.aquatox.2006.12.016
- Guerlet, E., Vasseur, P., Giambérini, L., 2010. Spatial and temporal variations of biological responses to environmental pollution in the freshwater zebra mussel. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1170–1181. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.05.009
- Hawkins, A.J.S., Bayne, B.L., Clarke, K.R., 1983. Co-ordinated rhythms of digestion, absorption and excretion in *Mytilus edulis* (Bivalvia: Mollusca). *Marine Biology* 74, 41–48. doi:10.1007/BF00394273
- Heiler, K., bij de Vaate, A., Ekschmitt, K., von Oheimb, P., Albrecht, C., Wilke, T., 2013. Reconstruction of the early invasion history of the quagga mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*) in Western Europe. *Aquatic Invasions* 8, 53–57. doi:10.3391/ai.2013.8.1.06
- Jones, L.A., Ricciardi, A., 2005. Influence of physicochemical factors on the distribution and biomass of invasive mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*) in the St. Lawrence River. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62, 1953–1962. doi:10.1139/f05-096
- Karatayev, A., Claudi, R., Lucy, F., 2012. History of *Dreissena* research and the ICAIS gateway to aquatic invasions research. *Aquatic Invasions* 7, 1–5. doi:10.3391/ai.2012.7.1.001
- Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Padilla, D.K., 2015. Zebra versus quagga mussels: a review of their spread, population dynamics, and ecosystem impacts. *Hydrobiologia* 746, 97–112. doi:10.1007/s10750-014-1901-x
- Karatayev, A.Y., Mastitsky, S.E., Padilla, D.K., Burlakova, L.E., Hajduk, M.M., 2011. Differences in growth and survivorship of zebra and quagga mussels: size matters. *Hydrobiologia* 668, 183–194. doi:10.1007/s10750-010-0533-z
- Kim, W.-S., Huh, H.-T., Je, J.-G., Han, K.-N., 2003. Evidence of two-clock control of endogenous rhythm in the Washington clam, *Saxidomus purpuratus*. *Marine Biology* 142, 305–309. doi:10.1007/s00227-002-0952-0
- Kobak, J., 2001. Light, gravity and conspecifics as cues to site selection and attachment behaviour of juvenile and adult *Dreissena polymorpha* Pallas, 1771. *Journal of Molluscan Studies* 67, 183–189.
- Kobak, J., Nowacki, P., 2007. Light-related behaviour of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*, Bivalvia). *Fundamental and Applied Limnology / Archiv für Hydrobiologie* 169, 341–352. doi:10.1127/1863-9135/2007/0169-0341
- Kramer, K.J.M., Foekema, E.M., 2001. The “Musselmonitor®” as Biological Early Warning System: the first decade, in: Butterworth, F.M., Gunatilaka, A., Gensebatt, M.E. (Eds.), *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change 2*. Springer, New York, pp. 59–87.
- Last, K.S., Bailhache, T., Kramer, C., Kyriacou, C.P., Rosato, E., Olive, P.J.W., 2009. Tidal, Daily, and Lunar-Day Activity Cycles in the Marine Polychaete *Nereis virens*. *Chronobiology International* 26, 167–183. doi:10.1080/07420520902774524
- Lorenzen, C.J., 1967. Determination of chlorophyll and pheo-pigments: spectrophotometric equations. *Limnology and oceanography* 12, 343–346.
- Magni, S., Parolini, M., Della Torre, C., de Oliveira, L.F., Catani, M., Guzzinati, R., Cavazzini, A., Binelli, A., 2017. Multi-biomarker investigation to assess toxicity induced by two antidepressants on *Dreissena polymorpha*. *Science of The Total Environment* 578, 452–459. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.10.208
- Marescaux, J., Boets, P., Lorquet, J., Sablon, R., Van Doninck, K., Beisel, J.-N., 2015. Sympatric *Dreissena* species in the Meuse River: towards a dominance shift from zebra to quagga mussels. *Aquatic Invasions* 10, 287–298. doi:10.3391/ai.2015.10.3.04
- Matthews, J., Schipper, A.M., Hendriks, A.J., Yen Le, T.T., bij de Vaate, A., van der Velde, G., Leuven, R.S.E.W., 2015. A dominance shift from the zebra mussel to the invasive quagga mussel may alter the trophic transfer of metals. *Environmental Pollution* 203, 183–190. doi:10.1016/j.envpol.2015.03.032
- Matthews, J., Van der Velde, G., Bij de Vaate, A., Collas, F.P.L., Koopman, K.R., Leuven, R.S.E.W., 2014. Rapid range expansion of the invasive quagga mussel in relation to zebra mussel presence in The Netherlands and Western Europe. *Biological Invasions* 16, 23–42. doi:10.1007/s10530-013-0498-8
- Mills, E.L., Roseman, E.F., Rutzke, M., Gutenmann, W.H., Lisk, D.J., 1993. Contaminant and nutrient element levels in soft tissues of zebra and quagga mussels from waters of southern lake ontario. *Chemosphere* 27, 1465–1473.

- Nalepa, T.F., Fanslow, D.L., Pothoven, S.A., 2010. Recent changes in density, biomass, recruitment, size structure, and nutritional state of *Dreissena* populations in southern Lake Michigan. *Journal of Great Lakes Research* 36, 5–19. doi:10.1016/j.jglr.2010.03.013
- Naylor, E. (Ed.), 2010. *Chronobiology of marine organisms*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Ortmann, C., 2003. Energy metabolism and valve closure behaviour in the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Journal of Experimental Biology* 206, 4167–4178. doi:10.1242/jeb.00656
- Palais, F., Dedourge-Geffard, O., Beaudon, A., Pain-Devin, S., Trapp, J., Geffard, O., Noury, P., Gourlay-Francé, C., Uher, E., Mouneyrac, C., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, A., 2012. One-year monitoring of core biomarker and digestive enzyme responses in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Ecotoxicology* 21, 888–905. doi:10.1007/s10646-012-0851-1
- Palmer, J.D. (Ed.), 1995. *The biological rhythms and clocks of intertidal animals*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Panda, S., Hogenesch, J.B., 2004. It's All in the Timing: Many Clocks, Many Outputs. *Journal of Biological Rhythms* 19, 374–387. doi:10.1177/0748730404269008
- Potet, M., Devin, S., Pain-Devin, S., Rousselle, P., Giambérini, L., 2016. Integrated multi-biomarker responses in two dreissenid species following metal and thermal cross-stress. *Environmental Pollution* 218, 39–49. doi:10.1016/j.envpol.2016.08.025
- Potet, M., Giambérini, L., Pain-Devin, S., Louis, F., Bertrand, C., Devin, S., 2017. Differential tolerance to nickel between *Dreissena polymorpha* and *Dreissena rostriformis bugensis* populations. Under revision in *Scientific Reports*.
- Ram, J.L., Karim, A.S., Banno, F., Kashian, D.R., 2012. Invading the invaders: reproductive and other mechanisms mediating the displacement of zebra mussels by quagga mussels. *Invertebrate Reproduction & Development* 56, 21–32. doi:10.1080/07924259.2011.588015
- Richman, L., Somers, K., 2005. Can we use zebra and quagga mussels for biomonitoring contaminants in the Niagara River? *Water Air Soil Pollut.* 167, 155–178. doi:10.1007/s11270-005-0083-6
- Schäfer, S., Hamer, B., Treursić, B., Möhlenkamp, C., Spira, D., Korlević, M., Reifferscheid, G., Claus, E., 2012. Comparison of bioaccumulation and biomarker responses in *Dreissena polymorpha* and *D. bugensis* after exposure to resuspended sediments. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 62, 614–627. doi:10.1007/s00244-011-9735-2
- Tran, D., Ciutat, A., Mat, A., Massabau, J.-C., Hégaret, H., Lambert, C., Le Goic, N., Soudant, P., 2015. The toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* disrupts daily rhythmic activities at gene transcription, physiological and behavioral levels in the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology* 158, 41–49. doi:10.1016/j.aquatox.2014.10.023
- Tran, D., Nadau, A., Durrieu, G., Ciret, P., Parisot, J.-P., Massabau, J.-C., 2011. Field chronobiology of a molluscan Bivalve: How the moon and sun cycles interact to drive oyster activity rhythms. *Chronobiology International* 28, 307–317. doi:10.3109/07420528.2011.565897
- Wojtal-Frankiewicz, A., Bernasińska, J., Frankiewicz, P., Gwoździński, K., Jurczak, T., 2017. The role of environmental factors in the induction of oxidative stress in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Ecology*. doi:10.1007/s10452-017-9617-4

Partie III : Variabilité inter et intra-spécifique

1. Variabilité inter-spécifique

Comme décrit précédemment, les hydrosystèmes français sont depuis relativement peu de temps colonisés par une seconde espèce de dreissenidés, *D. r. bugensis*. La question qui se pose alors est celle de l'identité des réponses biomarqueurs entre cette nouvelle espèce et *D. polymorpha*, espèce modèle en écotoxicologie sur laquelle un large corpus de données est déjà disponible.

Dans une optique de biosurveillance, il nous a semblé essentiel de soulever ce point, afin de voir le poids que pouvait avoir une méconnaissance des critères d'identification de ces deux bivalves sur l'interprétation des biomarqueurs.

Nous avons donc traité cette question à l'aide des données collectées en avril 2016 et en février 2017, dates pour lesquelles nous disposons du plus grand nombre de populations pour les deux espèces.

Une première ACP met clairement en évidence une différence des niveaux de biomarqueurs entre les deux espèces (Figure 31). Pour saisir l'ampleur de cette différence, il est important de prendre conscience que la figure présentée mélange, pour chaque espèce, 2 dates (avec un effet saison détaillé plus haut) et plusieurs populations. Malgré ces 2 sources de variabilité non explicitement représentées sur le plan factoriel, la différenciation des ellipses des 2 espèces reste très marquée. Les différences de valeurs mesurées pour les 11 biomarqueurs conservés dans l'étude entre espèces sont donc bien plus importantes que celles générées par un effet saison ou un effet population.

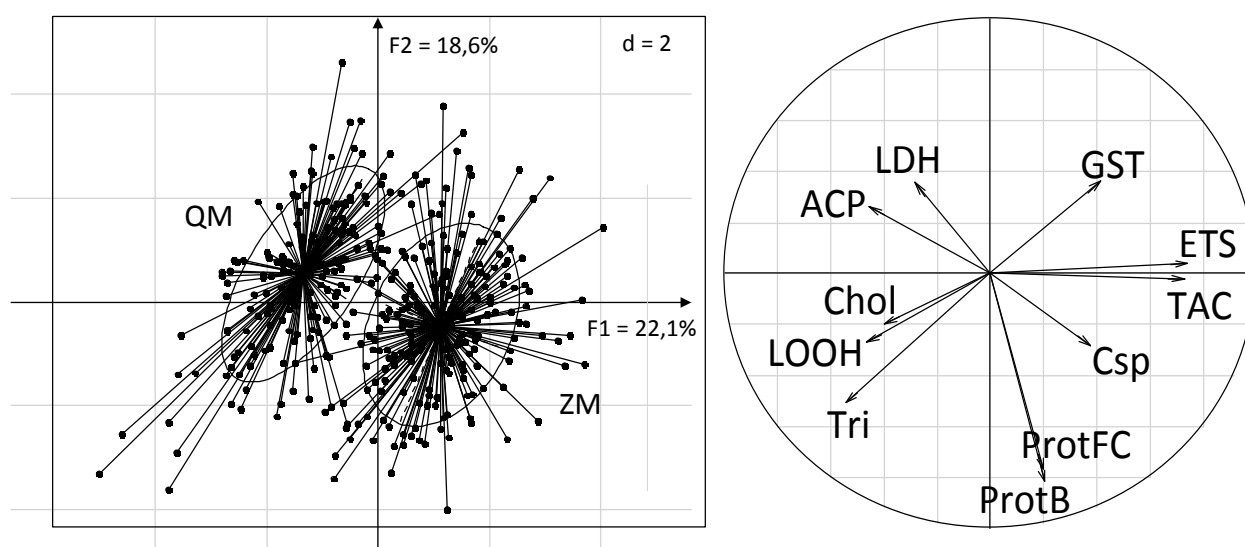


Figure 31 : Variabilité inter-spécifique des biomarqueurs pour les populations des deux espèces échantillonnées en avril 2016 et février 2017. Plan factoriel F1F2 de l'ACP réalisée sur le tableau individus x biomarqueurs (396 lignes, 11 colonnes) et cercle des corrélations associé

De plus, nous nous sommes focalisés sur 3 cas particuliers, 3 stations où les deux espèces coexistent (Montigny – Canal de Jouy, Oise, St Mihiel), à une seule saison, avril 2016. Cette seconde analyse nous permet de comprendre plus finement les différences entre les 2 espèces considérées.

Le plan factoriel (Figure 32) confirme la différence entre les 2 espèces. Cependant, le plus important ici n'est pas la position de *D. r. bugensis* relativement à la position de *D. polymorpha*, mais la manière dont se distribuent les 3 sites étudiés le long de l'axe F2 : la position relative des stations s'inverse entre *D. polymorpha* et *D. r. bugensis*, suggérant des patrons de réponses inversés par rapport aux conditions du milieu. En explorant plus finement les réponses biologiques, nous pouvons dire que :

- *D. r. bugensis* présente sur l'axe F1, d'une manière générale, des réponses antioxydantes et antitoxiques plus faibles que *D. polymorpha* (TAC, GST), se traduisant par une peroxydation lipidique plus forte (LOOH). *D. r. bugensis* possède également plus de réserves énergétiques (triglycérides), alors que dans le même temps, *D. polymorpha* présente une activité ETS plus élevée (métabolisme intracellulaire plus actif).

- L'axe F2, qui structure les différences entre populations, est structuré par la LDH, et les quantités de cholestérol et de protéines. A ce stade, il est délicat d'interpréter l'inversion du patron de réponse entre les 2 espèces. Cependant, cette différence inter-spécifique marquée pointe la nécessité de correctement identifier les organismes prélevés sur le terrain pour éviter de brouiller l'information fournie par la mesure de biomarqueurs.

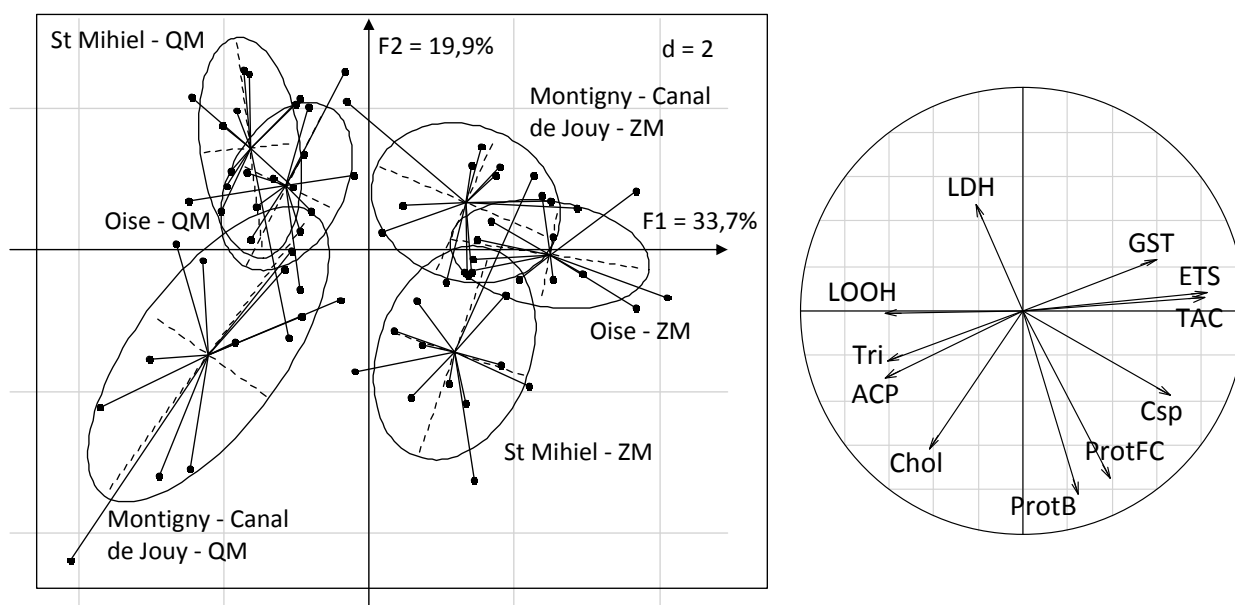


Figure 32 : Variabilité inter-spécifique des biomarqueurs pour les 3 stations où les deux espèces sont présentes en sympatrie échantillonnées en avril 2016. Plan factoriel F1F2 de l'ACP réalisée sur le tableau individus x biomarqueurs (72 lignes, 11 colonnes) et cercle des corrélations associé

Nous avons réalisé le même type d'analyse sur 4 autres stations (Montigny – Canal de Jouy, Oise, Seurre, Liverdun) où les deux espèces coexistent pour la campagne de février 2017. Cette seconde analyse confirme les différences interspécifiques observées précédemment, avec une séparation nette des réponses des deux espèces (Figure 33).

Contrairement à l'analyse précédente, il n'y a pas d'inversion de réponse le long de l'axe F2 entre les deux espèces pour les sites considérés ici. Cela suggère que sur ces sites les deux espèces ont les mêmes patrons de réponse par rapport aux conditions du milieu, bien que chaque espèce reste dans sa propre gamme de réponse.

Là encore *D. r. bugensis* présente, d'une manière générale, des réponses antioxydantes plus faibles, se traduisant par une peroxydation lipidique plus forte (LOOH), mais possède plus de réserves énergétiques que *D. polymorpha*.

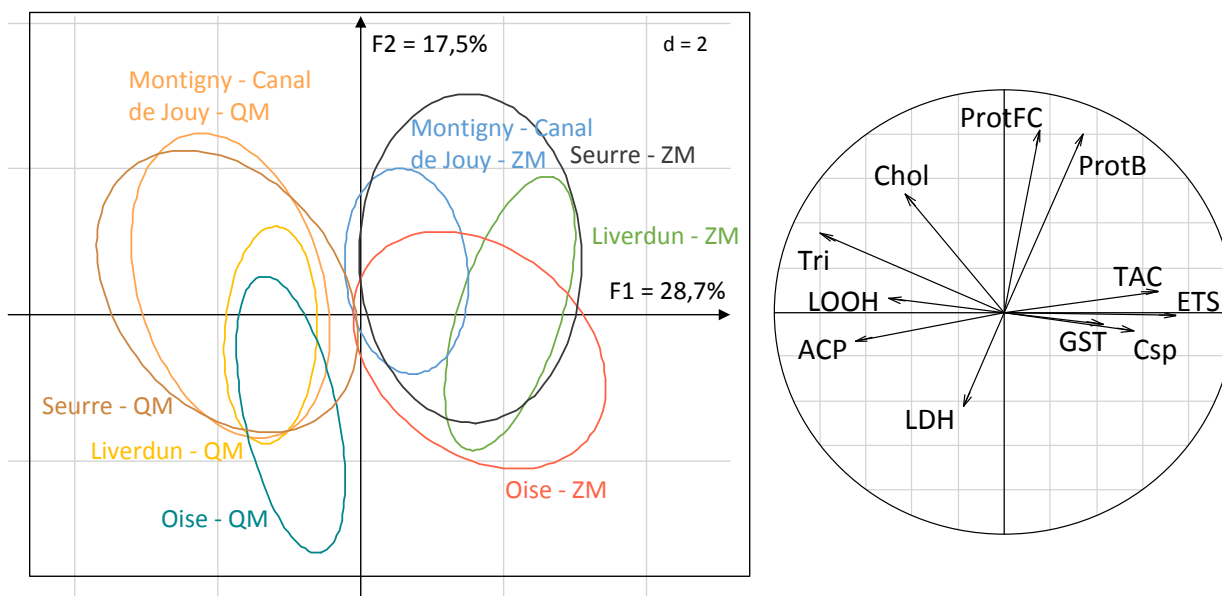


Figure 33 : Variabilité inter-spécifique des biomarqueurs pour les 4 stations où les deux espèces sont présentes en sympatrie échantillonnées en février 2017. Plan factoriel F1F2 de l'ACP réalisée sur le tableau individus x biomarqueurs (96 lignes, 11 colonnes) et cercle des corrélations associé

2. Variabilité intra-spécifique (inter-populations)

Outre ces variations inter-spécifiques, nous avons aussi souhaité évaluer l'existence de différences entre populations d'une même espèce (variations inter-populationnelles).

Pour *D. polymorpha* (Figure 34) il existe des différences de réponses entre populations, avec une séparation des ellipses correspondant aux différentes populations. Cette ACP reflète aussi l'effet saisonnier observé précédemment, avec les réponses du mois de février localisées principalement dans le quart supérieur gauche du plan factoriel, contrairement aux réponses du mois d'octobre. On peut également constater que les ellipses du mois d'octobre sont beaucoup plus étendues et plus éclatées les unes par rapport aux autres que celles du mois de février. Cela implique que (1) la variabilité inter-individuelle au sein de chaque population est plus importante en octobre, et que (2) les différences inter-populationnelles sont aussi plus marquées pour cette saison.

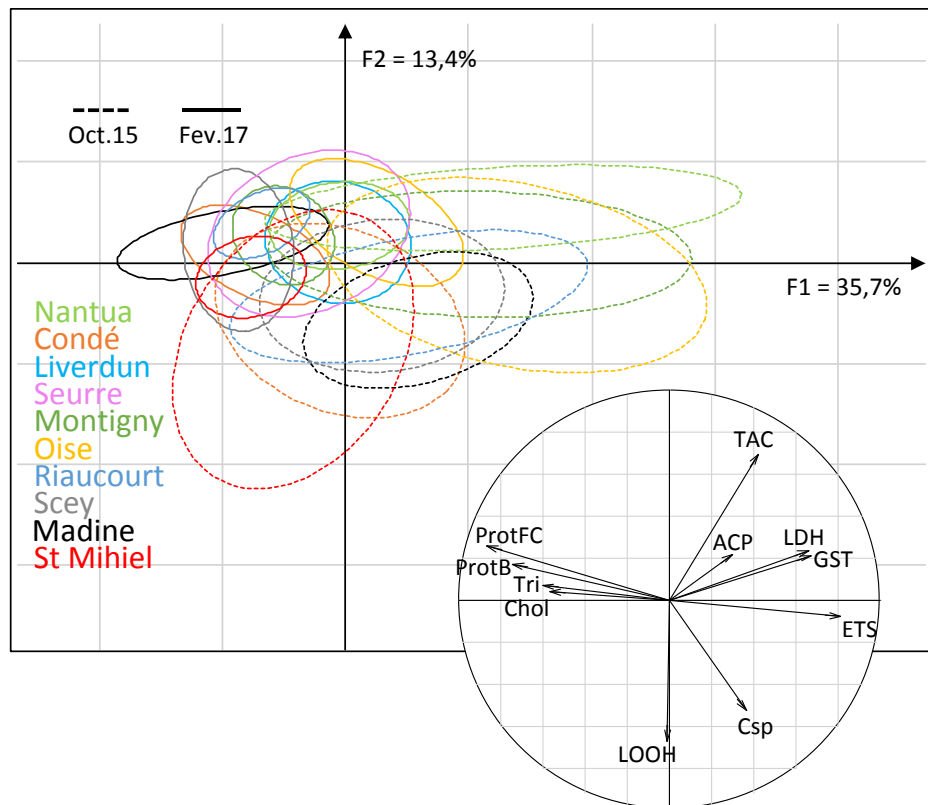


Figure 34 : Variabilité inter-populationnelle des biomarqueurs pour les populations de *D. polymorpha* échantillonnées en octobre 2015 et février 2017. Plan factoriel F1F2 de l'ACP réalisée sur le tableau individus x biomarqueurs (216 lignes x 11 colonnes) et cercle des corrélations associé

Des différences inter-populationnelles existent également pour *D. r. bugensis* (Figure 35). En revanche pour cette espèce, l'influence saisonnière est moins marquée, puisque les ellipses pour février et octobre sont globalement superposées. Ici aussi les ellipses du mois d'octobre sont beaucoup plus étendues et plus éclatées les unes par rapport aux autres que celles du mois de février, impliquant que (1) la variabilité inter-individuelle au sein de chaque population est plus importante en octobre, et que (2) les différences inter-populationnelles sont aussi plus marquées pour cette saison.

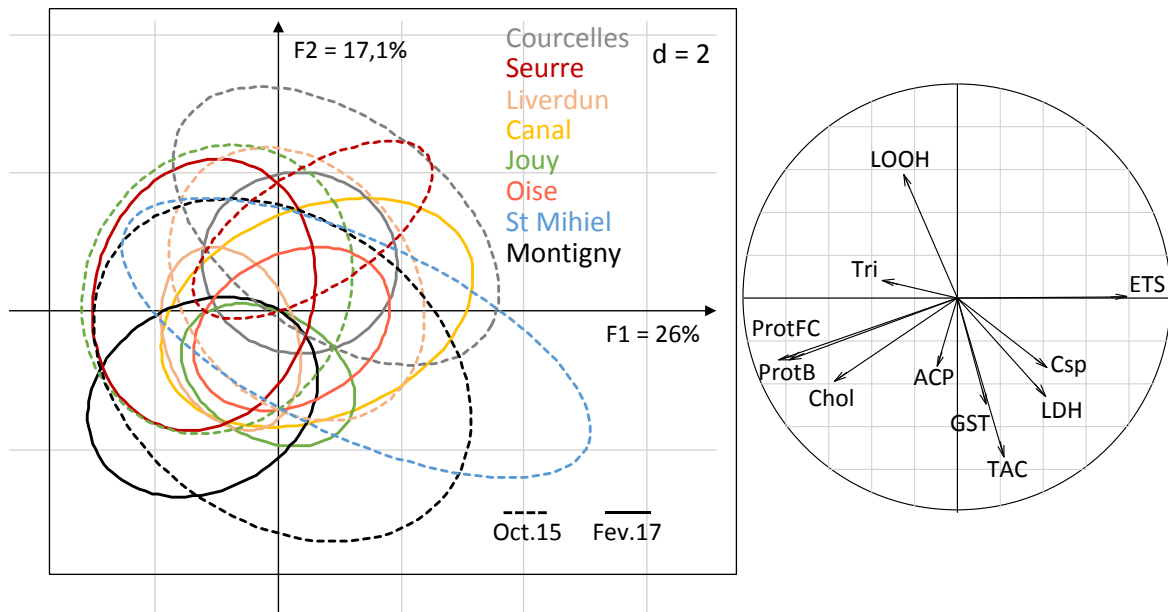


Figure 35 : Variabilité inter-populationnelle des biomarqueurs pour les populations de *D. r. bugensis* échantillonnées en octobre 2015 et février 2017. Plan factoriel F1F2 de l'ACP réalisée sur le tableau individus $\times$ biomarqueurs (156 lignes $\times$ 11 colonnes) et cercle des corrélations associé

3. Variabilité intra-spécifique, intra-site : le cas des « Big Zebra » de Condé-sur-l'Escaut

Comme mentionné lors de la présentation des sites, et au début de ce chapitre (p137), lors des campagnes terrain sur le site de Condé-Sur-l'Escaut (Nord), deux morphotypes de *D. polymorpha* ont été identifiés dans un seul étang, avec les deux types d'organismes parfois fixés sur les mêmes substrats rocheux (Figure 36). Les organismes de taille standard ($23,7 \pm 1,8$ mm de long) ont été nommés « ZM » et ceux de taille supérieure ($35,5 \pm 3,6$ mm de long) ont été nommés « BZM » (pour Big Zebra Mussels).



Figure 36: Deux morphotypes de *D. polymorpha* présents sur le site de Condé-sur-l'Escaut.

On peut voir sur ces images que les coquilles des organismes sont très noires ; cela est probablement lié au fait que ce site, réhabilité en étang de loisir, provienne de l'affaissement minier d'une ancienne mine de charbon.

Des identifications des isoformes de la SOD (qui sont différentes pour les deux espèces) ont été réalisées par Beatrice Rocher (Université le Havre Normandie), et on mit en évidence que les deux

morphotypes appartenait bien à l'espèce *polymorpha*. Toutefois nous avons pu constater lors des mesures des biomarqueurs que les deux morphotypes, bien qu'appartenant à la même espèce et vivant sur un même site, présentaient des réponses biochimiques différentes (Figure 37).

Ces résultats mettent en évidence des différences de réponses entre morphotypes en octobre 2015 ($p = 1.84 \cdot 10^{-3}$), mais pas en avril 2016 ($p = 0.19$). Pour un morphotype donné, les réponses des biomarqueurs peuvent varier avec la saison (ZM février 2017 $\neq$ ZM octobre 2015 ; BZM octobre 2015 $\neq$ BZM avril 2016). Globalement, les ZM présentent des réserves énergétiques plus importantes (protéines, triglycérides, cholestérol), alors que les biomarqueurs de défense sont plus actifs pour les BZM, notamment en octobre (TAC, ACP, GST, Csp).

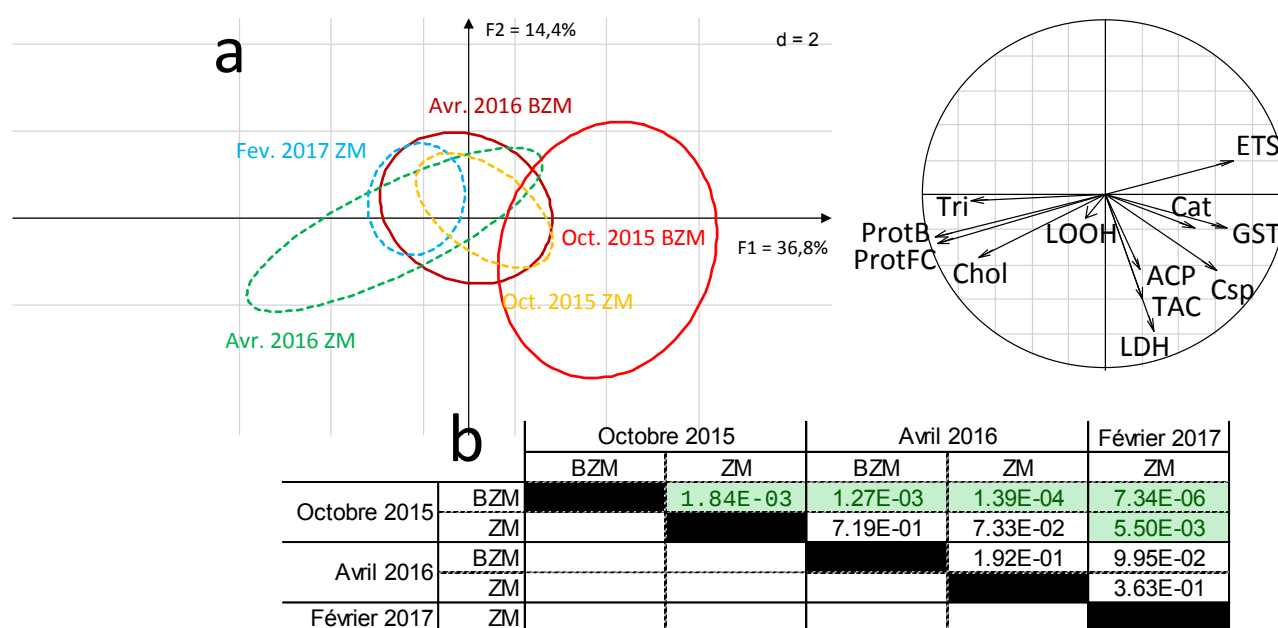


Figure 37 : Variabilité intra-site des biomarqueurs pour les deux morphotypes de *D. polymorpha* de taille standard (ZM) et élevée (BZM) échantillonnés en octobre 2015, avril 2016 et février 2017 sur le site de Condé-sur-l'Escaut. Plan factoriel F1F2 de l'ACP réalisée sur le tableau individus x biomarqueurs (58 lignes x 12 colonnes) et cercle des corrélations associé (a) et Tests de Hotelling (b) (les cadres verts indiquent une différence significative entre deux groupes)

Des mesures d'indice de condition et de volume de la coquille ont aussi été réalisées sur ces deux morphotypes aux différentes saisons (Figure 38). Les résultats indiquent que bien que le volume de la coquille soit largement supérieur pour les BZM, leur indice de condition est cependant moins bon que celui des ZM, témoignant d'un moins bon état de santé.

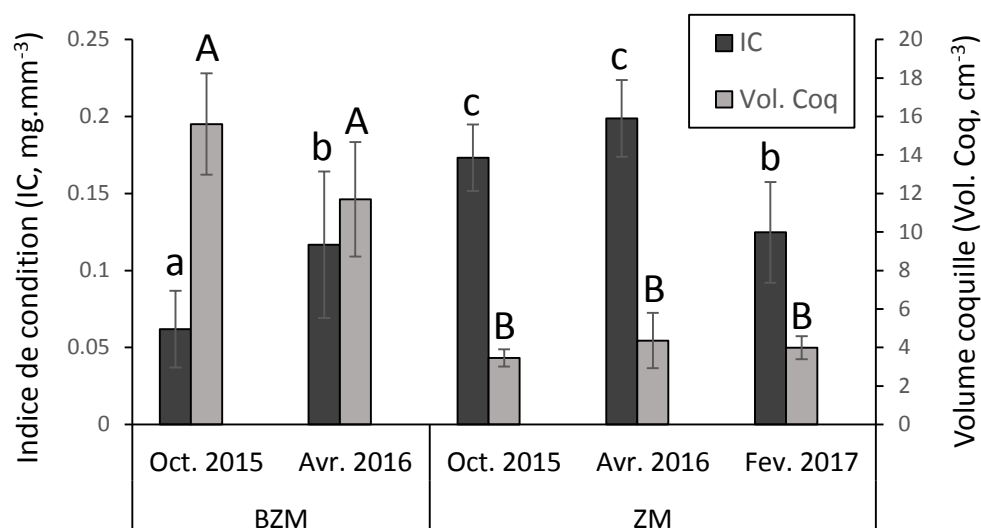


Figure 38 : Indices de condition (IC) et volumes de coquilles (Vol. coq.) pour les deux morphotypes de *D. polymorpha* de taille standard (ZM) et élevée (BZM) échantillonnés en octobre 2015, avril 2016 et février 2017 sur le site de Condé-sur-l'Escaut (moyenne $\pm$ écart type ; $n = 5$ pour BZM Oct. 15 ; $n = 12$ dans les autres cas). Les différences entre conditions pour chaque paramètre ont été testées avec une ANOVA suivie d'un test *post-hoc* de Tukey ; elles sont représentées en lettres minuscules pour l'IC et en majuscules pour le volume de la coquille ($p < 0.05$)

Ces résultats soulignent, en plus de tous les facteurs de variabilité mis en évidence dans ces travaux, l'importance de la variabilité au sein d'un même site et de l'impact de la morphologie des dreissènes sur leur physiologie. La morphologie et la symétrie des coquilles peuvent par exemple influencer la prévalence parasitaire (les individus de *D. polymorpha* présentant une coquille concave sont plus parasités par les ciliés, possiblement suite à une modification des flux d'eau dans la cavité mantellaire ; Minguez et al., 2012b). La morphologie peut également influencer l'activité locomotrice chez les dreissènes (Peyer et al., 2011).

Les différences de morphologie entre espèces de dreissènes, et au sein de chaque espèce sont bien référencées dans la littérature (Beggel et al., 2015 ; Teubner et al., 2016). Entre espèces, ces différences s'expliquent en partie par des différences de profondeur et de préférences pour le substrat ; au sein d'une même espèce, elles peuvent être liées à des différences de température, de salinité, et dépendre de la localisation des populations (Pavlova et Izyumov, 2014). Les différences morphologiques au sein d'un même site pour une espèce donnée sont en revanche peu référencées, mais peuvent être liées à la profondeur (Claxton et Mackie, 1998), ou aux gradients latitudinaux (Pavlova et Izyumov, 2014). Toutefois dans notre cas, la différence morphologique ne semble être liée ni à la profondeur ni à la latitude, puisque les deux morphotypes sont fréquemment trouvés simultanément sur les mêmes substrats rocheux. La différence morphologique entre ZM et BZM pourrait être liée à l'âge des organismes, mais dans ce cas il semblerait logique de retrouver aussi des organismes de taille plus importante sur les autres sites de prélèvement, ce qui n'est pas le cas. Il est également envisageable que les deux morphotypes observés puissent être issus de deux populations fondatrices différentes. Il faudrait

pour cela étudier les caractéristiques génétiques des 2 morphotypes, et connaître la date d'installation dans ce milieu pour évaluer la crédibilité d'une absence d'hybridation.

Partie III : Réponses des biomarqueurs au regard de la contamination des sites

L'objectif affiché de la convention BIOMICS est de mettre en évidence le potentiel des biomarqueurs pour évaluer la qualité des milieux aquatiques. Pour cela, nous avons choisi d'investiguer la variabilité des réponses biologiques entre populations, dans une démarche de biosurveillance passive, et de relier ces réponses aux paramètres abiotiques de leur milieu de vie.

1. Caractérisation de la contamination des sites

La DCE et autres directives et arrêtés associés ne fournissent quasiment aucun seuil de qualité pour les sédiments des cours d'eau intérieurs CF directives (UE, 2000, p. 60 ; UE, 2013, p. 105 ; UE, 2008). Ils identifient les substances prioritaires, et fournissent des NQE pour l'eau et le biote mais pas pour les sédiments. Faute de réglementation « récente » pour la qualité des sédiments issus des cours d'eau, nous avons réalisé deux classements de la contamination sédimentaire de nos sites :

- au regard de l'article 1^{er} de l'Arrêté du 9 août 2006, présentant un seuil de qualité pour 8 métaux lourds, ainsi que pour les HAP et PCB totaux (Tableau XI)

Tableau XI : Contamination sédimentaire au regard du Tableau IV de l'article 1er de l'Arrêté du 9 août 2006 concernant les niveaux relatifs aux éléments et composés traces pour les sédiments extraits de cours d'eau ou canaux. Lorsque la valeur S1 est atteinte pour un paramètre au moins, le site est classé > S1 (en orange)

	Somme HAP*	Somme PCB*	Al*	As*	Cd*	Cr*	Co*	Cu*	Fe*	Mn*	Hg*	Ni*	Pb*	Zn*
Seuil S1 ⁽¹⁾	22800	680	N.D.	30	2	150	N.D.	100	N.D.	N.D.	1	50	100	300
Octobre 2015														
Condé	8.838	0.0465	84.85	0.0082	0.0004	0.122	0.0179	0.0583	25.25	0.6958	0.0002	0.049	0.0304	0.1928
Courcelles	41.143	0.0175	23.07	0.0162	0.0547	0.0624	0.0061	0.079	14.74	0.3463	0.0045	0.0176	1.004	2.443
Nantua	16.981	0.0175	4.338	0.0045	0.0002	0.0422	0.0025	0.0398	6.848	0.1264	0.0005	0.0217	0.1435	0.128
Riaucourt	20.355	0.0175	25.84	0.0225	0.0003	0.1168	0.0077	0.0165	42.2	0.2354	5E-05	0.028	0.0252	0.1291
Scey	0.342	0.0175	49.25	0.024	0.0002	0.0583	0.008	0.013	19.13	0.1881	1E-05	0.016	0.0243	0.0483
Seurre	1.895	0.0175	43.79	0.0154	0.0008	0.0597	0.0081	0.1085	22.9	0.3729	0.0001	0.0236	0.0348	0.265
Oise	1.684	0.0175	15.92	0.0036	0.0001	0.0465	0.0039	0.0121	11.15	0.2582	7E-05	0.0086	0.0157	0.0602
St Mihiel	2.035	0.0175	29.58	0.0078	0.0003	0.0539	0.0072	0.0231	17.23	0.2042	6E-05	0.0226	0.0186	0.1225
Jouy	3.949	0.0175	65.68	0.0264	0.001	0.0933	0.0133	0.0441	40.48	0.6929	0.0002	0.042	0.0618	0.2759
Liverdun	11.897	0.1145	57.31	0.0306	0.0009	0.0808	0.01	0.0296	41.09	0.4701	0.0003	0.0241	0.3554	0.8539
Madine	3.191	0.0175	8.708	0.0219	0.0002	0.023	0.0054	0.0059	24.23	0.3365	2E-05	0.0106	0.0085	0.0413
Montigny (Jouy)	27.488	0.0175	40.84	0.0114	0.0003	0.0815	0.0068	0.0449	27.66	0.8823	4E-05	0.016	0.0697	0.1099
Février 2017														
Condé	6.307	0.176	25.64	0.0071	0.0005	0.1462	0.0165	0.0644	20.86	1.963	7E-05	0.0388	0.0458	0.1829
Courcelles	20.711	0.0285	24.18	0.0192	0.0595	0.0693	0.0067	0.0807	17.16	0.3196	0.0041	0.0192	0.9823	2.851
Nantua	3.071	0.0175	3.268	0.0026	0.0001	0.0149	0.001	0.0191	4.869	0.0965	0.0001	0.005	0.0322	0.0925
Riaucourt	15.28	0.0175	20.36	0.0292	0.0001	0.1217	0.0076	0.0138	50.98	0.236	5E-05	0.0292	0.0309	0.1309
Scey	1.438	0.0175	68.45	0.0324	0.0008	0.0898	0.0159	0.0885	40.28	0.5885	0.0002	0.0434	0.0627	0.4323
Seurre	2.197	0.0175	40.21	0.018	0.0005	0.061	0.0103	0.0223	23.78	0.5076	0.0003	0.0234	0.0251	0.1643
Oise	1.268	0.0175	20.5	0.0057	0.0003	0.0626	0.0054	0.0139	14.31	0.3387	8E-05	0.0129	0.0177	0.0717
St Mihiel	2.936	0.0175	41.71	0.0082	0.0004	0.0501	0.0071	0.0379	22.88	0.208	7E-05	0.0234	0.0261	0.1486
Jouy	16.95561	0.022	78.69	0.0241	0.001	0.0854	0.0111	0.0492	37.71	0.5248	0.0002	0.0348	0.0669	0.2448
Liverdun	0.838	0.0175	63.48	0.0147	0.0001	0.0601	0.0039	0.01	12.76	0.1238	4E-05	0.01	0.0429	0.0769
Madine	0.279	0.0175	15.16	0.0101	0.0001	0.0416	0.0028	0.008	10.03	0.2578	1E-05	0.0115	0.0135	0.0303
Montigny (Jouy)	2.287	0.0175	36.6	0.0084	0.0001	0.0845	0.0031	0.0144	18.35	0.4831	1E-05	0.009	0.0339	0.0356
Montigny (Metz)	2.783	0.0175	36.4	0.0109	0.0001	0.1136	0.0039	0.0134	16.72	0.2596	8E-05	0.0127	0.0272	0.0625

* résultats exprimés en mg/kg

⁽¹⁾ en mg/kg de sédiment sec analysé sur la fraction inférieure à 2 mm

- par un test de rang, permettant de construire un gradient de contamination des sites. Pour construire ce gradient (Tableau XII), nous avons transformé la variable quantitative associée à chaque contaminant en une variable discrète représentant le rang de chaque station au sein de l'ensemble des stations étudiées. Les rangs sont alors sommés pour tous les contaminants (Rang total), ou par classe de polluants (organiques et métaux).

Tableau XII: Classement par rang des 13 sites étudiés réalisé sur les paramètres de contamination des sédiments. Les codes couleurs correspondent aux 4 stations ayant le plus faible niveau de contamination (vert), aux 4 (octobre) ou 5 (février) avec les niveaux intermédiaires (orange pâle) et enfin les 4 stations avec les plus haut niveaux rencontrés (orange foncé)

	Octobre 2015			Février 2017		
	Rang total	Rang organiques	Rang métaux	Rang total	Rang organiques	Rang métaux
Oise	69	38	31	102	41	61
Scey	71	17	54	193	51	142
Madine	86	50	36	46	18	28
St Mihiel	102	46	56	166	87	79
Seurre	131	36	95	161	59	102
Nantua	140	90	50	129	92	37
Jouy	181	61	120	262	130	132
Riaucourt	188	105	83	203	118	85
Montigny (canal de Jouy)	198	118	80	124	64	60
Courcelles	221	125	96	265	152	113
Condé	234	123	111	308	195	113
Liverdun	269	152	117	82	27	55
Montigny (canal de Metz)				145	81	64

Si on se fie au Tableau XI ci-dessus, nos sites sont de bonne qualité. Toutefois, les seuils reportés dans cet Arrêté sont très élevés, et l'utilisation du classement de nos sites sur la base du test de rang nous a semblé plus pertinente.

L'ACP réalisée sur la contamination des sédiments (Figure 39) isole le site de Courcelles, sur le canal de la Deûle, un ancien site Metaleurop. Ce site est caractérisé par une forte charge en HAP et en métaux lourds (Hg, Pb, Zn, Cd, Cu...). Le site de Condé sur l'axe 2 se distingue par un fort niveau en PCB. Les autres sites présentent un gradient de contamination structuré essentiellement par les métaux.

L'autre enseignement majeur de cette analyse est la variabilité saisonnière de la contamination des sédiments. Les sédiments sont réputés être un compartiment intégrateur dans le temps de la contamination du milieu, et les analyses de la contamination des sédiments reflèteraient alors un état moyen de la charge en polluant du milieu. Cependant, comme nous pouvons le voir notamment pour Condé, Liverdun, Jouy ou encore Montigny – Canal de Jouy, le profil change radicalement entre octobre 2015 et février 2017. Cela souligne la nécessité de réaliser ces échantillonnages du sédiment à chaque campagne biomarqueurs, ce que nous n'avons pas fait en avril 2016, si l'on souhaite étudier finement les liens entre les compartiments biotiques et abiotiques.

C'est pourquoi, lorsque nous mettrons en relation les biomarqueurs avec la contamination des sites, nous nous limiterons aux 2 campagnes pour lesquelles ces informations ont été collectées simultanément (octobre 2015 et février 2017).

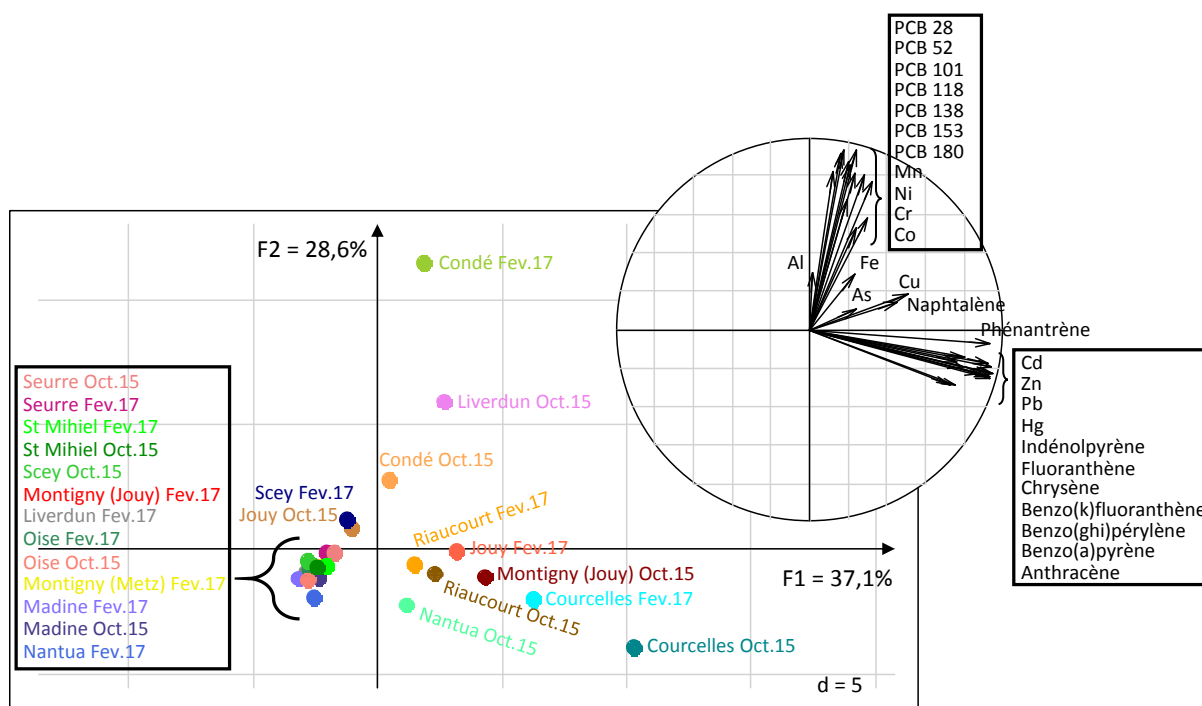


Figure 39 : Résultats de l'ACP du tableau de contamination des sédiments pour les 29 contaminants mesurés pour 12 sites x 2 saisons (octobre 2015 : Oct.15 ; février 2017 : Feb.17), sauf pour le site Montigny – Canal de Metz analysé uniquement en février 2017

2. Caractérisation de la physico-chimie des sites étudiés

Les ACP réalisées sur les données physico-chimiques de la colonne d'eau pour les deux (octobre 2015 et février 2017 ; Figure 40) ou trois dates d'échantillonnage (octobre 2015, avril 2016, février 2017 ; Figure 41) mettent en évidence la relative stabilité de ces paramètres aux différentes dates d'échantillonnage.

Ces deux analyses mettent toutefois en évidence la position particulière du site de Condé, une ancienne mine de charbon reconvertie en étang, ce qui explique sa forte DBO₅.

Les autres sites présentent un gradient le long de l'axe 1, relié à la minéralisation du milieu, avec sites sur la Moselle occupant une place à part. Pour ces sites (Jouy et les 2 sites de Montigny), nous pouvons observer une certaine variabilité entre les dates d'échantillonnage, particulièrement sur la Figure 41 : cela est lié au prélèvement d'avril 2016, effectué pendant une période de très forts débits, ayant entraîné une dilution des apports salins et donc une baisse notable de la minéralisation (autour de 800 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ contre 1900 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ habituellement).

Les plans factoriels mettent également en évidence la grande similitude, du point de vue chimie de l'eau, des autres sites échantillonnés. Ces paramètres ne joueront donc, a priori, qu'un rôle marginal sur la réponse biologique des organismes.

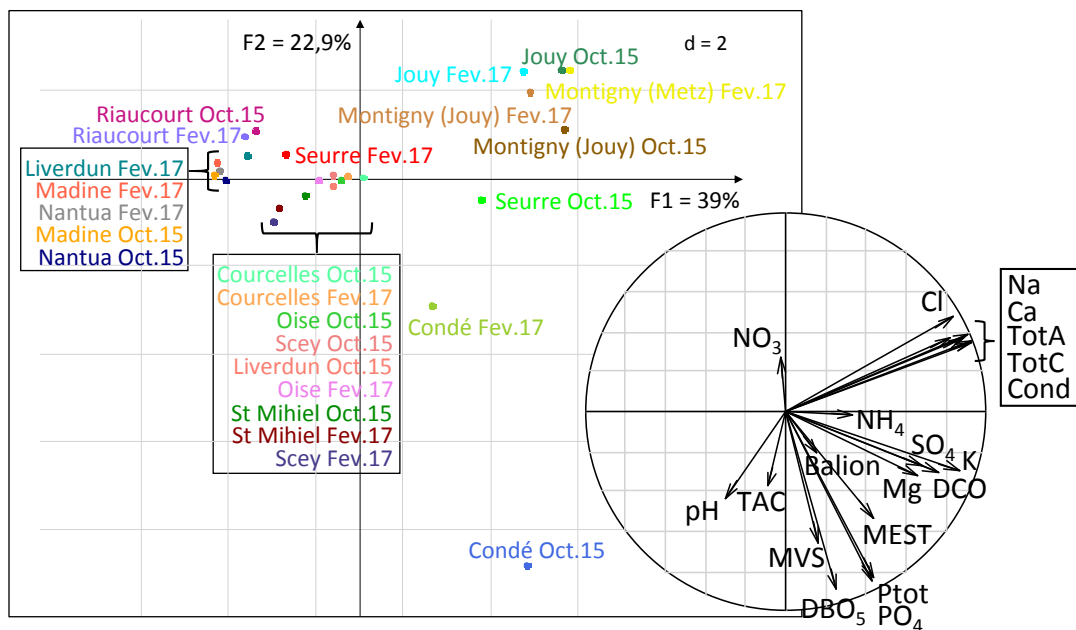


Figure 40 : Résultats de l'ACP du tableau de physico-chimie de la colonne d'eau pour les 20 paramètres mesurés pour 12 sites x 2 saisons (octobre 2015 : Oct.15 ; février 2017 : Fev.17), sauf pour le site Montigny – Canal de Metz analysé uniquement en février 2017

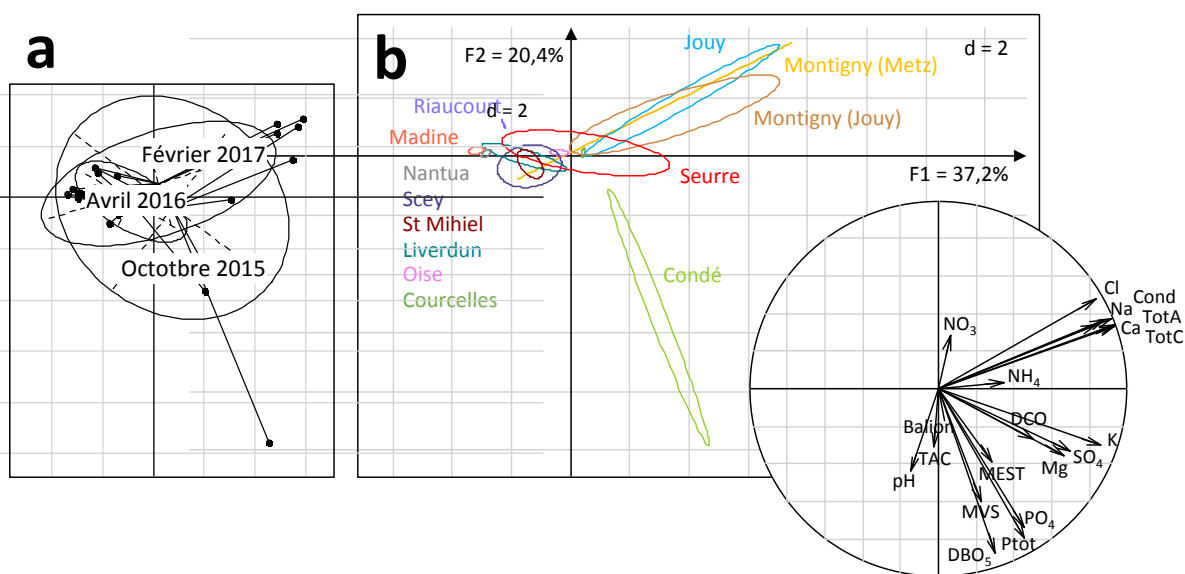


Figure 41 : Résultats de l'ACP du tableau de physico-chimie de la colonne d'eau pour les 20 paramètres mesurés pour 12 sites x 3 saisons, plus le site de Montigny – Canal de Metz analysé uniquement en avril 2016 et février 2017

3. Bioaccumulation des contaminants *in situ*

Les concentrations internes en contaminants n'ont été mesurées qu'en février 2017. Les contaminants suivis sont les mêmes que ceux mesurés dans les sédiments, sauf pour le naphthalène qui a été oublié lors de la création du devis. L'analyse des données révèle une plus forte tendance à la bioaccumulation chez *D. r. bugensis*, quelle que soit la famille de contaminants considérée (Figure 42).

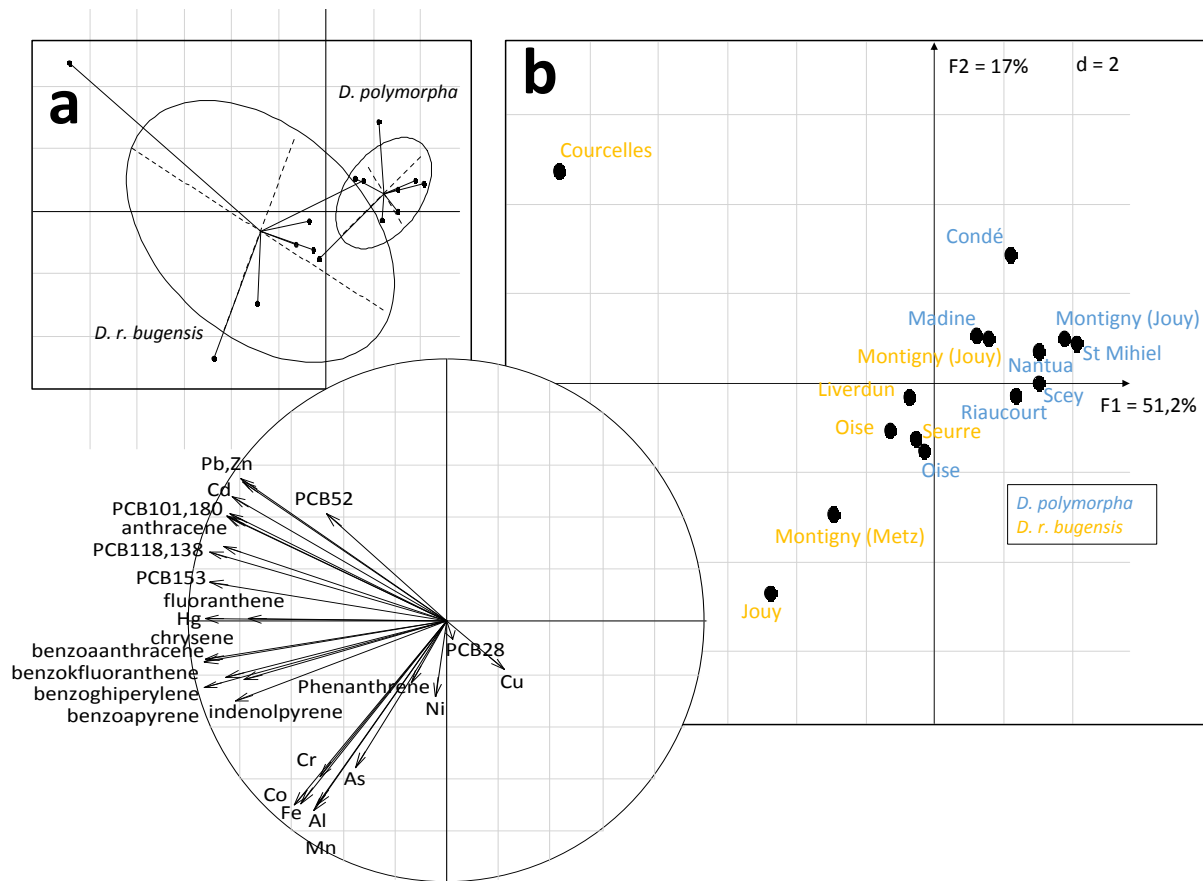


Figure 42 : Résultats de l'ACP sur les données de bioaccumulation par les organismes (15 stations x 28 contaminants) pour février 2017

4. Caractérisation des réponses biologiques

L'idée ici est de mettre en relation les réponses biologiques avec les paramètres environnementaux, afin de tenter de dégager une batterie de biomarqueurs apte à décrire un état de contamination du milieu.

Comme nous l'avons vu précédemment, la variabilité saisonnière, à la fois dans la contamination des sédiments et dans les réponses biologiques, nous a conduits à traiter les données indépendamment pour les 2 dates (octobre 2015 et février 2017).

Une première approche a consisté en l'étude des co-structures entre les différentes informations collectées : chimie de l'eau, contamination des sédiments, concentrations internes et biomarqueurs. Cette analyse se fait par l'étude de la co-inertie, dont les résultats sont synthétisés dans le Tableau XIII.

Tableau XIII : Résultats des 18 co-inerties réalisées pour étudier les co-structures des jeux de données disponibles. Chaque co-inertie est basée sur le croisement de deux ACP (par exemple une ACP entre la contamination des sédiments et une entre les concentrations internes en contaminants pour la première ligne du

tableau). Les co-inerties significatives (c'est-à-dire révélant une structure commune aux deux jeux de données) sont en gras

Costructure analysée	Total		<i>D. polymorpha</i>		<i>D. r. bugensis</i>	
	Octobre 2015	Février 2017	Octobre 2015	Février 2017	Octobre 2015	Février 2017
Contamination des sédiments vs bioaccumulation		0.039		0.536		0.016
Contamination des sédiments vs biomarqueurs	0.147	0.898	0.355	0.966	0.816	0.463
Chimie de l'eau vs biomarqueurs	0.08	0.228	0.974	0.946	0.004	0.346
Bioaccumulation vs biomarqueurs		0.003		0.415		0.021

Les résultats montrent globalement peu de co-structures significatives. La tendance à la bioaccumulation des polluants de *D. r. bugensis* décrite précédemment se traduit par une co-structure significative entre la contamination des sédiments et les concentrations internes, patrons non retrouvés pour *D. polymorpha*. Pour *D. r. bugensis* on retrouve également un lien entre les concentrations internes en contaminants et les réponses des biomarqueurs, ce qui n'est pas vrai chez *D. polymorpha*.

D'une manière générale, nous voyons que ces analyses conduisent à dire que les biomarqueurs ne répondent pas à la diversité des profils de contamination rencontrés sur le terrain.

Ce premier constat nous a conduits à procéder différemment, et à repenser notre stratégie d'analyse des données. En effet, l'objectif n'est pas de comprendre comment les paramètres du milieu influencent les réponses biomarqueurs, mais plutôt de voir comment les biomarqueurs traduisent un état de contamination du milieu, évalué ici au travers de la contamination des sédiments.

Pour répondre plus spécifiquement à cette question, nous avons développé une autre approche, à l'aide d'une régression PLS (Partial Least Squares, régression des moindres carrés). La régression PLS est une technique de régression qui vise à prédire les valeurs prises par un groupe de variables Y (variables à prédire, variables cibles, variables expliquées) à partir d'une série de variables X (variables prédictives, descripteurs, variables explicatives). Elle permet de traiter simultanément un grand nombre de descripteurs, même quand l'information qu'ils apportent est redondante. Pour toutes les PLS réalisées, les valeurs ont systématiquement été retenues sur les 3 premiers facteurs (il est difficile de représenter un espace à plus de trois dimensions). Les VIP (Variable Importance in the Projection) indiquent l'importance relative des biomarqueurs dans l'explication de la contamination. Ici nous n'avons retenu que les VIP pour le troisième facteur (prises à la suite, les colonnes rendent compte de l'évolution du rôle de la variable à mesure que l'on intègre l'information, c'est pour cela que nous avons conservé la dernière). Les seuils de significativité ont été arbitrairement fixés à 60% pour la variance expliquée cumulée, à 0.8 pour les R^2 cumulés et à 1 pour les VIP.

Trois questions ont été traitées : la contamination des sédiments est-elle expliquée par les réponses des biomarqueurs ? La contamination des sédiments est-elle expliquée par la bioaccumulation ? La bioaccumulation des contaminants est-elle expliquée par les réponses des biomarqueurs ?

4.1. La contamination des sédiments expliquée par les biomarqueurs

Cette première PLS, dont les résultats sont présentés dans le Tableau XIVa, visait à voir si les biomarqueurs sont aptes à refléter la contamination sédimentaire.

Pour les deux espèces aux deux saisons, plus de 70% de la variation des descripteurs est expliquée par les trois premiers facteurs (variables latentes). Cela veut dire qu'une grande partie de l'information apportée par les biomarqueurs (descripteurs) est bien retranscrite. Concernant les variables cibles, la variance expliquée permet d'observer le pouvoir explicatif du modèle. La proportion de variance expliquée des variables cibles est ici toujours plus faible que celles des variables explicatives. Ici, le modèle est meilleur pour *D. r. bugensis* : 67.4 et 60.2% de la variabilité des Y sont expliquées par les 3 premiers facteurs pour octobre et février respectivement, contre seulement 50.6 et 38.5% pour *D. polymorpha*. Plus la proportion de variance cumulée est proche de 1, plus la connaissance des variables explicatives (biomarqueurs) permet de prédire avec certitude les valeurs prises par les variables expliquées (contaminants sédimentaires). Autrement dit ici, les réponses des biomarqueurs chez *D. r. bugensis* reflètent bien la contamination sédimentaire contrairement à *D. polymorpha* qui présente un pourcentage de variabilité expliquée faible.

Si on regarde la variance expliquée cumulée des variables (R^2 cumulé), les deux tableaux R^2 indiquent la corrélation de chaque variable (explicative et expliquée) avec les facteurs, c'est-à-dire la proportion de variance expliquée pour chaque variable sur les 3 facteurs retenus. Certains biomarqueurs ont un poids déterminant sur les 3 premiers facteurs, mais ce ne sont pas les mêmes selon l'espèce, ni selon la saison. Pour identifier les biomarqueurs d'importance, il faut recouper ce tableau avec celui des VIP. Pour *D. r. bugensis* en octobre, les concentrations en protéines et en cholestérol, et les activités ETS, ACP et TAC reflètent les niveaux de contamination. En février on retrouve toujours les protéines, l'ETS et l'ACP, mais également l'activité des caspases et l'IBR. Pour *D. polymorpha* en octobre, on retrouve les ProtB, les triglycérides et le cholestérol, les activités GST, TAC, Csp et l'IBR. Pour le mois de février, les ProtFC, les triglycérides, les LOOH, l'activité GST et l'IBR. Toutefois, rappelons que pour cette espèce (*D. polymorpha*), le pourcentage de variance totale expliquée est inférieur au seuil de significativité de 60% : même si ces biomarqueurs semblent être les plus pertinents, ils ne reflètent pas forcément bien la contamination sédimentaire.

Pour *D. r. bugensis*, la plupart des contaminants, sauf les PCB, ont aussi un poids déterminant dans la construction de ces trois premiers facteurs. Il existe donc une liaison entre les biomarqueurs d'importance et certains contaminants (les HAP et les métaux surtout). Ce n'est pas vrai pour *D. polymorpha*.

4.2. La bioaccumulation expliquée par les biomarqueurs

Pour cette deuxième PLS (Tableau XIVb), le but était de voir si les réponses des biomarqueurs étaient capables de refléter l'accumulation des contaminants par les organismes.

Là encore, en regardant la variance expliquée cumulée, on voit que les réponses des biomarqueurs reflètent bien l'accumulation des contaminants dans les tissus mous, de façon plus prononcée pour *D. r. bugensis* que pour *D. polymorpha*.

Pour *D. polymorpha*, les réponses des biomarqueurs sont surtout reliées à l'accumulation de certains métaux (Cd, Co, Fe, Pb), mais pas tous. Pour *D. r. bugensis*, elles sont surtout reliées à l'accumulation des contaminants organiques (HAP et PCB). Si on compare avec la partie précédente, pour *D. r. bugensis*, les biomarqueurs reflètent l'accumulation des PCB par les organismes, mais pas leur présence dans les sédiments.

Contrairement à la relation entre les biomarqueurs et la contamination sédimentaire, où les biomarqueurs d'importance étaient différents entre les deux espèces, ici ce sont quasiment les mêmes qui reflètent l'accumulation des contaminants dans les tissus mous : ProtB, ETS, ACP et GST, même s'il convient de rappeler que pour *D. polymorpha* ces biomarqueurs sont surtout reliés à l'accumulation des métaux, alors qu'ils sont reliés à l'accumulation des organiques pour *D. r. bugensis*.

4.3. La contamination des sédiments expliquée par la bioaccumulation

Enfin, la dernière PLS visait à étudier le lien entre l'accumulation des contaminants dans les tissus mous des organismes et la contamination sédimentaire (Tableau XV).

Concernant la variance expliquée cumulée, on voit que pour deux espèces, l'accumulation des contaminants dans les tissus mous reflète bien la contamination sédimentaire.

Si on regarde les R^2 , on voit que c'est surtout vrai pour les contaminants organiques : *D. polymorpha*, constitue un bon indicateur de la présence de PCB dans les sédiments, alors que *D. r. bugensis* reflète plutôt la présence de HAP. C'est moins vrai pour les métaux, probablement car ce ne sont pas des composés lipophiles, et qu'ils sont probablement accumulés et détoxiqués différemment par les organismes.

Tableau XV : Résultats de la régression PLS concernant le lien entre l'accumulation des contaminants dans les tissus mous et la contamination sédimentaire

CONTAMINATION DES SEDIMENTS EXPLIQUEE PAR LA BIOACCUMULATION					
Février 2017			Février 2017		
	<i>D. r. bugensis</i>	<i>D. polymorpha</i>		<i>D. r. bugensis</i>	<i>D. polymorpha</i>
	Variance expliquée cumulée sur 3 axes (%)			R ² cumulé sur 3 axes - Variables expliquées	
Variables explicatives	88.04	72.04	Anthracène	0.80	0.75
Variables expliquées	62.95	68.34	Benzo(a)anthracène	0.88	0.75
	R ² cumulé sur 3 axes - Variables explicatives		Benzo(a)pyrène	0.84	0.75
Bioacc-Anthracène	0.98	0.86	Benzo(ghi)pérylène	0.84	0.77
Bioacc-Benzo(a)anthracène	0.87	0.81	Benzo(k)fluoranthène	0.86	0.76
Bioacc-Benzo(a)pyrène	0.98	0.67	Chrysène	0.87	0.75
Bioacc-Benzo(ghi)pérylène	0.84	0.28	Fluoranthène	0.98	0.75
Bioacc-Benzo(k)fluoranthène	0.84	0.33	Indénolpyrène	0.81	0.77
Bioacc-Chrysène	0.94	0.94	PCB 101	0.00	0.92
Bioacc-Fluoranthène	0.92	0.47	PCB 118	0.00	0.92
Bioacc-Indénolpyrène	0.72	0.69	PCB 138	0.99	0.92
Bioacc-Phénanthrène	0.94	0.16	PCB 153	0.86	0.92
Bioacc-PCB 101	0.99	0.98	PCB 180	0.00	0.92
Bioacc-PCB 118	0.99	0.95	PCB 28	0.00	0.92
Bioacc-PCB 138	0.95	0.93	PCB 52	0.00	0.92
Bioacc-PCB 153	0.92	0.91	Phénanthrène	0.80	0.81
Bioacc-PCB 180	0.97	0.85	Al	0.49	0.25
Bioacc-PCB 28	0.10	0.91	As	0.46	0.36
Bioacc-PCB 52	0.89	1.00	Cd	0.99	0.20
Bioacc-Al	0.69	0.69	Cr	0.55	0.75
Bioacc-As	0.79	0.67	Co	0.36	0.61
Bioacc-Cd	1.00	0.82	Cu	0.88	0.46
Bioacc-Cr	0.87	0.97	Fe	0.62	0.65
Bioacc-Co	0.90	0.75	Mn	0.21	0.88
Bioacc-Cu	0.93	0.43	Hg	0.98	0.15
Bioacc-Fe	0.99	0.88	Ni	0.57	0.62
Bioacc-Mn	0.94	0.61	Pb	0.99	0.57
Bioacc-Hg	0.91	0.64	Zn	0.99	0.33
Bioacc-Ni	0.82	0.96	Total expliqué	0.63	0.68
Bioacc-Pb	0.99	0.74			
Bioacc-Zn	0.99	0.31			
Total expliqué	0.88	0.72			
VIP sur 3 axes					
Bioacc-Anthracène	1.09	1.76			
Bioacc-Benzo(a)anthracène	1.08	0.77			
Bioacc-Benzo(a)pyrène	1.08	0.85			
Bioacc-Benzo(ghi)pérylène	0.99	0.96			
Bioacc-Benzo(k)fluoranthène	0.93	0.64			
Bioacc-Chrysène	1.10	0.77			
Bioacc-Fluoranthène	1.04	0.62			
Bioacc-Indénolpyrène	1.17	1.12			
Bioacc-Phénanthrène	0.95	0.60			
Bioacc-PCB 101	1.09	1.30			
Bioacc-PCB 118	1.10	0.98			
Bioacc-PCB 138	1.07	1.08			
Bioacc-PCB 153	1.05	1.41			
Bioacc-PCB 180	1.20	1.00			
Bioacc-PCB 28	0.33	1.06			
Bioacc-PCB 52	1.05	1.23			
Bioacc-Al	0.81	0.70			
Bioacc-As	1.10	1.12			
Bioacc-Cd	1.13	1.09			
Bioacc-Cr	0.77	1.24			
Bioacc-Co	0.89	0.46			
Bioacc-Cu	0.71	0.94			
Bioacc-Fe	0.76	0.68			
Bioacc-Mn	0.96	0.71			
Bioacc-Hg	1.15	1.11			
Bioacc-Ni	0.64	1.40			
Bioacc-Pb	1.12	0.63			
Bioacc-Zn	1.12	0.32			

Partie IV : Conclusion

Ce chapitre regroupe l'ensemble des résultats obtenus *in situ*, et les données de caractérisation des sites et de réponses des organismes constituent une base de travail pour les expérimentations qui ont été réalisées en laboratoire.

Dans le contexte du déploiement à large échelle des biomarqueurs chez les dreissenidés, les résultats nous permettent de lister les points de vigilance suivants :

- L'identification de l'espèce (*D. polymorpha* ou *D. r. bugensis*) doit être réalisée avec certitude, puisque les réponses des deux espèces utilisées ici sont clairement différentes, peu importe la saison, la physico-chimie du milieu, le site d'origine et son état de contamination.
- Pour les deux espèces, la saison de prélèvement ne semble pas importante dans le contexte d'une étude sur plusieurs sites, puisque les patrons de réponses sont stables d'une saison à l'autre.
- Dans tous les cas, la variabilité saisonnière des niveaux de réponse ne permet pas, pour l'heure, une interprétation « absolue » de la mesure, hors référentiel.
- Toujours concernant la saison, nous préconisons d'éviter l'hiver (février ici), saison pendant laquelle la dispersion des réponses est moindre, et donc la discrimination des sites plus ardue (la contrainte environnementale à cette période de l'année canalise les réponses)
- Il existe des différences inter-populationnelles au niveau des réponses des biomarqueurs, qui sont plus marquées en automne (octobre) qu'en hiver (février).
- Les réponses des biomarqueurs chez *D. r. bugensis* peuvent renseigner sur la contamination des sédiments par les HAP et les métaux, mais pas par les PCB. En revanche les réponses des biomarqueurs chez *D. polymorpha* reflètent assez mal la contamination sédimentaire.
- Les réponses des biomarqueurs sont capables de refléter l'accumulation des contaminants par les organismes ; pour *D. polymorpha*, ce sont quelques métaux qui sont concernés ; pour *D. r. bugensis* ce sont plutôt les contaminants organiques (HAP et PCB).
- L'accumulation des PCB par *D. r. bugensis* reflète bien la contamination sédimentaire pour ces composés ; pour *D. polymorpha* ce sont plutôt les HAP.
- Certains biomarqueurs, comme l'ETS, l'ACP, la GST et la TAC semblent mieux refléter la contamination sédimentaire et l'accumulation des contaminants par les organismes
- L'heure de prélèvement n'influence pas la valeur des biomarqueurs, et n'est donc pas une contrainte dans les programmes de biosurveillance.

En définitive, *D. r. bugensis* semble avoir des réponses plus plastiques et serait plus apte à refléter la contamination du milieu que *D. polymorpha*. L'accumulation des contaminants organiques (lipophiles) par les organismes reflète bien leur présence dans les sédiments. Pour les métaux, ce seront plutôt les biomarqueurs qui seront indicateurs de leur présence.

Les deux espèces présentent des réponses différentes, qu'il est nécessaire d'intégrer dans les campagnes de biosurveillance.

La contamination des sites n'explique pas totalement les différences inter-populationnelles observées au sein d'une espèce donnée. C'est pourquoi une autre partie des travaux, présentée dans le chapitre 4, s'est focalisée sur la tolérance et les capacités de modulation des biomarqueurs dans certaines de nos populations.

Chapitre 3 : Variabilité des biomarqueurs *in situ*

A RETENIR

- De nombreux facteurs de variabilité influencent les réponses des biomarqueurs : variabilité saisonnière, inter-annuelle, inter-spécifique, inter-populationnelle, intra-site
- La distinction entre les deux espèces doit être réalisée avec certitude
- Les patrons de réponse sont stables d'une saison à l'autre mais la collecte de données intégrant les paramètres du milieu est nécessaire pour construire des grilles d'interprétation fiables des réponses biologiques en fonction des périodes de prélèvement
- L'heure de prélèvement, en automne, n'influence pas les réponses des biomarqueurs au niveau sub-cellulaire
- Des différences inter-populationnelles existent et sont plus marquées en automne qu'en hiver
- Les biomarqueurs reflètent bien la contamination sédimentaire et l'accumulation des contaminants dans les tissus mous pour *D. r. bugensis* ; la relation est moins nette pour *D. polymorpha*
- L'accumulation des contaminants organiques dans les tissus mous reflète bien la contamination sédimentaire pour ces composés ; la relation est moins nette pour les métaux

Chapitre 4 : Tolérance et mécanismes d'acclimatation ou d'adaptation des organismes

Ce chapitre présente les expérimentations réalisées en laboratoire dans le but d'étudier la modulation des biomarqueurs et la tolérance des différentes populations face à une contamination. La plupart de ces résultats sont présentés sous forme de publications (en anglais) ; un résumé en français présentant les méthodes et les principaux résultats est fourni avant chaque publication. Ces expérimentations avaient pour but tout d'abord d'établir des liens entre les réponses des bivalves observées sur le terrain et celles obtenues face à un stress standardisé, et ensuite d'évaluer les capacités de tolérance et le comportement des biomarqueurs chez plusieurs populations des deux espèces en présence de facteurs de stress plus intenses que ceux rencontrés *in situ*.

Partie I : Comparaison inter-spécifique de la modulation des réponses des biomarqueurs en conditions de stress croisé (publication n°2)²⁶

Durant cette expérimentation, nous avons voulu tester l'impact d'un stress croisé sur les réponses des biomarqueurs chez les deux espèces modèles. Ici, nous avons testé l'impact d'une augmentation de température couplée à une contamination métallique au Ni ou au Cr sur les réponses des biomarqueurs, pour comprendre comment les organismes sont susceptibles de faire face à des changements globaux. En effet, sous l'influence du réchauffement climatique, des stresseurs supplémentaires tels qu'une contamination chimique sont à même d'impacter la distribution des espèces et le fonctionnement des écosystèmes. La capacité des organismes ectothermiques à gérer ces stress multiples dépendra de leurs capacités d'acclimatation et/ou d'adaptation.

Cinq traitements ont été appliqués : contrôle (sans contaminant), Ni à 20 et 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et Cr à 5 et 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Il y avait 8 réplicats par traitement, chacun contenant 2 organismes. Ces traitements ont été appliqués aux deux espèces, et ont été conduits dans des bains thermostatés à deux températures, 12 et 17 °C, correspondant respectivement à la température d'acclimatation et à un stress thermique. Après 96 h d'exposition en béccher, le taux de filtration a été mesuré sur 4 organismes, qui ont ensuite été utilisés pour mesurer les concentrations en métaux dans les tissus mous. Les glandes digestives de 8 autres organismes ont été disséquées pour mesurer une batterie de biomarqueurs au niveau cellulaire.

Les résultats montrent une activité de filtration plus élevée pour *D. r. bugensis*. Chez les deux espèces, le taux de filtration décroît lors de l'exposition aux métaux et lorsque la température augmente.

Les concentrations en Ni dans les tissus augmentent quand la concentration d'exposition augmente. La même relation est observée pour le Cr, mais chez *D. polymorpha* uniquement. La température n'influence pas l'accumulation des métaux.

Les conditions d'exposition n'ont eu aucun effet significatif sur la concentration en hydroperoxydes lipidiques, l'activité GST et l'activité des caspases. Les réponses des autres biomarqueurs sont généralement plus élevées pour *D. polymorpha* que pour *D. r. bugensis*, et l'exposition au Ni semble entraîner des effets plus importants sur ces réponses que l'exposition au Cr. Le changement de température n'a pas impacté les réponses des biomarqueurs.

Concernant les différences inter-spécifiques, les réponses des biomarqueurs ont été évaluées sous forme d'analyse discriminante linéaire (LDA). Seuls les biomarqueurs ayant un poids important dans la différenciation des groupes expérimentaux ont été conservés, et le jeu de données a été réduit de 13 à 7 biomarqueurs. Puisque la température ne semblait exercer que des effets sporadiques, ce facteur a été éliminé pour cette analyse. Le modèle obtenu permet de séparer efficacement les deux espèces et

²⁶ Les données supplémentaires relatives à cette publication sont disponibles en Annexe 2

met surtout en lumière les effets de l'exposition au Ni, avec un gradient de réponse à la contamination beaucoup plus marqué chez *D. polymorpha* que chez *D. r. bugensis*.

Cette approche multi-stress couplée à la mesure de notre batterie de biomarqueurs a mis en évidence :

- une plus forte accumulation des métaux dans les tissus mous pour les plus faibles concentrations d'exposition, pour lesquelles le taux de filtration est plus élevé
- qu'il n'y avait pas d'effet de la température sur les réponses des biomarqueurs 4 jours après un stress thermique
- que les réponses des biomarqueurs étaient plus fortes chez *D. polymorpha* que chez *D. r. bugensis*
- qu'il existe une différence de réponse entre les deux espèces, même chez les contrôles
- que même si les deux espèces assimilent les métaux de la même façon, les réponses sont beaucoup plus marquées chez *D. polymorpha*, surtout pour l'exposition au Ni.

Cette étude montre que *D. polymorpha* est plus encline à activer ses mécanismes de défense en présence de contaminants, contrairement à *D. r. bugensis* qui pourrait conserver son énergie pour l'allouer à sa croissance et à sa reproduction, plutôt qu'à sa propre survie. Cela pourrait expliquer sa meilleure capacité d'invasion.

Un autre point soulevé par ces différences inter-spécifiques concerne leur utilisation en biosurveillance. Les deux espèces présentent en effet des différences au niveau de leur capacité de bioaccumulation et de leur activité de filtration. Bien que leur patron de réponse à la contamination soit similaire, les réponses des biomarqueurs au niveau cellulaire sont beaucoup plus marquées chez *D. polymorpha*. Cela implique que les données disponibles sur *D. polymorpha* ne sont pas extrapolables à *D. r. bugensis*, et si les populations de *D. polymorpha* viennent à diminuer drastiquement, leur substitution par *D. r. bugensis* ne sera pas possible sans une meilleure compréhension des réponses de cette dernière.



Integrated multi-biomarker responses in two dreissenid species following metal and thermal cross-stress[☆]



Marine Potet, Simon Devin, Sandrine Pain-Devin, Philippe Rousselle, Laure Giambérini^{*}

Université de Lorraine, CNRS UMR 7360, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC), Campus Bridoux, Rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 June 2016

Received in revised form

28 July 2016

Accepted 8 August 2016

Keywords:

Dreissena polymorpha

Dreissena rostriformis bugensis

Biomarker

Temperature

Multi-stress

ABSTRACT

With current global changes, the combination of several stressors such as temperature and contaminants may impact species distribution and ecosystem functioning. In this study, we evaluated the combined impact of two metals (Ni and Cr) with a thermal stress (from 12 to 17 °C) on biomarker responses in two bivalves, *Dreissena rostriformis bugensis* and *Dreissena polymorpha*. Biomarkers are informative tools to evaluate exposure and effects of stressors on organisms. The set of 14 biomarkers measured here was representative of both physiologic (filtration activity) and cellular antioxidant and detoxification mechanisms. Our aim was to study the response pattern of both species, and its meaning in terms of invasive potential. The implications for the use of these mussels in environmental monitoring are also discussed. Results evidenced that the two species do not respond to multiple stressors in the same way. Indeed, the effects of contamination on biomarker responses were more marked for *D. polymorpha*, especially under nickel exposure. While we cannot conclude as to the effect of temperature, invasiveness could be influenced by species sensitivity to contaminants. The physiological and cellular differences between *D. polymorpha* and *D. r. bugensis* might also be of concern for environmental risk assessment. The two species present differential bioaccumulation patterns, filtration activity and cellular biomarker responses. If *D. polymorpha* populations decline, their substitution by *D. r. bugensis* for biomonitoring or laboratory studies will not be possible without a deeper understanding of biomarker responses of the new invasive.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Depending on scenarios, a 0.3–0.7 °C increase is predicted in the mean surface temperature by 2016–2035. The Earth's global warming could even exceed 1.5 °C by the period 2081–2100 (IPCC, 2014). Under the current climate change, further stressors such as contaminants might impact species distribution and abundance and could modify ecosystem structure and functioning. Recent studies point out that heat stress enhances metal and polycyclic hydrocarbon toxicity (Sokolova and Lannig, 2008; Kamel et al., 2012; Attig et al., 2014). The ability of ectothermic organisms to handle such changes will depend on their acclimation or

adaptation capacities (Falfushynska et al., 2014; Sulmon et al., 2015). Many tools are available to evaluate the impact of such factors on ecosystems and organisms, from physico-chemical measurements to biodiversity and community indices (Vasseur and Cossu-Leguille, 2003; Allan et al., 2006). However, while the first explore exposure and the latter describe effects at the ecosystem level, intermediate levels of biological organization need to be considered to understand mechanisms of action and develop Adverse Outcome Pathway models (Groh et al., 2015).

Biomarkers are biochemical or physiological parameters that can be measured in individuals to indicate exposure to environmental chemicals and, for some of them, to detect toxic effects (Lagadic, 2002). Their use enables the linkage of exposure with effects on individuals and seeks to predict long-term effects at higher levels of biological organization, before populations are affected. They are considered as sensitive early-warning tools to detect the impact of stressors on organisms and can be used in biomonitoring, since a modification in biomarker response may evidence that a modification in environmental conditions occurred

[☆] This paper has been recommended for acceptance by Maria Cristina Fossi.

^{*} Corresponding author.

E-mail addresses: marine.potet@univ-lorraine.fr (M. Potet), simon.devin@univ-lorraine.fr (S. Devin), sandrine.devin@univ-lorraine.fr (S. Pain-Devin), philippe.rousselle@univ-lorraine.fr (P. Rousselle), laure.giambérini@univ-lorraine.fr (L. Giambérini).

(Adams et al., 2001; Depledge and Fossi, 1994; Moore et al., 2004).

The zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, is currently used in biomonitoring as a sentinel organism to evaluate freshwater contamination. It is a widespread and abundant species with a high filtration rate, thus it is often used to evaluate the accumulation of contaminants in its tissues and to study their subsequent effects on biological processes (de Lafontaine et al., 2000; Binelli et al., 2010, 2015; Guerlet et al., 2007). It presents a moderate sensitivity against pollutants and many studies focus on the use of physiological reactions as biomarkers (Contardo-Jara et al., 2009; Pain-Devin et al., 2014). Even in bivalve species quite tolerant to environmental changes, their biomarker responses have shown a great precocity and sensitivity to metal exposure and temperature variations (Tsangaris et al., 2008; Attig et al., 2014; Kamel et al., 2014). However in the last few decades, *D. polymorpha* populations have been declining all over the world, and are being replaced by a sister-species, the quagga mussel *Dreissena rostriformis bugensis* (Nalepa et al., 2010; Matthews et al., 2014).

In order to understand the dynamic of invasion and the switch between the two species, their biology and ecology need to be compared (Ram et al., 2012). Most of the studies dealing with both species focused on their morphological (Rosenberg and Ludyanskiy, 1994; Beggel et al., 2015) or functional differences (Diggins, 2001; Peyer et al., 2009; Grutters et al., 2012), fitness-relative traits (MacIsaac, 1994; Baldwin et al., 2002; Stoeckmann, 2003; Karatayev et al., 2011) or on their bioaccumulation capacities (Rutzke et al., 2000; Richman and Somers, 2005). To our knowledge, the only study dealing with several cellular biomarkers was conducted by Schäfer et al. (2012) and focused on DNA damage, heat shock proteins, lipid content, body mass and bioaccumulation.

Studies on zebra mussels have shown that cellular endpoints responded early to environmental contamination and preceded effects at the individual level (Contardo-Jara et al., 2009; Guerlet et al., 2010). Multi-biomarker approaches are really useful in environmental quality assessment, to evaluate the impact of environmental conditions on organism's health and physiological status (Viarengo et al., 2007; Binelli et al., 2010). In our experiment, we measured a set of biomarker responses, representative of both antioxidant (antioxidant system, detoxification mechanisms) and physiological functions (cellular energetic, filtration rates) from the cellular to the individual scale. The large set of data obtained from multi-biomarker measurements can be analysed through multivariate analysis in order to integrate all the individual data and obtain a more synthetic overview of stress affecting both bivalve species.

To evaluate biomarker modulation, we exposed mussels to nickel (Ni) or chromium (Cr) and to a thermal stress (from 12 to 17 °C). The first temperature (12 °C) corresponds to the field temperature during the sampling, in March, and the second (17 °C) is considered as a thermal stress for this period. Ni is one of the priority metals under the European Water Framework Directive (2000/60/EC, 2000). It is mainly used for stainless steel production, plating and in many alloys to manufacture coins, tools, kitchen tools and mineral pigments. Ni represents approximately 0.9% of the Earth's crust, but its release into the environment is mainly due to anthropogenic sources (coal and fuel combustion, waste incineration, mining, steel manufacturing and plating) (INERIS, 2006). It is thus a metal of high environmental relevance, and many studies have shown its toxicity to aquatic organisms (Tsangaris et al., 2008; Attig et al., 2010), including *D. polymorpha* (Stuijzand et al., 1995; Minguez et al., 2012), and its role in free radical formation (Stohs and Bagchi, 1995). Hexavalent Cr is also a pro-oxidant agent, toxic for aquatic organisms, that can cross cellular membranes and lead to the formation of reactive oxygen species during its intracellular reduction in trivalent Cr, which is able to interact with DNA (Vignati

et al., 2010; Barmo et al., 2011). Cr is also used in stainless steel production and in several alloys, because it enhances metal's hardness and resistance to corrosion. It is emitted in the atmosphere through industry and gas combustion, and in watercourses via chroming, tanning, the textile industry and the manufacture of dyes and pigments (INERIS, 2005).

The aim of our study was to assess the response pattern of both species in the case of increasing water temperature and metal stress, in order to answer the following questions (1) is the quagga mussel more tolerant to environmental stressors compared to the zebra mussel, and thus may it enhance its invasiveness? (2) could the quagga mussel be used as a sentinel species for biomonitoring in case of zebra mussel disappearance?

2. Material and methods

2.1. Organism collection and biometric data

Organisms were hand-collected in March 2015 by section of their byssus and quickly transferred to the laboratory. *D. polymorpha* from Madine reservoir (Meuse, France, E05°44'52.2" N48°55'41") were 16.5 ± 2 mm in length and *D. r. bugensis* from the Moselle river (Jouy-aux-arches, France, E06°04'43" N49°03'58") were 27 ± 3 mm. The Madine population was the only population of *D. polymorpha* identified in the Moselle River basin at that time. The two species were differentiated according to morphometric parameters (Pavlova and Izyumov, 2014).

Just after sampling, 18 mussels of each species were measured (length, width and height of shell, in mm), soft tissues were weighed (without byssus, in mg) and a condition index was calculated for each individual, according to the following formula (Guerlet et al., 2010):

$$\text{Condition Index (mg mm}^{-3}\text{)} = \frac{\text{wet weight}}{(\text{length} \times \text{width} \times \text{height})}$$

2.2. Acclimation

The remaining mussels were acclimated for 96 h at 12 °C, which corresponds to the field temperature, without feeding before the experiment. During the first 3 days, 240 individuals of each species were placed in two separated 15 L aquaria continuously aerated and under a 10:14 light:dark period. Their water of origin was progressively replaced by spring water (Cristaline®, 1/3 per day; Ca²⁺: 106; Mg²⁺: 4.2; Na⁺: 3.5; K⁺: 1.5; HCO₃⁻: 272; SO₄²⁻: 50; Cl⁻: 0.9 mg L⁻¹). After 72 h, 160 organisms of each species were placed in 250 mL experimental beakers (two individuals of the same species per beaker) to allow byssal fixation (80 beakers containing 2 zebra mussels each, and 80 beakers containing 2 quagga mussels each). Beakers were filled with 200 mL of Cristaline® and placed in a water bath to maintain a 12 °C temperature, under natural photoperiod.

2.3. Exposure treatments

After acclimation, mussels were treated for 96 h, under natural light and without any food source. Beakers containing pairs of mussel were emptied and Cristaline® was replaced by 200 mL of exposure media. There were five different treatments (16 replicates per treatment, i.e. 32 organisms): control (only water); Ni chloride (20 and 500 µg L⁻¹ total ion Ni); potassium dichromate (5 and 15 µg L⁻¹ total ion Cr). Ni chloride (Cl₂Ni·6H₂O, ref 25851.236) and potassium dichromate (K₂Cr₂O₇, ref 26784.231) were purchased from VWR (Radnor, Pennsylvania). Stock solutions of Ni

(250 mg L⁻¹) and Cr (30 mg L⁻¹), expressed as total ion concentration, were prepared and acidified to 1% with nitric acid. Nominal test concentrations were made by diluting metal stock solution. Experimental beaker water was not aerated to limit metal adsorption upon glass walls. All media were prepared with Cristaline® and were renewed after 48 h both to ensure a semi-static exposure, and to avoid a drop in oxygen concentrations within the beakers. Since there is no toxicity value for Dreissenids exposed to Ni and Cr, the choice for exposure concentrations was a compromise between environmental quality standards, toxicity values for other invertebrates and previous experiments in our laboratory. For Ni, 20 µg L⁻¹ corresponds to the European legal limit for concentration in drinking water (CD 98/83/EC, 1998) and 500 µg L⁻¹ is the French legal limit of concentration in industrial discharge (Decree of the 2nd February 1998 on the classified installations, Article 32). For Cr, the 5 µg L⁻¹ concentration was selected since it is close to the predicted no effect concentration in freshwater (4.1 µg L⁻¹) and 15 µg L⁻¹ is in the lower range of no observed effect concentrations for several marine and freshwater invertebrates (INERIS, 2005).

For each treatment, half of the beakers (8 beakers) were maintained in a 12 °C bath, and the other half was placed in a 17 °C water bath to exert a thermal stress (see Fig. 1 for a flow chart of experimental design).

2.4. Tissue collection

After 96 h of exposure, a first set of mussel's digestive gland (12 individuals per condition) were dissected and frozen at -80 °C until being processed for biomarker measurements. A second set of individuals (4 individuals per condition) were used for filtration activity and internal metal concentration measurements. Tissue of each mussel was analysed individually.

2.5. Biomarker measurements

Biomarker responses were measured on 8 digestive glands per condition in an automated spectrophotometer (Konelab 20-XTi, ThermoScientific). The digestive gland in mussels is often used to study biomarker responses, since it is considered to be the most metabolically active organ (Viarengo et al., 2007).

Digestive glands were defrosted, weighed and crushed in phosphate buffer (50 mM, pH 7.6 supplemented with 1 mM

phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1 mM L-serine borate mixture as protease inhibitors) at a 4/1 (v/w) ratio. Homogenates were centrifuged at 250 × g for 5 min at 4 °C (crude extract). Homogenates were used for the assays immediately after their preparation. One part of this fraction was used to evaluate triglyceride, cholesterol, lipid hydroperoxide concentration (LOOH), electron transport system (ETS) and acid phosphatase (ACP) activity. The other part underwent a differential centrifugation (1000 × g for 20 min at 4 °C; the supernatant was recovered and centrifuged again at 20,000 × g for 50 min at 4 °C). The final supernatant corresponding to the cytosolic fraction was used to measure total antioxidant capacity (TAC), glutathione peroxidase (GPx), glutathione-S-transferase (GST), lactate dehydrogenase (LDH), caspase-3 (CSP3) and catalase (CAT) activities. Proteins were quantified on both fractions (crude extract and cytosolic fraction) by the Pyrogallol red colorimetric method, using Scal bovine-based serum as a reference. Biomarker responses were measured following classical methods, adapted for automated measurements in our spectrophotometer. The detailed protocols are available in Garaud et al. (2016).

2.6. Filtration rate

For each condition, four living mussels were placed separately in 50 mL of neutral red solution 5 mg L⁻¹, in the dark, at 12 or 17 °C. Siphons were oriented toward the inside of the beaker to ensure their good functioning. After 2 h, mussels were picked-up and placed in clean Cristaline® water, and allowed to depurate for 24 h. Beakers containing the neutral red solution were acidified to pH 5.0 with 37% HCl, agitated. We sampled 1 mL twice in each beaker and read the absorbance at 530 nm. Thanks to a standard neutral red curve, we calculated neutral red concentration in each beaker. Filtration rates (f) were calculated according to the method developed by Coughlan (1969): $f = (V/(n \times t)) \times \log(C_0/C_t)$ with V the total volume of neutral red solution (50 mL), n the number of individuals, t the time (h) and C₀ and C_t the initial and final neutral red concentrations in the beakers. Since the two species were very different in size, filtration rates were standardized by the dry weight (DW) of total mussel tissue and are expressed in mL gDW⁻¹ individual⁻¹ h⁻¹.

2.7. Water and internal metal concentration analysis

After depuration, 4 mussels per treatment were dissected, their byssus cut off. Samples were freeze-dried, weighed and digested in

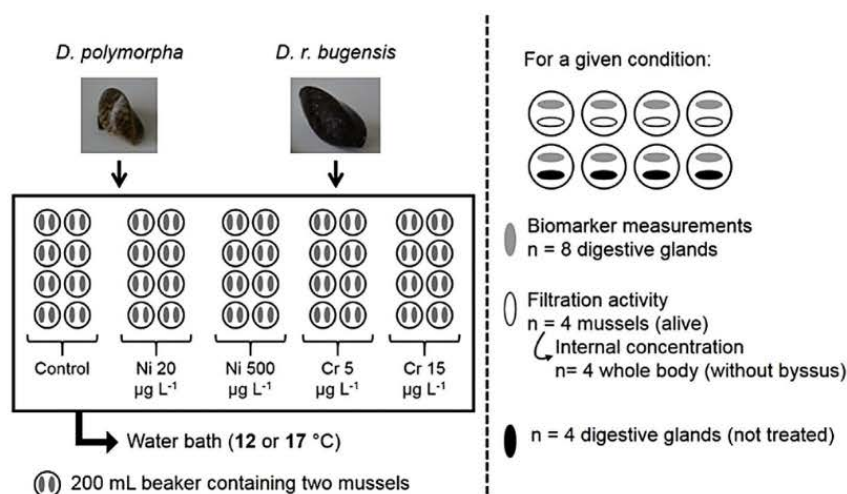


Fig. 1. Flow chart of the experimental design.

69% HNO₃ for 24 h at 60 °C. For both water and internal concentration analysis, the amount of Ni and Cr was determined by flame (Perkin-ELMER Aanalyst 100) or by graphite furnace (VARIAN Spectraa 800 with ZEEMAN correction) atomic absorption spectrophotometry, depending on metal concentration. Metal concentrations in mussels are expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight (DW) tissue, and in $\mu\text{g L}^{-1}$ for water media.

To evaluate the distribution of both metals in the different compartments (mussels, experimental media and absorbed on shells or beakers), the mass balance was calculated. From the concentrations of Ni and Cr in media at the start and at the end of the experiment, and the concentration in mussel tissues, taking into account water renewal on day two and the couple of mussels in each beaker, we calculated metal content (%) in the different compartments.

2.8. Statistical analysis

For the datasets relative to biomarker responses, filtration rates and metal internal concentrations, the differences between experimental conditions were tested with Student *t*-test or Mann-Whitney tests, depending on normality (Shapiro-Wilk) and variance homoscedasticity (Levene). Parametric data were analysed with Student *t*-test (variance homoscedasticity was set as “true” or “false”). Non-parametric data were analysed using Mann-Whitney test. P-values were adjusted with the BH (Benjamini and Hochberg) correction. Statistical power for every significant reported difference was checked and reported only if it was above 0.8. A chi-2 test was also implemented on the mass balance. A multivariate analysis of variance (MANOVA) was performed on the whole dataset to evaluate potential interactions between species, temperature and

contamination. A threshold of $p \leq 0.05$ is considered as significant. In order to integrate all biomarker responses together, we carried out a linear discriminant analysis (LDA) to assess which biomarker responses are able to discriminate experimental groups and inter-condition differences within species. Biomarkers that were more than 60% correlated with others, and/or that were not significant for the analysis were retrieved, and a new LDA was performed. Axes of the LDA were then used under Hotelling T² tests to assess significant differences between groups. Statistical analysis were made using R (R Development Core Team, version 3.1.0).

3. Results

3.1. Mortality, shell volume and condition index

There was no mortality during the whole experiment period. Shell volume (Fig. 2a) was significantly greater for *D. r. bugensis* (6.7 ± 1.3) than for *D. polymorpha* (1.2 ± 0.3 , $t = 17.3$, $Df = 18.4$, $p < 0.001$). However, condition index (Fig. 2b) was higher for *D. polymorpha* (0.13 ± 0.04) than for *D. r. bugensis* (0.10 ± 0.02 , $t = -2.7$, $Df = 26.3$, $p < 0.05$).

3.2. Filtration rates

When standardized by weight, there were no difference in filtration rates between the two species in non-exposed organisms. There was a slight effect of temperature for *D. polymorpha* exposed to Ni $20 \mu\text{g L}^{-1}$, with higher filtration rates at 17 °C than at 12 °C ($p < 0.05$). We observed a stronger effect of contamination on filtration rates (see Table 1 and Fig. S1). For *D. polymorpha* at 12 °C, filtration rates were significantly higher in mussels exposed to Cr

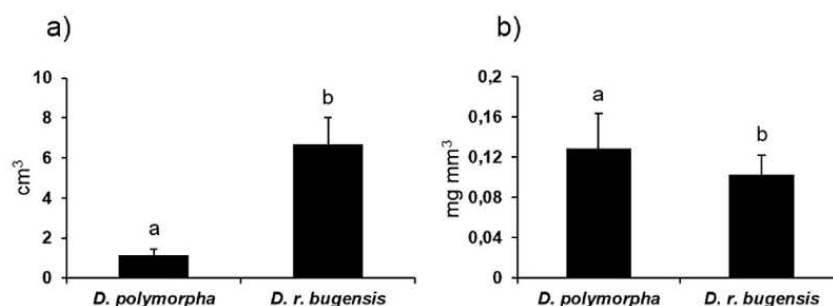


Fig. 2. Differences between species regarding shell volume (a) and condition index (b) before the experiment (mean $\pm$ SD, $n = 18$). Values that do not share a common letter are significantly different ($p < 0.05$).

Table 1

Filtration rates and contaminant levels in whole mussel tissues (mean $\pm$ SD, $n = 4$). Results are given relative to dry weight (DW). For each species at a given temperature, values that do not share a common letter are significantly different ($p < 0.05$). * indicates difference between species for a given condition ($p < 0.05$). No letter means no differences between conditions for a given species at a given temperature.

			Control	Ni $20 \mu\text{g L}^{-1}$	Ni $500 \mu\text{g L}^{-1}$	Cr $5 \mu\text{g L}^{-1}$	Cr $15 \mu\text{g L}^{-1}$
<i>Dreissena polymorpha</i>	12 °C	Filtration rate ($\text{mL gDW}^{-1} \text{ individual}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	0.2 ± 0.1^{ab}	0.1 ± 0.1^a	0.1 ± 0^a	0.2 ± 0.1^{ba}	0.1 ± 0^a
		Total Ni ($\mu\text{g gDW}^{-1}$)	4 ± 1.7	3.8 ± 0.8	$16.1 \pm 7.4^*$		
		Total Cr ($\mu\text{g gDW}^{-1}$)	$0 \pm 0.1^{ab*}$			0.5 ± 0.2^a	1.9 ± 0.7^{ba}
	17 °C	Filtration rate ($\text{mL gDW}^{-1} \text{ individual}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	0.1 ± 0	$0.2 \pm 0.1^*$	0.1 ± 0.1	$0.2 \pm 0^*$	0.1 ± 0
		Total Ni ($\mu\text{g gDW}^{-1}$)	3 ± 2.2^a	7 ± 2.1^a	26.2 ± 12.1^{ba}		
		Total Cr ($\mu\text{g gDW}^{-1}$)	$0 \pm 0.1^{a*}$			0.7 ± 0.1^b	1.3 ± 0.7^c
<i>Dreissena r. bugensis</i>	12 °C	Filtration rate ($\text{mL gDW}^{-1} \text{ individual}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0	$0.1 \pm 0^*$	0.1 ± 0
		Total Ni ($\mu\text{g gDW}^{-1}$)	5.3 ± 1.4^a	6.4 ± 1.2^a	57.9 ± 24.5^{ba}		
		Total Cr ($\mu\text{g gDW}^{-1}$)	$0.7 \pm 0.3^*$			1 ± 0.2	$0.9 \pm 0.4^*$
	17 °C	Filtration rate ($\text{mL gDW}^{-1} \text{ individual}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	0.1 ± 0	$0.1 \pm 0^*$	0.1 ± 0	$0.1 \pm 0^*$	0.1 ± 0
		Total Ni ($\mu\text{g gDW}^{-1}$)	6 ± 1.7^a	5.3 ± 0.8^a	55.4 ± 16.8^{ba}		
		Total Cr ($\mu\text{g gDW}^{-1}$)	$0.8 \pm 0.2^*$			1.2 ± 0.3	1.2 ± 0.3

5 $\mu\text{g L}^{-1}$ than in mussels exposed to Cr at 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($p < 0.05$), to Ni at 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($p < 0.01$) and to Ni at 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($p < 0.001$), although not different from controls. There was no impact of contamination on filtration rates at 17 °C for this species. Contamination exerted no effect on *D. r. bugensis* filtration rates, at both temperatures. However, between the two species, filtration rates were higher for *D. polymorpha* exposed to Cr 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ at both temperatures ($p < 0.01$) and to Ni 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ at 17 °C ($p < 0.01$).

3.3. Metal concentrations in experimental media and mussels

Concerning metal concentrations in experimental media, initial exposure concentrations were 16.5 and 491 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Ni and 4.7 and 15.4 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Cr, and 16.4 and 551 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Ni and 4.7 and 15.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Cr before water renewal.

Ni accumulation (Table 1) was significantly higher in *D. r. bugensis* exposed to 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ compared to controls and Ni 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, at both temperatures ($p < 0.001$). The same tendency is observed for *D. polymorpha* but at 17 °C only ($p < 0.01$ and $p < 0.05$ when compared to control and Ni 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectively). Again for Ni 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, accumulation was higher for *D. r. bugensis* than for *D. polymorpha* at both temperatures ($p < 0.001$). Therefore, Ni accumulation is higher in *D. r. bugensis* and for mussels exposed to 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. There was no significant influence of temperature, even if Ni accumulation seemed to increase at 17 °C for *D. polymorpha* compared to 12 °C.

For *D. polymorpha*, Cr accumulation (Table 1) was higher in exposed mussels than in controls at 17 °C ($p < 0.05$ and $p < 0.001$ for Cr 5 and 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectively). At both temperatures, internal concentration of Cr was higher for *D. polymorpha* individuals exposed to 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ than for those exposed to 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($p < 0.001$ and $p < 0.05$ for 12 and 17 °C respectively). There were no difference in Cr accumulation between conditions for *D. r. bugensis*. Between species, Cr content was significantly higher in *D. r. bugensis* controls compared to *D. polymorpha* controls at both temperatures ($p < 0.05$). At 12 °C, *D. polymorpha* exposed to 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ accumulated more Cr than *D. r. bugensis* ($p < 0.01$). Temperature did not modify Cr bioaccumulation.

To summarize the results of external and internal metal concentrations, a mass balance representing the proportion of contaminant in experimental media, adsorbed onto the shell and beaker surfaces and accumulated in mussel tissues, was established at the end of the experiment (Fig. 3). It shows that the proportion of Cr adsorbed on glass walls or shells is very low compared to Ni and

almost the totality of Cr implemented is found either in water or organisms. This is not the case for Ni, with a high proportion adsorbed on solid surfaces, especially in presence of *D. r. bugensis*, which were bigger in size than *D. polymorpha*. The metal content in tissues is always higher for *D. r. bugensis* than for *D. polymorpha*. The chi-2 test performed on the mass balance shows that the distribution of Ni is significantly different between the two species ($\chi^2 = 163.96$, Df = 14, $p < 0.001$), which is not the case for Cr ($\chi^2 = 1.99$, Df = 14, $p > 0.05$). The percentage of metal content in mussels is higher for the lowest exposure concentrations.

3.4. Individual analysis of biomarker responses

3.4.1. Effect of contamination

Detailed biomarker responses are presented in Table 2 and Fig. S2. Experimental conditions did not modify LOOH concentration, TAC, ETS, LDH, GST and CSP3 activities. GPx activities were only affected in *D. r. bugensis* at 17 °C, with a significant increase in mussels exposed to Cr 15 $\mu\text{g L}^{-1}$. The other biomarkers were randomly modified by exposure conditions, although exposure to Ni seems to exert the more pronounced effects. CAT and ACP activities were modified for *D. r. bugensis* individuals exposed to Cr 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ at 12 °C, and to Ni 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ at 17 °C. Cholesterol content was higher in both species exposed to Ni 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ at 12 °C. Energetic reserves, represented by proteins (on both fractions) and triglyceride concentrations increase under Ni exposure, especially at 20 $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.4.2. Effect of temperature

Significant influences of temperature are not shown in Table 2. Only 4 biomarkers responded differently between 12 and 17 °C, and only under Ni 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ exposure: the proteins in crude extract and triglycerides for *D. polymorpha* and TAC and ACP for *D. r. bugensis*. Temperature did not affect any other biomarker responses under our experimental conditions.

3.4.3. Effect of species

Significant differences between species are not shown in Table 2. No differences in LOOH, LDH, GPx and CSP3 responses were recorded between species. For proteins in both fractions and ACP, responses were higher for *D. polymorpha* for each exposure condition at both temperatures. We get the same result for triglycerides, except for Cr 15 $\mu\text{g L}^{-1}$. For GST activity, only mussels exposed to Cr 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ at 12 °C were different between species.

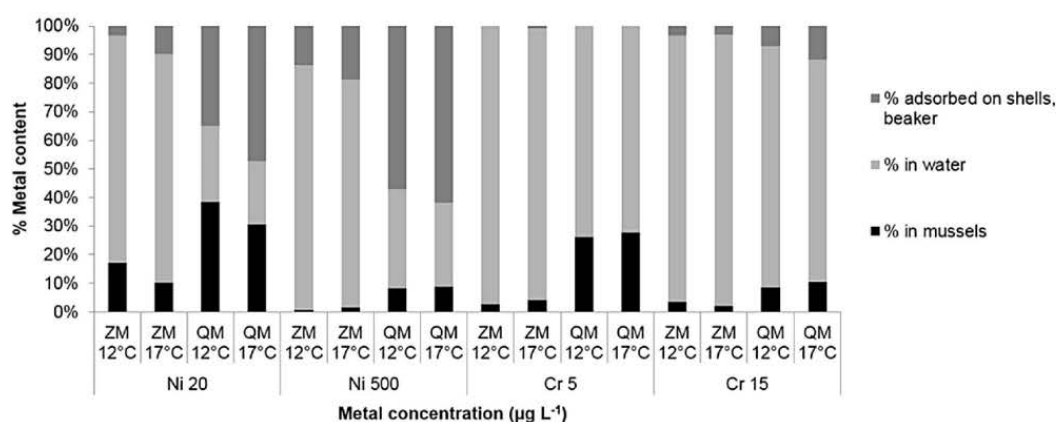


Fig. 3. Mass balance representing the mean percentage of recovered Ni and Cr in *D. polymorpha* (ZM) and *D. r. bugensis* (QM), water, and adsorbed on shells or beakers after 96 h of exposure.

Table 2
D. polymorpha and *D. r. bugensis* biomarker responses at 12 and 17 °C after 96 h of exposure to Ni or Cr. Data are expressed as mean $\pm$ SD (n = 4 to 8). For each species at a given temperature, values that do not share a common letter are significantly different ($p < 0.05$). No letter means no differences between conditions. Acronyms: GPx (glutathione peroxidase), TAC (total antioxidant capacity), CAT (catalase), GST (glutathione-S-transferase), ACP (acid phosphatase), LOOH (lipid hydroperoxide), CSP3 (caspase-3), ETS (electron transport system), LDH (lactate dehydrogenase).

	<i>D. polymorpha</i>		<i>D. r. bugensis</i>		<i>D. polymorpha</i>		<i>D. r. bugensis</i>	
	Exposure temperature		Exposure temperature		Exposure temperature		Exposure temperature	
	12 °C	17 °C	12 °C	17 °C	12 °C	17 °C	12 °C	17 °C
GPx ($\mu\text{mol NADPH g proteins}^{-1} \text{ min}^{-1}$)								
Control	25.4 $\pm$ 10.8	28.5 $\pm$ 7.7	31 $\pm$ 8.8	26.6 $\pm$ 6.2 ^a	Control	15.5 $\pm$ 6.3	12.4 $\pm$ 5.9	4.3 $\pm$ 1.8
Ni 20 $\mu\text{g L}^{-1}$	32.8 $\pm$ 10.8	26.6 $\pm$ 11.6	28.2 $\pm$ 7.5	25.4 $\pm$ 6.7 ^a	Ni 20 $\mu\text{g L}^{-1}$	9.1 $\pm$ 2.9	8.8 $\pm$ 2.5	6.4 $\pm$ 3.1
Ni 500 $\mu\text{g L}^{-1}$	17.6 $\pm$ 3.9	22.2 $\pm$ 6.3	28.4 $\pm$ 6.6	33.3 $\pm$ 8 ^{ab}	Ni 500 $\mu\text{g L}^{-1}$	7.3 $\pm$ 2.2	6.9 $\pm$ 2.1	4.9 $\pm$ 2.1
Cr 5 $\mu\text{g L}^{-1}$	27.5 $\pm$ 5.2	29 $\pm$ 7.5	22.6 $\pm$ 3.4	24.5 $\pm$ 9.2 ^a	Cr 5 $\mu\text{g L}^{-1}$	13 $\pm$ 7.4	9.2 $\pm$ 3.3	6.2 $\pm$ 4.2
Cr 15 $\mu\text{g L}^{-1}$	25.4 $\pm$ 5.2	35.4 $\pm$ 8.5	31.3 $\pm$ 7	39.1 $\pm$ 12.9 ^b	Cr 15 $\mu\text{g L}^{-1}$	10.5 $\pm$ 7.2	11.3 $\pm$ 4	4.7 $\pm$ 1.3
TAC ($\mu\text{mol Feq g proteins}^{-1} \text{ min}^{-1}$)					Proteins on crude extract (mg gFW^{-1})			
Control	34 $\pm$ 5	29.1 $\pm$ 7.2	18.7 $\pm$ 3.7	20.8 $\pm$ 2.8	Control	62.2 $\pm$ 6 ^a	58.1 $\pm$ 6.3 ^a	46.1 $\pm$ 2.5 ^{ac}
Ni 20 $\mu\text{g L}^{-1}$	34.2 $\pm$ 4.6	30.7 $\pm$ 7.3	23.4 $\pm$ 2.5	19.4 $\pm$ 1.5	Ni 20 $\mu\text{g L}^{-1}$	84.3 $\pm$ 5.4 ^b	75 $\pm$ 7.6 ^b	53.5 $\pm$ 3.8 ^b
Ni 500 $\mu\text{g L}^{-1}$	36 $\pm$ 3.5	34.9 $\pm$ 4.2	20.5 $\pm$ 3	24.3 $\pm$ 3.9	Ni 500 $\mu\text{g L}^{-1}$	73.8 $\pm$ 7.9 ^c	74.1 $\pm$ 11.2 ^b	51.4 $\pm$ 3.3 ^{ab}
Cr 5 $\mu\text{g L}^{-1}$	32.2 $\pm$ 9	30 $\pm$ 2.8	20.4 $\pm$ 6	21.2 $\pm$ 3.7	Cr 5 $\mu\text{g L}^{-1}$	62.1 $\pm$ 5 ^a	62.4 $\pm$ 5.4 ^a	45 $\pm$ 3.4 ^c
Cr 15 $\mu\text{g L}^{-1}$	36.9 $\pm$ 1.3	39.1 $\pm$ 9.8	20.2 $\pm$ 4.1	24.7 $\pm$ 5.2	Cr 15 $\mu\text{g L}^{-1}$	65.2 $\pm$ 6.2 ^a	59.5 $\pm$ 8.1 ^a	48.1 $\pm$ 4.9 ^{abc}
CAT ($\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ g proteins}^{-1} \text{ min}^{-1}$)					Proteins on cytosolic fraction (mg gFW^{-1})			
Control	146 $\pm$ 24.7	130.1 $\pm$ 18.1	109.5 $\pm$ 65 ^{ab}	125.6 $\pm$ 38.2 ^a	Control	40.5 $\pm$ 3.8 ^a	38.9 $\pm$ 3.2 ^a	32.7 $\pm$ 4
Ni 20 $\mu\text{g L}^{-1}$	160.5 $\pm$ 48.9	143.1 $\pm$ 21.6	67.3 $\pm$ 28.2 ^a	54.4 $\pm$ 29.2 ^b	Ni 20 $\mu\text{g L}^{-1}$	57.8 $\pm$ 4.1 ^b	52.4 $\pm$ 4.7 ^b	37.4 $\pm$ 4.8
Ni 500 $\mu\text{g L}^{-1}$	145.1 $\pm$ 24.3	164 $\pm$ 25.7	85.5 $\pm$ 33.9 ^{ab}	82.2 $\pm$ 45.7 ^{ab}	Ni 500 $\mu\text{g L}^{-1}$	51.2 $\pm$ 5.7 ^{bc}	51 $\pm$ 8 ^b	37.1 $\pm$ 2.8 ^{bc}
Cr 5 $\mu\text{g L}^{-1}$	136.7 $\pm$ 38.6	130.9 $\pm$ 35.7	126.3 $\pm$ 32.9 ^b	117.5 $\pm$ 47.7 ^{ab}	Cr 5 $\mu\text{g L}^{-1}$	42.6 $\pm$ 4.1 ^a	43.1 $\pm$ 5.2 ^a	33.4 $\pm$ 4.2
Cr 15 $\mu\text{g L}^{-1}$	144.2 $\pm$ 35.6	146 $\pm$ 14.1	115 $\pm$ 54.9 ^{ab}	132.5 $\pm$ 58.5 ^{ab}	Cr 15 $\mu\text{g L}^{-1}$	45.5 $\pm$ 4.7 ^{ac}	41.4 $\pm$ 5.4 ^a	35.7 $\pm$ 5.8
GST ($\mu\text{mol CDNB g proteins}^{-1} \text{ min}^{-1}$)					Triglycerides (mg gFW^{-1})			
Control	387.6 $\pm$ 72.1	373.5 $\pm$ 130.8	284.7 $\pm$ 32.8	287 $\pm$ 48.5	Control	22.3 $\pm$ 5.7 ^a	16.8 $\pm$ 6.1 ^a	6.7 $\pm$ 5.1
Ni 20 $\mu\text{g L}^{-1}$	419 $\pm$ 169.8	439.4 $\pm$ 117.5	234.3 $\pm$ 51.3	265 $\pm$ 61.3	Ni 20 $\mu\text{g L}^{-1}$	43.9 $\pm$ 4.3 ^c	30 $\pm$ 5.6 ^b	10.2 $\pm$ 4.3
Ni 500 $\mu\text{g L}^{-1}$	409 $\pm$ 110	447.3 $\pm$ 106	265.4 $\pm$ 58.3	244.3 $\pm$ 35.1	Ni 500 $\mu\text{g L}^{-1}$	39.3 $\pm$ 7.3 ^{bc}	44.7 $\pm$ 11.7 ^{ab}	11.1 $\pm$ 3.3
Cr 5 $\mu\text{g L}^{-1}$	425.3 $\pm$ 63.8	346.9 $\pm$ 85.2	273.3 $\pm$ 47.5	245.9 $\pm$ 43.8	Cr 5 $\mu\text{g L}^{-1}$	23.6 $\pm$ 4.9 ^{ab}	23.8 $\pm$ 5 ^{ab}	9.6 $\pm$ 4
Cr 15 $\mu\text{g L}^{-1}$	528.9 $\pm$ 171	569.4 $\pm$ 135.9	247.6 $\pm$ 38.4	286.1 $\pm$ 48.8	Cr 15 $\mu\text{g L}^{-1}$	32.1 $\pm$ 12.4 ^{abc}	20.9 $\pm$ 6.6 ^{ab}	12 $\pm$ 5.3
ACP ($\mu\text{mol g proteins}^{-1} \text{ h}^{-1}$)					ETS ($\mu\text{mol O}_2 \text{ g proteins}^{-1} \text{ h}^{-1}$)			
Control	41.2 $\pm$ 8.3	44 $\pm$ 8.1	75.2 $\pm$ 10.9 ^{ab}	74 $\pm$ 16.4 ^a	Control	0.9 $\pm$ 0.1	1 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.2
Ni 20 $\mu\text{g L}^{-1}$	35.2 $\pm$ 1.3	35.5 $\pm$ 6.7	80.3 $\pm$ 16.2 ^a	56.6 $\pm$ 14.6 ^b	Ni 20 $\mu\text{g L}^{-1}$	1 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1
Ni 500 $\mu\text{g L}^{-1}$	36.3 $\pm$ 2.9	33.1 $\pm$ 5.5	78.3 $\pm$ 12.1 ^{ab}	87.6 $\pm$ 18.7 ^a	Ni 500 $\mu\text{g L}^{-1}$	1 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.1
Cr 5 $\mu\text{g L}^{-1}$	41.1 $\pm$ 10.4	44.2 $\pm$ 6.8	62.7 $\pm$ 9 ^b	72.6 $\pm$ 18.5 ^a	Cr 5 $\mu\text{g L}^{-1}$	1 $\pm$ 0.2	1 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.2
Cr 15 $\mu\text{g L}^{-1}$	42.8 $\pm$ 10.1	44.6 $\pm$ 6.7	86.2 $\pm$ 17.9 ^a	87.5 $\pm$ 13.5 ^a	Cr 15 $\mu\text{g L}^{-1}$	1 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1
LOOH concentration ($\mu\text{mol g proteins}^{-1}$)					LDH ($\mu\text{mol NADH g proteins}^{-1} \text{ min}^{-1}$)			
Control	80.8 $\pm$ 59.8	31.1 $\pm$ 2.8	40.5 $\pm$ 21.5	44.5 $\pm$ 15.5	Control	161.8 $\pm$ 27.1	151.5 $\pm$ 13.6	160 $\pm$ 26.2
Ni 20 $\mu\text{g L}^{-1}$	61.6 $\pm$ 47.7	73.9 $\pm$ 44.5	41.5 $\pm$ 10.1	43.9 $\pm$ 15.5	Ni 20 $\mu\text{g L}^{-1}$	182.4 $\pm$ 20.9	155.2 $\pm$ 40.3	184.4 $\pm$ 45.2
Ni 500 $\mu\text{g L}^{-1}$	40.9 $\pm$ 3.4	51.5 $\pm$ 8.3	42.6 $\pm$ 17.3	58.1 $\pm$ 34.1	Ni 500 $\mu\text{g L}^{-1}$	181.6 $\pm$ 32.4	174 $\pm$ 25.5	198.9 $\pm$ 55.9
Cr 5 $\mu\text{g L}^{-1}$	54.9 $\pm$ 24.7	74.6 $\pm$ 60.8	32.9 $\pm$ 5.7	44.1 $\pm$ 26.7	Cr 5 $\mu\text{g L}^{-1}$	168.2 $\pm$ 12.9	156.3 $\pm$ 22.9	188.6 $\pm$ 65.6
Cr 15 $\mu\text{g L}^{-1}$	42.4 $\pm$ 15.4	29.9 $\pm$ 4.9	50.5 $\pm$ 24.3	57.9 $\pm$ 28.7	Cr 15 $\mu\text{g L}^{-1}$	197.5 $\pm$ 32.7	214.6 $\pm$ 40.5	201.3 $\pm$ 46.7
Cholesterol ($\text{mg g proteins}^{-1}$)								
Control	2.4 $\pm$ 0.6 ^a	2.3 $\pm$ 0.7	1.7 $\pm$ 0.3 ^a	1.9 $\pm$ 0.2				
Ni 20 $\mu\text{g L}^{-1}$	3.5 $\pm$ 0.3 ^b	2.6 $\pm$ 0.6	2.1 $\pm$ 0.3 ^b	2 $\pm$ 0.2				
Ni 500 $\mu\text{g L}^{-1}$	3 $\pm$ 0.2 ^{ab}	3.1 $\pm$ 0.5	1.8 $\pm$ 0.4 ^{ab}	2 $\pm$ 0.2				
Cr 5 $\mu\text{g L}^{-1}$	2.2 $\pm$ 0.6 ^a	2.2 $\pm$ 0.6	2 $\pm$ 0.3 ^{ab}	1.8 $\pm$ 0.2				
Cr 15 $\mu\text{g L}^{-1}$	2.5 $\pm$ 0.5 ^a	1.9 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.2 ^{ab}	1.9 $\pm$ 0.3				

D. polymorpha exposed to Ni at 12 °C expressed higher cholesterol content than *D. r. bugensis*. This is also true for the CAT activity but at 17 °C. TAC was higher in *D. polymorpha* controls and in Ni 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ and Cr 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ exposed organisms at 12 °C, and in organisms exposed to Ni 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ and Cr 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ at 17 °C. Concerning ETS, values were higher for *D. polymorpha* exposed to Ni 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ and to Cr at both concentrations at 12 °C. At 17 °C, ETS activity is higher in *D. polymorpha* controls and in Cr 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ exposed organisms. In a general way, TAC, CAT, GST, LOOH, cholesterol, CSP3, proteins, triglycerides responses in *D. polymorpha* tend to be higher than for *D. r. bugensis* except for ACP activities which tend to be lower.

3.5. Integrated analysis of biomarker responses

3.5.1. Multivariate analysis of variance (MANOVA)

So far, we have observed no clear effect of thermal stress on biomarker responses. A MANOVA performed on the whole dataset indicated that there was no interaction between the 3 factors (species, temperature and contamination) and confirmed that there was no influence of the temperature alone ($F = 1.15$, $Df = 104$, $p > 0.05$). However, it evidenced an impact of contamination ($F = 3.67$, $Df = 428$, $p < 0.001$), a strong influence of species ($F = 179.22$, $Df = 104$, $p < 0.001$) and an influence of contamination and species when taken together ($F = 3.64$, $Df = 428$, $p < 0.001$). The variance partitioning went in the same way, with the species, contamination and temperature explaining respectively 37, 3 and 0% of total variance. The temperature factor was thus neglected for the following analysis.

3.5.2. Linear discriminant analysis (LDA)

Biomarker data were summarized under LDA. As stated above, the temperature factor was eliminated before performing linear discriminant analysis on the whole dataset (Fig. 4a). The

significance of the LDA (the ability of biomarker responses to discriminate exposure conditions efficiently) was assessed with the Wilk's Lambda ($F = 9.68$, $Df = 63$, $p < 0.001$). GST, ETS, ACP activity, triglyceride, LOOH and LDH concentration were retrieved from analysis, reducing biomarker dataset from 13 to 7, since they showed the lowest significances and were highly correlated with other variables. The model led to an error rate of 34%, but looking at the confusion matrix we observed that there were no mistakes in species attributions. In order to assess pairwise between-group differences, we performed Hotelling T^2 test on our selected discriminant functions (Table 3). The first axis (84% of the overall variance) was positively influenced by protein concentration in crude extract, CAT activity and TAC. The second axis (7% of the variance) was positively influenced by proteins in the cytosolic fraction and negatively by proteins in crude extract and CSP3 activity.

Relative to biomarker responses, the model was able to differentiate the two species. Indeed, *D. r. bugensis* individuals were all located on the left of the vertical axis, whereas those of *D. polymorpha* were on the right. This is attested with the Hotelling T^2 test, since the global biomarker response between the two species was significantly different for all experimental conditions ($p < 0.001$) indicating that the two species did not respond to contamination in the same way.

There was a strong influence of contamination on *D. polymorpha* biomarker responses, with a marked gradient from control organisms to exposed ones and a clear separation between exposure conditions. Hotelling tests reinforced these results, with controls significantly different from Cr and Ni exposed organisms. Ni exposed organisms were significantly different from Cr exposed ones, however for a given metal there was no difference between the two applied concentrations. Ni apparently exerted the more pronounced effects on biomarker responses in *D. polymorpha*.

The response pattern was different for *D. r. bugensis*. All

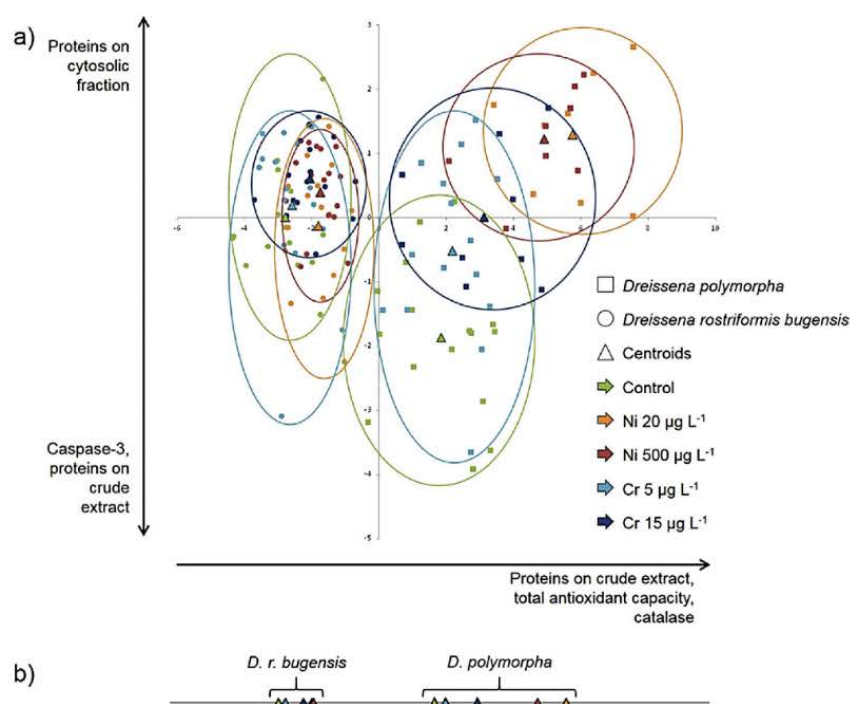


Fig. 4. (a) Linear discriminant analysis (LDA) of Ni and Cr biological effects on *D. polymorpha* and *D. r. bugensis*. (b) Projection of centroids upon axis 1 of the LDA.

analysis, we looked at the responses individually. In the same way as filtration rates and metal accumulation, we observed no significant effect of temperature on biomarker responses. Bivalves are ectothermic organisms, which means that their body temperature is dependent on external temperature. Since the beakers were placed from a 12 °C to a 17 °C water bath, the warming inside the beakers was certainly progressive. Maybe this warming, still in a temperature range that both species can handle, caused a stress initially but no longer after (Spidle et al., 1995). Looking at biomarker responses in controls, TAC, proteins, triglycerides and ETS were significantly higher for *D. polymorpha* at both temperatures. We observed the same tendency but not significantly for CAT, GST, LOOH, cholesterol and CSP3, and the opposite for ACP, GPx and LDH activities. Thus for control organisms, energetic reserves, antioxidant and antitoxic systems were highly activated for *D. polymorpha*, supporting the idea that they will be more likely to handle contamination. The MANOVA performed on biomarkers support the absence of temperature related effect, but evidenced an effect of contamination. This analysis also showed up a strong influence of species, in accordance with strong interspecific differences found by Schäfer et al. (2012) in their study. The Ni at 20 µg L⁻¹ seems to exert the more pronounced effects on the biomarker battery, that could be related to the higher bioaccumulation observed for both species exposed to this concentration.

Although *D. polymorpha* seemed to present a better health status and accumulated fewer metals than *D. r. bugensis*, their biomarker responses were more sensitive to the experimental conditions. Indeed, when we integrated the results under LDA, we observed a strong gradient for *D. polymorpha* from controls to contaminated organisms, and a clear separation between the two species.

Several factors might explain this higher sensitivity for *D. polymorpha*, starting with starvation. Baldwin et al. (2002) reported that *D. r. bugensis* use food and energy more efficiently than *D. polymorpha*, and had better growth rates for a given food level. Even if energetic reserves were unaffected during exposures, starvation might have impacted *D. polymorpha* individuals more thoroughly than *D. r. bugensis* ones, increasing their sensitivity to contaminant exposure. Adding sufficient concentrations in algae would avoid a supplementary food-related stress. There also might have been an impact of oxygen saturation, since experimental media were not aerated. Even if levels never fell below 36.6% for *D. r. bugensis* and 58.4% for *D. polymorpha* (not shown), values still in the range that they can handle, the diminution might have triggered a stress, while it is known that *D. r. bugensis* can handle lower oxygen levels (Karatajev et al., 1998; Baldwin et al., 2002).

A modification in abiotic factors, such as increasing temperature, might impact physiological or biochemical processes (metabolism, stability of nucleic acids and proteins, enzymatic activities, energetic balance, fluidity of biological membranes) leading to the formation of toxic metabolites, free radicals, generation of oxidative stress or modifications of metabolic pathways (Sokolova et al., 2012; Sulmon et al., 2015). In this sense, abiotic factors can also increase the sensitivity of organisms to additional stressors, such as pollution. Our study did not evidence the effect of temperature on biomarker responses, but organisms may have been more susceptible to metallic contamination under thermal stress.

Several studies on mussels have already shown an impact of Ni on oxidative stress, especially through the induction of CAT activity (Minguez et al., 2012; Attig et al., 2014). Ni, known as a pro-oxidant agent, has generated oxidative stress in our experiment, especially in *D. polymorpha*. We hypothesized that organisms induced their anti-oxidative mechanisms (CAT and TAC) to protect themselves and preserve cellular integrity. This protection was sufficient

enough, since the CSP3 activity was reduced in metal-exposed organisms, showing a decrease in cellular apoptosis. The absence of lipid hydroperoxides (LOOH) in metal-exposed organisms also attests the efficiency of antioxidant systems. This hypothesis is supported by the diminution of protein content in crude extract in metal-exposed organisms, which were probably degraded and turned-on into cytosolic proteins, such as antioxidant enzymes and molecules.

Nevertheless, the projection upon axis 1 of the LDA evidenced a similar response pattern between the two species, from controls, to Cr-exposed and to Ni-exposed organisms. However, each species respond in its own range and the sensitivity of the response is more marked for *D. polymorpha* which present a larger range. All these results taken together imply that *D. r. bugensis* do not invest in defense against metals, but might save energy to be spent in growth or reproduction. The defense mechanisms set up by *D. polymorpha* might not be viable in the long term for populations, and might be responsible for the dominance shift actually occurring between the two species (Ricciardi and Whoriskey, 2004; Nalepa et al., 2010; Matthews et al., 2014).

Our study supports the euryce character of both species that are able to cope with thermal stress without affecting their biological responses. In our conditions, we observed no impact of thermal stress on biomarker responses, nor interaction between thermal stress and contamination. It will be interesting to test other warming scenarios, such as a more moderate thermal stress (e.g. + 2 °C) but for a longer period, or a higher summer temperature, for instance 19 °C, which is known to increase mortality in the field. Nevertheless, invasiveness could be influenced by species sensitivity to contaminants. We showed that *D. polymorpha* is able to activate its defence mechanisms when exposed to metals, and especially Ni. This will certainly diminish the amount of energy available for survival, growth and reproduction, and will probably be gainful for *D. r. bugensis*. The physiological and cellular differences between *D. polymorpha* and *D. r. bugensis* might also be of concern for environmental risk assessment. The two species present differential bioaccumulation potential, filtration activity or cellular biomarker responses. Thus, the numerous data available for *D. polymorpha* cannot be extrapolated to *D. r. bugensis*. If *D. polymorpha* populations decline, their substitution by *D. r. bugensis* for biomonitoring or laboratory studies will not be possible without a deeper understanding of biomarker responses of the new invasive. We now need to elucidate if the response evidenced for *D. polymorpha* means (1) a better aptitude to handle stress without consequence on its physiology or (2) a greater sensitivity that can endanger populations in the long term.

Acknowledgements

We acknowledge Jean-François Poinssaint for his help during experimental set up. This work was supported by the French ONEMA (Organisme National de l'Eau et des Milieux Aquatiques) through BIOMICS program, the Agence Nationale de la Recherche through the IPOC program (ANR-12-ISV7-0004) and running costs by CPER Lorraine-ZAM (Contrat Projet Etat Région Lorraine, Zone Atelier Moselle). This work is a contribution to the Labex Ressources 21, ANR-10-LABX-21-01 (Strategic metal resources of the 21st century). The authors also wish to thank Sharon Kruger for English corrections.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.025>.

References

- 2000/60/EC. 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and the Council of 23 October 2000 Establishing a Framework for Community Action in the Field of Water Policy.
- Ackerman, J.D., 1999. Effect of velocity on the filter feeding of dreissenid mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): implications for trophic dynamics. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 56, 1551–1561. <http://dx.doi.org/10.1139/f99-079>.
- Adams, S.M., Giesy, J.P., Tremblay, L.A., Eason, C.T., 2001. The use of biomarkers in ecological risk assessment: recommendations from the christchurch conference on biomarkers in ecotoxicology. *Biomarkers* 6, 1–6. <http://dx.doi.org/10.1080/135475001452724>.
- Allan, I., Vrana, B., Greenwood, R., Mills, G., Roig, B., Gonzalez, C., 2006. A “toolbox” for biological and chemical monitoring requirements for the European union’s water framework directive. *Talanta* 69, 302–322. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2005.09.043>.
- Attig, H., Dagnino, A., Negri, A., Jebali, J., Boussetta, H., Viarengo, A., Dondero, F., Banni, M., 2010. Uptake and biochemical responses of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to sublethal nickel concentrations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1712–1719. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.007>.
- Attig, H., Kamel, N., Sforzini, S., Dagnino, A., Jamel, J., Boussetta, H., Viarengo, A., Banni, M., 2014. Effects of thermal stress and nickel exposure on biomarkers responses in *Mytilus galloprovincialis* (Lam). *Mar. Environ. Res.* 94, 65–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.12.006>.
- Baldwin, B.S., Mayer, M.S., Dayton, J., Pau, N., Mendilla, J., Sullivan, M., Moore, A., Ma, A., Mills, E.L., 2002. Comparative growth and feeding in zebra and quagga mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): implications for North American lakes. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 59, 680–694. <http://dx.doi.org/10.1139/f02-043>.
- Barmo, C., Ciacci, C., Fabbri, R., Olivieri, S., Bianchi, N., Gallo, G., Canesi, L., 2011. Pleiotropic effects of hexavalent chromium (CrVI) in *Mytilus galloprovincialis* digestive gland. *Chemosphere* 83, 1087–1095. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.037>.
- Beggel, S., Cerwenka, A., Brandner, J., Geist, J., 2015. Shell morphological versus genetic identification of quagga mussel (*Dreissena bugensis*) and zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquat. Invasions* 10, 93–99. <http://dx.doi.org/10.3391/ai.2015.10.1.09>.
- Binelli, A., Cogni, D., Parolini, M., Provini, A., 2010. Multi-biomarker approach to investigate the state of contamination of the R. Lambro/R. Po confluence (Italy) by zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 79, 518–528. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.02.033>.
- Binelli, A., Della Torre, C., Magni, S., Parolini, M., 2015. Does zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) represent the freshwater counterpart of *Mytilus* in ecotoxicological studies? A critical review. *Environ. Pollut.* 196, 386–403. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2014.10.023>.
- CD 98/83/EC. 1998. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the Quality of Water Intended for Human Consumption.
- Contardo-Jara, V., Krueger, A., Exner, H.-J., Wiegand, C., 2009. Biotransformation and antioxidant enzymes of *Dreissena polymorpha* for detection of site impact in watercourses of Berlin. *J. Environ. Monit.* 11, 1147. <http://dx.doi.org/10.1039/b820734h>.
- Coughlan, J., 1969. The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Mar. Biol.* 2, 356–358. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00355716>.
- 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). *Aquat. Toxicol.* 50, 51–71. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00094-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00094-6).
- Decree of the 2nd February 1998 on the classified installations, Article 32, n.d. Arrêté du 2 février 1998 relatif aux prélèvements et à la consommation d’eau ainsi qu’aux émissions de toute nature des installations classées pour la protection de l’environnement soumises à autorisation.
- Depledge, M.H., Fossi, M.C., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Invertebr. Ecotoxicol.* 3, 161–172. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00117081>.
- Diggins, T.P., 2001. A seasonal comparison of suspended sediment filtration by quagga (*Dreissena bugensis*) and zebra (*D. polymorpha*) mussels. *J. Gt. Lakes. Res.* 27, 457–466. [http://dx.doi.org/10.1016/S0380-1330\(01\)70660-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0380-1330(01)70660-0).
- Falfushynska, H., Gnatyshyna, L., Yurchak, I., Ivanina, A., Stoliar, O., Sokolova, I., 2014. Habitat pollution and thermal regime modify molecular stress responses to elevated temperature in freshwater mussels (*Anodonta anatina*: Unionidae). *Sci. Total Environ.* 500–501, 339–350. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.112>.
- Garaud, M., Auffan, M., Devin, S., Felten, V., Pagnout, C., Pain-Devin, S., Proux, O., Rodius, F., Sohm, B., Giambérini, L., 2016. Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Nanotoxicology* 1–37. <http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2016.1146363>.
- Groh, K.J., Carvalho, R.N., Chipman, J.K., Denslow, N.D., Halder, M., Murphy, C.A., Roelofs, D., Rolaki, A., Schirmer, K., Watanabe, K.H., 2015. Development and application of the adverse outcome pathway framework for understanding and predicting chronic toxicity: I. Challenges and research needs in ecotoxicology. *Chemosphere* 120, 764–777. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.09.068>.
- Grutters, B.M.C., Verhofstad, M.J.J.M., van der Velde, G., Rajagopal, S., Leuven, R.S.E.W., 2012. A comparative study of byssogenesis on zebra and quagga mussels: the effects of water temperature, salinity and light–dark cycle. *Biofouling* 28, 121–129. <http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2012.654779>.
- Guerlet, E., Ledy, K., Meyer, A., Giambérini, L., 2007. Towards a validation of a cellular biomarker suite in native and transplanted zebra mussels: a 2-year integrative field study of seasonal and pollution-induced variations. *Aquat. Toxicol.* 81, 377–388. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.12.016>.
- Guerlet, E., Vasseur, P., Giambérini, L., 2010. Spatial and temporal variations of biological responses to environmental pollution in the freshwater zebra mussel. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1170–1181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.05.009>.
- INERIS, 2005. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques: Chrome et ses dérivés (No. DRC-01-05590-00DF253). Version No2–1, September.
- INERIS, 2006. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques: Nickel et ses dérivés (No. DRC-02-25590-02DF44).
- IPCC, 2014. In: Pachauri, R.K., Meyer, L.A. (Eds.), *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, IPCC, Geneva, Switzerland. Core Writing Team.
- Johns, C., Timmerman, B.E., 1998. Total cadmium, copper, and zinc in two dreissenid mussels, *Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*, at the outflow of Lake Ontario. *J. Gt. Lakes. Res.* 24, 55–64.
- Kamel, N., Attig, H., Dagnino, A., Boussetta, H., Banni, M., 2012. Increased temperatures affect oxidative stress markers and detoxification response to benzo[a] Pyrene Exposure in Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 534–543. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-012-9790-3>.
- Kamel, N., Burgeot, T., Banni, M., Chalhaf, M., Devin, S., Minier, C., Boussetta, H., 2014. Effects of increasing temperatures on biomarker responses and accumulation of hazardous substances in rope mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from Bizerte lagoon. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 6108–6123. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-2540-5>.
- Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Padilla, D.K., 1998. Physical factors that limit the distribution and abundance of *Dreissena polymorpha* (Pall.). *J. Shellfish Res.* 17, 1219–1235.
- Karatayev, A.Y., Mastitsky, S.E., Padilla, D.K., Burlakova, L.E., Hajduk, M.M., 2011. Differences in growth and survivorship of zebra and quagga mussels: size matters. *Hydrobiologia* 668, 183–194. <http://dx.doi.org/10.1007/s10750-010-0533-z>.
- Lagadic, L., 2002. Biomarkers: useful tools for the monitoring of aquatic environments. *Rev. Med. Veterinaire* 153, 581–588.
- MacIsaac, H.J., 1994. Comparative growth and survival of *Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*, exotic molluscs introduced to the Great Lakes. *J. Gt. Lakes. Res.* 20, 783–790. [http://dx.doi.org/10.1016/S0380-1330\(94\)71196-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0380-1330(94)71196-5).
- Matthews, J., Van der Velde, G., Bij de Vaate, A., Collas, F.P.L., Koopman, K.R., Leuven, R.S.E.W., 2014. Rapid range expansion of the invasive quagga mussel in relation to zebra mussel presence in The Netherlands and Western Europe. *Biol. Invasions* 16, 23–42. <http://dx.doi.org/10.1007/s10530-013-0498-8>.
- Matthews, J., Schipper, A.M., Hendriks, A.J., Yen Le, T.T., bij de Vaate, A., van der Velde, G., Leuven, R.S.E.W., 2015. A dominance shift from the zebra mussel to the invasive quagga mussel may alter the trophic transfer of metals. *Environ. Pollut.* 203, 183–190. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.032>.
- Minguez, L., Boiché, A., Sroda, S., Mastitsky, S., Brulé, N., Bouquerel, J., Giambérini, L., 2012. Cross-effects of nickel contamination and parasitism on zebra mussel physiology. *Ecotoxicology* 21, 538–547. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-011-0814-y>.
- Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W., Paul Leonard, D., 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat. Res. Fundamental Mol. Mech. Mutagen.* 552, 247–268. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.028>.
- Nalepa, T.F., Fanslow, D.L., Pothoven, S.A., 2010. Recent changes in density, biomass, recruitment, size structure, and nutritional state of *Dreissena* populations in southern Lake Michigan. *J. Gt. Lakes. Res.* 36, 5–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jglr.2010.03.013>.
- Pain-Devin, S., Cossu-Leguille, C., Giffard, A., Giambérini, L., Jouenne, T., Minguez, L., Naudin, B., Parant, M., Rodius, F., Rousselle, P., Tarnowska, K., Daguin-Thiebaut, C., Viard, F., Devin, S., 2014. Towards a better understanding of biomarker response in field survey: a case study in eight populations of zebra mussels. *Aquat. Toxicol.* 155, 52–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.06.008>.
- Pavlova, V., Izyumov, Y., 2014. Morphological Variability of *Dreissena polymorpha* and *Dreissena Rostriformis Bugensis* (Mollusca: Bivalvia), in: *Quagga and Zebra Mussels - Biology, Impacts and Control*. Thomas F. Nalepa & Don W. Schloesser, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 287–314.
- Peyer, S.M., McCarthy, A.J., Lee, C.E., 2009. Zebra mussels anchor byssal threads faster and tighter than quagga mussels in flow. *J. Exp. Biol.* 212, 2027–2036. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.028688>.
- Ram, J.L., Karim, A.S., Banno, F., Kashian, D.R., 2012. Invading the invaders: reproductive and other mechanisms mediating the displacement of zebra mussels by quagga mussels. *Invertebr. Reprod. Dev.* 56, 21–32. <http://dx.doi.org/10.1080/07924259.2011.588015>.
- Ricciardi, A., Whoriskey, F.G., 2004. Exotic species replacement: shifting dominance of dreissenid mussels in the Soulanges Canal, upper St. Lawrence River, Canada. *J. North Am. Benthol. Soc.* 23, 507–514. [http://dx.doi.org/10.1899/0887-3593\(2004\)023<0507:essrdo>2.0.co;2](http://dx.doi.org/10.1899/0887-3593(2004)023<0507:essrdo>2.0.co;2).

- Richman, L., Somers, K., 2005. Can we use zebra and quagga mussels for bio-monitoring contaminants in the Niagara River? *Water Air Soil Pollut.* 167, 155–178. <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-005-0083-6>.
- Rosenberg, G., Ludyanskiy, M.L., 1994. A nomenclatural review of *Dreissena* (Bivalvia: Dreissenidae), with identification of the Quagga Mussel as *Dreissena bugensis*. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 51, 1474–1484. <http://dx.doi.org/10.1139/f94-147>.
- Rutzke, M.A., Gutenmann, W.H., Lisk, D.J., Mills, E.L., 2000. Toxic and nutrient element concentrations in soft tissues of zebra and quagga mussels from Lakes Erie and Ontario. *Chemosphere* 40, 1353–1356. [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00281-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00281-7).
- Schäfer, S., Hamer, B., Treursic, B., Möhlenkamp, C., Spira, D., Korlevic, M., Reifferscheid, G., Claus, E., 2012. Comparison of bioaccumulation and biomarker responses in *Dreissena polymorpha* and *D. bugensis* after exposure to resuspended sediments. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 614–627. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-011-9735-2>.
- Sokolova, I., Lannig, G., 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Clim. Res.* 37, 181–201. <http://dx.doi.org/10.3354/cr00764>.
- Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A.A., 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar. Environ. Res.* 79, 1–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003>.
- Spidle, A.P., May, B., Mills, E.L., 1995. Limits to tolerance of temperature and salinity in the quagga mussel (*Dreissena bugensis*) and the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 52, 2108–2119. <http://dx.doi.org/10.1139/f95-804>.
- Stoeckmann, A., 2003. Physiological energetics of Lake Erie dreissenid mussels: a basis for the displacement of *Dreissena polymorpha* by *Dreissena bugensis*. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 60, 126–134. <http://dx.doi.org/10.1139/F03-005>.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 321–336. [http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00159-H](http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849(94)00159-H).
- Stuijzand, S.C., Kraak, M.H.S., Wink, Y.A., Davids, C., 1995. Short-term effects of nickel on the filtration rate of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 376–381. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00195108>.
- Sulmon, C., van Baaren, J., Cabello-Hurtado, F., Gouesbet, G., Hennion, F., Mony, C., Renault, D., Bormans, M., El Amrani, A., Wiegand, C., Gérard, C., 2015. Abiotic stressors and stress responses: what commonalities appear between species across biological organization levels? *Environ. Pollut.* 202, 66–77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.013>.
- Tsangaris, C., Papathanassiou, E., Nicolaidou, A., 2008. Biochemical biomarkers and overall health status of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to nickel and chromium. *Chem. Ecol.* 24, 315–327. <http://dx.doi.org/10.1080/02757540802368650>.
- Vasseur, P., Cossu-Leguille, C., 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environ. Int.* 28, 711–717. [http://dx.doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00116-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00116-2).
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 146, 281–300. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.04.011>.
- Vignati, D.A.L., Dominik, J., Beye, M.L., Pettine, M., Ferrari, B.J.D., 2010. Chromium(VI) is more toxic than chromium(III) to freshwater algae: a paradigm to revise? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 743–749. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.01.011>.

Partie II : Différences inter-populationnelles et inter-spécifiques en terme de tolérance au stress (publication n°3)²⁷

Les différences de tolérance au stress entre espèces et entre populations ont ici été évaluées en conditions de stress multiples en laboratoire. Le but de cette expérimentation était d’approfondir la compréhension des réponses des biomarqueurs chez les dreissènes, en tenant compte de la variabilité inter et intra-spécifique. Les conditions environnementales locales et les caractéristiques génétiques d’une population donnée vont en effet conditionner ses réponses aux modifications environnementales. Des différences de réponses peuvent donc être observées entre deux espèces, même lorsqu’elles cohabitent sur un même site, mais aussi entre plusieurs populations d’une même espèce.

Pour déterminer s’il existe effectivement des réponses différentielles aux stress environnementaux, les deux espèces de dreissènes (*D. polymorpha* = ZM ; *D. r. bugensis* = QM) ont été échantillonnées sur deux sites où elles sont présentes en sympatrie (Montigny – Canal de Jouy = site 1 et Saint Mihiel = site 2), et une autre population de *D. r. bugensis* (celle de Montigny – Canal de Metz = site 3) a également été échantillonnée. Ces 5 populations ont été exposées en laboratoire à différents stress : un stress thermique (12 ou 17 °C), un stress alimentaire (nourriture ou non), une contamination au nickel (0, 20 ou 500 µg.L⁻¹) et une certaine durée d’exposition (0, 4 ou 8 jours).

Les résultats mettent surtout en évidence les fortes différences inter-spécifiques et inter-populationnelles, déjà observées durant toutes nos expérimentations, et soulignent à nouveau la nécessité de différencier correctement les deux espèces et de caractériser correctement les populations utilisées en biosurveillance. Comme nous l’avons montré dans le chapitre précédent, ces différences existent déjà *in situ*, aussi bien pour l’indice de condition que pour les biomarqueurs, et sont maintenues lors d’expositions en laboratoire.

Les deux espèces (ZM2 et QM2) vivant sur le site de Saint Mihiel (le moins contaminé des trois) ont un meilleur indice de condition et semblent plus proches l’une de l’autre que celles vivant sur le site de Montigny – Canal de Jouy (ZM1 et QM1) : en effet, leur réponses convergent après la période d’acclimatation, et cette relation plus étroite est confirmée après l’exposition aux différents stress, puisqu’elle diffèrent seulement en réponse au temps d’exposition, alors que ZM1 et QM1 diffèrent à la fois en réponse au temps d’exposition et à l’augmentation de température. Si on considère le fait que (1) les populations de *D. polymorpha* sont installées depuis plus longtemps et pourraient être génétiquement adaptées à leur environnement et (2) que le site de Montigny (site 1) est le plus contaminé, on peut supposer que les ZM1 sont plus accoutumées à des stressseurs et auront tendance à répondre de manière

²⁷ Les données supplémentaires relatives à cette publication sont disponibles en Annexe 3

spécifique par rapport aux QM1, alors que les ZM2 vivant sur un site plus propre ne seront pas adaptées à des stress sévères et auront des réponses plus proches des QM2.

Comme pour les expositions au Ni et au Cr, les populations de *D. polymorpha* présentent une activité antioxydante plus élevée et un métabolisme énergétique plus actif, contrairement aux populations de *D. r. bugensis* qui ont des réserves énergétiques plus conséquentes mais subissent plus de dommages cellulaires.

Concernant les différences inter-populationnelles, les populations de *D. r. bugensis* ont des patrons de réponse similaires et sont moins réactives à la contamination. Pour *D. polymorpha*, la population vivant sur le site le plus contaminé (ZM1) présente des biomarqueurs de défense plus actifs et est capable de maintenir son métabolisme énergétique en absence de nourriture ou lorsque le temps d'exposition augmente, contrairement aux ZM2. Ici encore, cela pourrait refléter les différences de dynamique d'invasion : les populations de *D. r. bugensis*, arrivées plus récemment, sont capables d'une acclimatation physiologique, similaire entre différentes populations, alors que pour *D. polymorpha*, arrivée il y a 200 ans, on peut supposer qu'une adaptation génétique s'est mise en place dans chaque population, expliquant les plus grandes différences de réponses observées entre populations.

Les résultats montrent aussi un effet du stress alimentaire sur les populations de *D. polymorpha* et l'impact de l'augmentation de température, qui entraîne notamment une augmentation de l'activité LDH. La température et la disponibilité en nourriture jouent un rôle important dans les processus biochimiques et physiologiques. En effet, à 12 °C, l'activité métabolique des moules est ralentie, elles ont donc besoin de moins d'énergie, et l'absence de nourriture n'engendre pas d'effet marqué. Puisque la dépense énergétique pour la filtration et l'assimilation de la nourriture est réduite, elles disposent de plus d'énergie pour activer leurs systèmes de défense. A l'inverse, à 17 °C, la demande métabolique augmente, les organismes nourris sont donc avantagés alors que les non-nourris souffrent plus des conditions d'exposition. Une augmentation de température peut donc influencer le métabolisme et la sensibilité des organismes à des stress additionnels, surtout quand il s'agit d'organismes ectothermes.

Pour conclure, nous avons vu que les mécanismes de défense sont plus actifs chez *D. polymorpha*, alors que *D. r. bugensis* présente des réserves énergétiques et des dommages cellulaires plus importants. Les différences de réponses aux facteurs de stress observées entre les espèces et entre les populations pourraient refléter l'invasion plus ancienne de *D. polymorpha*, potentiellement adaptée et dont les populations sont probablement génétiquement différenciées selon leurs conditions environnementales locales.

Cette expérience en conditions de stress multiples a généré un grand nombre de résultats, et les analyses statistiques sont difficiles à effectuer sur de tels ensembles de données, avec de multiples facteurs agissant sur les réponses des biomarqueurs. Nous avons néanmoins réussi à identifier les principales tendances. Les résultats ont montré que les populations et les espèces, pour plusieurs facteurs de stress, réagissent de la même manière, ce qui semble avantageux pour la biosurveillance. Cependant,

ils mettent en évidence que les niveaux de base sont différents entre les espèces et les populations, ce qui signifie qu'il serait difficile d'établir un intervalle de réponse «environnement sain», en dehors duquel les populations étudiées pourraient être considérées comme stressées.

Ainsi, les biomarqueurs ne seraient pas facilement applicables dans une approche ponctuelle (évaluer la qualité d'un site donné à un instant t par rapport à la gamme de référence), mais pourraient être utilisables plus aisément dans le cadre d'une approche comparative impliquant plusieurs sites, pour déterminer un gradient de qualité entre les sites. De tels résultats indiquent également qu'il est nécessaire de discriminer correctement les deux espèces, car leurs réponses à la contamination sont différentes. Cela signifie également qu'il est nécessaire de connaître les populations à utiliser en biosurveillance active et la nécessité de prendre en compte les différences de scénarios adaptatifs entre différentes populations d'une espèce donnée en biosurveillance passive.

Des dosages de glycogène ont aussi été réalisés durant cette expérimentation sur les populations de ZM1 et QM3. Les résultats ne sont pas présentés dans la publication mais sont disponibles en Annexe 3.

IMPACT OF MULTIPLE STRESSORS ON BIOMARKER RESPONSES IN SYMPATRIC DREISSENIID POPULATIONS

Marine Potet, Laure Giambérini, Sandrine Pain-Devin, Audrey Catteau, Danièle Pauly, Simon Devin.

Abstract

Dreissenid mussels, well-known invaders of the northern hemisphere, also constitute good biomonitors for freshwater quality assessment. Whereas the oldest, *D. polymorpha*, is relatively well-known, the new invasive, *D. r. bugensis*, has been very little characterized. The aim of this study was to go deeper in the understanding of subcellular biomarker responses within these species, by taking into account inter and intra-specific variability in biomarker responses during a multi-stress assessment. Indeed, due to local environmental conditions and genetic background, biomarker responses can be different among populations of a given species, not only among species. To evaluate these differential responses, we sampled mussels on two sites where they are both present in sympatry (plus another *D. r. bugensis* population), and we exposed these populations in laboratory to different stressors: thermal stress (12 or 17 °C), dietary stress (fed or unfed), contamination (nickel at 0, 20 and 500 µg.L⁻¹) and exposure duration (0, 4 or 8 days). Results mainly evidenced strong inter-species and inter-population differences, underlining the need to discriminate correctly between the two species and to know well the populations used in biomonitoring. Results also evidenced thermal and food stress-related effects. The numerous data obtained during this multi-stress experiment also highlight the complexity of working on several stressors and analysing the associated results.

Keywords

Dreissena, multi-biomarker, sympatry, multi-stress

Introduction

Dreissenid mussels, mainly represented by zebra (*Dreissena polymorpha*) and quagga (*Dreissena rostriformis bugensis*) mussels, are well-known invaders of the northern hemisphere freshwaters (Karatayev et al., 2012). In Europe, the first to invade about 200 years ago (van der Velde et al., 2010), *D. polymorpha*, is part of the Europe's top 10 invasive species identified through the DAISIE project (<http://www.europe-aliens.org/>; Vilà et al., 2010). However Western-European hydrosystems have recently been invaded by its sister-species, *D. r. bugensis*. This new invasive tends to replace the former one (Heiler et al., 2013; Marescaux et al., 2015; Matthews et al., 2014), and studies concerning both species often focus on this dominance shift (Heiler et al., 2013; Karatayev et al., 2015; Marescaux et al., 2015) and its consequences (Matthews et al., 2015), on their invasiveness, or on their tolerance to environmental parameters to predict their invasion range (De Ventura et al., 2016; Ellis and MacIsaac, 2009; Garton et al., 2014; Jones and Ricciardi, 2005).

However, due to their particular life history traits, they can also be used as sentinel organisms to evaluate water quality. They are widespread sessile filter-feeders, that can live for several years and reach high population densities (Akopian et al., 2001), and are thus able to reflect on-site contamination for relatively long periods. Since *D. polymorpha* was the first to invade, it is currently used in biomonitoring to evaluate both the presence of contaminants (Bourgeault et al., 2011; Mills et al., 1993) and their subsequent effects on individuals (Faria et al., 2014; Palais et al., 2012). This species is even considered as the freshwater counterpart of *Mytilus edulis* as a sentinel species (Binelli et al., 2015).

Since the invasion by *D. r. bugensis* is more recent, this species has not been regarded so far as a potential biomonitor, and studies concerning its responses to contamination are scarce. Most studies

comparing the two species have focused on their morphologies (Beggel et al., 2015; Claudi and Mackie, 1994; Teubner et al., 2016), their feeding and growth capacities (Baldwin et al., 2002; Karatayev et al., 2011), their reproductive outputs (Claxton and Mackie, 1998) and their environmental requirements (Karatayev et al., 2015; Ram et al., 2012), but less is known on their tolerance and their responses to contaminants (Ács et al., 2016; Farkas et al., 2017; Potet et al., 2016; Schäfer et al., 2012).

Contaminants can impact organisms at different levels of biological organization. The study presented here focuses on responses at the suborganismal level, that enable to quickly detect exposure and effects exerted by contaminants before higher levels of biological organization (population, community and ecosystem) are affected. Biomarkers are biochemical, physiological or behavioural parameters that can be measured in individuals to evidence the presence and effects of contaminants, and to understand their mode of action (Depledge and Fossi, 1994; Lagadic, 2002; Viarengo et al., 2007). They are considered as sensitive early-warning tools to detect the impact of stressors on organisms and can be used in biomonitoring, since a modification in biomarker response may evidence that a modification in environmental conditions occurred (Adams et al., 2001; Depledge and Fossi, 1994; Moore et al., 2004). The use of multiple biomarkers enables the understanding of different toxicity mechanisms triggered by multiple stressors existing in the field and that may with time lead to an overall adverse effect (de Lafontaine et al., 2000; Faria et al., 2009; Van der Oost et al., 2003).

However, when using different species or different populations in biomonitoring, one must pay attention to the differential tolerance to stress. Indeed, biomarker responses are generally different from one population to another, since each population is influenced by its local environmental conditions and its genetic background (Klerks and Weis, 1987; Millward and Klerks, 2002). This is also true when considering different species, even phylogenetically related, such as the dreissenids. Tolerance acquisition is thus heterogeneous and influences organisms' ability to respond to environmental stressors. To understand and correctly interpret biomarker responses measured in dreissenids in the frame of biomonitoring, inter-population variability in tolerance should be evaluated and attention must also be paid to inter-specific variability.

It thus seemed important to evaluate the influence of the selected species and populations in the interpretation of their biomarker responses. Our previous work has shown that *D. polymorpha* is more capable to respond to nickel contamination and to activate defence mechanisms compared to *D. r. bugensis* (Potet et al., 2016). *D. polymorpha* populations are also more tolerant to an acute nickel concentration, and present a higher survival time than *D. r. bugensis* (Potet et al., 2017, in prep.). The present study is the continuity of this work, but here we focused on sympatric populations of both species, to evaluate responses to stressors for species naturally living on a same site. The aim of this study was to compare biomarker responses of different populations of both species exposed to multiple stressors in laboratory, to evidence inter-species and inter-population differences in terms of stress tolerance. We wanted to evaluate (1) how does biomarkers responses vary between the two species (2) the differences in biomarker responses between sympatric populations of both species (3) how are the biomarkers modulated between different populations of a given species living in different environments.

Material and methods

1. Organism collection and biometric data

Organisms were hand-collected in March 2016 by section of their byssus. Three French waterways were selected: a first one in Montigny-lès-Metz, (E06°09'53.3" N49°06'42.3"; **site 1**) and a second one in Saint-Mihiel (E05°32'04.2" N48°53'13.8"; **SITE 2**); on these sites, both species were present simultaneously. The third site was located close to the first waterway in Montigny-lès-Metz (E06°09'54.5" N49°06'45.4"; **site 3**) but only *D. r. bugensis* was present. We thus had 5 different

populations. The two species were differentiated according to morphometric parameters (Pavlova and Izyumov, 2014; Teubner et al., 2016). Water temperature on sampling sites was 7.8-7.9 °C.

Mussels were quickly transferred to the laboratory, measured (length, width and height of shell, in mm) and their soft tissues were weighed (without byssus, in mg). Mussels from site 1 were 23.6 ± 3 mm in length for *D. polymorpha* and 17.4 ± 1 for *D. r. bugensis* (n = 12 for both species); they were 24 ± 2 for *D. polymorpha* and 29.9 ± 2 for *D. r. bugensis* from site 2 (n = 12 for both species); and 28.5 ± 3 for *D. r. bugensis* from site 3 (n = 5). A condition index was calculated for each individual, according to the following formula (Guerlet et al., 2010):

$$\text{Condition Index (mg mm}^{-3}\text{)} = \text{wet weight} / (\text{length} \times \text{width} \times \text{height})$$

After biometric measurements, the digestive gland of these mussels were frozen until biomarker analysis, and were considered as field controls (for biomarkers: n = 12 for ZM1, QM1, ZM2, QM2 and n = 5 for QM3).

2. Acclimation

The remaining mussels were maintained in aerated 15 L tanks (1 tank per population) in their water of origin during 72 h. Tanks were placed in a water bath and progressively acclimated to 12 °C. Then, their water of origin was progressively replaced by spring water during 96 h (Cristaline®, 1/3 per day, and only in Cristaline® for the last day; Ca^{2+} : 106; Mg^{2+} : 4.2; Na^{+} : 3.5; K^{+} : 1.5; HCO_3^{-} : 272; SO_4^{2-} : 50; Cl^{-} ; F^{-} : 0.9 mg L⁻¹). Mussels were then placed in 600 mL beakers containing only Cristaline®, for 24 h, to allow byssal fixation (5 individuals of the same population per beaker), still in the 12 °C water bath. Mussels were not fed during acclimation and were under natural photoperiod.

3. Exposure treatments

Since mussel's densities were low for some populations, we were not able to test all the experimental conditions for all populations (see Table I for experimental design).

Table I: Experimental treatments for the five different populations. ZM = D. polymorpha, QM = D. r. bugensis, from site 1 (ZM1, QM1), site 2 (ZM2, QM2) or site 3 (QM3). Each population in a given experimental condition correspond to 1 beaker containing 5 individuals. Mussels were exposed to Ni at 0, 20 or 500 µg.L⁻¹. They were either fed (F) or unfed (NF). Beakers were placed in 12 or 17 °C water baths. Mussels were sampled before starting exposure to Ni (D₀), and after 4 (D₄) or 8 (D₈) days of exposure and their digestive glands were used either for biomarker measurements.

			Ni 0 µg.L ⁻¹		Ni 20 µg.L ⁻¹		Ni 500 µg.L ⁻¹	
			F	NF	F	NF	F	NF
12 °C	Biomarkers	D ₀	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3
		D ₄	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2
		D ₈	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3
17 °C	Biomarkers	D ₀	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3
		D ₄	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2
		D ₈	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3

After acclimation and before starting exposures, some mussels were sampled as day 0 controls (D₀). Then, each beaker containing 5 mussels was emptied and Cristaline® was replaced by 500 mL of exposure media. There were three different treatments: Ni 0 µg.L⁻¹ (only water) and Ni at 20 or 500 µg

L⁻¹ (expressed as total ion Ni). Ni chloride (Cl₂Ni · 6H₂O, ref 25851.236) was purchased from VWR (Radnor, Pennsylvania). A stock solution of Ni (250 mg L⁻¹), expressed as total ion concentration, was prepared and acidified to 1% with nitric acid. Nominal test concentrations were made by diluting metal stock solution. Experimental beaker water was not aerated to limit metal adsorption onto glass walls and were either placed in a 12 or 17 °C water bath, depending on experimental treatment considered. All media were prepared with Cristaline® and were renewed every 48 h both to ensure a semi-static exposure, and to avoid a drop in oxygen concentrations within the beakers. Since there is no toxicity value for dreissenids exposed to Ni, the choice for exposure concentrations was a compromise between environmental quality standards, toxicity values for other invertebrates and previous experiments in our laboratory. For Ni, 20 µg L⁻¹ corresponds to the European legal limit for concentration in drinking water (CD 98/83/EC, 1998) and 500 µg L⁻¹ is the French legal limit of concentration in industrial discharge (Decree of the 2nd February 1998 on the classified installations, Article 32).

For fed mussels (F), stock solutions of living *Chlorella sp.* were prepared at 3.10⁸ cells.mL⁻¹ and 1 mL of this solution was distributed in each beaker every day (10⁶ cells.mL⁻¹.individual⁻¹.day⁻¹).

4. Tissue collection

At each sampling time (D₀, D₄, D₈), beakers were retrieved from the water baths and mussel's digestive gland were dissected and frozen at -80 °C until being processed for further analysis. Tissue of each mussel was analysed individually.

5. Biomarker measurements

Biomarker responses in the digestive glands were measured using an automated spectrophotometer (Konelab 20-XTi, ThermoScientific). The digestive gland in mussels is often used to study biomarker responses, since it is considered to be the most metabolically active organ (Viarengo et al., 2007).

Digestive glands were defrosted, weighed and crushed in phosphate buffer (50 mM, pH 7.6 supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1 mM L-serine borate mixture as protease inhibitors) at a 4/1 (v/w) ratio. Homogenates were centrifuged at 250 x g for 5 min at 4 °C (crude extract). Homogenates were used for the assays immediately after their preparation. One part of this fraction was used to evaluate triglyceride (Tri), cholesterol (Chol), lipid hydroperoxide concentration (LOOH), electron transport system (ETS) and acid phosphatase (ACP) activity. The other part underwent a differential centrifugation (1,000 x g for 20 min at 4 °C; the supernatant was recovered and centrifuged again at 20,000 x g for 50 min at 4 °C). The final supernatant corresponding to the cytosolic fraction was used to measure total antioxidant capacity (TAC), glutathione peroxidase (GPx), glutathione-S-transferase (GST), lactate dehydrogenase (LDH), caspase-3 (Csp) and catalase (CAT) activities. Proteins were quantified on both fractions (crude extract and cytosolic fraction) by the Pyrogallol red colorimetric method, using Scal bovine-based serum as a reference. Biomarker responses were measured following classical methods, adapted for automated measurements in our spectrophotometer. The detailed protocols are available in Garaud et al. (2016).

6. On-site physico-chemistry and sediment contamination

Temperature, pH, conductivity and oxygen saturation were measured using a Multi 3430 SET G (WTW) probe. On each site, 2 L of water were sampled for physico-chemical measurements in laboratory. Suspended matter (MES) were determined after water filtration and differential weighing of the filter before and after drying at 105 °C. Volatile suspended solids (MVS) correspond to the part of the MES volatilized after calcination of the filter at 525 °C. Nitrogen compounds were measured by

ionic chromatography (NO_2 , NO_3) or absorption spectrometry (NH_4), phosphates (PO_4) and total phosphorous (P_{tot}) were measured using absorption spectrometry. Cl and SO_4 concentrations were measured by ionic chromatography, and other ions (Ca , Mg , Na , K) by flame atomic absorption spectrophotometry. Total anions, cations and ionic balance were calculated depending on ion concentrations. Alkalimetric title (TAC) was measured by neutralizing a volume of water with a strong mineral acid. Chemical oxygen demand (COD) was measured by adding potassium dichromate in an acid medium, to oxidize organic materials. The excess in dichromate was then titrated with a solution of iron(II)sulfate and ammonium. Biological oxygen demand (BOD) was measured by monitoring the decrease in the amount of oxygen in the sample between 0 and 5 days.

Sediments were also sampled in our 3 studied sites. We made 3 sampling points per site, mixed them, and sent 500 g for metals, PCBs and HAPs analysis to La Drome Laboratoire (Cofrac accreditation n° 1-0852).

7. Statistical analysis

Statistical analysis was made using R software (R Development Core Team, version 3.3.0). Normality and homoscedasticity were tested respectively with Shapiro and Levene tests, followed by analysis of variance (ANOVA, MANOVA or Kruskal-Wallis, depending on previous tests). Inter-condition differences were evaluated through Student t test with risk correction, or post-hoc Tukey or KruskalMC tests.

Partial least square discriminant analysis (PLS-DA) was performed to assess which biomarker responses were able to discriminate experimental groups, and the significant biomarkers (variable importance in the projection, $\text{VIP} > 1$) are underlined on the graphics. Axes of the PLS-DA were then used under Hotelling T^2 tests to assess significant differences between groups.

For all analysis, a threshold of $p \leq 0.05$ is considered significant and degrees of freedom (df) and residual degrees of freedom (df_{res}) are reported. Data on the graphics are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD).

Results

1. Site characterization

Values for on-site physico-chemistry and sediment contamination are available in Table I. Site 3, which houses the QM3 population, seems more eutrophic with higher levels of phosphorous (PO_4 , P_{tot}) and suspended matters (MES). The other physico-chemical parameters are similar between the three sites. Concerning sediment contamination, site 1 is highly contaminated with HAPs compared to the others. Site 3 is more contaminated with metals, especially Al, As, Cr, Fe, Hg, Ni and Zn. Site 2 seems to be the least contaminated for the different elements measured here.

Table II: On-site physico-chemistry and sediment contamination

		Site 1 (Montigny)	Site 2 (St Mihiel)	Site 3 (Montigny)			Site 1 (Montigny)	Site 2 (St Mihiel)	Site 3 (Montigny)
NH ₄		<0,01	0.01	0.05	Anthracene		841	48	32
NO ₂		<0,01	<0,01	<0,01	Benzo(a)anthracene		3324	214	175
NO ₃		1.33	1.96	1.83	Benzo(a)pyrene		3380	82	214
PO ₄		0.006	0.001	0.041	Benzo(ghi)perylene		1785	210	184
P _{tot.}		0.046	0.026	0.102	Benzo(k)fluoranthene		1920	163	130
Cl		164	7.4	86.0	Chrysene		3687	230	159
SO ₄	mg.L ⁻¹	34.0	32.8	43.0	Fluoranthene	µg.kg MS ⁻¹	7762	737	425
MES		3.0	4.6	17.0	Indenolpyrene		1140	130	159
Ca		90.2	86.6	67.2	Naphtalene		1043	18	142
Mg		7.60	8.6	9.10	Phenanthrene		2606	203	175
Na		45.8	6.3	32.1	Sum PCB		2.5	2.5	2.5
K		3.6	2.0	2.9					
COD		49	21	45	Al		40840	29580	67210
BOD		2.2	1.6	1.5	As		11.4	7.8	24.1
					Cd		0.3	0.3	0.9
TA		2.01	4.31	2.17	Cr		81.5	53.9	93.9
Anions	meq.L ⁻¹	7.4	5.3	5.6	Co		6.8	7.2	11.6
Cations		7.2	5.4	5.6	Cu		44.9	23.1	38.8
					Fe	mg.kg MS ⁻¹	27660	17230	33660
MVS	%	57.4	37.2	14.7	Mn		882.3	204.2	626.8
Ionic balance		1.5	-0.2	0.4	Hg		0.04	0.06	0.2
					Ni		16	22.6	37.1
Cond.	µS.cm ⁻¹	820	505	600	Pb		69.7	18.6	58.5
pH		8.0	8.3	8.0	Zn		109.9	122.5	214.4

2. Field and acclimation controls

This part enabled to compare initial physiological status between the different populations. Condition indices and shell volumes are different among and within species (Figure 1). On site 1, condition index is significantly higher for QM1 than for ZM1, contrary to shell volume; this might means that ZM1 shells are larger but less filled with soft tissues. On site 2 there is no difference in condition indices among species, but QM2 has a significantly bigger shell volume.

Among populations, QM3 has a lower condition index compared to QM1 and QM2, but an intermediate shell volume. ZM1 has a lower condition index than ZM2, even though their shell volume is equivalent. Thus, mussels on site 2 seem to be in a better health status and show less inter-specific differences than mussels on site 1.

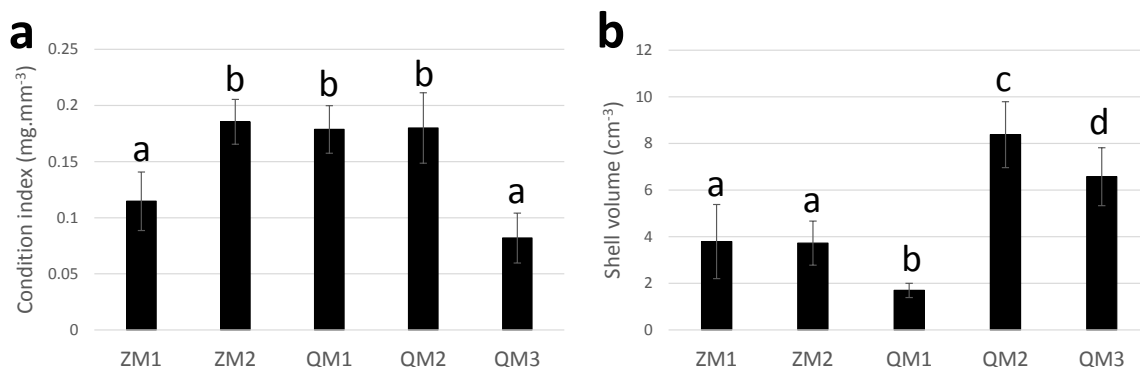


Figure 1: Condition indices (Figure 1a) and shell volumes (Figure 1b) for studied populations of *D. polymorpha* (ZM) and *D. r. bugensis* (QM) in the field ($n = 12$ for ZM1, ZM2, QM1, QM2; $n = 5$ for QM3). Results are expressed as mean $\pm$ SD. Significant differences were tested using Student t-test.

Biomarkers were also measured in the field and after the acclimation period to evaluate potential differences between populations *in situ*, and also to ensure that acclimation did not impact too strongly biomarker responses. When looking at the PLSDA and associated Hotelling tests (Figure 2), the different populations are relatively well separated, which means that in the field (field controls, FC), and before starting the experiments (acclimation controls, AC) they did not have the same biomarker response pattern.

There was a significant interactive effect of acclimation and population on biomarker responses ($p = 2.05 \cdot 10^{-8}$, $F = 2.9$, $df = 4$, $df_{res} = 100$). Acclimation had a greater effect on biomarker responses for QM1, ZM1, and QM2, since their responses are different in the field and after acclimation, but no effect on ZM2 ($p = 0.93$) nor on QM3 ($p = 0.067$, although for this population there is a huge response enlargement after acclimation, and the p value is close to 0.05).

Concerning inter-species differences, responses are closest among species from site 2 than among species from site 1 (see Figure 2a). Even if in the field there is a significant difference between ZM2 and QM2 ($p = 4.3 \cdot 10^{-4}$) and between ZM1 and QM1 ($p = 2.1 \cdot 10^{-10}$), it disappears along with acclimation for ZM2 and QM2 ($p = 0.39$) but still exists between ZM1 and QM1 ($p = 6.6 \cdot 10^{-9}$). Thus, acclimation leads to a convergence of responses for species from site 2, but not for species from site 1.

Regarding inter-population differences, responses for QM populations are more spread out than responses for ZM populations. Finally, except QM2, the global pattern of biomarker responses in each population is similar in the Field and after Acclimation to laboratory conditions.

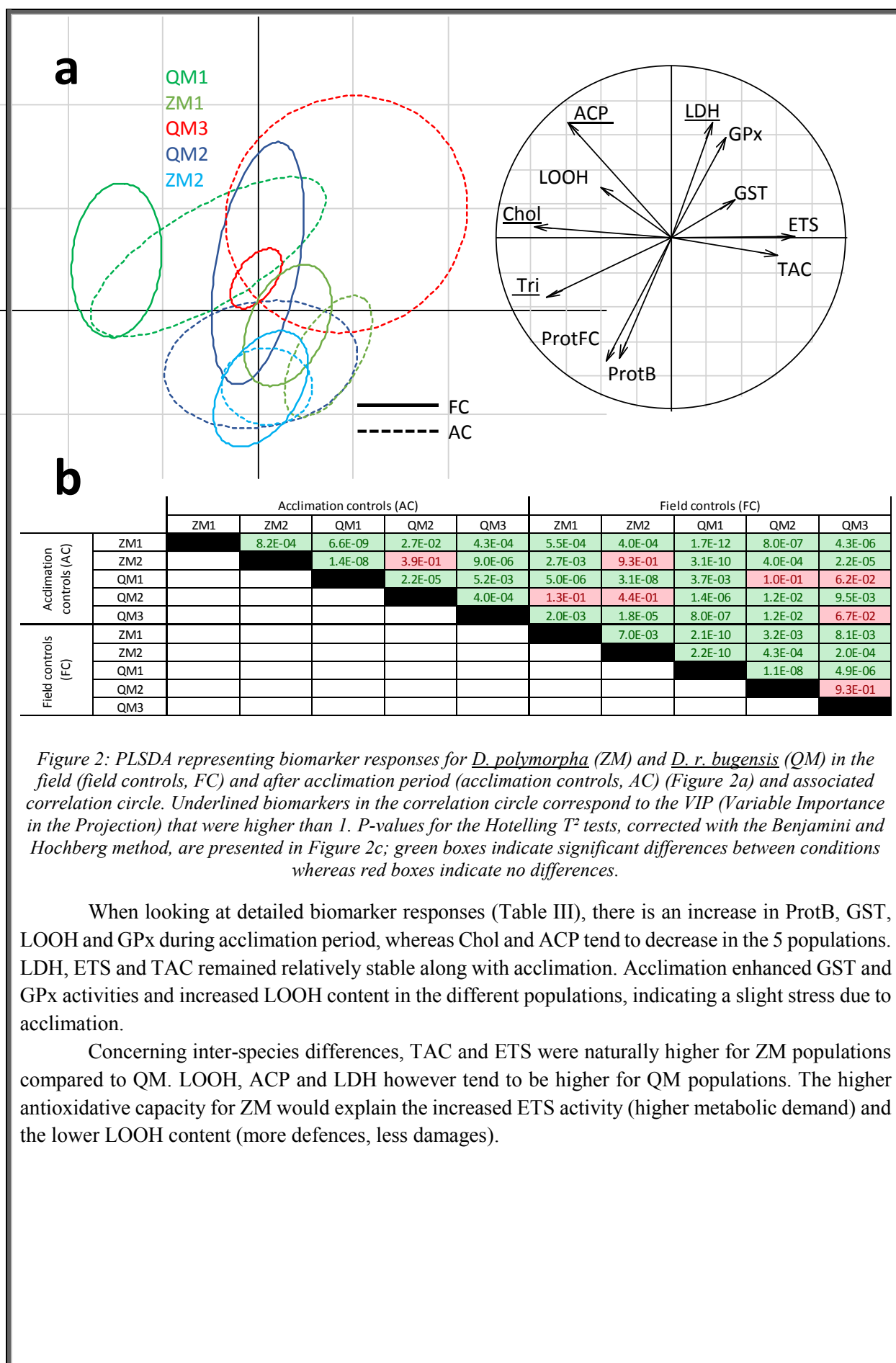


Table III: Detailed biomarker responses for *D. polymorpha* (ZM) and *D. r. bugensis* (QM) in field and acclimation controls. Results are expressed as mean $\pm$ SD ($n = 12$ for ZM1, ZM2, QM1, QM2; $n = 5$ for QM3).

	Field controls				
	QM 1	QM 2	ZM 1	ZM 2	QM3
ProtB (mg.gFW ⁻¹)	62.8 $\pm$ 6.9	52.0 $\pm$ 11.0	57.8 $\pm$ 6.0	64.9 $\pm$ 5.4	53.7 $\pm$ 4.7
Tri (mg.gFW ⁻¹)	32.0 $\pm$ 4.5	19.8 $\pm$ 5.3	15.8 $\pm$ 6.1	23.7 $\pm$ 3.2	7.2 $\pm$ 6.3
Chol (mg.gFW ⁻¹)	3.7 $\pm$ 0.6	1.9 $\pm$ 0.4	2.4 $\pm$ 0.4	2.3 $\pm$ 0.4	2.0 $\pm$ 0.3
ETS (μ mol O ₂ .gFW ⁻¹ .h ⁻¹)	0.8 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.2
LOOH (μ mol.gFW ⁻¹)	43.3 $\pm$ 38.3	42.8 $\pm$ 59.1	14.7 $\pm$ 3.0	19.5 $\pm$ 3.5	20.3 $\pm$ 16.3
ACP (μ mol.gFW ⁻¹ .h ⁻¹)	136.5 $\pm$ 20.8	86.6 $\pm$ 13.0	76.7 $\pm$ 16.4	60.9 $\pm$ 8.9	78.8 $\pm$ 17.5
ProtFC (mg.gFW ⁻¹)	45.6 $\pm$ 4.6	34.0 $\pm$ 8.0	42.7 $\pm$ 5.3	47.1 $\pm$ 4.9	42.0 $\pm$ 4.2
GST (μ mol CDNB.gFW ⁻¹ .min ⁻¹)	342.1 $\pm$ 71.1	223.8 $\pm$ 63.5	432.1 $\pm$ 86.7	266.7 $\pm$ 50.3	221.1 $\pm$ 28.6
GPx (μ mol NADPH.gFW ⁻¹ .min ⁻¹)	43.1 $\pm$ 19.1	40.8 $\pm$ 40.1	36.9 $\pm$ 23.5	26.6 $\pm$ 22.4	27.8 $\pm$ 6.7
TAC (μ mol Teq.gFW ⁻¹ .min ⁻¹)	18.2 $\pm$ 2.9	21.8 $\pm$ 3.2	32.3 $\pm$ 6.9	26.6 $\pm$ 6.5	6.7 $\pm$ 3.7
LDH (μ mol NADH.gFW ⁻¹ .min ⁻¹)	167.9 $\pm$ 30.0	160.7 $\pm$ 51.1	138.2 $\pm$ 36.1	122.3 $\pm$ 20.9	150.7 $\pm$ 45.4

	Acclimation controls				
	QM 1	QM 2	ZM 1	ZM 2	QM 3
ProtB (mg.gFW ⁻¹)	62.8 $\pm$ 4.1	63.6 $\pm$ 7.3	64.4 $\pm$ 5.2	69.1 $\pm$ 4.6	57.8 $\pm$ 9.7
Tri (mg.gFW ⁻¹)	26.1 $\pm$ 15.8	26.6 $\pm$ 5.0	15.8 $\pm$ 5.8	29.6 $\pm$ 5.6	3.9 $\pm$ 4.6
Chol (mg.gFW ⁻¹)	2.6 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.4
ETS (μ mol O ₂ .gFW ⁻¹ .h ⁻¹)	0.7 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.9
LOOH (μ mol.gFW ⁻¹)	84.2 $\pm$ 72.1	50.0 $\pm$ 60.7	15.5 $\pm$ 4.6	27.4 $\pm$ 11.1	34.1 $\pm$ 30.2
ACP (μ mol.gFW ⁻¹ .h ⁻¹)	93.8 $\pm$ 20.3	51.1 $\pm$ 15.1	48.2 $\pm$ 6.5	55.3 $\pm$ 12.0	86.2 $\pm$ 32.7
ProtFC (mg.gFW ⁻¹)	41.7 $\pm$ 4.0	42.2 $\pm$ 4.5	44.3 $\pm$ 4.1	45.2 $\pm$ 3.1	37.2 $\pm$ 7.4
GST (μ mol CDNB.gFW ⁻¹ .min ⁻¹)	406.8 $\pm$ 111.0	324.4 $\pm$ 83.1	453.6 $\pm$ 177.4	375.0 $\pm$ 185.5	477.5 $\pm$ 141.2
GPx (μ mol NADPH.gFW ⁻¹ .min ⁻¹)	91.3 $\pm$ 47.2	32.1 $\pm$ 21.7	52.4 $\pm$ 33.3	45.0 $\pm$ 36.9	86.3 $\pm$ 48.3
TAC (μ mol Teq.gFW ⁻¹ .min ⁻¹)	21.5 $\pm$ 9.5	22.8 $\pm$ 10.4	32.1 $\pm$ 5.9	28.1 $\pm$ 6.6	27.1 $\pm$ 11.9
LDH (μ mol NADH.gFW ⁻¹ .min ⁻¹)	183.1 $\pm$ 54.7	134.3 $\pm$ 33.4	164.6 $\pm$ 28.6	140.0 $\pm$ 24.8	247.7 $\pm$ 78.6

3. Inter-species differences

This part of the results is focused on inter-species differences, to see if there are differences in biomarker responses between the two species living on a same site, and/or if response patterns are the same for the two species exposed to stressors. Consequently, QM3 is excluded of this set of data analysis. We only focus, for both sites, on the effects of principal factors (species, temperature, algae, concentration and time) and two-factor interactions implying the factor species (Table IV). We did not focus on other interactions, since the aim here was to study the major differences between species. Furthermore, level-three (or more) interactions were almost always not significant.

Table IV: MANOVAs accounting for inter-species differences

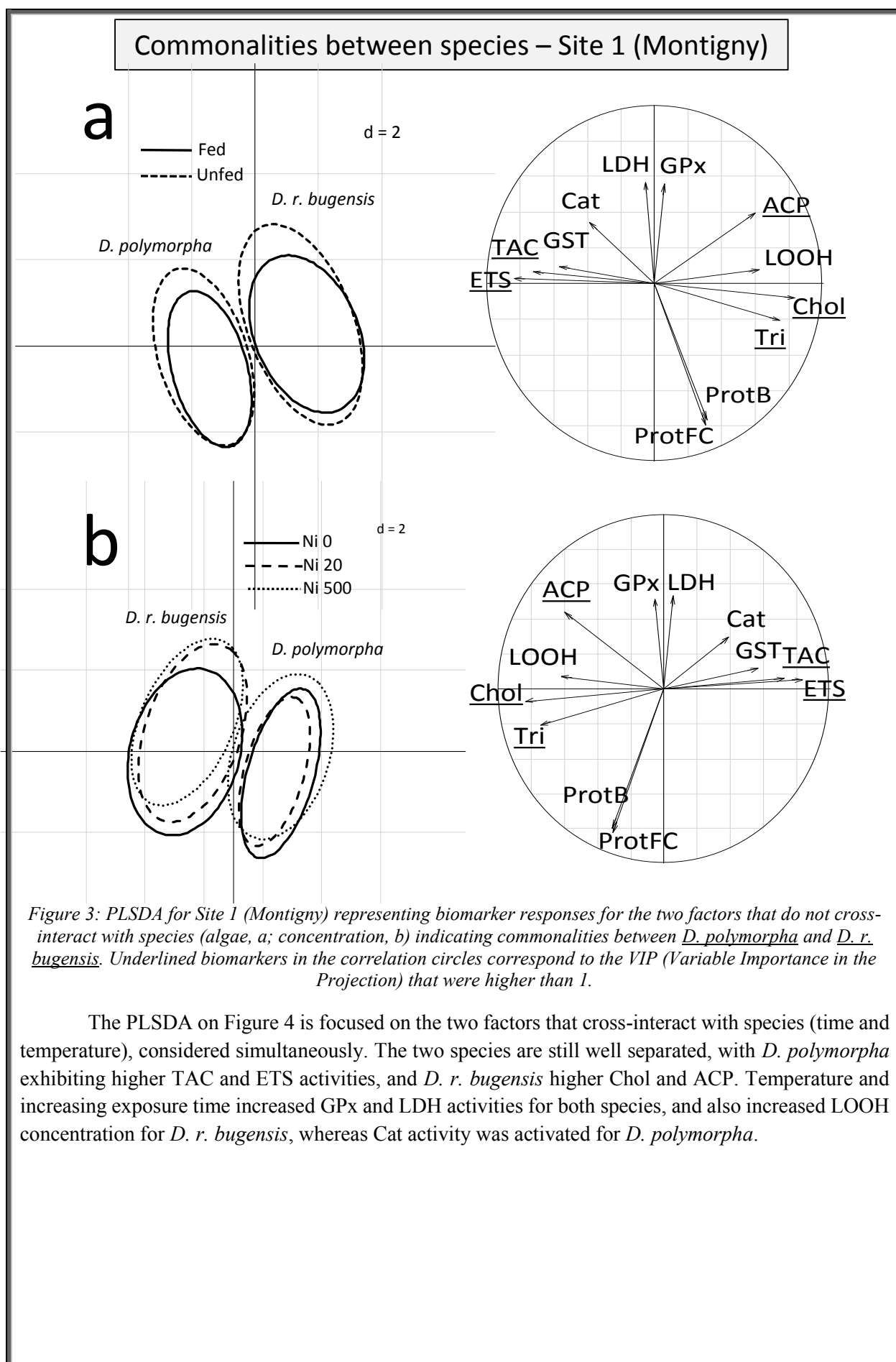
	Site 1 (Montigny) ZM1, QM1	Site 2 (St Mihiel) ZM2, QM2
Species	2.2E-16	2.2E-16
Temperature	2.2E-16	4.4E-08
Algae	4.3E-03	N.S.
Concentration	2.1E-03	N.S.
Time	4.4E-14	3.5E-06
Species x temperature	6.2E-05	N.S.
Species x time	3.2E-04	2.2E-05
Species x concentration	N.S.	N.S.
Species x algae	N.S.	N.S.

- **Site 1 (Montigny)**

For site 1 (Montigny), the five factors (species, temperature, algae, concentration and time) act significantly on biomarker responses (Table IV). Two of these factors interact significantly with species: temperature and exposure time. But there was no interaction between species and nickel concentration or algae. This means that for organisms from site 1, the two species respond the same way to Ni contamination, whatever the concentration, and to the dietary stress; on the contrary, they diverge in their response kinetics (time effect) and depending on temperature.

After analysing the importance of these factors through MANOVA, a PLSDA was run on biomarker responses to describe the commonalities (Figure 3) and the differences (Figure 4) between species.

On Figure 3, we can see that both dietary stress (Figure 3a) and nickel contamination (Figure 3b) triggered the same responses for the two species, although each species respond in his own range. For each of these factors, the same biomarker responses are involved in groups definition (ACP, TAC, ETS, Chol and Tri), but their expression is mainly responsible for the discrimination between the two species, with higher TAC and ETS activities for *D. polymorpha* and higher Tri, Chol and ACP for *D. r. bugensis*.



Differences between species – Site 1 (Montigny)

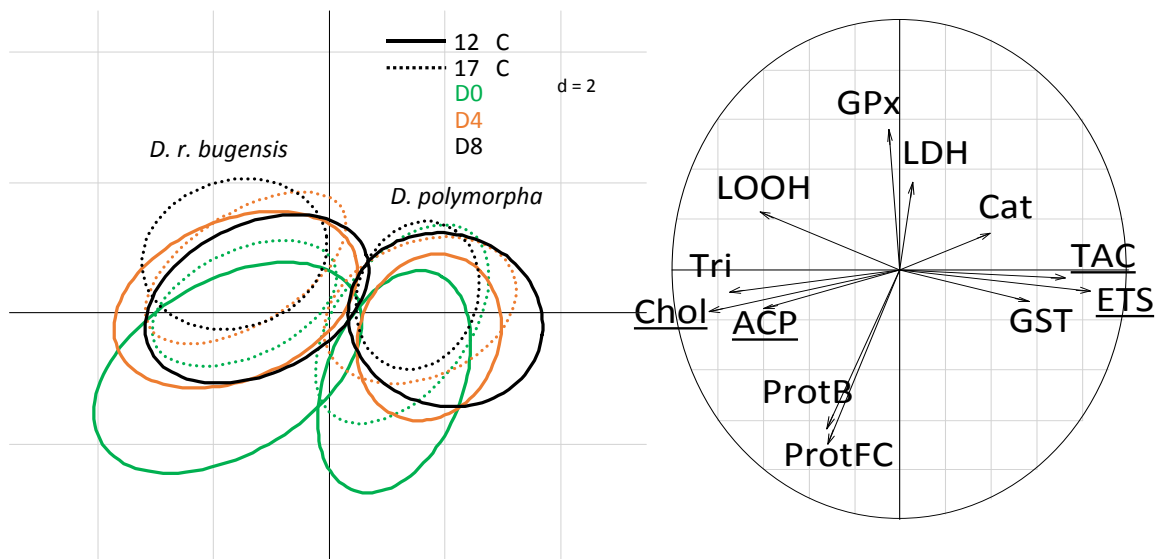


Figure 4: PLSDA for Site 1 (Montigny) representing biomarker responses for the two factors that interact with species (temperature and time) indicating differences between *D. polymorpha* and *D. r. bugensis*. Underlined biomarkers in the correlation circle correspond to the VIP (Variable Importance in the Projection) that were higher than 1.

• Site 2 (St Mihiel)

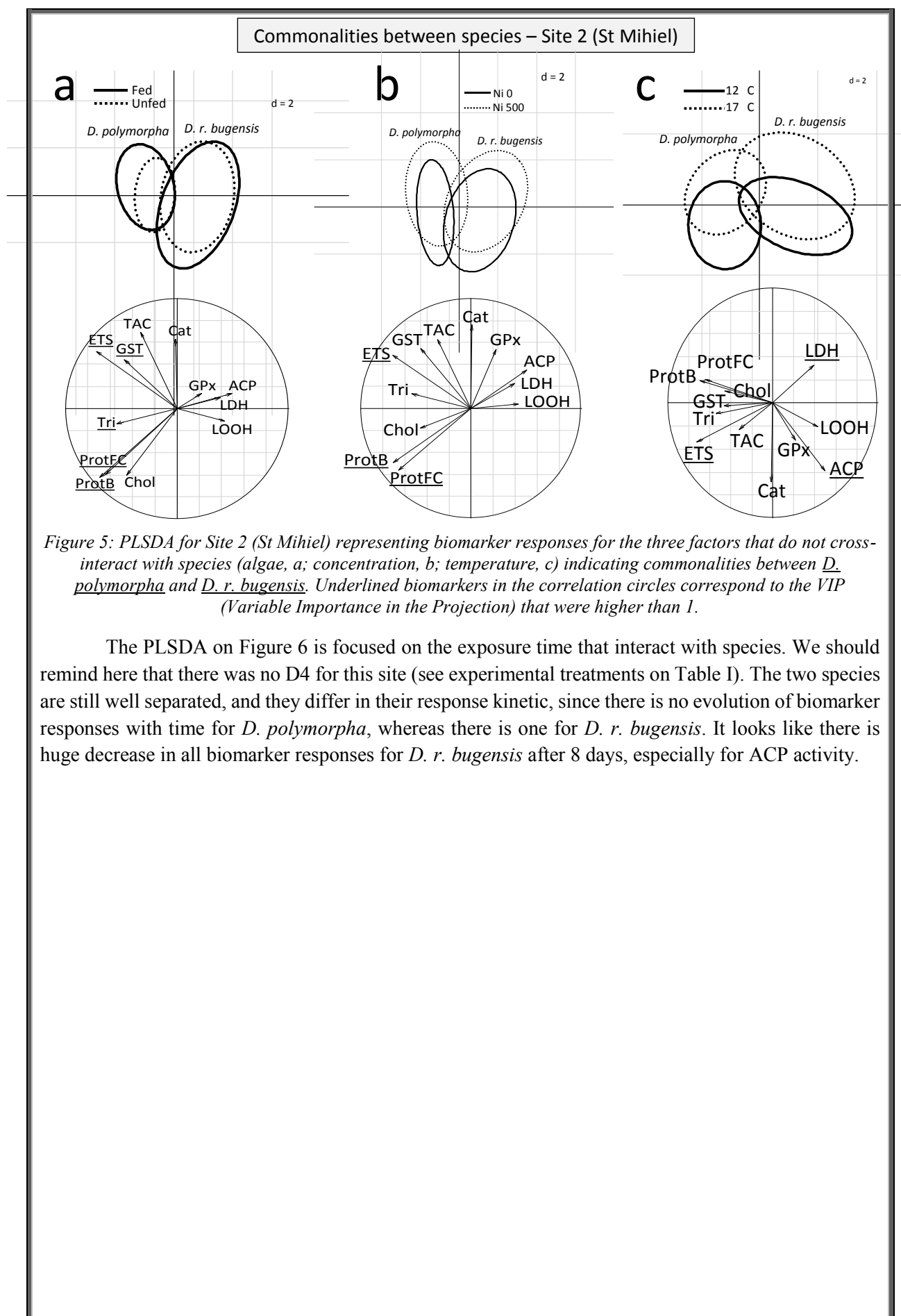
For site 2 (St Mihiel), only three factors (species, temperature, time) act significantly on biomarker responses (Table IV), whereas algae and nickel concentration do not. One interaction between species and exposure time was also significant, but there was no interaction between species and nickel concentration, algae or temperature. This means that for organisms from site 2, the two species respond the same way to Ni contamination, whatever the concentration, and to the dietary and thermal stresses; on the contrary, they diverge in their response kinetics (time effect).

After analysing the importance of these factors through MANOVA, a PLSDA was run on biomarker responses to describe the commonalities (Figure 5) and the differences (Figure 6) between species.

On Figure 5, we can see that dietary stress (Figure 5a), nickel contamination (Figure 5b) and thermal stress (Figure 5c) triggered the same responses for the two species, although each species respond in his own range. Contrary to site 1, it is not the same biomarkers that are involved in the groups differentiation depending on the considered stress factor:

- for dietary stress, in absence of food there is a slight decrease in Tri, ETS and Prots for both species, in GST for *D. polymorpha* and a slight increase in GST activity for *D. r. bugensis*
- for nickel concentration, there is an increase in ETS activity and a decrease in protein contents for both species at the highest exposure concentration
- for thermal stress, there is a decrease in ETS and ACP activities at 17 °C, whereas LDH activity increases.

Besides for thermal stress and Ni concentration, even if the response pattern is similar between the two species, we can observe a slight modification of biomarker responses between 12 and 17 °C, with an increase in LDH activity, and also between 0 and 500 µg.L⁻¹, with an increase in Cat, TAC, GST and GPx activities.



Differences between species – Site 2 (St Mihiel)

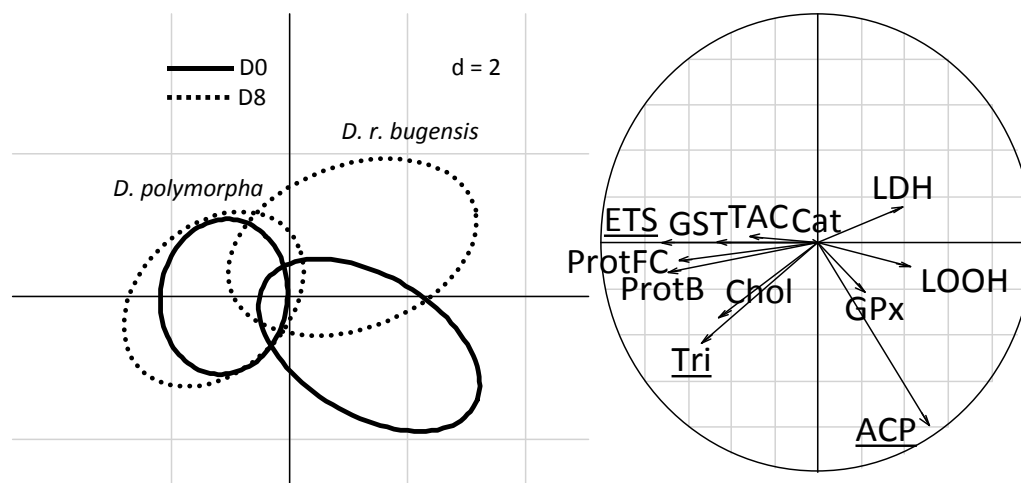


Figure 6: PLSDA for Site 2 (St Mihiel) representing biomarker responses for the factor time that interact with species indicating differences between *D. polymorpha* and *D. r. bugensis*. Underlined biomarkers in the correlation circles correspond to the VIP (Variable Importance in the Projection) that were higher than 1.

Biomarker responses are more similar between species on site 2 (St Mihiel) than they are on site 1 (Montigny), since on site 2 they only diverge relatively to exposure time. Biomarker responses are mainly influenced by temperature and exposure time; this is particularly true for LDH activity.

4. Intra-specific differences

In a second time, we wanted to investigate inter-population differences to see if basal and contaminant-induced biomarker responses are similar for different populations of a given species living on different sites. The same approach as for inter-specific differences has been applied to evaluate inter-population differences.

The effects of principal factors (species, temperature, algae, concentration and time) and significant level-two interactions for both sites are presented in Table V. We did not focus on other interactions, since the aim here was to study the major differences between populations.

Table V: MANOVAs accounting for inter-population differences

	<i>D. polymorpha</i> (ZM1, ZM2)	<i>D. r. bugensis</i> (QM1, QM2, QM3)
Population	2.2E-16	2.2E-16
Temperature	2.2E-16	2.1E-15
Algae	N.S.	N.S.
Concentration	2.1E-02	1.7E-05
Time	1.2E-08	3.5E-13
Populations x time	2.7E-05	N.S.
Population x algae	4.3E-02	N.S.
Population x concentration	N.S.	N.S.
Population x temperature	N.S.	N.S.

- **D. polymorpha (ZM1, ZM2)**

When comparing the two *D. polymorpha* populations, we can see that algae factor is not significant, whereas the other principal factors (population, temperature, concentration, time) are (Table V). For this species, algae and time interact significantly with population, which means that the two *D. polymorpha* population differ in their response to dietary stress and exposure time. On the other hand, the two populations respond similarly to nickel concentration and thermal stress, since there is no interaction with population for these factors.

Table VI reports the VIP values corresponding to the PLSDA analyses performed depending on the interactive and non-interactive factors for *D. polymorpha* populations.

We can see that temperature and nickel concentration do not affect the same biomarkers. The main biological responses involved in thermal stress are an increase in LDH activity, a decrease in ACP, Cat and TAC, no modification in Tri content and an increase in GST for ZM2, whereas it decreases for ZM1. Those involved in response to nickel concentration are Tri, GST, ProtB and ProtFC, which remained relatively stable when the concentration raised. However, these two factors (temperature and concentration) taken separately do not generate differences between the two populations.

On the opposite, exposure time and dietary stress trigger different responses between the two *D. polymorpha* populations. There was a decrease in Tri and ProtFC, coupled with an increase in ETS activity for ZM1 from D0 to D8, whereas the opposite was observed for ZM2. GST activity increased from D0 to D4 for both species; it was highest in fed mussels for ZM1, whereas it was highest in unfed mussels for ZM2.

Table VI: VIP (Variable Importance in the Projection) > 1 (green boxes), [1-0.8] (blue boxes) and [0.8-0.5] (yellow boxes) for the PLSDA performed on *D. polymorpha* populations, depending on the significant (or not) level-two interactions evidenced in the MANOVA.

	Non-interactive factors		Interactive factors
	Population x temperature	Population x concentration	Population x time x algae
Tri	1.46	1.70	1.54
ACP	1.34	0.52	0.65
GST	1.26	1.40	1.28
Cat	1.09	0.67	0.81
LDH	1.08	0.93	0.92
TAC	1.04	0.93	0.99
ETS	0.81	0.89	1.00
Chol	0.79	0.82	0.96
ProtB	0.70	1.03	0.82
LOOH	0.67	0.71	0.89
GPx	0.66	0.67	0.76
ProtFC	0.64	1.11	1.06

- **D. r. bugensis (QM1, QM2, QM3)**

When comparing the three *D. r. bugensis* populations, we can see that algae factor is not significant, whereas the other principal factors (population, temperature, concentration, time) are (Table V). For this species, there are no interactions between stress factors (concentration, time, algae, temperature) and population, which means that the three populations respond similarly to these stressors.

Table VII reports the VIP values corresponding to the PLSDA analyses performed depending on non-interactive factors for *D. r. bugensis* populations.

Considered separately, the four factors that do not interact with population however triggered the same biomarker responses: Tri, GST, Chol, GPx, LOOH. There is one exception with ACP which is also important in the response to exposure time, and decreased from D0 to D8. In a general way, Tri content decreased with exposure time and concentration, but remained constant with rising temperature and in absence of food. Chol content decreased with exposure time, but remained constant under the influence of other stressors. GPx activity increased along with temperature and exposure concentration, decreased with time, and remained stable in the absence of food. LOOH content increased with exposure time and decreased with exposure concentration for the three populations; it decreased for QM1 and QM3 when temperature raised, but remained stable for QM2; it decreased for unfed mussels of QM1 and QM2 but remained stable for QM3. GST activity was unchanged under increasing temperature; it decreased for QM1 along with exposure time, whereas it increased for QM2 and QM3; it increased in unfed mussels of QM1 and QM2 populations, whereas it increased for QM3; GST activity increased with Ni concentration for QM1 and QM3, whereas it remained stable for QM2.

Thus for *D. r. bugensis* populations, the same biomarker responses are involved in the response to the different stressors, and if biomarker responses are considered together, the three populations respond the same way to these stressors.

Table VII: VIP (Variable Importance in the Projection) > 1 (green boxes), [1-0.8] (blue boxes) and [0.8-0.5] (yellow boxes) for the PLSDA performed on *D. polymorpha* populations, depending on the significant (or not) level-two interactions evidenced in the MANOVA.

	Non-interactive factors			
	Population x temperature	Population x concentration	Population x time	Population x algae
Tri	1.64	1.58	1.63	1.64
GST	1.41	1.38	1.28	1.46
Chol	1.36	1.32	1.33	1.36
GPx	1.27	1.17	1.16	1.16
LOOH	1.09	1.05	1.10	1.12
ProtB	0.85	0.85	0.85	0.85
ACP	0.78	0.94	1.07	0.79
ProtFC	0.73	0.73	0.73	0.72
ETS	0.56	0.63	0.60	0.54
LDH	0.52	0.65	0.58	0.54
TAC	0.49	0.59	0.50	0.52
Cat	0.18	0.25	0.24	0.15

Discussion

This study mainly evidenced the significant influence of species and population on biomarker responses within dreissenids. These differences already exist in the field, regarding both condition indices and biomarker responses. We observed that species living on site 2 (the less contaminated) were in a better health status, since condition indices were equivalent for ZM2 and QM2, and they were equivalent or higher compared to their conspecifics living on site 1 (which is highly contaminated with HAPs). QM3 population, living on a eutrophic metal-contaminated site, had the lowest condition index, although shell volume was high, indicating that this population was unhealthy. For site 1, ZM1 had a lower condition index, despite a bigger shell volume, compared to QM1, which means that on site 1, ZM were in a poorer health status compared to QM.

Concerning biomarker responses, they are clearly different in the field between the different populations, indicating that the population's origin significantly influences biomarker responses; this is a well known phenomenon that is admitted in evolutionary toxicology (Johnston, 2011).

We also found a significant effect of the acclimation period on biomarker responses, although the differences between populations were maintained after this acclimation, except for ZM2 and QM2 populations whose responses converged after acclimation and were not significantly different. Thus, biomarker responses were closest between ZM2 and QM2 than between ZM1 and QM1 after the acclimation period.

This closest relationship between ZM2 and QM2 was confirmed during the experiment. Indeed, we observed that responses for ZM2 and QM2 were closest than responses for ZM1 and QM1 (for site 2 the two species differ only in their response to exposure time, whereas on site 1 they differ both in response to exposure time and temperature rise). If we take into account the facts that (1) *D. polymorpha* populations colonized a long time ago and might be genetically adapted to their specific environments and (2) the site 1 is more contaminated, we can assume that ZM1 is more accustomed to severe stress and respond in a specific way compared to QM1, whereas ZM2 that lives on a cleaner site is not adapted to severe stress and its responses are more similar to those of QM2.

Some of the biomarkers were deeply involved in the differences observed between species, with higher levels of ETS and TAC in *D. polymorpha*, and higher Tri, Chol and ACP for *D. r. bugensis*. The better ability of *D. polymorpha* to activate cellular metabolism, and consequently antioxidative mechanisms, has already been shown in our previous works when this species is confronted with stressors (Potet et al., 2017, 2016).

In addition to these inter-species differences, this study also highlights inter-population differences in biomarker responses within species.

Concerning *D. polymorpha*, responses between populations vary depending on exposure time and dietary stress. The influence of these stressors on organisms were reflected by a modification in Tri, GST, ETS and ProtFC. The two populations react in the same way to increasing temperature, with an increase in LDH activity and a decrease in antioxidative capacities. Exposure time and the absence of food triggered different responses for these two populations: a decrease in energetic reserves coupled with an increase in ETS activity was observed for ZM1, whereas the opposite was found for ZM2. This might again reflect the better ability of ZM1 to maintain its metabolism and handle stressors.

Concerning *D. r. bugensis*, the three populations respond the same way to the different stressors (concentration, time, algae and temperature), and the biomarkers involved in these responses are the same for the four stressors (Tri, GST, Chol, GPx, LOOH).

This means that there is a stronger response convergence for *D. r. bugensis* populations, than for *D. polymorpha* ones. This might reflect the more recent invasion by *D. r. bugensis*, which is not yet under selection pressure and has not already adapted to changing environmental conditions (Imo et al., 2010; Therriault et al., 2005). Comparatively, *D. polymorpha* populations present high genetic differentiation (Müller et al., 2002; Rajagopal et al., 2009) and might have been subjected to genetic adaptation, whereas *D. r. bugensis* populations are only capable of physiological acclimation. Thus each *D. polymorpha* population responds in its own way to stressors, whereas the response patterns are similar between *D. r. bugensis* populations.

Along the experiment, we observed a particular behavior of the ACP activity, which was the only biomarker that decreased significantly from D0 to D8 in the different experimental conditions, and exclusively for QM populations. Such decrease in ACP activity has already been shown for bivalves exposed to copper (Suresh and Mohandas, 1990), where metal ions probably inhibit enzymatic activity; these authors also found that ACP synthesis can be affected by exposure duration and metal

concentration. Inhibition of ACP activity had also been shown for *Scrobicularia plana* exposed to mercury (Mazorra et al., 2002).

We also observed an impact of dietary stress on *D. polymorpha* populations, and an impact of temperature during inter-species comparisons that mainly affected LDH activity. Temperature and food availability play an important role in biochemical and physiological processes, especially during the reproductive season, and the influence of these factors on biomarker responses has been demonstrated for marine species (Leiniö and Lehtonen, 2005), and particularly on the antioxidant system (Viarengo et al., 1991). Energy balance plays a role in stress adaptation and tolerance (Sibly and Calow, 1989), and an increase in temperature can modify metabolism and the susceptibility of organisms to additional stressors (Sokolova and Lannig, 2008), especially when it comes to ectotherms.

To conclude, we have seen that defense mechanisms are more active for *D. polymorpha*, whereas *D. r. bugensis* present more energetic reserves and cellular damages. The differences in response to stressors observed between species and between populations could reflect the longer invasion history of *D. polymorpha*, which is potentially adapted and whose populations are probably genetically differentiated depending on their local environmental conditions *in situ* (Tarnowska et al., 2013).

Many data arose from this experiment, and statistical analyses are hard to perform on such datasets, with multiple factors acting on biomarker responses. We have nevertheless succeeded in identifying major trends. Results evidenced that populations and species, for several stressors, react in the same way, which seems advantageous for biomonitoring. However, they also showed that baseline levels are different between species and populations, meaning that it would be difficult to establish a “healthy environment” response interval, outside which the populations studied could be considered as stressed.

Thus, biomarkers would not be applicable in a point-in-time approach (evaluate the quality of a given site at a given time relative to so-called reference range), but could be usable in the context of a comparative approach involving several sites, to determine a quality gradient among sites. It is in this sense that they are used in the marine environment (Burgeot et al., 2017). Such results also point that it is necessary to correctly discriminate the two species, since their responses to contamination is different. This also means that it is necessary to know the populations to be used in active biomonitoring and the necessity to take into account the differences of adaptive scenarios between different populations of a given species in passive biomonitoring.

Acknowledgements

This work was supported by the French ONEMA (Organisme National de l'Eau et des Milieux Aquatiques) through BIOMICS program, the Agence Nationale de la Recherche through the IPOC program (ANR-12-ISR7-0004) and running costs by CPER Lorraine-ZAM (Contrat Projet Etat Région Lorraine, Zone Atelier Moselle). The authors also wish to thank Philippe Wagner, Philippe Rousselle and Dan Coacolo for their technical help.

References

- Ács, A., Vehovszky, Á., Györi, J., Farkas, A., 2016. Seasonal and size-related variation of subcellular biomarkers in quagga mussels (*Dreissena bugensis*) inhabiting sites affected by moderate contamination with complex mixtures of pollutants. *Environmental Monitoring and Assessment* 188. doi:10.1007/s10661-016-5432-y
- Adams, S.M., Giesy, J.P., Tremblay, L.A., Eason, C.T., 2001. The use of biomarkers in ecological risk assessment: recommendations from the christchurch conference on biomarkers in ecotoxicology. *Biomarkers* 6, 1–6. doi:10.1080/135475001452724
- Akopian, M., Garnier, J., Testard, P., Ficht, A., 2001. Estimating the benthic population of *Dreissena polymorpha* and its impact in the lower Seine River, France. *Estuaries* 24, 1003–1014.

- Arrêté du 2/02/98, 1998. Arrêté du 2/02/98 relatif aux prélèvements et à la consommation d'eau ainsi qu'aux émissions de toute nature des installations classées pour la protection de l'environnement soumises à autorisation, JO n° 52 du 3 mars 1998.
- Baldwin, B.S., Mayer, M.S., Dayton, J., Pau, N., Mendilla, J., Sullivan, M., Moore, A., Ma, A., Mills, E.L., 2002. Comparative growth and feeding in zebra and quagga mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): implications for North American lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59, 680–694. doi:10.1139/f02-043
- Beggel, S., Cerwenka, A., Brandner, J., Geist, J., 2015. Shell morphological versus genetic identification of quagga mussel (*Dreissena bugensis*) and zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Invasions* 10, 93–99. doi:10.3391/ai.2015.10.1.09
- Binelli, A., Della Torre, C., Magni, S., Parolini, M., 2015. Does zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) represent the freshwater counterpart of *Mytilus* in ecotoxicological studies? A critical review. *Environmental Pollution* 196, 386–403. doi:10.1016/j.envpol.2014.10.023
- Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Priadi, C., Ayrault, S., Tusseau-Vuillemin, M.-H., 2011. Bioavailability of particulate metal to zebra mussels: Biodynamic modelling shows that assimilation efficiencies are site-specific. *Environmental Pollution* 159, 3381–3389. doi:10.1016/j.envpol.2011.08.034
- Burgeot, T., Akcha, F., Ménard, D., Robinson, C., Loizeau, V., Brach-Papa, C., Martínez-Gómez, C., Le Goff, J., Budzinski, H., Le Menach, K., Cachot, J., Minier, C., Broeg, K., Hylland, K., 2017. Integrated monitoring of chemicals and their effects on four sentinel species, *Limanda limanda*, *Platichthys flesus*, *Nucella lapillus* and *Mytilus* sp., in Seine Bay: A key step towards applying biological effects to monitoring. *Marine Environmental Research* 124, 92–105. doi:10.1016/j.marenvres.2016.10.009
- CD 98/83/EC, 1998. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption.
- Claudi, R., Mackie, G.L., 1994. Practical manual for zebra mussel monitoring and control. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- Claxton, W.T., Mackie, G.L., 1998. Seasonal and depth variations in gametogenesis and spawning of *Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis* in eastern Lake Erie. *Canadian Journal of Zoology* 76, 2010–2019. doi:10.1139/z98-150
- 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. doi:10.1016/S0166-445X(99)00094-6
- De Ventura, L., Sarpe, D., Kopp, K., Jokela, J., 2016. Variability in phenotypic tolerance to low oxygen in invasive populations of quagga and zebra mussels. *Aquatic Invasions* 11, 267–276. doi:10.3391/ai.2016.11.3.05
- Depledge, M.H., Fossi, M.C., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Invertebrates. Ecotoxicology* 3, 161–172. doi:10.1007/BF00117081
- Ellis, S., MacIsaac, H.J., 2009. Salinity tolerance of Great Lakes invaders. *Freshwater Biology* 54, 77–89. doi:10.1111/j.1365-2427.2008.02098.x
- Faria, M., Carrasco, L., Diez, S., Riva, M.C., Bayona, J.M., Barata, C., 2009. Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149, 281–288. doi:10.1016/j.cbpc.2008.07.012
- Faria, M., Ochoa, V., Blázquez, M., Juan, M.F.S., Lazzara, R., Lacorte, S., Soares, A.M.V.M., Barata, C., 2014. Separating natural from anthropogenic causes of impairment in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) populations living across a pollution gradient. *Aquatic Toxicology* 152, 82–95. doi:10.1016/j.aquatox.2014.03.020
- Farkas, A., Ács, A., Vehovszky, Á., Falfusynska, H., Stoliar, O., Specziár, A., Györi, J., 2017. Interspecies comparison of selected pollution biomarkers in dreissenid spp. inhabiting pristine and moderately polluted sites. *Science of The Total Environment* 599–600, 760–770. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.05.033
- Garaud, M., Auffan, M., Devin, S., Felten, V., Pagnout, C., Pain-Devin, S., Proux, O., Rodius, F., Sohm, B., Giamberini, L., 2016. Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Nanotoxicology* 10, 935–944. doi:10.3109/17435390.2016.1146363
- Garton, D.W., McMahon, R., Stoeckmann, A.M., 2014. Limiting environmental factors and competitive interactions between zebra and quagga mussels in North America, in: Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), *Quagga and Zebra Mussels - Biology, Impacts, and Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 383–402.
- Guerlet, E., Vasseur, P., Giambérini, L., 2010. Spatial and temporal variations of biological responses to environmental pollution in the freshwater zebra mussel. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1170–1181. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.05.009

- Heiler, K., bij de Vaate, A., Ekschmitt, K., von Oheimb, P., Albrecht, C., Wilke, T., 2013. Reconstruction of the early invasion history of the quagga mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*) in Western Europe. *Aquatic Invasions* 8, 53–57. doi:10.3391/ai.2013.8.1.06
- Imo, M., Seitz, A., Johannesen, J., 2010. Distribution and invasion genetics of the quagga mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*) in German rivers. *Aquatic Ecology* 44, 731–740. doi:10.1007/s10452-009-9311-2
- Johnston, E.L., 2011. Tolerance to contaminants: evidence from chronically exposed populations of aquatic organisms, in: Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S., Roméo, M. (Eds.), *Tolerance to Environmental Contaminants*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 25–48.
- Jones, L.A., Ricciardi, A., 2005. Influence of physicochemical factors on the distribution and biomass of invasive mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*) in the St. Lawrence River. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62, 1953–1962. doi:10.1139/f05-096
- Karatayev, A., Claudi, R., Lucy, F., 2012. History of *Dreissena* research and the ICAIS gateway to aquatic invasions research. *Aquatic Invasions* 7, 1–5. doi:10.3391/ai.2012.7.1.001
- Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Padilla, D.K., 2015. Zebra versus quagga mussels: a review of their spread, population dynamics, and ecosystem impacts. *Hydrobiologia* 746, 97–112. doi:10.1007/s10750-014-1901-x
- Karatayev, A.Y., Mastitsky, S.E., Padilla, D.K., Burlakova, L.E., Hajduk, M.M., 2011. Differences in growth and survivorship of zebra and quagga mussels: size matters. *Hydrobiologia* 668, 183–194. doi:10.1007/s10750-010-0533-z
- Klerks, P.L., Weis, J.S., 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review. *Environmental Pollution* 45, 173–205.
- Lagadic, L., 2002. Biomarkers: useful tools for the monitoring of aquatic environments. *Revue de Medecine Veterinaire* 153, 581–588.
- Leiniö, S., Lehtonen, K.K., 2005. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 140, 408–421. doi:10.1016/j.cca.2005.04.005
- Marescaux, J., Boets, P., Lorquet, J., Sablon, R., Van Doninck, K., Beisel, J.-N., 2015. Sympatric *Dreissena* species in the Meuse River: towards a dominance shift from zebra to quagga mussels. *Aquatic Invasions* 10, 287–298. doi:10.3391/ai.2015.10.3.04
- Matthews, J., Schipper, A.M., Hendriks, A.J., Yen Le, T.T., bij de Vaate, A., van der Velde, G., Leuven, R.S.E.W., 2015. A dominance shift from the zebra mussel to the invasive quagga mussel may alter the trophic transfer of metals. *Environmental Pollution* 203, 183–190. doi:10.1016/j.envpol.2015.03.032
- Matthews, J., Van der Velde, G., Bij de Vaate, A., Collas, F.P.L., Koopman, K.R., Leuven, R.S.E.W., 2014. Rapid range expansion of the invasive quagga mussel in relation to zebra mussel presence in The Netherlands and Western Europe. *Biological Invasions* 16, 23–42. doi:10.1007/s10530-013-0498-8
- Mazorra, M.T., Rubio, J.A., Blasco, J., 2002. Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana*: kinetic characteristics and effects of heavy metals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 131, 241–249.
- Mills, E.L., Roseman, E.F., Rutzke, M., Gutenmann, W.H., Lisk, D.J., 1993. Contaminant and nutrient element levels in soft tissues of zebra and quagga mussels from waters of southern Lake Ontario. *Chemosphere* 27, 1465–1473.
- Millward, R., Klerks, P., 2002. Contaminant-adaptation and community tolerance in ecological risk assessment: introduction. *Human and Ecological Risk Assessment* 8, 921–932. doi:10.1080/1080-700291905747
- Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W., Paul Leonard, D., 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552, 247–268. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.06.028
- Müller, J.C., Hidde, D., Seitz, A., 2002. Canal construction destroys the barrier between major European invasion lineages of the zebra mussel. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 269, 1139–1142.
- Palais, F., Dedourge-Geffard, O., Beaudon, A., Pain-Devin, S., Trapp, J., Geffard, O., Noury, P., Gourlay-Francé, C., Uher, E., Mouneyrac, C., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, A., 2012. One-year monitoring of core biomarker and digestive enzyme responses in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Ecotoxicology* 21, 888–905. doi:10.1007/s10646-012-0851-1
- Pavlova, V., Izyumov, Y., 2014. Morphological variability of *Dreissena polymorpha* and *Dreissena rostriformis bugensis* (Mollusca: Bivalvia), in: Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), *Quagga and Zebra Mussels - Biology, Impacts, and Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 287–314.
- Potet, M., Devin, S., Pain-Devin, S., Rousselle, P., Giambérini, L., 2016. Integrated multi-biomarker responses in two dreissenid species following metal and thermal cross-stress. *Environmental Pollution* 218, 39–49. doi:10.1016/j.envpol.2016.08.025

- Potet, M., Giambérini, L., Pain-Devin, S., Louis, F., Bertrand, C., Devin, S., 2017. Differential tolerance to nickel between *Dreissena polymorpha* and *Dreissena rostriformis bugensis* populations. Under revision in Scientific Reports.
- Rajagopal, S., Pollux, B.J.A., Peters, J.L., Cremers, G., Moon-van der Staay, S.Y., van Alen, T., Eygensteyn, J., van Hoek, A., Palau, A., bij de Vaate, A., van der Velde, G., 2009. Origin of Spanish invasion by the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting. *Biological Invasions* 11, 2147–2159. doi:10.1007/s10530-009-9495-3
- Ram, J.L., Karim, A.S., Banno, F., Kashian, D.R., 2012. Invading the invaders: reproductive and other mechanisms mediating the displacement of zebra mussels by quagga mussels. *Invertebrate Reproduction & Development* 56, 21–32. doi:10.1080/07924259.2011.588015
- Schäfer, S., Hamer, B., Treursić, B., Möhlenkamp, C., Spira, D., Korlević, M., Reifferscheid, G., Claus, E., 2012. Comparison of bioaccumulation and biomarker responses in *Dreissena polymorpha* and *D. bugensis* after exposure to resuspended sediments. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 62, 614–627. doi:10.1007/s00244-011-9735-2
- Sibly, R.M., Calow, P., 1989. A life-cycle theory of responses to stress. *Biological Journal of the Linnean Society* 37, 101–116.
- Sokolova, I., Lannig, G., 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate Research* 37, 181–201. doi:10.3354/cr00764
- Suresh, K., Mohandas, A., 1990. Hemolymph acid phosphatase activity pattern in copper-stressed bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology* 55, 118–125.
- Tarnowska, K., Daguin-Thiebaut, C., Pain-Devin, S., Viard, F., 2013. Nuclear and mitochondrial genetic variability of an old invader, *Dreissena polymorpha* (Bivalvia), in French river basins. *Biological Invasions* 15, 2547–2561. doi:10.1007/s10530-013-0472-5
- Teubner, D., Wesslein, A.-K., Rønne, P.B., Veith, M., Frings, C., Paulus, M., 2016. Is a visuo-haptic differentiation of zebra mussel and quagga mussel based on a single external morphometric shell character possible? *Aquatic Invasions* 11, 145–154. doi:10.3391/ai.2016.11.2.04
- Therriault, T.W., Orlova, M.I., Docker, M.F., MacIsaac, H.J., Heath, D.D., 2005. Invasion genetics of a freshwater mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*) in eastern Europe: high gene flow and multiple introductions. *Heredity* 95, 16–23. doi:10.1038/sj.hdy.6800691
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57–149.
- van der Velde, G., Rajagopal, S., bij de Vaate, A., 2010. From zebra mussels to quagga mussels: an introduction to the Dreissenidae, in: van der Velde, G., Rajagopal, S., bij de Vaate, A. (Eds.), *The Zebra Mussel in Europe*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp. 1–10.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D.R., 1991. Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 100, 187–190.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 146, 281–300. doi:10.1016/j.cbpc.2007.04.011
- Vilà, M., Basnou, C., Pyšek, P., Josefsson, M., Genovesi, P., Gollasch, S., Nentwig, W., Olenin, S., Roques, A., Roy, D., Hulme, P.E., 2010. How well do we understand the impacts of alien species on ecosystem services? A pan-European, cross-taxa assessment. *Frontiers in Ecology and the Environment* 8, 135–144. doi:10.1890/080083

Partie III : Tolérance à un stress aigu (publication n°4)²⁸

Ici, nous avons souhaité évaluer la tolérance des différentes populations à un stress aigu. Comme nous l'avons déjà évoqué, la tolérance différentielle peut être responsable de l'hétérogénéité des réponses des biomarqueurs entre plusieurs populations d'organismes sentinelles. Bien que *D. polymorpha* soit très utilisée en biosurveillance, les capacités de tolérance entre plusieurs populations n'ont été que très peu étudiées, tout comme celles de la nouvelle invasive *D. r. bugensis*. Quand elles le sont, c'est généralement au regard des paramètres environnementaux (température, salinité), pour prédire leur invasion, mais rarement au sens où nous l'entendons ici, à savoir l'adaptation aux contaminants et les processus conférant cette tolérance utilisables en tant qu'outils de biosurveillance.

Pour évaluer ces différences de tolérance, nous avons exposé la plupart des populations à une concentration élevée en nickel (2.5 mg.L^{-1}) et réalisé un suivi de la mortalité. Un TL_{50} (temps léthal au bout duquel 50% des organismes de la population meurent) a ainsi pu être établi pour chaque population. Plus ce TL_{50} est élevé, plus la population est considérée comme tolérante. Les réponses des biomarqueurs et les concentrations en nickel dans les tissus mous ont aussi été mesurées, pour tenter de relier la tolérance au statut physiologique des organismes, et évaluer leur aptitude à prendre en charge cette contamination métallique.

Les résultats montrent que les populations de *D. polymorpha* sont beaucoup plus tolérantes que celles de *D. r. bugensis*, avec des TL_{50} plus élevés. En plus de cette forte différence inter-spécifique, les TL_{50} sont beaucoup plus hétérogènes entre les populations de *D. polymorpha*, alors qu'ils sont similaires entre les populations de *D. r. bugensis*. Cette hétérogénéité entre populations de *D. polymorpha* est certainement liée à l'historique d'exposition et à l'adaptation de chaque population à son environnement local ; nous avons en effet mis en évidence un lien entre la contamination en métaux (le nickel en particulier) *in situ* et la tolérance (représentée par le TL_{50}) pour cette espèce. Les populations de *D. polymorpha* sont en effet établies depuis plus longtemps, et présentent une forte différenciation génétique par rapport à *D. r. bugensis*, chez qui les processus adaptatifs ne sont pas encore visibles.

Les deux espèces accumulent le nickel de façon équivalente, mais les populations de *D. polymorpha* semblent plus aptes à le gérer puisqu'elles survivent plus longtemps. Les réponses des biomarqueurs ont été fortement perturbées par la forte concentration en Ni appliquée ici, nécessaire pour obtenir ces TL_{50} . Toutefois, les populations de *D. polymorpha* présentaient là encore des mécanismes de défenses plus actifs et ont réussi à maintenir leurs processus apoptotiques, contrairement aux populations de *D. r. bugensis* qui étaient totalement dépassées.

²⁸ Les données supplémentaires relatives à cette publication sont disponibles en Annexe 4

DIFFERENTIAL TOLERANCE TO NICKEL BETWEEN *DREISSENA POLYMORPHA* AND *DREISSENA ROSTRIFORMIS BUGENSIS* POPULATIONS

Marine Potet, Laure Giambérini, Sandrine Pain-Devin, Fanny Louis, Carole Bertrand, Simon Devin

Abstract

Differential tolerance to stress is partly responsible for the heterogeneity of biomarker responses between populations of a sentinel species. Although currently used for freshwater biomonitoring, studies concerning inter-population variability in tolerance to contaminants for the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) are scarce. Moreover, this well-known invader is currently replaced by another, the quagga mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*). To evaluate the differential tolerance between dreissenids, several populations of both species were exposed to a high concentration of nickel. A LT_{50} (time when 50% of individuals were dead) was established for each population. Biomarker responses and internal nickel concentration were also measured, to link tolerance with physiological status. Results evidenced that *D. polymorpha* populations are more heterogeneous and more tolerant than *D. r. bugensis* ones. For *D. polymorpha* populations only, LT_{50} values were positively correlated with the nickel contamination *in situ*, with higher anti-oxidative defences and a higher Integrated Biomarker Response value in the field. Such findings may be explained by local adaptation and invasion dynamic within each species. The significance of this differential tolerance when using biomarker responses for biomonitoring purposes is thus discussed.

Introduction

Aquatic ecosystems are the ultimate receptacle for many pollutants, and undergo many disturbances. To face this environmental problem, the European Water Framework Directive (WFD) was designed to evaluate, protect and restore aquatic systems¹. Primarily, it mainly focused on chemical monitoring, along with the establishment of environmental quality standards, but the implementation of biological and ecological approaches quickly became essential in order to obtain a representative and integrative picture of the quality of a water body.

Among recommended biological tools², biomarkers are defined as biochemical, physiological or behavioural parameters that can evidence exposure to and/or toxic effects caused by stressors^{3,4}. They are currently used in biomonitoring to evidence the presence and effects of contaminants, and to understand their mode of toxic action at the individual and sub-individual scales⁵⁻⁷. The implementation of multi-biomarker approaches enables the understanding of different toxicity mechanisms triggered by multiple stressors existing in the field that may with time lead to an overall adverse effect⁸⁻¹⁰.

Despite their usefulness, the deployment of biomarkers is still controversial¹¹⁻¹³. Unlike the marine environment where some structuring is taking place^{14,15}, there is no particularly reasoned strategy for the choice of biomarkers in freshwater biomonitoring, although several studies tend to promote their integration as monitoring tools¹⁶⁻¹⁸.

In this study, we investigated the role that differential tolerance to stress might have on biomarker responses. Indeed, tolerance emergence in several populations of a same species is not homogeneous, since each population will develop a tolerance for the parameters it faces in its environment. Hence, each population sets up mechanisms to deal with environmental stressors, and express different biological responses, which need to be evaluated if they are to be used in biomonitoring. This inter-population variability in tolerance is in part responsible for the heterogeneity of biomarker responses among populations. Basal levels of biomarkers in the field are often different from one population to another, since each population is influenced by local environmental conditions

and genetic characteristics^{19,20}. Thus, to make a proper use of biomarkers, we need to know thoroughly the populations of sentinel organisms in order to be able to correctly interpret their responses to environmental changes.

The zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) is a widespread invasive bivalve species, commonly found in freshwaters of the northern hemisphere²¹, and identified by the IUCN as one of the 100 of the World's Worst Invasive Alien Species²². In these ecosystems, particularly exposed to contaminants and susceptible to biological invasions^{23,24}, *D. polymorpha* has an important ecological role and populations can reach high densities^{25,26}. It is a sedentary filter-feeder, able to tolerate a wide range of environmental contaminants. It is thus currently used in biomonitoring programs, to evaluate both the presence of contaminants through bioaccumulation measurements^{27,28}, and their effects through the use of biomarkers, either in the field or in laboratory^{29–31}. This species has recently been considered as the freshwater counterpart to *Mytilus edulis*³². To understand and correctly interpret biomarker responses measured in zebra mussels for biomonitoring, inter-population variability in tolerance should be evaluated, but attention must also be paid to inter-specific variability. Indeed, in recent years, populations of *D. polymorpha* have progressively been replaced by a sister species, the quagga mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*)^{33–35}. It is thus important to wonder to what extent the new invasive can either be used in future biomonitoring programs.

The two species have been largely studied and exhibit different anatomical and physiological features (e.g. morphology³⁶, feeding and growth^{37,38}, reproduction³⁹, environmental requirements^{40–42}, bioaccumulation capacities⁴³), but their tolerance to contaminants as well as their biological responses, have little been compared. Comparisons are often conducted between several populations of one species^{9,44,45} (inter-population variability) or between the two species⁴⁶ (inter-specific variability), but rarely on several populations of both species on a large geographical scale. To our knowledge, there is only one study dealing with both inter-population and inter-specific differences in relation to pollution¹⁰. The others are generally relative to hypoxia⁴⁷ or salinity⁴⁸ effects and even heritability of heat tolerance⁴⁹. However, these works are mainly focused on predicting the invasiveness of dreissenid species in contrasting habitats, not on their potential use as biomonitors.

Our previous work⁷ has shown that *D. polymorpha* is more able to respond to contamination than his fellow, with a gradual biomarker response to low-dose Ni contamination. In the present study, we wanted to evaluate tolerance capacities in several populations of these species, along with their biomarker responses when facing an acute metal stress. We assumed that *D. polymorpha* populations, due to their better ability to cope with metal stress and to activate defence mechanisms, might be more tolerant than *D. r. bugensis* ones. In order to investigate this hypothesis, we sampled 13 populations of dreissenids (7 populations of *D. polymorpha* and 6 populations of *D. r. bugensis*) on 12 sites located in northeastern France (Figure 1; for Montigny, the two species were simultaneously present). Organisms were brought to the laboratory and exposed to an acute concentration of nickel (Ni, 2.5 mg.L⁻¹), in order to evaluate the LT₅₀ (lethal time for 50 % of the individuals) for each population. This measurement represents the time when half of the individuals died, which gives an indication of the tolerance to Ni in each population. Nickel has been selected in our study since it is one of the four priority metals defined by the WFD⁵⁰, but ecotoxicological and environmentally relevant data for freshwater organisms are lacking. In order to explain the differential tolerance in tested populations, we first put LT₅₀ in relationship with the sediment contamination on each site, to verify if the chronic exposure of populations was responsible for the observed differences in tolerance to Ni. Secondly, we measured Ni accumulation in organisms and a set of cellular biomarkers. Since nickel is known as a pro-oxidant agent in bivalves^{51,52}, biomarkers of effects were preferentially selected, to evidence modifications in antioxidative mechanisms, energy metabolism and cellular damages.

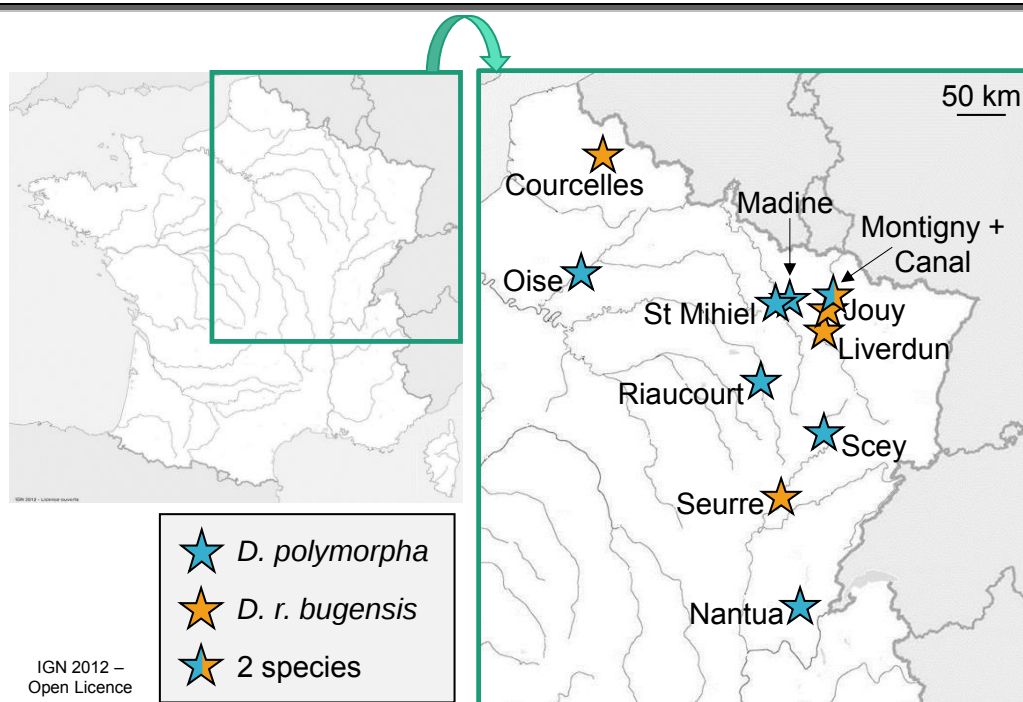


Figure 1: Sampling sites (modified from http://education.ign.fr/sites/all/files/carte_route_fluviale_5400k_13-2.jpg).

Results

1. Differential Ni sensitivities in studied populations

For a given population, LT_{50} values were calculated for each of the three replicates, computing mortality as a function of time. This means that we got three LT_{50} values per population (1 value for 5 individuals in one beaker). We observed differential tolerances to Ni in our populations (Figure 2). No mortality was observed for control organisms, meaning that Ni-exposed mussels died because of the metal exposure, and not because of starvation or any other laboratory condition. Thus, only LT_{50} for Ni-exposed organisms are represented. Two-way ANOVA showed strong populational ($p = 3.96 \cdot 10^{-5}$, $F = 6.59$, $df = 11$, $df_{res} = 26$, $n = 3$) and species-specific ($p = 1.94 \cdot 10^{-10}$, $F = 100.86$, $df = 1$, $df_{res} = 26$, $n = 3$) effects. In a general way, *D. polymorpha* are more tolerant to Ni than *D. r. bugensis* populations. Interspecific differences are very strong, with a mean LT_{50} for *D. polymorpha* ($193.6 \text{ h} \pm 85.2$) higher than for *D. r. bugensis* ($67.8 \text{ h} \pm 16.7$), and the highest value for *D. r. bugensis* never exceeded the lowest value obtained for *D. polymorpha*. Responses are more heterogeneous for *D. polymorpha*, with strong inter-population differences, than for *D. r. bugensis* (no differences between populations). We should also note that on the site where both species are present (Montigny), *D. polymorpha* is more tolerant than its fellow is.

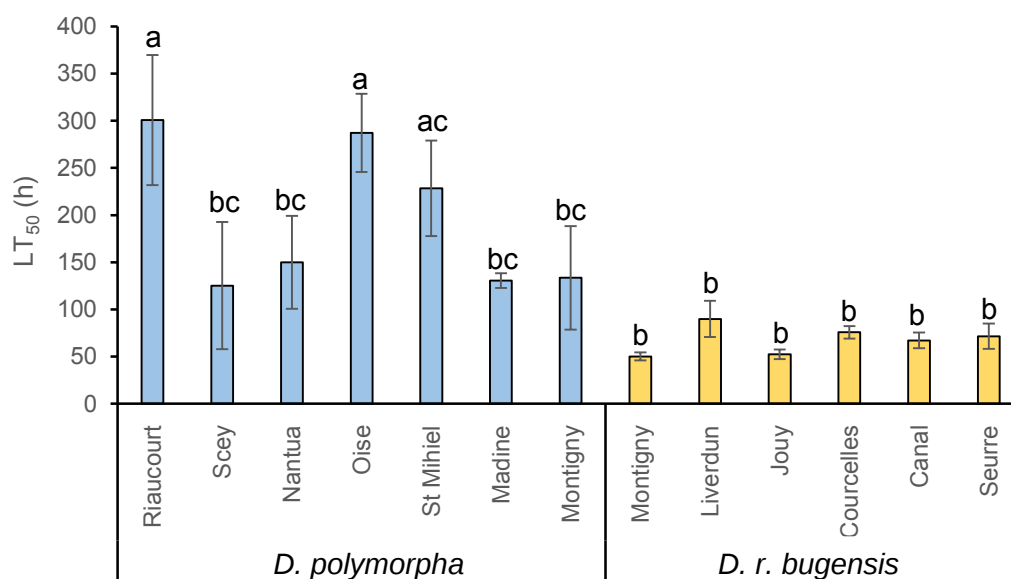


Figure 2: LT₅₀ for each population exposed to nickel (2.5 mg.L⁻¹), expressed as mean ± SD (n = 3). Differences between populations were evidenced through a Post Hoc Tukey test.

2. Differences in sensitivity and local adaptation phenomena

Assuming that Ni contamination on a given site can increase the tolerance of the population living therein, a simple regression between mean LT₅₀ for each population and Ni contamination in originating site was set up. No correlation was observed ($p = 0.19$, $n = 13$), which means that *in situ* Ni concentration has no effect on the LT₅₀ observed in laboratory. However, when we looked at the two species separately, there was a correlation for *D. polymorpha* ($p = 0.034$, $R^2 = 0.52$, $n = 7$), suggesting that for this species, Ni tolerance depends on chronic exposure to Ni, while it was not observed for its conspecific ($p = 0.37$, $R^2 = 0.03$, $n = 6$).

Since the whole environment can influence tolerance, we have extended correlation analysis to all the measured contaminants. To evaluate a possible influence of site contamination on tolerance, we correlate global contamination of sampling stations and survival of the populations using linear regression. The concentrations of contaminants measured *in situ* are given in Supplementary Table I. A contamination index is also reported for each site; it was calculated using a rank classification, considering all the contaminants (rank total), organic pollutants only (rank organics) or metals only (rank metals). Sites are classified from the least (1) to the most contaminated ones (12). We then tried to correlate mean LT₅₀ with these calculated ranks, symbolizing global contamination on each site (Figure 3). Considering the global contamination or only the organic or metallic ones, no significant correlation was observed. However, we identified a trend toward higher LT₅₀ values along with the concentration of metals in the sediment for *D. polymorpha*, which is a little bit higher than the significance level ($p = 0.052$, $R^2 = 0.44$, $n = 7$). The latter result supports the hypothesis that the chronic exposure of *D. polymorpha* to metals may influence its tolerance to acute Ni exposure.

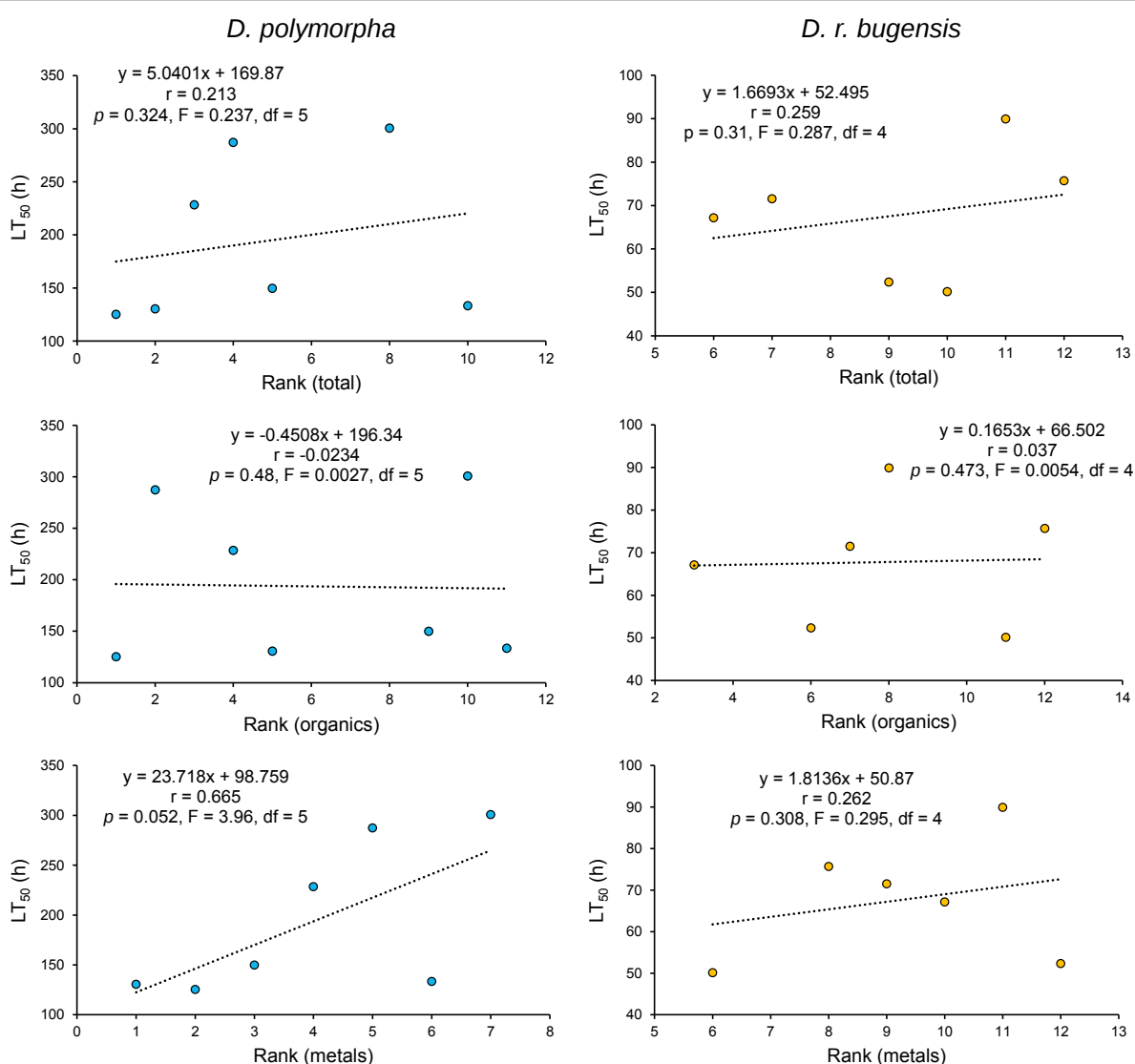


Figure 3: Simple linear regressions between LT_{50} and global contamination (rank) on sampling sites, for the two species separately (*D. polymorpha* on the left, $n = 7$; *D. r. bugensis* on the right, $n = 6$) and for the three rank types (total, organics and metals). For each regression, equation, correlation coefficient (r), p -value (p), F -statistic (F) and degree of freedom (df) of the model are mentioned.

3. Physiological mechanisms and differential sensitivities

Condition indices are given in Figure 4a. Results indicate that, despite some differences, all the populations were of the same health status before starting the experiment. We found no correlation between the mean condition index in the field and the mean LT_{50} ($p = 0.47$, $R^2 = 0$, $n = 13$). However, when looking at species separately again (Figure 4b), there was a correlation for *D. polymorpha* populations ($p = 0.03$, $R^2 = 0.64$, $n = 7$) but not for *D. r. bugensis* ones ($p = 0.43$, $R^2 = 0.16$, $n = 6$). Surprisingly, the correlation between condition index and LT_{50} is negative, meaning that the lower the condition index is in the field, the better the population tolerates Ni.

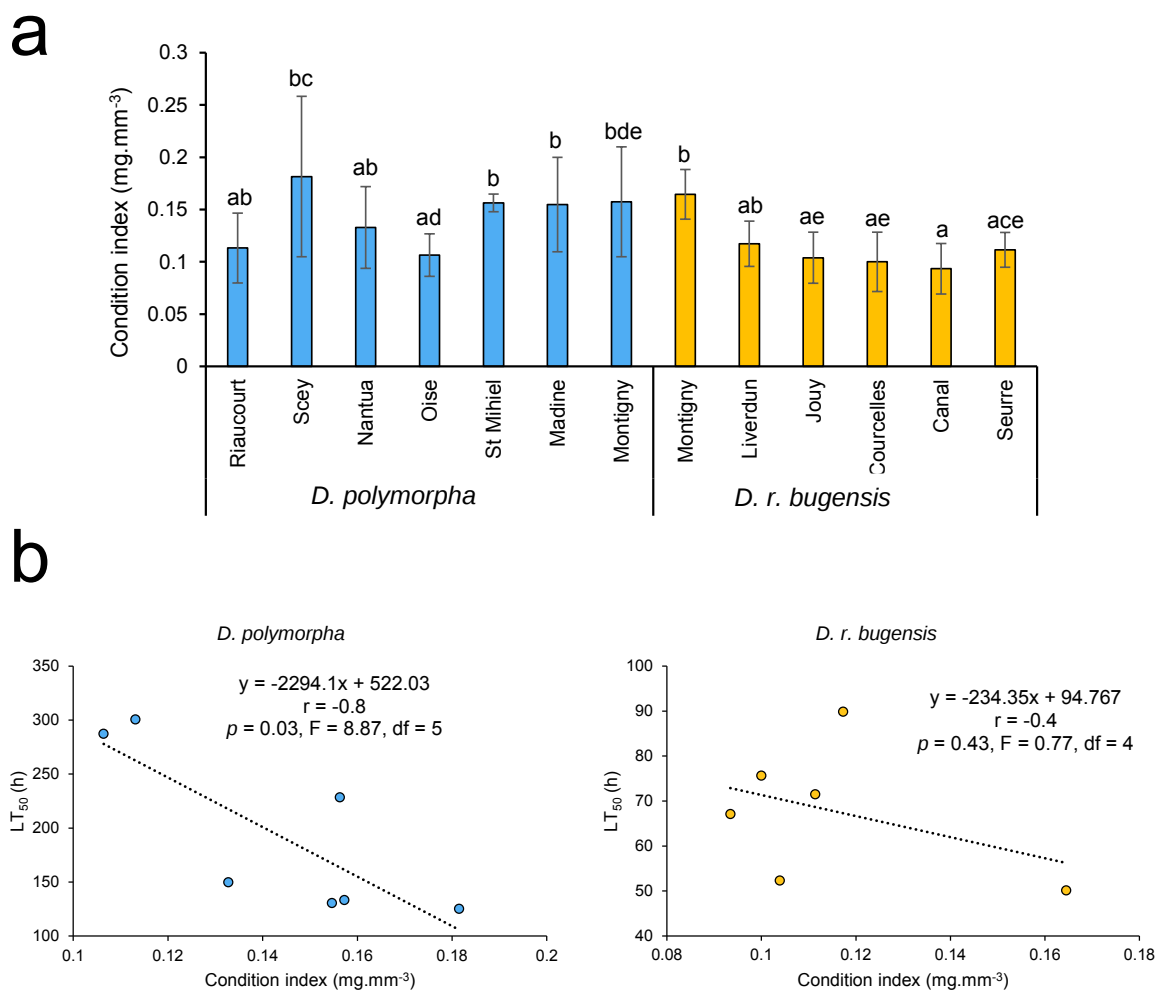


Figure 4: (a) Condition index for the different field populations of *D. polymorpha* and *D. r. bugensis* (mean $\pm$ SD, $n = 12$). Differences were tested using a Kruskal-Wallis test. (b) Simple linear regressions between LT_{50} and condition index for the two species separately (*D. polymorpha* on the left, $n = 7$; *D. r. bugensis* on the right, $n = 6$). For each regression, equation, correlation coefficient (r), p -value (p), F -statistic (F) and degree of freedom (df) of the model are mentioned.

Nickel bioaccumulation was measured throughout the experiment (see the experimental design on Figure 10). Internal concentrations in Ni after exposure for each population are reported in Figure 5. The highest mean Ni concentration in controls was $6.4 \mu\text{g.gDW}^{-1}$ for the Riaucourt population, thus values for controls are not represented here. ANOVA showed that Ni concentrations in soft tissues are different among populations ($p = 0.004$, $F = 2.98$, $df = 11$, $df_{\text{res}} = 52$, $n = 5$) and between species ($p = 0.039$, $F = 4.49$, $df = 1$, $df_{\text{res}} = 52$, $n = 35$ for *D. polymorpha* and 30 for *D. r. bugensis*). Within species, the only inter-population difference evidenced by the post-hoc Tukey test was between the Scey and Oise *D. polymorpha* populations.

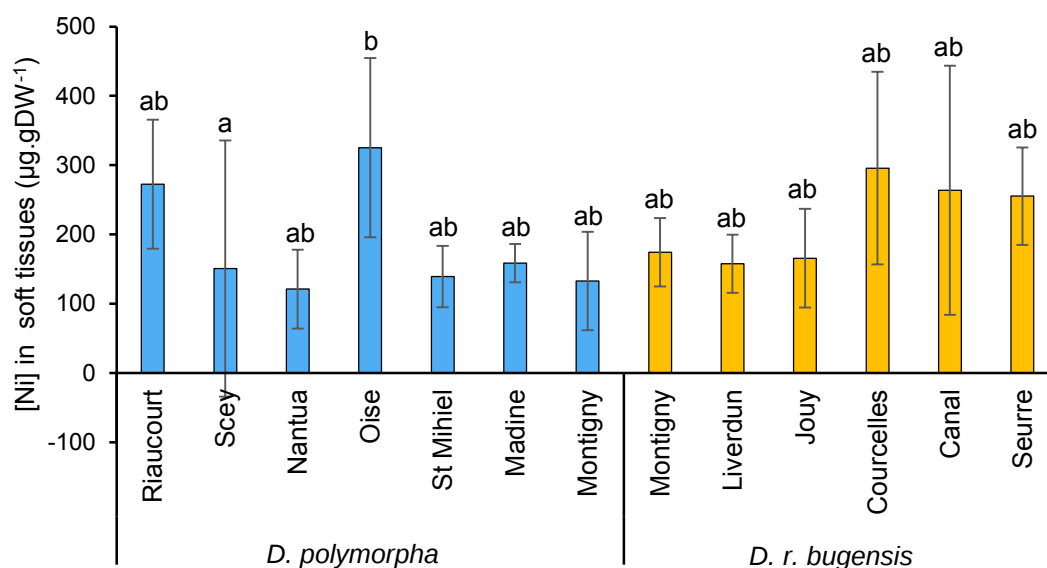


Figure 5: Nickel concentrations in soft tissues after LT_{50} experiment (mean $\pm$ SD, $n = 5$).

Since we get the exact time of death for each individual, we tried to correlate it with Ni accumulation. A simple linear regression evidenced that Ni internal concentration and time of death were correlated ($p = 2.87 \cdot 10^{-4}$, $R^2 = 0.19$, $n = 65$) meaning that bioaccumulation of Ni increases with exposure time (the later they die, the more they accumulate). If we considered species separately, this positive correlation is true for both species, *D. polymorpha* ($p = 4.32 \cdot 10^{-7}$, $R^2 = 0.54$, $n = 35$) and *D. r. bugensis* ($p = 5.13 \cdot 10^{-4}$, $R^2 = 0.36$, $n = 30$).

We also observed a positive correlation between Ni accumulation and LT_{50} for *D. polymorpha* populations ($p = 1.87 \cdot 10^{-2}$, $R^2 = 0.7$, $n = 7$) but not for *D. r. bugensis* ones ($p = 0.68$, $R^2 = 0.05$, $n = 6$).

4. Biomarkers reflect Ni tolerance

First, we looked only at controls, to examine the response pattern in non-exposed mussels (Figure 6). There is an evolution of biomarker responses from the field to 80 day-exposure conditions in the laboratory when all populations are combined. The response pattern for controls is almost the same for the two species. There is a rational decrease of energetic reserves (Prots, Tri, Chol) with time since the mussels were not fed. Antioxidant defences (Cat, TAC) cannot be maintained, explaining an increased lipid peroxidation (LOOH) at the intermediate time (D22 and D36). The only enzymatic mechanisms still activated in controls after 80 days are GST and ETS.

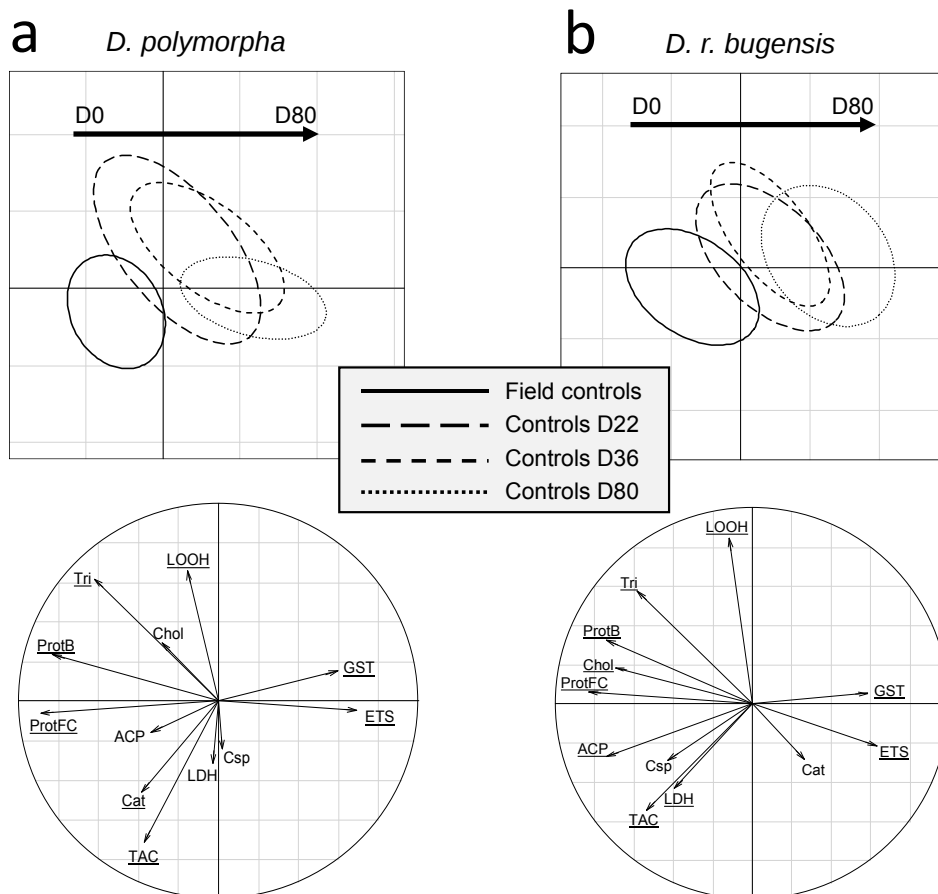


Figure 6: PLS-DA representing biomarker responses in the different controls along the experimentation. Responses of the two species are separated with *D. polymorpha* on the left (6a) and *D. r. bugensis* on the right (6b). For a given species, responses of all populations are confounded. Underlined biomarkers in the correlation circles correspond to the VIP (variable importance in the projection) that were higher than 0.8.

Then, we correlated biomarkers in field controls with LT_{50} , to see if the physiological status observed in the field might reflect tolerance. We selected the biomarkers explaining the major part of the LT_{50} variance using a PLS (Tanagra). We kept Chol, ETS, ACP, GST, TAC, Cat and Csp, which explained 78.3 % of the variance on the two first axis. Then, we performed a multiple linear regression to correlate these biomarkers with LT_{50} values. The model evidenced a correlation between biomarker responses in the field and LT_{50} ($p = 1.39 \cdot 10^{-2}$, $R^2 = 0.93$, $n = 13$). Populations with high Cat, ETS and TAC responses seem to better tolerate an acute exposure to Ni. However, this finding might be species-specific, since the higher responses for these biomarkers were in *D. polymorpha* populations.

To see how exposure has affected biomarker responses, we compared them between Ni-exposed and experimental control (D22) mussels. On the whole dataset, a MANOVA evidenced a significant effect of species ($p < 2.2 \cdot 10^{-16}$, $df = 1$, $df_{res} = 158$, $F = 27.56$), exposure ($p = 1.63 \cdot 10^{-6}$, $df = 1$, $df_{res} = 158$, $F = 4.73$) and population ($p = 9.42 \cdot 10^{-16}$, $df = 11$, $df_{res} = 158$, $F = 2.43$) on biomarker responses, but there was no interactive effect between these factors. Then, responses of the two species were examined separately under PLS-DA (Figure 7).

For *D. polymorpha* (Figure 7a), there was a significant effect of exposure ($p = 0.026$, $df = 1$, $df_{res} = 86$, $F = 2.11$) and population ($p = 2.28 \cdot 10^{-7}$, $df = 6$, $df_{res} = 86$, $F = 2.25$) on biomarker responses, but no interactive effect of these factors. For *D. r. bugensis* (Figure 7b), these two factors also act significantly (exposure: $p = 2.52 \cdot 10^{-5}$, $df = 1$, $df_{res} = 72$, $F = 4.669$; population: $p = 1.43 \cdot 10^{-8}$, $df = 5$,

$df_{res} = 72$, $F = 2.68$) and interact ($p = 3.42 \cdot 10^{-2}$, $df = 5$, $df_{res} = 72$, $F = 1.41$). We observed a diminution of energetic reserves (Prot, Tri, Chol) between controls and Ni-exposed mussels. ETS and LOOH were higher in controls than in Ni-exposed mussels for both species. TAC and LDH activity were maintained in Ni-exposed mussels of both species. GST activity was reduced for *D. polymorpha*, but maintained for *D. r. bugensis* during exposure. ACP was induced in Ni-exposed mussels. Cat activity was reduced in Ni-exposed mussels. The main difference concerned Csp activity, which was highly activated in *D. polymorpha*, but not at all in *D. r. bugensis* populations.

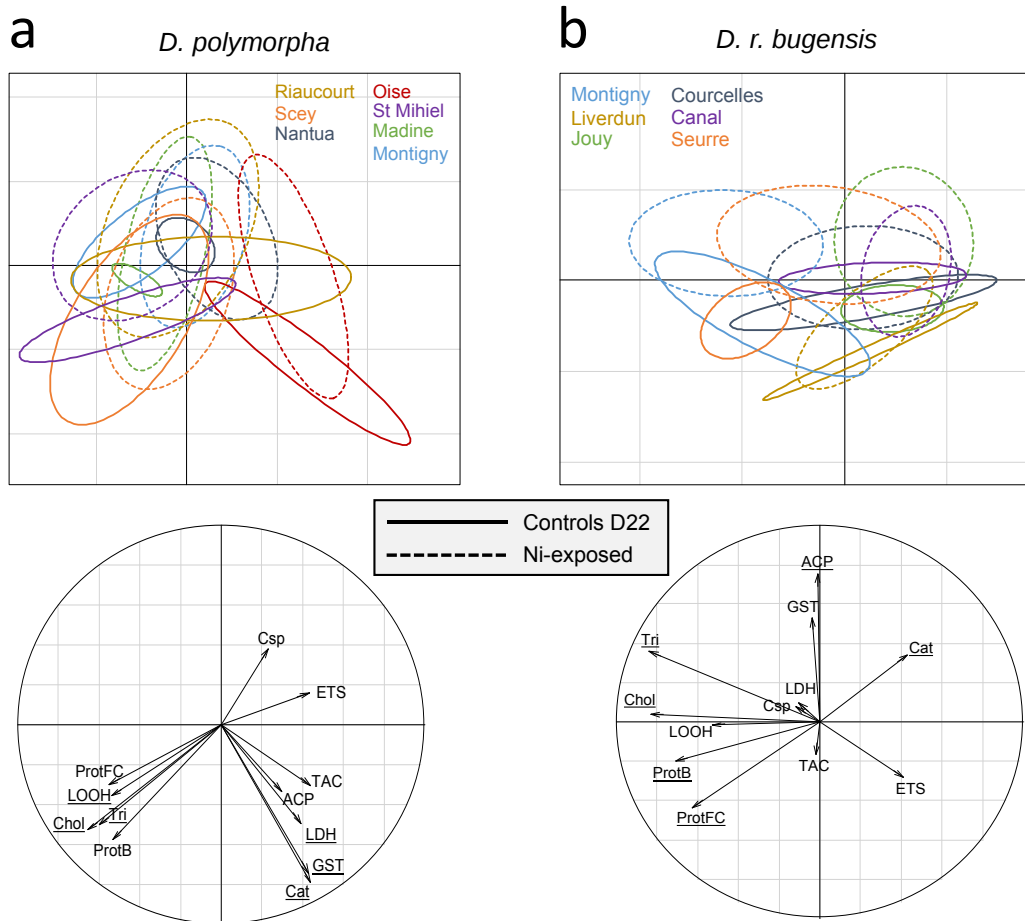


Figure 7: PLS-DA representing biomarker responses in the experimental controls (straight lines, $n = 4$) and Ni-exposed (dotted lines, $n = 10$) populations. Responses of the two species are separated with *D. polymorpha* on the left (7a) and *D. r. bugensis* on the right (7b). Underlined biomarkers in the correlation circles correspond to the VIP (variable importance in the projection) that were higher than 0.8.

Several findings appeared when we compared biomarker responses in field controls and Ni-exposed mussels, to evaluate the effect of acute exposure on organisms (Figure 8). On the whole dataset, a MANOVA evidenced a significant effect of both species ($p < 2.2 \cdot 10^{-16}$, $df = 1$, $df_{res} = 260$, $F = 62.37$), exposure ($p < 2.2 \cdot 10^{-16}$, $df = 1$, $df_{res} = 260$, $F = 53.1$) and population ($p < 2.2 \cdot 10^{-16}$, $df = 11$, $df_{res} = 260$, $F = 3.18$) on biomarker responses. First, we can see the impact of acute Ni-exposure on organisms with a clear separation of field controls (on the bottom left) and Ni-exposed (on the top right), associated with modifications in biomarker responses for both species.

Second, we can see that *D. polymorpha* populations are more heterogeneous than *D. r. bugensis*, both in the field and after Ni-exposure, since their ellipses are more spread out. In both species, there is no convergence of the responses after exposure, each population maintaining its own range of response.

Concerning *D. polymorpha* (Figure 8a), there was a significant effect of exposure ($p < 2.2 \cdot 10^{-16}$, $df = 1$, $df_{res} = 140$, $F = 49$), population ($p = 7.54 \cdot 10^{-15}$, $df = 6$, $df_{res} = 140$, $F = 3.11$) and an interactive effect ($p = 5.47 \cdot 10^{-3}$, $df = 6$, $df_{res} = 140$, $F = 0.71$) on biomarker responses. Populations living in the most contaminated sites (Riaucourt, Oise, Montigny and Nantua) are at the bottom of the plot. They differ from the other populations by a higher antioxidative capacity (Cat, TAC) in the field, which disappears along the exposure for the benefit of other mechanisms (increased GST, ETS and Csp activities).

Concerning *D. r. bugensis* (Figure 8b), there was also a significant effect of exposure ($p < 2.2 \cdot 10^{-16}$, $df = 1$, $df_{res} = 120$, $F = 18.7$), population ($p = 3.38 \cdot 10^{-14}$, $df = 5$, $df_{res} = 120$, $F = 3.38$) and their interaction ($p = 3.81 \cdot 10^{-3}$, $df = 5$, $df_{res} = 120$, $F = 1.6$) on biomarker responses. The response of all populations are close, except for the Montigny one, even after exposure to Ni. This site is not the most polluted, but the population seems to suffer from oxidative stress, with high levels of LOOH and lowered defences. This distress was maintained during the exposure.

Even if GST and ETS seem to be higher in Ni-exposed organisms of both species, the Csp activity is only maintained for *D. polymorpha*. Maybe this species is still able to perform apoptosis to destroy damaged cells, whereas *D. r. bugensis* has surrendered and their mechanisms were completely overwhelmed.

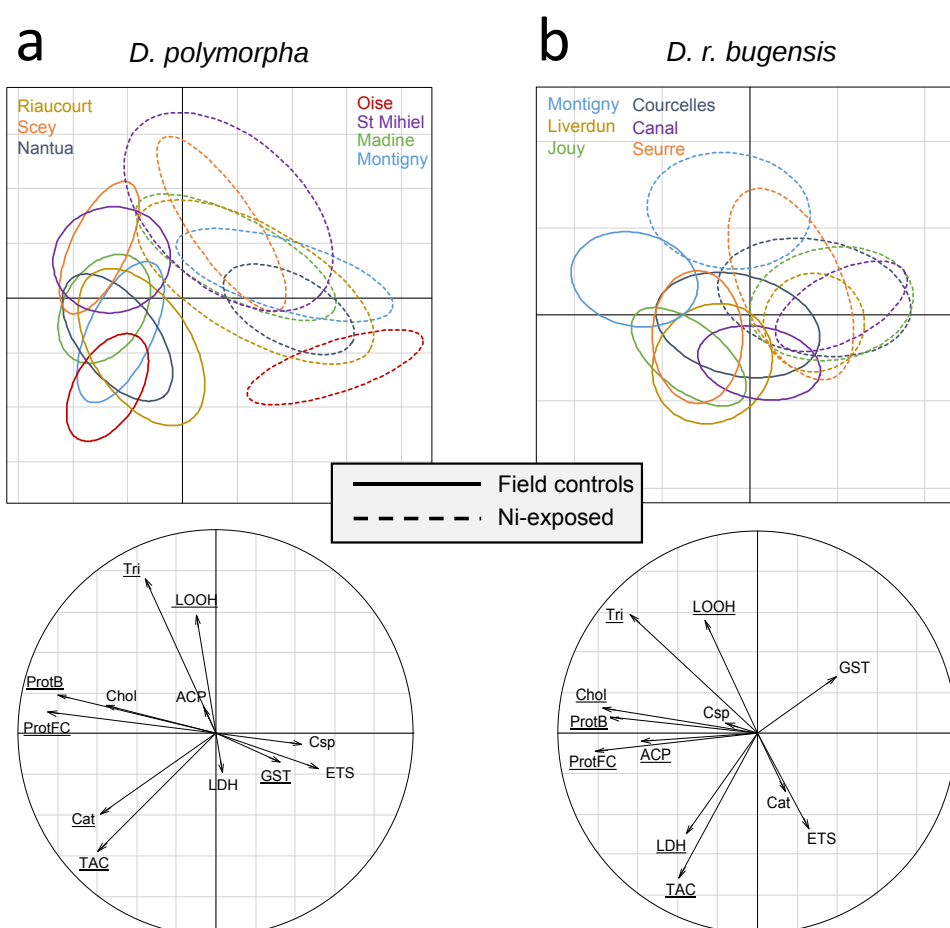


Figure 8: PLS-DA representing biomarker responses in the field controls (straight lines) and Ni-exposed (dotted lines) populations. Responses of the two species are separated with *D. polymorpha* on the left (8a) and *D. r.*

bugensis on the right (8b). Underlined biomarkers in the correlation circles correspond to the VIP (variable importance in the projection) that were higher than 0.8.

Integrated biomarker response (IBR) was calculated for the different experimental groups (Figure 9), to illustrate the general response of each population in a given condition (field controls, controls D22 and D36, Ni-exposed, controls D80). There is a general increase in IBR values from the field to the end of the experiment, for both species. IBR values are generally higher for *D. polymorpha* populations, either in the field or in laboratory.

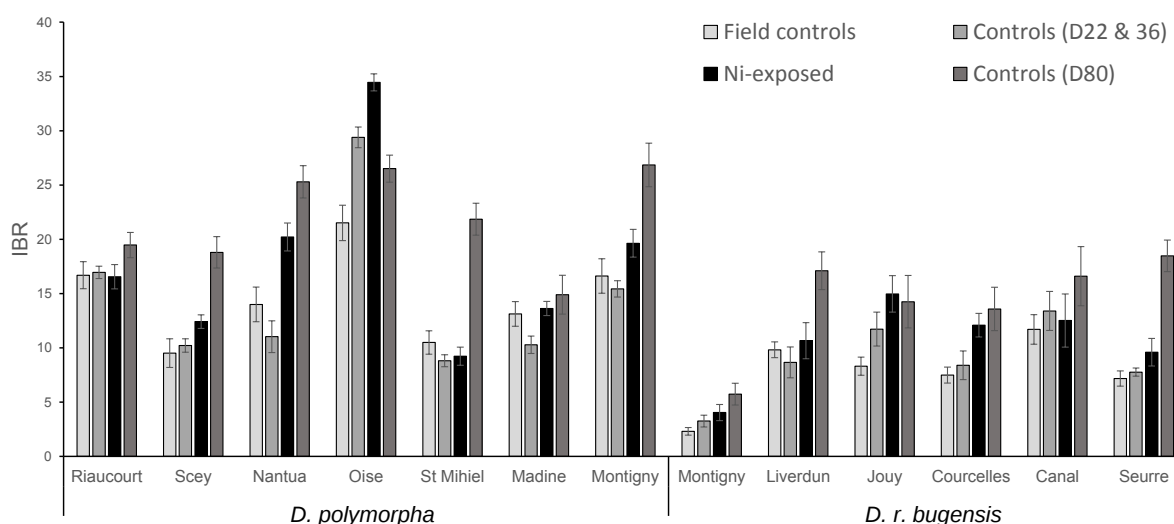


Figure 9: Integrated biomarker responses for the different experimental groups (field controls, $n = 12$; controls D22 & D36, $n = 8$; Ni-exposed, $n = 10$; controls D80, $n = 4$).

We also tried to correlate IBR values with LT_{50} for each population. We observed a strong correlation between IBR for the field controls and LT_{50} ($p = 2.1 \cdot 10^{-3}$, $R^2 = 0.59$, $n = 13$), which means that the higher the IBR is in the field, the better the population will tolerate Ni.

Discussion

In this study, LT_{50} assessment evidenced differential tolerances to Ni between dreissenid species and populations, with a higher tolerance to Ni for *D. polymorpha*, and a higher heterogeneity in tolerance for this species. This inter-population variability has already been shown in the literature for several species⁵³, and is often related to the historic exposure of each population. Indeed, we demonstrated that for *D. polymorpha*, tolerance was correlated with Ni concentration in sediments (although this correlation does not integrate the bioavailable portion of Ni *in situ*) and related with metal contamination in general, which was not true for *D. r. bugensis* populations. This link between sediment contamination and tolerance enables to support the cross-tolerance phenomena. Cross-tolerance is the condition in which enhanced tolerance to one toxicant also enhances tolerance to another²⁰. In the case of metal tolerance, it has been demonstrated in the laboratory that exposure to cadmium may induce copper tolerance in fish⁵⁴ or lead tolerance in *Daphnia magna*⁵⁵. Cross-tolerance seems to take place for particular pairs of toxic, sharing a chemical structure and mode of action, and depends on the species and the exposed populations. In our case, it is possible that cross-tolerance happened within *D. polymorpha* populations. Indeed, this relationship between sediment contamination and tolerance illustrates the fact that the most metal-exposed populations (Riaucourt, Oise) present the highest LT_{50} values; exposure to other metals might have enhanced individuals' tolerance to Ni.

Even if it is currently admitted that invasive species have greater genetic variability, upon which natural selection may act to increase their adaptability to new environments⁵⁶, literature is quite contradictory regarding tolerance to environmental stressors in invasive species. On one hand, some studies have shown that invasive species are more tolerant to environmental stressors than native species⁵⁷, and that detoxification and antioxidant systems tend to be more activated in invasive species than in native ones when facing a contamination^{58,59}. On the other hand, some have shown the opposite^{48,60}. For example, McMahon⁶⁰ has shown that *D. polymorpha* (r-strategy) does not exhibit high resistance or adaptation capacity, but is able to colonize unstable habitats and also to recolonize rapidly after mass extinction, whereas K-strategy native species has to develop an extensive tolerance to maintain. Invasive species are often associated with an r-strategy, characterized by several traits: rapid increase in population density, fast individual growth, early sexual maturity, high fecundity and long distance dispersal. When comparing dreissenid species, it is known that *D. r. bugensis* has a greater growth rate and a better assimilation efficiency, an earlier reproduction period, and seems to be a stronger competitor when both species are present^{37,38,61}. These findings, coupled with our results, may indicate that *D. polymorpha*, which is established in Western Europe for a longer time, might approach a more K-strategy than *D. r. bugensis* that remains in a complete r-strategy.

Several studies have shown that West-European *D. polymorpha* populations, established in the 19th century, present a high genetic differentiation^{62,63}. On the contrary, *D. r. bugensis*, which colonized only a decade ago, do not show genetic differentiation, and is not expected to be capable of local adaptation^{64,65}. However, De Ventura et al.⁴⁷ evidenced that local adaptation to fluctuating environmental parameters can rapidly occur even in newly established populations, and showed that *D. r. bugensis* is better adapted to fluctuating oxygen levels than *D. polymorpha*. This adaptability might thus exist, for both species, regarding physico-chemical parameters. However, adaptation to contaminants has not been proved yet, and our results tend to show that local adaptation to contaminants occurred in *D. polymorpha* while it has not yet been set up in *D. r. bugensis* populations. Our findings reflect the longer invasion history of *D. polymorpha*, which has benefited from more time to differentiate and adapt to local conditions. This might explain the greater variability in tolerance to Ni for tested *D. polymorpha* populations and the higher heterogeneity of biomarker responses observed in the field and after exposure to Ni. Such variability has already been evidenced by Pain-Devin et al.⁹ who compared several populations of *D. polymorpha* living in more or less polluted sites. Even if *D. polymorpha* populations have a common origin, genes were selected in each population by local environmental conditions, leading to a differentiation; this phenomenon can be enhanced by genetic drift and restricted gene flow⁶⁶.

Studies on local adaptation of dreissenids have rarely focused on adaptation to contaminants and even less on the related physiological or biochemical processes that confer tolerance and that can be used as biomonitoring tools. To counter this, we also assessed sub-cellular biomarker responses and internal Ni concentration in soft tissues, trying to link tolerance with physiological status.

We evidenced that Ni accumulation increased with exposure time for both species, and that an increased Ni accumulation was correlated with a higher tolerance for *D. polymorpha* populations only. This means that both species accumulated Ni, but *D. polymorpha* was more able to handle this accumulation and to defend itself, whereas *D. r. bugensis* was not. The better ability of *D. polymorpha* to defend itself against accumulated contaminants has already been evidenced; this species tend to induce its defense mechanisms, such as hsp70 in presence of organic compounds⁴⁶ or antioxidative mechanisms in presence of metals⁷, whereas *D. r. bugensis* suffers more from cellular damages (DNA damages or lipid peroxidation, for both experiments respectively).

Beyond a better comprehension of differential tolerance in natural populations, our study also raises new insights concerning the interpretation of biomarker responses. Measuring biomarker

responses on dying animals gave an idea of their biochemical status as they were close to death, and enabled a comparison with those measured *in situ*. We observed a decrease in energetic reserves (Prot, Tri, Chol), probably due to the absence of food during the experiment. Since the Ni-exposed mussels on which we measured biomarker responses were almost dying, we can hypothesize that organisms were in physiological distress. This is not surprising considering the high dose of Ni they were faced to (2.5 mg.L⁻¹). Classically, ecotoxicological studies carried out to evaluate biochemical and physiological responses are performed at low concentrations of contaminants, close to those observed *in situ*. Here, the main goal was to obtain LT₅₀ values, and the high concentration of Ni selected to evaluate this parameter was responsible for this distress. Even if cellular mechanisms in Ni-exposed mussels were greatly disrupted, *D. polymorpha* seemed more able to defend itself, with a higher GST activity and mainly a higher caspase activity, attesting that this species was still able to eliminate damaged cells whereas *D. r. bugensis* was completely overwhelmed. It would thus be interesting to focus on refining biomarker responses. For example by selecting two contrasted populations of both species, and exposing them at a more realistic concentration, with food implementation, to get a more field-representative assessment. Beyond these general trends, we also evidenced an interaction between population and exposure in almost all situations, which underlines that each population gets some specific features when dealing with contamination.

Biomarkers measured in field mussels showed that *D. polymorpha* presents higher levels of Cat, ETS, TAC *in situ* compared to *D. r. bugensis*. Thus, defence mechanisms (and especially antioxidant defences) are more activated for this species and seem to confer a better tolerance when exposed in the laboratory. In accordance with our previous results⁷, antioxidant mechanisms thus seem to be good candidates for biomonitoring through the use of biomarkers. The correlation between these responses and LT₅₀ attests that for *D. polymorpha*, high biomarker responses in the field might predict a greater tolerance when exposed to contaminants, while it is more often interpreted as a marker of population at risk.

We also integrated all biomarker responses in a general stress index using IBR. Results evidenced a lower IBR index for *D. r. bugensis* populations (both in the field and in laboratory), which theoretically means that they were less stressed than *D. polymorpha*. However, considering that all the results indicate a higher stress for *D. r. bugensis*, the lower IBR values for this species might just be due to a lower activity of cellular mechanisms used as biomarkers. According to Bocquené et al.⁶⁷, an IBR value higher than 9 means that individuals suffer from strong stress. Looking at IBR values for *D. polymorpha* in the field reveals that almost all populations exceed this threshold, but after exposure, it turns out that it seems to be the more tolerant species. Moreover, a high IBR index in the field is correlated with a high LT₅₀. Thus, when considering local adaptation in our interpretation of biomarker results, the common framework is questioned, since a high IBR value cannot necessarily be associated with a stress response and does not always mean that the population is in danger, and can even indicate a better ability to cope with pollution.

Tolerance might also depend on life-stage, as shown by Elderkin et al.⁴⁹, or on seasonal fluctuations, as shown by Costa et al.⁶⁸ who evidenced that tolerance to a molluscidal agent in *D. polymorpha* was lower during summer. A higher filtration rate and a poor health status during summer would reduce energy allocation to defence mechanisms, and may be responsible for this lowered tolerance. Such parameters (e.g. life-stage, season, reproductive status, gender) can influence tolerance and should be taken into account for future environmental monitoring using this species.

In conclusion, this study evidenced that there is a differential inter- and intra-specific tolerance to Ni in the two freshwater bivalves *D. polymorpha* and *D. r. bugensis*. Populations of *D. polymorpha* have a better ability to cope with anthropogenic stressors. This species has a longer invasion history and

presents a better adaptability to local environmental conditions, explaining the greater heterogeneity observed between *D. polymorpha* populations. This work also highlighted the need to take into account differential tolerance among populations of a given species to be used in biomonitoring, since it is obvious that different populations of a same species will not respond the same way to stressors. This variability must be considered as a confounding factor when using biomarker responses in biomonitoring. In accordance with our previous results, it also underlined that *D. r. bugensis* populations are less differentiated and more sensitive to contamination.. Thus, a thorough understanding of sentinel species and populations is needed to correctly interpret their responses to environmental changes.

Methods

1. Organism collection and biometric data

The 13 bivalve populations were hand-collected in April 2016 by section of their byssus, placed in separated aerated coolers (1 cooler per population), and transferred to the laboratory until LT₅₀ experiment. The two species were differentiated according to morphometric parameters⁶⁹ and all specimens were adults (22.5 ± 3.6 and 25.2 ± 4 mm in length for *D. polymorpha* and *D. r. bugensis* respectively).

During sampling, 12 mussels per population were measured (length, width, height of shell, in mm) and soft tissues were weighed in order to calculate an individual condition index according to the following formula⁷⁰:

Condition Index (CI in $\text{mg} \cdot \text{mm}^{-3}$) = wet weight / (length*width*height)

Thereafter, the digestive gland of these 12 mussels were dissected *in situ* and frozen in liquid nitrogen, and kept at -80 °C until biomarker measurements. They were used as a field control allowing us to have the originating response.

2. Acclimatization

Organisms used for LT₅₀ assessment were acclimatized during 3 days at 12 °C, which corresponds to the mean temperature for the different sampling sites (11.9 ± 1.9). Thirty organisms of each population were placed in 10 L aerated aquaria, without food, under natural photoperiod. Water from the field was progressively replaced by spring water (Cristaline®, 1/3 per day; Ca^{2+} : 106; Mg^{2+} : 4.2; Na^{+} : 3.5; K^{+} : 1.5; HCO_3^{-} : 272; SO_4^{2-} : 50; Cl^{-} ; F^{-} : 0.9 mg L^{-1}). Thereafter, organisms of each population were placed in 600 mL experimental beakers (six beakers per population, with five individuals per beaker) to allow byssal fixation. Beakers were filled with 600 mL of Cristaline® and placed in a water bath to maintain a 12 °C temperature, under natural photoperiod.

3. LT₅₀ experiment

After acclimatization, for each population, half of the mussels were exposed to nickel (15 organisms, distributed in 3 beakers, 5 mussels per beaker) at 2.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Figure 10). This concentration was chosen according to previous experiments (with several metals at several concentrations; unpublished data) because it enabled the obtainment of LT₅₀ values in short exposure time, allowing the effects of starvation to remain negligible. A stock solution of nickel chloride ($\text{Cl}_2\text{Ni} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Nickel(II)chloride hexahydrate AnalR NORMAPUR VWR Ref 25851.236) at 500 mg/L (expressed as total ion concentration) was prepared and acidified to 1% with nitric acid. Nominal test concentration was made by diluting Ni stock solution.

Experimental beaker water was not aerated to limit metal adsorption upon glass walls. All media were prepared with Cristaline® and were renewed every 48 h, both to ensure a semi-static exposure,

and to avoid a drop in oxygen concentrations within the beakers. The 15 remaining organisms were exposed only to Cristaline® and used as controls. Beakers were placed in 12 °C water bath. Nickel concentrations within the beakers were checked before every renewal and were $2.44 \pm 0.05 \text{ mg.L}^{-1}$. Five mL of exposure media were sampled in each diluted Ni solution and Ni concentration was measured using flame atomic absorption spectrophotometry (Perkin-ELMER Analyst 100).

4. Mortality check-up

Mortality was checked twice a day (in the morning and at the end of the afternoon). Mussels were considered alive when they were closed, when they rapidly closed their valves after prodding, and when they exhibited filtration activity (siphons out). Mussels that were too slow, or not fully closed, were considered dying and were removed from the beakers.

5. Use of organisms

All Ni-exposed mussels died before controls. Five mussels were randomly selected for bioaccumulation measurement, and the digestive gland of ten remaining mussels were used for biomarker measurement.

The first control beaker was stopped after 22 days, just after the last Ni-exposed mussel died, in order to compare biomarker responses between controls and exposed organisms. At that time, 1 mussel per control beaker was picked to measure bioaccumulation. The two remaining beakers, containing then 4 mussels were left. The second was stopped after 36 days, and the last one after 80 days. This prolongation for the controls enabled to (i) ensure that laboratory conditions were not responsible for organism's death, and (ii) to observe the evolution of biomarker responses on the long term. Even if mussels were unfed, a development of biofilm was observed after 1 month in the control beakers, probably due to algae that remained on the shells.

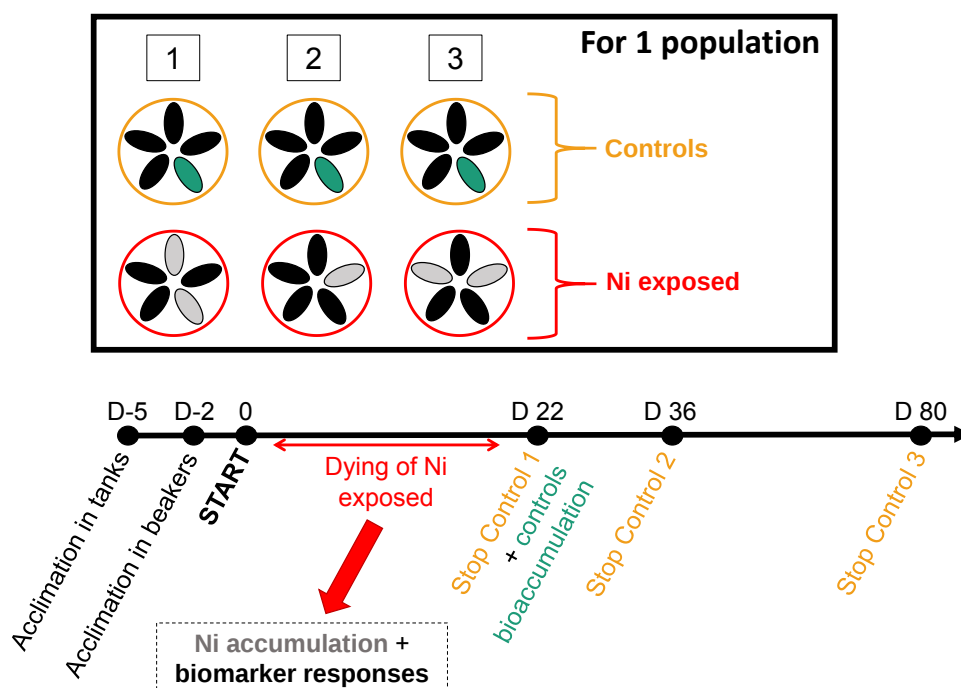


Figure 10: Experimental design

6. Biomarker measurements

Biomarker responses were measured using an automated spectrophotometer (Konelab 20-XTi, ThermoScientific). This device operates on very small volumes and enables the measurement of the whole set of biomarkers on each digestive gland, which is considered as the most metabolically active organ in mussels⁷¹.

Digestive glands were defrosted, weighed and crushed in phosphate buffer (50 mM, pH 7.6 supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1 mM L-serine borate mixture as protease inhibitors) at a 4/1 (v/w) ratio. Homogenates were centrifuged at 250 x g for 5 min at 4 °C (crude extract). Homogenates were used for the assays immediately after their preparation. One part of this fraction was used to evaluate triglyceride (Tri), cholesterol (Chol), lipid hydroperoxide concentration (LOOH), electron transport system (ETS) and acid phosphatase (ACP) activities. The other part underwent a differential centrifugation (1000 x g for 20 min at 4 °C; the supernatant was recovered and centrifuged again at 20,000 x g for 50 min at 4 °C). The final supernatant corresponding to the cytosolic fraction was used to measure total antioxidant capacity (TAC), glutathione-S-transferase (GST), lactate dehydrogenase (LDH), caspase-3 (Csp) and catalase (Cat) activities. Proteins were quantified on both fractions (crude extract (ProtB) and cytosolic fraction (ProtFC)) by the Pyrogallol red colorimetric method, using Scal bovine-based serum as a reference. Biomarker responses were measured following classical methods, adapted for automated measurements in our spectrophotometer. The detailed protocols are available in Garaud et al.⁶, except for Csp and Cat which were slightly modified for microplate measurement in a spectrofluorimeter (SAFAS Xenius, Monaco).

For Cat measurement, cytosolic fraction (5 µL) was diluted in homogenizing buffer (130 µL) and placed in a UV-clear transparent microplate. An automated injector added 65 µL H₂O₂ at 92.3 mM, the plate was agitated and the decrease in absorption was followed at 240 nm during 30 seconds. Results are expressed in mmol H₂O₂. g prot⁻¹.min⁻¹.

For Csp measurement, 20 µL of cytosolic fraction were placed in a dark microplate, and 120 µL of reagent (Tris 13.4 mM containing 350 µM DEVD-AFC, 5.6 mM DTT, 2.2 mM EDTA) were added. The fluorescence kinetic of AFC, cleaved by the caspases, was measured at 400 nm (emission) and 505 nm (excitation) during 30 min. Results are expressed as µmol AFC.g prot⁻¹.h⁻¹, relative to a standard of AFC (from 50 to 0 µM AFC).

7. Metal internal concentration analysis and sediment contamination

Total soft tissues (without byssus) were used for the measurement of internal concentration in Ni. Mussels were defrosted, dried in an oven at 60 °C for 24h, weighed and digested in 5 mL 69% HNO₃ for 48 h at 65 °C. The amount of Ni was determined by flame atomic absorption spectrophotometry (Perkin-ELMER Aanalyst 100). Metal concentrations in mussels are expressed as µg g⁻¹ dry weight (DW) tissue. To ensure a correct measurement, we used a standard mussel tissue (ERM[®]-CE278K) and we measured a concentration of 0.8 µg.gDW⁻¹ in Ni that falls within the 0.54-0.84 µg.gDW⁻¹ range specified for the standard, and attests the reliability of our measurements.

Sediments were sampled in our 12 studied sites. We made 3 sampling points per site, mixed them, and sent 500 g for metals, PCBs and HAPs analysis to La Drome Laboratoire (Cofrac accreditation n° 1-0852). Sediments were mineralized according to EPA 3052 method (using hydrofluoric and nitric acids). Total contaminant concentrations were measured on the <2 mm fraction, using gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS) for HAP and PCB (French norm XP X 33-012), inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) for Al, Fe, Mn, Zn (EN ISO 11885), inductively coupled plasma mass spectroscopy (ICP MS) for As, Cd, Cr, Co, Cu, Ni, Pb (EN ISO 17294-2) and cold vapour atomic fluorescence spectrophotometry for Hg (EN ISO 17852). A rank

test was used to build a contamination gradient of sites, and attribute to each one a contamination index. We transformed the quantitative variable associated with each contaminant into a discrete variable representing the rank of each station within the set of studied stations. The ranks are then summed for all contaminants (rank total), organic pollutants only (rank organics) or metals only (rank metals). Sites are classified from the least (1) to the most contaminated (12).

8. Statistical analysis

Statistical analysis was made using R software (R Development Core Team, version 3.3.0) and Tanagra (version 1.4). Non-linear regressions were performed using the REGTOX macro under ExcelTM (version 7.0.7, Hill model) to determine the time inducing 50% mortality in tested populations (LT₅₀, lethal time for 50 % of the population). Normality and homoscedasticity were tested respectively with Shapiro and Bartlett tests, followed by analysis of variance (ANOVA, MANOVA or Kruskal-Wallis, depending on previous tests). Inter-condition differences were evaluated through post-hoc Tukey or KruskalMC tests. Considering the low number of replicates (3) used to calculate LT₅₀ values for each population, power analysis were performed using G Power (version 3.1) for the observed significant differences; values were always above the 0.8 threshold, which is the classical admitted limit for a good quality power.

Correlations were tested using simple and multiple linear regression. Results of ANOVA statistics for linear regression analysis are given as proportion of variance explained (r^2) and p value of the F-test. Some data were transformed by log10, to avoid the influence of high values.

Partial least square discriminant analysis (PLS-DA) was performed to assess which biomarker responses were able to discriminate experimental groups, after selecting the influent biomarkers using PLS function under Tanagra. Then the PLS-DA was performed and the significant biomarkers (variable importance in the projection, VIP > 0.8) are underlined on the graphics.

A more synthetic representation of biomarker responses is also provided with IBR (Integrated Biomarker Response) calculation⁷², an index commonly used in ecotoxicology to synthesize multibiomarker studies.

For all analysis, a threshold of $p \leq 0.05$ is considered significant and degrees of freedom (df) and residual degrees of freedom (df_{res}) are reported. Data on the graphics are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD).

Acknowledgements

This work was supported by the French ONEMA (Organisme National de l'Eau et des Milieux Aquatiques) through BIOMICS program, the Agence Nationale de la Recherche through the IPOC program (ANR-12-ISV7-0004) and running costs by CPER Lorraine-ZAM (Contrat Projet Etat Région Lorraine, Zone Atelier Moselle). This work is a contribution to the Labex Ressources 21, ANR-10-LABX-21-01 (Strategic metal resources of the 21st century). The authors also wish to thank Sharon Kruger for English corrections, and Philippe Wagner, Philippe Rousselle and Danièle Pauly for their technical help.

References

1. EC. Directive 2000/60/EC du Parlement Européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau. (2000).
2. Allan, I. et al. A 'toolbox' for biological and chemical monitoring requirements for the European Union's Water Framework Directive. *Talanta* **69**, 302–322 (2006).
3. Lagadic, L. Biomarkers: useful tools for the monitoring of aquatic environments. *Rev. Med. Veterinaire* **153**, 581–588 (2002).

4. Depledge, M. H. & Fossi, M. C. The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. *Ecotoxicology* **3**, 161–172 (1994).
5. Magni, S. et al. Multi-biomarker investigation to assess toxicity induced by two antidepressants on *Dreissena polymorpha*. *Sci. Total Environ.* **578**, 452–459 (2017).
6. Garaud, M. et al. Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Nanotoxicology* **10**, 935–944 (2016).
7. Potet, M., Devin, S., Pain-Devin, S., Rousselle, P. & Giambérini, L. Integrated multi-biomarker responses in two dreissenid species following metal and thermal cross-stress. *Environ. Pollut.* **218**, 39–49 (2016).
8. Faria, M. et al. Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **149**, 281–288 (2009).
9. Pain-Devin, S. et al. Towards a better understanding of biomarker response in field survey: A case study in eight populations of zebra mussels. *Aquat. Toxicol.* **155**, 52–61 (2014).
10. Farkas, A. et al. Interspecies comparison of selected pollution biomarkers in dreissenid spp. inhabiting pristine and moderately polluted sites. *Sci. Total Environ.* **599–600**, 760–770 (2017).
11. Hagger, J. A., Jones, M. B., Leonard, D. R., Owen, R. & Galloway, T. S. Biomarkers and integrated environmental risk assessment: are there more questions than answers? *Integr. Environ. Assess. Manag.* **2**, 312–329 (2006).
12. Lam, P. K. & Gray, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Mar. Pollut. Bull.* **46**, 182–186 (2003).
13. Forbes, V. E., Palmqvist, A. & Bach, L. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* **25**, 272–280 (2006).
14. Burgeot, T. et al. Integrated monitoring of chemicals and their effects on four sentinel species, *Limanda limanda*, *Platichthys flesus*, *Nucella lapillus* and *Mytilus sp.*, in Seine Bay: A key step towards applying biological effects to monitoring. *Mar. Environ. Res.* **124**, 92–105 (2017).
15. Vethaak, A. D. et al. Integrated indicator framework and methodology for monitoring and assessment of hazardous substances and their effects in the marine environment. *Mar. Environ. Res.* **124**, 11–20 (2017).
16. Besse, J.-P., Geffard, O. & Coquery, M. Relevance and applicability of active biomonitoring in continental waters under the Water Framework Directive. *Trends Anal. Chem.* **36**, 113–127 (2012).
17. Connon, R. E., Geist, J. & Werner, I. Effect-Based Tools for Monitoring and Predicting the Ecotoxicological Effects of Chemicals in the Aquatic Environment. *Sensors* **12**, 12741–12771 (2012).
18. Martinez-Haro, M. et al. A review on the ecological quality status assessment in aquatic systems using community based indicators and ecotoxicological tools: what might be the added value of their combination? *Ecol. Indic.* **48**, 8–16 (2015).
19. Klerks, P. L. & Weis, J. S. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review. *Environ. Pollut.* **45**, 173–205 (1987).
20. Millward, R. & Klerks, P. Contaminant-adaptation and community tolerance in ecological risk assessment: introduction. *Hum. Ecol. Risk Assess.* **8**, 921–932 (2002).
21. Karatayev, A., Claudi, R. & Lucy, F. History of *Dreissena* research and the ICAIS gateway to aquatic invasions research. *Aquat. Invasions* **7**, 1–5 (2012).
22. Species profile: *Dreissena polymorpha*. Global Invasive Species Database (2017). Available at: <http://www.iucngisd.org/gisd/species.php?sc=50>. (Accessed: 24th May 2017)
23. Rahel, F. J. Homogenization of freshwater faunas. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **33**, 291–315 (2002).
24. Devin, S., Bollache, L., Noël, P.-Y. & Beisel, J.-N. Patterns of biological invasions in French freshwater systems by non-indigenous macroinvertebrates. *Hydrobiologia* **551**, 137–146 (2005).
25. Akopian, M., Garnier, J., Testard, P. & Ficht, A. Estimating the benthic population of *Dreissena polymorpha* and its impact in the lower Seine River, France. *Estuaries* **24**, 1003–1014 (2001).
26. Snyder, F. L., Brainard Hilgendorf, M. & Garton, D. W. Zebra mussels in North America The invasion and its implications. Ohio Sea Grant Ohio State Univ. Columbus OH (1997).
27. Mills, E. L., Roseman, E. F., Rutzke, M., Gutenmann, W. H. & Lisk, D. J. Contaminant and nutrient element levels in soft tissues of zebra and quagga mussels from waters of southern lake ontario. *Chemosphere* **27**, 1465–1473 (1993).

28. Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Priadi, C., Ayrault, S. & Tusseau-Vuillemin, M.-H. Bioavailability of particulate metal to zebra mussels: Biodynamic modelling shows that assimilation efficiencies are site-specific. *Environ. Pollut.* **159**, 3381–3389 (2011).
29. de Lafontaine, Y. et al. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquat. Toxicol.* **50**, 51–71 (2000).
30. Faria, M. et al. Separating natural from anthropogenic causes of impairment in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) populations living across a pollution gradient. *Aquat. Toxicol.* **152**, 82–95 (2014).
31. Palais, F. et al. One-year monitoring of core biomarker and digestive enzyme responses in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Ecotoxicology* **21**, 888–905 (2012).
32. Binelli, A., Della Torre, C., Magni, S. & Parolini, M. Does zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) represent the freshwater counterpart of *Mytilus* in ecotoxicological studies? A critical review. *Environ. Pollut.* **196**, 386–403 (2015).
33. Matthews, J. et al. Rapid range expansion of the invasive quagga mussel in relation to zebra mussel presence in The Netherlands and Western Europe. *Biol. Invasions* **16**, 23–42 (2014).
34. Marescaux, J. et al. Sympatric *Dreissena* species in the Meuse River: towards a dominance shift from zebra to quagga mussels. *Aquat. Invasions* **10**, 287–298 (2015).
35. Heiler, K. et al. Reconstruction of the early invasion history of the quagga mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*) in Western Europe. *Aquat. Invasions* **8**, 53–57 (2013).
36. Claudi, R. & Mackie, G. L. Practical manual for zebra mussel monitoring and control. (Lewis Publishers, 1994).
37. Baldwin, B. S. et al. Comparative growth and feeding in zebra and quagga mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): implications for North American lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **59**, 680–694 (2002).
38. Karatayev, A. Y., Mastitsky, S. E., Padilla, D. K., Burlakova, L. E. & Hajduk, M. M. Differences in growth and survivorship of zebra and quagga mussels: size matters. *Hydrobiologia* **668**, 183–194 (2011).
39. Claxton, W. T. & Mackie, G. L. Seasonal and depth variations in gametogenesis and spawning of *Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis* in eastern Lake Erie. *Can. J. Zool.* **76**, 2010–2019 (1998).
40. Ram, J. L., Karim, A. S., Banno, F. & Kashian, D. R. Invading the invaders: reproductive and other mechanisms mediating the displacement of zebra mussels by quagga mussels. *Invertebr. Reprod. Dev.* **56**, 21–32 (2012).
41. Karatayev, A. Y., Burlakova, L. E. & Padilla, D. K. Zebra versus quagga mussels: a review of their spread, population dynamics, and ecosystem impacts. *Hydrobiologia* **746**, 97–112 (2015).
42. Jones, L. A. & Ricciardi, A. Influence of physicochemical factors on the distribution and biomass of invasive mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*) in the St. Lawrence River. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **62**, 1953–1962 (2005).
43. Matthews, J. et al. A dominance shift from the zebra mussel to the invasive quagga mussel may alter the trophic transfer of metals. *Environ. Pollut.* **203**, 183–190 (2015).
44. Elderkin, C. L. & Klerks, P. L. Variation in thermal tolerance among three Mississippi River populations of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *J. Shellfish Res.* **24**, 221–226 (2005).
45. Ács, A., Vehovszky, Á., Györi, J. & Farkas, A. Seasonal and size-related variation of subcellular biomarkers in quagga mussels (*Dreissena bugensis*) inhabiting sites affected by moderate contamination with complex mixtures of pollutants. *Environ. Monit. Assess.* **188**, (2016).
46. Schäfer, S. et al. Comparison of bioaccumulation and biomarker responses in *Dreissena polymorpha* and *D. bugensis* after exposure to resuspended sediments. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **62**, 614–627 (2012).
47. De Ventura, L., Sarpe, D., Kopp, K. & Jokela, J. Variability in phenotypic tolerance to low oxygen in invasive populations of quagga and zebra mussels. *Aquat. Invasions* **11**, 267–276 (2016).
48. Ellis, S. & MacIsaac, H. J. Salinity tolerance of Great Lakes invaders. *Freshw. Biol.* **54**, 77–89 (2009).
49. Elderkin, C. L., Stoeckel, J. A., Klerks, P. L. & Berg, D. J. Heritability of heat tolerance in zebra mussel veligers. *J. Gt. Lakes Res.* **30**, 360–366 (2004).
50. UE. Directive 2013/39/UE du Parlement européen et du Conseil du 12 août 2013 modifiant les directives 2000/60/CE et 2008/105/CE en ce qui concerne les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l’eau. *Journal Officiel de l’union Européenne* n° 226 du 24 août 2013 (2013).

51. Minguez, L. et al. Cross-effects of nickel contamination and parasitism on zebra mussel physiology. *Ecotoxicology* **21**, 538–547 (2012).
52. Attig, H. et al. Effects of thermal stress and nickel exposure on biomarkers responses in *Mytilus galloprovincialis* (Lam). *Mar. Environ. Res.* **94**, 65–71 (2014).
53. Johnston, E. L. Tolerance to contaminants: evidence from chronically exposed populations of aquatic organisms. in *Tolerance to Environmental Contaminants* (eds. Amiard-Triquet, C., Rainbow, P. S. & Roméo, M.) 25–48 (CRC Press, 2011).
54. Xie, L. & Klerks, P. L. Responses to selection for cadmium resistance in the least killifish, *Heterandria formosa*. *Environ. Toxicol. Chem.* **22**, 313–320 (2003).
55. Ward, T. J. & Robinson, W. E. Evolution of cadmium resistance in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**, 2341–2349 (2005).
56. Lee, C. E. Evolutionary genetics of invasive species. *Trends Ecol. Evol.* **17**, 386–391 (2002).
57. Lenz, M. et al. Non-native marine invertebrates are more tolerant towards environmental stress than taxonomically related native species: Results from a globally replicated study. *Environ. Res.* **111**, 943–952 (2011).
58. Bielen, A. et al. Differences in tolerance to anthropogenic stress between invasive and native bivalves. *Sci. Total Environ.* **543**, 449–459 (2016).
59. Burmester, V., Nimptsch, J. & Wiegand, C. Adaptation of freshwater mussels to cyanobacterial toxins: Response of the biotransformation and antioxidant enzymes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **78**, 296–309 (2012).
60. McMahon, R. F. Evolutionary and physiological adaptations of aquatic invasive animals: r selection versus resistance. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **59**, 1235–1244 (2002).
61. Mills, E. L. et al. A review of the biology and ecology of the quagga mussel (*Dreissena bugensis*), a second species of freshwater dreissenid introduced to North America. *Am. Zool.* **36**, 271–286 (1996).
62. Müller, J. C., Hidde, D. & Seitz, A. Canal construction destroys the barrier between major European invasion lineages of the zebra mussel. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **269**, 1139–1142 (2002).
63. Rajagopal, S. et al. Origin of Spanish invasion by the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting. *Biol. Invasions* **11**, 2147–2159 (2009).
64. Imo, M., Seitz, A. & Johannesen, J. Distribution and invasion genetics of the quagga mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*) in German rivers. *Aquat. Ecol.* **44**, 731–740 (2010).
65. Therriault, T. W., Orlova, M. I., Docker, M. F., MacIsaac, H. J. & Heath, D. D. Invasion genetics of a freshwater mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*) in eastern Europe: high gene flow and multiple introductions. *Heredity* **95**, 16–23 (2005).
66. Tarnowska, K., Daguin-Thiebaut, C., Pain-Devin, S. & Viard, F. Nuclear and mitochondrial genetic variability of an old invader, *Dreissena polymorpha* (Bivalvia), in French river basins. *Biol. Invasions* **15**, 2547–2561 (2013).
67. Bocquené, G. et al. Biological effects of the ‘ Erika ’ oil spill on the common mussel (*Mytilus edulis*). *Aquat. Living Resour.* **17**, 309–316 (2004).
68. Costa, R., Aldridge, D. C. & Moggridge, G. D. Seasonal variation of zebra mussel susceptibility to molluscicidal agents. *J. Appl. Ecol.* **45**, 1712–1721 (2008).
69. Pavlova, V. & Izyumov, Y. Morphological variability of *Dreissena polymorpha* and *Dreissena rostriformis bugensis* (Mollusca: Bivalvia). in *Quagga and zebra mussels - Biology, impacts, and control* (eds. Nalepa, T. F. & Schloesser, D. W.) 287–314 (CRC Press, 2014).
70. Guerlet, E., Vasseur, P. & Giambérini, L. Spatial and temporal variations of biological responses to environmental pollution in the freshwater zebra mussel. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **73**, 1170–1181 (2010).
71. Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E. & Koehler, A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **146**, 281–300 (2007).
72. Beliaeff, B. & Burgeot, T. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* **21**, 1316–1322 (2002).

Partie IV : Le rôle du système MXR dans la tolérance des organismes

Suite aux modifications de réponses des biomarqueurs, observées aussi bien *in situ* qu'en laboratoire, nous avons souhaité évaluer l'importance d'un autre système de défense, le système MXR, dans la tolérance des dreissènes aux contaminants. Comme présenté dans les chapitres 1 et 2, le MXR est constitué de pompes présentes dans la membrane cellulaire, qui vont permettre d'en expulser les xénobiotiques de la cellule. Un inhibiteur spécifique des pompes MXR, le Vérapamil, a été utilisé ici pour tenter d'identifier l'impact d'une inhibition de ce système de protection dans la tolérance des dreissènes à une exposition au nickel.

Les organismes ont été prélevés à Montigny (canal de Jouy pour *D. polymorpha* ; canal de Metz pour *D. r. bugensis*) en juillet 2016, et acclimatés pendant 3 jours avec 1/3 de volume d'eau du milieu remplacé quotidiennement par de la Cristaline®. Les deux expérimentations ont été réalisées à 12 °C, sans apport de nourriture, avec une photopériode naturelle et un renouvellement du milieu tous les deux jours.

Le but de cette expérimentation, nommée « LT₅₀-MXR », était de voir si une inhibition du système MXR, couplée à une exposition au nickel, réduisait d'autant plus le temps de survie que l'exposition au Ni seule. Autrement dit, si l'activité MXR jouait un rôle dans la tolérance de ces espèces au Ni. Elle présentait 4 conditions expérimentales d'exposition : eau Cristaline® (témoins), eau Cristaline® + Vérapamil 30 µm, Ni à 2.5 mg.L⁻¹ et Ni 2.5 mg.L⁻¹ + Vérapamil 30 µM. Pour chaque espèce et chaque condition, 3 béciers de 600 mL contenant chacun 5 organismes étaient utilisés. Le suivi de la mortalité a été réalisé 2 fois par jour ; étaient considérés comme morts les organismes dont la fermeture des valves et/ou la rétractation des siphons étaient ralenties. Sur ces organismes dits « sub-mourants », 3 ont par la suite été utilisés pour la mesure de la concentration en Ni dans les tissus mous et 12 pour la mesure de notre batterie de biomarqueurs définie précédemment.

1. Expérimentation LT₅₀-MXR

1.1. Valeurs de LT₅₀ obtenues

Le suivi de mortalité réalisé durant cette expérimentation a permis d'obtenir des valeurs de temps léthal 50 (TL₅₀ ou LT₅₀). Les valeurs obtenues ici sont présentées en Figure 43a, et sont également reportées comparativement aux valeurs obtenues lors de la précédente expérience de TL₅₀ (p221) en Figure 43b. Aucune mortalité n'a été observée chez les témoins (eau, ou eau + Vérapamil), aucune LT₅₀ n'a donc pu être calculée pour ces conditions.

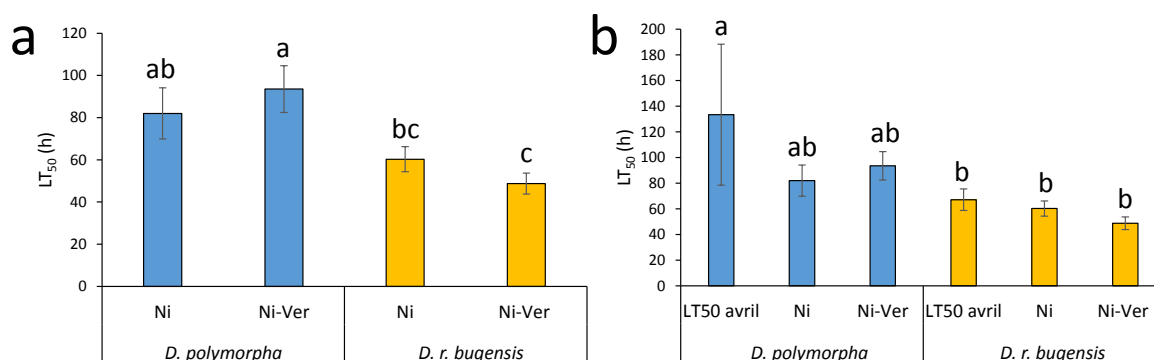


Figure 43 : LT₅₀ obtenues pour les deux espèces soumises à une exposition au Ni seul (Ni) ou au Ni + Vérapamil (Ni-Ver), exprimées en moyenne $\pm$ écart type (a) et relativement aux valeurs obtenues lors d'une expérimentation précédente (b, LT₅₀ avril) ($n = 3$). Les différences entre conditions ont été testées à l'aide d'une ANOVA suivie d'un test post-hoc HSD de Tukey

Sur la Figure 43a, on retrouve une différence interspécifique ($p = 2.21 \cdot 10^{-4}$), avec globalement une meilleure tolérance pour *D. polymorpha* qui présente des TL₅₀ plus élevés. Les conditions d'exposition en revanche n'influencent pas significativement les TL₅₀ ($p = 0.99$, Figure 43a) mais il existe un effet interactif entre espèce et condition d'exposition ($p = 0.0012$ Figure 43a).

Pour une espèce donnée, les valeurs de TL₅₀ obtenues ici ne sont pas significativement différentes de celles obtenues lors de la précédente expérimentation (Figure 43b).

Pour une espèce donnée, il n'y a pas de différence entre les organismes exposés au Ni seul ou au Ni + Vérapamil, donc l'inhibition des pompes MXR n'augmente pas la sensibilité des organismes au Ni.

1.2. Accumulation du Ni dans les tissus mous

Concernant l'accumulation du Ni dans les tissus mous (Figure 44), il existe une différence entre les deux espèces ($p = 0.047$), avec une accumulation légèrement plus importante du Ni pour *D. r. bugensis* ; on notera que cette différence est trop ténue pour être mise en évidence lors des comparaisons 2 à 2 des tests post-hoc. Les concentrations accumulées sont cohérentes avec les patrons d'expositions, avec des quantités significativement plus importantes chez les organismes exposés au Ni ou au Ni + Vérapamil que pour les témoins ($p < 2 \cdot 10^{-16}$). La présence de Vérapamil n'influence donc pas l'accumulation du Ni dans les tissus mous (le blocage des pompes MXR n'augmente pas la rétention du Ni).

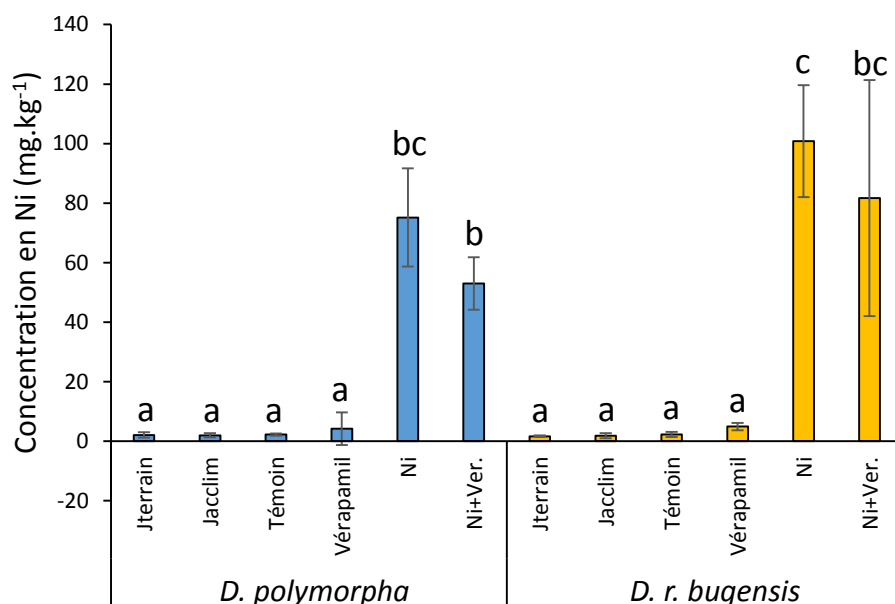


Figure 44 : Concentration en Ni dans les tissus mous (moyenne $\pm$ écart type, $n = 3$) pour les différentes conditions expérimentales (Témoin, Vérapamil, Ni seul et Ni + Vérapamil) et après prélèvement sur le terrain (Jterrain) et la période d'acclimatation (Jacclim)

1.3. Réponses des biomarqueurs

Les mesures des réponses des biomarqueurs ont été réalisées sur les 12 organismes « sub-mourants » restant pour chaque condition. Les résultats ont été analysés par une ACP (Figure 45) qui englobe l'intégralité des réponses mesurées. La MANOVA réalisée met en évidence de fortes différences de réponse entre les deux espèces, visibles sur la Figure 45a ($p < 2 \cdot 10^{-16}$), mais aussi une influence significative des conditions d'exposition ($p = 9.16 \cdot 10^{-13}$) et un effet croisé de ces deux facteurs ($p = 8.94 \cdot 10^{-3}$) sur les réponses des biomarqueurs. La Figure 45b met en effet en évidence un gradient de réponse, du terrain vers les conditions expositions les plus contraignantes pour les organismes. Les tests de Hotelling (Figure 45d) mettent en évidence les effets significatifs des conditions d'exposition sur les réponses des biomarqueurs ; on peut notamment remarquer que les organismes témoins ont des réponses différentes de ceux exposés au Ni, au Vérapamil, et au Ni + Vérapamil. Comme c'est souvent le cas, on observe une augmentation des activités ETS, TAC et GST pour *D. polymorpha*, et une augmentation de LOOH, Tri et Chol pour *D. r. bugensis*. Les organismes exposés au Ni et au Vérapamil voient leurs activités catalase et caspase augmenter, attestant de perturbations importantes au niveau intra-cellulaire. Toutefois, le Vérapamil n'entraîne pas d'effets supplémentaires par rapport au Ni seul (Figure 45c).

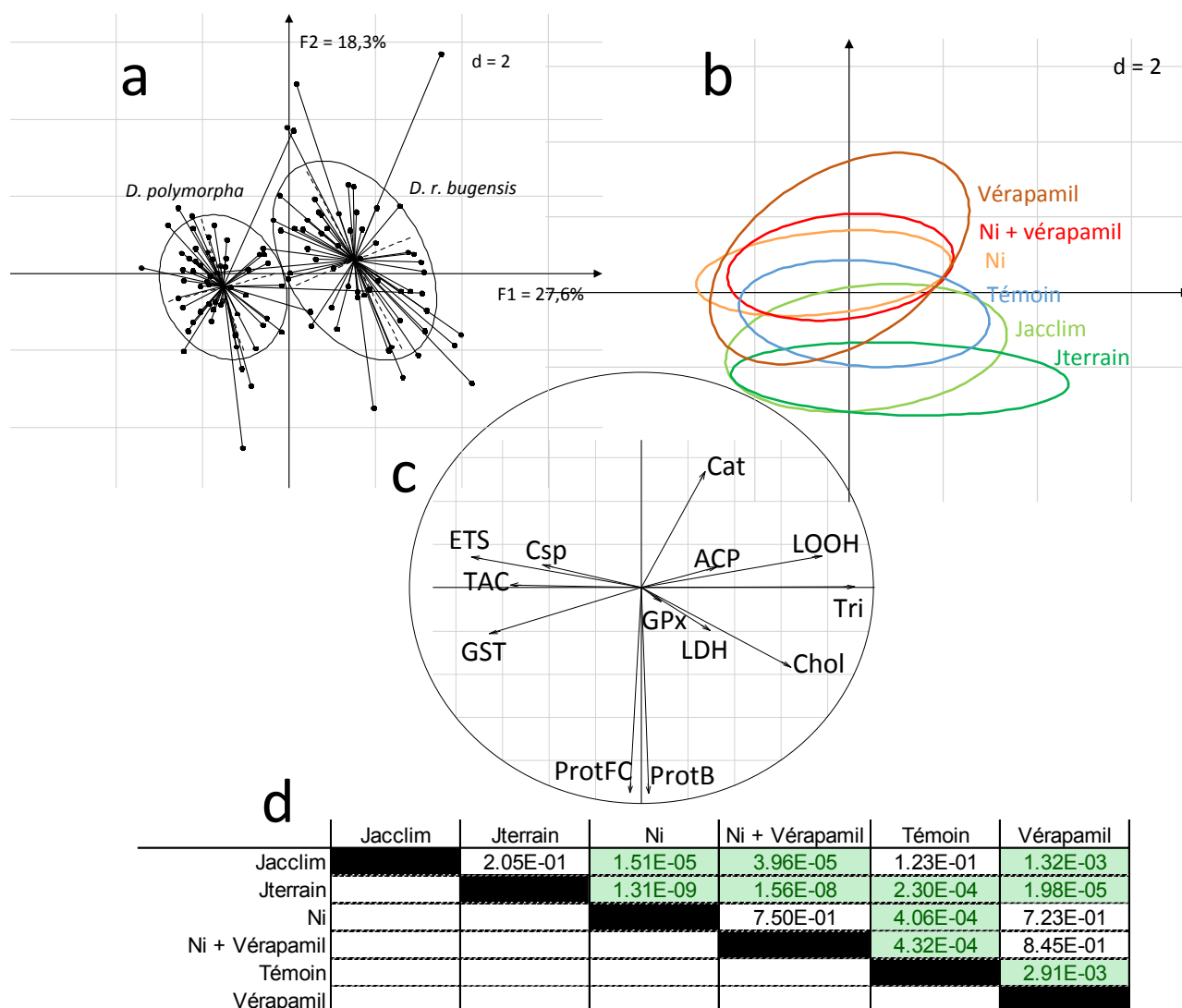


Figure 45 : ACP représentant les réponses des biomarqueurs chez les organismes exposés aux différentes conditions expérimentales (LT_{50} -MXR) avec les diagrammes de dispersion selon l'espèce (a) ou les différentes conditions expérimentales (b), le cercle des corrélations (c) et p-valeurs associées aux tests de Hotelling entre conditions corrigées par la méthode Benjamini & Hochberg (d)

2. Discussion et conclusion

Le principal résultat mis en évidence à travers cette expérimentation est la différence de réponse entre les deux espèces exposées au métal, observée pour les niveaux de LT_{50} (comme lors de l'expérimentation précédente sur les 13 populations) et au niveau des réponses des biomarqueurs. En revanche, l'inhibition du MXR n'a pas entraîné d'effet supplémentaire par rapport à une exposition au Ni seul : l'inhibition des pompes MXR n'influence ni les LT_{50} mesurées, ni l'accumulation du Ni dans les tissus mous, ni les réponses des biomarqueurs. On peut donc supposer que ce système de défense ne joue pas un rôle prépondérant dans la tolérance des organismes au Ni.

Bien que ce système soit induit par de nombreux contaminants chez les organismes aquatiques (Eufemia et Epel, 2000), il est admis qu'il est plus adapté aux contaminants modérément hydrophobes comme les contaminants organiques (Bard, 2000 ; Minier et al., 2006 ; Pain et Parant, 2003b).

Certaines études ont tout de même montré que ce système pouvait être induit par les métaux. Par exemple le MXR répond mieux à de faibles concentrations en cadmium (Achard, 2004) et l'expression des gènes codant pour la Pgp (la principale protéine responsable du phénomène MXR) est augmentée à une faible concentration en Ni ($18 \mu\text{g.L}^{-1}$) chez *Mytilus galloprovincialis* mais pas à de plus fortes concentrations (180, 1800 et $3600 \mu\text{g.L}^{-1}$; Dallas et al., 2013). L'exposition durant 4 jours à du Ni à $770 \mu\text{g.L}^{-1}$ n'entraîne pas non plus d'augmentation de la transcription des Pgp chez *M. galloprovincialis* (Franzellitti et al., 2011). Vue la forte concentration appliquée ici pour obtenir les TL_{50} ($2500 \mu\text{g.L}^{-1}$), cela pourrait expliquer l'absence d'incidence visible du MXR dans la tolérance au nickel.

On soulignera également que le Vérapamil seul semble être la condition la plus contraignante sur les réponses des biomarqueurs, entraînant la plus forte induction des biomarqueurs de stress ; la position intermédiaire de la condition Ni+Vérapamil pourrait ne pas être liée à l'inhibition du MXR mais à une cytotoxicité du Vérapamil. L'hypothèse de la toxicité des inhibiteurs et des fluorochromes utilisés pour mesurer l'activité MXR a déjà été émise chez le gammare (Andreï, 2015).

Chapitre 4 : Tolérance et mécanismes d'acclimatation et d'adaptation des organismes

A RETENIR

- Les différences inter-spécifiques et inter-populationnelles observées *in situ* sont maintenues en laboratoire
- Les populations de *D. polymorpha* ont une meilleure tolérance à un stress aigu au nickel que les populations de *D. r. bugensis* ; le système MXR ne joue pas de rôle prépondérant dans cette tolérance
- Ces capacités de tolérance différentes entre populations de *D. polymorpha* peuvent être mises en relation avec la contamination sédimentaire (nickel notamment) des sites d'origine des organismes
- Les populations de *D. polymorpha* sont plus hétérogènes, aussi bien dans leurs capacités de tolérance qu'au niveau des réponses des biomarqueurs, que les populations de *D. r. bugensis*
- Les réponses des biomarqueurs chez les deux espèces peuvent être influencées par la température du milieu et la disponibilité en nourriture, qui vont agir sur l'activité de filtration, l'accumulation des contaminants et l'activité métabolique
- Lors d'expositions en laboratoire *D. polymorpha* présente un métabolisme cellulaire et des mécanismes antioxydants et antitoxiques plus actifs que *D. r. bugensis* qui, malgré ses réserves énergétiques plus importantes, présente plus de dommages cellulaires
- L'accumulation des contaminants dans les tissus mous est généralement similaire pour les deux espèces
- Ces différents points mis en parallèle pourraient indiquer que les populations de *D. r. bugensis*, arrivées plus récemment, présenteraient des capacités d'acclimatation physiologique similaires entre populations, qui leur permettraient de survivre *in situ*, mais seraient insuffisantes lors d'expositions à des stress plus intenses. A l'inverse, *D. polymorpha* est installée depuis beaucoup plus longtemps : chaque population a pu s'adapter génétiquement aux conditions environnementales locales, ce qui expliquerait les différences observées entre populations

Chapitre 5 : Etude intégrée de toutes les données acquises

Ce chapitre constitue une analyse globalisée des différents résultats obtenus durant ces trois années de travaux. Cette partie apportera des éléments de réponse aux livrables attendus dans le cadre du projet BIOMICS, à savoir combien et quels biomarqueurs sélectionner dans une démarche de biosurveillance ? Quel échantillon minimal d'organismes est nécessaire pour s'assurer d'une bonne représentativité des résultats ? Et au final, peut-on établir une gamme de variation des biomarqueurs en dehors de laquelle on pourra considérer que le milieu présente un danger pour les organismes ? Nous verrons également si un écart par rapport aux valeurs de référence mesurées *in situ* est indicateur d'une modification de la contamination du milieu.

Partie I : Effort de prélèvement des organismes

Un point clé des études en écotoxicologie, lié à la lourdeur expérimentale de la mesure des biomarqueurs et à la quantité de tissus nécessaire à leur mesure, est le nombre d'individus, ou plus généralement de réplicats, nécessaires à la mesure de chaque biomarqueur. Un trop faible nombre de réplicats remet en effet en cause la validité des patrons de réponses révélés. Un compromis devait alors nécessairement être trouvé entre un grand nombre de biomarqueurs, sur peu d'individus, ou peu de biomarqueurs sur de nombreux individus. L'utilisation d'un automate de dosage nous a permis de lever l'un des verrous expérimentaux, en permettant de doser plus d'une dizaine de variables biologiques sur un seul individu, laissant le champ libre à une augmentation du nombre d'individus étudiés.

La question de la représentativité de notre échantillon expérimental par rapport à la taille de la population se pose alors. Nous avons de ce fait cherché à déterminer le nombre d'individus nécessaire pour obtenir une réponse pertinente par rapport à la population étudiée. Cette démarche n'a pas été appliquée à toutes les populations étudiées, mais seulement à 2 populations de *D. polymorpha* et 3 populations de *D. r. bugensis*. Sur ces 5 populations, un effort d'échantillonnage important a été effectué (de 20 à 36 individus selon la population). La batterie de 13 biomarqueurs a été mesurée pour chacun d'entre eux.

Pour définir la taille minimale permettant de limiter les erreurs liées à la variabilité au sein de chaque population, nous avons produit 2 échantillons aléatoires de n individus parmi les N prélevés, n allant de 3 (taille minimale requise pour un échantillon) à N. Ces 2 échantillons sont comparés par un test t, et la procédure est répétée 100 fois pour chaque valeur de n.

Tableau XVI : Synthèse du nombre de différences significatives entre sous-échantillons aléatoires tirés au sort au sein de chaque population, pour différentes valeurs de n. Les valeurs rencontrées dans le tableau peuvent se lire comme des pourcentages d'erreur, la méthode de sous-échantillonnage ayant été répétée 100 fois pour chaque valeur de n et pour chaque biomarqueur

	n	Protéines (broyat)	Protéines cytosoliques	Triglycérides	Cholestérol	ETS	LOOH	AcP	GST	TAC	LDH	CSP
ZM	3	4	1	1	1	5	0	0	0	1	5	2
Montigny -	6	3	1	2	1	3	2	0	1	4	7	4
Canal de Jouy	10	4	1	2	5	1	0	1	2	0	1	2
ZM	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Saint-Mihiel	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QM	3	2	0	1	3	4	1	4	3	3	6	1
Montigny -	6	2	0	4	6	0	2	4	2	1	5	1
Canal de Jouy	10	2	1	1	1	0	0	4	1	0	2	0
QM	3	2	1	1	1	0	5	4	1	3	6	3
Saint-Mihiel	6	1	2	4	2	0	2	2	5	0	3	2
	10	2	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0
QM	3	1	0	2	1	2	1	2	1	2	2	2
Montigny -	6	0	0	0	2	1	1	3	2	2	3	0
Canal de Metz	10	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0

Le Tableau XVI présente le nombre de fois où le test t a mis en évidence une différence significative entre les 2 sous-échantillons aléatoires, pour certaines valeurs de n seulement. Il illustre l'hétérogénéité de la variabilité intra-populationnelle : ainsi, pour *D. polymorpha*, nous pouvons voir que, même pour n = 10, certaines erreurs peuvent subsister, conduisant à établir une différence de réponse entre échantillons provenant de la population de Montigny - Canal de Jouy (pour le cholestérol, cette erreur se produit dans 5% des cas, qui est l'erreur maximale admissible), alors que pour la population de la même espèce prélevée à Saint-Mihiel, aucune erreur n'a pu être mise en évidence, même avec n = 3. Les mêmes patrons de réponse sont identifiés pour *D. r. bugensis*, avec toutefois une plus grande stabilité des réponses, et toujours la population de Montigny - Canal de Jouy, qui présente la variabilité la plus élevée.

Cette première étape nous a cependant permis d'établir qu'un n compris entre 8 et 10 était généralement suffisant pour rendre compte de la réponse moyenne de la population. Par précaution, nous avons utilisé n = 10 à n = 12 durant nos expérimentations.

Partie II : Réponses observées sur le terrain et en laboratoire

1. Description des réponses

Pour cette partie, l'ensemble des données obtenues, aussi bien *in situ* que lors des expérimentations en laboratoire, ont été regroupées. Tous les individus sur lesquels la batterie de biomarqueurs a été mesurée ont été répartis en trois catégories : « Terrain », pour les individus dont les réponses ont été mesurées *in situ*, « Témoin », pour les témoins en laboratoire ou témoins post-acclimatation, et « Stress » pour ceux ayant subi un stress en laboratoire (stress métallique à différentes concentrations de Ni ou Cr, stress alimentaire). Dans la mesure où l'augmentation de température que nous avons parfois appliquée ne produisait un effet que dans des conditions bien particulières, elle n'a pas été considérée ici.

Une ACP a été réalisée sur ce jeu de données (Figure 46), afin de voir s'il existait un recoupement des réponses entre les individus « Terrain », « Témoin » et « Stressés ». On peut observer que les trois groupes se superposent, indiquant une absence de patron de réponse net selon la condition (Figure 46a). La séparation des deux espèces est toujours vraie (Figure 46b). Les groupes « Témoin » et « Stress » sont relativement bien superposés, alors que le groupe « Terrain » se retrouve légèrement en décalage, pour les deux espèces (Figure 46d).

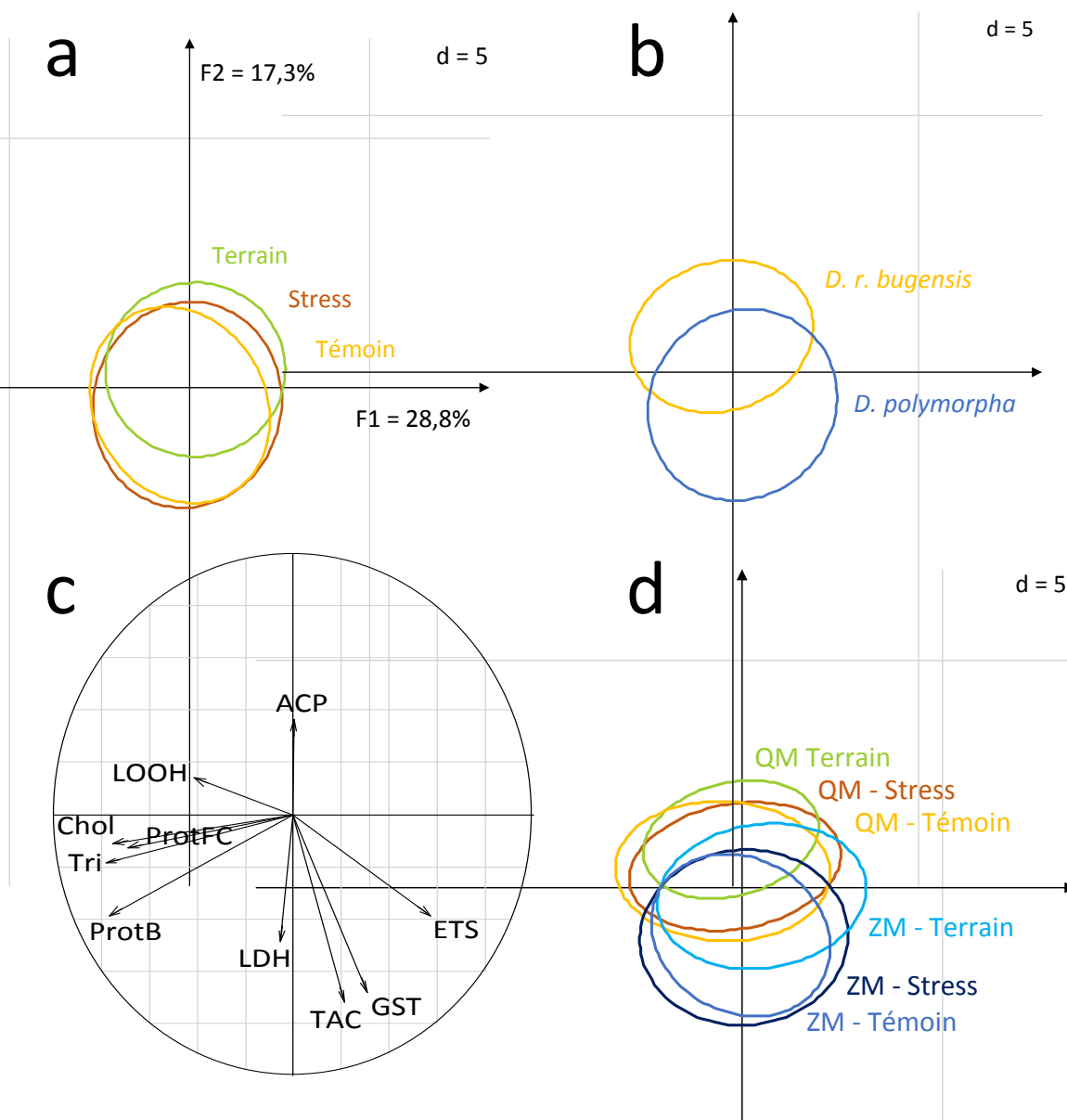


Figure 46 : ACP représentant la variabilité des réponses des biomarqueurs en condition terrain (Terrain), pour les témoins utilisés en laboratoire (Témoin) et pour les organismes exposés à un stress en laboratoire (Stress), chez *D. polymorpha* (ZM) et *D. r. bugensis* (QM), toutes populations confondues. Les diagrammes de dispersion sont représentés en fonction des typologies (a), des espèces (b) ou de ces deux facteurs simultanément (d), avec le cercle des corrélations associé (c). Plan factoriel F1F2 de l'analyse du tableau individus x biomarqueurs (10 colonnes x 2278 lignes)

La même analyse a été reproduite uniquement sur les populations de *D. polymorpha* et *D. r. bugensis* de Montigny, pour lesquelles nous disposons du plus grand nombre de données (Figure 47). Sur ces deux populations, on observe cette fois une séparation beaucoup plus nette des réponses entre les organismes « Terrain » et ceux utilisés en laboratoire (Figure 47a) ; cette observation est aussi valable si on considère les deux espèces séparément (Figure 47c). En laboratoire, les réponses des organismes témoins et stressés se superposent. Ici aussi on observe une séparation des réponses des deux espèces (Figure 47b).

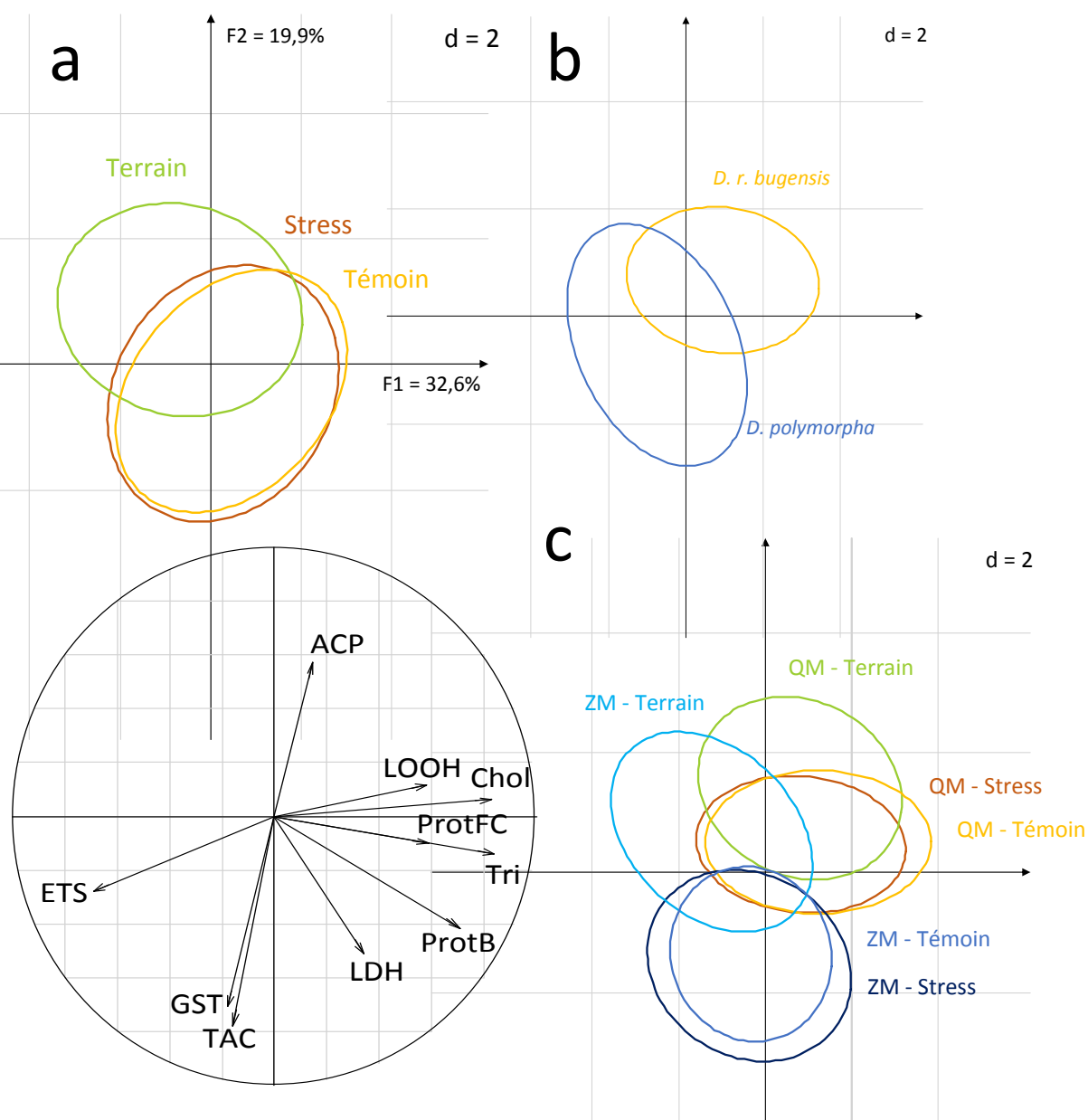


Figure 47 : ACP représentant la variabilité des réponses des biomarqueurs en condition terrain (Terrain), pour les témoins utilisés en laboratoire (Témoin) et pour les organismes exposés à un stress en laboratoire (Stress), chez *D. polymorpha* (ZM) et *D. r. bugensis* (QM), pour les populations de Montigny – Canal de Jouy uniquement. Les diagrammes de dispersion sont représentés en fonction des typologies (a), des espèces (b) ou de ces deux facteurs simultanément (d), avec le cercle des corrélations associé (c). Plan factoriel F1F2 de l'analyse du tableau individus x biomarqueurs (10 colonnes x 857 lignes)

Cette analyse a aussi été faite sur les populations de *D. polymorpha* et *D. r. bugensis* vivant sur le site de Saint Mihiel, qui ont aussi été utilisées lors des expérimentations en laboratoire (Figure 48). Pour ces populations, la séparation des deux espèces est toujours visible (Figure 48b), mais cette fois ci les réponses des organismes sur le terrain et en laboratoire se superposent, que les espèces soient séparées (Figure 48c) ou non (Figure 48a).

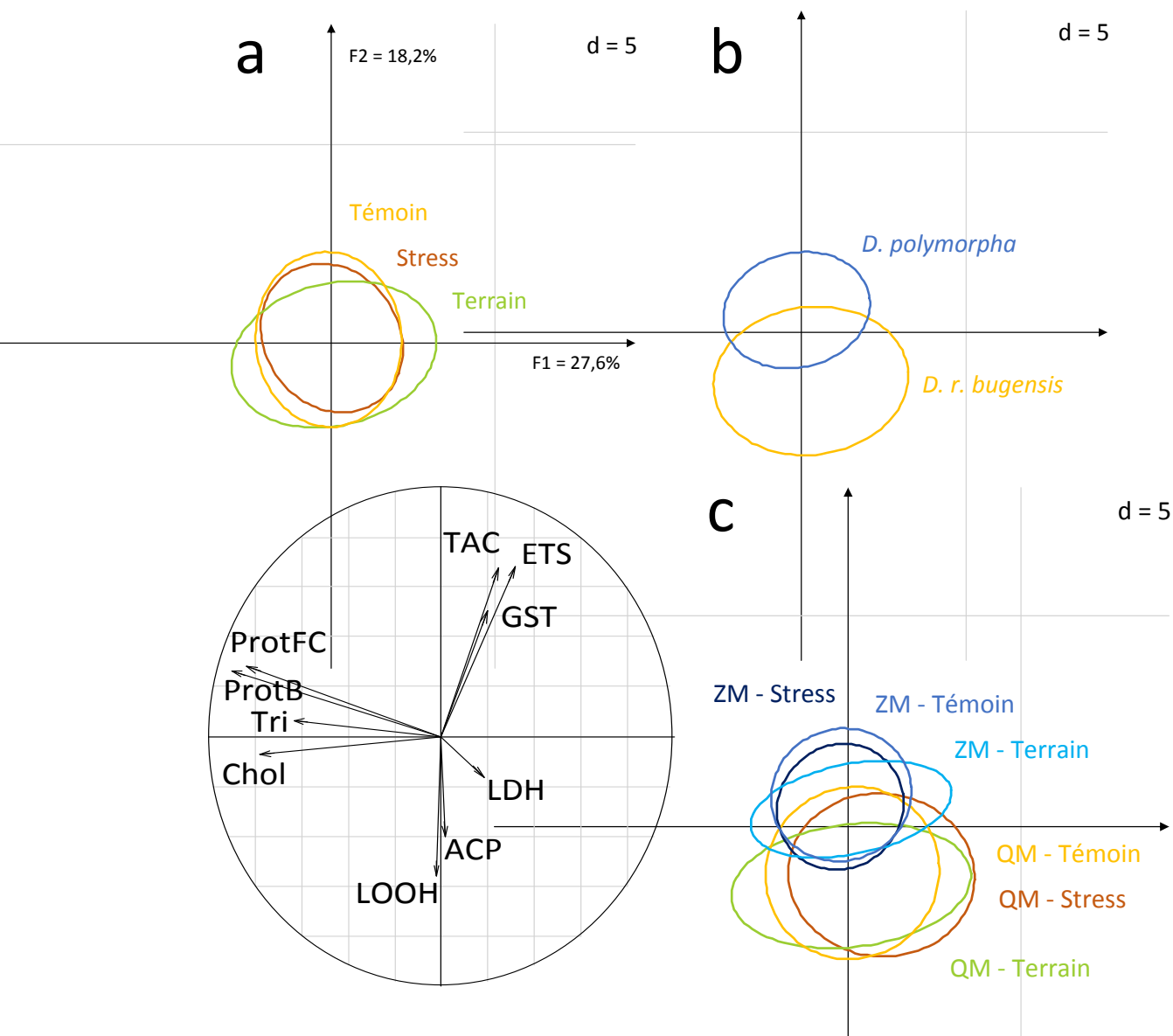


Figure 48 : ACP représentant la variabilité des réponses des biomarqueurs en condition terrain (Terrain), pour les témoins utilisés en laboratoire (Témoin) et pour les organismes exposés à un stress en laboratoire (Stress), chez *D. polymorpha* (ZM) et *D. r. bugensis* (QM), pour les populations de Saint Mihiel uniquement. Les diagrammes de dispersion sont représentés en fonction des typologies (a), des espèces (b) ou de ces deux facteurs simultanément (d), avec le cercle des corrélations associé (c). Plan factoriel F1F2 de l'analyse du tableau individus x biomarqueurs (10 colonnes x 423 lignes)

Ces différentes analyses nous indiquent que selon le site considéré, les réponses des organismes sur le terrain et exposées en laboratoire peuvent être similaires (Saint Mihiel, Figure 48), ou différentes (Montigny, Figure 47). Si on considère tous les sites simultanément, la distinction entre réponses sur le terrain et réponses en laboratoire n'est pas possible. Ces résultats soulignent à nouveau la nécessité de caractériser chacun des sites de prélèvement, et de connaître les patrons de réponse des populations qui y vivent. De plus, pour le site le plus documenté au cours de ces travaux (Montigny) le passage en laboratoire semble être un facteur déterminant dans la réponse des organismes, qui masque même l'effet de stress faible par rapport aux témoins.

2. Typologie des sites et relations entre réponses biologiques

Par la suite, nous avons essayé de faire correspondre chaque individu avec une typologie sur la base des réponses des biomarqueurs : 1 = organismes non stressés *in situ* ; 2 = organismes stressés *in situ* ; 3 = organismes témoins en laboratoire ; 4 = organismes stressés en laboratoire. Comme les réponses des biomarqueurs sont toujours différentes entre les deux espèces, elles ont d'emblée été séparées. L'attribution de chaque lot expérimental à l'un de ces 4 groupes a été réalisée selon deux stratégies différentes. Pour les organismes utilisés lors des expérimentations en laboratoire, l'assignation est basée sur les conditions d'exposition : 3 pour les témoins et 4 pour ceux ayant subi un stress expérimental (absence de nourriture, ou exposition à un contaminant, peu importe la concentration). Pour les organismes dont les réponses ont été mesurées *in situ*, nous avons utilisé une démarche de classification automatique des données, afin de différencier les organismes stressés (2) ou non sur le terrain (1). La méthode des centres mobiles²⁹ (kmeans) a été utilisée pour définir, parmi les organismes « Terrain », lesquels étaient stressés ou non. La méthode de classification a été appliquée sur les données collectées à l'échelle individuelle, et non sur les moyennes à l'échelle du site. En conséquence, tous les individus d'une même population n'ont pas été attribués par la méthode des kmeans à la même classe. Ces individus ont donc été manuellement réattribués à la classe dans laquelle se trouvait la majeure partie des individus de la population.

Lors de l'attribution des individus aux 4 typologies, nous avons remarqué que la proportion d'individus stressés sur le terrain, relativement aux non-stressés, était beaucoup plus importante pour *D. r. bugensis* (66%) que pour *D. polymorpha* (22%). Cela est probablement lié à la qualité des milieux échantillonnés ici, qui comme nous l'avons déjà vu, est généralement moins bonne sur les sites où vivent les populations de *D. r. bugensis*.

Nous avons également remarqué que pour une population donnée, l'attribution aux typologies 1 ou 2 pouvait varier avec la saison, attestant encore une fois du rôle de l'effet saisonnier dans les réponses des biomarqueurs et dans l'interprétation qui y est associée en terme de qualité du milieu.

Une fois chaque individu attribué à une typologie, des réseaux de corrélation entre biomarqueurs ont été réalisés. Pour cela, nous avons utilisé la fonction « qgraph » du package qgraph dans R, qui permet de représenter graphiquement les relations entre variables (biomarqueurs ici) identifiées à l'aide d'une matrice de corrélations. L'utilisation de l'argument « sig2 » (package fdrtool) dans cette fonction permet à la fois de déterminer la significativité des réseaux obtenus (*p*-valeurs), et de distinguer les corrélations positives (tons bleu) des corrélations négatives (tons orange). L'utilisation de l'argument « layout = spring » permet de forcer la représentation des biomarqueurs, en rapprochant les plus corrélés. Le but de ces réseaux de corrélations est de tenter de mettre en évidence un mode d'action des polluants,

²⁹ La fonction « kmeans » du package stats permet d'effectuer un regroupement des individus en *x* groupes (clusters), de telle sorte que la somme des carrés des points au centre des groupes soit minimisée

et de voir si les corrélations entre réponses biologiques sont modifiées selon les stress auxquels sont confrontés les individus (typologies 1 à 4).

2.1. Relations entre biomarqueurs chez *D. polymorpha*

Pour *D. polymorpha*, si l'on considère les réponses des biomarqueurs dans leur ensemble sans distinguer les différentes typologies (Figure 49), on constate que tous les biomarqueurs sont reliés les uns aux autres, plus ou moins fortement. Il existe une très forte liaison entre les marqueurs liés au métabolisme énergétique (protéines, triglycérides, cholestérol), qui sont corrélés négativement avec l'activité ETS ; cela signifie que lorsque l'activité métabolique cellulaire augmente, les réserves énergétiques diminuent. Les biomarqueurs de détoxification (GST), d'activité antioxydante (TAC) et de stress cellulaire plus général (LDH) sont corrélés positivement ; ils agissent donc dans le même sens. L'ETS est aussi corrélé positivement à l'activité GST.

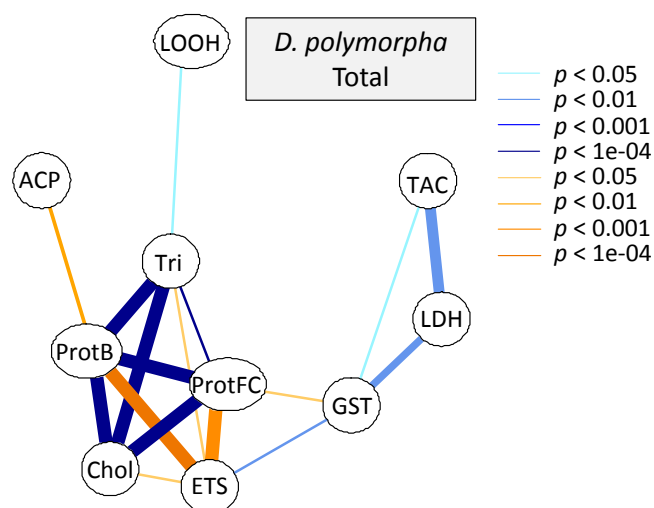


Figure 49 : Corrélations entre les réponses des biomarqueurs pour l'ensemble des individus de *D. polymorpha*. La couleur et l'épaisseur des traits témoignent d'une corrélation plus ou moins forte entre 2 biomarqueurs (CF p-valeurs). Les tons bleus indiquent une corrélation positive, les tons oranges une corrélation négative

Lorsqu'on sépare les réponses des biomarqueurs selon les différentes typologies (Figure 50), on constate des modifications des relations entre biomarqueurs selon la typologie. Certaines corrélations entre biomarqueurs sont modifiées, mais les relations entre les biomarqueurs du métabolisme énergétique (protéines, triglycérides, cholestérol et ETS) sont maintenues dans les 4 typologies.

Pour la typologie 1 (organismes non stressés *in situ*, Figure 50a), on voit que l'ACP et la LOOH ne montrent aucune corrélation ; la LDH et la TAC sont corrélées positivement ; la GST est corrélée négativement aux ProtFC et aux Tri.

Pour la typologie 2 (organismes stressés *in situ*, Figure 50b), l'ACP et la TAC ne montrent aucune corrélation ; la GST, l'ETS et la LDH sont corrélées positivement et sont positionnés à proximité des marqueurs énergétiques. La LOOH est corrélée négativement aux ProtFC.

Pour la typologie 3 (organismes témoins en laboratoire, Figure 50c), la LOOH, la TAC et l'ACP ne montrent aucune corrélation. L'ETS, la GST et la LDH sont de nouveau corrélées positivement. L'intensité des relations entre les marqueurs énergétiques est réduite.

Pour la typologie 4 (organismes stressés en laboratoire, Figure 50d), la LOOH, la TAC et l'ACP ne sont plus corrélées aux autres biomarqueurs. La GST et la LDH sont corrélées positivement, mais éloignées des marqueurs énergétiques.

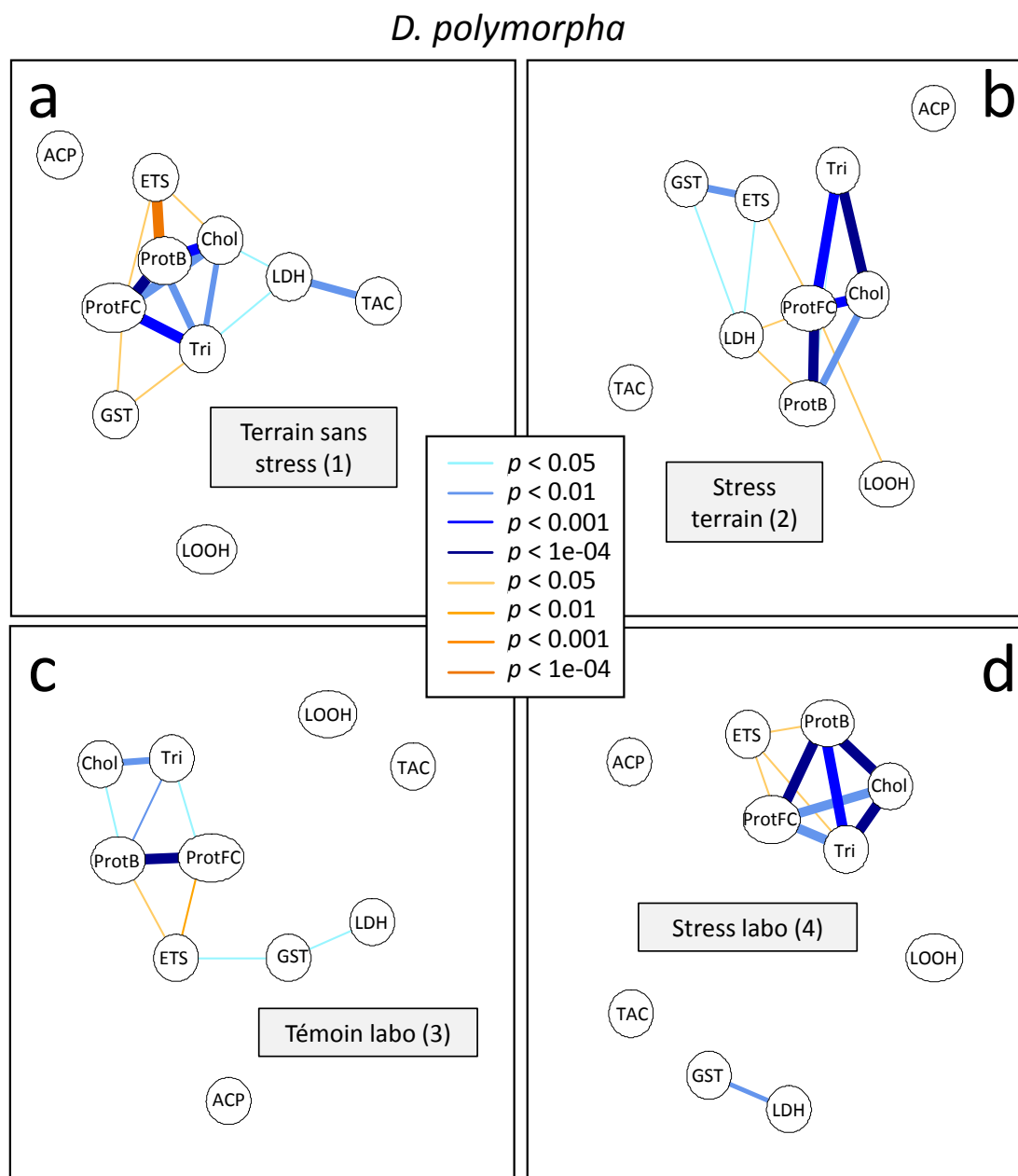


Figure 50 : Corrélations entre les réponses des biomarqueurs pour les individus de *D. polymorpha* non-stressés sur le terrain (a), stressés sur le terrain (b), témoins en laboratoire (c) et stressés en laboratoire (d). La couleur et l'épaisseur des traits témoignent d'une corrélation plus ou moins forte entre 2 biomarqueurs (CF p-valeurs). Les tons bleus indiquent une corrélation positive, les tons oranges une corrélation négative

2.2. Relations entre biomarqueurs chez *D. r. bugensis*

Pour *D. r. bugensis*, si on considère les réponses des biomarqueurs dans leur ensemble sans distinguer les différentes typologies (Figure 51), on constate que contrairement à *D. polymorpha* tous les biomarqueurs ne sont pas reliés les uns aux autres. On retrouve toutefois la forte liaison entre les marqueurs liés au métabolisme énergétique (protéines, triglycérides, cholestérol), qui sont corrélés négativement avec l'activité ETS. Les activités GST et LDH sont corrélées positivement, contrairement à la TAC qui n'est reliée à aucun marqueur.

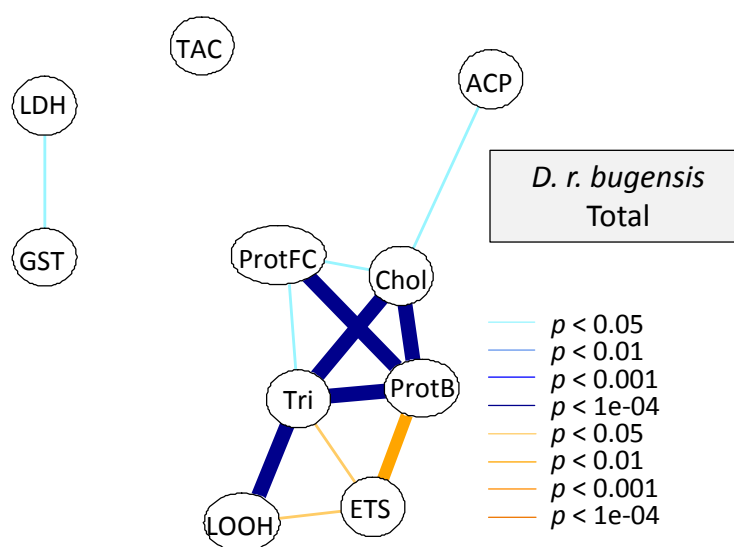


Figure 51 : Corrélations entre les réponses des biomarqueurs pour l'ensemble des individus de *D. r. bugensis*. La couleur et l'épaisseur des traits témoignent d'une corrélation plus ou moins forte entre 2 biomarqueurs (CF p-valeurs). Les tons bleus indiquent une corrélation positive, les tons oranges une corrélation négative

Lorsqu'on sépare les réponses des biomarqueurs selon les différentes typologies (Figure 52), on constate chez cette espèce aussi des modifications des relations entre biomarqueurs selon la typologie. Ici aussi les relations entre les biomarqueurs du métabolisme énergétique (protéines, triglycérides, cholestérol et ETS) sont maintenues dans les 4 typologies, mais moins fortement que pour *D. polymorpha*.

Pour la typologie 1 (organismes non stressés *in situ*, Figure 52a), tous les biomarqueurs sont mis en relation. La TAC est corrélée négativement aux LOOH : quand les capacités antioxydantes augmentent, les dommages cellulaires sont réduits. La GST est reliée positivement à l'ETS.

Pour la typologie 2 (organismes stressés *in situ*, Figure 52b), les relations entre biomarqueurs de défense disparaissent ; seuls certains (ACP, GST et TAC) sont ponctuellement reliés à la quantité de protéines.

Pour la typologie 3 (organismes témoins en laboratoire, Figure 52c), on remarque que l'ETS n'est plus corrélée aux indicateurs énergétiques, et que la TAC est corrélée avec la LDH.

Pour la typologie 4 (organismes stressés en laboratoire, Figure 52d), on retrouve un groupement des marqueurs énergétiques, associés cette fois ci aux LOOH. La TAC et la LDH sont de nouveau fortement corrélées positivement.

Pour les typologies 2 et 3, la puissance des relations entre les biomarqueurs est réduite (traits moins épais).

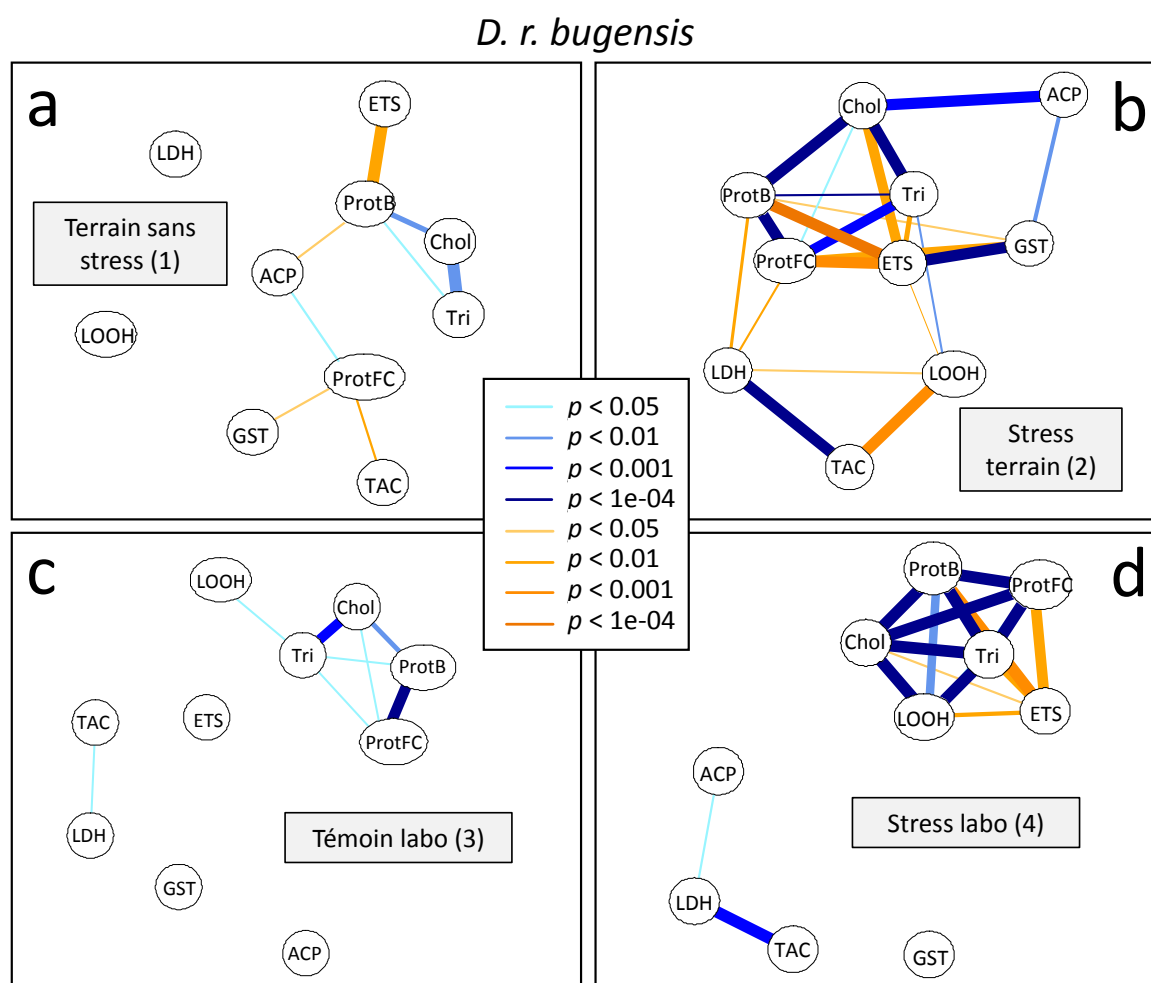


Figure 52 : Corrélations entre les réponses des biomarqueurs pour les individus de *D. r. bugensis* non-stressés sur le terrain (a), stressés sur le terrain (b), témoins en laboratoire (c) et stressés en laboratoire (d). La couleur et l'épaisseur des traits témoignent d'une corrélation plus ou moins forte entre 2 biomarqueurs (CF p-valeurs). Les tons bleus indiquent une corrélation positive, les tons oranges une corrélation négative

3. Conclusion sur les relations entre biomarqueurs

En définitive chez *D. polymorpha*, la TAC, la LOOH et l'ACP n'entrent pas en relation avec les autres biomarqueurs mesurés ici, mais peuvent toutefois jouer un rôle dans la réponse des organismes aux stressseurs. La GST et la LDH semblent jouer un rôle en présence de conditions stressantes, et les marqueurs énergétiques sont souvent reliés. Les corrélations observées de façon récurrente chez *D.*

polymorpha pourraient donc traduire une activation du métabolisme des sucres (LDH) et de production d'énergie (ETS), résultant en une diminution des réserves énergétiques (protéines, triglycérides, cholestérol) et une allocation énergétique des organismes dans les systèmes de défense (GST et TAC).

Chez *D. r. bugensis*, les LOOH sont généralement corrélés aux marqueurs énergétiques. La TAC et la LDH sont aussi corrélées positivement, sauf pour la typologie 2. Toutefois pour cette espèce, il est encore plus difficile de dégager un patron de réponse et d'émettre des hypothèses sur les liens entre biomarqueurs, tellement les réseaux diffèrent d'une typologie à l'autre.

Ces réseaux de corrélations ne permettent pas d'établir un patron de réponse clair des biomarqueurs, ni d'identifier un mode d'action spécifique des stressseurs sur les biomarqueurs. Toutefois, ils soulignent la nécessité de prendre en compte plusieurs biomarqueurs pour comprendre la réponse des organismes. En effet, l'absence de patron commun à l'ensemble des typologies souligne (1) que la redondance entre biomarqueurs d'un même système (antioxydant par exemple) peut n'être vraie que dans des conditions d'exposition bien particulières et que par conséquent, (2) chaque biomarqueur pouvant être amené à répondre indépendamment des autres à un stress particulier, l'utilisation de batterie est une nécessité.

Partie III : Variabilité des biomarqueurs observée *in situ* et en conditions stressantes

Dans cette partie, nous avons souhaité représenter, sur la base de nos données, la variabilité des biomarqueurs que nous avons mesurés *in situ* et en conditions stressantes au laboratoire. Pour cela, nous avons là encore travaillé sur les populations de *D. polymorpha* et *D. r. bugensis* de Montigny – Canal de Jouy, pour lesquelles nous avons acquis le maximum de données *in situ* et en laboratoire. Pour les deux espèces prises indépendamment, nous avons représenté pour chaque biomarqueur la gamme de variation naturelle *in situ* (représentée ici en vert) au fil des différentes campagnes de prélèvement, ainsi que la gamme de variation observée en laboratoire (représentée ici en rouge) en conditions stressantes. Les intervalles de confiance associés à chaque mesure sont représentés à l'aide des aires en transparence.

Cette partie est purement exploratoire, et ne constitue pour le moment pas une gamme de référence extrapolable à l'ensemble des populations de dreissènes. Les conclusions relatives à chaque biomarqueur sont propres à cette partie, et ne reflètent pas forcément ce qui a été observé durant les autres expérimentations.

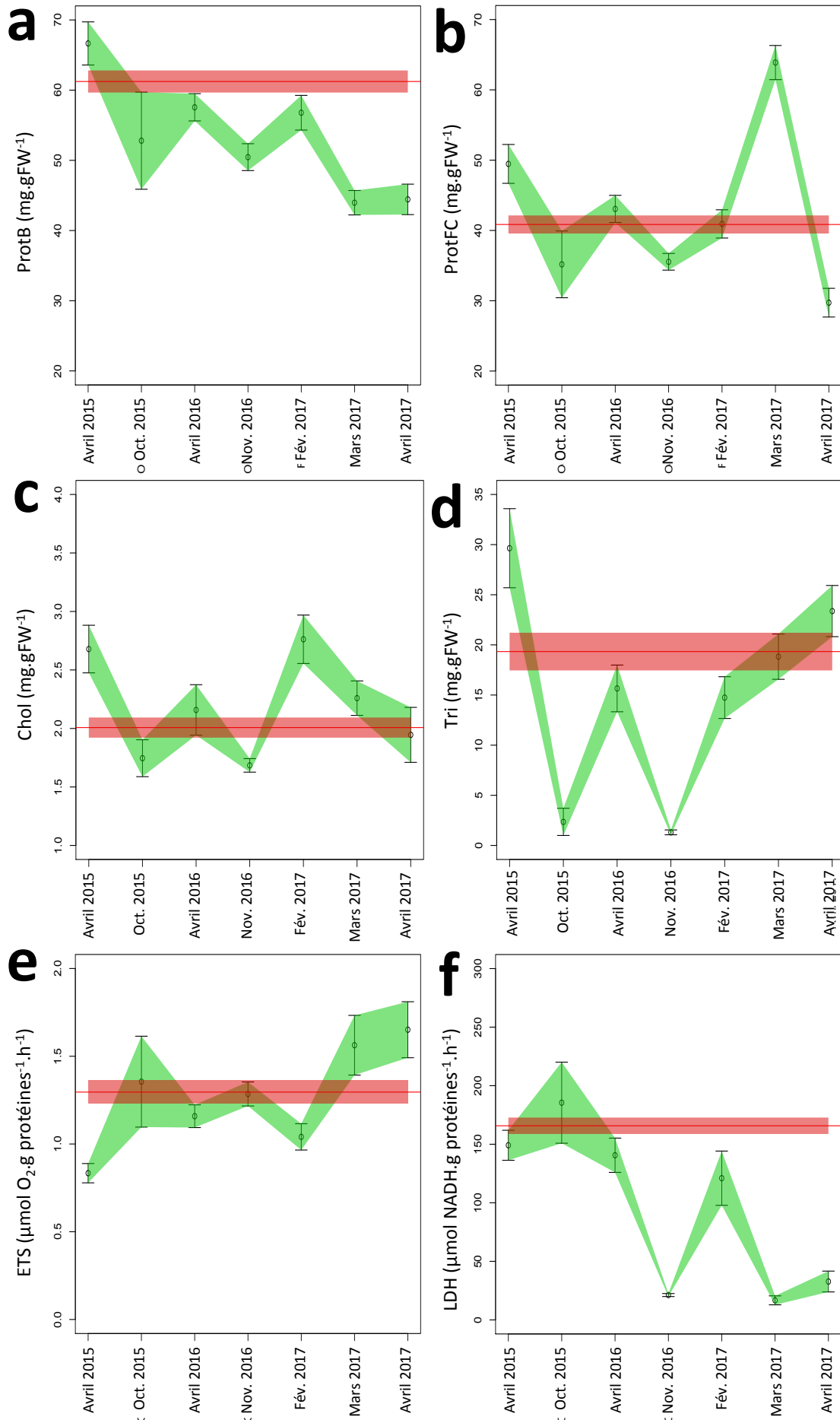
1. Variabilité des biomarqueurs chez *D. polymorpha*

Pour *D. polymorpha*, on peut voir que la variabilité des biomarqueurs énergétiques en laboratoire (protéines, triglycérides, cholestérol, ETS ; Figure 53a, b, c, d, e) recoupe la variabilité observée dans le milieu. Ces marqueurs ne semblent donc pas aptes à témoigner de l'apparition d'un stress supplémentaire, puisqu'ils prennent des valeurs similaires en conditions stressantes et en milieu naturel.

Pour les LOOH (Figure 53h), une concentration plus élevée est observée en laboratoire par rapport aux valeurs mesurées *in situ* ; une valeur supérieure à 40 $\mu\text{mol TBH.g protéines}^{-1}$ pourrait donc témoigner d'un stress oxydatif chez les individus. Toutefois, on peut voir que pour ce marqueur les intervalles de confiance sont beaucoup plus importants que pour les autres, soulignant une forte variabilité de réponse et la nécessité de considérer ce biomarqueur avec précaution.

L'ACP (Figure 53j) semble être un bon candidat, puisqu'il n'y a aucun recoupement entre les valeurs observées *in situ* et les valeurs mesurées en laboratoire en conditions de stress. Pour ce marqueur, une valeur inférieure à 50 $\mu\text{mol.g protéines}^{-1}.\text{h}^{-1}$ serait donc indicatrice d'un stress.

Les autres marqueurs (LDH, Figure 53f ; TAC, Figure 53g ; GST, Figure 53i) pourraient aussi constituer de bons indicateurs, si on occulte les trois premières dates d'échantillonnage (avril 2015, octobre 2015 et avril 2016). En effet, les mois d'avril et octobre correspondent respectivement au début et à la fin de la période de reproduction des organismes, les variabilités observées *in situ* et en laboratoire se recoupent, alors que ce n'est pas le cas aux autres dates de prélèvements. Ces biomarqueurs pourraient être utilisables en tant qu'indicateurs de stress, mais en dehors de cette période de reproduction.



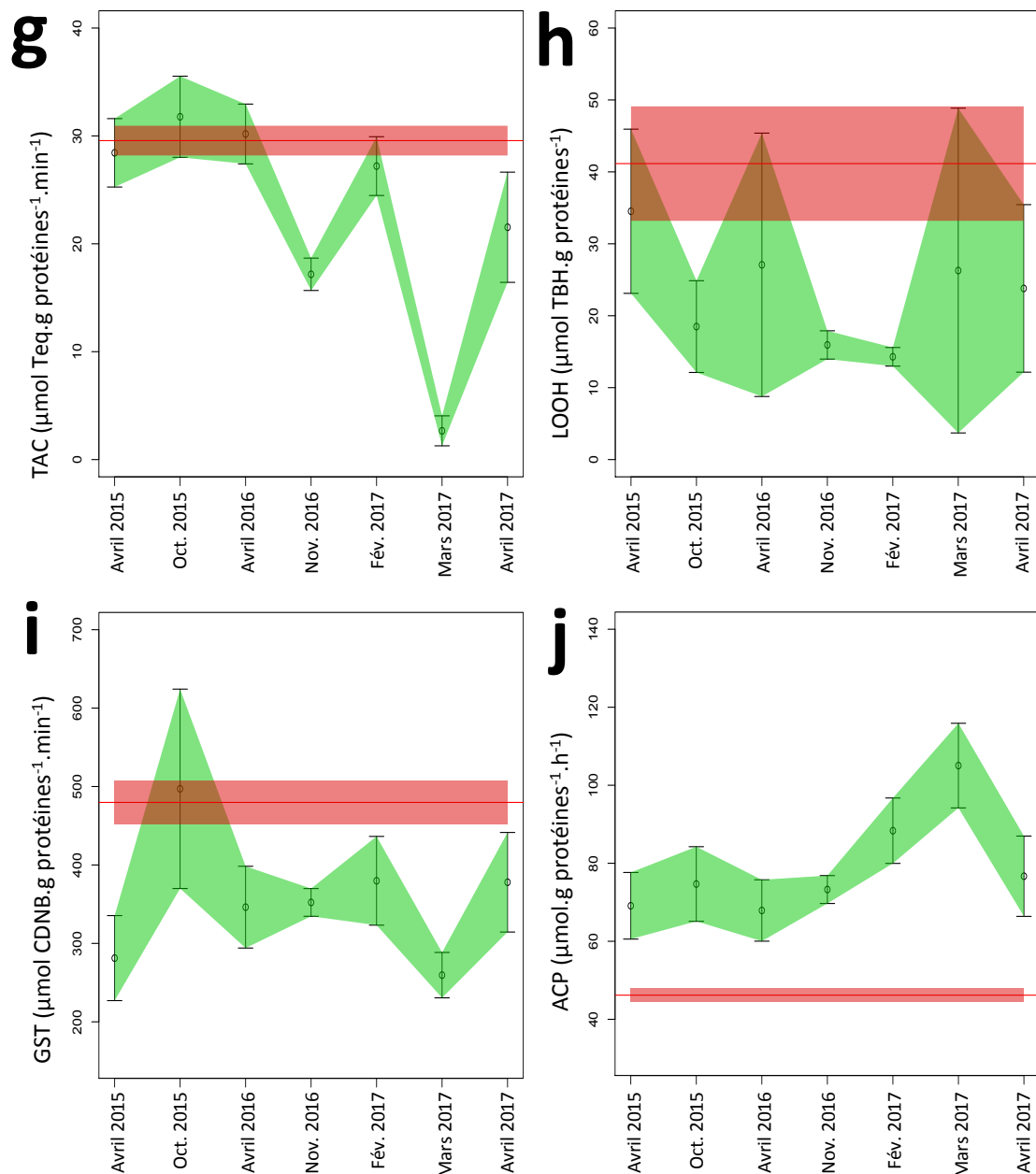


Figure 53 : Plots représentant la variabilité observable *in situ* lors des différentes campagnes de prélèvements (en vert) et la variabilité potentielle observée en laboratoire (en rouge) pour les différents biomarqueurs (protéines sur le broyat, a ; protéines sur la fraction cytosolique, b ; cholestérol, c ; triglycérides, d ; système de transport d'électrons, ETS, e ; lactate déshydrogénase, LDH, f ; capacité antioxydante totale, TAC, g ; hydroperoxydes lipidiques, LOOH, h ; glutathion-S-transférase, GST, i ; phosphatase acide, ACP, j) mesurés dans la population de *D. polymorpha* de Montigny – Canal de Jouy. Les points verts représentent la valeur moyenne du biomarqueur pour une campagne donnée ; l'intervalle de confiance associé à la mesure est représenté. La valeur moyenne du biomarqueur mesurée en laboratoire est symbolisée par le trait rouge, borné par son intervalle de confiance

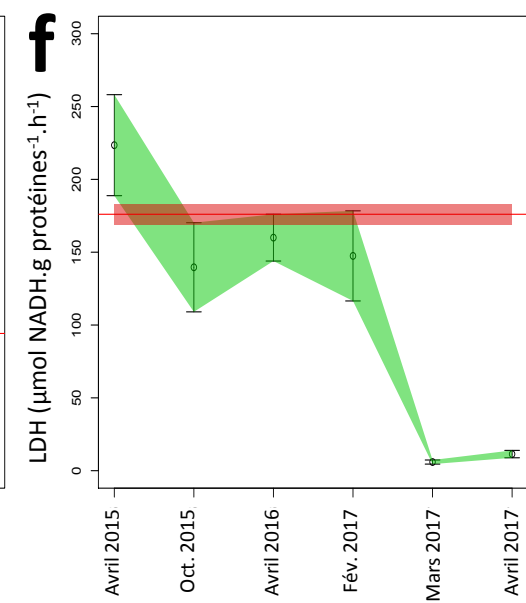
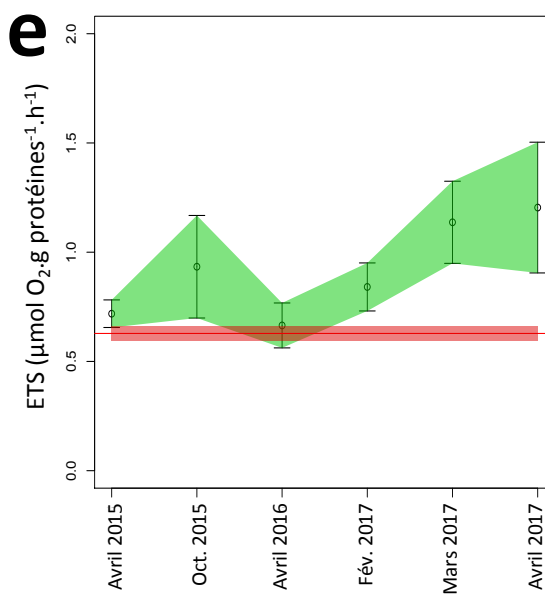
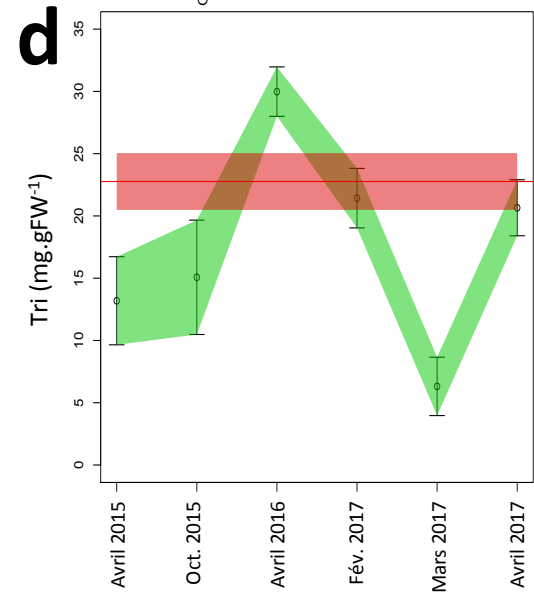
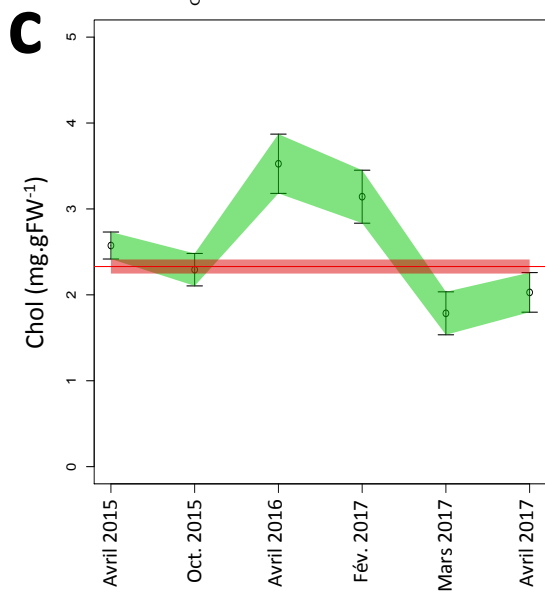
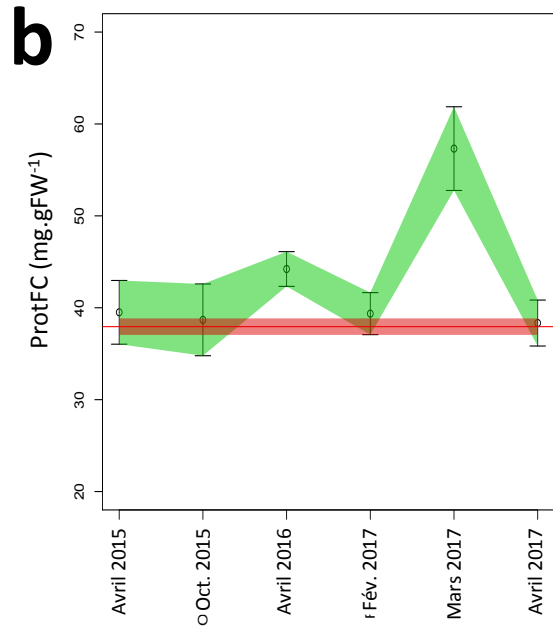
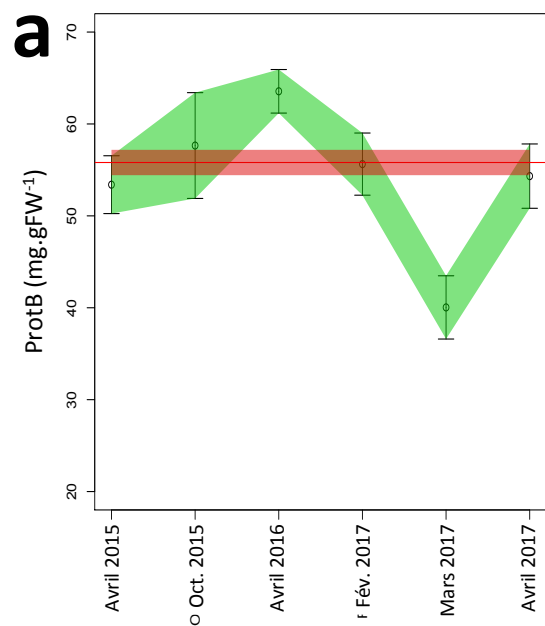
2. Variabilité des biomarqueurs chez *D. r. bugensis*

Pour *D. r. bugensis*, les protéines, triglycérides, cholestérol ne semblent pas non plus être de bons indicateurs (Figure 54a, b, c, d). L'ETS en revanche semble être plus affecté chez *D. r. bugensis* en conditions stressantes que chez *D. polymorpha*, et pourrait donc être un bon indicateur de stress chez cette espèce (Figure 54e).

Pour les LOOH (Figure 54h), même si là encore les intervalles de confiance sont importants, on observe une meilleure séparation entre la variabilité *in situ* du biomarqueur et sa variabilité en conditions stressantes. Ce biomarqueur pourrait donc être utilisé comme un indicateur de stress relativement fiable chez *D. r. bugensis*.

Comme pour *D. polymorpha*, les activités LDH (Figure 54f) et TAC (Figure 54g) doivent aussi être mises en regard de la saison ; des mesures entre avril et octobre seraient à proscrire, mais seraient pertinentes le reste de l'année. La GST (Figure 54i) en revanche ne semble pas être un bon indicateur de stress pour *D. r. bugensis*.

Ici aussi c'est finalement l'ACP (Figure 54j) qui présente les réponses les plus tranchées entre le terrain et le stress en laboratoire, et qui semble donc être le meilleur candidat.



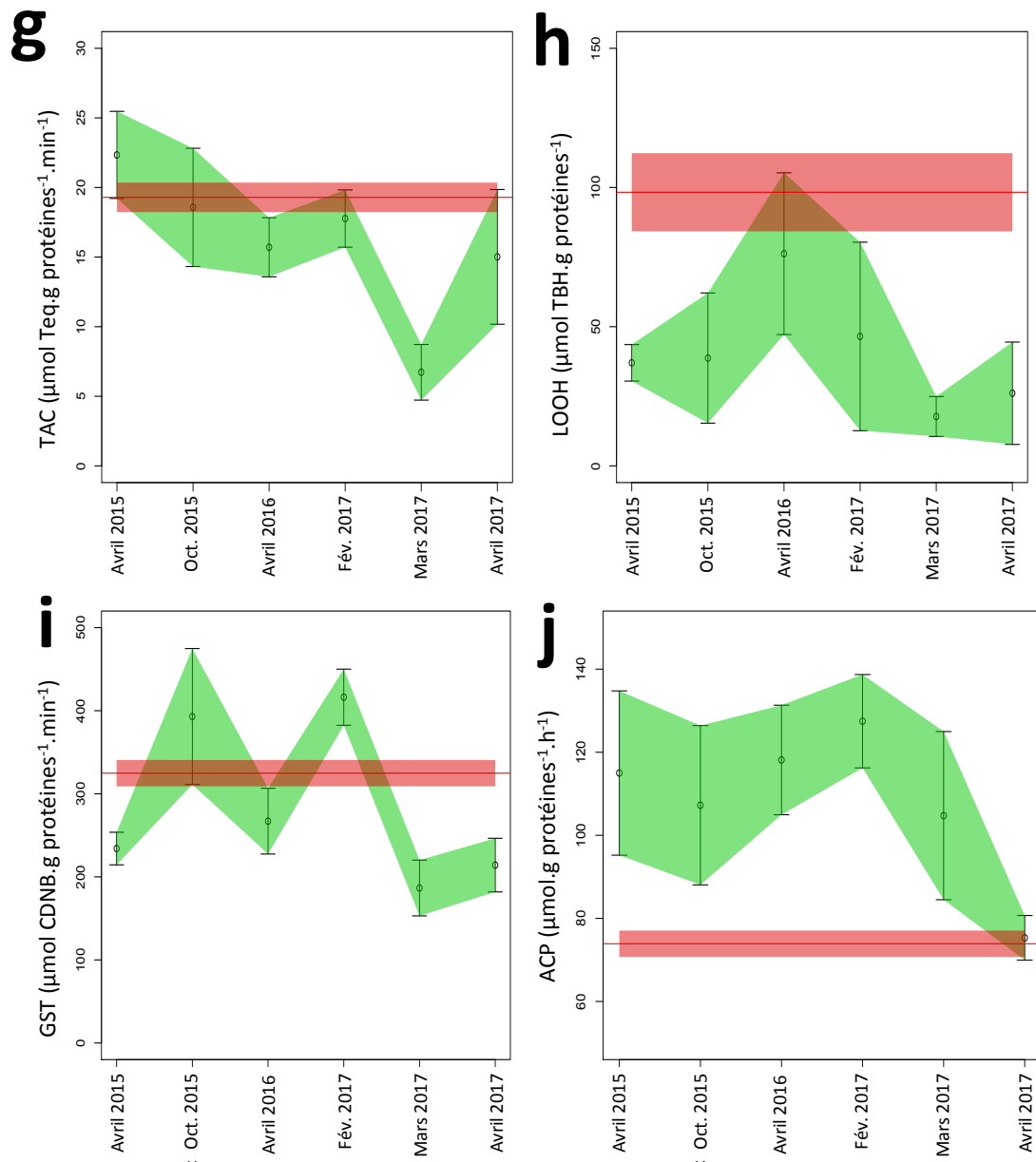


Figure 54 : Plots représentant la variabilité observable *in situ* lors des différentes campagnes de prélèvements (en vert) et la variabilité potentielle observée en laboratoire (en rouge) pour les différents biomarqueurs (protéines sur le broyat, a ; protéines sur la fraction cytosolique, b ; cholestérol, c ; triglycérides, d ; système de transport d'électrons, ETS, e ; lactate déshydrogénase, LDH, f ; capacité antioxydante totale, TAC, g ; hydroperoxydes lipidiques, LOOH, h ; glutathion-S-transférase, GST, i ; phosphatase acide, ACP, j) mesurés dans la population de *D. r. bugensis* de Montigny – Canal de Jouy. Les points verts représentent la valeur moyenne du biomarqueur pour une campagne donnée ; l'intervalle de confiance associé à la mesure est représenté. La valeur moyenne du biomarqueur mesurée en laboratoire est symbolisée par le trait rouge, borné par son intervalle de confiance

On prendra soin de rappeler que ces résultats sont uniquement ceux des populations de Montigny – Canal de Jouy, et que des profils de réponses différents seraient certainement observés si on considérait d'autres populations.

Bien que certaines tendances, observées lors des autres expérimentations soient retrouvées ici, un suivi mensuel apporterait certainement plus de robustesse à ce type de représentation graphique.

Partie IV : Discussion autour de l'exploration des données

Nous avons vu ici que lorsqu'on considérait la réponse globale des organismes, en intégrant simultanément tous les biomarqueurs, il était difficile de distinguer un patron net entre les réponses naturelles des organismes dans leur milieu et leurs réponses en cas de stress. Il semble toutefois que ce soit possible pour certaines populations, qu'il serait nécessaire de caractériser.

Nous avons vu également que les relations entre biomarqueurs changeaient lorsque l'intensité du stress croissait, sans pour autant réussir à identifier un patron de réponse clair. C'est vrai pour la batterie de biomarqueurs que nous avons sélectionnés ici, mais le remplacement ou l'ajout de certains marqueurs pourraient peut-être améliorer ces liens entre réponses biologiques.

Certains biomarqueurs pris individuellement présentent malgré tout un bon potentiel en tant qu'indicateurs de stress : l'ACP principalement, la LDH et la TAC si elles sont mesurées hors période de reproduction, la GST pour *D. polymorpha*, et l'ETS et LOOH pour *D. r. bugensis*. Ce sont d'ailleurs généralement ces marqueurs qui s'expriment lors des différentes expérimentations réalisées.

La biosurveillance à l'aide de paramètres écologiques (abondance, densité, biodiversité) permet de caractériser l'état des écosystèmes impactés mais manque de capacités prédictives (Martinez-Haro et al., 2015). Depuis leur description dans les années 90, les biomarqueurs, qui permettent d'identifier les stressseurs avant que des changements aux niveaux supérieurs n'apparaissent, gagnent en crédibilité et leur utilisation est de plus en plus recommandée (Besse et al., 2012 ; Wernersson et al., 2015). En focalisant sur des niveaux plus bas, à l'aide d'approches multibiomarqueurs au niveau sub-individuel, on peut caractériser la nature des stress (oxydatif, immunologique, cytotoxique...) à des concentrations sublétales, et évaluer la contamination chimique de façon anticipée, avant que les communautés ne soient affectées (Hanson, 2011). Toutefois, il est difficile d'attribuer à une réponse cellulaire une valeur écologique et ils sont constamment remis en question pour leur manque de pertinence. Leur application est pour le moment beaucoup plus développée en milieu marin que continental, où elle a permis de développer des outils opérationnels pour le suivi des milieux présentés ci-après (Burgeot et al., 2017 ; Vethaak et al., 2017).

L'influence de facteurs confondants sur les biomarqueurs, qui complique l'interprétation des résultats et limite leur efficacité, doit être prise en compte. Une des méthodes possible passe par l'utilisation d'analyses statistiques permettant de standardiser l'influence des facteurs confondants et de développer des modèles prédictifs pour définir un niveau de base représentatif de conditions de référence (Artigas et al., 2012). L'OSPAR (Convention pour la protection du milieu marin de l'Atlantique Nord Est) et l'ICES (International Council for the Exploration of the Sea, ou CIEM en français) ont proposé une méthode pour établir ces gammes de référence, *via* l'établissement de critères d'évaluation appelés BAC (Background Assessment Concentration) et EAC (Environmental Assessment Criteria) pour définir la qualité de l'environnement marin (OSPAR, 2009). Cette méthode fonctionne en définissant la

plage de valeurs attendues dans un site de référence en tant que BAC³⁰ et les valeurs en dehors de cette plage en tant que EAC³¹. Pour établir avec succès le BAC et l'EAC, il est recommandé de recueillir des organismes sur un site de référence pendant au moins deux cycles saisonniers afin d'établir l'influence des facteurs de confusion chimiques et physiques lors de la mesure des biomarqueurs et de faciliter l'identification des sites pollués (OSPAR, 2009). Pour établir avec succès ces niveaux de base, il est également nécessaire de caractériser les différences maximales entre sites (Hanson, 2011) et de sélectionner des espèces sentinelles reconnues, l'idée étant de fournir un modèle permettant d'établir un niveau de base pour le biomarqueur sélectionné en prenant en compte l'influence de facteurs confondants (Barrick et al., 2016).

Dans notre cas, les graphes présentés en Partie III de ce chapitre constituent une première base de réflexion à partir des données que nous avons acquises. Pour rendre cette approche pertinente, il faudrait appliquer les critères établis pour les BAC et les EAC cités précédemment en augmentant considérablement le nombre de sites échantillonnés et en réalisant des suivis mensuels. Cette démarche d'observation, menée sur le long terme, fait encore cruellement défaut dans les milieux d'eau douce.

Pour implémenter les biomarqueurs dans les campagnes de biosurveillance, il est aussi nécessaire de définir quantitativement des seuils de variation naturelle. Certains biomarqueurs, sont très variables et très dépendants des facteurs externes, et leur implémentation ne sera peut-être possible qu'à l'échelle locale plutôt qu'à l'échelle continentale voir planétaire. Les approches par biomarqueur sont généralement concentrées sur la standardisation et le contrôle de la variabilité, en sélectionnant des organismes de même taille ou de même génotype, afin d'avoir des données comparables entre sites (Durou et al., 2007). Cette approche restreinte à un sous-ensemble de la population peut ne pas refléter l'ensemble des réponses possibles au sein de la population globale (Calow, 1996 ; Devin et al., 2014b). Il est donc nécessaire d'adapter les campagnes d'échantillonnage, afin d'appréhender cette variation et de créer des gammes de référence écologiquement pertinentes (Handy et al., 2003). Il faut également identifier en amont les besoins et objectifs réels afin d'utiliser des méthodologies adaptées au questionnement. Ainsi, en caractérisant la gamme de variation d'un biomarqueur au sein d'une population, on peut déterminer un seuil au-delà duquel la population est considérée en danger (Adams et al., 2001) ; en utilisant de multiples sites de référence, on peut définir une gamme de variation attendue pour les sites propres, et identifier rapidement un site à risque qui sortirait de cette gamme dite de référence.

Certains biomarqueurs, appelés « core biomarkers », ont été sélectionnés pour leur pertinence et leur efficacité aussi bien en laboratoire qu'*in situ* chez différents types d'organismes en milieu marin. Pour les moules (*Mytilus sp.*), l'utilisation des métallothionéines, de la stabilité lysosomale et de l'histopathologie sont recommandées (Davies et Vethaak, 2012). Pour ces biomarqueurs, des BAC et

³⁰ BAC : estimés à partir de données issues de régions éloignées ; permettent d'évaluer si une concentration dépasse ou non un contexte naturel

³¹ EAC : dérivés de données toxicologiques et indiquant un effet subléthal

des EAC sont disponibles (Davies et Vethaak, 2012 ; OSPAR, 2009) et on connaît relativement bien l'influence des facteurs confondants sur leur réponse. Malgré cela, même si les effets de certains contaminants à travers les différents niveaux d'organisation biologiques sont connus (grâce au développement de l'AOP ou Adverse Outcome Pathway, Ankley et al., 2010), les valeurs quantitatives sont rares et les EAC ne fournissent des valeurs que pour un nombre restreint d'espèces et de contaminants. De plus, elles ne constituent pas de limites légales contrairement aux NQE.

Dans ces travaux, nous avons sélectionné une batterie de biomarqueurs, dont certains sont recommandés pour la biosurveillance chez les mollusques en milieu marin, mais qui ne sont pas encore reconnus comme des « core biomarkers ». Pour les HAP et PCB, l'utilisation des activités MXR et GST est évoquée ; pour les métaux, il faudrait se tourner vers des marqueurs de stress oxydant comme par exemple la TAC, la GPx et la catalase (OSPAR, 2013). Les marqueurs du métabolisme énergétique pourraient aussi être envisagés, dans la mesure où ils sont pertinents à l'échelle de l'organisme et permettent de présupposer des effets au niveau populationnel (Barrick et al., 2016 ; Durou et al., 2007). La méthode de mesure automatisée d'une batterie de biomarqueurs que nous avons utilisée ici permettrait de mesurer toutes ces réponses pour chaque individu.

Pour évaluer l'état de santé d'un écosystème, il est indispensable de comprendre ce que signifie une modification de la valeur d'un biomarqueur. Une modification de cette valeur est indicatrice d'un stress pour l'organisme, mais en terme de biosurveillance, il est indispensable de comprendre la nature et l'intensité de ce stress, la façon dont les individus sont affectés (mise en place de mécanismes de défense, dommages), et les impacts au niveaux supérieurs. Dans le cadre de l'utilisation des biomarqueurs pour la biosurveillance des eaux douces, il semble nécessaire d'améliorer la détermination des EAC et de développer les AOP.

Chapitre 5 : Etude approfondie des données acquises

A RETENIR

- Il faut un minimum de 8 individus pour rendre compte de la réponse moyenne de la population
- Selon le site considéré, les réponses des organismes sur le terrain et exposés en laboratoire peuvent être similaires (Saint Mihiel), ou différentes (Montigny). Si l'on considère tous les sites simultanément, la distinction entre réponses sur le terrain et réponses en laboratoire n'est pas possible
- Pour le site le plus documenté (Montigny) le passage en laboratoire semble être un facteur déterminant dans la réponse des organismes, pouvant masquer l'effet d'une exposition à des stressseurs de faible intensité.
- La proportion d'individus stressés sur le terrain, relativement aux non-stressés, est beaucoup plus importante pour *D. r. bugensis* (66%) que pour *D. polymorpha* (22%)
- L'effet saisonnier est encore mis en évidence, puisqu'une population donnée peut être considérée comme stressée ou non *in situ* selon la saison
- Pour les deux espèces, la TAC et la LDH semblent jouer un rôle dans la réponse au stress
- Les réseaux de corrélation ne montrent pas de patron de réponse clair des biomarqueurs lorsqu'on passe d'une situation non-stressante à une situation stressante
- Ils ne permettent pas non plus de mettre en évidence un mode d'action spécifique des stressseurs sur les biomarqueurs
- L'absence de patron commun à toutes les typologies souligne (1) que la redondance entre biomarqueurs d'un même système (antioxydant par exemple) peut n'être vraie que dans des conditions d'exposition bien particulières et que par conséquent (2) chaque biomarqueur pouvant être amené à répondre indépendamment des autres à un stress particulier, l'utilisation d'une batterie est une nécessité

Chapitre 6 : Discussion générale

Pour rappel, l'objectif de cette thèse était d'identifier les rôles relatifs des paramètres physico-chimiques des milieux aquatiques, des pressions anthropiques et des caractéristiques des populations sur les réponses des biomarqueurs des deux espèces, *D. polymorpha* et *D. r. bugensis*. Le but était d'évaluer leur potentiel à constituer des modèles en biosurveillance des milieux d'eau douce, en cherchant notamment à comprendre la signification des biomarqueurs en termes de sensibilité et de vulnérabilité des populations. Pour cela, une batterie de biomarqueurs représentatifs de grandes fonctions physiologiques, comme le métabolisme énergétique et les défenses antitoxiques et antioxydantes, a été suivie chez ces organismes. Des approches de surveillance passive *in situ* ont été menées afin d'évaluer les réponses des organismes dans leur environnement naturel, tout en intégrant un certain nombre de facteurs de variabilité (variabilité journalière, variabilité saisonnière, variabilité inter-spécifique, inter-populationnelle, intra-populationnelle). Des expérimentations en laboratoire ont permis d'approfondir les connaissances concernant les capacités de tolérance, et la modulation des réponses biologiques en conditions de stress contrôlé chez ces espèces.

La première partie de ce chapitre reviendra sur les nombreux facteurs de variabilité mis en évidence au cours de ces travaux, et sur l'importance de la prise en compte de ceux-ci dans l'utilisation des biomarqueurs. Dans un second temps, nous verrons si les capacités de modulations des réponses biologiques par les organismes sont aptes à refléter d'éventuels phénomènes d'acclimatation et/ou d'adaptation. Nous reviendrons également sur l'importance des capacités de tolérance des organismes dans l'interprétation de la réponse des biomarqueurs. Une dernière partie, plus appliquée, reprendra les capacités des biomarqueurs à refléter la qualité des sites et à être intégrés dans les programmes de biosurveillance des écosystèmes dulçaquicoles.

Partie I : Que faire de la variabilité naturelle des biomarqueurs ?

Comme nous avons pu le voir à travers les différents chapitres, les réponses des biomarqueurs (prises dans leur globalité, sous formes d'ACP ou de PLSDA) présentent une forte variabilité spatio-temporelle.

Un des facteurs de variabilité les plus importants que nous avons pu observer est lié à la saison. En effet, il a été constaté une variation des réponses en fonction de la saison chez plusieurs populations de *D. polymorpha* (p139 ; p249). Chez *D. r. bugensis* (p141 ; p249), l'influence de la saison existe aussi, même si elle reste moins marquée.

Outre les flux de contaminants, qui peuvent eux-mêmes être soumis à des variations saisonnières en lien avec le caractère saisonnier de certaines activités anthropiques, les variations saisonnières des réponses biologiques s'expliquent en partie par les fluctuations des facteurs environnementaux (e.g. température, salinité, oxygénation), ou encore des facteurs biotiques en lien avec la physiologie (taille, poids, sexe, statut reproducteur, statut énergétique) et l'écologie des organismes (parasitisme, prédation, compétition ; la prévalence parasitaire chez *D. polymorpha* suit par exemple une dynamique saisonnière (Minguez et Giambérini, 2012), tout comme la compétition intra-spécifique pour la nourriture qui est plus importante durant la période de fixation des larves (Wacker et Von Elert, 2008)). L'influence de ces variations naturelles sur les biomarqueurs est assez bien documentée chez *D. polymorpha*, moins chez *D. r. bugensis* pour laquelle les réponses biochimiques sont peu étudiées.

Concernant les facteurs environnementaux, il a été montré que le symptôme de stress oxydatif est plus important au printemps qu'en été chez *D. polymorpha* et que l'activité des défenses antioxydantes est en lien avec la minéralisation (Mg, Ca), la concentration en oxygène et le pH du milieu (Wojtal-Frankiewicz et al., 2017). Au-delà du stress oxydatif, à l'heure actuelle, une seule étude a été réalisée *in situ* sur les deux espèces de dreissènes et met en évidence des activités plus élevées en octobre qu'en juin pour les métallothionéines, le cytochrome P450, la vitellogénine ainsi que des dommages aux membranes cellulaires et à l'ADN (Farkas et al., 2017). Dans notre cas, il semble que les biomarqueurs énergétiques et de défense (TAC, LDH, GST, ETS) soient également plus actifs en octobre par rapport aux autres dates de prélèvement, et ce pour les deux espèces. Outre les biomarqueurs au niveau cellulaire, ces paramètres environnementaux peuvent influencer plus globalement la physiologie des organismes. Des variations saisonnières ont ainsi été observées pour la byssogénèse (Grutters et al., 2012) et le taux de filtration (Marescaux et al., 2016) chez les deux espèces. L'influence de la profondeur et de la saison sur l'indice de condition, le nombre de véligères et la densité d'individus au m² a aussi été rapportée chez *D. r. bugensis* (Glyshaw et al., 2015). Chez *D. polymorpha*, l'activité MXR varie également en lien avec les fluctuations saisonnières de température, et présente une activité plus élevée

de juin à octobre (et elle dépend également des charges en contaminants organiques du milieu ; Pain et al., 2007).

La température et la quantité de nourriture jouent un rôle très important dans le métabolisme des organismes ectothermes. Comme montré dans la publication n°3 (p197), une augmentation de la température (en été, ce qui lance la période de reproduction) entraîne généralement une augmentation de la demande métabolique : lorsqu'il y a peu de nourriture (en hiver et au printemps), les dreissènes auront moins d'énergie à allouer à leurs mécanismes de défense. Cela a déjà été montré chez d'autres espèces de bivalves (Leiniö et Lehtonen, 2005).

Les variations saisonnières des réponses des biomarqueurs sont aussi étroitement liées aux facteurs biotiques, et notamment au cycle reproducteur. Faria et al. (2014) ont par exemple montré que le statut reproducteur dans différentes populations de *D. polymorpha* était fortement corrélé aux réponses de certains biomarqueurs (SOD, Cat, GSH, GST, MXR, LDH, peroxydation lipidique, cassures à l'ADN). Guerlet et al. (2007) ont aussi montré la saisonnalité des réponses biologiques chez *D. polymorpha*, en lien avec le cycle reproducteur, avec une augmentation de la teneur en lipides et de l'activité de filtration en période de reproduction, lorsque la température augmente. A un niveau d'organisation inférieur, l'évolution au fil des saisons du statut reproducteur des organismes entraîne aussi une modification du transcriptome chez *D. polymorpha* (Navarro et al., 2013).

Le poids et la taille des organismes peuvent aussi influencer leurs réponses ; c'est le cas par exemple de l'AChE chez *Gammarus fossarum* (Xuereb et al., 2009). Kerambrun et al. (2016) ont aussi montré une variation saisonnière de la taille des moules, et une corrélation entre la taille et l'indice de condition des organismes et l'expression de certains gènes (Cat et GPx). Les organismes subissent donc de fortes modifications métaboliques selon les saisons, en lien avec leur statut reproducteur. Les variations observées sont aussi liées à des modifications de la biodisponibilité et de la spéciation des contaminants, qui peuvent varier avec la température ou les précipitations pluvieuses, et aussi à des variations du métabolisme des organismes (Bodin et al., 2004 ; Kefi et al., 2016 ; Waeles et al., 2005).

Ces différentes études indiquent que les variations des biomarqueurs sont plus importantes au printemps et en été, avec une influence très importante de la température, du cycle reproducteur et de la disponibilité en nourriture. Même si l'été ne semble pas être la période la plus propice, il faudra envisager d'ajouter cette saison dans la poursuite des travaux pour mieux intégrer les modifications physiologiques que subissent les organismes à cette période.

La variabilité naturelle des biomarqueurs représente un des freins à leur utilisation en biosurveillance. En effet, le challenge consistant à identifier la variation liée à un stress toxique dans un ensemble de réponses naturellement fluctuantes reste à l'heure actuelle difficile à appréhender (Hanson et al., 2010). Plusieurs méthodes existent néanmoins, et cherchent à prendre en compte l'influence des facteurs environnementaux dans l'interprétation des biomarqueurs.

La biosurveillance active permet par exemple de limiter l'influence des facteurs biotiques intrinsèques : transplanter des individus d'une population source sur différents sites d'étude permet de standardiser les individus (sexe, taille, poids, statut reproducteur homogènes), de s'affranchir des phénomènes d'adaptation locale (puisque'une seule et même population est utilisée), de contrôler la durée d'exposition des organismes. Toutefois, la mise en place de ce type d'approche est généralement plus complexe que l'approche passive et peut manquer de pertinence, dans la mesure où il n'y a pas de parallèle possible entre les réponses d'organismes transposés et celles d'organismes autochtones adaptés à leur environnement (Khan et al., 2011). L'utilisation de cette approche active n'est de plus pas envisageable de manière systématique pour les espèces invasives comme les dreissènes, dans la mesure où il est inconcevable de les introduire dans un milieu où elles ne sont pas déjà présentes. Dans ce cas, l'approche active doit se limiter aux milieux déjà colonisés.

Pour intégrer les facteurs environnementaux, il est possible d'utiliser une approche amont-aval, qui fait l'hypothèse que les stations d'une portion de cours d'eau sont similaires en termes de paramètres physico-chimiques et diffèrent uniquement selon leur niveau de contamination. Mais en pratique, (1) les paramètres physico-chimiques peuvent changer drastiquement d'un point d'échantillonnage à l'autre de manière naturelle (Smolders et al., 2004a) ou lorsque le rejet lui-même modifie les caractéristiques physico-chimiques, (2) ce type d'approche permet une biosurveillance ciblée, généralement réservée au suivi de l'impact d'une installation anthropique (zone agricole, agglomération, installation industrielle...) (Hanson, 2011) et (3) les mécanismes adaptatifs peuvent intervenir même à ces petites échelles, si le rejet exerce une pression de sélection suffisante.

D'aucun préconisent alors de définir des gammes de valeurs de référence qui prennent en compte cette variabilité spatio-temporelle (Hagger et al., 2008; Hanson et al., 2010) en faisant un suivi de plusieurs populations de référence à différentes saisons. Mais ces gammes sont généralement très variables (à cause de la grande variabilité des réponses des organismes), ce qui augmente le risque de faux négatifs (risque de ne pas détecter un impact alors qu'il y en a un). La stabilisation d'une gamme de référence nécessite d'intégrer un grand nombre de sites et de tenir compte de l'évolution constante des milieux en les actualisant régulièrement (e.g. réchauffement climatique, polluants émergents). De plus, pourquoi ne considérer que des populations de référence ? Nos travaux soulignent les différences de tolérance entre populations, et les différences qui peuvent exister en termes de réponses biochimiques d'une population à l'autre. Ignorer sciemment l'existence de populations plus tolérantes lors de l'établissement de ces gammes conduirait également à un biais.

A l'inverse de la variabilité saisonnière, aucune variabilité journalière dans la réponse des biomarqueurs n'a pu être mise en évidence chez les deux espèces (publication n°1, p143). Toutefois, cette expérimentation a été réalisée à la fin de l'automne, saison durant laquelle les variations de réponses sont moindres. A cette saison, les processus physiologiques des organismes sont ralentis, plus stables et moins dépendant des facteurs externes. La littérature est très pauvre concernant l'impact du

cycle circadien sur les réponses des biomarqueurs chez les organismes aquatiques. Pour les dreissènes, les seules variations journalières connues sont celles de l'activité valvaire chez *D. polymorpha* (Borcherding, 1992). Pour ce qui est des biomarqueurs sub-cellulaires, il semblerait que l'heure de prélèvement importe peu à cette période, mais il faudrait reconduire cette expérience à d'autres saisons pour s'assurer que c'est bien le cas toute l'année et sur d'autres populations (les populations de Saint Mihiel sont par exemple prélevées dans une écluse et sont donc régulièrement soumises à l'émersion, au changement de température et d'exposition lumineuse). Nous avons aussi pu voir que les paramètres physico-chimiques du milieu, pris dans leur ensemble n'avaient qu'un rôle marginal sur les réponses des biomarqueurs (p167).

En revanche, à cette variabilité saisonnière s'ajoute une variabilité inter-annuelle, observée chez *D. polymorpha* et chez *D. r. bugensis* entre avril 2015 et avril 2016 (p139). Cette variabilité interannuelle a été montrée chez *Mytilus trossulus* pour certains biomarqueurs (Cat, EROD ; Kopecka et al., 2006). Alors que la saisonnalité est souvent prise en compte, cette problématique de l'inter-annualité est trop rarement intégrée et les suivis de biomarqueurs sur plusieurs années consécutives sont assez rares, spécialement en eau douce. Dans notre cas, la conductivité était très différente pour les mois d'avril 2015 et 2016, en comparaison avec les autres dates d'échantillonnage, avec de fortes crues sur l'ensemble du territoire à ces deux périodes qui ont considérablement réduit la conductivité (à titre d'exemple sur les sites Mosellans, Montigny – canal de Jouy, Montigny – canal de Metz et Jouy, elle est passée de 1.5 psu en temps normal à 0.5 psu). Or, il a été montré que les variations de salinité pouvaient influencer les réponses des biomarqueurs (Bertrand et al., 2017) ; en milieu hypo-osmotique, des modifications des concentrations en métallothionéines de la consommation d'oxygène et de la survie à l'émersion sont observées chez *Mytilus galloprovincialis* (Hamer, 2008). Les variations de température et de salinité peuvent être associées à une modification de la biodisponibilité des contaminants, couplée à une modification de l'activité des métallothionéines (Money et al., 2011). Fattorini et al. (2008) ont d'ailleurs mis en évidence des variations saisonnières, spatiales et inter-annuelles de la bioaccumulation des métaux chez *M. galloprovincialis*. Dans leurs travaux, la bioaccumulation de l'As a pu être reliée à la salinité. Chez *D. polymorpha*, la composition minérale (Mg, Ca) influence les défenses antioxydantes, et notamment l'activité de la catalase et la concentration en glutathion (Wojtal-Frankiewicz et al., 2017).

Outre les facteurs de variabilité déjà identifiés et que l'on sait déterminants, la plupart des analyses statistiques réalisées sur les résultats obtenus *in situ* mettent en évidence une grande part de variance résiduelle non expliquée. Cette part de variabilité inexpliquée est en général supérieure à 60%, et n'est liée ni à l'espèce, ni au site de prélèvement, ni à la saison.

Cette instabilité des réponses d'une saison à l'autre et d'une année à l'autre souligne le besoin :

- d'acquérir des données sur le long terme sur les populations d'intérêt afin d'identifier des modifications ponctuelles des réponses ou au contraire des tendances temporelles
- de collecter systématiquement les données relatives aux paramètres du milieu pour construire des grilles d'interprétation intégrant ces facteurs à l'instant t
- d'intégrer le maximum de sites pour définir un patron de réponse stable et établir un gradient des sites les uns par rapport aux autres.

Si on se base sur les campagnes que nous avons réalisées, le tableau Tableau XVII représente le coût que pourrait engendrer ce type de campagne à large échelle et sur le long terme. Si on imagine réaliser des suivis complets, sur 30 populations, tous les deux mois pendant 3 ans, on aboutit à un budget de 731 036 euros, qui n'inclue pas les salaires des personnes impliquées, uniquement les frais de fonctionnement. Ce budget est conséquent à l'échelle d'un seul laboratoire ou bureau d'étude, et souligne l'importance du travail en collaboration pour mutualiser les financements, les moyens humains et techniques, et rentabiliser au mieux les échantillonnages sur de larges échelles spatiales et temporelles. Ce budget initial est celui qui serait nécessaire pour développer et mettre au point l'outil, jusqu'à un stade opérationnel. Son déploiement en tant qu'indicateur serait nettement moins coûteux, dans la mesure où l'objectif est d'obtenir avec l'outil biomarqueur des informations sur la contamination du milieu, des organismes et sur le risque pour l'écosystème.

Tableau XVII: Estimation des frais de fonctionnement pour une campagne à large échelle (30 populations, à raison de 12 organismes par population), sur le long terme (3 ans, à raison d'un échantillonnage tous les 2 mois)

	15 sites, 1 campagne	30 sites, 18 campagnes
Bioaccumulation dans les organismes	3 800 €	136 800 €
Contamination sédimentaire	4 500 €	162 000 €
Frais d'essence	200 €	7 200 €
Hotel, restauration pour 2 personnes	1 100 €	39 600 €
Automate de mesure	65 000 €	65 000 €
Biomarqueurs (matériel, amortissement machine)	8 901 €	320 436 €
TOTAL	83 501 €	731 036 €

Partie II : Comment se comportent les deux espèces dans le milieu naturel et en réaction à un/des stress ?

Quand on s'intéresse plus en détail au comportement des deux espèces sélectionnées ici, le principal résultat mis en évidence est la très nette différence de réponses entre *D. polymorpha* et *D. r. bugensis* pour toutes les expérimentations réalisées. A la variabilité spatio-temporelle évoquée précédemment s'ajoute donc une variabilité inter-spécifique. Ces fortes différences inter-spécifiques sont visibles même lorsqu'on intègre simultanément plusieurs populations des deux espèces à différentes périodes d'échantillonnage (Figure 31, p159). Même si les patrons de réponses peuvent être communs dans certains cas, les niveaux de base diffèrent entre les deux espèces, tout comme leur façon de répondre à des stressés supplémentaires. Lors de toutes les expérimentations réalisées en laboratoire, on se rend compte que ce ne sont pas les mêmes biomarqueurs qui réagissent chez les deux espèces, chacune développant ses propres mécanismes homéostatiques pour faire face aux stressés.

Les différences inter-spécifiques, observées dans un premier temps *in situ*, sont maintenues lors des expositions en laboratoire, avec par exemple une tolérance au nickel plus importante pour les populations de *D. polymorpha* (publication n°4, p221), et une capacité pour cette espèce à activer ses défenses en présence de ce métal et à répondre graduellement aux stress (publication n°2, p183). *D. polymorpha* présente en effet un métabolisme cellulaire plus actif (ETS) qui lui permet d'activer ses défenses antioxydantes (TAC) (publication n°3, p197). Elle est aussi capable de maintenir ses processus apoptotiques en cas de stress sévère (publication n°4, p221). A l'inverse, les populations de *D. r. bugensis* sont moins tolérantes à une exposition aiguë au nickel, et ont des réponses plus convergentes et sont moins réactives en cas d'exposition à une faible concentration métallique. Les populations de *D. r. bugensis* présentent généralement des dommages cellulaires et une inhibition de l'ACP, bien qu'elles possèdent des réserves énergétiques plus importantes. Nous avons aussi pu remarquer une plus forte et significative hétérogénéité dans la tolérance au nickel entre populations de *D. polymorpha*, contrairement aux populations de *D. r. bugensis*. A la variabilité inter-spécifique s'ajoute donc une variabilité inter-populationnelle (ou variabilité spatiale) observée chez les deux espèces, et plus marquée en octobre qu'en février (p161). La diminution de la variabilité inter-populationnelle en février pour les deux espèces indique que cette saison ne serait pas idéale pour la mesure des biomarqueurs ; en effet, dans l'optique d'une approche comparative des réponses des biomarqueurs entre plusieurs populations, la discrimination des sites serait moins performante à cette période.

Cette variabilité entre populations d'une même espèce *in situ* a aussi été reportée pour *A. anatina* (Falfushynska et al., 2016). Il est admis que la variabilité des réponses des organismes peut résulter d'adaptations à une large gamme de stressés environnementaux (Lushchak, 2011), et que les populations habitant dans des zones polluées peuvent développer une tolérance à la pollution.

Falfushynska et al. (2013) ont par exemple montré que la réponse de *A. anatina* aux métaux dépendait de l'origine des moules, tout comme Milan et al. (2016) l'ont mis en évidence pour *Ruditapes philippinarum*, dans le lagon de Venise.

Tous ces éléments pourraient refléter l'invasion plus récente de *D. r. bugensis*, qui n'est pas encore sous pression de sélection ou subit une pression de sélection plus faible, et ne serait ainsi pas encore adaptée aux conditions environnementales locales (Imo et al., 2010 ; Therriault et al., 2005). En comparaison, les populations de *D. polymorpha* qui sont installées depuis plus longtemps présentent une forte différenciation génétique (Müller et al., 2002; Rajagopal et al., 2009) et ont certainement été sujettes à l'adaptation génétique³². La divergence entre populations de *D. polymorpha* a été mise en évidence à plusieurs reprises, que ce soit au niveau de la diversité génétique (Tarnowska et al., 2013), de l'expression de leurs gènes (Kerambrun et al., 2016) ou de leur profil protéomique et de l'expression de certains biomarqueurs sub-cellulaires (Pain-Devin et al., 2014). Une différenciation génétique est même possible pour des populations de *D. polymorpha* très proches géographiquement (750m, Thomas et al., 2014). Outre les liens entre variation des biomarqueurs et contamination, la composition génétique des populations doit être considérée comme un facteur confondant ou expliquant les réponses observées, qui détermine la réponse des populations à leur environnement. Les études de Pain-Devin et al. (2014) et Tarnowska et al. (2013) soulignent la nécessité de connaître de manière fine la physiologie et les capacités de tolérance des populations d'espèces sentinelles utilisées en monitoring, si l'on veut interpréter et prédire de manière fiable leurs réponses face à de nouveaux stress.

Dans la mesure où il n'y a pas d'étude récente sur la différenciation génétique entre populations de *D. r. bugensis*, ces éléments doivent être considérés comme des hypothèses.

Conjointement à cela, nous avons remarqué (p253) que la proportion d'individus stressés sur le terrain, relativement aux non-stressés, était beaucoup plus importante pour *D. r. bugensis* (66%) que pour *D. polymorpha* (22%). Cela est probablement lié à la qualité des milieux échantillonnés ici, qui comme nous l'avons vu, est généralement moins bonne sur les sites où vivent les populations de *D. r. bugensis*. Comme les populations de *D. r. bugensis* sont soumises à une contamination plus importante, on pourrait en théorie supposer que leur tolérance devrait être meilleure. En pratique, nous avons vu que ce n'était pas le cas, puisque ces populations de *D. r. bugensis* ont des biomarqueurs de défense peu actifs, et ne réagissent pas à la contamination en laboratoire par rapport à *D. polymorpha*, et ce même en situation de sympatrie. Cela est vrai pour le contaminant testé ici (Ni), mais peut être seraient-elles tolérantes à d'autres types de contaminants, organiques par exemple. Le fait que des populations vivant en milieu contaminé ne soient pas plus tolérantes a déjà été rapporté chez *A. anatina* (Falfushynska et al., 2016), indiquant que l'exposition préalable des organismes peut perturber les mécanismes de

³² Ces hypothèses sont valables pour l'ouest de l'Europe, mais certainement pas en Amérique où les deux espèces sont arrivées quasi simultanément

protection cellulaire, et les sensibiliser à d'autres stressseurs. Ces résultats semblent indiquer qu'*in situ*, les capacités d'acclimatation et de bioaccumulation de *D. r. bugensis* lui permettent de se maintenir, mais qu'une exposition à un stress plus intense la rend plus vulnérable que sa consœur.

Nous avons également pu voir qu'*in situ*, le patron de réponse était inversé entre les deux espèces par rapport aux conditions du milieu pour les populations de Montigny, Oise et Saint Mihiel. Généralement, les populations de *D. polymorpha* avaient des activités TAC, GST, ETS plus élevées que les populations de *D. r. bugensis* qui présentaient des concentrations en Tri et LOOH plus importantes, avec la LDH structurant les différences entre populations. Cependant, ce patron inversé n'est pas vrai lorsque l'on considère d'autres populations des deux espèces (chaque espèce reste dans sa gamme, mais les patrons de réponse par rapport au milieu sont similaires ; p159).

Les stress multiples peuvent rétrécir la gamme de tolérance des organismes aux contaminants ou aux facteurs environnementaux (Heugens, 2003). Deux théories existent quant à l'effet d'un stress sur un organisme déjà stressé : soit l'organisme ne peut pas faire face à plus de stress et sa réponse au stress supplémentaire est amplifiée ; soit l'organisme est déjà adapté au stress et sa réponse au second stress est diminuée. La réponse à un stress additionnel dépendra de l'état initial, qui peut être différent entre espèces et entre populations (Thrush et al., 2008). Stark et al. (2004) ont mis en évidence qu'un même niveau du facteur de stress avait un impact différent sur la réponse de plusieurs espèces qui présentaient des stratégies d'histoire de vie différente. Ces différences d'histoire de vie sont aussi valables entre populations. Chaque espèce et chaque population présente des traits d'histoire de vie adaptés à son environnement (Colas et al., 2014), et dépendants des facteurs génétiques. Différentes populations présenteront donc différents traits, et donc différentes réponses face à un stress toxique.

La Figure 55 illustre ce phénomène. Si on considère 3 populations A, B et C ayant chacune des capacités de tolérance différentes (différents types d'adaptation), la réponse au stress ne sera pas la même. Dans les populations A, B et C, pour une même intensité relative du stress (x) la réponse sera différente : la population B sera dépassée, la population A sera au maximum de sa réponse, alors que la population C sera encore dans sa phase d'induction. Ces trois populations ont des gammes de tolérance différentes, et la population B présente la gamme de tolérance la plus restreinte pour le stress considéré ici, mais pourrait être plus tolérante que les populations A et C si un autre stressseur était considéré.

En revanche il est plus difficile de dire qui de A ou de C est la plus tolérante ici. En effet, bien que la population C tolère une plus large intensité de stress, l'amplitude de sa réponse est plus limitée que celle de la population A. Dans la mesure où A et C ont une réponse maximale différente, on peut se demander comment ces deux populations réagiraient à un stress supplémentaire, et revenir aux deux théories évoquées précédemment, à savoir l'amplification ou la diminution de la réponse.

Les populations B et C présentent une même induction maximale (y), mais pour des niveaux de stress différents. Pour cette même réponse (y), la population A peut être soit être dans sa zone

d'induction (si l'intensité du stress est faible), soit dans sa zone de déclin (si le stress est plus fort) ; c'est le phénomène de réponse biphasique évoqué dans la synthèse bibliographique.

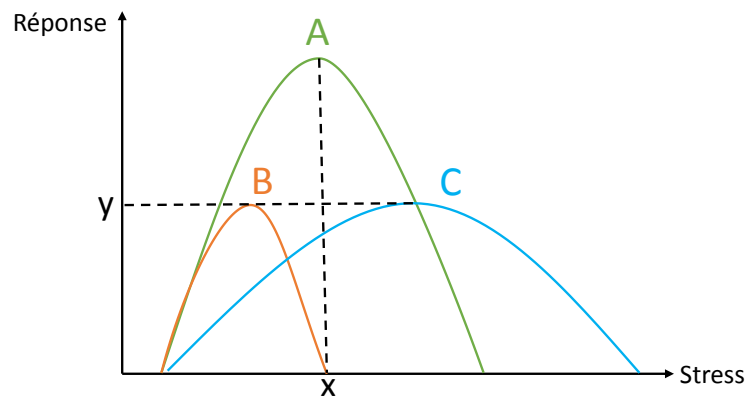


Figure 55 : Réponses de 3 populations de bivalves A, B et C présentant des capacités de tolérance différentes à un stress

Cette figure illustre assez bien la complexité de l'interprétation de la réponse d'un biomarqueur, et l'importance de tenir compte des capacités de tolérance différentielle entre populations.

Une autre difficulté dans l'interprétation des résultats obtenus est la comparaison avec la littérature, très peu abondante en ce qui concerne les biomarqueurs chez *D. r. bugensis*. En effectuant une recherche bibliographique avec les mots clés «dreissena x polymorpha x bugensis x biomarker » sur la base de données Web of Science (consulté le 20/10/2017), seules trois publications ressortent : Farkas et al. (2017) et Schäfer et al. (2012) sont brièvement présentées dans le Tableau XVIII, et Potet et al. (2016), déjà présentée dans le présent manuscrit.

Tableau XVIII : Deux études (sur trois publiées) concernant les différences inter-spécifiques chez les dreissènes en terme de réponse des biomarqueurs

	Schäfer et al. 2012	Farkas et al. 2017
Objectif	Comparer les capacités de bioaccumulation et la toxicité de sédiments resuspendus chez les deux espèces	Etudier la variabilité inter-spécifique de certains biomarqueurs entre dreissènes habitant des sites propres ou modérément pollués
Principe	Exposition des deux espèces à des sédiments resuspendus en laboratoire pendant 2 semaines : 1 sédiment fortement pollué aux pesticides organochlorés (rivière Elbe, Dessau, Allemagne), l'autre considéré comme non pollué (Rivière Havel, Havelberg, Allemagne). Dreissènes prélevées dans le Rhin (Rees, Allemagne)	Prélèvement des deux espèces sur 5 sites du lac Balaton (Hongrie), dont 1 dit de référence. Prélèvements en juin et octobre. Contamination organique (HAP) et métallique
Mesures	Accumulation dans les tissus mous (7 PCB, DDT + métabolites, hexachlorohexanes et hexachlorobenzène). Mesure des dommages à l'ADN et des HSP70 dans les branchies	Mesure de MT, activité EROD, peroxydation lipidique, cassures à l'ADN, vitellogénine (Vtg) dans les tissus mous entiers
Résultats & Conclusion	Bioaccumulation plus importante pour l'exposition aux sédiments contaminés pour les deux espèces. Bioaccumulation des PCB plus importante chez <i>D. r. bugensis</i>. La standardisation par les lipides diminue ces différences (<i>D. r. bugensis</i> a une teneur en lipides plus importante) > Potentiel de bioaccumulation des organochlorés différent entre les deux espèces. Dommages à l'ADN plus importants chez <i>D. r. bugensis</i>. Teneur en HSP plus importante chez <i>D. polymorpha</i>. Pas de lien entre les biomarqueurs et le temps d'exposition ou la qualité des sédiments. > Différences inter-spécifiques > Besoin de plus d'informations avant que <i>D. r. bugensis</i> ne soit utilisée comme alternative à <i>D. polymorpha</i>	Faible variabilité inter-spécifique sur tous les sites échantillonnés, avec tout de même des réponses légèrement plus élevées pour <i>D. polymorpha</i>. Biomarqueurs varient selon la saison (plus élevés en octobre, surtout dans les sites contaminés) avec une influence significative du cycle reproducteur sur MT et Vtg. Pas de variation spatio-temporelle de l'indice de condition ni de la teneur en protéines > Les organismes sont surtout affectés au niveau sub-organismal > La variabilité inter-spécifique dans la tolérance au stress est comparable

Si on s'intéresse à ces études, nos résultats concordent donc avec ceux de Schäfer et al. (2012) mais différent complètement de ceux obtenus par Farkas et al. (2017). Dans la mesure où ces derniers mesurent les réponses biologiques sur les tissus mous entiers, on peut se poser la question de l'influence de l'organe étudié sur le diagnostic réalisé en terme de réponse aux stressseurs. La glande digestive est-elle le bon organe, ou ne faudrait-il pas coupler plusieurs organes systématiquement (par exemple les branchies constituent une autre voie d'entrée majeure des contaminants) ?

Au vu de nos résultats, il n'y aurait donc pas d'extrapolation possible entre les deux espèces, et il serait impossible de considérer « les dreissènes » comme un ensemble homogène. Ceci implique qu'il est obligatoire de correctement identifier l'espèce utilisée pour le monitoring. De plus, si nos hypothèses concernant une adaptation génétique plus poussée chez *D. polymorpha*, du fait de son installation plus ancienne, sont exactes, la comparaison entre études européennes et américaines semble plus complexe, dans la mesure où la dynamique de colonisation est différente en Amérique du Nord.

Partie III : Peut-on, à l'heure actuelle, utiliser les biomarqueurs chez ces espèces dans un contexte de surveillance des milieux ?

La variabilité des réponses que nous avons mise en évidence dans ces travaux n'est généralement pas le premier facteur incriminé quand il s'agit de l'utilisation des biomarqueurs. On leur reproche plutôt leur manque de pertinence écologique, ou la difficulté d'extrapoler aux niveaux supérieurs à partir de mesures individuelles. En règle générale, on essaye de réduire au maximum la variabilité des réponses biologiques, qui est considérée comme un « bruit ». Néanmoins, cette variabilité existe et vouloir la réduire à tout prix n'est pas forcément pertinent, puisqu'elle englobe par essence l'ensemble des réponses possibles au sein de la population. En sélectionnant un échantillon d'individus calibrés, de même taille, de même sexe, ou de même stade de vie, on peut surestimer ou sous-estimer la tolérance de la population dans son ensemble, d'autant plus que cette tolérance varie de façon spatio-temporelle. Prélever un échantillon représentatif de la population dans son ensemble aboutit à des résultats plus complexes, mais aussi plus réalistes, permettant d'aborder les conséquences aux échelles supérieures avec plus de fiabilité. C'est pourquoi nous avons fait le choix d'exploiter l'information contenue dans la variabilité intra- et inter-populationnelle, généralement négligée (Devin et al., 2014b).

Les résultats de la publication n°3 (p197) ont permis d'établir que les populations et les espèces réagissent à plusieurs stressseurs dans le même sens, ce qui paraît avantageux en biosurveillance. En revanche, ces résultats montrent aussi que les niveaux de base diffèrent (entre espèces et entre populations), et qu'il serait difficile d'établir un intervalle de réponses « de référence » en dehors duquel les populations étudiées pourraient être considérées comme stressées. En définitive, les biomarqueurs ne seraient pas applicables en l'état pour une approche ponctuelle (évaluer la qualité d'un site donné à l'instant *t* par rapport à une gamme dite de référence), mais pourraient être utilisables dans le cadre d'une approche comparative incluant plusieurs sites, pour déterminer un gradient de qualité des sites les uns par rapport aux autres ; c'est d'ailleurs dans ce sens qu'ils sont utilisés en milieu marin, pour lequel une certaine structuration des méthodes de biosurveillance a déjà été mise en place (Burgeot et al., 2017).

Le chapitre 5, malgré son côté très exploratoire, nous a permis de faire ressortir d'autres pistes de réflexion.

Malgré l'évidente différence entre les deux espèces, et entre les populations, nous n'avons pas pu mettre en lumière de patron de réponse clair des biomarqueurs lorsqu'on passe d'une situation non-stressante à une situation stressante, ni de mode d'action spécifique des stressseurs sur les biomarqueurs. L'absence de patron commun à toutes les typologies souligne (1) que la redondance entre biomarqueurs d'un même système (antioxydant par exemple) peut n'être vraie que dans des conditions d'exposition bien particulières et que par conséquent (2) chaque biomarqueur pouvant être amené à répondre indépendamment des autres à un stress particulier, l'utilisation d'une batterie est une nécessité.

Selon les populations considérées, les réponses des organismes sur le terrain et exposés en laboratoire peuvent être similaires (Saint Mihiel), ou différentes (Montigny). Si l'on considère tous les sites simultanément, la distinction entre réponses sur le terrain et réponses en laboratoire n'est pas possible. Ces résultats soulignent à nouveau la nécessité de caractériser chacun des sites de prélèvement, et de connaître les patrons de réponse des populations qui y vivent. Pour le site le plus documenté au cours de ces travaux (Montigny), le passage en laboratoire semble être un facteur déterminant dans la réponse des organismes, qui masque même l'effet de stress faible par rapport aux témoins. Malgré tout pour les deux espèces, la TAC et la LDH, qui sont respectivement indicatrices des capacités antioxydantes et d'un syndrome de stress général des organismes, semblent jouer un rôle majeur dans la réponse au stress (p253).

L'accumulation des contaminants dans les tissus mous et les réponses des biomarqueurs, notamment chez *D. r. bugensis*, peuvent traduire l'état de contamination du milieu, notamment pour les contaminants organiques. L'établissement de ce type de lien nécessite de caractériser la qualité des sites à chaque campagne car la contamination des sites montre des variations annuelles (p167).

Le recours à une batterie de biomarqueurs permet d'intégrer l'impact de la contamination dans son ensemble en y associant les autres facteurs de stress. Toutefois, l'augmentation du nombre de réponses mesurées augmente également la complexité de l'interprétation conjointe de ces mesures. Outre les outils de statistiques multivariées qui permettent de décrire et visualiser des jeux de données complexes, des outils intégrateurs sont également essentiels, à la fois pour résumer l'ensemble des mesures dans une réponse simple et synthétique et pour faciliter le transfert de ces outils vers les gestionnaires (Hagger et al., 2008). Parmi les outils proposés pour répondre à ce besoin, l'Integrated Biomarker Response (IBR ; Beliaeff et Burgeot, 2002 ; Devin et al., 2014a) est une méthode prometteuse qui offre à la fois une synthèse graphique des réponses des différents biomarqueurs et une valeur numérique qui intègre toutes ces réponses. Des étapes préliminaires à l'utilisation d'indices sont généralement nécessaires, afin de sélectionner les réponses les plus pertinentes et les plus riches en informations. Ces étapes permettent aussi de rechercher les liens entre un contaminant (ou une famille de contaminants) et une réponse biologique particulière. Dans notre cas, l'IBR semble pouvoir refléter la qualité des sites, mais dans des conditions très particulières (p171). Bien que cet outil synthétique vienne appuyer les conclusions obtenues quant à la qualité des sites, l'interprétation de la réponse des biomarqueurs pris individuellement reste de mise, dans la mesure où ils permettent de comprendre plus précisément les mécanismes de réponse des organismes soumis à des conditions stressantes.

Conclusion générale et perspectives

Les résultats obtenus au cours de ces travaux ont permis d'interroger les notions de sensibilité et de vulnérabilité des populations et de mieux comprendre les facteurs déterminant les réponses biologiques des organismes confrontés à des stress. Les différences inter-populationnelles montrent que l'accumulation des contaminants par les organismes et leurs réponses biologiques sont bien dépendantes de la qualité du biotope propre à chaque population, mais aussi de la saison, un facteur certes naturel mais confondant qui doit donc être pris en compte dans l'analyse des biomarqueurs lors de campagnes de biosurveillance. A l'ère de l'anthropocène, on peut aussi considérer que les polluants chimiques sont devenus une variable comme une autre de nos écosystèmes, et qu'ils peuvent être intégrés en tant que facteur de variabilité supplémentaire.

De fortes différences de réponse des biomarqueurs entre les deux espèces ont aussi été observées, aussi bien *in situ* que lors des expositions en laboratoire, soulignant la nécessité de bien différencier ces deux espèces, pourtant très proches. La nouvelle arrivée, *D. r. bugensis*, présente des réponses plus plastiques *in situ*, mais semble moins capable de gérer des stress aigus lors d'expositions en laboratoire. A l'inverse, *D. polymorpha*, arrivée il a 200 ans en France, semble mieux adaptée, avec une variabilité de réponse moins marquée et une meilleure tolérance aux contaminants. La dynamique d'invasion de ces espèces étant différente en Amérique du Nord, il serait intéressant de mener des projets en collaboration, afin d'étudier le comportement de ces espèces sur les deux continents, et d'affiner les hypothèses concernant leurs mécanismes d'acclimatation et d'adaptation. Cette comparaison inter-continentale a été réalisée dans le cadre du projet IPOC, mais pour *D. polymorpha* uniquement. Une comparaison avec des organismes provenant de leur aire originelle pourrait aussi être envisagée.

Il serait aussi intéressant de tester des expositions à d'autres types de contaminants, utilisés seuls ou en mélange, ou d'autres voies d'exposition (sédiments contaminés resuspendus par exemple). Cela permettrait (1) de se placer dans des conditions plus environnementalement réalistes, et (2) de voir comment les modes d'actions et les réponses biochimiques des organismes seraient affectés, et si les patrons de réponse généraux observés entre espèces et entre populations seraient modifiés ou non.

On pourrait aussi envisager de se pencher de façon plus poussée sur les réponses des biomarqueurs et la bioaccumulation dans les différents organes (branchies, glande digestive, tissus mous entiers), pour mieux appréhender la gestion des contaminants par les organismes, et évaluer avec plus de finesse les niveaux de stress auxquels ils sont exposés et/ou les risques pour les populations.

Les transitions entre l'individu et la population sont influencées par la plasticité phénotypique et les facteurs génétiques, qui vont directement influencer la physiologie ou la capacité de l'organisme à supporter une perturbation, à s'acclimater à de nouvelles conditions. Il est difficile de prévoir dans quelle mesure les patrons d'expression des gènes ou des biomarqueurs vont persister ou être modifiés suite à une levée de stress. La façon dont une exposition chronique peut affecter la réponse à d'autres

contaminants est aussi méconnue. Des approches stress-on-stress ou stress-levée de stress en laboratoire permettraient d'explorer ce genre de situation ; en situation naturelle, il faudrait se tourner vers des transplantations croisées sur des sites très contrastés en termes de contamination, à différentes périodes de l'année.

D'autres réponses ont aussi été évaluées durant ces travaux (bioaccumulation, activité de filtration, MXR, TL_{50}), et certaines semblent aussi capables de refléter la qualité des sites. C'est le cas par exemple du taux de filtration des deux espèces qui varie avec l'exposition au Ni et au Cr, de l'indice de condition, qui est en général un bon reflet de l'état de santé des populations, ou encore du TL_{50} , qui est relié à la contamination des sédiments en métaux (Ni notamment) chez *D. polymorpha*. Dans une optique d'évaluation du risque plus poussée, et plus seulement de biosurveillance, il serait intéressant d'entamer une démarche similaire à celle de l'AOP pour tenter de relier les événements observés au niveau biochimique (*i.e.* modification des biomarqueurs), à ces effets observés à des niveaux d'organisation supérieurs.

Les différences de tolérance que nous avons observées entre espèces et entre populations soulignent que dans un contexte de biosurveillance, les mécanismes d'adaptation (1) doivent être pris en compte et (2) constituent une information (puisque l'adaptation témoigne d'une perturbation chronique et historique). Cette adaptation soulève, en filigrane, une autre question : une espèce qui s'est adaptée aux milieux qu'elle a colonisés peut-elle encore être considérée comme une espèce invasive ?

Ces travaux montrent que ces deux espèces sont aptes à nous renseigner sur l'état de contamination du milieu dans lequel elles vivent, même si les grilles d'interprétation peuvent être différentes de l'une à l'autre. Les variations des réponses des biomarqueurs au niveau sub-cellulaire témoignent de façon précoce de modifications de la qualité du milieu. Certains biomarqueurs semblent toutefois plus informatifs que d'autres, la batterie mesurée pourrait donc être réduite. A l'avenir, ces travaux permettront une meilleure lecture et interprétation des biomarqueurs mesurés dans des populations autochtones ou transplantées, et attestent de l'intérêt des biomarqueurs en tant qu'outils d'évaluation de la qualité des milieux aquatiques.

Ces travaux n'ont pas permis de dégager une stratégie optimale de biosurveillance des écosystèmes *via* l'utilisation des biomarqueurs chez les dreissènes, mais ont permis d'aller plus en profondeur dans la compréhension de ces outils. Une combinaison d'approches holistiques et réductionnistes semble donc être la plus à même de nous fournir une image réaliste de l'état de santé des milieux.

En tant qu'organismes sessiles, les moules intègrent la contamination sur leur site de vie. Mais la complexité des interactions avec les contaminants, ainsi que la variabilité biologique et les conditions environnementales locales changeantes compliquent le lien entre biomarqueurs et pollution. L'interprétation de la « valeur brute » d'un biomarqueur par rapport à une gamme de référence préétablie semble peu probable. A l'inverse, l'utilisation des biomarqueurs en comparatif sur un grand nombre de

populations semble plus prometteur, à condition de réaliser des suivis fréquents et de caractériser *a minima* les populations. Si l'on parvient à calibrer un jour ces outils, les mesures en parallèle de contamination des milieux et de bioaccumulation deviendraient accessoires.

Des suivis sur le long terme sont donc nécessaires, et pourraient être mis en place *via* des systèmes d'observatoires pérennes. Pour cela, il serait nécessaire d'augmenter le nombre de sites de prélèvement, d'étendre les dates d'échantillonnage sur plusieurs années et de travailler sur des sites les plus contrastés possibles, moyennant un coût et des besoins humains assez conséquents.

L'utilisation des biomarqueurs en biosurveillance, pour être pertinente, implique donc de faire des suivis avec une fréquence suffisamment élevée pour détecter effectivement des réponses précoces, préliminaires à des changements plus importants au sein de l'écosystème. Bien que la Directive Cadre-Stratégie pour le Milieu Marin ait été mise en application 8 ans après la Directive Cadre sur l'Eau, l'application des biomarqueurs en milieu marin est bien plus aboutie. On peut alors se demander pourquoi ce décalage existe, et s'il ne serait pas intéressant de travailler main dans la main, pour faire progresser simultanément l'utilisation de ces outils, pour les milieux marins et dulçaquicoles. Un autre enjeu majeur sera de se doter d'outils performants pour discriminer des sites au profil de contamination complexe, mais modérée. Le développement d'outil d'agrégation des données sera nécessaire pour favoriser le transfert vers les gestionnaires des milieux aquatiques.

Bibliographie

- Achard, M., 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquatic Toxicology* 67, 347–357. doi:10.1016/j.aquatox.2004.01.014
- Ackerman, J.D., 1999. Effect of velocity on the filter feeding of dreissenid mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): implications for trophic dynamics. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56, 1551–1561. doi:10.1139/f99-079
- Ackerman, J.D., 1994. A review of the early life history of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): comparisons with marine bivalves. *Canadian Journal of Zoology* 72, 1169–1179. doi:10.1139/z94-157
- Ács, A., Vehovszky, á., Györi, J., Farkas, A., 2016. Seasonal and size-related variation of subcellular biomarkers in quagga mussels (*Dreissena bugensis*) inhabiting sites affected by moderate contamination with complex mixtures of pollutants. *Environmental Monitoring and Assessment* 188. doi:10.1007/s10661-016-5432-y
- Adams, S.M., Giesy, J.P., Tremblay, L.A., Eason, C.T., 2001. The use of biomarkers in ecological risk assessment: recommendations from the christchurch conference on biomarkers in ecotoxicology. *Biomarkers* 6, 1–6. doi:10.1080/135475001452724
- Aldridge, D.C., Elliott, P., Moggridge, G.D., 2004. The recent and rapid spread of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in Great Britain. *Biological Conservation* 119, 253–261. doi:10.1016/j.biocon.2003.11.008
- Aldridge, D.W., Payne, B.S., Miller, A.C., 1995. Oxygen consumption, nitrogenous excretion, and filtration rates of *Dreissena polymorpha* at acclimation temperatures between 20 and 32 °C. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52, 1761–1767. doi:10.1139/f95-768
- Alexander Jr, J.E., McMahon, R.F., 2004. Respiratory response to temperature and hypoxia in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 137, 425–434. doi:10.1016/j.cbpb.2003.11.003
- Allan, I., Vrana, B., Greenwood, R., Mills, G., Knutsson, J., Holmberg, A., Guigues, N., Fouillac, A., Laschi, S., 2006a. Strategic monitoring for the European Water Framework Directive. *Trends in Analytical Chemistry* 25, 704–715. doi:10.1016/j.trac.2006.05.009
- Allan, I., Vrana, B., Greenwood, R., Mills, G., Roig, B., Gonzalez, C., 2006b. A “toolbox” for biological and chemical monitoring requirements for the European Union’s Water Framework Directive. *Talanta* 69, 302–322. doi:10.1016/j.talanta.2005.09.043
- Allen, J.I., Moore, M.N., 2004. Environmental prognostics: Is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation? *Marine Environmental Research* 58, 227–232. doi:10.1016/j.marenvres.2004.03.119
- Alley, E.R., 2007. Chapter 3 - Pollutant clasification, in: *Water Quality Control Handbook - 2nd Edition*. McGraw Hill & WEF Press, p. 3.1-3.28.
- Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., 2015a. Conventional risk assessment of environmental contaminants, in: Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Mouneyrac, C. (Eds.), *Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks*. Academic Press, pp. 25–49.
- Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., 2015b. Quality standard setting and environmental monitoring, in: Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Mouneyrac, C. (Eds.), *Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks*. Academic Press, pp. 51–76.

- Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., 2015c. From incorporation to toxicity, in: Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Mouneyrac, C. (Eds.), *Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks*. Academic Press, pp. 103–125.
- Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76, 160–202. doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.015
- Amiard, J.-C., Caquet, T., Lagadic, L., 1998. Introduction - Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement, in: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C., Ramade, F. (Eds.), *Utilisation de Biomarqueurs Pour La Surveillance de La Qualité de L'environnement*. Lavoisier, Paris, pp. XXI–XXXI.
- Amiard-Triquet, C., 2015. Introduction, in: Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Mouneyrac, C. (Eds.), *Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks*. Academic Press, pp. 1–23.
- Amiard-Triquet, C., 2011. Pollution tolerance: from fundamental biological mechanisms to ecological consequences, in: Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S., Roméo, M. (Eds.), *Tolerance to Environmental Contaminants*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1–24.
- Anderson, K.E., Waite, J.H., 2002. Biochemical characterization of a byssal protein from *Dreissena bugensis* (Andrusov). *Biofouling* 18, 37–45. doi:10.1080/08927010290017716
- Andreï, J., 2015. Effets (sub)individuels et fonctionnels des nanoparticules manufacturées sur des crustacés Gammaridae. Université de Lorraine, Metz.
- Ankley, G.T., Bennett, R.S., Erickson, R.J., Hoff, D.J., Hornung, M.W., Johnson, R.D., Mount, D.R., Nichols, J.W., Russom, C.L., Schmieder, P.K., Serrano, J.A., Tietge, J.E., Villeneuve, D.L., 2010. Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 730–741. doi:10.1002/etc.34
- Arab, K., Steghens, J.-P., 2004. Plasma lipid hydroperoxides measurement by an automated xylenol orange method. *Anal. Biochem.* 325, 158–163. doi:10.1016/j.ab.2003.10.022
- Arrêté du 2 février, 1998. Arrêté du 2/02/98 relatif aux prélèvements et à la consommation d'eau ainsi qu'aux émissions de toute nature des installations classées pour la protection de l'environnement soumises à autorisation, JO n° 52 du 3 mars 1998.
- Arrêté du 9 août, 2006. Arrêté du 09/08/06 relatif aux niveaux à prendre en compte lors d'une analyse de rejets dans les eaux de surface ou de sédiments marins, estuariens ou extraits de cours d'eau ou canaux relevant respectivement des rubriques 2.2.3.0, 4.1.3.0 et 3.2.1.0 de la nomenclature annexée à l'article R. 214-1 du code de l'environnement, Journal Officiel n° 222 du 24 septembre 2006.
- Arrêté du 26 décembre, 2012. Arrêté du 26/12/12 modifiant l'arrêté du 31 janvier 2008 relatif au registre et à la déclaration annuelle des émissions polluantes et des déchets.
- Arrêté du 31 janvier, 2008. Arrêté du 31/01/08 relatif au registre et à la déclaration annuelle des émissions et des transferts de polluants et des déchets, JO n° 62 du 13 mars 2008.
- Artigas, J., Arts, G., Babut, M., Caracciolo, A.B., Charles, S., Chaumot, A., Combourieu, B., Dahllöf, I., Despréaux, D., Ferrari, B., Friberg, N., Garric, J., Geffard, O., Gourlay-Francé, C., Hein, M., Hjorth, M., Krauss, M., De Lange, H.J., Lahr, J., Lehtonen, K.K., Lettieri, T., Liess, M., Loftis, S., Mayer, P., Morin, S., Paschke, A., Svendsen, C., Usseglio-Polatera, P., van den Brink, N., Vindimian, E., Williams, R., 2012. Towards a renewed research agenda in ecotoxicology. *Environmental Pollution* 160, 201–206. doi:10.1016/j.envpol.2011.08.011
- Attig, H., Dagnino, A., Negri, A., Jebali, J., Boussetta, H., Viarengo, A., Dondero, F., Banni, M., 2010. Uptake and biochemical responses of mussels *Mytilus galloprovincialis*

- exposed to sublethal nickel concentrations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1712–1719. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.08.007
- Baird, D.J., Burton, G.A. (Eds.), 2001. *Ecological variability: Separating natural from anthropogenic causes of ecosystem impairment*. SETAC Press, Pensacola, Florida.
- Balabaskaran, S., Chew, S., Segaran, M., 1986. Studies on glutathione S-transferase in molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 85, 183–192. doi:10.1016/0305-0491(86)90241-5
- Baldwin, B.S., Mayer, M.S., Dayton, J., Pau, N., Mendilla, J., Sullivan, M., Moore, A., Ma, A., Mills, E.L., 2002. Comparative growth and feeding in zebra and quagga mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): implications for North American lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59, 680–694. doi:10.1139/f02-043
- Barata, C., Baird, D.J., Mitchell, S.E., Soares, A.M., 2002. Among-and within-population variability in tolerance to cadmium stress in natural populations of *Daphnia magna*: Implications for ecological risk assessment. *Environmental toxicology and chemistry* 21, 1058–1064. doi:10.1002/etc.5620210523
- Bard, S.M., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 48, 357–389. doi:10.1016/S0166-445X(00)00088-6
- Barrick, A., Châtel, A., Marion, J.-M., Perrein-Ettajani, H., Bruneau, M., Mouneyrac, C., 2016. A novel methodology for the determination of biomarker baseline levels in the marine polychaete *Hediste diversicolor*. *Marine Pollution Bulletin* 108, 275–280. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.04.056
- Bartram, J., Ballance, R. (Eds.), 1996. *Water quality monitoring: a practical guide to the design and implementation of freshwater quality studies and monitoring programmes*. E&FN Spon, London, UK.
- Becker van Slooten, K., Tarradellas, J., 1994. Accumulation, depuration and growth effects of tributyltin in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* under field conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 755–762. doi:10.1002/etc.5620130510
- Beers, R.F., Sizer, I.W., 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry* 195, 133–140.
- Beggel, S., Cerwenka, A., Brandner, J., Geist, J., 2015. Shell morphological versus genetic identification of quagga mussel (*Dreissena bugensis*) and zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Invasions* 10, 93–99. doi:10.3391/ai.2015.10.1.09
- Beliaeff, B., Burgeot, T., 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 1316–1322. doi:10.1002/etc.5620210629
- Benedetti, M., Ciaprini, F., Piva, F., Onorati, F., Fattorini, D., Notti, A., Ausili, A., Regoli, F., 2011. A multidisciplinary weight of evidence approach for classifying polluted sediments: Integrating sediment chemistry, bioavailability, biomarkers responses and bioassays. *Environment International* 38, 17–28. doi:10.1016/j.envint.2011.08.003
- Benito, M., Mosteo, R., Rubio, E., LaPlante, D., Ormad, M.P., Goñi, P., 2017. Bioaccumulation of inorganic elements in *Dreissena polymorpha* from the Ebro River, Spain: Could zebra mussels be used as a bioindicator of the impact of human activities? *River Research and Applications* 33, 718–728. doi:10.1002/rra.3126
- Benson, A.J., 2014. Chronological history of zebra and quagga mussels (Dreissenidae) in North America, 1988-2010, in: Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), *Quagga and Zebra Mussels - Biology, Impacts, and Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 9–31.
- Berthet, B., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Martoja, M., Jeantet, A.Y., 1992. Bioaccumulation, toxicity and physico-chemical speciation of silver in bivalve

- molluscs: ecotoxicological and health consequences. *Science of the Total Environment* 125, 97–122. doi:10.1016/0048-9697(92)90385-6
- Berthet, B., Leung, K.M.Y., Amiard-Triquet, C., 2011. Inter- and intraspecific variability of tolerance: implications for bioassays and biomonitoring, in: Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S., Roméo, M. (Eds.), *Tolerance to Environmental Contaminants*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 49–84.
- Bertrand, C., Devin, S., Mouneyrac, C., Giambérini, L., 2017. Eco-physiological responses to salinity changes across the freshwater-marine continuum on two euryhaline bivalves: *Corbicula fluminea* and *Scrobicularia plana*. *Ecological Indicators* 74, 334–342. doi:10.1016/j.ecolind.2016.11.029
- Bervoets, L., Voets, J., Chu, S., Covaci, A., Schepens, P., Blust, R., 2004. Comparison of accumulation of micropollutants between indigenous and transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environmental toxicology and chemistry* 23, 1973–1983. doi:10.1897/03-365
- Bervoets, L., Voets, J., Covaci, A., Chu, S., Qadah, D., Smolders, R., Schepens, P., Blust, R., 2005. Use of transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) to assess the bioavailability of microcontaminants in Flemish surface waters. *Environmental Science & Technology* 39, 1492–1505. doi:10.1021/es049048t
- Besse, J.-P., Geffard, O., Coquery, M., 2012. Relevance and applicability of active biomonitoring in continental waters under the Water Framework Directive. *Trends in Analytical Chemistry* 36, 113–127. doi:10.1016/j.trac.2012.04.004
- Bickham, J.W., Sandhu, S., Hebert, P.D., Chikhi, L., Athwal, R., 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 463, 33–51. doi:10.1016/S1383-5742(00)00004-1
- Bickham, J.W., Smolen, M.J., 1994. Somatic and heritable effects of environmental genotoxins and the emergence of evolutionary toxicology. *Environmental Health Perspectives* 102, 25–28.
- Bielen, A., Bošnjak, I., Sepčić, K., Jaklič, M., Cvitanić, M., Lušić, J., Lajtner, J., Simčič, T., Hudina, S., 2016. Differences in tolerance to anthropogenic stress between invasive and native bivalves. *Science of The Total Environment* 543, 449–459. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.11.049
- bij de Vaate, A., van der Velde, G., Leuven, R.S.E.W., Heiler, K.C.M., 2014. Spread of the quagga mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*) in Western Europe, in: Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), *Quagga and Zebra Mussels - Biology, Impacts, and Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 83–92.
- Binelli, A., Bacchetta, R., Mantecchia, P., Ricciardi, F., Provini, A., Vailati, G., 2004. DDT in zebra mussels from Lake Maggiore (N. Italy): level of contamination and endocrine disruptions. *Aquat. Toxicol.* 69, 175–188. doi:10.1016/j.aquatox.2004.05.005
- Binelli, A., Parolini, M., Pedriali, A., Provini, A., 2011. Antioxidant activity in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in response to Triclosan exposure. *Water, Air, & Soil Pollution* 217, 421–430. doi:10.1007/s11270-010-0597-4
- Binelli, A., Pedriali, A., Riva, C., Parolini, M., 2012. Illicit drugs as new environmental pollutants: Cyto-genotoxic effects of cocaine on the biological model *Dreissena polymorpha*. *Chemosphere* 86, 906–911. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.10.056
- Binelli, A., Ricciardi, F., Riva, C., Provini, A., 2005. Screening of POP pollution by AChE and EROD activities in Zebra mussels from the Italian Great Lakes. *Chemosphere* 61, 1074–1082. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.03.047

- Binelli, A., Riva, C., Provini, A., 2007. Biomarkers in Zebra mussel for monitoring and quality assessment of Lake Maggiore (Italy). *Biomarkers* 12, 349–368. doi:10.1080/13547500701197412
- Blanck, H., 2002. A critical review of procedures and approaches used for assessing Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) in biotic communities. *Human and Ecological Risk Assessment* 8, 1003–1034. doi:10.1080/1080-700291905792
- Bodin, N., Burgeot, T., Stanisière, J.Y., Bocquené, G., Menard, D., Minier, C., Boutet, I., Amat, A., Cherel, Y., Budzinski, H., 2004. Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 138, 411–427. doi:10.1016/j.cca.2004.04.009
- Bolognesi, C., Buschini, A., Branchi, E., Carboni, P., Furlini, M., Martino, A., Monteverde, M., Poli, P., Rossi, C., 2004. Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. *Science of The Total Environment* 333, 127–136. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.05.018
- Borcherding, J., 1992. Another Early Warning System for the detection of toxic discharges in the aquatic environment based on valve movements of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*, in: Neumann, D., Jenner, H.A. (Eds.), *The Zebra Mussel Dreissena Polymorpha*, *Limnologie Aktuell Band 4*. Gustav Fischer Verlag, New York, pp. 127–146.
- Borcherding, J., 1991. The annual reproductive cycle of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* Pallas in lakes. *Oecologia* 87, 208–218. doi:10.1007/BF00325258
- Borcherding, J., Jantz, B., 1997. Valve movement response of the mussel *Dreissena polymorpha* - the influence of pH and turbidity on the acute toxicity of pentachlorophenol under laboratory and field conditions. *Ecotoxicology* 6, 153–165. doi:10.1023/A:1018666525205
- Borcherding, J., Wolf, J., 2001. The influence of suspended particles on the acute toxicity of 2-chloro-4-nitro-aniline, cadmium, and pentachlorophenol on the valve movement response of the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 497–504. doi:10.1007/s002440010202
- Borja, A., Bremmer, J., Muxika, I., Rodriguez, J.G., 2015. Biological responses at supraindividual levels, in: Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Mouneyrac, C. (Eds.), *Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks*. Academic Press, pp. 333–353.
- Bou, R., Codony, R., Tres, A., Decker, E.A., Guardiola, F., 2008. Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation–xylenol orange method: A review of the factors that influence the method's performance. *Analytical Biochemistry* 377, 1–15. doi:10.1016/j.ab.2008.02.029
- Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Priadi, C., Ayrault, S., Tusseau-Vuillemin, M.-H., 2011. Bioavailability of particulate metal to zebra mussels: Biodynamic modelling shows that assimilation efficiencies are site-specific. *Environmental Pollution* 159, 3381–3389. doi:10.1016/j.envpol.2011.08.034
- Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Vincent-Hubert, F., Palais, F., Geffard, A., Biagianti-Risbourg, S., Pain-Devin, S., Tusseau-Vuillemin, M.-H., 2010. Lessons from a transplantation of zebra mussels into a small urban river: An integrated ecotoxicological assessment. *Environmental Toxicology* 25, 468–478. doi:10.1002/tox.20591
- Bouskill, N.J., Handy, R.D., Ford, T.E., Galloway, T.S., 2006. Differentiating copper and arsenic toxicity using biochemical biomarkers in *Asellus aquaticus* and *Dreissena*

- polymorpha*. Ecotoxicology and Environmental Safety 65, 342–349. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.07.027
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248–254.
- Brown, R.J., Galloway, T.S., Lowe, D., Browne, M.A., Dissanayake, A., Jones, M.B., Depledge, M.H., 2004. Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. Aquatic Toxicology 66, 267–278. doi:10.1016/j.aquatox.2003.10.001
- Bultelle, F., Panchout, M., Leboulenger, F., Danger, J.M., 2002. Identification of differentially expressed genes in *Dreissena polymorpha* exposed to contaminants. Marine environmental research 54, 385–389. doi:10.1016/S0141-1136(02)00159-9
- Burgeot, T., Akcha, F., Ménard, D., Robinson, C., Loizeau, V., Brach-Papa, C., Martínez-Gómez, C., Le Goff, J., Budzinski, H., Le Menach, K., Cachot, J., Minier, C., Broeg, K., Hylland, K., 2017. Integrated monitoring of chemicals and their effects on four sentinel species, *Limanda limanda*, *Platichthys flesus*, *Nucella lapillus* and *Mytilus sp.*, in Seine Bay: A key step towards applying biological effects to monitoring. Marine Environmental Research 124, 92–105. doi:10.1016/j.marenvres.2016.10.009
- Burlakova, L.E., 2006. Endosymbionts of *Dreissena polymorpha* in Ireland: Evidence for the introduction of adult mussels. Journal of Molluscan Studies 72, 207–210. doi:10.1093/mollus/eyi067
- Burlakova, L.E., Tulumello, B.L., Karatayev, A.Y., Krebs, R.A., Schloesser, D.W., Paterson, W.L., Griffith, T.A., Scott, M.W., Crail, T., Zanatta, D.T., 2014. Competitive replacement of invasive congeners may relax impact on native species: Interactions among Zebra, Quagga, and native Unionid mussels. PloS one 9, 20p. doi:10.1371/journal.pone.0114926
- Byczkowski, J.Z., Gessner, T., 1988. Biological role of superoxide ion-radical. International Journal of Biochemistry 20, 569–580.
- Cain, D.J., Luoma, S.N., Wallace, W.G., 2004. Linking metal bioaccumulation of aquatic insects to their distribution patterns in a mining-impacted river. Environmental Toxicology and Chemistry 23, 1463–1473. doi:10.1897/03-291
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viareng, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. Science of The Total Environment 247, 295–311. doi:10.1016/S0048-9697(99)00499-4
- Calow, P., 1996. Variability: noise or information in ecotoxicology? Environmental toxicology and pharmacology 2, 121–123. doi:10.1016/S1382-6689(96)00041-5
- Calow, P., 1991. Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 100, 3–6. doi:10.1016/0742-8413(91)90110-F
- Calzolari, L., Ansorge, W., Calabrese, E., Denslow, N., Part, P., Lettieri, T., 2007. Transcriptomics and proteomics. Applications to ecotoxicology. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics 2, 245–249. doi:10.1016/j.cbd.2007.04.007
- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., Pruzzo, C., 2002. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. Microscopy Research and Technique 57, 469–476. doi:10.1002/jemt.10100
- Carlton, J.T., 2008. The zebra mussel *Dreissena polymorpha* found in north america in 1986 and 1987. Journal of Great Lakes Research 34, 770–773. doi:10.3394/0380-1330-34.4.770

- Carlton, J.T., 1993. Dispersal mechanisms of the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*), in: Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), Zebra Mussels - Biology, Impacts and Control. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 677–697.
- Carr, R.S., Neff, J.M., 1984. Quantitative semi-automated enzymatic assay for tissue glycogen. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 77, 447–449. doi:10.1016/0305-0491(84)90258-X
- Casper, A.F., Johnson, L.E., 2010. Contrasting shell/tissue characteristics of *Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis* in relation to environmental heterogeneity in the St. Lawrence River. Journal of Great Lakes Research 36, 184–189. doi:10.1016/j.jglr.2009.10.001
- Chapman, D., Jackson, J., Krebs, F., 1996. Chapter 11 - Biological monitoring, in: Bartram, J., Ballance, R. (Eds.), Water Quality Monitoring. E&FN Spon, Londres, UK, pp. 270–309.
- Chapman, P.M., 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. Marine pollution bulletin 44, 7–15. doi:10.1016/S0025-326X(01)00253-3
- Châtel, A., Faucet-Marquis, V., Gourlay-Francé, C., Pfohl-Leszkowicz, A., Vincent-Hubert, F., 2015. Genotoxicity and activation of cellular defenses in transplanted zebra mussels *Dreissena polymorpha* along the Seine river. Ecotoxicology and Environmental Safety 114, 241–249. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.03.023
- Châtel, A., Faucet-Marquis, V., Perret, M., Gourlay-France, C., Uher, E., Pfohl-Leszkowicz, A., Vincent-Hubert, F., 2012. Genotoxicity assessment and detoxification induction in *Dreissena polymorpha* exposed to benzo[a]pyrene. Mutagenesis 27, 703–711. doi:10.1093/mutage/ges036
- Châtel, A., Faucet-Marquis, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Gourlay-France, C., Vincent-Hubert, F., 2014. DNA adduct formation and induction of detoxification mechanisms in *Dreissena polymorpha* exposed to nitro-PAHs. Mutagenesis 29, 457–465. doi:10.1093/mutage/geu040
- Cho, Y.-C., Frohnhoefer, R.C., Rhee, G.-Y., 2004. Bioconcentration and redeposition of polychlorinated biphenyls by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in the Hudson River. Water Research 38, 769–777. doi:10.1016/j.watres.2003.10.046
- Ciacci, C., Barmo, C., Gallo, G., Maisano, M., Cappello, T., D’Agata, A., Leonzio, C., Mauceri, A., Fasulo, S., Canesi, L., 2012. Effects of sublethal, environmentally relevant concentrations of hexavalent chromium in the gills of *Mytilus galloprovincialis*. Aquatic Toxicology 120–121, 109–118. doi:10.1016/j.aquatox.2012.04.015
- Clarke, M., 1999. The effect of food availability on byssogenesis by the zebra mussel (*Dreissena polymorpha* Pallas). Journal of molluscan studies 65, 327–333. doi:10.1093/mollus/65.3.327
- Clarke, M., McMahon, R.F., 1996. Effects of current velocity on byssal-thread production in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Canadian journal of zoology 74, 63–69. doi:10.1139/z96-008
- Claudi, R., Mackie, G.L., 1994. Practical manual for zebra mussel monitoring and control. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- Claxton, W.T., Mackie, G.L., 1998. Seasonal and depth variations in gametogenesis and spawning of *Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis* in eastern Lake Erie. Canadian Journal of Zoology 76, 2010–2019. doi:10.1139/z98-150
- Claxton, W.T., Martel, A., Dermott, R.M., Boulding, E.G., 1997. Discrimination of field-collected juveniles of two introduced dreissenids (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*) using mitochondrial DNA and shell morphology. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 54, 1280–1288. doi:10.1139/cjfas-54-6-1280

- Clayton, M.E., Steinmann, R., Fent, K., 2000. Different expression patterns of heat shock proteins hsp 60 and hsp 70 in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) exposed to copper and tributyltin. *Aquatic Toxicology* 47, 213–226. doi:10.1016/S0166-445X(99)00022-3
- Clements, W.H., Carlisle, D.M., Lazorchak, J.M., Johnson, P.C., 2000. Heavy metals structure benthic communities in Colorado Mountain streams. *Ecological Applications* 10, 626. doi:10.2307/2641120
- Cohen, A.N., 2007. Potential Distribution of Zebra Mussels (*Dreissena polymorpha*) and Quagga Mussels (*Dreissena bugensis*) in California: Phase 1 Report. San Francisco Estuary Institute.
- Cohen, A.N., 2005. A review of Zebra mussels' environmental requirements. San Francisco Estuary Institute.
- Cohen, A.N., Weinstein, A., 2001. Zebra mussel's calcium threshold and implications for its potential distribution in North America. San Francisco Estuary Institute.
- Colas, F., Baudoin, J.-M., Danger, M., Usseglio-Polatera, P., Wagner, P., Devin, S., 2013. Synergistic impacts of sediment contamination and dam presence on river functioning: *Multiple stressors impacts associated with dams*. *Freshwater Biology* 58, 320–336. doi:10.1111/fwb.12060
- Colas, F., Vigneron, A., Felten, V., Devin, S., 2014. The contribution of a niche-based approach to ecological risk assessment: Using macroinvertebrate species under multiple stressors. *Environmental Pollution* 185, 24–34. doi:10.1016/j.envpol.2013.09.033
- Conn, D.B., Ricciardi, A., Babapulle, M.N., Klein, K.A., Rosen, D.A., 1996. *Chaetogaster limnaei* (Annelida: Oligochaeta) as a parasite of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*, and the quagga mussel *Dreissena bugensis* (Mollusca: Bivalvia). *Parasitology Research* 82, 1–7. doi:10.1007/s004360050058
- Connon, R.E., Geist, J., Werner, I., 2012. Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. *Sensors* 12, 12741–12771. doi:10.3390/s120912741
- Contardo-Jara, V., Krueger, A., Exner, H.-J., Wiegand, C., 2009. Biotransformation and antioxidant enzymes of *Dreissena polymorpha* for detection of site impact in watercourses of Berlin. *Journal of Environmental Monitoring* 11, 1147. doi:10.1039/b820734h
- Contardo-Jara, V., Otterstein, S.K.B., Downing, S., Downing, T.G., Pflugmacher, S., 2014. Response of antioxidant and biotransformation systems of selected freshwater mussels (*Dreissena polymorpha*, *Anadonta cygnea*, *Unio tumidus*, and *Corbicula javanicus*) to the cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine. *Toxicol. Environ. Chem.* 96, 451–465. doi:10.1080/02772248.2014.945452
- Contardo-Jara, V., Wiegand, C., 2008. Molecular biomarkers of *Dreissena polymorpha* for evaluation of renaturation success of a formerly sewage polluted stream. *Environmental Pollution* 155, 182–189. doi:10.1016/j.envpol.2007.10.018
- Coughlan, J., 1969. The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Marine Biology* 2, 356–358. doi:10.1007/BF00355716
- Couleau, N., Techer, D., Pagnout, C., Jomini, S., Foucaud, L., Laval-Gilly, P., Falla, J., Bennisroune, A., 2012. Hemocyte responses of *Dreissena polymorpha* following a short-term in vivo exposure to titanium dioxide nanoparticles: Preliminary investigations. *Science of The Total Environment* 438, 490–497. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.08.095
- Dagnino, A., Allen, J.I., Moore, M.N., Broeg, K., Canesi, L., Viarengo, A., 2007. Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. *Biomarkers* 12, 155–172. doi:10.1080/13547500601037171

- Dagnino, A., Sforzini, S., Dondero, F., Fenoglio, S., Bona, E., Jensen, J., Viarengo, A., 2008. A weight-of-evidence approach for the integration of environmental “triad” data to assess ecological risk and biological vulnerability. *Integrated Environmental Assessment and Management* 4, 314–326. doi:10.1897/IEAM_2007-067.1
- Dallas, L.J., Bean, T.P., Turner, A., Lyons, B.P., Jha, A.N., 2013. Oxidative DNA damage may not mediate Ni-induced genotoxicity in marine mussels: Assessment of genotoxic biomarkers and transcriptional responses of key stress genes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 754, 22–31. doi:10.1016/j.mrgentox.2013.03.009
- Davids, C., Kraak, M.H.S., 1993. Trematode parasites of the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*), in: Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), *Zebra Mussels - Biology, Impacts and Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 749–759.
- Davie, T. (Ed.), 2008. Water quality, in: *Fundamentals of Hydrology 2nd Edition*, Routledge Fundamentals of Physical Geography Series. Routledge, London, pp. 125–150.
- Davies, I.M., Vethaak, D. (Eds.), 2012. Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects, ICES cooperative research report. ICES/CIEM, Copenhagen.
- De Coen, W.M., Janssen, C.R., 1997. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular energy allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 6, 43–55. doi:10.1023/A:1008228517955
- De Coen, W.M., Janssen, C.R., Giesy, J.P., 2000. Biomarker applications in ecotoxicology: bridging the gap between toxicology and ecology, in: Persoone, G., Janssen, Colin R., De Coen, Wim M. (Eds.), *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. Springer, Boston, MA, pp. 13–25.
- 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. doi:10.1016/S0166-445X(99)00094-6
- De Ventura, L., Sarpe, D., Kopp, K., Jokela, J., 2016. Variability in phenotypic tolerance to low oxygen in invasive populations of quagga and zebra mussels. *Aquatic Invasions* 11, 267–276. doi:10.3391/ai.2016.11.3.05
- Del Piero, S., Masiero, L., Casellato, S., 2012. Influence of temperature on fluoride toxicity and bioaccumulation in the nonindigenous freshwater mollusk *Dreissena polymorpha* Pallas, 1769. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 2567–2571. doi:10.1002/etc.1979
- den Besten, P.J., 1998. Concepts for the implementation of biomarkers in environmental monitoring. *Marine Environmental Research* 46, 253–256. doi:10.1016/S0141-1136(97)00049-4
- Depledge, M.H., 1994. The rationale basis for the use of biomarkers as ecological tools, in: Fossi, M.C., Leonzio, C. (Eds.), *Non Destructive Biomarkers in Vertebrates*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 271–296.
- Depledge, M.H., Fossi, M.C., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Invertebrates. Ecotoxicology* 3, 161–172. doi:10.1007/BF00117081
- Dermott, R., Munawar, M., 1993. Invasion of Lake Erie offshore sediments by *Dreissena*, and its ecological implications. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50, 2298–2304. doi:10.1139/f93-254
- Devin, S., Burgeot, T., Giambérini, L., Minguez, L., Pain-Devin, S., 2014a. The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 2448–2454. doi:10.1007/s11356-013-2169-9

- Devin, S., Giamberini, L., Pain-Devin, S., 2014b. Variation in variance means more than mean variations: What does variability tell us about population health status? *Environment International* 73, 282–287. doi:10.1016/j.envint.2014.08.002
- Di Poi, C., Costil, K., Bouchart, V., Halm-Lemeille, M.-P., 2017. Toxicity assessment of five emerging pollutants, alone and in binary or ternary mixtures, towards three aquatic organisms. *Environmental Science and Pollution Research* 1–13. doi:10.1007/s11356-017-9306-9
- Di Toro, D.M., Allen, H.E., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Paquin, P.R., Santore, R.C., 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 2383–2396. doi:10.1897/1551-5028(2001)020<2383:BLMOTA>2.0.CO;2
- Diamantino, T.C., Almeida, E., Soares, A.M., Guilhermino, L., 2001. Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* straus. *Chemosphere* 45, 553–560. doi:10.1016/S0045-6535(01)00029-7
- Dietz, T.H., Lessard, D., Silverman, H., Lynn, J.W., 1994. Osmoregulation in *Dreissena polymorpha*: the importance of Na, Cl, K, and particularly Mg. *The Biological Bulletin* 187, 76–83. doi:10.2307/1542167
- Diggins, T.P., 2001. A seasonal comparison of suspended sediment filtration by quagga (*Dreissena bugensis*) and zebra (*D. polymorpha*) mussels. *Journal of Great Lakes Research* 27, 457–466. doi:10.1016/S0380-1330(01)70660-0
- Domm, S., McCauley, R.W., Kott, E., Ackerman, J.D., 1993. Physiological and taxonomic separation of two dreissenid mussels in the Laurentian Great Lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50, 2294–2297. doi:10.1139/f93-253
- Durou, C., Mouneyrac, C., Pellerin, J., Péry, A., 2008. Conséquence des perturbations du métabolisme énergétique, in: Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C. (Eds.), *Les Biomarqueurs Dans L'évaluation de L'état Écologique Des Milieux Aquatiques*. Lavoisier, Paris, pp. 273–294.
- Durou, C., Poirier, L., Amiard, J.-C., Budzinski, H., Gnassia-Barelli, M., Lemenach, K., Peluhet, L., Mouneyrac, C., Roméo, M., Amiard-Triquet, C., 2007. Biomonitoring in a clean and a multi-contaminated estuary based on biomarkers and chemical analyses in the endobenthic worm *Nereis diversicolor*. *Environmental Pollution* 148, 445–458. doi:10.1016/j.envpol.2006.12.022
- Eckroat, L.E., Masteller, E.C., Shaffer, J.C., Steele, L.M., 1993. The byssus of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): morphology, byssal thread formation, and detachment, in: Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), *Zebra Mussels - Biology, Impacts and Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 239–263.
- Elderkin, C.L., Klerks, P.L., 2005. Variation in thermal tolerance among three Mississippi River populations of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Journal of Shellfish Research* 24, 221–226. doi:10.2983/0730-8000(2005)24[221:VITTAT]2.0.CO;2
- Elliott, P., Aldridge, D.C., Moggridge, G.D., 2008. Zebra mussel filtration and its potential uses in industrial water treatment. *Water Research* 42, 1664–1674. doi:10.1016/j.watres.2007.10.020
- Epel, D., 1998. Use of multidrug transporters as first lines of defense against toxins in aquatic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 120, 23–28. doi:10.1016/S1095-6433(98)10005-3
- Erel, O., 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry* 37, 277–285. doi:10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015
- Eufemia, N.A., Epel, D., 2000. Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to

- environmental stresses. *Aquatic toxicology* 49, 89–100. doi:10.1016/S0166-445X(99)00068-5
- Evariste, L., Rioult, D., Brousseau, P., Geffard, A., David, E., Auffret, M., Fournier, M., Betoulle, S., 2017. Differential sensitivity to cadmium of immunomarkers measured in hemocyte subpopulations of zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 137, 78–85. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.11.027
- Eymard, S., Genot, C., 2003. A modified xylenol orange method to evaluate formation of lipid hydroperoxides during storage and processing of small pelagic fish. *European Journal of Lipid Science and Technology* 105, 497–501. doi:10.1002/ejlt.200300768
- Falfushynska, H., Gnatyshyna, L., Yurchak, I., Ivanina, A., Stoliar, O., Sokolova, I., 2014. Habitat pollution and thermal regime modify molecular stress responses to elevated temperature in freshwater mussels (*Anodonta anatina*: Unionidae). *Science of The Total Environment* 500–501, 339–350. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.08.112
- Falfushynska, H., Gnatyshyna, L., Yurchak, I., Stoliar, O., Sokolova, I.M., 2016. Interpopulational variability of molecular responses to ionizing radiation in freshwater bivalves *Anodonta anatina* (Unionidae). *Science of The Total Environment* 568, 444–456. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.05.175
- Falfushynska, H.I., Gnatyshyna, L.L., Stoliar, O.B., 2013. Effect of in situ exposure history on the molecular responses of freshwater bivalve *Anodonta anatina* (Unionidae) to trace metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 89, 73–83. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.11.024
- Fanslow, D.L., Nalepa, T.F., Johengen, T.H., 2001. Seasonal changes in the respiratory electron transport system (ETS) and respiration of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* in Saginaw Bay, Lake Huron. *Hydrobiologia* 448, 61–70. doi:10.1023/A:1017582119098
- Faria, M., Carrasco, L., Díez, S., Riva, M.C., Bayona, J.M., Barata, C., 2009. Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149, 281–288. doi:10.1016/j.cbpc.2008.07.012
- Faria, M., López, M.A., Díez, S., Barata, C., 2010. Are native naiads more tolerant to pollution than exotic freshwater bivalve species? An hypothesis tested using physiological responses of three species transplanted to mercury contaminated sites in the Ebro River (NE, Spain). *Chemosphere* 81, 1218–1226. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.09.037
- Faria, M., Ochoa, V., Blázquez, M., Juan, M.F.S., Lazzara, R., Lacorte, S., Soares, A.M.V.M., Barata, C., 2014. Separating natural from anthropogenic causes of impairment in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) populations living across a pollution gradient. *Aquatic Toxicology* 152, 82–95. doi:10.1016/j.aquatox.2014.03.020
- Farkas, A., Ács, A., Vehovszky, Á., Falfusynska, H., Stoliar, O., Specziár, A., Györi, J., 2017. Interspecies comparison of selected pollution biomarkers in dreissenid spp. inhabiting pristine and moderately polluted sites. *Science of The Total Environment* 599–600, 760–770. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.05.033
- Fattorini, D., Notti, A., Di Mento, R., Cicero, A.M., Gabellini, M., Russo, A., Regoli, F., 2008. Seasonal, spatial and inter-annual variations of trace metals in mussels from the Adriatic sea: A regional gradient for arsenic and implications for monitoring the impact of off-shore activities. *Chemosphere* 72, 1524–1533. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.04.071
- Férard, J.-F., Blaise, C. (Eds.), 2013. *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer, Netherlands.
- Fitzpatrick, P.J., O'Halloran, J., Sheehan, D., Walsh, A.R., 1997. Assessment of glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis*(L.), as a potential organic pollution biomarker. *Biomarkers* 2, 51–56. doi:10.1080/135475097231977

- Forbes, V.E., Calow, P., 2002. Species Sensitivity Distributions revisited: A critical appraisal. *Human and Ecological Risk Assessment* 8, 473–492. doi:10.1080/10807030290879781
- Forbes, V.E., Palmqvist, A., Bach, L., 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 272–280. doi:10.1897/05-257R.1
- Franzellitti, S., Capuzzo, A., Viarengo, A., Fabbri, E., 2011. Interactive effects of nickel and chlorpyrifos on Mediterranean mussel cAMP-mediated cell signaling and MXR-related gene expressions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 154, 377–382. doi:10.1016/j.cbpc.2011.07.006
- Franzellitti, S., Viarengo, A., Dinelli, E., Fabbri, E., 2012. Molecular and cellular effects induced by hexavalent chromium in Mediterranean mussels. *Aquatic Toxicology* 124–125, 125–132. doi:10.1016/j.aquatox.2012.07.011
- Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M.B., Depledge, M.H., 2004. A multibiomarker approach to environmental assessment. *Environmental Science & Technology* 38, 1723–1731. doi:10.1021/es030570+
- Garaud, M., Auffan, M., Devin, S., Felten, V., Pagnout, C., Pain-Devin, S., Proux, O., Rodius, F., Sohm, B., Giambérini, L., 2016. Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Nanotoxicology* 10, 935–944. doi:10.3109/17435390.2016.1146363
- Garaud, M., Trapp, J., Devin, S., Cossu-Leguille, C., Pain-Devin, S., Felten, V., Giambérini, L., 2015. Multibiomarker assessment of cerium dioxide nanoparticle (nCeO₂) sublethal effects on two freshwater invertebrates, *Dreissena polymorpha* and *Gammarus roeselii*. *Aquatic Toxicology* 158, 63–74. doi:10.1016/j.aquatox.2014.11.004
- Garton, D.W., Haag, W.R., 1993. Seasonal reproductive cycles and settlement patterns of *Dreissena polymorpha* in Western Lake Erie, in: Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), *Zebra Mussels - Biology, Impacts and Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 111–128.
- Garton, D.W., McMahon, R., Stoeckmann, A.M., 2014. Limiting environmental factors and competitive interactions between zebra and quagga mussels in North America, in: Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), *Quagga and Zebra Mussels - Biology, Impacts, and Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 383–402.
- Garton, D.W., Payne, C.D., Montoya, J.P., 2005. Flexible diet and trophic position of dreissenid mussels as inferred from stable isotopes of carbon and nitrogen. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62, 1119–1129. doi:10.1139/f05-025
- Giambérini, L., Auffret, M., Pihan, J.-C., 1996. Haemocytes of the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha* Pallas: cytology, cytochemistry and X-ray microanalysis. *Journal of Molluscan Studies* 62, 367–379.
- Giambérini, L., Cajarville, M.P., 2005. Lysosomal responses in the digestive gland of the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*, experimentally exposed to cadmium. *Environmental Research* 98, 210–214. doi:10.1016/j.envres.2004.11.003
- Giambérini, L., Pihan, J.-C., 1997. Lysosomal changes in the hemocytes of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* experimentally exposed to lead and zinc. *Diseases of Aquatic Organisms* 28, 221–227. doi:10.3354/dao028221
- Giesy, J.P., Graney, R.L., 1989. Recent developments in and intercomparisons of acute and chronic bioassays and bioindicators. *Hydrobiologia* 188/189, 21–60. doi:10.1007/BF00027770
- Glyshaw, P.W., Riseng, C.M., Nalepa, T.F., Pothoven, S.A., 2015. Temporal trends in condition and reproduction of quagga mussels (*Dreissena rostriformis bugensis*) in southern Lake Michigan. *Journal of Great Lakes Research* 41, 16–26. doi:10.1016/j.jglr.2015.08.006

- Goedkoop, W., Naddafi, R., Grandin, U., 2011. Retention of N and P by zebra mussels (*Dreissena polymorpha* Pallas) and its quantitative role in the nutrient budget of eutrophic Lake Ekoln, Sweden. *Biological Invasions* 13, 1077–1086. doi:10.1007/s10530-011-9950-9
- Grutters, B.M.C., Verhofstad, M.J.J.M., van der Velde, G., Rajagopal, S., Leuven, R.S.E.W., 2012. A comparative study of byssogenesis on zebra and quagga mussels: the effects of water temperature, salinity and light–dark cycle. *Biofouling* 28, 121–129. doi:10.1080/08927014.2012.654779
- Guerlet, E., Ledy, K., Meyer, A., Giambérini, L., 2007. Towards a validation of a cellular biomarker suite in native and transplanted zebra mussels: A 2-year integrative field study of seasonal and pollution-induced variations. *Aquatic Toxicology* 81, 377–388. doi:10.1016/j.aquatox.2006.12.016
- Guerlet, E., Vasseur, P., Giambérini, L., 2010. Spatial and temporal variations of biological responses to environmental pollution in the freshwater zebra mussel. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1170–1181. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.05.009
- Gundacker, C., 1999. Tissue-specific heavy metal (Cd, Pb, Cu, Zn) deposition in a natural population of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* pallas. *Chemosphere* 38, 3339–3356. doi:10.1016/S0045-6535(98)00567-0
- Gurtu, V., Kain, S.R., Zhang, G., 1997. Fluorimetric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Analytical Biochemistry* 251, 98–102.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry* 249, 7130–7139.
- Hagger, J.A., Jones, M.B., Leonard, D.R., Owen, R., Galloway, T.S., 2006. Biomarkers and integrated environmental risk assessment: are there more questions than answers? *Integrated Environmental Assessment and Management* 2, 312–329. doi:10.1002/ieam.5630020403
- Hagger, J.A., Jones, M.B., Lowe, D., Leonard, D.R.P., Owen, R., Galloway, T.S., 2008. Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: A case study. *Marine Pollution Bulletin* 56, 1111–1118. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.03.040
- Haitzer, M., Höss, S., Traunspurger, W., Steinberg, C., 1998. Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms, a review. *Chemosphere* 37, 1335–1362. doi:10.1016/S0045-6535(98)00117-9
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (Eds.), 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine* - 2nd Edition. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Hamer, B., 2008. Effect of hypoosmotic stress by low salinity acclimation of Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis* on biological parameters used for pollution assessment. *Aquatic Toxicology* 89, 137–151. doi:10.1016/j.aquatox.2008.06.015
- Handy, R.D., Galloway, T.S., Depledge, M.H., 2003. A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. *Ecotoxicology* 12, 331–343. doi:10.1023/A:1022527432252
- Hanson, N., 2011. Using biological data from field studies with multiple reference sites as a basis for environmental management: The risks for false positives and false negatives. *Journal of Environmental Management* 92, 610–619. doi:10.1016/j.jenvman.2010.09.026
- Hanson, N., Förlin, L., Larsson, Å., 2010. Spatial and annual variation to define the normal range of biological endpoints: An example with biomarkers in perch. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 2616–2624. doi:10.1002/etc.300
- Hardin, G., 1960. The competitive exclusion principle. *Science* 131, 1292–1297.

- Hebert, P.D., Muncaster, B.W., Mackie, G.L., 1989. Ecological and genetic studies on *Dreissena polymorpha* (Pallas): a new mollusc in the Great Lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46, 1587–1591. doi:10.1139/f89-202
- Heiler, K., bij de Vaate, A., Ekschmitt, K., von Oheimb, P., Albrecht, C., Wilke, T., 2013. Reconstruction of the early invasion history of the quagga mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*) in Western Europe. *Aquatic Invasions* 8, 53–57. doi:10.3391/ai.2013.8.1.06
- Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., Storey, K.B., 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)Xylenol orange complex formation. *Free Radical Biology and Medicine* 19, 271–280. doi:10.1016/0891-5849(95)00020-X
- Heugens, E.H., Hendriks, A.J., Dekker, T., van Straalen, N.M., Admiraal, W., 2001. A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factors for use in risk assessment. *Critical reviews in toxicology* 31, 247–284. doi:10.1080/20014091111695
- Heugens, E.H.W., 2003. Predicting effects of multiple stressors on aquatic biota. IBED, Universiteit van Amsterdam.
- Heys, K.A., Shore, R.F., Pereira, M.G., Jones, K.C., Martin, F.L., 2016. Risk assessment of environmental mixture effects. *Royal Society of Chemistry Advances* 6, 47844–47857. doi:10.1039/C6RA05406D
- Higgins, S.N., 2014. Meta-analysis of dreissenid effects on freshwater ecosystems, in: Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), *Quagga and Zebra Mussels - Biology, Impacts, and Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 487–494.
- High, K.A., Barthet, V.J., McLaren, J.W., Blais, J.-S., 1997. Characterization of metallothionein-like proteins from zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environmental toxicology and chemistry* 16, 1111–1118. doi:10.1897/1551-5028(1997)016<1111:COMLPF>2.3.CO;2
- Hoy, M.S., Kelly, K., Rodriguez, R.J., 2010. Development of a molecular diagnostic system to discriminate *Dreissena polymorpha* (zebra mussel) and *Dreissena bugensis* (quagga mussel). *Molecular Ecology Resources* 10, 190–192. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02727.x
- Imo, M., Seitz, A., Johannesen, J., 2010. Distribution and invasion genetics of the quagga mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*) in German rivers. *Aquatic Ecology* 44, 731–740. doi:10.1007/s10452-009-9311-2
- INERIS, 2011. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : les polychlorobiphényles (PCB) (No. DRC-11-118962-11081A).
- INERIS, 2006. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques : Nickel et ses dérivés (No. DRC-02-25590-02DF44).
- IRSTEA (Ed.), 2010. Des outils pour mesurer l'impact des toxiques sur l'écosystème aquatique. Science, eaux et territoires 1.
- Iwanyzki, S., McCauley, R.W., 1993. Upper lethal temperature of adult zebra mussels (*Dreissena polymorpha*), in: Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), *Zebra Mussels - Biology, Impacts and Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 667–673.
- Jager, T., Albert, C., Preuss, T.G., Ashauer, R., 2011. General Unified Threshold model of Survival - a toxicokinetic-toxicodynamic framework for ecotoxicology. *Environmental Science & Technology* 45, 2529–2540. doi:10.1021/es103092a
- Jiang, Z.-Y., Woollard, A.C., Wolff, S.P., 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26, 853–856. doi:10.1007/BF02536169
- Johns, C., 2012. Trends of total cadmium, copper, and zinc in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) along the upper reach of the St. Lawrence River: 1994-2005.

- Environmental Monitoring and Assessment 184, 5371–5385. doi:10.1007/s10661-011-2346-6
- Johns, C., 2011. Quagga mussels (*Dreissena bugensis*) as biomonitors of metal contamination: A case study in the upper St. Lawrence River. *Journal of Great Lakes Research* 37, 140–146. doi:10.1016/j.jglr.2010.11.002
- Johns, C., Timmerman, B.E., 1998. Total cadmium, copper, and zinc in two dreissenid mussels, *Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*, at the outflow of Lake Ontario. *Journal of Great Lakes Research* 24, 55–64.
- Johnson, P.D., McMahon, R.F., 1998. Effects of temperature and chronic hypoxia on survivorship of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and Asian clam (*Corbicula fluminea*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55, 1564–1572. doi:10.1139/cjfas-55-7-1564
- Johnston, E.L., 2011. Tolerance to contaminants: evidence from chronically exposed populations of aquatic organisms, in: Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S., Roméo, M. (Eds.), *Tolerance to Environmental Contaminants*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 25–48.
- Johnston, E.L., Roberts, D.A., 2009. Contaminants reduce the richness and evenness of marine communities: A review and meta-analysis. *Environmental Pollution* 157, 1745–1752. doi:10.1016/j.envpol.2009.02.017
- Jones, L.A., Ricciardi, A., 2005. Influence of physicochemical factors on the distribution and biomass of invasive mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*) in the St. Lawrence River. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62, 1953–1962. doi:10.1139/f05-096
- Juhel, G., Davenport, J., O'Halloran, J., Culloty, S.C., O'Riordan, R.M., James, K.F., Furey, A., Allis, O., 2006. Impacts of microcystins on the feeding behaviour and energy balance of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*: A bioenergetics approach. *Aquatic Toxicology* 79, 391–400. doi:10.1016/j.aquatox.2006.07.007
- Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Padilla, D.K., 2015. Zebra versus quagga mussels: a review of their spread, population dynamics, and ecosystem impacts. *Hydrobiologia* 746, 97–112. doi:10.1007/s10750-014-1901-x
- Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Padilla, D.K., 1998. Physical factors that limit the distribution and abundance of *Dreissena polymorpha* (Pall.). *Journal of Shellfish Research* 17, 1219–1235.
- Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Padilla, D.K., 1997. The effects of *Dreissena polymorpha* (Pallas) invasion on aquatic communities in eastern Europe. *Journal of Shellfish Research* 16, 187–203.
- Karatayev, A.Y., Mastitsky, S.E., Padilla, D.K., Burlakova, L.E., Hajduk, M.M., 2011. Differences in growth and survivorship of zebra and quagga mussels: size matters. *Hydrobiologia* 668, 183–194. doi:10.1007/s10750-010-0533-z
- Kashian, D.R., Zuellig, R.E., Mitchell, K.A., Clements, W.H., 2007. The cost of tolerance: sensitivity of stream benthic communities to UV-B and metals. *Ecological Applications* 17, 365–375. doi:10.1890/06-0396
- Kefi, F.J., Mleiki, A., Béjaoui, J.M., El Menif, N.T., 2016. Seasonal variations of trace metal concentrations in the soft tissue of *Lithophaga lithophaga* collected from the Bizerte Bay (Northern Tunisia, Mediterranean Sea). *Journal of Aquaculture Research & Development* 7. doi:10.4172/2155-9546.1000432
- Kerambrun, E., Rioult, D., Delahaut, L., Evariste, L., Pain-Devin, S., Auffret, M., Geffard, A., David, E., 2016. Variations in gene expression levels in four European zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, populations in relation to metal bioaccumulation: A field study.

- Ecotoxicology and Environmental Safety 134, 53–63. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.08.018
- Khan, F.R., Irving, J.R., Bury, N.R., Hogstrand, C., 2011. Differential tolerance of two *Gammarus pulex* populations transplanted from different metallogenic regions to a polymetal gradient. Aquatic Toxicology 102, 95–103. doi:10.1016/j.aquatox.2011.01.001
- Klerks, P.L., Weis, J.S., 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review. Environmental Pollution 45, 173–205. doi:10.1016/0269-7491(87)90057-1
- Klobučar, G.I.V., Pavlica, M., Erben, R., Papeš, D., 2003. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. Aquatic Toxicology 64, 15–23. doi:10.1016/S0166-445X(03)00009-2
- Kobak, J., 2006. Factors influencing the attachment strength of *Dreissena polymorpha* (Bivalvia). Biofouling 22, 141–150. doi:10.1080/08927010600691895
- Kobak, J., Kakareko, T., 2009. Attachment strength, aggregation and movement of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*, Bivalvia) in the presence of potential predators. Fundamental and Applied Limnology / Archiv für Hydrobiologie 174, 193–204. doi:10.1127/1863-9135/2009/0174-0193
- Kopecka, J., Lehtonen, K.K., Baršienė, J., Broeg, K., Vuorinen, P.J., Gercken, J., Pempkowiak, J., 2006. Measurements of biomarker levels in flounder (*Platichthys flesus*) and blue mussel (*Mytilus trossulus*) from the Gulf of Gdańsk (southern Baltic). Marine Pollution Bulletin 53, 406–421. doi:10.1016/j.marpolbul.2006.03.008
- Kovatch, C.E., Schizas, N.V., Chandler, G.T., Coull, B.C., Quattro, J.M., 2000. Tolerance and genetic relatedness of three meiobenthic copepod populations exposed to sediment-associated contaminant mixtures: Role of environmental history. Environmental toxicology and chemistry 19, 912–919. doi:10.1897/1551-5028(2000)019<0912:TAGROT>2.3.CO;2
- Kraak, M.H., Martin, C.T., Peeters, W.H., De Kock, W.C., others, 1991. Biomonitoring of heavy metals in the Western European rivers Rhine and Meuse using the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. Environmental pollution 74, 101–114. doi:10.1016/0269-7491(91)90107-8
- Kraak, M.H.S., Ainscough, C., Fernandez, A., van Vlaardingen, P.L.A., de Voogt, P., Admiraal, W.A., 1997. Short-term and chronic exposure of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) to acridine: effects and metabolism. Aquatic Toxicology 37, 9–20. doi:10.1016/s0166-445x(96)00809-0
- Kraak, M.H.S., Lavy, D., Schoon, H., Toussaint, M., Peeters, W.H.M., van Straalen, N.M., 1994. Ecotoxicity of mixtures of metals to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. Environmental Toxicology and Chemistry 13, 109–114. doi:10.1897/1552-8618(1994)13[109:EOMOMT]2.0.CO;2
- Kraak, M.H.S., Schoon, H., Peeters, W.H.M., Vanstraalen, N.M., 1993. Chronic Ecotoxicity of Mixtures of Cu, Zn, and Cd to the Zebra Mussel *Dreissena polymorpha*. Ecotoxicology and Environmental Safety 25, 315–327. doi:10.1006/eesa.1993.1029
- Kraemer, L.D., Evans, D., Dillon, P.J., 2013. Temporal and spatial variation in Hg accumulation in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): Possible influences of DOC and diet. Ecotoxicology and Environmental Safety 91, 71–78. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.01.011
- Kryger, J., Riisgard, H.U., 1988. Filtration rate capacities in 6 species of European freshwater bivalves. Oecologia 77, 34–38. doi:10.1007/BF00380921

- Kurelec, B., Smital, T., Pivčević, B., Eufemia, N.A., Epel, D., 2000. Multixenobiotic resistance, P-glycoprotein, and chemosensitizers. *Ecotoxicology* 9, 307–327. doi:10.1023/A:1026560922731
- Kwon, T.-D., Fisher, S.W., Kim, G.W., Hwang, H., Kim, J.-E., 2006. Trophic transfer and biotransformation of polychlorinated biphenyls in zebra mussel, round goby, and smallmouth bass in Lake Erie, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 1068–1078. doi:10.1897/05-180R.1
- Lagadic, L., Caquet, T., Ramade, F., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology* 3, 193–208. doi:10.1007/BF00117084
- Lam, P.K., Gray, J.S., 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin* 46, 182–186. doi:10.1016/S0025-326X(02)00449-6
- Lannig, G., Flores, J.F., Sokolova, I.M., 2006. Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: Pollution reduces temperature tolerance in oysters. *Aquatic Toxicology* 79, 278–287. doi:10.1016/j.aquatox.2006.06.017
- Lawrence, R.A., Burk, R.F., 1976. Glutathione Peroxidase Activity in Selenium-Deficient Rat Liver. *Biochemical and biophysical research communications* 71, 952–958. doi:10.1016/0006-291X(76)90747-6
- Lazzara, R., Fernandes, D., Faria, M., López, J.F., Tauler, R., Porte, C., 2012. Changes in lipid content and fatty acid composition along the reproductive cycle of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*: Its modulation by clofibrate exposure. *Science of The Total Environment* 432, 195–201. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.05.094
- Le Goff, J., Gallois, J., Pelhuet, L., Devier, M.H., Budzinski, H., Pottier, D., André, V., Cachot, J., 2006. DNA adduct measurements in zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, Pallas. *Aquatic Toxicology* 79, 55–64. doi:10.1016/j.aquatox.2006.05.002
- Lecoeur, S., Videmann, B., Berny, P., 2004. Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*. *Environmental Research* 94, 184–191. doi:10.1016/S0013-9351(03)00069-0
- Leiniö, S., Lehtonen, K.K., 2005. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 140, 408–421. doi:10.1016/j.cca.2005.04.005
- Lenz, M., da Gama, B.A.P., Gerner, N.V., Gobin, J., Gröner, F., Harry, A., Jenkins, S.R., Kraufvelin, P., Mummelthei, C., Sareyka, J., Xavier, E.A., Wahl, M., 2011. Non-native marine invertebrates are more tolerant towards environmental stress than taxonomically related native species: Results from a globally replicated study. *Environmental Research* 111, 943–952. doi:10.1016/j.envres.2011.05.001
- Lepom, P., Irmer, U., Wellnitz, J., 2012. Mercury levels and trends (1993–2009) in bream (*Abramis brama* L.) and zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from German surface waters. *Chemosphere* 86, 202–211. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.10.021
- Leslie, E.M., Deeley, R.G., Cole, S.P.C., 2005. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology* 204, 216–237. doi:10.1016/j.taap.2004.10.012
- Li, L., Zheng, B., Liu, L., 2010. Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: Definitions, approaches and trends. *Procedia Environmental Sciences* 2, 1510–1524. doi:10.1016/j.proenv.2010.10.164
- Lindeman, R.L., 1942. The trophic-dynamic aspect of ecology. *Ecology* 23, 399–417.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin* 42, 656–666. doi:10.1016/S0025-326X(01)00060-1

- Livingstone, D.R., Lips, F., Martinez, P.G., Pipe, R.K., 1992. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 112, 265–276. doi:10.1007/BF00702471
- Lori, E., Cianfanelli, S., 2006. New records of *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) (Mollusca: Bivalvia: Dreissenidae) from Central Italy. *Aquatic Invasions* 1, 281–283. doi:10.3391/ai.2006.1.4.11
- Luckenbach, T., Corsi, I., Epel, D., 2004. Fatal attraction: Synthetic musk fragrances compromise multixenobiotic defense systems in mussels. *Marine Environmental Research* 58, 215–219. doi:10.1016/j.marenvres.2004.03.017
- Luoma, S.N., Cain, D.J., Ho, K., Hutchinson, A., 1983. Variable tolerance to copper in two species from San Francisco Bay. *Marine environmental research* 10, 209–222. doi:0141-1136/83/\$03.00
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101, 13–30. doi:10.1016/j.aquatox.2010.10.006
- MacIsaac, H.J., 1994. Comparative Growth and Survival of *Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*, Exotic Molluscs Introduced to the Great Lakes. *Journal of Great Lakes Research* 20, 783–790. doi:10.1016/S0380-1330(94)71196-5
- Mackie, G.L., Schloesser, D.W., 1996. Comparative biology of zebra mussels in Europe and North America: an overview. *American Zoologist* 36, 244–258.
- Madon, S.P., Schneider, D.W., Stoeckel, J.A., 1998a. In situ estimation of zebra mussel metabolic rates using the electron transport system (ETS) assay. *Journal of Shellfish Research* 17, 195–203.
- Madon, S.P., Schneider, D.W., Stoeckel, J.A., Sparks, R.E., 1998b. Effects of inorganic sediment and food concentrations on energetic processes of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*: implications for growth in turbid rivers. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55, 401–413. doi:10.1139/cjfas-55-2-401
- Magni, S., Parolini, M., Binelli, A., 2014. Sublethal effects induced by morphine to the freshwater biological model *Dreissena polymorpha*. *Environmental Toxicology* 31, 58–67. doi:10.1002/tox.22021
- Magni, S., Parolini, M., Della Torre, C., de Oliveira, L.F., Catani, M., Guzzinati, R., Cavazzini, A., Binelli, A., 2017. Multi-biomarker investigation to assess toxicity induced by two antidepressants on *Dreissena polymorpha*. *Science of The Total Environment* 578, 452–459. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.10.208
- Mantecca, P., Bacchetta, R., Vailati, G., 2010. Field application of histopathological biomarkers in *Dreissena polymorpha*, in: van der Velde, G., Rajagopal, S., bij de Vaate, A. (Eds.), *The Zebra Mussel in Europe*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp. 285–294.
- Mantecca, P., Vailati, G., Bacchetta, R., 2006. Histological changes and Micronucleus induction in the Zebra mussel *Dreissena polymorpha* after Paraquat exposure. *Histology and Histopathology* 21, 829–840.
- Marasinghe Wadige, C.P.M., Taylor, A.M., Maher, W.A., Ubrihien, R.P., Krikowa, F., 2014. Effects of lead-spiked sediments on freshwater bivalve, *Hyridella australis*: linking organism metal exposure-dose-response. *Aquatic Toxicology* 149, 83–93. doi:10.1016/j.aquatox.2014.01.017
- Marescaux, J., Boets, P., Lorquet, J., Sablon, R., Van Doninck, K., Beisel, J.-N., 2015. Sympatric *Dreissena* species in the Meuse River: towards a dominance shift from zebra to quagga mussels. *Aquatic Invasions* 10, 287–298. doi:10.3391/ai.2015.10.3.04
- Marescaux, J., Falisse, E., Lorquet, J., Van Doninck, K., Beisel, J.-N., Descy, J.-P., 2016. Assessing filtration rates of exotic bivalves: dependence on algae concentration and seasonal factors. *Hydrobiologia* 777, 67–78. doi:10.1007/s10750-016-2764-0

- Marescaux, J., Van Doninck, K., 2013. Using DNA barcoding to differentiate invasive *Dreissena* species (Mollusca, Bivalvia). *ZooKeys* 365, 235–244. doi:10.3897/zookeys.365.5905
- Marie, V., Baudrimont, M., Boudou, A., 2006a. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere* 65, 609–617. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.01.074
- Marie, V., Gonzalez, P., Baudrimont, M., Bourdineaud, J.-P., Boudou, A., 2006b. Metallothionein response to cadmium and zinc exposures compared in two freshwater bivalves, *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea*. *BioMetals* 19, 399–407. doi:10.1007/s10534-005-4064-4
- Marsden, J.E., Spidle, A.P., May, B., 1996. Review of genetic studies of *Dreissena* spp. *American Zoologist* 36, 259–270. doi:10.1093/icb/36.3.259
- Martel, A.L., Baldwin, B.S., Dermott, R.M., Lutz, R.A., 2001. Species and epilimnion/hypolimnion-related differences in size at larval settlement and metamorphosis in *Dreissena* (Bivalvia). *Limnology and Oceanography* 46, 707–713. doi:10.4319/lo.2001.46.3.0707
- Martinez-Haro, M., Beiras, R., Bellas, J., Capela, R., Coelho, J.P., Lopes, I., Moreira-Santos, M., Reis-Henriques, A.M., Ribeiro, R., Santos, M.M., Marques, J.C., 2015. A review on the ecological quality status assessment in aquatic systems using community based indicators and ecotoxicological tools: what might be the added value of their combination? *Ecological Indicators* 48, 8–16. doi:10.1016/j.ecolind.2014.07.024
- Matthews, J., Schipper, A.M., Hendriks, A.J., Yen Le, T.T., bij de Vaate, A., van der Velde, G., Leuven, R.S.E.W., 2015. A dominance shift from the zebra mussel to the invasive quagga mussel may alter the trophic transfer of metals. *Environmental Pollution* 203, 183–190. doi:10.1016/j.envpol.2015.03.032
- Matthews, M.A., McMahon, R.F., 1999. Effects of temperature and temperature acclimation on survival of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian clams (*Corbicula fluminea*) under extreme hypoxia. *Journal of Molluscan Studies* 65, 317–325. doi:10.1093/mollus/65.3.317
- May, B., Marsden, J.E., 1992. Genetic identification and implications of another invasive species of dreissenid mussel in the Great Lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49, 1501–1506. doi:10.1139/f92-166
- McLaughlan, C., Gallardo, B., Aldridge, D.C., 2014a. How complete is our knowledge of the ecosystem services impacts of Europe's top 10 invasive species? *Acta Oecologica* 54, 119–130. doi:10.1016/j.actao.2013.03.005
- McLaughlan, C., Rose, P., Aldridge, D.C., 2014b. Making the best of a pest: The potential for using invasive Zebra Mussel (*Dreissena Polymorpha*) biomass as a supplement to commercial chicken feed. *Environmental Management* 54, 1102–1109. doi:10.1007/s00267-014-0335-6
- McMahon, R.F., 2002. Evolutionary and physiological adaptations of aquatic invasive animals: *r* selection versus resistance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59, 1235–1244. doi:10.1139/f02-105
- McMahon, R.F., 1996. The physiological ecology of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, in North America and Europe. *American zoologist* 36, 339–363. doi:10.1093/icb/36.3.339
- McMahon, R.F., Matthews, M.A., Ussery, T.A., Chase, R., Clarke, M., 1994. Further studies of heat tolerance in zebra mussels: Effects of temperature acclimation and chronic exposure to lethal temperatures. Presented at the Proceedings of the Fourth International Zebra Mussel Conference, Madison, USA.

- McMahon, R.F., Ussery, T.A., 1995. Thermal tolerance of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) relative to rate of temperature increase and acclimation temperature (Technical report No. EL-95-10), U.S. Army Engineer Waterways Experiment Station. Vicksburg.
- McMahon, R.F., Ussery, T.A., Clarke, M., 1993. Use of emersion as a zebra mussel control method. DTIC Contract report EL-93-1, U.S. Army Corps of Engineers, Washington DC.
- Mellina, E., 1993. Patterns in the distribution and abundance of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in the St. Lawrence River in relation to substrate and other physico-chemical factors. McGill University, Montreal.
- Mersch, J., Beauvais, M.-N., 1997. The micronucleus assay in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to in situ monitor genotoxicity in freshwater environments. Mutation Research 393, 141–149. doi:10.1016/S1383-5718(97)00099-5
- Mersch, J., Beauvais, M.-N., Nagel, P., 1996. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. Mutation Research 371, 47–55. doi:10.1016/S0165-1218(96)90093-2
- Michel, C., 2011. Biomarqueurs de génotoxicité chez *Dreissena polymorpha* : indicateurs de la pression chimique urbaine et variabilité naturelle des lésions de l'ADN. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.
- Milan, M., Matozzo, V., Pauletto, M., Di Camillo, B., Giacomazzo, M., Boffo, L., Binato, G., Marin, M.G., Patarnello, T., Bargelloni, L., 2016. Can ecological history influence response to pollutants? Transcriptomic analysis of Manila clam collected in different Venice lagoon areas and exposed to heavy metal. Aquatic Toxicology 174, 123–133. doi:10.1016/j.aquatox.2016.02.024
- Miller, R.L., Mojares, J.J., Ram, J.L., 1994. Species-specific sperm attraction in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, and the quagga mussel, *Dreissena bugensis*. Canadian Journal of Zoology 72, 1764–1770. doi:10.1139/z94-238
- Mills, E.L., Dermott, R.M., Roseman, E.F., Dustin, D., Mellina, E., Conn, D.B., Spidle, A.P., 1993a. Colonization, ecology, and population structure of the "Quagga" Mussel (Bivalvia: Dreissenidae) in the Lower Great Lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 50, 2305–2314. doi:10.1139/f93-255
- Mills, E.L., Roseman, E.F., Rutzke, M., Gutenmann, W.H., Lisk, D.J., 1993b. Contaminant and nutrient element levels in soft tissues of zebra and quagga mussels from waters of southern lake ontario. Chemosphere 27, 1465–1473. doi:10.1016/0045-6535(93)90241-V
- Mills, E.L., Rosenberg, G., Spidle, A.P., Ludyanskiy, M., Pligin, Y., May, B., 1996. A review of the biology and ecology of the quagga mussel (*Dreissena bugensis*), a second species of freshwater dreissenid introduced to North America. American Zoologist 36, 271–286.
- Minguez, L., Boiché, A., Sroda, S., Mastitsky, S., Brulé, N., Bouquerel, J., Giambérini, L., 2012a. Cross-effects of nickel contamination and parasitism on zebra mussel physiology. Ecotoxicology 21, 538–547. doi:10.1007/s10646-011-0814-y
- Minguez, L., Devin, S., Molloy, D.P., Guérol, F., Giambérini, L., 2013. Occurrence of zebra mussel parasites: Modelling according to contamination in France and the USA. Environmental Pollution 176, 261–266. doi:10.1016/j.envpol.2013.01.031
- Minguez, L., Giambérini, L., 2012. Seasonal dynamics of zebra mussel parasite populations. Aquatic Biology 15, 145–151. doi:10.3354/ab00418
- Minguez, L., Lang, A.-S., Beisel, J.-N., Giambérini, L., 2012b. Is there a link between shell morphology and parasites of zebra mussels? Journal of Invertebrate Pathology 109, 229–234. doi:10.1016/j.jip.2011.11.010

- Minguez, L., Meyer, A., Molloy, D.P., Giambérini, L., 2009. Interactions between parasitism and biological responses in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): Importance in ecotoxicological studies. *Environmental Research* 109, 843–850. doi:10.1016/j.envres.2009.07.012
- Minier, C., Akcha, F., Galgani, F., 1993. P-glycoprotein expression in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* in polluted seawater. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 106, 1029–1036. doi:10.1016/0305-0491(93)90068-G
- Minier, C., Moore, M., Galgani, F., Claisse, D., 2006. Multixenobiotic resistance protein expression in *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* and *Crassostrea gigas* from the French coasts. *Marine Ecology Progress Series* 322, 143–154. doi:10.3354/meps322143
- Molloy, D.P., bij de Vaate, A., Wilke, T., Giambérini, L., 2007. Discovery of *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov 1897) in Western Europe. *Biological Invasions* 9, 871–874. doi:10.1007/s10530-006-9078-5
- Molloy, D.P., Giambérini, L., Burlakova, L.E., Karatayev, A.Y., Cryan, J.R., Trajanovski, S.L., Trajanovska, S.P., 2010. Investigations of the endosymbionts of *Dreissena stankovici* with morphological and molecular confirmation of host species, in: van der Velde, G., Rajagopal, S., bij de Vaate, A. (Eds.), *The Zebra Mussel in Europe*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp. 227–238.
- Molloy, D.P., Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Kurandina, D.P., Laruelle, F., 1997. Natural enemies of zebra mussels: Predators, parasites, and ecological competitors. *Reviews in Fisheries Science* 5, 27–97. doi:10.1080/10641269709388593
- Money, C., Braungardt, C.B., Jha, A.N., Worsfold, P.J., Achterberg, E.P., 2011. Metal speciation and toxicity of Tamar Estuary water to larvae of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research* 72, 3–12. doi:10.1016/j.marenvres.2011.05.001
- Morel, F.M.M. (Ed.), 1983. *Principles of Aquatic Chemistry*. Wiley, New York.
- Morgan, A.J., Kille, P., Stürzenbaum, S.R., 2007. Microevolution and ecotoxicology of metals in invertebrates. *Environmental Science & Technology* 41, 1085–1096. doi:10.1021/es061992x
- Morton, B., 1993. The anatomy of *Dreissena polymorpha* and the evolution and success of the heteromyarian form in the Dreissenoida, in: Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), *Zebra Mussels - Biology, Impacts and Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 185–215.
- Mouabad, A., Pihan, J.-C., 1993. Le test comportemental de *Dreissena polymorpha* : un outil biologique de prévision et d'évaluation de la toxicité en milieu d'eau douce. *Hydroécologie Appliquée* 5, 97–109.
- Mouneyrac, C., Leung, P.T.Y., Leung, K.M.Y., 2011. Cost of tolerance, in: Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S., Roméo, M. (Eds.), *Tolerance to Environmental Contaminants*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 265–297.
- Mubiana, V.K., Blust, R., 2007. Effects of temperature on scope for growth and accumulation of Cd, Co, Cu and Pb by the marine bivalve *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research* 63, 219–235. doi:10.1016/j.marenvres.2006.08.005
- Müller, J.C., Hidde, D., Seitz, A., 2002. Canal construction destroys the barrier between major European invasion lineages of the zebra mussel. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 269, 1139–1142.
- Naddafi, R., Rudstam, L.G., 2013. Predator-induced behavioural defences in two competitive invasive species: the zebra mussel and the quagga mussel. *Animal Behaviour* 86, 1275–1284. doi:10.1016/j.anbehav.2013.09.032

- Navarro, A., Campos, B., Barata, C., Piña, B., 2013. Transcriptomic seasonal variations in a natural population of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Science of The Total Environment* 454–455, 482–489. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.03.048
- Navarro, A., Faria, M., Barata, C., Piña, B., 2011. Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. *Environmental Pollution* 159, 100–107. doi:10.1016/j.envpol.2010.09.018
- Navarro, A., Weißbach, S., Faria, M., Barata, C., Piña, B., Luckenbach, T., 2012. Abcb and Abcc transporter homologs are expressed and active in larvae and adults of zebra mussel and induced by chemical stress. *Aquatic Toxicology* 122–123, 144–152. doi:10.1016/j.aquatox.2012.06.008
- Navarro, E., Bacardit, M., Caputo, L., Palau, T., Armengol, J., 2006. Limnological characterization and flow patterns of a three coupled reservoir system and their influence on *Dreissena polymorpha* populations and settlement during the stratification period. *Lake and Research Management* 22, 293–302. doi:10.1080/07438140609354363
- Newman, M.C., 2015a. Chapter 1 - Introduction, in: *Fundamentals of Ecotoxicology the Science of Pollution*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1–31.
- Newman, M.C., 2015b. Chapter 3 - Uptake, biotransformation, detoxification, elimination, and accumulation, in: *Fundamentals of Ecotoxicology the Science of Pollution*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 99–127.
- Newman, M.C., 2015c. Chapter 4 - Factors influencing bioaccumulation, in: *Fundamentals of Ecotoxicology the Science of Pollution*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 129–155.
- Newman, M.C., 2015d. Chapter 11 - Effects to communities and ecosystems, in: *Fundamentals of Ecotoxicology the Science of Pollution*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 343–375.
- Newman, M.C., 2015e. Chapter 8 - Sublethal effects to individuals, in: *Fundamentals of Ecotoxicology the Science of Pollution*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 235–274.
- Newman, M.C., 2015f. Chapter 6 - Molecular effects and biomarkers, in: *Fundamentals of Ecotoxicology the Science of Pollution*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 181–208.
- Newman, M.C., 2015g. Chapter 10 - Effects on populations, in: *Fundamentals of Ecotoxicology the Science of Pollution*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 305–342.
- Newman, M.C., 2015h. Chapter 9 - Acute and chronic effects to individuals, in: *Fundamentals of Ecotoxicology the Science of Pollution*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 275–304.
- Newman, M.C., 2015i. Chapter 2 - Major classes of contaminants, in: *Fundamentals of Ecotoxicology the Science of Pollution*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 33–98.
- Nollet, L.M.L., De Gelder, L.S.P. (Eds.), 2014. *Handbook of water analysis - 3rd Edition*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Norton, S.B., Rodier, D.J., Gentile, J.H., van der Schalie, W.H., Wood, W.P., Slimak, M.W., 1992. A framework for ecological risk assessment at the EPA. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, 1663–1672. doi:10.1002/etc.5620111202
- Oertel, N., Salanki, J., 2003. Biomonitoring and bioindicators in aquatic ecosystems, in: Ambasht, R.S., Ambasht, N.K. (Eds.), *Modern Trends in Applied Aquatic Ecology*. Springer, New York, pp. 219–246.
- Orlova, M.I., Khlebovich, V.V., Kpmendantov, A.Y., 1998. Potential euryhalinity of *Dreissena polymorpha* (Pallas) and *Dreissena bugensis* (Andr.). *Russian Journal of Aquatic Ecology* 7, 17–28.
- Orlova, M.I., Muirhead, J.R., Antonov, P.I., Shcherbina, G.K., Starobogatov, Y.I., Biochino, G.I., Therriault, T.W., MacIsaac, H.J., 2004. Range expansion of quagga mussels

- Dreissena rostriformis bugensis* in the Volga River and Caspian Sea basin. *Aquatic Ecology* 38, 561–573. doi:10.1007/s10452-004-0311-y
- Orlova, M.I., Therriault, T.W., Antonov, P.I., Shcherbina, G.K., 2005. Invasion ecology of quagga mussels (*Dreissena rostriformis bugensis*): a review of evolutionary and phylogenetic impacts. *Aquatic Ecology* 39, 401–418. doi:10.1007/s10452-005-9010-6
- Ortega-Calvo, J.-J., Harmsen, J., Parsons, J.R., Semple, K.T., Aitken, M.D., Ajao, C., Eadsforth, C., Galay-Burgos, M., Naidu, R., Oliver, R., Peijnenburg, W.J.G.M., Römbke, J., Streck, G., Versnoren, B., 2015. From bioavailability science to regulation of organic chemicals. *Environmental Science & Technology* 49, 10255–10264. doi:10.1021/acs.est.5b02412
- Osman, A.M., Heuvel, H. van den, Noort, P.C.M. van, 2007. Differential responses of biomarkers in tissues of a freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*, to the exposure of sediment extracts with different levels of contamination. *Journal of Applied Toxicology* 27, 51–59. doi:10.1002/jat.1183
- OSPAR, 2013. Background documents and technical annexes for biological effect monitoring, update 2013.
- OSPAR, 2009. Background document on CEMP assessment criteria for the QSR 2010.
- Owens, T.G., King, F.D., 1975. The measurement of respiratory electron-transport-system activity in marine zooplankton. *Mar. Biol.* 30, 27–36. doi:10.1007/BF00393750
- Packard, T.T., 1968. The Measurement of Respiratory Electron-transport Activity in Marine Phytoplankton. *Journal of Marine Research* 29, 3.
- Paglia, D.E., Valentine, W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 158–169.
- Pain, S., Devin, S., Parant, M., 2007. Biomarker versus environmental factors: Seasonal variations and modelling multixenobiotic defence (MXD) transport activity in transplanted zebra mussels. *Science of The Total Environment* 373, 103–112. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.10.054
- Pain, S., Parant, M., 2003a. Le mécanisme de défense multixénobiotique (MDMX) chez les bivalves. *Comptes Rendus Biologies* 326, 659–672. doi:10.1016/S1631-0691(03)00156-2
- Pain, S., Parant, M., 2003b. Response of multixenobiotic defence mechanism in *Dreissena polymorpha* exposed to environmental stress. *Chemosphere* 52, 1105–1113. doi:10.1016/S0045-6535(03)00356-4
- Pain-Devin, S., Cossu-Leguille, C., Geffard, A., Giambérini, L., Jouenne, T., Minguez, L., Naudin, B., Parant, M., Rodius, F., Rousselle, P., Tarnowska, K., Daguin-Thiébaud, C., Viard, F., Devin, S., 2014. Towards a better understanding of biomarker response in field survey: A case study in eight populations of zebra mussels. *Aquatic Toxicology* 155, 52–61. doi:10.1016/j.aquatox.2014.06.008
- Palais, F., 2011. Potentiel informatif des réponses enzymatiques digestives dans l'évaluation des effets d'un stress toxique sur l'état physiologique des invertébrés aquatiques - Etude de cas chez un bivalve d'eau douce : *Dreissena polymorpha*. Université de Reims.
- Palais, F., Mouneyrac, C., Dedourge-Geffard, O., Giambérini, L., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, A., 2011. One-year monitoring of reproductive and energy reserve cycles in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 83, 1062–1073. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.01.060
- Paquin, P.R., Santore, R.C., Wu, K.B., Kavvas, C.D., Di Toro, D.M., 2000. The biotic ligand model: a model of the acute toxicity of metals to aquatic life. *Environmental Science & Policy* 3, 175–182. doi:10.1016/S1462-9011(00)00047-2

- Parolini, M., Binelli, A., 2013. Adverse effects induced by ecgonine methyl ester to the zebra mussel: A comparison with the benzoylecgonine. *Environmental Pollution* 182, 371–378. doi:10.1016/j.envpol.2013.07.038
- Parolini, M., Magni, S., Binelli, A., 2014. Environmental concentrations of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced cellular stress and modulated antioxidant enzyme activity in the zebra mussel. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 11099–11106. doi:10.1007/s11356-014-3094-2
- Parolini, M., Magni, S., Castiglioni, S., Binelli, A., 2016. Genotoxic effects induced by the exposure to an environmental mixture of illicit drugs to the zebra mussel. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 132, 26–30. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.05.022
- Parolini, M., Pedriali, A., Binelli, A., 2013. Chemical and biomarker responses for site-specific quality assessment of the Lake Maggiore (Northern Italy). *Environmental Science and Pollution Research* 20, 5545–5557. doi:10.1007/s11356-013-1556-6
- Pathy, D.A., Mackie, G.L., 1993. Comparative shell morphology of *Dreissena polymorpha*, *Mytilopsis leucophaeata*, and the “quagga” mussel (*Bivalvia*: *Dreissenidae*) in North America. *Canadian Journal of Zoology* 71, 1012–1023. doi:10.1139/z93-135
- Pavlica, M., Klobučar IV, G., Mojaš, N., Erben, R., Papeš, D., 2001. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 490, 209–214.
- Pavlova, V., Izyumov, Y., 2014. Morphological variability of *Dreissena polymorpha* and *Dreissena rostriformis bugensis* (Mollusca: Bivalvia), in: Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), *Quagga and Zebra Mussels - Biology, Impacts, and Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 287–314.
- Peyer, S.M., Hermanson, J.C., Lee, C.E., 2011. Effects of shell morphology on mechanics of zebra and quagga mussel locomotion. *Journal of Experimental Biology* 214, 2226–2236. doi:10.1242/jeb.053348
- Peyer, S.M., McCarthy, A.J., Lee, C.E., 2009. Zebra mussels anchor byssal threads faster and tighter than quagga mussels in flow. *J Exp Biol* 212, 2027–2036. doi:10.1242/jeb.028688
- Phillips, D.J.H., Rainbow, P.S. (Eds.), 1994. *Biomonitoring of trace aquatic contaminants*. Chapman & Hall, London.
- Pimentel, D., Zuniga, R., Morrison, D., 2005. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics* 52, 273–288. doi:10.1016/j.ecolecon.2004.10.002
- Pollux, B.J.A., Minchin, D., van der Velde, G., Van Alen, T., Moon-van der Staay, S.Y., Hackstein, J., 2003. Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in Ireland, AFLP-fingerprinting and boat traffic both indicate an origin from Britain. *Freshwater Biology* 48, 1127–1139.
- Pollux, B.J.A., van der Velde, G., bij de Vaate, A., 2010. A perspective on global spread of *Dreissena polymorpha*: a review on possibilities and limitations, in: van der Velde, G., Rajagopal, S., bij de Vaate, A. (Eds.), *The Zebra Mussel in Europe*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp. 45–58.
- Posthuma, L., Traas, T.P., Suter II, G.W., 2002. General introduction to Species Sensitivity Distributions, in: Posthuma, L., Suter II, G.W., Traas, T.P. (Eds.), *Species Sensitivity Distribution in Ecotoxicology*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 3–10.
- Potet, M., Devin, S., Pain-Devin, S., Rousselle, P., Giambérini, L., 2016. Integrated multi-biomarker responses in two dreissenid species following metal and thermal cross-stress. *Environmental Pollution* 218, 39–49. doi:10.1016/j.envpol.2016.08.025
- Quinn, A., Gallardo, B., Aldridge, D.C., 2014. Quantifying the ecological niche overlap between two interacting invasive species: the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and

- the quagga mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*). *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* 24, 324–337. doi:10.1002/aqc.2414
- Quinn, B., Gagné, F., Blaise, C., Costello, M.J., Wilson, J.G., Mothersill, C., 2006. Evaluation of the lethal and sub-lethal toxicity and potential endocrine disrupting effect of nonylphenol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 142, 118–127. doi:10.1016/j.cbpc.2005.11.004
- Quinn, B., Gagné, F., Costello, M., McKenzie, C., Wilson, J., Mothersill, C., 2004. The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Toxicology* 66, 279–292. doi:10.1016/j.aquatox.2003.10.007
- Rainbow, P.S., 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental Pollution* 120, 497–507. doi:10.1016/S0269-7491(02)00238-5
- Rajagopal, S., Pollux, B.J.A., Peters, J.L., Cremers, G., Moon-van der Staay, S.Y., van Alen, T., Eygensteyn, J., van Hoek, A., Palau, A., bij de Vaate, A., van der Velde, G., 2009. Origin of Spanish invasion by the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting. *Biological Invasions* 11, 2147–2159. doi:10.1007/s10530-009-9495-3
- Rajagopal, S., van der Velde, G., Jenner, H.A., 2002. Does status of attachment influence survival time of zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, exposed to chlorination? *Environmental toxicology and chemistry* 21, 342–346. doi:10.1002/etc.5620210216
- Rajagopal, S., van der Velde, G., van der Gaag, M., Jenner, H.A., 2005. Byssal detachment underestimates tolerance of mussels to toxic compounds. *Marine Pollution Bulletin* 50, 20–29. doi:10.1016/j.marpolbul.2004.08.015
- Ram, J.L., Fong, P.P., Garton, D.W., 1996. Physiological aspects of zebra mussel reproduction: maturation, spawning, and fertilization. *American Zoologist* 36, 326–338. doi:10.1093/icb/36.3.326
- Ram, J.L., Karim, A.S., Banno, F., Kashian, D.R., 2012. Invading the invaders: reproductive and other mechanisms mediating the displacement of zebra mussels by quagga mussels. *Invertebrate Reproduction & Development* 56, 21–32. doi:10.1080/07924259.2011.588015
- Ramcharan, C.W., Padilla, D.K., Dodson, S.I., 1992. Models to predict potential occurrence and density of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49, 2611–2620. doi:10.1139/f92-289
- Reeders, H.H., bij de Vaate, A., 1992. Bioprocessing of polluted suspended matter from the water column by the zebra mussel (*Dreissena polymorpha* Pallas). *Hydrobiologia* 239, 53–63. doi:10.1007/BF00027529
- Regoli, F., Gorbi, S., Frenzilli, G., Nigro, M., Corsi, I., Focardi, S., Winston, G.W., 2002. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Marine Environmental Research* 54, 419–423.
- Ribeiro, S., Guilhermino, L., Sousa, J.P., Soares, A.M.V.M., 1999. Novel bioassay based on acetylcholinesterase and lactate dehydrogenase activities to evaluate the toxicity of chemicals to soil isopods. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44, 287–293. doi:10.1006/eesa.1999.1837
- Ricciardi, A., Serrouya, R., Whoriskey, F.G., 1995. Aerial exposure tolerance off zebra and quagga mussels (*Bivalvia: Dreissenidae*): implications for overland dispersal. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52, 470–477. doi:10.1139/f95-048
- Ricciardi, A., Whoriskey, F.G., 2004. Exotic species replacement: shifting dominance of dreissenid mussels in the Soulanges Canal, upper St. Lawrence River, Canada. *Journal of the North American Benthological Society* 23, 507–514. doi:10.1899/0887-3593(2004)023<0507:esrdo>2.0.co;2

- Ricciardi, F., Binelli, A., Provini, A., 2006. Use of two biomarkers (CYP450 and acetylcholinesterase) in zebra mussel for the biomonitoring of Lake Maggiore (northern Italy). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63, 406–412. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.02.007
- Richman, L., Somers, K., 2005. Can we use zebra and quagga mussels for biomonitoring contaminants in the Niagara River? *Water Air Soil Pollut.* 167, 155–178. doi:10.1007/s11270-005-0083-6
- Riva, C., Binelli, A., Cogni, D., Provini, A., 2007. Evaluation of DNA damage induced by decabromodiphenyl ether (BDE-209) in hemocytes of *Dreissena polymorpha* using the comet and micronucleus assays. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 48, 735–743. doi:10.1002/em.20353
- Riva, C., Binelli, A., Provini, A., 2008. Evaluation of several priority pollutants in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in the largest Italian subalpine lakes. *Environmental Pollution* 151, 652–662. doi:10.1016/j.envpol.2007.03.016
- Riva, C., Cristoni, S., Binelli, A., 2012. Effects of triclosan in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*: A proteomic investigation. *Aquatic Toxicology* 118–119, 62–71. doi:10.1016/j.aquatox.2012.03.013
- Robillard, S., Beauchamp, G., Laulier, M., 2003. The role of abiotic factors and pesticide levels on enzymatic activity in the freshwater mussel *Anodonta cygnea* at three different exposure sites. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 135, 49–59. doi:10.1016/S1532-0456(03)00049-8
- Roditi, H.A., Fisher, N.S., 1999. Rates and routes of trace element uptake in zebra mussels. *Limnology and Oceanography* 44, 1730–1749. doi:10.4319/lo.1999.44.7.1730
- Roe, S.L., MacIsaac, H.J., 1997. Deepwater population structure and reproductive state of quagga mussels (*Dreissena bugensis*) in Lake Erie. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54, 2428–2433. doi:10.1139/cjfas-54-10-2428
- Roméo, M., Giambérini, L., 2008. Chapitre 1 - Historique, in: Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C. (Eds.), *Les Biomarqueurs Dans L'évaluation de L'état Écologique Des Milieux Aquatiques*. Lavoisier, Paris, pp. 17–54.
- Rosenberg, G., Ludyanskiy, M.L., 1994. A Nomenclatural Review of *Dreissena* (Bivalvia: Dreissenidae), with Identification of the Quagga Mussel as *Dreissena bugensis*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 51, 1474–1484. doi:10.1139/f94-147
- Ross, K., Cooper, N., Bidwell, J.R., Elder, J., 2002. Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Marine Pollution Bulletin* 44, 671–679. doi:10.1016/S0025-326X(01)00333-2
- Rutzke, M.A., Gutenmann, W.H., Lisk, D.J., Mills, E.L., 2000. Toxic and nutrient element concentrations in soft tissues of zebra and quagga mussels from Lakes Erie and Ontario. *Chemosphere* 40, 1353–1356. doi:10.1016/S0045-6535(99)00281-7
- Schäfer, S., Hamer, B., Treursić, B., Möhlenkamp, C., Spira, D., Korlević, M., Reifferscheid, G., Claus, E., 2012. Comparison of bioaccumulation and biomarker responses in *Dreissena polymorpha* and *D. bugensis* after exposure to resuspended sediments. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 62, 614–627. doi:10.1007/s00244-011-9735-2
- Schaller, J., Planer-Friedrich, B., 2017. The filter feeder *Dreissena polymorpha* affects nutrient, silicon, and metal(loid) mobilization from freshwater sediments. *Chemosphere* 174, 531–537. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.02.037

- Seitkalieva, A.V., Menzorova, N.I., Rasskazov, V.A., 2015. Phosphatases of echinoderms and bivalve mollusks of the Japan and Okhotsk seas. *Russian Journal of Marine Biology* 41, 51–59. doi:10.1134/S1063074015010071
- SETAC, 1997. Technical Issue Paper - Ecological Risk Assessment. Society of Environmental Toxicology and Chemistry.
- Shuhaimi-Othman, M., Yakub, N., Ramle, N.A., 2014. Sensitivity of freshwater organisms to nickel. Presented at the International Conference on Biological, Chemical and Environmental Sciences, Penang, Malaysia. doi:10.15242/IICBE.C614022
- Sibly, R.M., Calow, P., 1989. A life-cycle theory of responses to stress. *Biological Journal of the Linnean Society* 37, 101–116. doi:10.1111/j.1095-8312.1989.tb02007.x
- Silverman, H., Lynn, J.W., Achberger, E.C., Dietz, T.H., 1996. Gill structure in Zebra mussels: bacterial-sized particle filtration. *American Zoologist* 36, 373–384. doi:doi.org/10.1093/icb/36.3.373
- Smital, T., Luckenbach, T., Sauerborn, R., Hamdoun, A.M., Vega, R.L., Epel, D., 2004. Emerging contaminants—pesticides, PPCPs, microbial degradation products and natural substances as inhibitors of multitoxinobiotic defense in aquatic organisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552, 101–117. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.06.006
- Smital, T., Sauerborn, R., Hackenberger, B.K., 2003. Inducibility of the P-glycoprotein transport activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* and the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology* 65, 443–465. doi:10.1016/S0166-445X(03)00175-9
- Smital, T., Sauerborn, R., Pivčević, B., Krča, S., Kurelec, B., 2000. Interspecies differences in P-glycoprotein mediated activity of multitoxinobiotic resistance mechanism in several marine and freshwater invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 126, 175–186. doi:10.1016/S0742-8413(00)00110-9
- Smith, D.G., 1999. Differences in siphonal anatomy between *Dreissena polymorpha* and *D. bugensis* (Mollusca: Dreissenidae) in Lake Ontario. *The American Midland Naturalist* 141, 402–405. doi:10.1674/0003-0031(1999)141[0402:DISABD]2.0.CO;2
- Smolders, R., Bervoets, L., Blust, R., 2002. Transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) as active biomonitors in an effluent-dominated river. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 1889–1896. doi:10.1002/etc.5620210916
- Smolders, R., Bervoets, L., De Coen, W., Blust, R., 2004a. Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environmental Pollution* 129, 99–112. doi:10.1016/j.envpol.2003.09.027
- Smolders, R., De Coen, W., Blust, R., 2004b. An ecologically relevant exposure assessment for a polluted river using an integrated multivariate PLS approach. *Environmental Pollution* 132, 245–263. doi:10.1016/j.envpol.2004.04.024
- Sokolova, I., Lannig, G., 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate Research* 37, 181–201. doi:10.3354/cr00764
- Son, M., 2007. Native range of the zebra mussel and quagga mussel and new data on their invasions within the Ponto-Caspian Region. *Aquatic Invasions* 2, 174–184. doi:10.3391/ai.2007.2.3.4
- Sousa, R., Gutiérrez, J.L., Aldridge, D.C., 2009. Non-indigenous invasive bivalves as ecosystem engineers. *Biological Invasions* 11, 2367–2385. doi:10.1007/s10530-009-9422-7

- Sousa, R., Novais, A., Costa, R., Strayer, D.L., 2014. Invasive bivalves in fresh waters: impacts from individuals to ecosystems and possible control strategies. *Hydrobiologia* 735, 233–251. doi:10.1007/s10750-012-1409-1
- Sousa, R., Pilotto, F., Aldridge, D.C., 2011. Fouling of European freshwater bivalves (Unionidae) by the invasive zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): *Freshwater Biology* 56, 867–876. doi:10.1111/j.1365-2427.2010.02532.x
- Spidle, A.P., Marsden, J.E., May, B., 1994. Identification of the Great Lakes quagga mussel as *Dreissena bugensis* from the Dnieper River, Ukraine, on the basis of allozyme variation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 51, 1485–1489. doi:10.1139/f94-148
- Spidle, A.P., May, B., Mills, E.L., 1995a. Limits to tolerance of temperature and salinity in the quagga mussel (*Dreissena bugensis*) and the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52, 2108–2119. doi:10.1139/f95-804
- Spidle, A.P., Mills, E.L., May, B., 1995b. Absence of naturally occurring hybridization between the quagga mussel (*Dreissena bugensis*) and the zebra mussel (*D. polymorpha*) in the lower Great Lakes. *Canadian journal of zoology* 73, 400–403. doi:10.1139/z95-044
- Sprung, M., 1995b. Physiological energetics of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* in lakes I. Growth and reproductive effort. *Hydrobiologia* 304, 117–132. doi:10.1007/BF02579417
- Sprung, M., 1995c. Physiological energetics of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* in lakes III. Metabolism and net growth efficiency. *Hydrobiologia* 304, 147–158. doi:10.1007/BF02579419
- Sprung, M., 1995a. Physiological energetics of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* in lakes II. Food uptake and gross growth efficiency. *Hydrobiologia* 304, 133–146. doi:10.1007/BF02579418
- Sprung, M., 1993. The other life: an account of present knowledge of the larval phase of *Dreissena polymorpha*, in: Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), *Zebra Mussels - Biology, Impacts, and Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 39–53.
- Sprung, M., Borcharding, J., 1991. Physiological and morphometric changes in *Dreissena polymorpha* (Mollusca: Bivalvia) during a starvation period. *Malacologia* 33, 179–191.
- Sprung, M., Rose, U., 1988. Influence of food size and food quantity on the feeding of the mussel *Dreissena polymorpha*. *Oecologia* 77, 526–532.
- Sroda, S., Cossu-Leguille, C., 2011. Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy reserves in the freshwater gammarid *Gammarus roeseli*. *Chemosphere* 83, 538–544. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.12.023
- Stäb, J.A., Frenay, M., Freriks, I.L., Brinkman, U.A.T., Cofino, W.P., 1995. Survey of nine organotin compounds in the Netherlands using the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) as biomonitor. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 2023–2032. doi:10.1002/etc.5620141204
- Stark, J.D., Banks, J.E., Vargas, R., 2004. How risky is risk assessment: The role that life history strategies play in susceptibility of species to stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 732–736. doi:10.1073/pnas.0304903101
- Stepien, C.A., Grigorovich, I.A., Gray, M.A., Sullivan, T.J., Yerga-Woolwine, S., Kalayci, G., 2014. Evolutionary, biogeographic, and population genetic relationships of dreissenid mussels, with revision of component taxa, in: Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), *Quagga and Zebra Mussels - Biology, Impacts, and Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 403–444.

- Stepien, C.A., Hubers, A.N., Skidmore, J.L., 1999. Diagnostic genetic markers and evolutionary relationships among invasive dreissenoid and corbiculoid bivalves in North America: phylogenetic signal from mitochondrial 16S rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13, 31–49. doi:10.1006/mpev.1999.0666
- Stoeckmann, A., 2003. Physiological energetics of Lake Erie dreissenid mussels: a basis for the displacement of *Dreissena polymorpha* by *Dreissena bugensis*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 60, 126–134. doi:10.1139/F03-005
- Stoeckmann, A.M., Garton, D.W., 2001. Flexible energy allocation in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in response to different environmental conditions. *Journal of the North American Benthological Society* 20, 486–500. doi:10.2307/1468043
- Stoeckmann, A.M., Garton, D.W., 1997. A seasonal energy budget for zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in western Lake Erie. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54, 2743–2751. doi:10.1139/f97-184
- Strayer, D.L., Caraco, N.F., Cole, J.J.C., Findlay, S., Pace, M.L., 1999. Transformation of freshwater ecosystems by bivalves - A case study of zebra mussels in the Hudson River. *BioScience* 49, 19–27. doi:10.2307/1313490
- Strayer, D.L., Cid, N., Malcom, H.M., 2011. Long-term changes in a population of an invasive bivalve and its effects. *Oecologia* 165, 1063–1072. doi:10.1007/s00442-010-1792-0
- Strayer, D.L., Smith, L.C., 1993. Distribution of the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*) in estuaries and brackish waters, in: Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), *Zebra Mussels - Biology, Impacts and Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 715–727.
- Stuijzand, S.C., Kraak, M.H.S., Wink, Y.A., Davids, C., 1995. Short-term effects of nickel on the filtration rate of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 54, 376–381. doi:10.1007/BF00195108
- Summers, R.B., Thorp, J.H., Alexander, J.E., Fell, R.D., 1996. Respiratory adjustment of dreissenid mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*) in response to chronic turbidity. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53, 1626–1631. doi:10.1139/cjfas-53-7-1626
- Suresh, K., Mohandas, A., 1990. Hemolymph acid phosphatase activity pattern in copper-stressed bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology* 55, 118–125. doi:10.1016/0022-2011(90)90041-4
- Tachet, H., Richoux, P., Bournaud, M., Usseglio-Polatera, P. (Eds.), 2000. *Invertébrés d'eau douce - Systématique, biologie, écologie*. CNRS Editions, Paris.
- Tarnowska, K., Daguin-Thiebaut, C., Pain-Devin, S., Viard, F., 2013. Nuclear and mitochondrial genetic variability of an old invader, *Dreissena polymorpha* (Bivalvia), in French river basins. *Biological Invasions* 15, 2547–2561. doi:10.1007/s10530-013-0472-5
- Ten Winkel, E.H., Davids, C., 1982. Food selection by *Dreissena polymorpha* Pallas (mollusca: bivalvia). *Freshwater Biology* 12, 553–558. doi:10.1111/j.1365-2427.1982.tb00647.x
- Tessier, C., Blais, J.-S., 1996. Determination of cadmium–metallothioneins in Zebra Mussels exposed to subchronic concentrations of Cd²⁺. *Ecotoxicology and environmental safety* 33, 246–252.
- Teubner, D., Wesslein, A.-K., Rønne, P.B., Veith, M., Frings, C., Paulus, M., 2016. Is a visuo-haptic differentiation of zebra mussel and quagga mussel based on a single external morphometric shell character possible? *Aquatic Invasions* 11, 145–154. doi:10.3391/ai.2016.11.2.04
- Therriault, T.W., Orlova, M.I., 2010. Invasion success within the Dreissenidae: prerequisites, mechanisms and perspectives, in: van der Velde, G., Rajagopal, S., bij de Vaate, A. (Eds.), *The Zebra Mussel in Europe*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp. 59–67.

- Therriault, T.W., Orlova, M.I., Docker, M.F., MacIsaac, H.J., Heath, D.D., 2005. Invasion genetics of a freshwater mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*) in eastern Europe: high gene flow and multiple introductions. *Heredity* 95, 16–23. doi:10.1038/sj.hdy.6800691
- Thomas, E.G., Šrut, M., Štambuk, A., Klobučar, G.I.V., Seitz, A., Griebeler, E.M., 2014. Effects of freshwater pollution on the genetics of Zebra Mussels (*Dreissena polymorpha*) at the molecular and population level. *BioMed Research International* 2014, 1–11. doi:10.1155/2014/795481
- Thorp, J.H., Alexander, J.E., Cobbs, G.A., 2002. Coping with warmer, large rivers: a field experiment on potential range expansion of northern quagga mussels (*Dreissena bugensis*). *Freshwater Biology* 47, 1779–1790. doi:10.1046/j.1365-2427.2002.00902.x
- Thorp, J.H., Casper, A.F., 2003. Importance of biotic interactions in large rivers: an experiment with planktivorous fish, dreissenid mussels and zooplankton in the St. Lawrence River. *River Research and Applications* 19, 265–279. doi:10.1002/rra.703
- Thorp, J.H., Covich, A.P. (Eds.), 2010. Ecology and classification of North American freshwater invertebrates - 3rd Edition, Aquatic ecology series. Academic Press, Oxford, UK.
- Thrush, S.F., Hewitt, J.E., Hickey, C.W., Kelly, S., 2008. Multiple stressor effects identified from species abundance distributions: Interactions between urban contaminants and species habitat relationships. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 366, 160–168. doi:10.1016/j.jembe.2008.07.020
- Tourari, A., 1988. Effets de l'échauffement des eaux sur le cycle de reproduction de la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha* (Bivalve ; Dreissenidae). Université de Lorraine Metz.
- Tutundjian, R., Minier, C., 2007. Effect of temperature on the expression of P-glycoprotein in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Journal of Thermal Biology* 32, 171–177. doi:10.1016/j.jtherbio.2007.01.008
- UE, 2013. Directive 2013/39/UE du Parlement européen et du Conseil du 12 août 2013 modifiant les directives 2000/60/CE et 2008/105/CE en ce qui concerne les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l'eau, Journal Officiel de l'union Européenne n° 226 du 24 août 2013.
- UE, 2008. Directive 2008/105/CE du 16/12/08 établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau, modifiant et abrogeant les directives du Conseil 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/280/CEE et modifiant la directive 2000/60/CE, Journal Officiel de l'union Européenne n° 348 du 24 décembre 2008.
- UE, 2000. Directive 2000/60/EC du Parlement Européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau.
- UE, 1998. Directive 98/83/CE du Conseil du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine, Journal Officiel des Communautés Européennes n° 330 du 5 décembre 1998.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57–149. doi:10.1016/S1382-6689(02)00126-6
- van der Oost, R., Porte-Visa, C., van den Brink, P.J., 2005. Biomarkers in environmental assessment, in: den Besten, P.J., Munawar, M. (Eds.), *Ecotoxicological Testing of Marine and Freshwater Ecosystems: Emerging Techniques, Trends, and Strategies*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 87–137.

- van der Velde, G., Platvoet, D., 2007. Quagga mussels *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov, 1897) in the Main River (Germany). *Aquatic Invasions* 2, 261–264. doi:10.3391/ai.2007.2.3.11
- van der Velde, G., Rajagopal, S., bij de Vaate, A., 2010. From zebra mussels to quagga mussels: an introduction to the Dreissenidae, in: van der Velde, G., Rajagopal, S., bij de Vaate, A. (Eds.), *The Zebra Mussel in Europe*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp. 1–10.
- van Straalen, N., Timmermans, M., 2002. Genetic variation in toxicant-stressed populations: An evaluation of the “Genetic Erosion” hypothesis. *Human and Ecological Risk Assessment* 8, 983–1002. doi:10.1080/1080-700291905783
- Vanderploeg, H.A., Liebig, J.R., Carmichael, W.W., Agy, M.A., Johengen, T.H., Fahnenstiel, G.L., Nalepa, T.F., 2001. Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) selective filtration promoted toxic *Microcystis* blooms in Saginaw Bay (Lake Huron) and Lake Erie. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58, 1208–1221. doi:10.1139/cjfas-58-6-1208
- Vasseur, P., Cossu-Leguille, C., 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environment International* 28, 711–717. doi:10.1016/S0160-4120(02)00116-2
- Verbrugge, L.N.H., Schipper, A.M., Huijbregts, M.A.J., van der Velde, G., Leuven, R.S.E.W., 2012. Sensitivity of native and non-native mollusc species to changing river water temperature and salinity. *Biological Invasions* 14, 1187–1199. doi:10.1007/s10530-011-0148-y
- Vethaak, A.D., Davies, I.M., Thain, J.E., Gubbins, M.J., Martínez-Gómez, C., Robinson, C.D., Moffat, C.F., Burgeot, T., Maes, T., Wosniok, W., Giltrap, M., Lang, T., Hylland, K., 2017. Integrated indicator framework and methodology for monitoring and assessment of hazardous substances and their effects in the marine environment. *Marine Environmental Research* 124, 11–20. doi:10.1016/j.marenvres.2015.09.010
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D.R., 1991. Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 100, 187–190.
- Voets, J., Bervoets, L., Smolders, R., Covaci, A., De Coen, W., Blust, R., 2010. Biomonitoring environmental pollution in freshwater ecosystems using *Dreissena polymorpha*, in: van der Velde, G., Rajagopal, S., bij de Vaate, A. (Eds.), *The Zebra Mussel in Europe*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp. 301–321.
- Voets, J., Redeker, E.S., Blust, R., Bervoets, L., 2009. Differences in metal sequestration between zebra mussels from clean and polluted field locations. *Aquatic Toxicology* 93, 53–60. doi:10.1016/j.aquatox.2009.03.006
- 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. doi:10.1016/j.aquatox.2006.06.001
- Vorkamp, K., McGeer, J.C., 2015. How to improve exposure assessment, in: Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Mouneyrac, C. (Eds.), *Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks*. Academic Press, pp. 77–102.
- Voroshilova, I.S., Artamonova, V.S., Makhrov, A.A., Slyn'ko, Y.V., 2010. Natural hybridization of two mussel species *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) and *Dreissena bugensis* (Andrusov, 1897). *Biology Bulletin* 37, 542–547. doi:10.1134/S1062359010050158

- Wacker, A., Von Elert, E., 2008. Body size and food thresholds for zero growth in *Dreissena polymorpha*: a mechanism underlying intraspecific competition. *Freshwater Biology* 53, 2356–2363. doi:10.1111/j.1365-2427.2008.02051.x
- Waeles, M., Riso, R.D., Le Corre, P., 2005. Seasonal variations of cadmium speciation in the Penzé estuary, NW France. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 65, 143–152. doi:10.1016/j.ecss.2005.06.002
- Walker, C.H. (Ed.), 2009. Organic pollutants: an ecotoxicological perspective - 2nd Edition. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Walz, N., 1978. The energy balance of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* Pallas in laboratory experiments and in Lake Constance - I - Pattern of activity, feeding and assimilation efficiency. *Archiv für Hydrobiologie* 55, 83–105.
- Ward, J.M., Ricciardi, A., 2007. Impacts of *Dreissena* invasions on benthic macroinvertebrate communities: a meta-analysis. *Diversity and Distributions* 13, 155–165. doi:10.1111/j.1472-4642.2007.00336.x
- Weis, J.S., 2011. Tolerance and biodiversity, in: Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S., Roméo, M. (Eds.), *Tolerance to Environmental Contaminants*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 249–264.
- Wernersson, A.-S., Carere, M., Maggi, C., Tusil, P., Soldan, P., James, A., Sanchez, W., Dulio, V., Broeg, K., Reifferscheid, G., Buchinger, S., Maas, H., Van Der Grinten, E., O'Toole, S., Ausili, A., Manfra, L., Marziali, L., Polesello, S., Lacchetti, I., Mancini, L., Lilja, K., Linderoth, M., Lundeborg, T., Fjällborg, B., Porsbring, T., Larsson, D.J., Bengtsson-Palme, J., Förlin, L., Kienle, C., Kunz, P., Vermeirssen, E., Werner, I., Robinson, C.D., Lyons, B., Katsiadaki, I., Whalley, C., den Haan, K., Messiaen, M., Clayton, H., Lettieri, T., Carvalho, R.N., Gawlik, B.M., Hollert, H., Di Paolo, C., Brack, W., Kammann, U., Kase, R., 2015. The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environmental Sciences Europe* 27. doi:10.1186/s12302-015-0039-4
- Whittier, T.R., Ringold, P.L., Herlihy, A.T., Pierson, S.M., 2008. A calcium-based invasion risk assessment for zebra and quagga mussels (*Dreissena spp*). *Frontiers in Ecology and the Environment* 6, 180–184. doi:10.1890/070073
- Wiesner, L., Günther, B., Fenske, C., 2001. Temporal and spatial variability in the heavy-metal content of *Dreissena polymorpha* (Pallas)(Mollusca: Bivalvia) from the Kleines Haff (northeastern Germany). *Hydrobiologia* 443, 137–145. doi:10.1023/A:1017508523148
- Wilson, K.A., Howell, E.T., Jackson, D.A., 2006. Replacement of zebra mussels by quagga mussels in the Canadian nearshore of Lake Ontario: the importance of substrate, round goby abundance, and upwelling frequency. *Journal of Great Lakes Research* 32, 11–28. doi:10.3394/0380-1330(2006)32[11:ROZMBQ]2.0.CO;2
- Wojtal-Frankiewicz, A., Bernasińska, J., Frankiewicz, P., Gwoździński, K., Jurczak, T., 2017. The role of environmental factors in the induction of oxidative stress in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Ecology*. doi:10.1007/s10452-017-9617-4
- Wright, D.A., Setzler-Hamilton, E.M., Magee, J.A., Harvey, H.R., 1996. Laboratory culture of zebra (*Dreissena polymorpha*) and quagga (*D. bugensis*) mussel larvae using estuarine algae. *Journal of Great Lakes Research* 22, 46–54. doi:10.1016/S0380-1330(96)70933-4
- Wu, R.S.S., Lam, P.K., 1997. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase in the green-lipped mussel (*Perna viridis*): possible biomarkers for hypoxia in the marine environment. *Water Research* 31, 2797–2801. doi:10.1016/S0043-1354(97)00116-4
- Xuereb, B., Chaumot, A., Mons, R., Garric, J., Geffard, O., 2009. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda) - Intrinsic variability, reference levels,

- and a reliable tool for field surveys. *Aquatic Toxicology* 93, 225–233. doi:10.1016/j.aquatox.2009.05.006
- Yen Le, T.T., Leuven, R.S.E.W., Hendriks, A.J., 2011. Modeling metal bioaccumulation in the invasive mussels *Dreissena polymorpha* and *Dreissena rostriformis bugensis* in the rivers Rhine and Meuse. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 2825–2830. doi:10.1002/etc.685
- Yurimoto, T., 2015. Seasonal Changes in Glycogen Contents in Various Tissues of the Edible Bivalves, Pen Shell *Atrina lischkeana* , Ark Shell *Scapharca kagoshimensis* , and Manila Clam *Ruditapes philippinarum* in West Japan. *Journal of Marine Biology* 2015, 1–5. doi:10.1155/2015/593032
- Zhulidov, A.V., Kozhara, A.V., Scherbina, G.H., Nalepa, T.F., Protasov, A., Afanasiev, S.A., Pryanichnikova, E.G., Zhulidov, D.A., Gurtovaya, T.Y., Pavlov, D.F., 2010. Invasion history, distribution, and relative abundances of *Dreissena bugensis* in the old world: a synthesis of data. *Biological Invasions* 12, 1923–1940. doi:10.1007/s10530-009-9641-y
- Zhulidov, A.V., Nalepa, T.F., Kozhara, A.V., Zhulidov, D.A., Gurtovaya, T.Y., 2006. Recent trends in relative abundance of two dreissenid species, *Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis* in the Lower Don River system, Russia. *Archiv für Hydrobiologie* 165, 209–220. doi:10.1127/0003-9136/2006/0165-0209
- Zupan, I., Kalafatic, M., 2003. Histological Effects of Low Atrazine Concentration on Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha* Pallas). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70, 688–695. doi:10.1007/s00128-003-0039-8

Annexes

Annexe 1 : Méthodes d'analyse des concentrations en métaux lourds, HAP et PCB dans les sédiments (laboratoire La Drome ; accréditation Cofrac n° 1-0852) et les tissus mous des organismes (MicroPolluants Technologie S.A. ; accréditation Cofrac n° 1-1151).

Analyse des concentrations totales dans les sédiments sur la fraction <2 mm

Minéralisation	EPA 3052 (acides nitrique et hydrofluorique)
HAP et PCB	Spectrométrie de masse couplée à chromatographie en phase gazeuse - (GC-MS, norme XP X 33-012)
Al, Fe, Mn, Zn	Spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES, EN ISO 11885)
As, Cd, Cr, Co, Cu, Ni, Pb	Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS, EN ISO 17294-2)
Hg	Spectrométrie par fluorescence atomique à vapeur froide (CVAFS, EN ISO 17852)

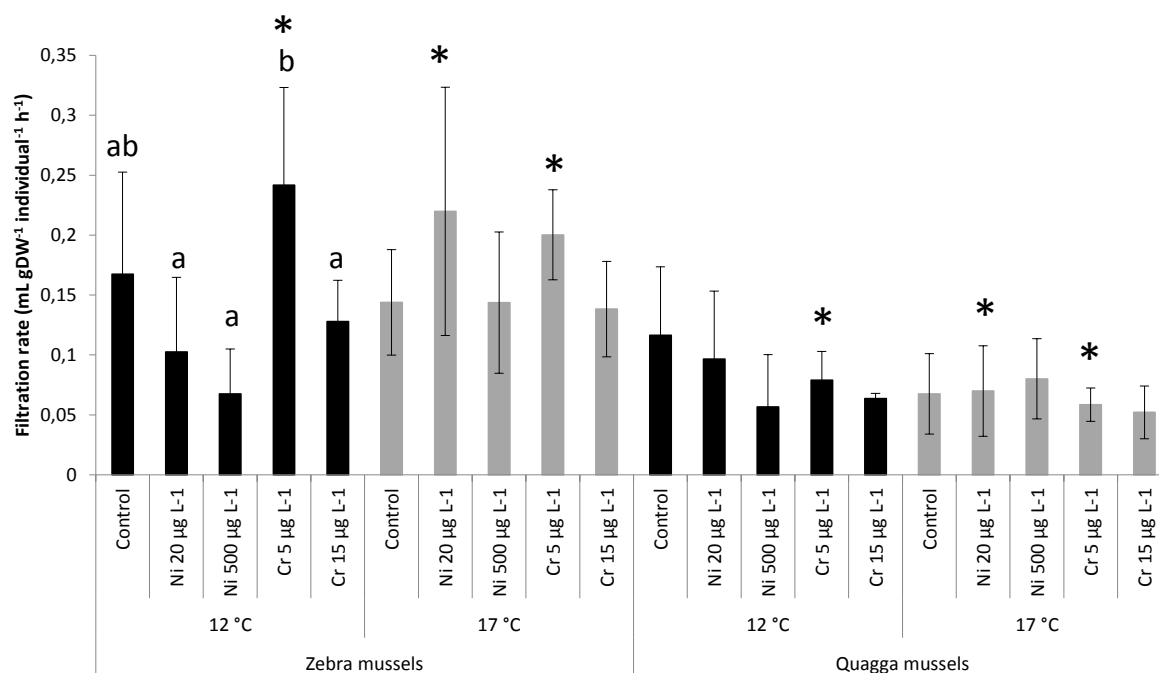
Analyse des concentration totales dans les tissus mous (séchés) des organismes

Al, As, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn	Spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES, EN ISO 11885)
Hg	Spectrométrie par fluorescence atomique à vapeur froide (CVAFS, EN ISO 17852)
Extraction pour organiques	NF EN ISO 15753
HAP	Spectrométrie de masse couplée à chromatographie en phase gazeuse - (GC-MS, norme XP X 33-012)
PCB	Spectrométrie de masse couplée à chromatographie en phase gazeuse - (GC-MS, norme XP X 33-012)

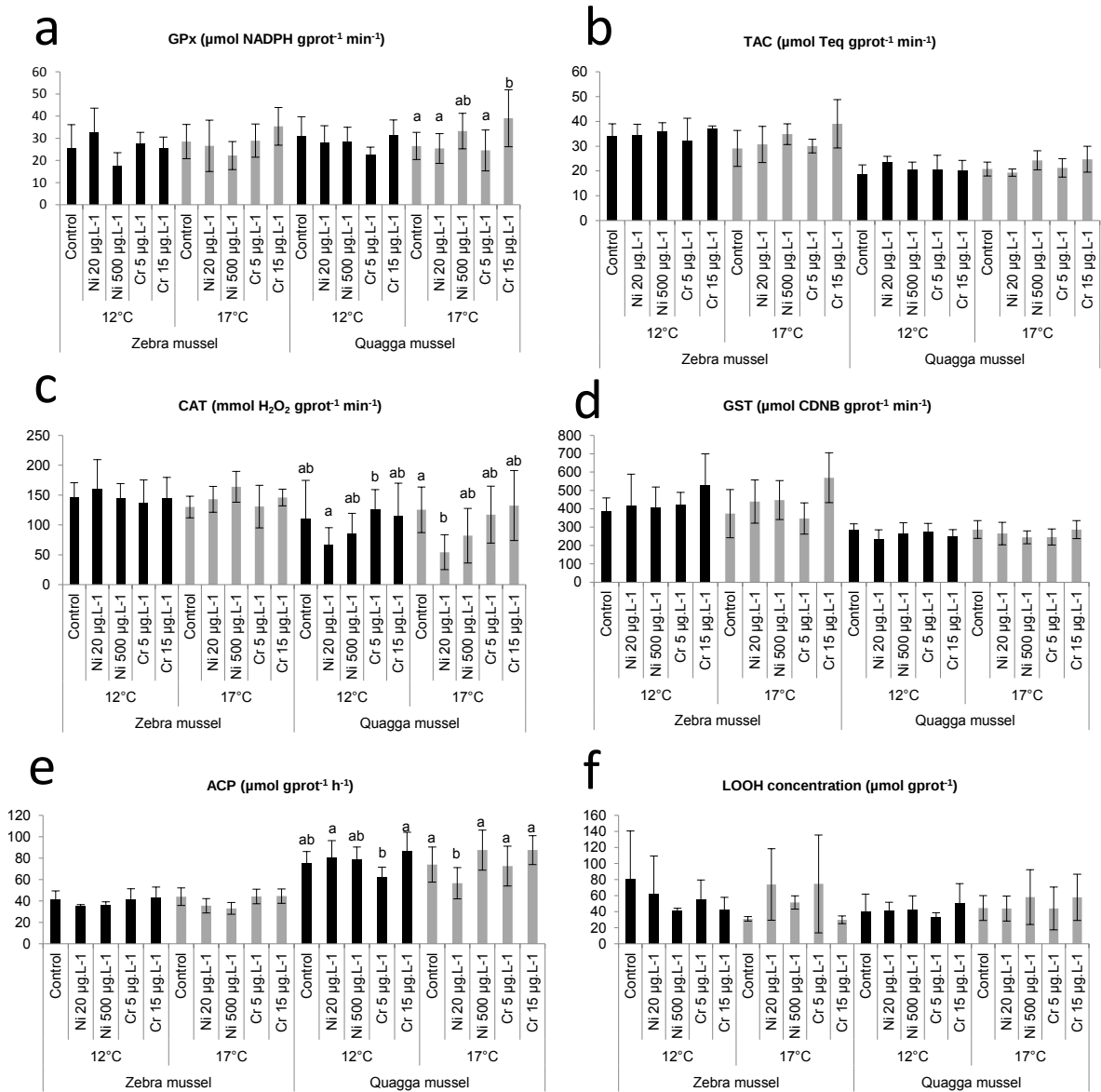
Pour la contamination sédimentaire sur chaque site, 3 prélèvements sont réalisés, mélangés, et 500 g ont été envoyés au laboratoire pour analyse.

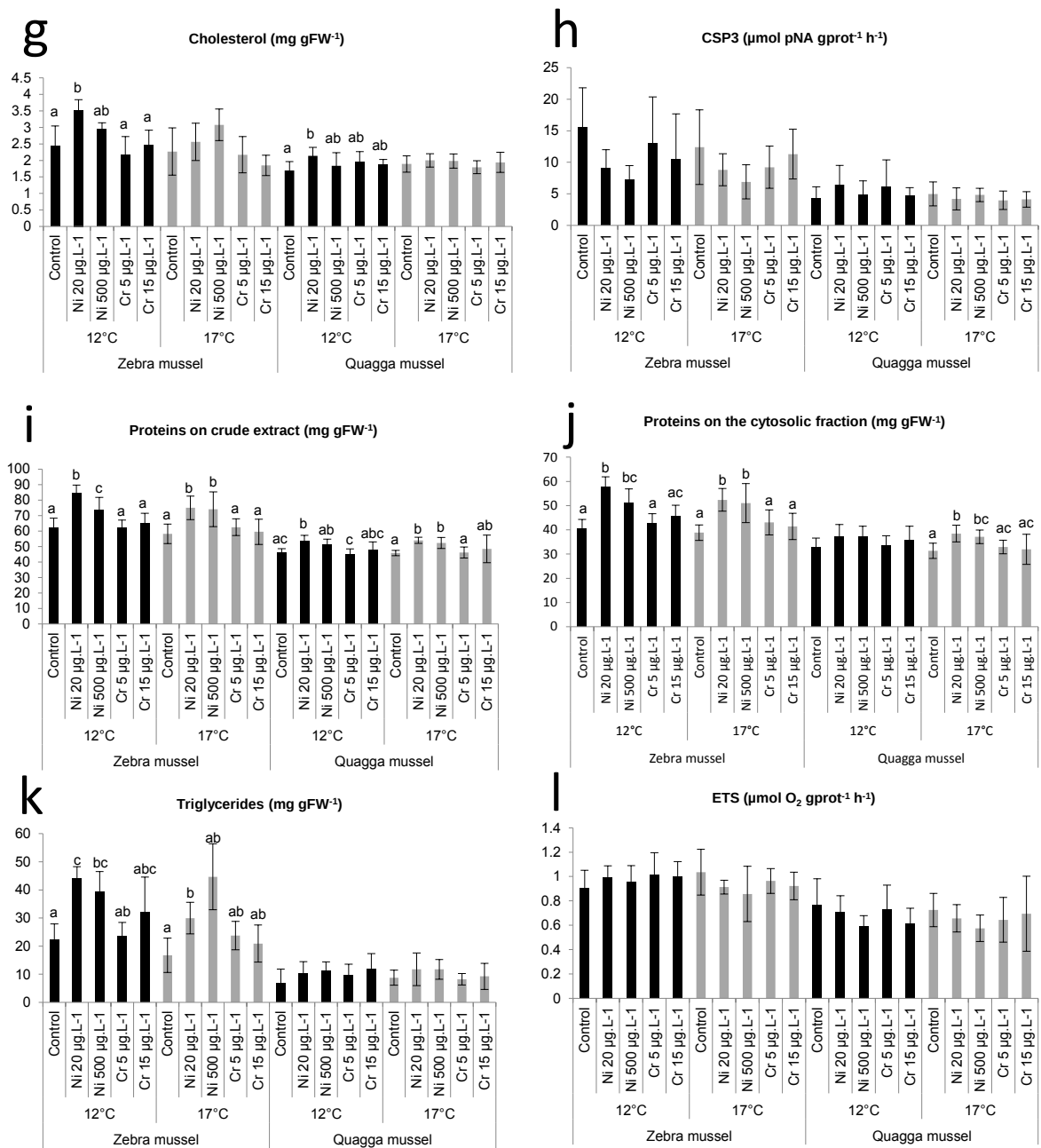
Pour la contamination dans les tissus mous, les individus entiers (sans le byssus) ont été poolés par site (entre 17 et 63 individus selon les sites), et ont été séchés 48 h à 60 °C avant envoi au laboratoire.

Annexe 2 : Données supplémentaires relatives à la publication n°2 “Integrated multi-biomarker responses in two dreissenid species following metal and thermal cross-stress”



*Fig. S1: Graphical representations of filtration rates relative to dry weight of individuals. For each species at a given temperature, values that do not share a common letter are significantly different ($p < 0.05$). * indicates difference between species, at a given temperature, for a given treatment ($p < 0.05$). No letter means no differences between conditions for a given species at a given temperature.*





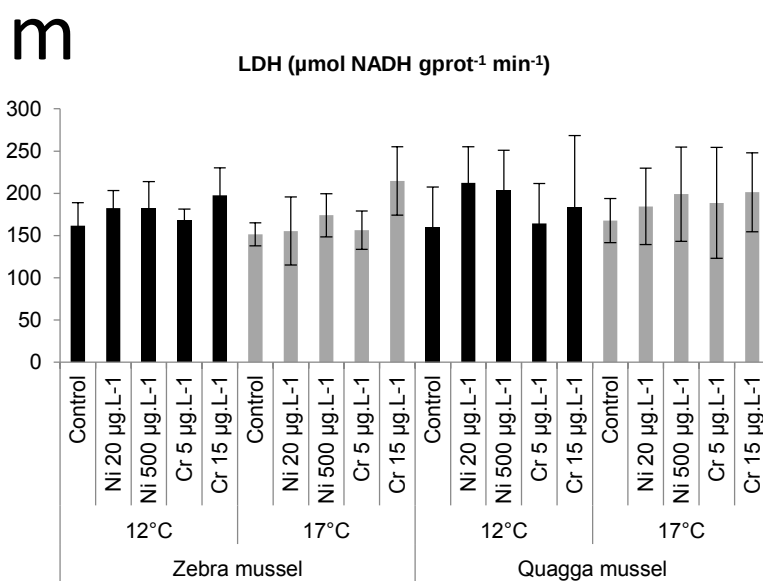


Fig. S2: Graphical representations of *D. polymorpha* and *D. r. bugensis* biomarker responses at 12 and 17 °C after 96 h of exposure to Ni or Cr. Data are expressed as mean $\pm$ SD ($n = 4$ to 8). For each species at a given temperature, values that do not share a common letter are significantly different ($p < 0.05$). No letter means no differences between conditions. Acronyms: GPx (glutathione peroxidase), TAC (total antioxidant capacity), CAT (catalase), GST (glutathione-S-transferase), ACP (acid phosphatase), LOOH (lipid hydroperoxide), CSP3 (caspase-3), ETS (electron transport system), LDH (lactate dehydrogenase).

Annexe 3 : Données supplémentaires relatives à la publication n°3 “Impact of multiple stressors on biomarker responses in sympatric dreissenid populations” – Dosage du glycogène pour l’expérimentation Ni-populations sympatriques

			Ni 0 µg.L ⁻¹		Ni 20 µg.L ⁻¹		Ni 500 µg.L ⁻¹	
			F	NF	F	NF	F	NF
12 °C	Biomarkers	D ₀	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3
		D ₄	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2
		D ₈	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3
	Glycogen	D ₀	ZM1, QM3	ZM1, QM3			ZM1, QM3	ZM1, QM3
		D ₄						
		D ₈	ZM1, QM3	ZM1, QM3			ZM1, QM3	ZM1, QM3
17 °C	Biomarkers	D ₀	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3
		D ₄	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2
		D ₈	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3	ZM1, QM1, ZM2, QM2, QM3

Méthode de dosage du glycogène :

Glycogen content was measured according to Carr and Neff (1984) and adapted for *D. polymorpha* by Palais (2011). Digestive glands were defrosted, weighed and crushed in citrate buffer (0.1 M pH 5) in 2 mL microtubes (15 ml for 500 mg of digestive gland) using a Beadbeater (Retsch MM400®; 30 sec at 30 Hz). Homogenates were placed in boiling water for 4 min, placed on ice, and then centrifuged at 250 x g for 5 min at 4 °C, and at 1,000 x g for 20 min at 4 °C. The supernatants were placed in new 1.5 mL microtubes and centrifuged at 20,000 x g for 50 min at 4 °C. Final supernatants (minimum 400 µL) were equally divided in two tubes A (for total glycogen measurement) and B (for circulating glucose). Standards of glycogen and glucose were prepared. Amyloglucosidase was added to tubes A (5 µL for 200 µL of sample) and in the glycogen standard (2.5 µL for 100 µL of standard) ; the tubes were then placed in a 55 °C bath during 45 min.

Tubes A, B and glycogen were centrifuged at 12,000 x g for 10 min at 4 °C and 90 µL of supernatant were placed in new microtubes, along with the glucose standard. Finally, 810 µL of GOD-POD (glucose oxidase-peroxidase) were added in every tubes (A, B, glycogen and glucose), which were incubated for 45 min at ambient temperature in the dark and absorbances were read at 450 nm.

Glycogen content – Results :

Since the experimental design was not completely straight and all experimental conditions have not been tested (see Table above), glycogen content could not be added to the biomarker battery. This biomarker has been tested for ZM1 and QM3 populations, at D0 and D8, at 12 °C only, and at Ni 0 and Ni 500, with or without algae, and results are presented in Figure S1

Erreur ! Source du renvoi introuvable..

Glycogen content is more stable (and slightly higher) for *D. polymorpha* than for *D. r. bugensis* along the experimentation. The variations observed for *D. r. bugensis* seems to be due to the presence or absence of algae: glycogen and circulating glucose are lowered for unfed mussel, which reduces the level of total glycogen in absence of food. The effect of the absence of food seems however to be reduced for *D. r. bugensis* at D8 compared to D0.

For *D. polymorpha*, we can see a decrease in circulating glucose for all experimental conditions between D0 and D8, whereas glycogen storage increases; this lead to the relative stability of total glycogen along the experiment for this species.

It seems that exposure duration and the absence of food play a preponderant role in glycogen content, rather than nickel contamination.

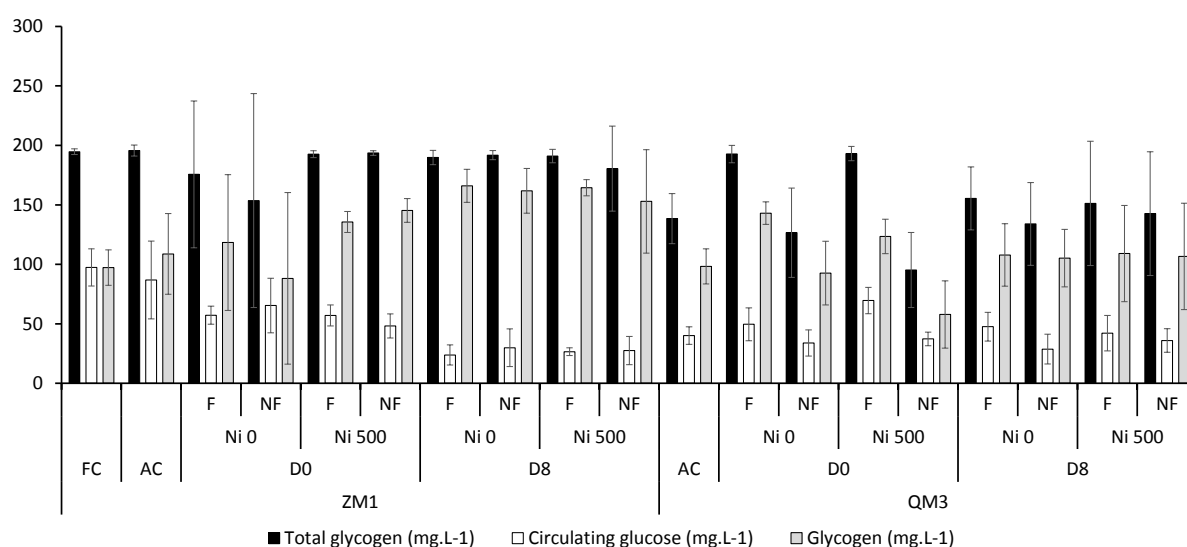


Figure S1: Values obtained for the glycogen-related measurements expressed as mean $\pm$ SD ($n = 5$). Total glycogen corresponds to circulating glucose + glucose derived from glycogen (named “glycogen” here).

Concerning glycogen, we have seen that glycogen content in QM decreases in the absence of food, especially at D0. For ZM, the total glycogen was relatively constant along the experiment, although circulating glucose decreases at D8, whereas stored glycogen increased. We can hypothesize that ZM (1) transforms circulating glucose into glycogen or (2) uses circulating glucose for metabolism while restocking glycogen from other organs. Indeed, some studies have shown that in bivalves, glycogen is mainly stocked in foot and adductor muscle (Yurimoto, 2015); since the digestive gland is the major detoxifying organ, it is possible that mussels reallocate glycogen from other organs to the digestive gland, while using the available glucose in the digestive gland to activate defense mechanisms. This hypothesis cannot be confirmed, since we measured glycogen only in the digestive gland. It would also have been interesting to measure glycogen content at both temperatures, because the impact of dietary stress depends on the temperature, and because glycogen is directly related to food assimilation.

Annexe 4 : Données supplémentaires relatives à la publication n°4 “Differential tolerance to nickel between *Dreissena polymorpha* and *Dreissena rostriformis bugensis* populations”

Element	Unit	Riaucourt	Scey	Nantua	Oise	St Mihiel	Madine	Montigny	Livardun	Jouy	Courcelles	Canal	Seurre
		ZM	ZM	ZM	ZM	ZM	ZM	ZM & QM	QM	QM	QM	QM	QM
Anthracene	$\mu\text{g.kg}^{-1}$ DM	390	<20	513	36	48	42	841	375	114	1,304	32	50
Benzo(a)anthracene		2,890	46	2,362	132	214	487	3,324	1,435	494	5,007	175	517
Benzo(a)pyrene		2,600	52	2,253	200	82	425	3,380	1,265	503	5,291	214	961
Benzo(ghi)perylene		1,570	48	1,280	204	210	239	1,785	976	306	2,770	184	829
Benzo(k)fluoranthene		1,490	27	1,211	97	163	198	1,920	828	232	3,073	130	415
Chrysene		2,560	<50	2,293	144	230	482	3,687	1,496	492	5,310	159	875
Fluoranthene		5,909	90	4,586	385	737	940	7,762	3,306	1,142	12,072	425	2,231
Indeno(1,2,3-cd)pyrene		955	14	791	143	130	150	1,140	535	172	1,607	159	392
Naphtalene		81	<10	<10	<10	18	<10	1,043	70	<10	130	142	10
Phenanthrene		1,910	<50	1,687	148	203	223	2,606	1,611	489	4,579	175	1,244
Sum PCB		<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	112	5	5	<5	6
As	mg.kg^{-1} DM	22.5	24	4.5	6.9	7.8	21.9	11.4	30.6	26.4	16.2	24.1	20.3
Cd		0.3	<0,2	<0,2	0.4	0.3	<0,2	0.3	0.9	1	54.7	0.9	1.1
Cr		116.8	58.3	42.2	62.3	53.9	23	81.5	80.8	93.3	62.4	93.9	71.4
Cu		16.5	13	39.8	15.9	23.1	5.9	44.9	29.6	44.1	79	38.8	358.7
Hg		0.05	0.02	0.52	0.12	0.06	<0,02	0.04	0.28	0.2	4.46	0.2	0.21
Ni		28	16	21.7	18.9	22.6	10.6	16	24.1	42	17.6	37.1	37
Pb		25.2	24.3	143.5	29.2	18.6	8.5	69.7	355.4	61.8	1004	58.5	72.2
Zn		129.1	48.3	128	100.9	122.5	41.3	109.9	853.9	275.9	2443	214.4	537.9
Rank (total)		8	1	5	4	3	2	10	11	9	12	6	7
Rank (organics)		10	1	9	2	4	5	11	8	6	12	3	7
Rank (metals)		7	2	3	5	4	1	6	11	12	8	10	9

Supplementary table I: Contaminant concentrations in the sediments for the 12 sampling sites. Results are expressed relative to dry matter (DM). Sites are classified from the least (1) to the most contaminated (12), considering all the contaminants (rank total), organic pollutants only (rank organics) or metals only (rank metals). Colours indicate the contamination level according to the rank (green: four least contaminated; yellow: four intermediately contaminated; red: four most contaminated).

Résumé en anglais

The regulatory framework defined by the Water Framework Directive requires the development of reliable methodologies for assessing and / or characterizing the health status of aquatic ecosystems. The objective of this thesis was to identify the relative roles of environmental parameters (temperature, seasonal cycle, mineralization), population characteristics and anthropic pressures on biomarker responses in a model aquatic organism, the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). A sister species, *Dreissena rostriformis bugensis*, which invaded more recently our waterways, has been used in parallel and its potential as a biomonitor has also been evaluated. For this purpose, a battery of a dozen sub-cellular biomarkers was measured in different populations of the two species living in contrasting environments, at different times of the year, but also under laboratory stresses. The selected biomarkers corresponded to different physiological and / or antitoxic functions, and responses with high ecological relevance, such as oxygen consumption or filtration activity, were occasionally followed.

These various parameters allowed to question the concepts of sensitivity and vulnerability of the populations and to understand the factors determining biomarker responses. Inter-population differences showed that the accumulation of contaminants by organisms and their biomarker responses depend on environmental quality at the originating site of each population, but also on the season, a confounding factor which must therefore be taken into account during biomonitoring programs. Strong differences in biomarker responses between the two species were also observed, both *in situ* and during laboratory experiments, emphasizing the need to differentiate the two species, so close they are. The recent invader, *D. r. bugensis*, presents more plastic responses *in situ*, but appears less able to manage acute stress in laboratory. Conversely, *D. polymorpha*, which is about 200 years old in France, appears to be better adapted, with less response variability and a better tolerance to contaminants.

This thesis work is part of the BIOMICS convention, carried out in collaboration with ONEMA. It shows that these two species are able to inform about the contamination status of their environment. Variations in biomarker responses at the sub-cellular level indicate early changes in environmental quality. Some biomarkers, however, seem more informative than others do, so the measured battery could be reduced. In the future, this work will allow a better reading and interpretation of biomarkers measured in autochthonous or transplanted populations, and attest the value of biomarkers as tools for assessing aquatic environment quality.

Résumé en français

Le cadre réglementaire défini par la Directive Cadre sur l'Eau impose le développement de méthodologies fiables d'évaluation et/ou de caractérisation de l'état de santé des écosystèmes aquatiques. L'objectif de ce travail de thèse était d'identifier les rôles relatifs des paramètres des milieux aquatiques (température, cycle saisonnier, minéralisation), des caractéristiques des populations et des pressions anthropiques sur les réponses des biomarqueurs chez un organisme aquatique modèle, la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*). Une espèce sœur, *Dreissena rostriformis bugensis*, arrivée plus récemment dans nos cours d'eau, a été suivie en parallèle et son potentiel en tant que biomonitor a également été évalué. Pour cela, une batterie d'une douzaine de biomarqueurs sub-cellulaires a été mesurée dans différentes populations des deux espèces vivant dans des milieux contrastés, à différentes périodes de l'année, mais aussi lors de stress standardisés en laboratoire. Les biomarqueurs choisis correspondaient à différentes fonctions physiologiques et/ou antitoxiques, et des réponses à fortes pertinence écologiques, telles que la consommation d'oxygène ou l'activité de filtration, ont ponctuellement été suivies.

Ces différents paramètres ont permis d'interroger les notions de sensibilité et de vulnérabilité des populations et de mieux comprendre les facteurs déterminant les réponses des biomarqueurs. Les différences inter-populationnelles montrent que l'accumulation des contaminants par les organismes et leurs réponses biologiques sont bien dépendantes de la qualité du biotope propre à chaque population, mais aussi de la saison, un facteur confondant qui doit donc être pris en compte lors de campagnes de biosurveillance. De fortes différences de réponse des biomarqueurs entre les deux espèces ont aussi été observées, aussi bien *in situ* que lors des expositions en laboratoire, soulignant la nécessité de bien différencier ces deux espèces, pourtant très proches. La nouvelle arrivée, *D. r. bugensis*, présente des réponses plus plastiques *in situ*, mais semble moins capable de gérer des stress aigus lors d'expositions en laboratoire. A l'inverse, *D. polymorpha*, arrivée il a 200 ans en France, semble mieux adaptée, avec une variabilité de réponse moins marquée et une meilleure tolérance aux contaminants.

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre de la convention BIOMICS, réalisée en collaboration avec l'ONEMA. Ils montrent que ces deux espèces sont aptes à nous renseigner sur l'état de contamination du milieu dans lequel elles vivent, même si les grilles d'interprétation peuvent être différentes de l'une à l'autre. Les variations des réponses des biomarqueurs au niveau sub-cellulaire témoignent de façon précoce de modifications de la qualité du milieu. Certains biomarqueurs semblent toutefois plus informatifs que d'autres, la batterie mesurée pourrait donc être réduite. A l'avenir, ces travaux permettront une meilleure lecture et interprétation des biomarqueurs mesurés dans des populations autochtones ou transplantées, et attestent de l'intérêt des biomarqueurs en tant qu'outils d'évaluation de la qualité des milieux aquatiques.