UFR Sciences Fondamentales et Appliquées
Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité et Ecosystèmes
LIEBE / CNRS UMR 7146

Ecole Doctorale
Sciences et Ingénierie des Ressources Procédés Produits Environnement – RP2E

THESE
Présentée en vue de l'obtention du titre de
Docteur en ECOTOXICITE ET BIODIVERSITE
par

Edwige GUERLET

UTILISATION DE BIOMARQUEURS CELLULAIRES CHEZ PLUSIEURS ESPECES D'INVERTEBRES POUR L'EVALUATION DE LA CONTAMINATION DES MILIEUX DULÇAQUICOLES

Soutenue le 12 10 2007 devant la commission d'examen composée de :

Claude AMIARD-TRIQUET	Directrice de Recherche, CNRS – Nantes	Rapporteur
Christophe MINIER	Professeur, Université du Havre	Rapporteur
Laure GIAMBERINI	Professeur, Université Paul Verlaine – Metz	Directrice de thèse
Paule VASSEUR	Professeur, Université Paul Verlaine – Metz	Codirectrice de thèse, Présidente du jury
Sandrine PAIN	Maître de Conférences, Université de Reims Champagne-Ardennes	Examinateur

Ph. Wagner

Remerciements

A l'issue de ces années de doctorat, mes premiers remerciements vont à ma directrice de thèse, Laure Giambérini, qui m'a témoigné sa confiance, depuis mon stage de maîtrise, et qui a fait pour moi considérablement plus que sa fonction ne l'exigeait... Laure, merci de m'avoir formée à la recherche, d'avoir tant insisté sur l'importance d'adopter une approche conceptuelle et d'avoir semé chez moi des graines de pragmatisme (qui germent, si, si…). Un immense merci, également, pour ton important investissement pratique et concret dans le travail, tant sur le terrain qu'à la paillasse et surtout devant le microscope. Je tiens également à saluer, du fond du cœur, tes qualités humaines rares, ton écoute, ta patience, ta disponibilité et, enfin, ton hospitalité qui m'a permis de terminer cette rédaction dans de bonnes conditions. J'ai eu beaucoup de chance d'avoir une directrice de thèse si impliquée et dotée d'une si belle âme…

Je remercie également Paule Vasseur d'avoir accepté de co-diriger ce doctorat. Merci à vous de m'avoir fait bénéficier de votre recul et de votre expérience, par vos conseils avisés qui se sont toujours avérés très utiles et percutants. Merci, enfin, d'avoir bien voulu apporter vos corrections et commentaires sur ce document dans l'urgence…

J'exprime ma gratitude aux professeurs Claude Amiard-Triquet et Christophe Minier, pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'accepter d'être rapporteurs de ces travaux et pour les corrections apportées après soutenance. Avec toutes mes excuses pour la taille conséquente de ce document et les délais un peu serrés…

Un très grand merci, également, au docteur Sandrine Pain, pour avoir accepté de juger ces travaux et pour ses remarques très contructives au cours de la soutenance. Cela me touche particulièrement, puisqu'elle fait partie des ainés qui m'ont accueillie et guidée dans mes premiers pas « d'apprentie chercheuse »… Je la remercie de tout coeur de m'avoir, il y a quelques années, véhiculée à maintes reprises sur le terrain et d'avoir partagé avec moi son bureau, ses réflexions et de sympathiques moments.

Je remercie également les organismes qui ont contribué au financement de ce doctorat. Un très grand merci à Electricité de France, pour nous avoir permis de mettre en œuvre l'extensive étude saisonnière à long terme. J'en profite pour remercier messieurs Khalanski, Vazelle et Mattaix, pour leur investissement dans le projet ; j'adresse particulièrement mes plus vifs remerciements à Michel Khalanski pour ses conseils qui ont sensiblement amélioré le premier article présenté dans ce document. Ce travail fut également possible grâce aux fonds apportés dans le cadre de l'ACI Ecodyn de l'Institut des Sciences de l'Univers du CNRS, ainsi

que dans le cadre du programme ERRUP-CEREMEL financé par le Ministère de L'Ecologie et du Développement Durable. Enfin, le CPER Zone-Atelier-Moselle a également contribué, par sa participation financière, à la bonne marche de ces travaux.

Cette thèse est véritablement le fruit d'un travail d'équipe au quotidien. Je tiens à remercier très chaleureusement Antoinette Meyer et Karine Ledy. Antoinette, merci entre autres pour ces milliers de « coups de manivelle » en salle d'histologie, qui n'ont pourtant pas réussi à vous transformer en méchante Shadock et qui nous ont au contraire apporté la matière pour travailler. Merci également d'avoir, depuis mon stage de maîtrise, contribué à ma formation en histologie et au travail de laboratoire en général, et pour votre grande patience dans la transmission du sens de la paillasse propre et des placards bien rangés… Enfin, merci pour votre gentillesse, votre sens de l'écoute, vos conseils avisés à bien des égards, mais également pour toutes les petites gourmandises qui atterrissaient comme par magie sur mon bureau et pour nous avoir si agréablement verdi et fleuri le labo… Karine, merci pour ton accueil, ta gaieté, et ton investissement dans ma formation. Un très grand merci également pour tous les résultats que tu as acquis et que j'ai ré-exploités en partie dans ces travaux (industries papetières, mise en place de l'expérimentation saisonnière et premiers tiers de résultats de cette étude).

Un très grand merci à mes autres compagnons de terrain : aux cap'taines Philippe Wagner et Jean-François Poinsaint, à mon amie Ingrid Vinot et à l'ensemble des participants du programme ECODYN.

Merci beaucoup à l'ensemble des participants du programme CEREMEL, et plus particulièrement à Laurent Lagadic pour la coordination du programme, à Didier Azam pour avoir fourni les lymnées des bioessais et à Jean-Pierre Cravedi pour les dosages des résidus d'herbicides dans l'eau. Un merci tout particulier à Carole Cossu-Leguille et à mon cher « binôme », Renaud Denoyelle, avec qui le travail à quatre mains s'est déroulé harmonieusement et fort sympathiquement, ce qui avait notamment le mérite de rendre plus agréables les « manips » du dimanche aux aurores…

Je remercie aussi Philippe Rousselle et Etienne Morhain pour toutes les analyses physico-chimiques, pour leurs conseils et leur agréable compagnie. Merci également à Laurent Jeanneau et Pierre Faure pour les dosages des organiques (ECODYN). Je remercie aussi Anne-Marie Veber pour nous avoir fourni les cultures algales et Claudine Rast pour ses conseils logistiques pour la mise en œuvre des bioessais CEREMEL.

Une pensée à tous les anciens stagiaires d'histologie et/ou d'analyse d'image. Merci, en particulier, à Khadija Abarrou pour son aide précieuse dans le cadre des bioessais CEREMEL et pour sa gentillesse et sa

chaleur humaine. Et un merci plus large à tous ceux qui m'ont permis de commencer l'apprentissage de l'encadrement et surtout de passer de bons moments : Estelle Germain, Olivier Wagner, Isabelle Henri, Jordan Stefanov, Anne-Charlotte Guillard, Aline Claudel et Mireille Sidot.

Ma reconnaissance va à également à tous ceux qui m'ont aidée dans la recherche bibliographique : Mireille Ollivier, tout d'abord, mais également Jacques Mouthon, pour les articles sur les traits d'histoire de vie des lymnées, Jukka Jokela pour ses informations sur l'écologie des lymnées et Guillaume Guerlet pour les coups de pouce bibliographiques depuis la « base » strasbourgeoise.

Un grand merci à toutes celles sans qui les tâches administratives ne pourraient suivre leur cours : Maryline Goergen, Catherine Drui, Nathalie Kleinen et Fabienne Chalté. Merci à vous toutes de m'avoir épaulée dans les moments difficiles.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement Simon Devin pour son aide, sa disponibilité et ses conseils bien appréciables au cours du marathon final de la rédaction. Merci en particulier pour la simplification de la formule de l'IBR, l'essai de modélisation, les données sur les traits biologiques et écologiques de Dikerogammarus et les conseils bibliographiques.

Je voudrais aussi témoigner ma gratitude envers ceux qui ont toujours répondu avec gentillesse et disponibilité à mes questionnements sur le traitement statistique des résultats, à savoir Philippe Usseglio-Polaterra, Jean-Nicolas Beisel, Vincent Felten, François Guérold et Jean-Paul Robin.

Un grand merci Sharon Kruger pour avoir patiemment et scrupuleusement corrigé l'anglais de nos articles.

Aux informaticiens, Yann Walterthum et Jamal, ainsi qu'à Philippe Rousselle et Samuel Dembski, dont ça n'est pas le métier, mais qui ont plus d'une corde à leur arc : mille mercis pour les nombreux dépannages informatiques !!!

Un grand merci général à l'ensemble des membres du LIEBE, avec une pensée particulière pour mes « compagnons de table » : Delphine, François, Laure, Philippe, Antoinette et Jean-François, ainsi que pour Marc, Marie-Christine, Lionel, Nathalie N., que je côtoie avec plaisir. Merci au Professeur Dan Molloy du New York State Museum, qui nous fait régulièrement les honneurs de sa présence à Metz, et à sa charmante

épouse Becky, pour leur chaleur humaine. Un clin d'œil amical à l'autre amateur de la météo marine, Gérard Masson.

Je suis très reconnaissante aux anciens thésards, DEA et stagiaires pour leur bonne humeur et pour m'avoir fait bénéficier de leur savoir-faire et connaissances dans des domaines divers et variés, qu'il s'agisse de concepts « écotox », de traitement statistique des données, de connaissances sur les hydrosystèmes de la région ou, au-delà, d'évasion par la lecture, les balades ou les récits de voyages… Karine, Ingrid, Sandrine, Jean-Marc, Chafik, Vincent, Simon, Guillaume, Samuel, Christophe Pi., Christophe Pa., Mikaël, Sébastien L., Marie-Aline, Sophie, Bénédicte, Virginie, Arnaud, Patricia, Sébastien C., Céline et Etienne, merci à vous !

Je n'oublie pas les étudiants actuels et en particulier Manolo, Anatole, Vincent(s), Sophie, Pierre, Anne-Sophie et surtout Laëtitia qui m'a fait, cette dernière année, de la place dans le bureau qui est désormais le sien ; merci pour ton agréable compagnie et pour m'avoir prêté ton point de vue dans mes dilemmes de mise en forme…

Je suis très reconnaissante envers ceux qui m'ont permis de travailler dans de bonnes conditions matérielles ces deux dernières années, et d'élargir mes savoir-faire et connaissances par la même occasion.

Merci à François Guérold et à Laure Giambérini pour le contrat d'ingénieur et à l'ensemble de l'équipe pédagogique du département Biologie de l'UFR Sci-FA pour les vacations que j'ai pu assurer l'an dernier.

Je remercie également l'ensemble du personnel de l'IBFA et tous les membres du laboratoire UMR IFREMER 100 – Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins de l'Université de Caen Basse-Normandie pour leur accueil et leur soutien à divers égards lors de mon année écoulée à leur côté en tant qu'ATER, avec une pensée particulière pour Katherine Costil et Michel Mathieu, qui m'ont témoigné leur confiance. Katherine, merci beaucoup de m'avoir facilité la tâche pour mener de front toutes mes activités. Je remercie Juliette Royer pour son accueil, son écoute, et pour m'avoir fait découvrir les tableaux croisés dynamiques et autres subtilités d'excel…Merci beaucoup à Estelle Le Bihan pour ses conseils, pour avoir pris le temps de lire des morceaux de ce manuscrit et m'apporter de très précieuses corrections et suggestions. Merci à mes compagnons de bureau successifs, Sophie, Ali, Antoine et Eri pour leur agréable compagnie. Je suis très reconnaissante envers Mathieu Hunet, stagiaire de M1, pour m'avoir considérablement allégé la tâche en recherche au cours de l'année d'ATER, ainsi que pour sa bonne humeur et sa bonne volonté à toute épreuve. Enfin, merci à Géraldine, Anne-Sophie, Christophe et Anne-Caroline pour leur amitié.

Pour finir, toutes mes pensées vont à tous ceux sans lesquels la vie n'aurait pas la même saveur, et sans qui jamais je n'aurais pu « tenir » jusqu'au bout…

A vous, mes amis, que j'ai si peu vus, « un peu » (euphémisme…) négligés, mais qui êtes tellement précieux et au contact desquels le verbe « se ressourcer » prend pour moi tout son relief.

A Virge, Marion, Anne-Laure et Stéphane, N'Marie et Yann, Rémi, Caro, Aurélie, Hugo (« VirtuaBrother »), Estelle, Constance et Joël, Cécile et Laurent, Marie, Céline et Alhassane, Sébastien, Marion-dans-les-airs, Bénédicte, Emmanuel, Carine et Mickaël, Anouchka. Avec, enfin et en particulier une mention spéciale pour ceux qui ont été d'une générosité, d'un secours « logistique » et moral exceptionnel ces derniers mois : ma chère fée Charlotte et Cyrille, qui m'ont si bien dorlotée dans leur « home sweet home », Barbara et Cyrille (merci pour ces fantastiques souvenirs, culinaires et autres, au « Solgne Resort Hôtel »).

Et enfin, un immense merci et toute mon affection vont à ma grande famille…

A mes parents pour m'avoir offert cette présence discrète, mais sans faille, pour leur confiance, leur écoute, leur indulgence et leurs « coups de pied au derrière », la force qu'ils me donnent depuis toujours et pour m'avoir soutenue affectivement et matériellement dans toutes mes pérégrinations entre grand Est et grand Ouest au cours des dix dernières années.

A mes deux autres parents, Cathy et Joël, qui m'ont également beaucoup soutenue, chacun à sa manière, et auxquels je tiens très fort.

A mes sœur, frères et beau-frère, Aline et Mickaël, Guillaume et Thibaut, ma bouffée d'air frais, mes plus anciens complices. A Léonard, le « tit n'veu » qui m'a fait la joie de pointer le bout de son nez pendant cette rédaction. A ma sœur de cœur, Sandrine, accompagnée de sa petite famille, Lina, Lorena et Djibril.

A ma famille au sens large, avec toutes mes excuses pour mon manque de présence et d'attention ces dernières années.

Et parce que citer chaque nom serait trop long, je salue et témoigne ma gratitude à tous ceux qui ont un jour mis du vent dans mes voiles, dans ce long périple que fut cette thèse, parfois sans le savoir, au détour d'une idée dont ils m'ont fait part ou d'une « question-qui-fait-mouche », d'un service rendu, d'un moment chaleureux partagé, d'un simple sourire…

Table des matières

REMERCIEMENTS **3**

TABLE DES MATIERES **9**

LISTE DES FIGURES **15**

LISTE DES TABLEAUX **19**

INTRODUCTION **23**

1 Contexte : utilisation de biomarqueurs en écotoxicologie aquatique 23
1.1 Biomarqueurs et état de santé des individus 25
1.2 Application d'une approche biomarqueurs 28
1.2.1 Objectifs visés 28
1.2.2 Facteurs de confusion et limites à l'utilisation des biomarqueurs 29
1.2.3 Apports de l'approche « multi-biomarqueurs » 30
1.2.4 Apports de l'approche multi-espèces 31
2 Origine des travaux 31
3 Présentation de la démarche de validation 33
4 Organisation du manuscrit 36

CHAPITRE I. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE LES DIFFERENTES REPONSES BIOLOGIQUES ETUDIEES **39**

1 Premier niveau d'organisation biologique : LA CELLULE 39
1.1 Utilisation des peroxysomes comme biomarqueurs de stress environnemental 39
1.1.1 Pourquoi étudier les réponses du système peroxysomal comme biomarqueurs ? 40
1.1.2 Réponses peroxysomales d'organismes aquatiques aux contaminants 42
1.1.3 Influence d'autres facteurs 43
1.1.4 Quelle(s) catégorie de biomarqueurs pour la prolifération peroxysomale ? 44
1.2 Utilisations du système lysosomal comme biomarqueur de stress environnemental 44
1.2.1 Pourquoi étudier les réponses lysosomales comme biomarqueurs ? 45
1.2.2 Réponses lysosomales d'organismes aquatiques à différents contaminants et scénarios d'exposition in situ 47
1.2.2.1 Réponses lysosomales aux contaminants organiques 47
1.2.2.2 Réponses lysosomales aux métaux 49
1.2.2.3 Réponses lysosomales au stress oxydant 51
1.2.3 Influence d'autres facteurs 51
1.2.4 Classification des réponses lysosomales dans les différentes catégories de biomarqueurs 53
1.3 L'accumulation des lipofuscines comme biomarqueur de stress environnemental 54
1.3.1 Accumulation, devenir des lipofuscines et controverses autour des effets sur la cellule 55
1.3.2 L'accumulation de lipofuscines digestives chez les invertébrés aquatiques et les poissons exposés à différents contaminants et scénarios d'exposition in situ 56
1.3.3 Influence d'autres facteurs sur l'accumulation de lipofuscines 57
1.3.4 Accumulations de lipofuscines et classifications des biomarqueurs 59
1.4 Utilisation des lipides neutres insaturés comme biomarqueurs. 59

1.4.1 Réponses aux polluants et intérêts comme biomarqueurs 60
1.4.2 Fluctuations saisonnières et influence d'autres facteurs sur les niveaux de lipides et en particulier de lipides neutres insaturés 62
1.4.3 Quelles classes de biomarqueurs attribuer aux réponses du contenu digestif en lipides neutres insaturés ? 63
1.5 Quels liens entre les réponses de ces biomarqueurs cellulaires et des effets à des niveaux supérieurs d'organisation biologique ? 64
2 Second niveau d'organisation biologique : DU TISSU A L'ORGANE 66
3 Troisième niveau d'organisation biologique : ETAT PHYSIOLOGIQUE 67
3.1 L'indice gonadique 67
3.2 Indices de condition 70

CHAPITRE II. MATERIELS & METHODES 75

1 Matériel biologique 75
1.1 Les espèces utilisées 75
1.2 Organe étudié 79
2 Histochimie, analyse d'images et stéréologie 79
2.1 Principes et utilité des méthodes 79
2.1.1 L'histochimie 79
2.1.2 La stéréologie 80
2.2 Protocoles de révélation histochimique 82
2.2.1 Congélation du tissu digestif et coupe à froid 82
2.2.2 Mise en évidence de la structure du système lysosomal 82
2.2.2.1 Principe 83
2.2.2.2 Mode opératoire 83
2.2.2.3 Résultat 83
2.2.3 Révélation des lipofuscines 83
2.2.3.1 Principe 83
2.2.3.2 Mode opératoire 83
2.2.3.3 Résultat 84
2.2.4 Révélation des lipides neutres insaturés 84
2.2.4.1 Principe 84
2.2.4.2 Mode opératoire 84
2.2.4.3 Résultat 84
2.2.5 Mise en évidence du système peroxysomal 84
2.2.5.1 Principe 84
2.2.5.2 Mode opératoire 84
2.2.5.3 Résultat 85
2.3 Analyse d'image et stéréologie 85
3 Histopathologie 87
4 Indices physiologiques 88
4.1 L'indice gonadique 88
4.2 L'indice de condition 89
4.2.1 Indices de condition chez Dreissena polymorpha 90
4.2.2 Indice de condition chez Lymnaea stagnalis 92
5 Physico-chimie et pigments chlorophylliens, application du SEQ-Eau 94
5.1 Physico-chimie classique 94
5.1.1 Paramètres mesurés in situ 94
5.1.2 Paramètres mesurés au laboratoire 94
5.1.2.1 Demandes chimique et biologique en oxygène 94
5.1.2.2 Matières en suspension 94
5.1.2.3 Cations et anions 94
5.1.2.4 Pigments chlorophylliens et albazod 95
5.2 Dosage des métaux 95

5.3 Dosage des organiques 95
5.3.1 Hydrocarbures aromatiques polycycliques 95
5.3.2 Herbicides 96
5.3.2.1 Fomésafène dans l'eau 96
5.3.2.2 Diquat dans l'eau 96
5.4 Standards d'évaluation de la qualité de l'eau 97
6 Exploitation des données et statistiques 98

CHAPITRE III. RESULTATS & DISCUSSIONS 101

1ERE PARTIE : EXPERIMENTATIONS *IN SITU* ET EN LABORATOIRE 101
A. Etude saisonnière à long terme des biomarqueurs cellulaires et physiologique chez D. polymorpha, C. fluminea et D. villosus 101
1 Introduction 101
2 Matériel et méthodes 104
2.1 Sites d'étude 104
2.2 Les organismes 105
2.3 Prélèvement et analyse de l'eau 107
2.4 Analyse des données 108
2.4.1 Statistiques 108
2.4.2 Analyses multivariées 108
3 Résultats 110
Article 1. Guerlet E., Ledy K., Meyer A., Giambérini L., 2007. Towards a validation of a cellular biomarker suite in native and transplanted zebra mussel: A two-year integrative field study of seasonal and pollution-induced variations. *Aquatic Toxicology.* 81 : 377-388. 110
3.1 Physico-chimie et pigments chlorophylliens 110
Résumé des résultats en français 110
3.2 Dreissènes natives et transférées *Résumé des résultats en français* 111
3.3 Corbicules transférées 127
3.3.1 Biomarqueurs cellulaires 127
3.3.2 ACP 130
3.4 Gammares natifs 133
Article 2. Guerlet E., Ledy K., Giambérini L. Is the freshwater gammarid, *Dikerogammarus villosus*, a suitable sentinel species for the implementation of histochemical biomarkers? 133
4 Discussion générale – Comparaisons des trois espèces et deux approches (passive et active) 148
4.1 Comparaisons avec le maximum de données disponibles 148
4.1.1 La question de la saisonnalité… 149
4.1.2 Pertinence de la batterie pour la mise en évidence d'une hétérogénéité spatiale… 151
4.2 Comparaisons en conditions homogènes 153
B. Etude de la persistance spatiale et temporelle des réponses cellulaires et de l'indice de condition chez D. polymorpha Programme National / ACI-FNS : «ECCO» ECosphère COntinentale : processus et modélisation. Action thématique « ECODYN » ECOtoxicologie et écoDYNamique des contaminants. Conséquences écotoxicologiques de la confluence de la Fensch avec la Moselle et étude intégrée de l'écodynamique de la pollution métallique et organique. 157
1 Introduction 157
2 Expérimentations *in situ* : Réponses des biomarqueurs cellulaires et indices de condition chez *D. polymorpha* transférée sur la Fensch et sur la Moselle, à l'amont et l'aval de la confluence. Etude de la réversibilité des réponses 161
Article 3. Guerlet E., Vasseur P., Giambérini L. Spatial and temporal persistence of cellular responses to environmental pollution in the freshwater zebra mussel, *Dreissena polymorpha* 161

Résumé de l'article en français 161
2.1 Expérimentation n°1 (printemps-été 2004) : étude de la réversibilité 161
2.2 Expérimentation n°2 (printemps-été 2005) : étude d'un gradient spatial plus étendu 163
3 Confrontation des résultats obtenus chez la dreissène transférée à ceux mis en évidence chez la corbicule native 191
4 Expérimentation en laboratoire et à court-terme sur la réponse de *D. polymorpha* à différentes concentrations d'eau de la Fensch 193
4.1 Matériel et méthodes 194
4.1.1 Organismes 194
4.1.2 Prélèvement et conditionnement de l'eau 194
4.1.3 Modalités d'exposition 194
4.1.4 Contrôle et prélèvement des organismes 195
4.1.5 Biomarqueurs cellulaires 195
4.1.6 Statistiques 195
4.2 Résultats et discussion 196
C. Effets de deux herbicides, appliqués seuls ou en mélange avec un adjuvant, sur le système lysosomal digestif de L. stagnalis Programme « ERRUP » Evaluation et Réduction des Risques Liés à l'Utilisation des Pesticides. «CEREMEL » Changements d'Echelle et évaluation du Risque Ecotoxicologique de MELanges entre substances actives herbicides et adjuvant. *201*
1 Introduction 201
1.1 Contexte et objectifs de l'étude 201
1.2 Les substances testées 203
1.3 Mise en œuvre du « volet messin » du programme et apports au travail de these 207
2 Matériel et méthodes 207
2.1 Organismes 207
2.2 Produits utilisés 208
2.3 Plan expérimental 208
2.4 Concentrations nominales testées 209
2.5 Modalités d'exposition 209
2.6 Contrôle analytique des concentrations d'exposition 210
2.7 Contrôle et prélèvement des organismes 211
2.8 Biomarqueur cellulaire étudié 211
2.9 Marqueur physiologique étudié 213
2.10 Analyses statistiques 213
3 Résultats et discussions 213
3.1 Exposition au fomésafène, à l'agral et à leur mélange 213
3.1.1 Concentrations de fomésafène mesurées 213
3.1.2 Réponses du système lysosomal 214
3.1.2.1 Exposition au fomésafène 214
3.1.2.2 Exposition à l'Agral 90® 215
3.1.2.3 Exposition au mélange Fomésafène-Agral 90® 216
3.1.3 Indice de condition 217
3.1.4 Survie 217
3.1.5 Discussion 218
3.2 Exposition au diquat, à l'agral et à leur mélange 219
3.2.1 Concentrations de diquat mesurées 219
3.2.2 Réponses du système lysosomal 220
3.2.3 Indices de condition 221
3.2.4 Survie 221
4 Synthèse et mise en relief des resultats présents avec ceux obtenus A d'autres niveaux de l'organisation biologique 222
4.1 Analyse individuelle de nos résultats 222
4.2 Intérprétations à la lueur de l'ensemble des résultats du programme CEREMEL 223

2EME PARTIE : VERS UNE VALIDATION… 227
Valeur diagnostique (et pronostique ?) de la batterie de marqueurs : test de différents outils d'analyse (analyses multivariées, indices intégratifs, système expert…) *227*
1 Analyses multivariées : exemple de l'ACP 228
2 Indices intégratifs : Exemple de L'IBR (« Integrated Biomarker Response », Beliaeff et Burgeot, 2002) 234
2.1 Introduction 234
2.2 Mode de calcul 234
2.3 Application à la batterie de biomarqueurs cellulaires et physiologique 236
3 Perspective d'adaptation du Système expert « DiSAV ES » proposé par Dagnino *et al.* (2007) 244
3.1 Principe et fonctionnement 245
3.2 Limites à une utilisation directe du système sur les résultats de la batterie de biomarqueurs cellulaires chez les espèces sentinelles dulçaquicoles 246
3.3 Préalable à l'utilisation d'un système expert chez *D. polymorpha* : détermination des seuils de réponse 247
4 Bilan comparatif des différentes approches 253

CHAPITRE IV. DISCUSSION GENERALE 259

1 Eléments de réponse aux trois grands objectifs 259
1.1 Pertinence dans la mise en évidence de Contaminations 259
1.2 saisonnalité, niveaux de base et influence d'autres facteurs 265
1.3 Valeur prédictive, échelle des réponses, réversibilité 267
2 Propositions pour des applications futures de la batterie de biomarqueurs 269
2.1 Améliorations individuelles des biomarqueurs : le cas des lipofuscines 269
2.2 Quelles réponses proposer en priorité ? 271

CONCLUSION & PERSPECTIVES 273

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 277

ANNEXES 291

ANNEXE 1 : ARTICLE 4 291
Article 4. Guerlet E., Ledy K., Giambérini, L., 2006, Field application of a set of cellular biomarkers in the digestive gland of the freshwater snail *Radix peregra* (Gastropoda, Pulmonata). Aquatic Toxicol. 77 : 19-32 291
ANNEXE 2 : FICHES-PROTOCOLES DETAILLEES 306
MISE EN EVIDENCE DU SYSTEME LYSOSOMAL *306*
PROTOCOLE DE REVELATION DES LIPOFUSCINES *307*
PROTOCOLE DE REVELATION HISTOCHIMIQUE DES LIPIDES NEUTRES INSATURES *308*
PROTOCOLE DE REVELATION HISTOCHIMIQUE DE LA CATALASE PEROXYSOMALE *309*
Tampons et réactifs *310*
ANNEXE 3 : DONNEES PHYSICO-CHIMIQUES ET TROPHIQUES DE L'ETUDE SAISONNIERE 312
ANNEXE 4 : DEBITS RELATIFS CARACTERISTIQUES DE LA FENSCH 315
ANNEXE 5 : CARACTERISTIQUES DE L'EAU DE SOURCE EMPLOYEE POUR LES EXPOSITIONS RESPECTIVES DES DREISSENES ET DES LYMNEES A DIFFERENTES DILUTIONS DE L'EAU DE LA FENSCH ET AUX HERBICIDES (CEREMEL) 316

RESUME 317

Liste des figures

Figure i.1. Représentation schématique des différents types de paramètres mesurables dans le milieu physique et à différents niveaux d'organisation biologique pour évaluer l'état de l'environnement (Amiard, 1994). 24
Figure i.2. Evolution du rôle des biomarqueurs en fonction de la concentration en toxique ou de la durée d'exposition (Depledge, 1994). 26
Figure II.1. Représentation schématique de la mesure des longueur (L), hauteur (H) et épaisseur (E) de coquille de la dreissène pour le calcul des indices de condition. **A**. Vue de la valve droite. **B**. Vue de la face antérieure. 90
Figure II.2. Représentation schématique de la mesure de la hauteur (H) sans l'extrémité et de l'épaisseur (E) de la coquille chez la lymnée pour le calcul de l'indice de condition. 93
Figure III.1.A.1. Photographies des sites d'étude et localisation géographique des stations ① et ③, situées dans la Moselle, et de la station Mirgenbach ②, positionnée au-dessus de l'ouvrage de prise d'eau vers la Moselle. Au niveau de la retenue, le caractère ⊗ désigne l'ouvrage de rejet d'eau de la centrale dans le Mirgenbach. 105
Figure III.1.A.2. Résultats de l'ACP des deux premières composantes principales définies par les quatre biomarqueurs cellulaires chez les corbicules transférées (61,50 % de la variance totale). (A) Histogramme des valeurs propres de l'ACP. (B) Cercle des corrélations sur le plan F1-F2, défini par les quatre biomarqueurs (en noir et gras) ; les paramètres physico-chimiques et les pigments chlorophylliens sont projetés comme variables supplémentaires (en rouge) – C.D. Plan factoriel F1-F2 des observations : C. variabilité temporelle (pour les mois : ◇ d'automne, ◼ de printemps et ◢ d'été) – D. variabilité spatiale (centres de gravité des sites ①, ② et ③). 130
Figure III.1.B.1. Présentation des sites d'étude utilisés lors du programme ECCO-ECODYN (Sources : SIERM et Google Earth) [NB : Noter la localisation des sites de l'étude saisonnière à long terme à l'aval des stations du programme ECODYN (cadre en pointillés)]. 159
Figure III.1.B.2. Effets cellulaires du déploiement de corbicules natives le long du gradient sur la Moselle au cours de l'expérimentation ECODYN, printemps-été 2005. Les lettres indiquent les moyennes significativement différentes (test post-hoc de Duncan, $p \leq 0,05$, après transformation logarithmique des variables Sv_{LN} et Sv_{LF} ; sauf Nv_L : U de Mann-Whitney, Wilcoxon, $2(1-p) \leq 0.05$) 191
Figure III.1.B.3. Réponses cellulaires à l'exposition de D. polymorpha à l'eau de la Fensch, filtrée ou non, et diluée dans l'eau de la Moselle et de l'eau de source. Les astérisques indiquent les différences significatives par rapport au début de l'expérimentation (moules originaires de Ref2)et les matrices indiquent la significativité des différences deux à deux à 7 jours (test unilatéral de Mann-Whitney, Wilcoxon, $2(1-p) \leq 0,05$) 196
Figure III.1.C.1 (Lagadic et al., 2007). Représentation schématique des mécanismes par lesquels le diquat et le fomésafène peuvent agir à l'échelle cellulaire. Pour les deux herbicides, la toxicité est médiée par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (en rouge). Le fomésafène inhibe la protoporphyrinogène-oxydase (PROTOX), dernière enzyme de la voie de biosynthèse des hèmes, ce qui conduit à l'accumulation de protoporphyrinogène IX oxydé de façon non-enzymatique en protoporphyrine IX, laquelle produit, sous l'action de la lumière, des espèces radicalaires de l'oxygène. Le diquat est transformé, par addition d'un électron célibataire, en radical réactif qui réagit avec l'oxygène moléculaire pour former un anion superoxyde. Les ERO sont à l'origine de dommages à de nombreux constituants protéiques et lipidiques des cellules, notamment au niveau des membranes avec, pour conséquence, des perturbations fonctionnelles et des processus chimio-induits de mort cellulaire 206
Figure III.1.C.2. Protocole expérimental de l'étude de la réponse des marqueurs cellulaires, physiologique et histopathologique chez L.stagnalis exposée pendant 8 jours au diquat ou au fomésafène associés à l'Agral 90 en conditions expérimentales. 208

Figure III.1.C.3. (A) Vue d'ensemble et (B) de détail des dispositifs expérimentaux utilisés lors des bioessais. 209
Figure III.1.C.4. Particularités de la glande digestive de L. stagnalis. (A) Vue d'ensemble de la glande digestive avec ses canaux (flèches) et tubules (astérisque) et (B) détail des granules minéraux (coloration au bleu de toluidine). (C) Manque de spécificité de la mise en évidence des lipofuscines chez L. stagnalis, avec coloration des granules minéraux (flèches) et (D) comparaison avec R. peregra, chez qui l'absence de granules permet de bien distinguer les lipofuscines (flèches). (E) Mise en évidence du système lysosomal digestif chez L. stagnalis témoin avant intoxication et (F) exposée à 222 µg.L^{-1} de fomésafène durant 4 jours. Les lysosomes montrent une réaction positive lors de l'activation de la ß-glucuronidase (flèches), tout comme les granules minéraux (astérisques), qu'il est néanmoins aisé d'évincer de la procédure d'analyse d'images. 212
Figure III.1.C.5. Evolution de la structure du système lysosomal digestif des lymnées (L. stagnalis) exposées au fomésafène, à l'Agral® 90 et au mélange durant 192 h. Fx, Ax et FAx : concentrations croissantes en fomésafène, NPEOs de l'Agral® 90 et mélange. Sont représentés les moyennes et écart-types. Les lettrines différentes indiquent des moyennes statistiquement différentes pour chacun des traitements, isolément des deux autres (F, A ou FA) ; * : différence par rapport au témoin (test U). 215
Figure III.1.C.6. Evolution de l'indice de condition des lymnées (L. stagnalis) exposées au fomésafène, à l'Agral 90 et au mélange durant 192 heures. . Fx, Ax et FAx : concentrations croissantes en fomésafène, NPEOs de l'Agral® 90 et mélange. Sont représentés les moyennes et écart-types. Les lettrines différentes indiquent des moyennes statistiquement différentes pour chacun des traitements, isolément des deux autres (F, A ou FA) ; * : différence par rapport au témoin (test U, $p<0,05$). 217
Figure III.1.C.7. Evolution de la structure du système lysosomal digestif de L. stagnalis exposée au diquat, à l'Agral 90® et au mélange durant 192 h. Dx, Ax et DAx : concentrations croissantes en diquat, NPEOs de l'Agral 90® et mélange. Sont représentés les moyennes et écart-types. Les lettrines différentes indiquent des moyennes statistiquement différentes pour chacun des traitements, isolément des deux autres (D, A ou DA) ; * : différence par rapport au témoin (test U, $p<0,05$). 220
Figure III.1.C.8. Evolution de l'indice de condition de L. stagnalis exposée au diquat, à l'Agral 90® et au mélange durant 192 h. Dx, Ax et DAx : concentrations croissantes en diquat, NPEOs de l'Agral 90® et mélange. Sont représentés les moyennes et écart-types. Les lettrines différentes indiquent des moyennes statistiquement différentes pour chacun des traitements, isolément des deux autres (D, A ou DA) ; * : différence par rapport au témoin (test U, $p<0,05$). 221
Figure III.2.1. ACP de la réponse des biomarqueurs cellulaires et physiologique chez les dreissènes de l'expérimentation ECODYN n°1 (2004) (66,9 % de la variance totale). (A) Cercle des corrélations sur le plan F1-F2, défini par les quatre biomarqueurs (en noir et gras) ; les concentrations corporelles en métaux et HAP figurent comme variables supplémentaires (en rouge) – (B.C) Plan factoriel F1-F2 des observations : (B) variabilité temporelle (centres de gravité des dates de prélèvement en jours) – (C) variabilité spatiale (centres de gravité des sites M1, M2 et F). - Na, Naphthalene ; Ayl, Acenaphtylene ; Aen, Acenaphtene ; F, Fluorene ; Pn, Phenanthrene ; An, Anthracene ; Fl, Fluoranthene ; Py, Pyrene ; BaA, Benzo[a]anthracene ; Ch, Chrysene ; IP, Indeno[1.2.3-cd]pyrene ; BbF, Benzo[b]fluoranthene ; BkF, Benzo[k]fluoranthene ; BaP, Benzo[a]pyrene ; DhA, Di Benzo[a.h]anthracene ; Bghi, Benzo[g.h.i]perylene – Cd, cadmium ; Cu, cuivre ; Fe, fer ; Ni, nickel ; Pb, plomb ; Zn, zinc – R30, transfert de restauration à 30 jours. 229
Figure III.2.2. ACP de la réponse des biomarqueurs cellulaires et physiologique chez les dreissènes de l'expérimentation ECODYN n°2 (2005) (74,1 % de la variance totale). Même légendes que la figure III.2.1. 229
Figure III.2.3. ACP de la réponse des biomarqueurs cellulaires chez les lymnées exposées à proximité d'un rejet d'usine de pâte à papier blanchissant au chlore (Ton-BPPME) (98,2 % de la variance totale) (A) Cercle des corrélations sur le plan F1-F2, défini par les quatre biomarqueurs (en noir et gras) ; les paramètres physico-chimiques figurent comme variables supplémentaires (en rouge)

– (B.C) Plan factoriel F1-F2 des observations : (B) variabilité temporelle (centres de gravité des dates de prélèvement en jours) – (C) variabilité spatiale (centres de gravité des sites) – AOX, concentrations en composés organo-halogénés adsorbables. 230
Figure III.2.4. ACP de la réponse des biomarqueurs cellulaires chez les lymnées exposées à proximité d'un rejet de papeterie (Moselle PPME) (95,3 % de la variance totale). Même légendes que la figure III.2.3. 230
Figure III.2.5. ACP construite à partir des valeurs individuelles des biomarqueurs cellulaires et physiologique chez les dreissènes de l'expérimentation ECODYN n°1 (2004) (67,45 % de la variance totale). Même légendes que la figure III.2.1. Noter la similitude des coordonnées des vecteurs et des centres de gravité des dates de prélèvement et des sites d'étude avec la figure III.2.1. 233
Figure III.2.6. Mode de calcul des aires Ai pour la détermination de l'IBR. 235
Figure III.2.7. Application de l'indice IBR aux résultats de l'étude saisonnière à long terme : histogrammes des valeurs mensuelles de l'IBR ; pour chacune des trois stations, les moyennes et écart-types sur l'ensemble de la période sont indiqués à droite de la figure, ainsi que la fréquence des différences entre stations. 239
Figure III.2.8. Application de l'indice IBR aux résultats de l'expérimentation ECODYN n°1 (2004) 240
Figure III.2.9. Application de l'indice IBR aux résultats de l'expérimentation ECODYN n°2 (2005) 241
Figure III.2.10. Application de l'indice IBR aux résultats de l'exposition de R. peregra à un effluent d'usine de pâte à papier blanchissant au chlore (rivière Ton, voir Article 4)..... 242
Figure III.2.11. Application de l'indice IBR aux résultats de l'exposition de R. peregra à un effluent de papeterie (rivière Moselle, voir Article 4)..... 243
Figure. III.2.12. Comparaison synthétique des trois outils d'intégration de la réponse de la batterie de biomarqueurs chez les organismes dulçaquicoles. 255
Figure IV.1. Influence d'une période de dépuration de 15 jours sur le contenu en lipides neutres insaturés dans les tissus digestifs des dreissènes de l'étude ECODYN 2004. Les pointillés figurent la réponse durant la dépuration. Les courbes bleue, verte et orange désignent respectivement les réponses des moules transférées sur les stations M1, M2 et F (construites à partir de n = 6-8 données à 3, 15, 30 et 90 jours). 268
Figure IV.2. Proposition d'un arbre de décision pour l'utilisation des lipofuscines comme biomarqueur de détoxication des effets de la lipoperoxydation. 270

Liste des tableaux

Tableau i.1. Deux exemples de classification des biomarqueurs. 27
Tableau i.2. Présentation succincte des différentes études réalisées au cours de ces travaux et facteurs favorisant les apports de chacune à la démarche de validation 35
Tableau I.1 (modifié d'après Cajaraville et al. (2003)). Principales caractéristiques de la prolifération peroxysomale comme biomarqueur de pollution organique d'après des études conduites chez des mollusques (M) ou des poissons (P)..... 43
Tableau II.1. Présentation des quatre espèces sentinelles utilisées au cours de ces travaux 76
Tableau I.2. Présentation succincte des résultats de quelques études relatives à la toxicité des métaux et au système lysosomal réalisées chez plusieurs espèces d'invertébrés……50
Tableau I.3. Présentation succincte des résultats de quelques études relatives aux changements du contenu en lipofuscines réalisées chez plusieurs organismes aquatiques soumis à des conditions de stress……...58
Tableau I.4. Présentation succincte des résultats de quelques études relatives aux changements du contenu en lipides réalisées chez plusieurs espèces de poissons et invertébrés aquatiques soumis à des conditions de stress……..……61
Tableau III.1.A.1. Présentation des groupes expérimentaux transférés et natifs de l'étude saisonnière à long terme..... 106
Tableau III.1.A.2. Paramètres physico-chimiques et trophiques suivis mensuellement lors de l'étude saisonnière..... 107
Tableau III.1.A.3. Classes de qualité de l'eau pour les trois stations de l'étude saisonnière à long terme, selon le SEQ-Eau-version 2, et classes de qualité vis-à-vis des concentrations en cuivre et zinc dans l'eau selon les UK-EQS pour la vie piscicole. 111
Tableau III.1.A.4. Valeurs mensuelles des biomarqueurs cellulaires chez les corbicules transplantées (moyenne ± écart-type). 125
Tableau III.1.A.5. Coefficients de corrélation de Spearman (n = 33) entre les biomarqueurs cellulaires et les paramètres physico-chimiques et trophiques 128
Tableau III.1.A.6. Résumé des principales tendances mesurées dans la réponse des biomarqueurs chez les quatre groupes expérimentaux d'organismes au cours de l'étude saisonnière de 26 mois 148
Tableau III.1.A.7. Résumé des ACP et des analyses inter-groupes réalisées chez les quatre groupes expérimentaux d'organismes au cours de l'étude saisonnière de 26 mois 149
Tableau III.1.A.8. Résumé des ACP réalisées chez les quatre lots d'organismes sur des mois identiques dans un but comparatif..... 154
Tableau III.1.C.1. Concentrations mesurées dans les dispositifs expérimentaux au cours de l'exposition des lymnées au fomésafène seul ou en mélange avec l'Agral 90®..... 214
Tableau III.1.C.2. Mortalité dans les dispositifs (en terme d'effectifs) au cours de l'exposition au fomésafène, appliqué seul ou en mélange avec l'adjuvant..... 217
Tableau III.1.C.3. Concentrations mesurées dans les dispositifs expérimentaux au cours de l'exposition des lymnées au diquat seul ou en mélange avec l'Agral 90® 219
Tableau III.1.C.4. Mortalité dans les dispositifs (en terme d'effectifs) au cours de l'exposition au diquat, appliqué seul ou en mélange avec l'adjuvant 222
Tableau III.1.C.5. Synthèse des résultats obtenus lors des bioessais CEREMEL..... 222
Tableau III.2.1. Significativité statistique des ACP conduites sur des valeurs individuelles (ind) ou sur des moyennes (moy)..... 233
Tableau III.2.2. Biomarqueurs entrant dans le calcul de l'IBR dans les différentes expérimentations et chez les diverses espèces sentinelles utilisées 238
Tableau III.2.3. Paramètres stéréologiques et physiologiques incorporés dans la base de données ... 248
Tableau III.2.4. Valeurs moyennes et dispersion des différents paramètres biologiques étudiés in situ chez D. polymorpha et pourcentage de réponse par rapport aux témoins, traduits en niveaux d'altération 250

Tableau III.2.5. Seuils d’altération du DiSAV ES appliqués aux réponses mesurées chez D. polymorpha 251
Tableau III.2.6. Comparaison détaillée des différents outils d’analyse intégrative de la batterie de biomarqueurs 254

INTRODUCTION

INTRODUCTION

1 CONTEXTE : UTILISATION DE BIOMARQUEURS EN ECOTOXICOLOGIE AQUATIQUE

Les activités humaines sont à l'origine d'une dégradation de l'environnement, en grande partie par la dispersion croissante de substances ou d'éléments synthétiques et naturels. Il en résulte de nombreuses conséquences délétères pour la santé humaine, et, au-delà, celle des écosystèmes. Ainsi, le 20ème siècle a connu l'émergence d'une prise de conscience : celle de la nécessité de préservation et de restauration de la qualité de l'environnement. L'ampleur de ces enjeux socio-économiques et scientifiques alimente désormais les préoccupations et les efforts concertés des scientifiques et des gestionnaires.

D'un point de vue réglementaire, la Directive Cadre sur l'Eau 2000/60/CE (DCE), adoptée par le Parlement européen le 23 octobre 2000, fixe l'objectif d'atteindre un « bon état » chimique et écologique des eaux superficielles (intérieures, côtières et de transition) et un bon état chimique et quantitatif des eaux souterraines à l'horizon 2015. La DCE vise également un arrêt de la détérioration des eaux, ainsi que la suppression ou la diminution de rejet des substances polluantes, dont 33 sont classées prioritaires. D'autre part, le règlement REACH (« Registration, Evaluation and Autorisation of CHemicals », soit « enRegistrement, Evaluation et Autorisation des produits CHimiques »), qui vient d'être adopté par le Parlement européen le 13 décembre 2006, impose, entre autre, d'évaluer les risques toxicologiques et écotoxicologiques liés à l'utilisation et à la présence dans l'environnement des substances chimiques nouvelles et existantes, produites ou importées en quantité supérieure à une tonne par an.

La recherche d'outils de surveillance de la qualité des écosystèmes et la mise au point de méthodes d'évaluation du risque environnemental mobilisent d'intenses efforts de la part d'une large communauté scientifique depuis les dernières décennies. Le potentiel offert par de tels outils et les connaissances ainsi acquises sont en partie exploités pour la mise en œuvre de telles réglementations et projets communautaires.

Les outils de surveillance de la qualité environnementale s'inscrivent dans deux approches complémentaires : le contrôle analytique de paramètres physico-chimiques, et la mise en œuvre de méthodes d'observation et/ou de quantification de paramètres biologiques (Amiard *et al.*, 1998).

Cette seconde approche, la **biosurveillance**, présente l'avantage de rendre compte de la biodisponibilité des polluants *in situ* (Forbes & Forbes, 1997). Contrairement aux mesures physico-chimiques qui ne renseignent pas sur une perturbation passée, la biosurveillance permet d'évaluer quels sont, pour les écosystèmes, les effets intégrés dans le temps de la présence de l'ensemble des contaminants et autres facteurs de stress dans le milieu naturel, à plus ou moins long terme (Amiard *et al.*, 1998). Elle s'effectue à différents niveaux d'organisation (figure i.1), allant de la communauté (utilisation d'indices biocénotiques) jusqu'aux niveaux individuels et infraindividuels (recours aux biomarqueurs).

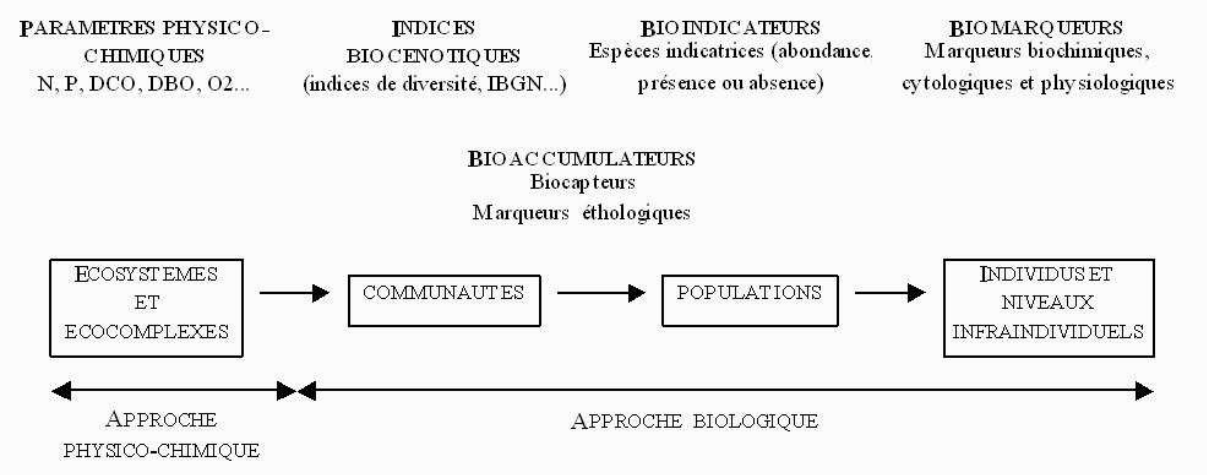


Figure i.1. Représentation schématique des différents types de paramètres mesurables dans le milieu physique et à différents niveaux d'organisation biologique pour évaluer l'état de l'environnement (Amiard, 1994).

Parmi les organismes, végétaux et animaux, qui s'inscrivent dans cette démarche de biosurveillance, différentes catégories (non exclusives, ni exhaustives ici) se distinguent, en fonction du type d'observation(s) qualitative et/ou quantitative réalisée(s) (Amiard *et al.*, 1998 ; Lagadic *et al.*, 1997) :

- les espèces bioindicatrices renseignent, par leur présence (ou absence) et/ou leur abondance, sur la qualité écologique du milieu, dans des études d'écologie numérique portant généralement sur la structure des communautés auxquelles elles appartiennent ;

- les espèces bioaccumulatrices présentent, par leur mode de vie et/ou leurs caractéristiques physiologiques, la capacité d'accumuler certains contaminants, directement à partir de leur environnement (bioconcentration) ou par voie trophique (bioamplification) ; les niveaux atteints par cette accumulation sont nettement supérieurs à ceux du milieu physique et donc souvent plus facilement décelables ;
- **les espèces sentinelles** indiquent précocement la présence et/ou la toxicité d'au moins un contaminant, dont il est possible d'évaluer les effets délétères potentiels pour l'homme et/ou l'environnement ; cette démarche implique l'utilisation de biomarqueurs.

L'une des nombreuses définitions proposées du **biomarqueur** est celle d'un « changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant » (Lagadic *et al.*, 1997).

Dans ce dernier cas (espèces sentinelles), les études peuvent concerner les populations naturellement présentes sur le site (biosurveillance passive) ou des populations transplantées d'une localité considérée comme référence sur les différents sites étudiés (biosurveillance active). Cette dernière permet de réduire une partie de la variabilité des résultats par l'apport d'échantillons biologiques comparables (Nasci *et al.*, 1999).

1.1 BIOMARQUEURS ET ETAT DE SANTE DES INDIVIDUS

Les biomarqueurs utilisés en biosurveillance doivent avant tout être replacés dans un contexte **physiologique** et **fonctionnel** dans l'organisme. Avant d'être des biomarqueurs, ce sont en effet des mécanismes physiologiques ou leur réponse (figure i.2).

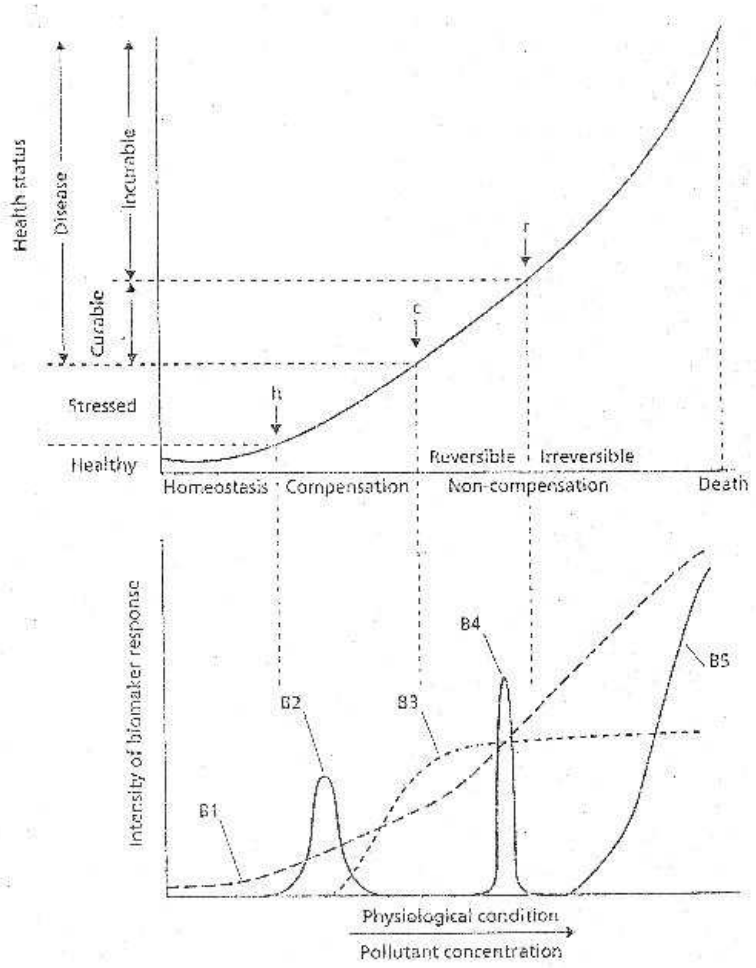


Figure i.2. Evolution du rôle des biomarqueurs en fonction de la concentration en toxique ou de la durée d'exposition (Depledge, 1994).

Ils interviennent à différents niveaux, selon l'importance de la dose interne et/ou de l'exposition aux contaminants environnementaux ou aux facteurs de stress :

- dans le maintien de l'homéostasie (état de santé normal de l'individu) ;
- dans une compensation de l'action des polluants sur l'individu, telle qu'une limitation de leur toxicité (état de stress) ;
- d'autres fonctions physiologiques ou structures cellulaires deviennent ensuite les cibles des effets d'une augmentation de la dose et/ou de la durée de l'exposition. Elles peuvent être considérées comme des biomarqueurs de non-compensation, témoins d'effets néfastes réversibles pour l'organisme ou sa descendance ;
- en cas d'insuffisance de l'action des mécanismes de compensation, les effets, irréversibles, pourront conduire à une issue fatale.

Plus la limite de non-compensation sera atteinte pour une dose faible et/ou de façon rapide, plus l'organisme sera considéré comme vulnérable (Depledge, 1994 ; Lagadic *et al.*, 1997). Il est important de noter que la dose interne et la durée de l'exposition sont elles-mêmes sous l'influence d'un certain nombre d'autres facteurs, propres aux individus (espèce, âge, stade de développement…), à la nature des toxiques ou encore aux conditions d'exposition.

Le rôle fonctionnel des biomarqueurs entre en considération dans certaines des classifications qui leur sont attribuées.

Tableau i.1. Deux exemples de classification des biomarqueurs.

Catégorie	Description	Exemples	Références
BM d'exposition à un xénobiotique	Témoin de la pénétration du polluant dans l'organisme, souvent le résultat d'une interaction polluant / molécules biologiques dans les tissus ou fluides corporels	Conjugaison au GSH, formation d'adduits à l'ADN, induction des MT	(Cajaraville *et al.*, 2000; Lagadic *et al.*, 1997; NAS/NRC, 1989)
BM d'effet	Témoin de l'amplitude d'un effet, toxique ou non, sur une cible critique, après entrée et distribution du xénobiotique dans l'organisme (= BM de stress général + BM spécifiques d'une classe de xénobiotiques)	Cassures à l'ADN, enzymes du stress oxydant, réponses lysosomales	
BM de sensibilité	Témoin de variations génétiques de la réponse à la contamination par les polluants. Lorsque cette sensibilité est faible, après sélection par des molécules toxiques : BM de résistance	Augmentation de la quantité de GST, baisse de sensibilité des AChE (résistance aux insecticides)	
BM de défense	Réaction de défense d'un organisme exposé à un contaminant	Induction des MT ou de l'activité EROD	(de Lafontaine *et al.*, 2000)
BM de dommages	Altération directe causée à l'organisme par les contaminants toxiques	Cassures à l'ADN, produits de la LPO, niveaux de VG	

Abréviations : AChE : acétylcholinestérases ; BM : biomarqueur ; EROD : activité 7-éthoxyrésorufine O-dééthylase ; GSH : glutathion ; GST : glutathion S-transférases ; LPO : lipoperoxydation ; MT : métallothionéines ; VG : protéines de type vitellogénine.

Le tableau i.1 présente les deux types de classifications des biomarqueurs les plus souvent citées parmi celles qui figurent dans la littérature. S'il est classiquement fait référence à la première, celle plus récemment proposée par de Lafontaine *et al.* (2000) peut également sembler séduisante à certains égards. Elle risque moins d'induire une interprétation erronée sur un lien de cause à effet systématique entre les biomarqueurs d'exposition et d'effets, et la limite entre ses deux catégories peut sembler moins floue. Cependant, les auteurs soulignent que tous les biomarqueurs n'entrent pas systématiquement dans ces dernières.

1.2 APPLICATION D'UNE APPROCHE BIOMARQUEURS

1.2.1 Objectifs visés

Les applications des biomarqueurs dépendent de l'objectif fixé qui correspond à :

- une première identification rapide pour signaler la présence ou les effets de polluants (dépistage ou « screening ») ;
- un diagnostic, réalisé sur le terrain grâce à une batterie de biomarqueurs (notion qui sera développée dans les paragraphes suivants) indiquant une réponse précoce, avant que la population ne soit touchée ;
- une surveillance spatio-temporelle de tendances, avec une traduction des objectifs de qualité à atteindre en gammes de réponses des biomarqueurs indicatrices d'un environnement non pollué ;
- ou enfin des procédures prédictives de caractérisation du risque (den Besten, 1998).

Idéalement, les biomarqueurs, étudiés au niveau individuel, devraient en effet permettre de prédire par extrapolation les effets possibles de la présence des polluants et d'autres facteurs de stress à l'échelle supérieure de la population ou de la communauté. A ce jour, cet objectif n'est pas atteint et nécessite des efforts supplémentaires de validation afin d'approcher une **évaluation du risque écotoxicologique.** Cette dernière nécessite la fois la connaissance de la valeur prédictive des biomarqueurs (par des observations en milieu naturel et l'expérimentation en conditions contrôlées) et des conditions dans lesquelles les prédictions se réaliseraient (Connell *et al.*, 1999 ; Lagadic *et al.*, 1997).

Au cours du développement et de validation d'un ou de plusieurs biomarqueur(s), il est difficile de se positionner d'emblée par rapport aux quatre objectifs présentés précédemment, dans une démarche *a priori*. Un minimum de recul et une solide connaissance des réponses biologiques en question sont nécessaires pour juger de la pertinence de l'outil développé dans chacune des quatre démarches.

1.2.2 Facteurs de confusion et limites à l'utilisation des biomarqueurs

Le biomarqueur parfait et universel n'existe pas. Un biomarqueur peut s'avérer très pertinent dans certaines conditions, mais ne pas répondre dans d'autres, voire induire un diagnostic erroné. Ces conditions varient selon une telle quantité de facteurs, qu'il est inconcevable de présumer de la pertinence d'un biomarqueur dans toutes les situations possibles, parfaitement claires et définies.

Il serait idéal de ne pouvoir se concentrer que sur la caractérisation des modalités de la contamination :

- dose, durée et/ou répétitions de l'exposition ;
- nature et propriétés du contaminant, du mélange de substances testé ;

ou

- contexte de contamination multiple *in situ*.

Les mélanges de substances et les contaminations multiples impliquent de potentiels synergies et antagonismes, ce qui complexifie déjà grandement la compréhension des faits.

Néanmoins, de nombreux autres facteurs sont susceptibles d'influencer la physiologie d'un organisme et donc la réponse d'un biomarqueur.

Parmi eux, il est possible de distinguer notamment des facteurs intrinsèques, tels que l'âge, le sexe, le statut reproducteur ou les caractéristiques génétiques de l'espèce sentinelle. Enfin, d'autres facteurs extrinsèques exercent une influence sur la réponse des biomarqueurs, qu'il s'agisse d'interactions biotiques (compétition intra- ou interspécifique, prédation, parasitisme…) ou encore de facteurs abiotiques tels que la température ou la salinité (Amiard *et al.*, 1998).

Si l'influence de ces facteurs peut être en partie limitée ou, à défaut, correctement appréhendée en conditions contrôlées, l'interprétation de la réponse des biomarqueurs devient extrêmement plus délicate en milieu naturel (Amiard *et al.*, 1998). Ainsi, les efforts soutenus de standardisation sont généralement restés vains, tant la définition de la gamme de réponses pouvant être considérée comme « normale » pour un organisme s'avère difficile, voire impossible à établir (Brown *et al.*, 2004). Il est donc recommandé de toujours comparer les réponses entre sites de niveaux de contamination différents (emploi de sites de « relative

référence »). L'utilisation d'organismes maintenus dans des conditions contrôlées (souches de laboratoire, procédures d'encagement *in situ*) peut également limiter certains des facteurs de confusion (Amiard *et al.*, 1998).

1.2.3 Apports de l'approche « multi-biomarqueurs »

Toujours pour les raisons exposées ci-dessus, ainsi que pour la diversité importante des types et manifestations possibles des atteintes toxiques, les approches intégrées impliquant l'étude conjointe de plusieurs biomarqueurs sont de nos jours fortement recommandées et de plus en plus répandues (voir, par exemple, Beyer *et al.*, 1996 ; Brown *et al.*, 2004 ; de Lafontaine *et al.*, 2000 ; Galloway *et al.*, 2006 ; Goksøyr *et al.*, 1996 ; Moore *et al.*, 2004 ; Van der Oost *et al.*, 1997). A ce type d'approche sont associées les notions d'études « multi-(bio)marqueur », de « suite de biomarqueurs » ou de « batterie de biomarqueurs ».

Dans une telle démarche holistique, la standardisation d'un biomarqueur individualisé devient donc secondaire, par rapport à la mise en évidence des effets toxiques intégrés d'un contaminant pour un organisme, grâce à l'étude combinée de plusieurs biomarqueurs (Brown *et al.*, 2004). Dans certaines situations, l'un des biomarqueur composant la batterie peut ne pas répondre clairement, voire induire un diagnostic faux sur la qualité du milieu pour le biota, s'il est considéré isolément. La convergence des autres réponses étudiées (vers un reflet correct de l'état de santé des individus) peut alors éviter l'erreur de diagnostic.

De plus en plus, l'application de ce type d'approche a rendu nécessaire le développement de stratégies intégratives de traitement et de présentation des données. En effet, il s'avérait nécessaire de réduire la complexité de l'analyse des résultats (parfois générés en grand nombre) en les appréhendant de façon synthétique, et d'augmenter encore la pertinence de l'approche multi-biomarqueur par rapport à une analyse individuelle de chaque réponse biologique étudiée. Ainsi, l'usage de certains outils tend à se généraliser, comme par exemple :

- l'application de méthodes d'analyses multivariées (par exemple, Beyer *et al.*, 1996 ; Goksøyr *et al.*, 1996 ; Astley *et al.*, 1999 ; Schmolke *et al.*, 1999 ; de Lafontaine *et al.*, 2000 ; Machala *et al.*, 2001 ; Roméo *et al.*, 2003a ; Galloway *et al.*, 2006) ;
- des propositions d'indices intégratifs (Narbonne *et al.*, 1999 ; Beliaeff & Burgeot, 2002 ; Chèvre *et al.*, 2003 ; Broeg *et al.*, 2005) ;

- et très récemment, un système expert d'aide à la décision, développé par (Dagnino *et al.*, 2007) qui se révèle extrêmement prometteur pour une réelle intégration des approches biomarqueurs dans les procédures d'évaluation des risques (Dondero *et al.*, 2006). Son utilisation s'avère envisageable à l'échelle des gestionnaires de l'environnement, et ne s'adresse plus seulement à un petit nombre d'experts dans le milieu de la recherche.

1.2.4 Apports de l'approche multi-espèces

Afin de permettre l'application d'une suite biomarqueurs dans un grand nombre de situations, il semble également intéressant de valider l'utilisation de ces outils de biosurveillance chez différents taxa (Brown *et al.*, 2004 ; Cheung *et al.*, 2006). En effet, une approche plurispécifique efficace fournit des indicateurs de stress chez des espèces qui diffèrent à la fois par leur sensibilité au stress et/ou à la pollution, par leur physiologie, le groupe fonctionnel auquel elles appartiennent au sein d'une communauté, ainsi que par le compartiment de l'écosystème auquel elles sont principalement exposées, à savoir la colonne d'eau, le sédiment ou leur interface (Sanchez & Tarazona, 2002 ; Brown *et al.*, 2004 ; Cheung *et al.*, 2006). Pour des raisons pratiques, et afin de préserver un certain réalisme écologique, le développement et la validation d'une suite de biomarqueurs chez différentes espèces permet son application à plus grande échelle, en tenant compte à la fois de la présence des différents taxa sur le terrain, de leur type d'habitat (Brown *et al.*, 2004), ainsi que de leur accessibilité.

2 ORIGINE DES TRAVAUX

L'axe méthodologique adopté associe l'histochimie et l'analyse d'image, approche proposée pour la première fois par (Lowe *et al.*, 1981) au niveau des tissus digestifs de la moule marine, *Mytilus edulis*, et présentée plus en détail dans le Chapitre II. Cette approche est également couramment employée par d'autres chercheurs travaillant dans un contexte d'écotoxicologie marine, notamment par l'équipe de Miren P. Cajaraville, du Laboratoire de Biologie Cellulaire et Histologie (Université du Pays Basque - Bilbao), au sein de laquelle la révélation histochimique du système lysosomal digestif a été adaptée à la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha*, dans les années 90 (Giamberini & Cajaraville, 2005). Les travaux ainsi initiés ont été poursuivis lors du doctorat de Karine Ledy (Ledy, 2002), qui consistait à

développer une batterie de biomarqueurs cellulaires chez différentes espèces d'invertébrés d'eau douce. Ces travaux de thèse ont notamment permis :

- de poursuivre l'adaptation des méthodes de révélation histochimique de quatre contenus ou compartiments cellulaires supplémentaires (mise en évidence des contenus digestifs en lipofuscines et lipides neutres insaturés, de la structure du système peroxysomal et de la NADPH-ferrohémoprotéine réductase), chez les espèces d'invertébrés dulçaquicoles suivantes : trois bivalves : la moule zébrée ou dreissène, *D. polymorpha*, la corbicule, *Corbicula fluminea*, et la mulette (ou unio) des peintres, *Unio pictorum* ; un gastéropode pulmoné, *Radix peregra* (complexe) ; le crustacé amphipode *Dikerogammarus villosus* ;

- d'initier une étude saisonnière *in situ* à long terme chez trois de ces espèces, selon une approche de biosurveillance active et/ou passive en fonction de la population étudiée. Les premiers mois d'exploitation ont permis de dégager les premières tendances saisonnières de variation de la réponse des biomarqueurs et d'appréhender l'influence de facteurs environnementaux autres que les contaminants, ainsi que du statut reproductif (étudié chez la dreissène grâce à un indice gonadique) ;

- de montrer la pertinence de ces biomarqueurs pour la mise en évidence de plusieurs gradients de contamination au cours d'études de biosurveillance active de court/moyen terme (21 jours) *;*

- d'analyser les réponses des biomarqueurs en conditions contrôlées au cours d'une intoxication au cuivre à des concentrations réalistes pour l'environnement, et de montrer la réversibilité relative de deux d'entre elles ;

- de mettre en évidence des différences entre certaines des réponses des biomarqueurs fréquemment décrites chez les mollusques marins et celles observées dans plusieurs contextes différents au cours de ces travaux.

Ces résultats prometteurs ont motivé la poursuite de la validation de ces outils au cours des travaux exposés dans le présent document, après abandon de l'un des cinq biomarqueurs

cellulaires utilisés dans les travaux de Karine Ledy (fluctuations de la NADPH-ferrohémoprotéine réductase révélée par histochimie dans les cellules digestives) car le rapport pertinence/coût semblait nettement trop faible.

3 PRESENTATION DE LA DEMARCHE DE VALIDATION

Dans la continuité de ces études visant la validation d'une suite de biomarqueurs cellulaires chez plusieurs espèces d'invertébrés d'eau douce, nos travaux se sont orientés selon trois axes de recherche :

Axe 1 Pertinence dans la mise en évidence des perturbations d'origine anthropique

Les questions suivantes sont abordées dans cet axe de recherche.

- Dans quelle mesure les réponses des biomarqueurs cellulaires et physiologiques étudiés dans ces travaux permettent-elles de mettre en évidence la présence ou l'effet de polluants ?
- Existe-t-il différents types de réponses des contenus et compartiments cellulaires au stress en général, chez les organismes étudiés ?
- Bien que ces biomarqueurs ne soient pas tous réputés comme spécifiques, existe-t-il néanmoins des schémas de réponses différents selon les grandes classes de polluants ou contaminants majoritaires ?
- Le degré de réponse reflète t'il le gradient de contamination ?
- Parmi les biomarqueurs proposés, quels sont les plus pertinents et dans quelles conditions ?
- Pour les biomarqueurs considérés, les démarches de biosurveillance active et passive sont-elles toutes deux pertinentes ?
- La pertinence de l'étude de ces réponses biologiques est-elle fortement accrue en conditions contrôlées ?

Axe 2 Fluctuations saisonnières et influence de facteurs biotiques et abiotiques

Certes, l'approche multi-biomarqueur apporte une certaine souplesse et permet, en partie, de s'affranchir de la nécessité de connaître l'influence exacte d'un nombre très

important de facteurs sur la réponse des biomarqueurs. Néanmoins, il nous a semblé nécessaire de travailler sur les questions suivantes.

- Les fluctuations saisonnières des biomarqueurs étudiés sont-elles reproductibles au sein d'une population ?
- Est-il alors possible de définir des gammes de valeurs « normales » saisonnières pour pouvoir s'affranchir de cette variabilité saisonnière dans des études de biosurveillance ? Est-il possible de déterminer une valeur de base, considérée comme une référence, pour chacun des biomarqueurs ?
- Si tel n'est pas le cas, leur utilisation doit-elle être abandonnée ou est-il possible d'interpréter correctement les résultats obtenus ?
- Existe-t-il des périodes critiques où l'application de tout ou partie de la suite de biomarqueurs serait moins pertinente ?
- Outre les polluants, quels sont les facteurs environnementaux qui exercent une influence majeure sur les biomarqueurs étudiés ?

Axe 3 Valeur pronostique

Cet axe s'organise autour des questions suivantes.

- Les effets mesurés au niveau sub-cellulaire, censés représenter des indicateurs précoces d'effets toxiques à des niveaux supérieurs d'organisation biologique, peuvent-ils être effectivement mis en relation avec des effets observés, voire quantifiés, à des niveaux supérieurs d'organisation biologique ?
- Si oui, les précèdent-ils bien dans le temps ?
- Est-il possible d'identifier des seuils de compensation et de non-compensation, et de réversibilité et irréversibilité des effets ?
- Peut-on préciser les conditions dans lesquelles ces seuils risquent d'être franchis ?

Concrètement, chaque expérimentation réalisée au cours de ces travaux de thèse a été conçue de manière à fournir des éléments de réponses à deux ou chacun des axes choisis dans la démarche de validation (mais sans la prétention de répondre de façon exhaustive et définitive à l'ensemble des questions posées à l'issue de ces travaux). Parmi ces trois études, présentées dans le Tableau i.2, l'étude saisonnière avait été en partie accomplie (10 mois d'échantillonnage analysés), lors de la thèse de Karine Ledy (Ledy, 2002) et du DEA ayant

précédé les présents travaux (Guerlet, 2002). Durant les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit, deux campagnes mensuelles sur le terrain ont été encore menées, et surtout l'exploitation de 16 mois de prélèvements a été poursuivie. Les deux autres études ont également été réalisées pendant ce doctorat, dans le cadre de programmes nationaux de recherche (programmes ECCO et ERRUP).

Tableau i.2. Présentation succincte des différentes études réalisées au cours de ces travaux et facteurs favorisant les apports de chacune à la démarche de validation

	Etude saisonnière sur la retenue du Mirgenbach et la Moselle	Programme ECCO – Etude ECODYN	Programme ERRUP – Etude CEREMEL
Type d'exposition	*In situ*	*In situ* & laboratoire	Laboratoire
Durée(s)	26 mois	3 mois, 1 mois & 6 jours	2 x 8 jours
Biosurveillance	Active & passive	Active (& passive)	-
Espèce(s)	*D. polymorpha*, *C. fluminea*, *D. villosus*	*D. polymorpha* *C. fluminea*	*L. stagnalis*
Biomarqueurs cellulaires	LYS, LPF, LNI, PER	LYS, LPF, LNI	LYS
Axe 1. Réponse aux polluants	Contamination au cuivre, aux chlorures	Contamination aux métaux, HAP	Exposition à deux herbicides et un adjuvant
Axe 2. Influence d'autres facteurs	Reproduction, facteurs trophiques, température	Facteurs trophiques, température	
Axe 3. Valeur Pronostique	(Reproduction)	Indice de condition, réversibilité, histopathologie	Indice de condition (+ traits d'histoire de vie : résultats INRA Rennes)
Type d'étude *in situ* selon den Besten *et al.* (2001)	Surveillance spatio-temporelle de tendances	Surveillance spatio-temporelle de tendances	

LYS : morphométrie du système lysosomal digestif ; LPF : contenu digestif en lipofuscines ; LNI : contenu digestif en lipides neutres insaturés ; PER : morphométrie du système peroxysomal

4 ORGANISATION DU MANUSCRIT

Après avoir réalisé un état de l'art sur l'utilisation des réponses biologiques étudiées à différents niveaux de l'organisation biologique dans les présents travaux (**Chapitre I**) et après avoir présenté les méthodes mises en œuvre et le matériel biologique utilisé (**Chapitre II**), nous aborderons successivement les trois études, introduites précédemment, dans la première partie du **Chapitre III**, intitulée « Expérimentations *in situ* et en laboratoire ». Puis, la seconde partie de ce chapitre, intitulée « Vers une validation… » est consacré à l'essai et la comparaison de différents outils d'analyse des données (analyses multivariées, indices intégratifs…), au service de l'établissement d'un diagnostic à partir de la batterie de biomarqueurs. Cette partie concerne également les premiers résultats synthétiques acquis grâce à la conception d'une base de donnée destinée à compiler, à terme, l'ensemble des résultats acquis et à venir dans la thématique biomarqueurs cellulaires. Dans le **Chapitre IV,** chacun des trois axes de recherche sera repris un à un et discuté à la lueur des apports de l'ensemble des expérimentations et exploitations de résultats. Ce chapitre se poursuivra par des propositions pour des applications futures de la batterie de biomarqueurs.

Ce manuscrit se présente sous la forme d'une thèse sur articles et comporte une alternance de parties rédigées en français et quatre articles en anglais (publiés ou soumis). Ils sont alors précédés d'un résumé en français.

Le quatrième article (Guerlet *et al.*, 2006) figure en annexe de ce document (Annexe 1) car, bien que rédigé au cours de ce doctorat, il concerne des résultats acquis par Karine Ledy pendant sa thèse. Les résultats correspondants sont toutefois ré-exploités dans la seconde partie du Chapitre III et dans la discussion finale (Chapitre IV).

CHAPITRE I.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I.
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE
Les différentes réponses biologiques étudiées

1 PREMIER NIVEAU D'ORGANISATION BIOLOGIQUE : LA CELLULE

Cette analyse est principalement axée sur les profils de réponses aux polluants et autres facteurs environnementaux de deux compartiments et deux contenus cellulaires, exploités pour la constitution de la batterie de biomarqueurs cellulaires. Après avoir entrevu chacun des compartiments individuellement, nous aborderons les liens établis avec des effets à d'autres niveaux de l'organisation biologique (individu, voire population ou communautés lorsque l'information est disponible).

La plupart des références citées concernent des études menées chez des invertébrés marins (essentiellement des bivalves), parfois d'eau douce, ainsi que chez des poissons marins ou dulçaquicoles. Le développement de biomarqueurs cellulaires chez les invertébrés d'eau douce par une approche couplant histochimie et analyse d'images a été réalisé bien plus tardivement, ce qui explique le nombre plus réduit de références citées (Antón *et al.*, 2000 ; Ledy, 2002 ; Giamberini & Cajaraville, 2005 ; Champeau & Narbonne, 2006 ; Guerlet *et al.*, 2006, Guerlet *et al.*, 2007 ; Zaldibar *et al.*, 2006).

1.1 UTILISATION DES PEROXYSOMES COMME BIOMARQUEURS DE STRESS ENVIRONNEMENTAL

Le **système peroxysomal** est un ensemble d'organites cellulaires rencontré dans presque toutes les cellules eucaryotes. Les peroxysomes sont présents en nombre dans le rein et le foie (vertébrés) ou dans des organes de fonction proche chez les invertébrés, tels que l'hépatopancréas des crustacés ou la glande digestive des bivalves. Ils renferment un grand nombre d'enzymes telles que la catalase, la D-amino acide oxydase, l'acyl-CoA oxydase ou

encore les superoxyde dismutases (Noguchi *et al.*, 1979 ; Cajaraville *et al.*, 1992 ; Pipe *et al.*, 1993).

Les grandes **fonctions des peroxysomes** chez les invertébrés aquatiques sont présentées en détail dans la revue de (Cancio & Cajaraville, 2000). Ils sont principalement impliqués dans le métabolisme des lipides. En effet, chez les invertébrés, ils interviennent dans la β-oxydation des longues chaînes d'acides gras, converties en acétyl-CoA, ainsi que dans la synthèse des acides biliaires et du cholestérol. En outre, les peroxysomes jouent un rôle dans le catabolisme des acides aminés, des purines et des polyamines. Ils influenceraient, de plus, l'excrétion de certains xénobiotiques.

Enfin, les peroxysomes interviennent dans des réactions oxydantes utilisant du dioxygène et générant du peroxyde d'hydrogène et d'autres espèces réactives de l'oxygène, qui sont ensuite détoxifiées par la catalase, d'autres enzymes antioxydantes peroxysomales et des systèmes de défense antioxydante non-enzymatique. Ils jouent donc un rôle clef dans le phénomène de stress oxydant.

1.1.1 Pourquoi étudier les réponses du système peroxysomal comme biomarqueurs ?

L'intérêt pour l'étude des **variations d'activités d'enzymes** présentes notamment dans les peroxysomes (Cu-Zn superoxyde dismutase et catalase) en tant que biomarqueurs a été suscité tout d'abord par leur implication dans la défense de l'organisme contre le stress oxydant. La réponse des systèmes antioxydants aux contaminants se manifeste généralement dans un premier temps par une activité accrue des enzymes en question, traduisant l'accommodation des individus à de nouvelles conditions environnementales. Cette induction d'activité est généralement transitoire et finalement non spécifique, ce qui constitue un avantage dans leur utilisation dans des contextes de contamination mutiple (Cossu *et al.*, 1997b). En outre, des inhibitions des activités des enzymes antioxydantes traduisent des effets toxiques, généralement associés au phénomène de lipoperoxydation.

D'autre part, chez certains mammifères (chez la plupart des rongeurs, mais pas chez l'homme, ni les autres primates ou encore le cobaye), certains composés organiques

(notamment les médicaments hypolipémiants de la famille des fibrates, les phthalates, utilisés comme plastifiants, le trichloréthylène, et des herbicides) provoquent une **prolifération peroxysomale** et parfois des effets carcinogènes qui ne reposeraient ni sur une mutagénécité, ni sur une génotoxicité (Rao & Reddy, 1991).

La prolifération peroxysomale se définit selon des critères morphologiques, à savoir par une augmentation de la taille et du nombre des peroxysomes. Elle peut ou non être accompagnée d'une activité accrue de certaines enzymes peroxysomales, essentiellement celles de la β-oxydation (Cajaraville *et al.*, 2000 ; Cajaraville *et al.*, 2003).

Le mécanisme de prolifération peroxysomale impliquerait chez les rongeurs la participation de facteurs de transcription, les récepteurs nucléaires activés par les inducteurs de la prolifération des peroxysomes ou PPARs (« Peroxisomal Proliferator Activated Receptors ») (Issemann & Green, 1990). Après avoir été activé par la fixation d'un de ses ligands spécifiques (endogènes ou exogènes), un PPAR forme un hétérodimère avec le récepteur des rétinoïdes (RXR), ce qui permet la fixation, au niveau de la région promotrice de l'ADN, à l'élément de réponse aux inducteurs de la prolifération des peroxysomes, le PPRE (« Peroxisomal Proliferator Responsive Element ») et donc la régulation de la transcription de gènes cibles (codant notamment pour certaines enzymes peroxysomales et pour les peroxynes).

Il a été montré qu'une prolifération peroxysomale pouvait également être induite par certaines classes de composés organiques chez des poissons et invertébrés aquatiques, suggérant l'intérêt de ce type de réponse en tant que biomarqueur spécifique de ces classes de composés chez les organismes aquatiques. Néanmoins, à notre connaissance, il n'aurait pas été mis en évidence de PPARs à ce jour chez les mollusques, tandis que les poissons posséderaient ces récepteurs (voir la revue de Cajaraville *et al.*, 2003). Le mécanisme de prolifération n'a toujours pas été élucidé chez les mollusques. De même, aucun effet carcinogène lié à l'activation de PPARs n'a été démontré à ce jour chez les animaux aquatiques.

1.1.2 Réponses peroxysomales d'organismes aquatiques aux contaminants

L'activité des **enzymes peroxysomales antioxydantes** peut être modulée par l'exposition aux contaminants environnementaux en conditions contrôlées et *in situ*. Des inductions transitoires ont été fréquemment rapportées en présence de composés organiques tels que les HAP ou les PCB (voir, par exemple, Cajaraville *et al.*, 1990a ; Porte *et al.*, 1991). A l'inverse, des inhibitions de l'activité de la catalase ont été montrées chez des bivalves marins ou des carpes en présence de certains métaux (arsenic, cadmium ou fortes concentrations de cuivre) (Radi & Matkovics, 1988 ; Regoli *et al.*, 1998a). Enfin, les enzymes peroxysomales antioxydantes ne répondent pas toujours à la présence de facteurs de stress oxydant (cuivre, fer, dithiocarbamate, effluents complexes). Ainsi, les activités de la catalase et de la superoxyde dismutase peuvent rester constantes en présence de contaminants alors même que d'autres activités enzymatiques antioxydantes (glutathion peroxydase et réductase) ou la présence de piégeurs d'ERO (glutathion réduit) diminuent nettement (Doyotte *et al.*, 1997 ; Regoli *et al.*, 1998a).

Le tableau I.1, adapté de la revue de Cajaraville et collaborateurs (2003), récapitule les caractéristiques de la **prolifération peroxysomale** en tant que biomarqueur chez les organismes aquatiques, la plupart du temps, marins. Le caractère inducteur des fibrates et des phthalates, reconnu chez les rongeurs, a été confirmé chez les mollusques et les poissons. D'autres substances organiques, des contaminants environnementaux classiquement étudiés en écotoxicologie, ont également montré un potentiel inducteur de la prolifération peroxysomale chez certains de ces organismes aquatiques. Il s'agit des HAP, d'effluents d'industries papetières blanchissant au chlore, de molécules surfactantes (alkylphénols), d'œstrogènes et de divers pesticides. Les métaux, en revanche, ne semblent généralement pas induire de prolifération peroxysomale chez les organismes sentinelles utilisés. Appliqué en mélange avec le B[a]P, le cadmium semblerait même inhiber la prolifération peroxysomale.

Tableau I.1 (modifié d'après Cajaraville et al. (2003)). Principales caractéristiques de la prolifération peroxysomale comme biomarqueur de pollution organique d'après des études conduites chez des mollusques (M) ou des poissons (P)

Caractéristiques		Nouvelles références
Spécificité	Médicaments hypolipémiants de la famille des fibrates (M, P)	
	Phthalates (M, P)	(3, 4)
	HAP (M, P)	(4)
	PCB (M)	
	Effluents d'industries papetières blanchissant au chlore (M, P)	(1, 2)
	Alkylphénols (M, P) (NB : faible prolifération, voire possibles effets antagonistes en mélange avec d'autres inducteurs de la prolifération des peroxysomes)	(4)
	Oestrogènes (P)	(3)
	Divers pesticides (P)	
	Retardateurs de flamme bromés (M)	(4)
Influence de facteurs biotiques	Connaissances limitées de l'influence du genre (M, P), du stade de développement (P) du stade gamétogénique (M) et de l'âge (P)	(4)
Influence de facteurs abiotiques	Connaissances limitées sur les variations saisonnières	
Réversibilité	Prouvée lors d'expérimentations de transfert *in situ*, mais plus de connaissances sont requises	
Répétabilité	Montrée dans des expérimentations avec le B[a]P et le DEHP	
Reproductibilité	Des études inter-laboratoire sont requises	
Pertinence écologique (effets sur la reproduction, le développement ou la croissance)	Inconnue, mais les effets délétères d'inducteurs de la prolifération peroxysomale sur la reproduction sont en cours d'investigation (M, P)	(3, 4)

Les ajouts au contenu du tableau original figurent en couleur ([1] Ledy, 2002 ; [2] Guerlet et al., 2006 ; [3] Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville ; [4] Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville, 2006). A l'exception de ces ajouts, voir la revue de Cajaraville et al. (2003) pour les références des autres études concernées.

1.1.3 Influence d'autres facteurs

Les activités antioxydantes et la morphologie du système peroxysomal de la glande digestive des bivalves marins sont influencées par des facteurs biotiques et abiotiques (voir le Tableau I.1 pour la prolifération peroxysomale).

Notamment, de fortes variations saisonnières peuvent survenir, telles qu'une diminution de l'activité catalasique durant l'automne et l'hiver. Ce phénomène montré à plusieurs reprises dans la glande digestive de mollusques marins, refléterait un ralentissement du métabolisme durant cette période, en relation avec la disponibilité en nourriture et le cycle reproducteur (Viarengo *et al.*, 1991a ; Cancio *et al.*, 1999 ; Orbea *et al.*, 1999a). Néanmoins, au cours d'une étude en conditions contrôlées, Khessiba et collaborateurs (2005) ont montré une diminution de cette activité chez *M. galloprovincialis* maintenues en présence de nourriture. L'activité de la catalase montrait en revanche des corrélations positives avec la température, la salinité et la photopériode. En outre, une augmentation d'un facteur 25 de

l'activité de l'acyl-coA oxydase (enzyme peroxysomale de la β-oxydation des acides gras), accompagnée d'une multiplication par 8 du nombre de peroxysomes a été montrée en début de printemps chez cette même espèce, ce qui est tout à fait comparable à une prolifération peroxysomale typique (Cancio *et al.*, 1998).

De plus, l'âge influence également les activités antioxydantes. En effet, chez *M. edulis*, les individus âgés de plus de 10 ans ont des capacités antioxydantes (catalase, glutathion peroxydase, glutathion réduit, caroténoïdes et vitamine E) significativement plus faibles (Viarengo *et al.*, 1991b).

1.1.4 Quelle(s) catégorie de biomarqueurs pour la prolifération peroxysomale ?

La **prolifération peroxysomale** est proposée comme biomarqueur d'exposition à certaines classes de contaminants organiques et pourrait représenter une alternative à la recherche d'une induction du cytochrome P450 chez les invertébrés (Cajaraville *et al.*, 2003). En effet, si l'induction de diverses isoformes du cytochrome P450 semble représenter un biomarqueur fiable d'exposition aux contaminants organiques chez les poissons, son existence même est controversée chez les mollusques.

1.2 UTILISATIONS DU SYSTEME LYSOSOMAL COMME BIOMARQUEUR DE STRESS ENVIRONNEMENTAL

Les lysosomes, dont le nom signifie corpuscules lytiques ou digestifs, sont des organites d'environ 0.5 µm de diamètre, délimités par une membrane semi-perméable lipoprotéique. Ils renferment une soixantaine d'enzymes (Barrett & Heath, 1977) capables de dégrader en produits de faibles poids moléculaires toutes les classes de macromolécules d'origine intracellulaire et extracellulaire, à savoir les acides nucléiques, les protéines, les lipides et les polysaccharides. Découverts par Christian de Duve dans les années 1950 dans les hépatocytes de rat, ils sont quasiment présents dans toutes les cellules animales (à l'exception des érythrocytes), végétales, fongiques et les levures (Holtzman, 1989).

Les enzymes lysosomales catalysent des réactions du type :

$$A\text{-}B + H_2O \rightarrow A\text{-}H + B\text{-}OH \quad (1)$$

La grande majorité d'entre elles fonctionne à un pH optimum acide (de l'ordre de 4-5) qui est entretenu grâce à l'action d'une pompe à protons ATPasique située sur la face externe de la membrane lysosomale (Holtzman, 1989).

Le rôle des lysosomes est fondamental dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Chez les mammifères, ils participent à de nombreux processus physiologiques normaux, plus ou moins spécialisés selon les types cellulaires, et aussi divers que la séquestration de composés étrangers à la cellule et la réponse immunitaire, la reproduction, le développement embryonnaire et l'organogenèse, le turn-over des organites, membranes et protéines, l'osmorégulation intracellulaire, le renouvellement des tissus osseux, l'hormonogenèse (pour la glande thyroïde), la réabsorption des protéines au niveau rénal ou encore la régulation de la sécrétion (De Duve, 1974 ; Moore, 1982 ; Holtzman, 1989).

Leur intervention dans la digestion intracellulaire est un aspect primordial pour les bivalves dont c'est la principale modalité digestive. Ceci explique donc la richesse particulière en lysosomes des cellules digestives des mollusques bivalves (Owen, 1972) et implique que leur système lysosomal digestif se trouve particulièrement exposé aux substances présentes dans leur environnement, y compris aux xénobiotiques.

1.2.1 Pourquoi étudier les réponses lysosomales comme biomarqueurs ?

D'une façon générale, c'est l'implication du compartiment lysosomal dans le maintien de l'homéostasie cellulaire qui fait de l'intégrité lysosomale un bon indicateur de l'intégrité fonctionnelle de la cellule tout entière (Moore & Icarus Allen, 2002). En effet, les lysosomes participent à la protéolyse (et donc à remise à disponibilité d'acides aminés pour de nouvelles synthèses protéiques, ce qui inclut notamment les enzymes et protéines de détoxication), au recyclage d'autres macromolécules, au renouvellement tissulaire, à la mobilisation des réserves énergétiques et à la fonction immunitaire. Toutes ces fonctions peuvent être mises à profit pour lutter contre le stress environnemental. Notamment, dans l'analyse proposée par Moore et collaborateurs (2006b), l'autophagie (dégradation lysosomale des constituants cellulaires endommagés ou redondants) interviendrait en seconde position, derrière la première ligne de défense de l'organisme (comportant notamment les transporteurs de

xénobiotiques, les enzymes antioxydantes et de biotransformation). Dans une troisième ligne de défense (en cas d'insuffisance des deux précédentes) l'autophagie favoriserait plusieurs types de mort cellulaire (apoptotique, autophagique et nécrotique) afin de préserver l'intégrité de l'organe.

Plus directement encore, les lysosomes jouent également un rôle dans certains processus de détoxication par la dégradation et/ou la séquestration de nombreux xénobiotiques. Ils sont notamment capables d'accumuler de grandes quantités de métaux et de polluants organiques, les isolant ainsi du cytoplasme dans les limites des capacités de stockage.

Certaines substances en excès peuvent exercer des effets toxiques sur le système lysosomal, tels qu'une déstabilisation de la membrane lysosomale et un éventuel relargage des hydrolases acides ainsi que des substances toxiques accumulées, à l'origine d'effets cytotoxiques (Viarengo *et al.*, 1981 ; Lowe & Pipe, 1994 ; Cajaraville *et al.*, 1995a). Des altérations, voire ruptures, de la membrane lysosomale peuvent également être envisagées en cas d'exercice intempestif de la fonction lysosomale digestive (De Duve, 1974). L'induction de fortes déstabilisations de la membrane lysosomale est responsable de la fuite de cathepsines et de l'activation de la phospholipase A2 lysosomale. Or, ces dernières seraient à l'origine d'une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène par les mitochondries, se traduisant par une augmentation de la fréquence du phénomène d'apoptose. Ceci a été montré sur des cellules isolées de mammifères (Antunes *et al.*, 2001 ; Zhao *et al.*, 2003), et mériterait certainement d'être étudié plus en détail dans un contexte d'écotoxicologie aquatique.

Des pathologies autres que la déstabilisation de la membrane peuvent être induites par des conditions stressantes sur le compartiment lysosomal. Il peut s'agir de modifications morphologiques (de volume), de changements quantitatifs de certains contenus lysosomaux spécifiques (tels que des augmentations des lipofuscines et lipides) ou d'une inhibition de la pompe à protons (Pellerin-Massicotte & Tremblay, 1998).

Les différentes altérations ou modifications que subit système lysosomal semblent donc bien refléter des atteintes de l'état de santé général des individus (Allen & Moore, 2004 ; Moore *et al.*, 2004). Elles correspondent à des réponses présentées comme précoces des organismes à divers facteurs de stress, puisqu'elles interviennent à un niveau sub-cellulaire,

avant que les dommages ne s'étendent aux niveaux supérieurs d'organisation que sont l'organe, l'individu, la population ou la communauté (Regoli, 1992).

1.2.2 Réponses lysosomales d'organismes aquatiques à différents contaminants et scénarios d'exposition in situ

Il existerait des réponses lysosomales dites « de stress général », telles que :

- la **déstabilisation de la membrane** ;
- le « **gonflement lysosomal** » (« lysosomal enlargment » en anglais, correspondant à une augmentation de la taille individuelle moyenne des organites, généralement mise en évidence par histochimie), parfois accompagné d'augmentations de leur nombre ;
- les **changements des contenus lipidiques des lysosomes** (abordés dans les sections 1.2. et 1.3 de cette analyse bibliographique).

De façon moins répandue, une détection moindre des lysosomes dans les hémocytes en culture, représenterait un biomarqueur non spécifique, reflet de la viabilité réduite des cellules (Gagnaire *et al.*, 2006).

D'autres réponses lysosomales seraient, en revanche, plus spécifiques à certaines classes de contaminants, mais également plus complexes et encore incomplètement décrites et élucidées, notamment chez les organismes exposés à certaines classes de contaminants organiques (Marigómez & Baybay-Villacorta, 2003).

Le propos n'est pas de réaliser ici une revue exhaustive des différentes études conduites en écotoxicologie aquatique sur les réponses lysosomales au stress environnemental (qui sont de plus en plus nombreuses), mais de présenter les différents types de réponses de ce compartiment cellulaire, généralement rapportés dans la littérature.

1.2.2.1 Réponses lysosomales aux contaminants organiques

Diverses études ont montré l'implication des lysosomes dans la séquestration des **contaminants organiques** et la sensibilité de ces organites à ce type d'exposition.

Si les changements du système lysosomal digestif de mollusques exposés en conditions contrôlées à certaines classes de contaminants organiques (HAP, fraction soluble de pétroles bruts) pouvaient sembler relativement stéréotypés et transposables d'une molécule à une autre, il s'est avéré que ces réponses étaient plus complexes, diverses et variables dans le temps qu'elles ne semblaient au premier abord (Marigómez & Baybay-Villacorta, 2003). Devant ces réponses variables, (Moore, 1988b) a tout d'abord émis l'hypothèse de réponses de type biphasique. Celles-ci auraient consisté en une réduction de la taille des lysosomes et/ou une stabilité membranaire accrue à de faibles doses et temps d'exposition (Moore, 1988b ; Cajaraville *et al.*, 1995a), et en un gonflement lysosomal accompagné d'une stabilité membranaire réduite à de fortes concentrations et après des expositions de long terme (Lowe *et al.*, 1981 ; Axiak *et al.*, 1988 ; Krishnakumar *et al.*, 1997). Les réponses constatées à de faibles niveaux d'exposition pourraient donc être hormétiques, avec un effet stabilisateur des hydrocarbures sur les membranes lysosomales (Moore, 1988b). Une autre étude a mis en évidence une situation encore plus complexe (Marigómez & Baybay-Villacorta, 2003). Plus de deux phases pourraient se succéder dans le temps dans la réponse de bivalves (*M. galloprovincialis*) exposés à divers types d'hydrocarbures, soit par balnéation, soit par injection (comme affranchissement du facteur confondant qu'est le comportement d'évitement par fermeture des valves). Ainsi, les phases suivantes se succèdent :

- un premier gonflement (mis en évidence 1 jour après injection ou début de l'exposition par l'eau), plus rapide chez les moules exposées à la fraction solubilisée de pétrole brut que dans le lot exposé au benzo[a]pyrène ;
- une réduction de la taille des lysosomes (après 7 jours d'exposition par l'eau uniquement), plus prononcée chez les individus exposés à la fraction solubilisée de pétrole brut
- un gonflement à « long terme » (21 jours).

Ces réponses complexes en conditions contrôlées suggèrent donc une difficulté supplémentaire dans l'interprétation des réponses lysosomales observées, notamment lors d'expositions *in situ* à des facteurs de stress multiples.

D'autre part, une <u>diminution de la quantité de lysosomes détectés</u> dans des hémocytes d'huître (*C. gigas*) témoignerait d'une viabilité diminuée des cellules exposées *in vitro* de 4 à 24 heures aux contaminants organiques suivants : les HAP benzo[a]pyrène (200 $\mu mol.L^{-1}$),

phénanthrène (300 µmol.L^{-1}) et anthracène (180 µmol.L^{-1}), le polychlorobiphényle congénère PCB 77 (6 et 60 µmol.L^{-1}) et l'insecticide paraoxon (40 et 400 µmol.L^{-1}).

L'huître, *C.gigas*, exposée pour 30 jours à un mélange d'herbicides atrazine – diuron – isoproturon (aux concentrations respectives de 2 – 1 – 0,5 µg.L^{-1}), a montré, dans la glande digestive, une augmentation de la transcription de gènes codant pour une protéine associée aux lysosomes et pour l'enzyme lysosomale protéolytique cathepsine-L. Ce phénomène pourrait correspondre notamment à une protéolyse accrue permettant une mise à disposition d'acides aminés pour la synthèse *de novo* d'enzymes détoxifiantes (Tanguy *et al.*, 2005).

Des études *in situ* ont de plus permis de mettre en évidence, d'une part, des corrélations positives entre l'activité de la β-glucuronidase digestive et les concentrations tissulaires en divers polluants organiques (DDT, Arochlor 1254 et 8 congénères de PCB) et, d'autre part, des corrélations négatives entre les concentrations tissulaires en divers contaminants organiques et le temps de latence de la N-acétyl-β-hexosaminidase digestive, chez deux espèces de moules marines (Krishnakumar *et al.*, 1994 ; Lowe & Fossato, 2000). Ces résultats semblent indiquer respectivement une stimulation de l'activité de dégradation et une atteinte de l'intégrité membranaire des lysosomes, toutes deux dépendantes de la concentration.

1.2.2.2 Réponses lysosomales aux métaux

L'exposition aux métaux est aussi connue pour provoquer des atteintes du système lysosomal. Le tableau I.2 présente les résultats de quelques études réalisées en laboratoire et *in situ* sur plusieurs types tissulaires et chez différentes espèces d'invertébrés aquatiques (mollusques et crustacés) exposés aux métaux.

Les réponses lysosomales associées à ce type d'expositions sont diverses. Des diminutions de la stabilité de la membrane lysosomale sont fréquemment rapportées, et parfois accompagnées d'une dégradation de la structure de ces organites pouvant entraîner la diffusion de leur contenu dans le cytosol (Viarengo *et al.*, 1981, 1987; Regoli, 1992 ; Regoli *et al.*, 1998a ; Ringwood *et al.*, 1998 ; Nicholson, 1999).

Tableau I.2. Présentation succincte des résultats de quelques études relatives à la toxicité des métaux et au système lysosomal réalisées chez plusieurs espèces d'invertébrés

Métaux	Espèces	Conditions expérimentales	Techniques	Résultats relatifs au compartiment lysosomal	Résultats annexes	Références
Cd	*Mytilus galloprovincialis*	**L.** expo. Cd (9j) + récupération (28j) ou expo. Cd (37j)	Latence NAH	↘↘ stabilité lysosomale expo. 9j, totalement réversible avec récupération 28j. Stabilité ~ avec expo. 37j	↗ MT(9j + 28j), ↗↗ MT (37j) ~ LPF	Viarengo *et al.*, 1987
(Cu, Mn, Fe, Pb) sur site	*Mytilus galloprovincialis*	**T.** 1 an site pollué / site de réf. **T'.** 6 mois transfert réf→pollué **L .** 4 sem dépuration des 2 pop	Latence NAH	**T.** ↘ stabilité lysosomale site pollué **T'.** ↗ taille lysosomes moules transférées **L .** ↗ stabilité chez pop site pollué, mais < pop réf.	**T.** ↗ LPF site pollué **T.** ↘ LNI pop transférée par rapport aux 2 pop autochtones	Regoli, 1992
T. Zn **L.** Zn, Cu, Cd	*Mytilus galloprovincialis*	**T.** site pollué au Zn **L.** acclimatation 1 sem., expo. sublétale 6 sem	Morphométrie β-GLU (gl.digestive)	**T.** ↗ taille lysosomes site pollué (retour au niveau témoin après 1 semaine de dépuration) **L.** ↗ taille lysosomes Cu, Zn, Cd < **T.**		Etxeberria *et al.*, 1994
Cu, Hg, Pb	*Adamussium colbecki*	**L.** (3-6-12j à 20, 5, 40 µg.L^{-1}) **T.** Effluents base italienne en Antarctique (30-60j)	Latence NAH (gl.digestive)	**L.** ↘ stabilité lysosomale (témoin>Pb>>Hg>Cu) ↗ taille, dégradations structurelles, diffusion contenu lysosomal (Cu, Hg) ; **T.** : effets très limités	↘ glutathion ↘ activités CAT+ GST Δ GPx ; ~ SOD	Regoli, 1998
Cu	*Crassostrea virginica*	**L.** expo. Cu (18h, 4-7-14j) **T.** transférés + autochtones sur 15 sites (3 réf.+ 12 pollués)	Rétention rouge neutre (cellules digestives)	**L.** ↘ stabilité lysosomale dès 18h, effet maintenu dans le temps et avec la dose **T.** ↘ stabilité lysosomale sites pollués		Ringwood *et al.*, 1998
(Zn, Cu, Ag, Cr…)	*Perna viridis*	**T.** 78j sur 3 sites pollués aux métaux lourds + 1 site réf.	Rétention rouge neutre (hémocytes)	↘ stabilité lysosomale sites pollués	~ rythmes cardiaques ↘ IC sites pollués	Nicholson, 1999
(Cu, Mn, Ni, Pb, Cr…)	*Mytilus galloprovincialis*	**T.** 1 site réf. + 1 site industriel **T.** transplantation croisée 4 sem. entre les 2 sites	Morphométrie β-GLU(gl.digestive)	nb. lysosomes site pollué > site réf. ↗ nb. lysosomes pour les transplantés (réf.→ pollué) pas de récupération en 1 mois pour les transplantés (pollué → réf.)	Pas d'accumulation de métaux (réf.→pollué) par rapport à réf. Hautes [métaux] tissus site pollué	Da Ros *et al.*, 2000
Cd	*Mytilus galloprovincialis*	**L.** (Injections *in-vivo* + glande digestive *in-vitro*)	Immunoblots sur la β-GLU	↗ niveaux de la protéine β-glucuronidase par rapport aux contrôles		Lekube *et al.*, 2000
(Cd, Cr, Cu...)	*Austropotamobius pallipes* *Pacifastacus leniusculus*	**T.** échantillonnage organismes natifs (automne 1996)	Morphométrie β-GLU(gl.digestive)	Corrélation positive entre ↗ taille lysosomes et l'indice de charge en polluant (standard calculé sur la base des [Cd], [Cu] et [Cr] tissulaires)	↘épaisseur de l'épithélium digestif	Antón *et al.*, 2000
Al	*Anodonta cygnea*	**L.** expo. Al (15j) + récupération (15j)	Ultrastructure	↗ nb. lysosomes dans branchies, rein, glande digestive pendant exposition et dépuration	↘ filtration à la forte [Al](irréversible)	Kadar *et al.*, 2001
Cu	*Dreissena polymorpha*	**L.** expo. Cu (2-7-15-30j) à 0, 10, 20 et 40 µg.L^{-1} + récupération (15-30j)	Morphométrie β-GLU(gl.digestive)	↗ nb. lysosomes et ↗ volume du système lysosomal en fonction de la dose et du temps d'exposition Restauration totale à 15j post-intoxication	↘ LNI avec restauration partielle ; ~ LPF ; taille PER > témoins après 2 et 7j	Ledy, 2002
Cd	*Dreissena polymorpha*	**L.** expo. Cd (7-21j) à 10 et 200 µg.L^{-1}	Morphométrie β-GLU(gl.digestive)	↗ nb. et taille des lysosomes en fonction de la dose et du temps d'exposition		Giamberini & Cajaraville, 2005
Cu	*Mytilus galloprovincialis*	**T.** transplantation 3 sem. (effluents miniers) 4 sites, gradient de [Cu] : 1~2<3<4	Latence NAH + Morphométrie β-GLU(gl.digestive)	↘ stabilité lysosomale sites 3 et 4 ; ↘ taille des lysosomes site 4. Les résultats au site 4 sont interprétés comme une exocytose des lysosomes (et LPF) contenant le cuivre dans la lumière des tubules digestifs	↗ LPF et métaux tissulaires (2 et 3) ; Site 4 : ↘ LNI; atrophie épithéliale, remplacement des cellules digestives par des cellules basophiles (site 4) ; gamétogenèse précoce(♀ site 4)	Zorita *et al.*, 2006

*NB : lorsque plusieurs substances sont testées, les concentrations sont données dans leur ordre respectif. Abréviations : **L .** : étude de laboratoire, **T.** : étude de terrain, Al : aluminium, Cd : cadmium, Cu : cuivre, Hg : mercure, Pb : plomb, Zn : zinc, [x] : concentration, ↗ : augmentation, ↘ : diminution, Δ : réponse variable, ~ : réponse très peu différente du témoin, ♀ : femelles ;β-GLU : β-glucuronidase ; expo. : exposition ; gl.digestive : glande digestive ; j. : jour(s), h. : heure(s), LNI : lipides neutres insaturés ; LPF : lipofuscines ; NAH : N-acétyl-β-hexosaminidase ; nb. : nombre, pop : populations, PER : peroxysomes ; réf. : référence, sem. : semaine(s), CAT : catalase, IC : indices de condition, GST : glutathion S-transférases, GPx : glutathion peroxidases, MT : métallothionéines, SOD : superoxyde dismutase*

Des augmentations de leur taille ou de leur nombre sont également observées Regoli, 1992 ; Etxeberria *et al.*, 1994 ; Regoli *et al.*, 1998a ; Antón *et al.*, 2000 ; Da Ros *et al.*, 2000 ; Kadar *et al.*, 2001 ; Ledy, 2002 ; Giamberini & Cajaraville, 2005 ; Zorita *et al.*, 2006).

Enfin, certaines enzymes lysosomales semblent être rapidement présentes en plus grandes quantités dans la glande digestive de mollusques exposés aux métaux, comme l'a montré une étude utilisant des techniques immunochimiques pour quantifier la protéine β-glucuronidase, dont le niveau augmente significativement une heure après exposition au cadmium (Lekube *et al.*, 2000).

Ces réponses lysosomales aux métaux ne sont pas toujours proportionnelles au niveau d'exposition, comme cela a été observé sur les augmentations de taille des lysosomes n'apparaissant qu'à de fortes concentrations. Ceci pourrait être lié à une éventuelle protection contre de faibles concentrations de métaux non-métaboliques dans les étapes initiales (Etxeberria *et al.*, 1994).

1.2.2.3 Réponses lysosomales au stress oxydant

Les lysosomes, impliqués dans certains mécanismes oxydatifs (souvent étroitement liés à la présence de métaux), peuvent également être affectés par un stress oxydant.

Ainsi, l'exposition à des oxyradicaux ou au peroxyde d'hydrogène à des concentrations sub-létales induit *in vitro* des déstabilisations de la membrane lysosomale (Winston *et al.*, 1991 ; Brunk *et al.*, 1995) et le même phénomène observé *in vivo* est également accompagné d'augmentations de la surface lysosomale totale (Cavaletto *et al.*, 2002).

Comme il sera plus détaillé dans la section 1.2. de ce chapitre, le stress oxydant est généralement responsable de l'accumulation de lipofuscines dans les lysosomes.

1.2.3 Influence d'autres facteurs

Si le système lysosomal répond à la présence de contaminants, son fonctionnement et sa morphologie sont aussi sous la dépendance d'un grand nombre de facteurs biotiques et abiotiques qu'il est nécessaire de prendre en compte lors de l'utilisation de ce compartiment cellulaire comme biomarqueur de stress environnemental.

Ainsi, le rôle joué par ces organites dans la digestion intracellulaire implique que le statut nutritionnel des organismes exerce une influence non négligeable sur les lysosomes. Le jeûne chez *L. littorea* serait responsable d'un gonflement lysosomal (Moore, 1988b). Ce même phénomène, constaté en été et automne chez *M. galloprovincialis*, pourrait être attribué à une augmentation de l'activité hétérophagique liée à un changement de la disponibilité en nourriture ou du comportement nutritionnel des moules (Marigómez *et al.*, 1996).

En outre, le cycle reproducteur entraîne souvent une remobilisation des réserves de la glande digestive pour le développement gamétique, ce qui induit une déstabilisation de la membrane lysosomale durant les derniers stades de la reproduction chez *M. edulis* (Moore, 1991). Cette dernière est, de plus, placée sous contrôle neuroendocrinien et implique également des hormones stéroïdes, dont l'action déstabilisatrice sur les membranes lysosomales a été montrée *in vitro* et *in vivo*, mais qui, contrairement aux facteurs de stress environnementaux précités, ne semblent pas induire d'autres modifications des lysosomes, tant au niveau de leur taille que de leur contenu (Moore *et al.*, 1978 ; Moore, 1991).

D'autre part, il a été établi que le stress thermique et l'hypoxie peuvent également fragiliser la membrane lysosomale chez *M. edulis* (Moore, 1976a ; Moore *et al.*, 1979). Une salinité accrue provoque une augmentation du nombre de lysosomes chez cette même espèce. Ce phénomène résulte probablement d'un accroissement du catabolisme des protéines (par autophagie ou apoptose) pour disposer d'acides aminés libres pouvant être re-mobilisés pour assurer l'osmorégulation (Pipe & Moore, 1985).

Enfin, le maintien des organismes en laboratoire durant une longue période (au-delà de 3 ou 4 semaines) constitue également un facteur de stress susceptible d'induire une fusion des lysosomes, mise en évidence par une augmentation de leur taille accompagnée d'une diminution de leur nombre (Cajaraville *et al.*, 1991a). Une diminution de la stabilité lysosomale digestive a également été montrée chez la même espèce (*M. galloprovincialis*) après une journée de maintien en aquarium au laboratoire, suivie d'une augmentation, constatée après une semaine et interprétée comme le résultat de l'acclimatation des animaux aux conditions de maintien (Dimitriadis & Koukouzika, 2003).

1.2.4 Classification des réponses lysosomales dans les différentes catégories de biomarqueurs

Les implications diverses du système lysosomal dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et dans des processus de détoxication directs (séquestration, dégradation…) ou indirects (accroissement du turn-over cellulaire, remobilisation rapide des réserves…) rendent difficile le classement des réponses lysosomales dans l'une ou l'autre des catégories de biomarqueurs présentées dans l'introduction générale du document.

La plupart de réponses lysosomales sont présentées comme des biomarqueurs d'effets (Cajaraville *et al.*, 1995b). Cependant, la prise en charge extrêmement rapide des contaminants ingérés par les lysosomes des cellules digestives (Lekube *et al.*, 2000) pourrait, dans les phases les plus précoces, justifier la classification des changements morphométriques du système lysosomal digestif et de son contenu enzymatique en biomarqueurs d'exposition, témoignant simplement de la pénétration et de la distribution d'une substance ou d'un élément dans le corps.

Une protéolyse lysosomale accrue pourrait être considérée comme un mécanisme impliqué dans la résistance des insectes aux insecticides, ce qui a été démontré par comparaisons de deux souches de la mouche, *Musca domestica*, l'une résistante et l'autre sensible (Wilkins *et al.*, 1999). En effet, cette protéolyse fournirait un apport supplémentaire en acides aminés pour la synthèse *de novo* des enzymes détoxifiantes. Ainsi, une augmentation de l'activité des protéases lysosomales et certaines modifications morphométriques reflétant, par exemple, un cycle lysosomal accéléré, pourraient être, dans certains cas, considérés comme des biomarqueurs de sensibilité/résistance. Dans le même ordre d'idée, une stimulation régulière de l'autophagie par des épisodes répétés de stress oxydant est également présentée comme un possible mécanisme de résistance et de protection contre les effets de ce type de stress (Moore *et al.*, 2006b). Il s'agirait, au-delà de la simple protéolyse, d'un mécanisme favorisant un turn-over cellulaire accéléré qui permet la production d'énergie et de protéines nécessaires à la lutte contre le stress.

De même, selon le degré des réponses lysosomales, celles-ci pourront témoigner d'une participation de la fonction lysosomale à la défense de l'organisme, mais aussi des dommages subis au niveau subcellulaire.

Cette difficulté de classement et l'apparente inadéquation des catégories couramment employées peuvent expliquer la désignation de la plupart des réponses lysosomales comme « biomarqueurs de stress général » (voir par exemple, (Etxeberria *et al.*, 1995 ; Lekube *et al.*, 2000 ; Petrovic *et al.*, 2001)), à l'exception des changements morphométriques complexes plus spécifiques de l'exposition à certains contaminants organiques. Cette expression, « biomarqueur de stress général », est employée sans précision systématique des notions d'exposition, d'effet, de sensibilité ou encore de défense ou de dommages, puisque ces phénomènes semblent trop intriqués dans les réponses de ces organites aux contaminants.

L'emploi de l'expression « stress général » est également justifié par l'influence importante de facteurs autres que les contaminants sur les réponses lysosomales, qui est l'une des raisons pour lesquelles l'interprétation des réponses lysosomales nécessite de grandes précautions.

1.3 L'ACCUMULATION DES LIPOFUSCINES COMME BIOMARQUEUR DE STRESS ENVIRONNEMENTAL

Découvertes au 19ème siècle par l'histologiste hollandais Hannover dans les neurones humains disséqués, les lipofuscines (de « lipo », « gras » en grec et « fuscus », « brun » en latin) sont des pigments intracellulaires granuleux aux formes irrégulières, qui émettent *in situ* une fluorescence vert-jaunâtre ou orange-jaunâtre lors d'une excitation aux UV ou à la lumière bleue. Leur composition biochimique est très variable entre les tissus et les espèces. Leurs constituants majeurs seraient des lipides (20 à 50 %, dont une part importante de triglycérides) et des protéines (30 à 70 %) pouvant être glycosylés (4 à 7 % de glucides), et elles comporteraient également des traces de métaux (Fe, Cu, Al, Zn) (Björkerud, 1964 ; Monserrat *et al.*, 1995 ; Porta *et al.*, 2002).

Les lipofuscines sont formées dans les lysosomes secondaires et constituent des déchets de l'auto- ou de l'hétérophagocytose de matériel biologique varié. Différents modes de

formation sont rapportés dans la littérature, et il semblerait que les voies diffèrent selon le tissu considéré.

Une des voies majeures de formation implique des radicaux libres dérivés de l'oxygène, qui peuvent initier une séquence complexe de peroxydation des lipides, lorsqu'ils ne sont pas totalement détoxifiés par les systèmes antioxydants. Cette lipoperoxydation est responsable de l'altération structurale et fonctionnelle des membranes cellulaires. Les membranes altérées se trouvent, par la suite, intégrées aux lysosomes, où des carbonyles, produits de dégradation persistants tels que le malondialdéhyde, combinés avec des amines primaires, acides aminés ou protéines (voire à des bases azotées des acides nucléiques), s'accumuleraient sous forme de lipofuscines insolubles (Nagy, 1988 in Viarengo & Nott, 1993 ; Yin, 1996). Cette lipoperoxydation, particulièrement des acides gras polyinsaturés, peut également se produire directement dans les lysosomes, en présence de l'anion superoxyde O_2^- ou de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 provenant principalement des mitochondries actives dans la cellule, voire en cours de dégradation à l'intérieur des lysosomes (Brunk *et al.*, 1992). D'autres produits de réactions oxydatives, seuls ou associés à des composés aminés, sont à l'origine de la formation des lipofuscines. Il s'agit de dérivés de protéines, de composés polyéniques (rétinoïdes, caroténoïdes et dolichols) et de l'acide ascorbique. En outre, un ensemble de réactions non oxydatives et non enzymatiques de glycosylation (encore appelées glycation ou réaction de Maillard), impliquant des sucres réducteurs, toujours en présence de composés aminés, génère également des lipofuscines. Ce type de réactions est favorisé par la présence, non indispensable, d'oxygène et de métaux de transition (Yin, 1996).

1.3.1 Accumulation, devenir des lipofuscines et controverses autour des effets sur la cellule.

Il semble exister un effet délétère de l'accumulation des lipofuscines dans les lysosomes secondaires, qui augmentent de taille et sont donc statistiquement plus susceptibles que les lysosomes non chargés de recevoir les enzymes néosynthétisées, qui « s'épuisent » à accomplir l'impossible dégradation de ces pigments, au détriment des autres activités lysosomales (Terman & Brunk, 2004). La surcharge lysosomale en lipofuscines peut également provoquer un état de «saturation» empêchant les lysosomes d'accumuler davantage de produits de la lipoperoxydation, ce qui peut être à l'origine de dommages cellulaires

(Brunk & Cadenas, 1988). En outre, il se peut que les métaux de transition liés aux lipofuscines sensibilisent les lysosomes au stress oxydant (Terman & Brunk, 2004).

Cependant, les équipes travaillant sur les cellules digestives de mollusques leur attribuent, à l'inverse, un possible rôle dans la détoxication des métaux (Viarengo & Nott, 1993 ; Zorita *et al.*, 2006). Adsorbés à la surface des granules de lipofuscines, les métaux sont séquestrés par l'accumulation progressive de pigment au fur et à mesure du grossissement des granules. Ainsi, les lipofuscines et les métaux ainsi piégés peuvent être éliminés par l'exocytose des corps résiduels dans la lumière des tubules digestifs ou par le remplacement rapide des cellules digestives elles-mêmes.

Ainsi, si les interrogations sur l'éventuelle dégradation ou élimination des lipofuscines des cellules sans activité mitotique sont encore d'actualité (Katz, 2002), l'accumulation de ces pigments ne semble pas irréversible dans les cellules fréquemment renouvelées et/ou placées face à la lumière d'un émonctoire naturel, tel que le tubule digestif des mollusques.

1.3.2 *L'accumulation de lipofuscines digestives chez les invertébrés aquatiques et les poissons exposés à différents contaminants et scénarios d'exposition* in situ

Des études morphométriques menées grâce à la densimétrie et la morphométrie permettent de quantifier les changements de contenu en lipofuscines dans les tissus de divers organismes soumis à différentes conditions environnementales (tableau I.3).

Divers facteurs de contamination environnementale sont susceptibles de provoquer des accumulations de lipofuscines. Cela a été montré à de nombreuses reprises dans les cellules digestives de bivalves ou les hépatocytes de poissons, après exposition à des contaminants organiques (Moore, 1988b ; Krishnakumar *et al.*, 1994, 1997 ; Au *et al.*, 1999 ; Fåhraeus-Van Ree & Spurrell, 2000) et métalliques (Viarengo *et al.*, 1987 ; Regoli, 1992 ; Dondero *et al.*, 2006 ; Zorita *et al.*, 2006) ou à des facteurs de stress oxydant (Cavaletto *et al.*, 2002), individuellement (laboratoire), et sous forme de mélanges complexes *in situ* (Au & Wu,

2001 ; Ledy, 2002 ; Riveros *et al.*, 2002 ; Kagley *et al.*, 2003 ; Petrovic *et al.*, 2004 ; Nigro *et al.*, 2006). Les accumulations de lipofuscines, lorsqu'elles sont accompagnées d'altérations lysosomales, sont considérées comme de bons indicateurs d'augmentation des processus autophagiques (Moore, 1988b).

Le mode de formation des lipofuscines étroitement associé à la plupart des mécanismes oxydatifs cellulaires est en accord avec tous ces résultats, qu'il s'agisse d'une implication directe du peroxyde d'hydrogène, de l'action catalytique des métaux tels que le cuivre ou le fer ou encore d'une participation plus indirecte des contaminants organiques. En effet, les HAP sont par exemple métabolisés par le cytochrome P450 en quinones dont l'oxydation entraînerait la formation d'espèces réactives de l'oxygène (Au & Wu, 2001).

1.3.3 Influence d'autres facteurs sur l'accumulation de lipofuscines

La reproduction peut entraîner une lipoperoxydation accrue (phénomène générateur de lipofuscines), comme cela fut suggéré chez la coquille *Mizuopecten yeoenssis* (Lukyanova & Khotimchenko, 1995).

Dans des sites peu contaminés, une étude saisonnière a effectivement montré une corrélation négative entre les contenus digestifs en lipofuscines de *M. edulis* et la température de l'eau, interprétée comme une possible conséquence des processus physiologiques liés à la ponte et la résorption des gonades (Petrovic *et al.*, 2004). Aucune corrélation ne fut trouvée entre l'accumulation de lipofuscines d'une part et la salinité, le pH ou le taux de dioxygène dissous, d'autre part.

En revanche, durant toute cette étude, les individus échantillonnés dans des sites contaminés montraient des niveaux élevés, mais constants de pigments

Tableau I.3. Présentation succincte des résultats de quelques études relatives aux changements du contenu en lipofuscines réalisées chez plusieurs organismes aquatiques soumis à des conditions de stress

Contaminants	**Espèces**	**Conditions expérimentales**	**Techniques employées**	**Résultats relatifs aux contenus en LPF**	**Résultats annexes**	**Références**
Cu	*Mytilus galloprovincialis*	**L.** expo. Cu 40 µg.l^{-1} (3 j) + récupération (3 j)	Morphométrie	↗ LPF par rapport au témoin		Viarengo *et al.*, 1981
T. HAP, PCB, métaux **L.** Huile diesel + Cu	*Mytilus edulis*	**T.** Gradient de pollution 4 sites (GEEP, Norvège) (1<2<3<4) **L.** 4 [Cu] + [diesel] croissantes (C<L<M<H)	Microdensimétrie (660 nm)	**T.** ↗ LPF + ↗ nb corps résiduels (sites 2, 3, 4) **L.** ↗ LPF (mésocosme H)	**T.** ↘ stabilité LYS ; ↗ taille LYS ; ↗ LNI cytoplasmiques et lysosomaux (sites 2, 3, 4) ; ↗activité NFR (sites 3,4) **L.** ↗ taille LYS (+ ↗ LNI lysosomaux) (mésocosmes C, M, H)	Moore, 1988b
Métaux lourds sur site	*Mytilus galloprovincialis*	**T.** 1 an 2 sites (pollué-réf.) **T'.** 6 mois transfert (réf.→pollué) **L .** 4 sem dépuration 2 pop	Morphométrie	**T.** ↗ LPF (site pollué)	**T.** ↘ stabilité LYS site pollué **T'.** ↗ taille LYS moules transférées **L .** ↗ stabilité chez pop provenant du site pollué, mais < pop de réf.	Regoli, 1992
(HAP, PCB, DDT) sur site	*Mytilus edulis*	**T.** 1 collecte sur 4 sites réf. + 5 sites contaminés	Morphométrie	↗ LPF (sites pollués)	↘ stabilité LYS, ↗ activité NAH, ↗ LNI cytoplasmiques et lysosomaux, ↘ taille organismes sur sites pollués	Krishnakumar *et al.*, 1994
HAP, PCB	*Mytilus edulis*	**L.** expo. orale 6 et 30 j (3 HAP ou 1 PCB ; 150 µg.L^{-1})	Morphométrie	↗ LPF (6 j pour expo PCB, 30 j pour expo HAP)	↘ stabilité LYS (6 j et 30 j pour expo HAP) ↗ activité NFR (30 j pour expo HAP et PCB) ↗ activité CAT (30 j pour expo PCB)	Krishnakumar *et al.*, 1997
B[a]P	*Solea ovata*	**L.** Suivi 7j après injection I.P. 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg.kg^{-1}	Morphométrie ultrastrucurale	↗ abondance LPF dans les hépatocytes (1 et 5 mg.kg^{-1})	Induction EROD dose-dépendante ; ↗ lipides, PER, mitochondries, LYS, RE ; ↘ glycogène (1 et 5 mg.kg^{-1}) ; Condensation du contenu cytoplasmique (10 mg.kg^{-1})	Au *et al.*, 1999
Toxaphène (=organochloré)	*Pleuronectes ferrugineus* ♀ juvéniles	**L.** Hépatocytes isolés exposés 3 j au toxaphène (0, 1, 10 µg.ml^{-1})	Morphométrie	↗ LPF (10 µg.ml^{-1})	↗ concentration-dépendante lipides totaux + LNI ; ↗ activité phosphatase acide	Fåhraeus-Van Ree & Spurrell, 2000
Métaux, HAP, PCB + autres organiques	*Solea ovata* immatures	**T.** Autochtones d'un site au sédiment hautement contaminé + site de réf.	Morphométrie ultrastrucurale	↗ NS abondance LPF dans les hépatocytes (site contaminé)	Induction EROD (site contaminé) ; ↗ NS nb. et taille PER (site contaminé) ; Corrélation entre induction EROD et volume des LPF	Au & Wu, 2001
Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	*Mytilus galloprovincialis*	**L.** expo. H_2O_2 20µM pendant 1, 4, 7 j	Morphométrie	↗ abondance LPF concentration-dépendante	Surface LYS doublée à 1, 4, 7 j par rapport au témoin ; ↘ stabilité LYS concentration-dépendante ; ↗ MT + MDA à 4 j, réversible (7 j) ; ↗ activités CAT, SOD ; ~ GPX	Cavaletto *et al.*, 2002
Cu	*Dreissena polymorpha*	**L.** expo. Cu (2-7-15-30 j) à 0, 10, 20 et 40 µg.L^{-1} + récupération (15-30 j)	Morphométrie	~ LPF pendant expo. ↗ NS LPF après 30 j et post-intoxication, à partir de 20 µg.L^{-1}	↗ nb. lysosomes et ↗ volume du système lysosomal et restauration totale à 15j post-intoxication ; ↘ LNI avec restauration partielle ; taille PER > témoins après 2 et 7j	Ledy, 2002
Cu	*Mytilus galloprovincialis*	**T.** transplantation 3 sem. (effluents miniers) 4 sites, gradient de [Cu] : 1~2<3<4	Morphométrie	↗ LPF (sites 2 et 3), puis exocytose au site 4	↗ métaux tissulaires (2 et 3) ↘ LNI, stabilité LYS et taille des LYS au site 4 Modifications structurales de l'épithélium digestif (site 4) Gamétogenèse précoce(♀ site 4)	Zorita *et al.*, 2006

Abréviations : [x] : concentration, ↗: augmentation, ↘: diminution, Δ : réponse variable, ~ : réponse très peu différente du témoin, ♀ : femelles; CAT : catalase, Cd : cadmium, Cu : cuivre, expo. : exposition, GPx : glutathion peroxidases, GST : glutathion S-transférases, h : heure(s), IC : indices de condition, IP : intra-péritonéale, j : jour(s), ***L .*** *: étude de laboratoire, LNI : lipids neutres insaturés ; LPF : lipofuscines ; LYS : lysosomes / lysosomal(e) ; MDA : malondialdéhyde ; MT : métallothionéines, NAH : N-acétyl-ß-hexosaminidase ; nb. : nombre, NFR : NADPH-férrohémoprotéine réductase ; NS : non significatif (ve), PER : peroxysomes ; pop : populations, réf. : référence, sem. : semaine(s), SOD : superoxyde dismutase,* ***T.*** *: étude de terrain.*

1.3.4 Accumulations de lipofuscines et classifications des biomarqueurs

Une fois encore, les classes habituellement attribuées aux biomarqueurs (voir Tableau i.1) semblent difficilement applicables aux accumulations de lipofuscines. En effet, ce phénomène est interprété, selon les auteurs et le degré de stress, comme un effet toxique, occasionnant des dommages cellulaires potentiels ou, à l'inverse, comme un possible mécanisme de défense, notamment au niveau du tissu digestif des mollusques, par exocytose des corps résiduels dans la lumière des tubules (voir paragraphe 1.3.2.1).

Généralement associée au gonflement lysosomal et aspécifique, l'accumulation de lipofuscines est souvent présentée comme une altération lysosomale à part entière (Nigro *et al.*, 2006 ; Zorita *et al.*, 2006), faisant partie des biomarqueurs de stress général (Zorita *et al.*, 2006).

Elle est parfois également désignée, de façon légèrement plus ciblée, comme un des indices reflétant l'intensité des phénomènes de lipoperoxydation, c'est-à-dire comme marqueur de stress oxydant (Bocchetti & Regoli, 2006 ; Dondero *et al.*, 2006).

1.4 UTILISATION DES LIPIDES NEUTRES INSATURES COMME BIOMARQUEURS.

Les lipides neutres sont des molécules non chargées, comprenant les acylglycérols (glycérides), les cérides et les stérides. Parmi les lipides neutres, les acylglycérols sont constitués de glycérol estérifié pour donner les mono-, di- ou triglycérides. Si les mono- et diglycérides existent dans la nature, c'est la forme triglycérides qui est la majeure source de carbone et d'énergie, ubiquitaire chez les animaux (Olsen, 1999). Le contenu énergétique important des lipides (39.5 J/mg), supérieur à ceux des protéines et glucides (23.63 et 17.18 J/mg), implique qu'ils jouent un rôle important dans le métabolisme énergétique (par le biais du catabolisme oxydatif) (Cavaletto & Gardner, 1999 ; Olsen, 1999).

1.4.1 Réponses aux polluants et intérêts comme biomarqueurs

Les niveaux de lipides neutres des organismes aquatiques peuvent être affectés de diverses façons par des conditions environnementales stressantes (tableau I.4).

De nombreuses études ont montré une augmentation des lipides neutres cytoplasmiques et surtout lysosomaux, chez divers organismes aquatiques exposés à des contaminants organiques (Moore, 1988b ; Köhler, 1991 ; Krishnakumar *et al.*, 1994 ; Fåhraeus-Van Ree & Payne, 1999 ; Fåhraeus-Van Ree & Spurrell, 2000). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer le mécanisme impliqué. Cette augmentation des niveaux de lipides neutres pourrait correspondre à une « lipidose chimiquement induite », dégénération pathologique des lipides impliquant les lysosomes. Elle se trouve en effet souvent associée à un accroissement de taille des lysosomes et/ou à une stabilité basse de leur membrane, respectivement témoin et facteur facilitant de l'autophagie accrue des gouttelettes lipidiques cytoplasmiques (Moore, 1988a). Cette accumulation de lipides neutres dans les lysosomes pourrait résulter d'une augmentation de leur synthèse, d'une incapacité à les cataboliser (pouvant être due à un dysfonctionnement des lipases lysosomales) ou encore d'une défaillance du contrôle de leur stockage (Lowe & Clarke, 1989).

Marigómez et Baybay-Villacorta (2003) ont récemment émis l'hypothèse que la lipophilie des contaminants organiques pourrait être liée à l'occurrence de ces accumulations de lipides neutres insaturés. En effet, l'acétone, substance organique hydrophile ($\log_{Kow}$ = 0,24), n'induit pas ce phénomène contrairement à d'autres substances très lipophiles, telles que le B[a]P ou di (2-éthylhexyl) phthalate (DEHP) ($\log_{Kow}$ = 5,97 et 4,89, respectivement).

Dans le même ordre d'idée, il semble exister, chez la dreissène, une plus forte corrélation des niveaux de PCB avec les lipides neutres qu'avec les lipides totaux. Les liens étroits entre richesse lipidique des tissus et partition des contaminants lipophiles impliquent également de grandes conséquences des variations qualitatives des lipides sur les concentrations tissulaires des xénobiotiques, et donc sur la menace pour l'organisme (Roe & MacIsaac, 1998).

Tableau I.4. Présentation succincte des résultats de quelques études relatives aux changements du contenu en lipides réalisées chez plusieurs espèces de poissons et invertébrés aquatiques soumis à des conditions de stress

Contaminants	Espèces	Conditions expérimentales	Techniques employées	Résultats relatifs aux contenus en lipides	Résultats annexes	Références
T. HAP, PCB, métaux	*Mytilus edulis* *Carcinus maenas*	**T.** Gradient de pollution 4 sites (GEEP, Norvège) (1<2<3<4) **L.** 4 [Cu] + [diesel] croissantes (C<L<M<H)	Analyse gravimétrique ; Séparation, quantification : CCM-DIF	**T.** ↗ lipides + L/P (sites 2, 3, 4 : *M. edulis*, site 3: *C. maenas)* **L.** lipides + L/P : ↗ mésocosme H : *M. edulis*; ↘ mésocosme *M : C. maenas* **T.** *M. edulis* : ↗ LN totaux (↗ TAG ; Δ DAG, AGL) ; ↘ PL site 4 d'où ↘ LP d'où ↗ LN / LP **L.** *M. edulis* : ↘ LN + ↗ PL (L et M) ; ↗ LN (=↗ MAG) + ↘ PL (H) **T.L.** changements des classes lipidiques corrélés avec concentrations des moules en PCB et HAP		Capuzzo & Leavitt, 1988
T. HAP, PCB, métaux **L.** Huile Diesel + Cu	*Mytilus edulis*	**T.** Gradient de pollution 4 sites (GEEP, Norvège) (1<2<3<4) **L.** 4 [Cu] + [diesel] croissantes (C<L<M<H)	Microdensimétrie (530 nm) (LN cellulaires) + microscopie (LN lysosomaux)	**T.** ↗ LN cellulaires et lysosomaux (sites contaminés) **L.** ↗ LN lysosomaux (quand ↗ taille lysosomes), ~ LN cellulaires	**T.** ↘ stabilité lysosomale ; ↗ taille lysosomes ; ↗ lipofuscines sites 2, 3, 4 ; ↗ activité NFR sites 3,4 **L.** ↗ lipofuscines mésocosme H ; ↗ taille lysosomes mésocosmes C, M, H	Moore, 1988a
Métaux lourds	*Mytilus galloprovincialis*	**T.** 1 an 2 sites (pollué-réf.) **T'.** 6 mois transfert (réf.→ pollué) **L .** 4 sem dépuration 2 pop	Morphométrie (oil red O)	**T.** Variations saisonnières des 2 pop (↗ été, ↘ hiver). **T'.** LN des transférés << aux 2 pop naturelles + aucune ↗ LN. en été	**T.** ↘ stabilité lysosomale + ↗ lipofuscines site pollué **T'.** ↗ taille lysosomes moules transférées **L .** ↗ stabilité lysosomale pendant dépuration chez pop provenant du site pollué, mais < pop de réf.	Regoli, 1992
(HAP, PCB, DDT) sur site	*Mytilus edulis*	**T.** 1 collecte sur 4 sites réf. + 5 sites contaminés	Morphométrie	↗ LN cytoplasmiques et lysosomaux (sites pollués)	↘ stabilité lysosomale, ↗ activité NAH, ↗ lipofuscines, ↘ taille organismes sur sites pollués	Krishnakumar *et al.*, 1994
B[a]P	*Solea ovata*	**L.** Suivi 7j après injection I.P. 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg/kg	Morphométrie ultrastrucurale	↗ abondance gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes (1 et 5 mg/kg)	Induction EROD dose-dépendante ; ↗ lipofuscines, peroxysomes, mitochondries, lysosomes, RE ; ↘ glycogène 1 et 5 mg/kg ; Condensation du contenu cytoplasmique 10 mg/kg	Au *et al.*, 1999
Rosin : acides abiétiques et pimariques (effluents d'udpp)	*Mytilus edulis*	**L.** exposition 15j au Rosin, solution de Rosin renouvelée 3x	Morphométrie (Sudan black B + oil red O)	↗ nb. + taille gouttelettes lipides totaux + ↗ abondance LN	Histopathologie dégénération des cellules digestives, ↗ basophilie des granulocytes ; nombreux corps résiduels ; ↗ activités G-6-PDH et NADPH-diaphorase	Fåhraeus-Van Ree & Payne, 1999
Toxaphène (=organochloré)	*Pleuronectes ferrugineus* ♀ juvéniles	**L.** Hépatocytes isolés exposés 3j au toxaphène (0, 1, 10 µg/ml)	Morphométrie (Sudan black B + oil red O)	↗ concentration-dépendante nb. + taille gouttelettes lipides totaux (dès 1µg/ml) + LN (10 µg/ml)	↗ activité phosphatase acide ; ↗ lipofuscines	Fåhraeus-Van Ree & Spurrell, 2000
Pollutions multiples (industrielles et agricoles)	Mytilus galloprovincialis (pop naturelles et/ou cultivées)	**T.** Gradient de pollution 6 sites prélèvements trimestriels (3x)	Morphométrie (LN cytoplasmiques + lysosomaux)	Variations saisonnières (↗ printemps, ↘ fin été, ↘↘hiver). Pas d'effet lié au degré de pollution (mais LN cytoplasmiques majoritairement étudiés ici)	↗ nb. corps résiduels stations relativement polluées ; ↘ stabilité lysosomale, ↗ volume + diamètre hétérolysosomes + corps résiduels, ↗ métaux lourds intralysosomaux parfois : pollution plus forte	Domouhtsidou & Dimitriadis, 2001
Cu	*Dreissena polymorpha*	**L.** expo. Cu (2-7-15-30j) à 0, 10, 20 et 40 µg.L^{-1} + récupération (15-30j)	Morphométrie	↘ continue des LNI significative par rapport aux témoins : dès 7 j (40 µg.L^{-1}) ou après 15 j (20 µg.L^{-1}), avec restauration partielle post-intoxication	↗ nb. lysosomes et ↗ volume du système lysosomal et restauration totale à 15j post-intoxication ; ~ LPF ; taille PER > témoins après 2 et 7j	Ledy, 2002

Abréviations : ↗ : augmentation, ↘ : diminution, Δ : réponse variable, ~ : réponse très peu différente du témoin, ♀ : femelles, AGL : acides gras libres, CCM-DIF : chromatographie couche mince couplée à un détecteur à ionisation de flamme, Cu : cuivre, DAG : diacylglycérols, expo. : exposition, I.P. : intra-péritonéale, j. : jour(s), **L .** : étude de laboratoire, L/P : ratio lipides/protéines, LN : lipides neutres, LP : lipides polaires, MAG : monoacylglycérols, nb. : nombre, NFR : NADPH-férrohémoprotéine réductase, PL : phospholipides, pop : populations, réf. : référence, sem. : semaine(s), **T.** : étude de terrain, TAG : triacylglycérols, udpp : usines de pâte à papier.

Néanmoins, une pollution spécifiquement métallique ne semble pas provoquer d'augmentations des quantités de lipides neutres par rapport à des sites non contaminés. Des déplétions des lipides de la glande digestive sont observées chez des organismes transférés d'un site de référence vers un site contaminé en métaux, ce qui pourrait correspondre à une utilisation rapide des réserves lipidiques liée au stress et à un défaut d'adaptation par rapport à la population autochtone (Regoli, 1992). L'exposition à des concentrations « environnementalement réalistes » de cuivre en conditions contrôlées, des transplantations à l'aval de rejets d'industries papetières ou le long d'un gradient de pollution dans un programme de biosurveillance (PNETOX) sont également à l'origine de diminutions parfois radicales (de plus de 75 %) des quantités de lipides neutres insaturés mis en évidence dans la glande digestive de divers mollusques d'eau douce (Ledy, 2002).

1.4.2 Fluctuations saisonnières et influence d'autres facteurs sur les niveaux de lipides et en particulier de lipides neutres insaturés

Les variations des lipides neutres insaturés semblent parfois difficiles à interpréter et à relier à des niveaux de contamination, tant l'influence de facteurs saisonniers et du statut reproducteur des organismes est importante. Les facteurs qui exercent un effet sur le profil lipidique saisonnier des organismes dulçaquicoles benthiques sont :

- la disponibilité en nourriture,
- la morphologie,
- le statut reproducteur,
- le niveau d'adaptation
- l'habitat (notamment lorsqu'il influe sur la température et donc la ressource trophique, comme dans les zones profondes des grands lacs).

Contrairement à ce qui est rapporté chez la plupart des autres bivalves, les lipides de la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha* sont plus importants que le glycogène en terme de réserves énergétiques (Sprung, 1995).

Chez la dreissène, une augmentation de température favorable à la gamétogenèse est suivie d'un transfert des lipides de la glande digestive vers la gonade. Les effets cumulés de la

gamétogenèse et de la disponibilité en nourriture (pouvant elle-même être limitée par la densité des populations de dreissènes) semblent agir sur le niveau de lipides de stockage (triacylglycérols). Celui-ci est maximal au printemps (saison des pics phytoplanctoniques) et décline durant l'été et l'automne, tandis que les phospholipides, constituants membranaires, restent constants (Cavaletto & Gardner, 1999).

En outre, il peut être utile d'étudier simultanément d'autres classes de lipides. Ainsi l'étude du ratio lipides neutres / phospholipides peut renseigner sur les mobilisations des lipides neutres dans le pool de phospholipides, qui peuvent potentiellement avoir des conséquences sur la structure et la fonction des membranes (Capuzzo & Leavitt, 1988).

Enfin, les lipides neutres ne constituent pas systématiquement un outil sensible sur certains sites où les caractéristiques qualitatives et quantitatives des polluants n'entraînent pas de variations significatives de ce paramètre, là où d'autres réponses, relatives par exemple au compartiment lysosomal, sont plus tranchées (Domouhtsidou & Dimitriadis, 2001).

1.4.3 Quelles classes de biomarqueurs attribuer aux réponses du contenu digestif en lipides neutres insaturés ?

Il convient de distinguer deux types de réponses : d'une part, les accumulations de lipides neutres insaturés (traditionnellement désignées sous le terme « lipidoses chimiquement induites »), et d'autre part, les déplétions de lipides.

Dans le premier cas, Marigómez et Baybay-Villacorta (2003) précisent que ce type de réponse est très précoce et atopique, mais de type « tout ou rien » et qu'il est par conséquent impossible de construire de courbe dose-réponse. L'utilisation de l'accumulation des lipides neutres insaturés comme biomarqueur doit donc être réalisée en guise de premier dépistage (« screening »), et l'absence de ce type de réponse pourrait notamment suggérer l'absence d'exposition importante à certains contaminants organiques fortement lipophiles et épargner ainsi de coûteux dosages de polluants dans les tissus. Il s'agit alors de biomarqueurs spécifiques de l'exposition à certaines classes de polluants organiques.

A l'inverse, les déplétions en lipides neutres insaturés, attribuées à une mobilisation des réserves pour lutter contre le stress (Regoli, 1992 ; Ledy, 2002 ; Zorita *et al.*, 2006) sont moins fréquemment rapportées. Le positionnement de ce type de réponse parmi les différentes classes de biomarqueurs n'a pas été encore discuté à notre connaissance.

1.5 QUELS LIENS ENTRE LES REPONSES DE CES BIOMARQUEURS CELLULAIRES ET DES EFFETS A DES NIVEAUX SUPERIEURS D'ORGANISATION BIOLOGIQUE ?

Il est aisé de concevoir les conséquences délétères de ruptures de la membrane lysosomale (pouvant être, dans certains cas, imputables à une surcharge en lipofuscines), de déplétions sévères des réserves énergétiques ou encore d'inhibitions ou de saturations des fonctions antioxydantes peroxysomales. Elles ont été décrites en terme de santé individuelle, au moins chez les mammifères, et évoquées dans les paragraphes précédents du présent chapitre.

Néanmoins, les limites de non-compensation de ces atteintes (sub)cellulaires (voir Introduction, figure i.2) ne sont pas bien connues. Or, dans les études de biosurveillance environnementale, les biomarqueurs cellulaires ne sont pas toujours mesurés en parallèle avec d'autres réponses à des niveaux supérieurs de l'organisation biologique, ce qui est pourtant nécessaire pour tâcher d'appréhender ces limites. De surcroît, il semble difficile d'établir la relation étiologique entre les réponses observées à différentes échelles. Enfin, la question du délai entre les différents niveaux d'atteinte toxique semble également rarement abordée.

Toutefois, quelques études mettent en évidence un lien, sinon une concordance, entre les biomarqueurs cellulaires et des réponses biologiques à d'autres niveaux de l'organisation biologique.

Au niveau inférieur de la molécule, une corrélation négative entre la stabilité lysosomale et la fréquence des micronoyaux, biomarqueur de génotoxicité, a été montrée (Moore *et al.*, 2004).

De même, une concordance a pu être mise en évidence entre les biomarqueurs cellulaires et d'autres réponses au niveau plus global de l'intégrité tissulaire, de la physiologie générale, voire du comportement.

Ainsi, des bioessais de 21 jours pour évaluer la toxicité de sédiments chez le bivalve estuarien *Tapes semidecussatus* ont montré une accumulation de lipofuscines, accompagnant des réponses comportementales (enfouissement limité) (Byrne & Halloran, 1999).

Chez la moule marine, *M. edulis*, exposée durant trois semaines le long d'un gradient de pollution au cuivre, certains résultats suggèrent raisonnablement un lien étiologique entre les niveaux d'accumulation intracellulaire en métaux (attestés par autométallographie), certaines réponses lysosomales, et des effets tissulaires (Zorita *et al.*, 2006). Les réponses lysosomales en question incluent une diminution de la stabilité lysosomale et une charge accrue en lipofuscines aux deux sites moyennement contaminés. Au site le plus contaminé, se côtoient les réponses suivantes :

- diminution la plus marquée de la stabilité lysosomale,
- réduction de la taille des lysosomes,
- quantité de lipofuscines diminuée dans les cellules digestives,
- exocytose des lysosomes contenant les métaux et des lipofuscines dans la lumière des tubules,
- diminution de la quantité de lipides neutres insaturés,
- atrophie des cellules digestives et remplacement de ces dernières par des cellules basophiles,
- maturité sexuelle accélérée chez les femelles.

Toujours au niveau individuel, une étude rétrospective sur un ensemble de données de terrain et de laboratoire chez *M. edulis* a permis de montrer une corrélation positive entre les valeurs de la stabilité lysosomale et celles de l'estimation du potentiel de croissance (Scope for Growth) (Allen & Moore, 2004).

En raison des rôles clefs du système lysosomal dans le maintien de l'homéostasie cellulaire à bien des égards, les réponses lysosomales au stress environnemental sont considérées par Moore et collaborateurs (2004) comme de bons indices intégrateurs de la santé individuelle.

Les programmes de recherche intégratifs peuvent constituer une base intéressante pour aborder la concordance entre les réponses cellulaires au stress environnemental et des effets à des niveaux encore supérieurs d'organisation biologique (pouvant aller jusqu'à des données concernant la structure des communautés).

Dans le cadre du programme PNETOX conduit en 1998 et 1999 en Haute-Moselle, une relative convergence a été montrée entre les diagnostics établis à partir de la réponse de biomarqueurs, mesurés chez les poissons et les bivalves, et des indicateurs populationnels (Vasseur *et al.*, 2000). Les biomarqueurs en question incluaient les réponses des systèmes lysosomal et peroxysomal et des contenus en lipofuscines et lipides neutres insaturés des tissus digestifs d'*Unio pictorum* (Ledy, 2002).

En outre, Moore et Allen (2003) ont montré des corrélations positives entre la stabilité lysosomale chez le poisson plat *Limanda limanda* et deux indices écologiques, à savoir la diversité des communautés de nématodes et la biomasse de la macrofaune benthique. Ces données étaient tirées d'une étude poursuivie en mer du Nord dans le cadre du programme « Bremerhaven Workshop » en 1990 (Gee, 1992 ; Köhler *et al.*, 1992).

2 SECOND NIVEAU D'ORGANISATION BIOLOGIQUE : DU TISSU A L'ORGANE

Chez les mollusques, des altérations histopathologiques peuvent être associées à l'exposition à des contaminants environnementaux. Ce type de réponse est rarement systématique et se traduit le plus souvent par des fréquences plus importantes chez les populations ou groupes exposés que chez les témoins. Chez les mollusques soumis au stress environnemental *in situ* ou à des concentrations « environnementalement réalistes » de contaminants en conditions contrôlées, les atteintes histopathologiques aiguës et chroniques le plus souvent rencontrées (souvent de concert) sont les suivantes :

- des **gonflements et lyses d'organites** ou des **modifications de leur nombre** (Guolan & Yong, 1995) ;
- des **inflammations de type infiltrations hémocytaires** (« néoplasie hémocytaire » ; « leucémie » ou « granulocytome ») (Da Ros *et al.*, 1995 ; Strandberg *et al.*, 1998 ; Svardh, 1999 ; Czech *et al.*, 2001) ;
- des **atrophies épithéliales (**Da Ros *et al.*, 1995 ; Czech *et al.*, 2001 ; Nicholson & Lam, 2005 ; Buisson, 2006) ;

- la **dégénérescence des tubules** (débutant au niveau des cils) ou leur **dilatation**, qui seraient liées à un dysfonctionnement lysosomal (Lowe, 1988) ;
- des **atteintes mécaniques des filaments branchiaux** qui peuvent témoigner d'une exposition des bivalves aux métaux ou à des solides en suspension (Nicholson & Lam, 2005) ;
- des **nécroses tissulaires** accompagnées de lyses cellulaires de divers organes (Da Ros *et al.*, 1995 ; Teh *et al.*, 2000 ; Czech *et al.*, 2001). ;
- des **inclusions granulaires** dans les tissus de la glande digestive et des reins, résultant de la séquestration des métaux par les lysosomes (Nicholson & Lam, 2005).
- des **changements des proportions de certaines catégories cellulaires** (cellules basophiles des tubules digestifs (Bayne *et al.*, 1976)) ;
- des **infections virales** et les **infestations parasitaires**, susceptibles d'agir comme facteur de stress supplémentaire ou d'être favorisées par une fragilité des organismes exposés aux contaminants (Buisson, 2006).

Bien que non systématique, l'utilisation d'échelles semi-quantitatives peut s'avérer utile pour comparer des sites ou des niveaux de contamination de façon objective. Cela peut également permettre d'inclure les résultats à une batterie d'indices exploitée de façon intégrative. De telles échelles attribuent des niveaux d'atteinte numérotés de 1 à x, en fonction de la sévérité des lésions ou de la proportion de tissus affectée (Czech *et al.*, 2001 ; Buisson, 2006).

3 TROISIEME NIVEAU D'ORGANISATION BIOLOGIQUE : ETAT PHYSIOLOGIQUE

3.1 L'INDICE GONADIQUE

Dans le cadre de la validation d'une batterie de biomarqueurs, il est important de comprendre et interpréter le mieux possible leurs variations saisonnières, mais aussi d'appréhender l'influence du statut reproducteur sur la sensibilité des organismes au stress et éventuellement sur la pertinence de la batterie. Dans cette optique, il peut s'avérer très utile de suivre l'état de maturité de la gonade à l'aide d'un indice gonadique ou indice de maturité

(Bodin *et al.*, 2004), généralement évalué de façon semi-quantitative par l'observation de coupes histologiques de gonades.

En effet, le cycle gamétogénique semble affecter les capacités de défense des bivalves. Notamment, les hémocytes sont considérés, chez les bivalves, comme les principaux médiateurs des systèmes de défense, qui leur permettent de résister aux maladies, aux blessures et aux infections (Delaporte *et al.*, 2006). Or, il a été montré que la concentration en hémocytes circulants diminue durant la gamétogenèse chez l'huître creuse, *C. gigas*. De surcroît, leur activité phagocytaire et leur capacité d'adhésion sont inhibées pendant cette période, avec une possible responsabilité des enzymes de la reproduction dans ces phénomènes (Delaporte *et al.*, 2006).

En outre, l'effort de reproduction est considérablement coûteux en énergie chez les bivalves. Des modifications hormonales et énergétiques importantes ont lieu, durant le cycle reproducteur et avec les transferts des réserves du soma vers les gonades. Ces phénomènes, principalement gouvernés par les changements de température du milieu (de même que les variations saisonnières de la disponibilité en nourriture), sont susceptibles de modifier la physiologie entière d'un individu au fil des mois. Il est donc raisonnable de penser que les systèmes de détoxication et autres systèmes de défense peuvent être également affectés par l'effort de reproduction, et ainsi influencer la réponse d'un grand nombre de biomarqueurs (Sheehan & Power, 1999).

De surcroît, les effets des contaminants sur la reproduction elle-même peuvent être variés. Le phénomène d'imposex (masculinisation des femelles) chez les gastéropodes aquatiques exposés au tributylétain en est un exemple bien connu (Alzieu, 2000). Nous assistons effectivement à une multiplication des études concernant les composés perturbateurs endocriniens (Taylor & Harrison, 1999). Parmi les critères d'évaluation des effets délétères des contaminants environnementaux sur la fonction reproductrice figure notamment le suivi de la maturité sexuelle.

Grâce à la prise en compte d'un indice de maturité, Zorita et collaborateurs (2006) et Smaoui-Damak et collaborateurs (2006) ont en effet montré les désynchronisations de la reproduction entre mâles et femelles, chez deux espèces de bivalves en présence de métaux.

Ces études concernaient respectivement les moules, *M. edulis*, exposées *in situ* durant seulement 3 semaines à un gradient de cuivre, et les palourdes, *Ruditapes decussatus*, lors d'un suivi à long terme (1 an) de populations originaires de deux sites, différant par leur contamination au cadmium.

En outre, un indice gonadique moindre a été mesuré chez les coques, *Cerastoderma edule*, maintenues durant neuf mois en conditions contrôlées sur du sédiment provenant du port de Rotterdam (Timmermans *et al.*, 1996). Cette diminution de l'indice gonadique est attribuée par les auteurs à la pollution, soit directement, soit par le biais d'infestations parasitaires. En effet, la forte occurrence des parasites coïncide avec le moment où l'indice gonadique moyen se distingue de celui des témoins.

De façon analogue, un retard de maturation des gamètes chez les femelles (GI inférieur aux témoins) a été mis en évidence chez *M. galloprovincialis* après 3 semaines d'exposition à 0,5 ppm d'un pétrole brut (Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville, 2006).

3.2 INDICES DE CONDITION

Si les indices de condition ont été surtout développés dans un contexte de conchyliculture, pour évaluer l'efficacité de la croissance des coquillages destinés à la consommation humaine (Lucas & Beninger, 1985), leur utilisation dans les études de biosurveillance et dans les bioessais en écotoxicologie devient de plus en plus fréquente.

De nombreux indices de condition existent chez les bivalves (moins chez les autres mollusques). Ils consistent généralement à exprimer la masse de tissus mous de l'animal par rapport à la masse totale ou aux mensurations de la coquille.

Ils sont considérés comme des outils d'évaluation intégrés du statut nutritionnel et du stress dans le temps (Smolders *et al.*, 2002 ; Nicholson & Lam, 2005). Leur raison d'être en écotoxicologie se base en effet sur le principe selon lequel des conditions stressantes – et notamment l'exposition aux contaminants – sont responsables d'une déplétion des réserves énergétiques, au détriment de la croissance. En principe, des indices plus faibles sont relevés dans les groupes expérimentaux soumis aux conditions les plus sévères, soit, généralement, les plus contaminés.

Ce type de résultat a été obtenu à de nombreuses reprises, chez différentes espèces soumises à des scénarios de contamination variés (voir, par exemple, Timmermans *et al.*, 1996 ; Cheung *et al.*, 1998 ; Gagné *et al.*, 2002).

Néanmoins, deux biais importants résident dans l'utilisation des indices de condition comme outils de biosurveillance environnementale.

Le premier concerne les indices basés sur la masse fraîche des tissus. Certaines conditions stressantes (pollution, jeûne) peuvent générer un déséquilibre osmotique pour les animaux, qui peut se traduire par un œdème des tissus, une augmentation de la masse fraîche de l'individu et donc une élévation de la valeur de l'indice de condition ; ceci correspond à l'inverse du résultat attendu en cas d'augmentation des facteurs de stress. C'est un argument en faveur de l'utilisation des masses sèches pour le calcul des indices de condition (Nicholson & Lam, 2005). Cependant, la mesure de l'indice de condition basé justement sur

l'augmentation du contenu en eau (masse fraîche / masse sèche) constitue un marqueur assez sensible de stress, puisqu'il a été montré à plusieurs reprises qu'il reflétait correctement les gradients de contamination *in situ*, comme par exemple chez *D. polymorpha* (Smolders *et al.*, 2002).

La seconde limite se conçoit dans le cadre du travail *in situ*. Tous les facteurs environnementaux qui exercent un effet sur la croissance sont susceptibles de modifier l'indice de condition, notamment la température (maturation des gonades) et le niveau trophique du site. Ainsi, des indices de condition très élevés sont retrouvés chez les huîtres du bassin ostréicole de la Baie des Veys en Basse-Normandie car les nutriments sont abondants dans cette zone. En comparant deux sites au sein de cette baie qui présente une forte hétérogénéité d'un point de vue de la richesse trophique, ce sont les huîtres élevées dans la zone soumise à la plus forte influence des apports terrigènes qui montrent les indices de condition les plus élevés. Pourtant, ces apports terrigènes sont également responsables de concentrations plus importantes en pesticides dans l'eau de mer (Buisson, 2006). De même, les réponses de l'indice de condition et de la stabilité lysosomale chez *Perna viridis* peuvent concorder, le long d'un gradient de pollution à l'exception du site le plus contaminé. Le fort taux de matières organiques particulaires dans l'eau de ce site empêche l'indice de condition d'être minimum, contrairement à la stabilité lysosomale (Cheung *et al.*, 1998).

CHAPITRE II.

MATERIELS & METHODES

Chapitre II.
MATERIELS & METHODES

1 MATERIEL BIOLOGIQUE

1.1 LES ESPECES UTILISEES

Le choix des organismes a déjà été discuté dans une thèse précédente (Ledy, 2002), à l'exception de *Lymnaea stagnalis*, mais un gastéropode pulmoné proche (du genre *Radix*) avait été utilisé avec succès au cours de ces travaux.

Sans revenir en détail sur les critères de choix des organismes, le tableau II.1 présente les différentes espèces utilisées au cours de ces travaux, à travers :

- Une présentation de leurs grands traits biologiques, physiologiques et écologiques ;

- Une liste de quelques exemples d'études où elles se sont avérées pertinentes ou prometteuses :

- en tant qu'espèces bioaccumulatrices (étude de l'accumulation de contaminants environnementaux *in situ*),

- en tant qu'espèces sentinelles (étude de biomarqueurs *in situ*) et pour la réalisation de bioessais en laboratoire.

Tableau II.1. Présentation des quatre espèces sentinelles utilisées au cours de ces travaux

		Dreissena polymorpha (Pallas, 1771)	*Corbicula fluminea* (Müller, 1774)	*Lymnaea stagnalis* (Linné, 1758)	*Dikerogammarus villosus* (Sovinski-Martinov, 1894)	Réf.
Position systématique (classification phylogénétique)		Eucaryotes Métazoaires Protostomiens				[1] [2]
	Embranchement	Lophotrochozoaires Eutrochozoaires Mollusques Ganglioneures			Cuticulates Ecdysozoaires Euarthropodes Mandibulates	
	Classe……..	Diasomes Bivalves		Viscéroconques Gastéropodes	Pancrustacés Malacostracés	
	Sous-classe…..	Hétérodontes			Eumalacostracés	
	Ordre……...	Veneroidés		Pulmonés	Amphipodes	
	Sous-ordre……	…….……..		Basommatophores	Gammaridea	
	Super-famille.	Dreissenoidés	Corbiculoidés	Lymneoidés		
	Famille……..…	Dreissenidés	Corbiculidés	Lymneidés	Gammaridés	
Noms vernaculaires		Dreissène, moule zebrée	Corbicule, palourde asiatique	Lymnée (limnée) des étangs	(Gammare)	
Morphologie externe – individus adultes (Barre d'échelle : environ 1 cm)		 *Michel Ribette*	 *Karine Ledy*		 *Simon Devin*	
Taille maximale (mm)		20 – 40 (1) 40 – 80 (3)	20 – 40 (3) 40 – 80 (3)	20 – 40 (3) 40 – 80 (1)	22,2 (Moselle) 30	[2] à [4]
Cycle vital (durée)		> 1 an (3)	> 1 an (3)	≤ 1 an (3) > 1 an (2)	< 1 an	[2] [3]
Nombre de générations par an		1 (3)	1 (2) > 1 (1)	1 (3) < 1 (1)	3	[2] [3]
Stades aquatiques		Œuf ; Larve ; Adulte (3)	Œuf ; Larve ; Adulte (3)	Œuf (3) Adulte (2)	Œuf ; Adulte	[2] [3]
Reproduction		Ovoviviparité (3)	Ovoviviparité (3) Œufs isolés, libres (1)	Pontes cimentées ou fixées (3) Pontes libres (1)	Œufs isolés fixés au pléon	[2]
Dispersion		Aquatique passive (3) Aquatique active (1)	Aquatique passive (3) Aquatique active (1)	Aquatique passive (2) Aquatique active (2)	Aquatique active Aquatique passive	[2]
Forme de résistance		Aucune (3)	Aucune (3) Logette contre dessiccation (1)	Diapause ou quiescence (3)	Aucune	[2]
Type de nourriture		Microinvertébrés vivants ; Débris < 1 mm (3) Microphytes vivants (2)	Microphytes et microinvertébrés vivants ; Débris < 1 mm	Microphytes vivants ; Animaux morts > 1 mm (3) Débris végétaux ; Macroinvertébrés vivants (2) Débris < 1 mm (1)	Macroinvertébrés vivants (Ephémères, Odonates, Crustacés…) ; végétaux ; conspécifiques ; débris (dont pseudofaeces de dreissènes)	[2] à [4]
Mode d'alimentation		Filtreur (3)	Filtreur (3)	Racleur brouteur (3) Parasite (2) Broyeur (1)	Prédateur (dominant parmi les gammares) Racleur brouteur	[2] [3]
Respiration		Branchies (3) Tégument (1)	Branchies (3) Tégument (1)	Tégument (3)	Branchies	[2]
Température		Eurytherme (3)	Sténotherme thermophile (> 15 °C) (3)	Eurytherme (3) Sténotherme thermophile (> 15 °C) (2)	Eurytherme 1,5 – 26,5°C	[2] [4]

Tableau II.1. (suite)

	Dreissena polymorpha (Pallas, 1771)	*Corbicula fluminea* (Müller, 1774)	*Lymnaea stagnalis* (Linné, 1758)	*Dikerogammarus villosus* (Sovinski-Martinov, 1894)	Réf.
pH	> 6 (3) > 5,5 – 6 (2)	> 6 (3) > 5,5 – 6 (2)	> 6 (3) 5,5 – 6 (2) 5 – 5,5 (1)	/	[2]
Degré de trophie	Mésotrophe (2) Eutrophe (1)	Eutrophe (2) Mésotrophe (1)	Mésotrophe (3) Eutrophe (2) Oligotrophe (1)		[2]
Valeur saprobiale	β-mésosaprobe (3) α-mésosaprobe (1) Oligosaprobe (1)	Polysaprobe (2) α-mésosaprobe (1)	β-mésosaprobe (3) Oligosaprobe (1)	β-mésosaprobe (7) α-mésosaprobe (2) Oligosaprobe (1)	[2] [4]
Salinité	Eau douce (3) Eau saumâtre (2)	Eau douce (3) Eau saumâtre (3)	Eau douce (3) Eau saumâtre (3)	0 – 8 ‰	[2] [4]
Zones biogéographiques (Limnofauna europea)	Pyrénées (3) Alpes et Jura (3) Massif central et Vosges (3) Basses terres (océaniques) (3) Basses terres (méditerranéen) (3)	Alpes et Jura (1) Massif central et Vosges (3) Basses terres (océaniques) (3) Basses terres (méditerranéen) (3)	Pyrénées (3) Alpes et Jura (3) Massif central et Vosges (3) Basses terres (océaniques) (3) Basses terres (méditerranéen) (3)	Danube – Lac Balaton – Affluents mers Noire et Caspienne Europe de l'Ouest	[2] [4]
Altitude	Plaine et collinéen (< 1000 m) (3)	Plaine et collinéen (< 1000 m) (3)	Plaine et collinéen (< 1000 m) (3) Montagnard (1000 – 2000 m) (2) Alpin (> 2000 m) (1)	0 – 500 m	[2] [4]
Distribution longitudinale	Epipotamon (4) Métapotamon (5) Estuaire (2) Hyporhitron (1) Hors hydrosystème fluvial (1)	Epipotamon (4) Métapotamon (4) Estuaire (3)	Hors hydrosystème fluvial (5) Hyporhitron (3) Epipotamon (3) Métarhitron (2) Epirithron (2) Métapotamon (1) Crénon (1)	Epipotamon Métapotamon Estuaire	[2] [4]
Distribution transversale par rapport au chenal	Chenal de rivières (3) Rives, cheneaux secondaires (2) Etangs, mares, méandres abandonnés (2) Lacs (2)	Rives, cheneaux secondaires (3) Chenal de rivières (1) Lacs (1)	Etangs, mares, méandres abandonnés (5) Rives, cheneaux secondaires (2) Lacs (2) Marais, tourbières(1) Eaux temporaires (1)	Rives Chenal des rivières Lacs	[2] [4]
Microhabitats	Dalles, blocs, pierres, galets (5) Branches, racines (2)	Sable (5) Vase (3) Graviers ; Limon (2) Dalles, blocs, pierres, galets (1)	Macrophytes, algues filamenteuses (5) Vase (3) Graviers ; Litière (2) Sable ; Limon ; Microphytes ; Dalles, blocs, pierres, galets (1)	Végétaux Cailloux, blocs Racines Gravier Colonies de dreissènes	[2] [4]
Mode de locomotion et relation au substrat	Fixation permanente (3) Rampant ; Nageur en pleine eau (plancton, necton) (1)	Fouisseur épibenthique (4) Rampant ; Nageur en pleine eau (plancton, necton) (1)	Rampant (3) Nageur en surface (1)	Rampant Nageur en pleine eau Nageur en surface	[2]
Courant (préférundums)	Nul (3) Lent (<25 cm.s^{-1}) (3)	Nul (3) Lent (<25 cm.s^{-1}) (3)	Nul (3) Lent (<25 cm.s^{-1}) (3) Moyen (25-50cm^{-1})(1)	Faible	[2] [4]
Caractère invasif ?	Oui, en Amérique du Nord (originaire du bassin Ponto-Caspien). 1ère observation en France : 1847	Oui (originaire d'Asie du sud-est). 1ère observation en France : 1980	Non	Oui (originaire du bassin Ponto-Caspien). 1ère observation en France : 1997	[5]

Tableau II.1. (suite)

	Dreissena polymorpha (Pallas, 1771)	*Corbicula fluminea* (Müller, 1774)	*Lymnaea stagnalis* (Linné, 1758)	*Dikerogammarus villosus* (Sovinski-Martinov, 1894)	Réf.
Voies d'exposition probables ou avérées aux contaminants	Colonne d'eau, MES, nourriture, COD, (particules fines du sédiment mises en suspension)	Colonne d'eau, sédiment, eaux interstitielles, MES, nourriture, COD	Colonne d'eau, MES, nourriture, COD, sédiment	Nourriture (pouvant inclure sédiment et pseudofaeces des dreissènes), colonne d'eau, (et éventuellement eaux interstitielles), MES, COD	[4] [6]à [11]
Utilisation comme espèce bioaccumulatrice – Exemples de contaminants dosés	Organochlorés, métaux, radionucléides	Métaux	Métaux, alkylphénols, microcystine (toxine algale)	Métaux	[7] [11] à [18]
Utilisation comme espèce sentinelle *in situ* et/ou pour les bioessais d'écotoxicologie en laboratoire – Exemples de biomarqueurs étudiés	LYS hémocytes, fragilité LYS, MXR, Hsp, COMET, MT, Vg, TBARS, EROD, dommages ADN, morphométrie LYS digestifs, LPF, LNI, PER, NFR, taux de filtration, mouvement des valves, expression CoxI…	MT, ChE, LPO, CAT, NADH-Red, ChE, dommages ADN, morphométrie LYS digestifs, LPF, LNI, NFR, PER, enzyme cellulolytique, métabolites de la testostérone, GST, glutathion, MDA, MXR, expression CoxI…	Hémocytes : fragilité LYS, densité, activité phagocytaire, production d'ERO, burst oxydatif, apoptose ; Marqueurs de perturbation endocrine (stéroïdes, glycogène)	LYS digestifs, LPF, LNI, PER Chez espèces proches (*Gammarus pulex* et *G. fossarum*) : DT-diaphorase, GPx, Hsp, indice de maturité, $[Na^+]$ et $[K^+]$ hémolymphatiques	[19] à [50]
Elevage aisé pour des bioessais ?	Non	Non	Oui	Maintenance aisée	[51]

NB : les chiffres entre parenthèses indiquent le degré d'affinité du taxon pour chaque modalité d'un trait biologique ou écologique particulier (de (1) : faible affinité, à (3) ou (5): forte affinité) (Tachet et al., 2000).
CAT : catalase ; ChE : cholinéstérases ; CoxI : 1ère isoenzyme de la cyclooxygénase ; ERO : espèces réactives de l'oxygène ; EROD : activité 7-éthoxyrésorufine O-dééthylase ; GPx : glutathion peroxydase ; GST : glutathion-S-transférase ; Hsp : protéines de choc thermique ; LNI : lipides neutres insaturés ; LPF : lipofuscines ; LPO : lipoperoxydation ; LYS : lysosomes ; MDA : malondialdéhyde ; MT : métallothionéines ; MXR : mécanisme de résistance multixénobiotique ; NADH-Red : NADH-réductase ; NFR : NADPH-ferrohémoprotéine réductase ; PER : morphométrie du système peroxysomal digestif ; TBARS : substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique ; Vg : vitellogénine. – [1] Lecointre & Le Guyader, 2001 ; [2] Tachet et al., 2000 ; [3] Beisel, 2006 ; [4] Simon Devin, communication personnelle ; [5] Beisel & Devin, 2006 ; [6] Livingstone et al., 2000 ; [7] Roditi et al., 2000 ; [8] Gossiaux et al., 1998 ; [9] Kaag et al., 1998 ; [10] Bruner et al., 1995 ; [11] Mardsen & Rainbow, 2004 ; [12] Binelli et al., 2001 ; [13] Leglize & Crochard, 1987 ; [14] Maarouf & Pihan, 1987 ; [15] Mersch et al., 1992 ; [16] Robertson & Lauenstein, 1998 ; [17] Roe & MacIsaac, 1998 ; [18] Vinot, 2004 ; [19]Aarab et al., 2005 ; [20] Achard et al., 2004 ; [21] Achard-Joris et al., 2006 ; [22] Barfield et al., 2001 ; [23] Basack et al., 1998 ; [24] Baudrimont et al., 1999 ; [25] Borcherding, 1992 ; [26] Britvic & Kurelec, 1999 ; [27] Bultelle et al., 2002 ; [28] Burgeot, 1999 ; [29] Clayton et al., 2000 ; [30] Felten & Guérold, 2004 ; [31] [Gagné et al., 2002] ; [32] Giamberini & Cajaraville, 2005 ; [33] Giamberini & Pihan, 1997 ; [34]Jumel et al., 2002 ; [35] Kraak et al., 1992 ; [36] Kutlu et Susuz, 2004 ; [37] Ledy, 2002 ; [38]Minier et al., 2006 ; [39] Mora et al., 1999 ; [40] Mouabad & Pihan, 1992 ; [41] Parant & Pain, 2001 ; [42] Pavlica et al., 2001 ; [43]Russo & Lagadic, 2004 ; [44] Russo et al., 2007 ; [45] Russo & Madec, 2007 ; [46] Schirling et al., 2005 ; [47] Smital et al., 2000 ; [48] Triebskorn et al., 2002 ; [49]Vidal et al., 2001 ; [50]Waldmann et al., 1995 ; [51] Vincent Médoc, communication personnelle

1.2 ORGANE ETUDIE

Les différents biomarqueurs cellulaires présentés dans le chapitre I sont étudiés au niveau de la glande digestive. Cette dernière est également appelée diverticule digestif, hépatopancréas ou cæca hépatopancréatiques (amphipodes). Chez les mollusques, les gastéropodes et les crustacés, la glande digestive présente des analogies avec certains organes des vertébrés, tels que le pancréas, l'intestin et surtout le foie. Les similitudes fonctionnelles entre la glande digestive et le foie des vertébrés sont les suivantes :

- rôle dans le processus de digestion (synthèse et la sécrétion de la bile pour le foie, sécrétion et digestion intracellulaire pour la glande digestive) ;
- stockage des nutriments de réserves (glycogène, lipides, etc.) et régulation de leur transfert vers les autres tissus, notamment gonadiques (Bayne *et al.*, 1976 ; Gabbott, 1976) ;
- accumulation, métabolisme et biotransformation des xénobiotiques (Viarengo & Canesi, 1991 ; Nassiri *et al.*, 2000).

C'est pour cette dernière raison que la glande digestive constitue l'un des modèles d'organes de choix pour les études de biosurveillance environnementale.

2 HISTOCHIMIE, ANALYSE D'IMAGES ET STEREOLOGIE

2.1 PRINCIPES ET UTILITE DES METHODES

2.1.1 L'histochimie

L'histochimie désigne la coloration spécifique de certains compartiments ou contenus tissulaires (et la cytochimie est l'équivalent au niveau de cellules isolées). La coloration peut être :

- Directe, grâce à un colorant montrant une forte affinité pour le compartiment ou contenu cellulaire en question ;

- Issue de l'exploitation du couplage entre un antigène présent au niveau de la structure étudiée et un anticorps (le plus spécifique possible) (immunohistochimie et immunocytochimie) ;
- Issue de l'exploitation d'une activité enzymatique. C'est notamment ce dernier type de coloration qui est utilisé pour mettre en évidence de façon spécifique certains organites cellulaires. En effet, la mise en évidence de l'activité d'une enzyme confinée à l'organite en question permet de matérialiser l'organite contenant l'enzyme.

Dans ces travaux, nous avons utilisé la première (lipofuscines et lipides neutres insaturés) et la troisième approche (compartiments lysosomal et peroxysomal).

2.1.2 La stéréologie

Le terme stéréologie fut créé le 11 mai 1961 par un groupe de scientifiques à Feldberg (en Forêt Noire) sur l'initiative de l'anatomiste américain, Hans Elias. A cette occasion fut fondée l'International Society for Stereology. La **stéréologie** se définit comme un « ensemble de méthodes, pour la plupart mathématiques et statistiques, qui permettent d'aboutir à des paramètres en trois dimensions d'une structure, à partir d'informations partielles provenant de sections ou de projections dans un plan, c'est-à-dire dans un espace à deux dimensions » (Cau, 1990).

Les champs d'application de la stéréologie sont vastes et concernent à la fois la géologie, la métallurgie, les sciences des matériaux et bien-sûr la biologie. En histologie quantitative par exemple, cette discipline s'avère particulièrement utile car la simple quantification de surfaces de section ou d'un nombre de particules, à partir de l'observation d'une coupe, ne permet pas d'estimer directement la quantité réelle de ces particules ou leur volume relatif au sein d'un autre volume (tissu, organe). La stéréologie permet d'éviter certains pièges. Par exemple, dans le cas d'un ensemble unimodal de sphères en coupe (même taille de particules), le diamètre se rapprochant le plus du diamètre équatorial est le diamètre maximum des profils de section des particules, et non pas le diamètre moyen (Cau, 1990 ; Sahagian & Proussevitch, 1998).

Une notion importante à considérer dans la stéréologie est celle d'**espace de référence**. Il s'agit de « l'espace contenant les particules et dont la mesure représente le dénominateur

[contenu / contenant]» (Weibel, 1981). La plupart du temps, il s'agit d'un volume. Dans les présents travaux, l'espace de référence est le volume (ou la surface de section) du cytoplasme des tubules digestifs.

Il existe des règles de nomenclature des paramètres stéréologiques, règles qui ont été suivies dans l'expression des résultats de ces travaux :

- une lettre majuscule désigne le paramètre évalué au niveau des particules, par exemple :

- S : leur surface d'enveloppe ;
- A : leur surface de section ;
- V : leur volume ;
- N : leur nombre ;
- B : leur périmètre ;
- P : le nombre de points ;

Ces paramètres, exprimés par rapport à l'espace de référence, correspondent à des proportions.

- Une lettre majuscule en indice désigne l'espace de référence, par exemple :

- $_A$: indice un paramètre exprimé par rapport à une surface de section de référence ;
- $_V$: indice un paramètre exprimé par rapport à un volume de référence.

Généralement, ces deux lettres (majuscule et indice) sont suivies d'une parenthèse dans laquelle sont désignés respectivement le compartiment étudié et l'espace de référence.

Par exemple, la proportion volumique du compartiment lysosomal au sein du cytoplasme d'une cellule (c'est-à-dire le volume total des particules lysosomales rapporté à celui du cytoplasme des cellules étudiés) est désigné par V_V (lyso, cyto). Pour simplifier les choses, comme notre espace de référence reste le cytoplasme, nous avons choisi d'utiliser les termes abrégés proposés par Lowe et collaborateurs (1981), tels que Vv_L (où L désigne les lysosomes) (voir section 2.3. de ce chapitre).

L'un des paramètres les plus importants à mesurer pour calculer la plupart des autres paramètres stéréologiques est A_A (la surface de section des particules rapportée à la surface de section de l'objet de référence). D'un point de vue méthodologique, plusieurs approches existent : planimétrie, projection sur feuilles d'étain, découpage et pesée, mesure de la

longueur de lignes incluses et comptage de point. C'est cette dernière méthode qui présente le meilleur rapport qualité/coût (ou coefficient de variation/temps nécessaire). Le comptage de points, proposé par Weibel, consiste (très brièvement) en l'application d'une grille transparente sur le plan de coupe à analyser, et en un comptage des intersections de la trame de lignes avec les surfaces étudiées. Les méthodes d'analyse d'image semi-automatisée (où la quantification des pixels remplace la grille) ont permis d'accroître encore l'efficacité de cette méthode en réduisant de façon considérable le temps consacré à l'analyse (Cau, 1990).

2.2 PROTOCOLES DE REVELATION HISTOCHIMIQUE

2.2.1 Congélation du tissu digestif et coupe à froid

→ Coupe à froid : E. Guerlet, A. Meyer, K. Ledy

Les glandes digestives ou les cæca hépatopancréatiques des organismes, fraîchement prélevés, sont cryoprotégés dans une solution tamponnée de sucrose à 7 % (tampon phosphate pH 7,4 ; 0,05 mol.L^{-1}), inclus dans un milieu aqueux (Cryomatrix, Shandon), puis congelés dans les vapeurs d'azote liquide. Les échantillons sont ensuite stockés à -60°C/ -80°C jusqu'à la coupe. Les tissus sont coupés à l'aide d'un cryostat dont la chambre est maintenue à -28°C/-30°C. Les sections de 8 µm d'épaisseur sont recueillies sur des lames de verre et conservées à -60°C/-80°C jusqu'aux révélations histochimiques.

Les paragraphes suivants décrivent brièvement le principe, le protocole et le résultat obtenu pour chacune des révélations histochimiques. Les protocoles plus détaillés et la composition des différents tampons et réactifs utilisés sont indiqués dans l'annexe 2.

2.2.2 Mise en évidence de la structure du système lysosomal

→ L. Giambérini (étude saisonnière) et E. Guerlet (ECODYN, CEREMEL)

Le système lysosomal est mis en évidence selon la méthode de Cajaraville et collaborateurs (1991b), adaptée pour les espèces dulçaquicoles.

2.2.2.1 Principe

La β-glucuronidase lysosomale est activée par un substrat artificiel, le 1-naphtol-AS-BI-β-D-glucuronide, qui, couplé à un sel de diazonium, produit un colorant azoïque insoluble dans l'eau.

2.2.2.2 Mode opératoire

Les coupes sont placées 3 h à 4°C, puis 5 min à température ambiante. L'incubation est alors réalisée à pH 4.5 sous agitation durant 30 min à 37°C, dans un milieu contenant le substrat et du polyvinyle alcool, stabilisateur préservant la morphologie du tissu et l'activité enzymatique *in situ*. Les opérations suivantes sont réalisées à température ambiante : les coupes sont rincées dans une solution de NaCl à 0.25 %, incubées dans un milieu contenant le sel de diazonium (10 min sous agitation), puis fixées au formol de Baker calcique (10 min). Un rinçage à l'eau distillée précède le montage en milieu aqueux (gélatine de Kaiser).

2.2.2.3 Résultat

Une coloration rouge-orangée révèle la présence des sites d'activité enzymatique et matérialise les lysosomes.

2.2.3 Révélation des lipofuscines

Méthode de Schmorl (Pearse, 1972).

2.2.3.1 Principe

Le ferricyanure ferrique colore les dérivés d'oxydation des lipides du type des lipofuscines.

2.2.3.2 Mode opératoire

Les coupes sont placées durant 3 h à 4°C, puis subissent une fixation de 15 min au formol de Backer calcique à 4°C. Après rinçage à l'eau distillée, elles sont immergées 10 min dans le milieu de réaction préparé extemporanément, contenant du chlorure ferrique à 1 % et du ferricyanure de potassium à 1 %. Un rinçage à l'acide acétique à 1 %, puis à l'eau distillée, précède le montage en milieu aqueux.

2.2.3.3 Résultat

Les lipofuscines sont révélées par la formation de bleu de Prusse (ferrocyanure ferrique).

2.2.4 Révélation des lipides neutres insaturés

La révélation des gouttelettes de lipides neutres insaturés est réalisée selon Moore (1988b).

2.2.4.1 Principe

Les lipides neutres insaturés sont colorés par l'oil red O.

2.2.4.2 Mode opératoire

Les coupes sont placées durant 3 h à 4°C, puis fixées 15 min au formol de Backer calcique à 4°C, et rincées à l'eau distillée. Elles sont alors plongées dans un solvant, le triéthylphosphate à 60 %, puis colorées 15 min à 20°C dans une solution préalablement filtrée d'oil red O dans le solvant, et enfin différenciées dans le triéthylphosphate à 60 % et rincées à l'eau.

2.2.4.3 Résultat

Les lipides apparaissent colorés en rouge.

2.2.5 Mise en évidence du système peroxysomal

Le système peroxysomal est mis en évidence selon la méthode de Cancio et collaborateurs (1998), adaptée pour les espèces dulçaquicoles par Ledy (2002).

2.2.5.1 Principe

La catalase peroxysomale utilise le peroxyde d'hydrogène pour oxyder un substrat artificiel, la diaminobenzidine, donneur d'électrons et d'hydrogène (voir réaction (2) dans le Chapitre I). Il résulte de cette réaction de peroxydation un polymère brun insoluble dans l'eau.

2.2.5.2 Mode opératoire

Les coupes sont placées 3 h à 4°C, puis fixées durant 5 h à 4°C dans du formaldéhyde en solution dans du tampon phosphate à pH 7,4. Après un rinçage dans le même tampon, sans

formaldéhyde, l'incubation est alors réalisée dans l'obscurité sous agitation durant 40 min à 42°C dans un milieu contenant le peroxyde d'hydrogène et le substrat. Les coupes sont rincées dans du tampon Theorell-Stenhagen à pH 10,4, puis à l'eau distillée. Le montage est réalisé en milieu aqueux avec la gélatine de Kaiser.

2.2.5.3 Résultat

Une coloration brunâtre révèle la présence des sites d'activité enzymatique et matérialise les peroxysomes.

2.3 ANALYSE D'IMAGE ET STEREOLOGIE

→ ***E. Guerlet***

→ ***L.Giambérini (Sv_L étude saisonnière)***

→ ***K. Ledy (Sv_P : 10 mois, Sv_{LN} et Sv_{LF} : 5 mois, étude saisonnière)***

Les images sont capturées à l'aide d'une caméra tri CCD couleur Sony connectée à un microscope Olympus avec un objectif de 100. Les images sont segmentées manuellement sur un système d'analyse d'images (Système Analysis, Pro Olympus). Cinq champs sont analysés au hasard (selon un trajet en « zigzag ») sur une section par individu pour cinq à huit individus par groupe expérimental. En cas de présence dans le champ de surfaces n'appartenant pas aux cellules digestives (tissus conjonctif ou gonadique), ces dernières sont retirées de l'analyse.

Un à quatre paramètres stéréologiques sont calculés en fonction du biomarqueur (Lowe *et al.*, 1981), selon les formules détaillées ici pour le système lysosomal (dans lesquelles L désigne les particules « lysosomes secondaires positifs à la révélation histochimique de la β-glucuronidase » et C désigne l'espace de référence « cytoplasme des cellules digestives »).

- La **proportion volumique, Vv** (**« volume density »** en anglais) correspond à la relation entre le volume occupé par l'ensemble des particules révélées et le volume de cytoplasme des cellules digestives.

$$Vv_L = V_L / V_C = K\, A_A \qquad (2)$$

$$(\mu m^3.\mu m^{-3})$$

Avec :

$$A_A = X / m \qquad (3)$$

X : nombre de points tombant sur les particules

m : nombre de points tombant sur le cytoplasme digestif

Selon la nomenclature choisie par Lowe et collaborateurs (1981) et en utilisant une trame appliquée sur l'écran.

Soit, en utilisant l'analyse d'images :

$$A_A = \%_L / \%_C \qquad (4)$$

$\%_L$: pourcentage du cadre occupé par les particules*

$\%_C$: pourcentage du cadre occupé par le cytoplasme (càd par le tissu digestif)*

*il s'agit ici de notations personnelles, et non plus de notations suivant les conventions de la stéréologie.

$$K = (2 / (3t)) (\Sigma Y_i^3 / \Sigma Y_i^2) \qquad (5)$$

t : épaisseur des coupes de tissu (soit 8 µm)

Y_i : diamètres mesurés des particules (i = 1 à n)

(n = 30 diamètres mesurés au hasard par individu chez Lowe et collaborateurs (1981)).

Ici, les diamètres n'ont pas été mesurés individuellement au hasard à l'aide d'une grille appliquée sur l'écran, mais nous avons utilisé les diamètres moyens calculés par le logiciel d'analyse d'image sur chacune des cinq images correspondant à un individu (d'où n = 5).

- La **proportion de surface, Sv** (**« surface density »** en anglais) est la relation entre la surface d'enveloppe des particules détectées et le volume de cytoplasme des cellules digestives.

$$Sv_L = S_L / V_C = (4 / t) A_A \qquad (6)$$

$(\mu m^2.\mu m^{-3}$ ou $\mu m^{-1})$

- Le **ratio surface-sur-volume, S/V,** représente la relation entre la superficie et le volume occupé par les particules. Ce paramètre est inversement proportionnel à la taille de ces dernières (sous l'hypothèse qu'elles sont sphériques). Il est le seul paramètre stéréologique présenté ici qui ne dépend pas de l'espace de référence « volume du cytoplasme » et qui ne concerne que les particules elles-mêmes.

$$S_L / V_L = 4 / (t K) \qquad (7)$$

$(\mu m^2.\mu m^{-3}$ ou $\mu m^{-1})$

- La **proportion numérique, Nv** (**« numerical density »** en anglais), représente le nombre de particules au sein d'une unité de volume de cytoplasme des cellules digestives.

$$Nv_L = N_L / V_C = (4 A_A n) / (t \pi \Sigma Y_i^2) \quad (8)$$
$$(\mu m^{-3})$$

De la même manière, les paramètres stéréologiques relatifs au compartiment peroxysomal sont calculés selon les formules suivantes (dans lesquelles P désigne les particules « peroxysomes positifs à la révélation histochimique de la catalase » et C désigne l'espace de référence « cytoplasme des cellules digestives »).

$$Vv_P = V_P / V_C \quad (9)$$
$$Sv_P = S_P / V_C \quad (10)$$
$$S_P / V_P \quad (11)$$
$$Nv_P = N_P / V_C \quad (12)$$

Les granules de lipofuscines et les gouttelettes de lipides neutres insaturés, lorsqu'ils sont présents en quantité importante, peuvent former des amas difficiles à séparer par l'analyse d'image. Pour cette raison, les diamètres ne peuvent être pris en compte de façon rigoureuse pour le calcul des paramètres stéréologiques, et seule la proportion de surface est alors calculée, selon les formules suivantes (où $_{NL}$ désigne les particules « gouttelettes de lipides neutres insaturés colorées par l'oil red O », $_{LF}$ désigne les particules « amas de lipofuscines colorés par le ferricyanure ferrique » et $_C$ désigne l'espace de référence « cytoplasme des cellules digestives »).

$$Sv_{LF} = S_{LF} / V_C \quad (13)$$
$$Sv_{LN} = S_{LN} / V_C \quad (14)$$

3 HISTOPATHOLOGIE

→ ***Confection des coupes et coloration : Antoinette Meyer.***

→ ***Analyse des coupes : Laure Giambérini.***

Les organes sont fixés au fixateur de Bouin durant 48 h, lavés à l'eau durant une journée, puis déshydratées dans une série de bains d'alcool et de toluène. Après un bain de paraffine de 12 h, les tissus sont inclus dans des blocs de paraffine.

Les coupes de 5 µm sont confectionnées au microtome, collées sur lames de verre à l'eau albumineuse, puis colorées au bleu de toluidine après déparaffinage et hydratation. La coloration est suivie d'une nouvelle série de bains de déshydratation, puis d'un montage à l'aide d'une résine synthétique (Eukitt), et enfin d'un séchage durant quelques jours.

Les coupes sont ensuite examinées à la recherche d'éventuelles atteintes histopathologiques.

4 INDICES PHYSIOLOGIQUES

4.1 L'INDICE GONADIQUE

→ Confection des coupes et coloration : Antoinette Meyer.

→ Analyse des coupes : Laure Giambérini.

L'état de maturité des gonades des dreissènes est évalué (uniquement pour l'étude saisonnière à long terme, présentée dans la partie 1.A. du chapitre III) à partir d'observations de coupes de gonades (confectionnées selon le protocole décrit dans la section 3 du présent chapitre), qui permettent le calcul d'un indice gonadique moyen pour chaque mois de prélèvement (Tourari, 1988).

La présente étude ne concerne que des individus de taille comprise entre 18 et 22 mm, ayant donc déjà réalisé une première gamétogenèse.

La maturation des produits génitaux se déroule en plusieurs étapes définies par six stades successifs dont trois présentent des caractéristiques communes aux deux sexes, les trois autres étant plus spécifiques.

- stades communs aux deux sexes
    - stade 0 : repos sexuel apparent
    - stade Ia : début de la gamétogénèse
    - stade E : émission des gamètes
- stades propres aux mâles
    - stade Ib : premiers stades de la spermatogenèse
    - stade II : spermiogenèse

- stade III : état de maturité sexuelle

- stades propres aux femelles
  - stade Ia (Prs) : stade de présynthèse : début d'accroissement des ovocytes
  - stade Ia (S) : stade de synthèse : synthèse des réserves, accroissement de la taille des ovocytes
  - stade Ia (Post S) : stade de post-synthèse : état de maturité sexuelle

A partir des données de l'observation des coupes histologiques, on détermine un indice gonadique moyen, qui est caractéristique de l'état de maturation génitale de la population étudiée. A chaque stade, précédemment défini, un score arbitraire de 0 à 5 est attribué.

- stade 0 0
- stade Ia 1
- stade Ib, Ia (Prs) 2
- stade II, Ia (S) 3
- stade III, Ia (Post S) 4
- stade E 5

L'indice gonadique est égal à :

$$IG = (\Sigma n_i s_i) / N \qquad (15)$$

(pas d'unité)

où

n_i : nombre d'individus de chaque stade

s_i : valeur du stade

N : nombre d'individus de l'échantillon

L'indice gonadique est égal à 0 quand tous les individus de l'échantillon de la station étudiée sont en repos sexuel. Il atteint la valeur de 5 quand l'ensemble des individus échantillonnés émet ses gamètes.

4.2 L'INDICE DE CONDITION

L'obtention de l'indice de condition a fait l'objet de mises au point spécifiques.

4.2.1 *Indices de condition chez* Dreissena polymorpha

Plusieurs indices de condition, calculés sur la base de la masse sèche et/ou de la masse fraîche des tissus mous et de la coquille de l'animal, ont été tout d'abord testés lors d'une étude de laboratoire non présentée dans ce document. Le protocole utilisé lors de la mise au point est le suivant.

Les valves sont nettoyées de tout dépôt de sédiment et de tout épibionte à l'aide d'un scalpel et de papier absorbant humidifié. Les longueur (L), hauteur (H) et épaisseur (E) maximales de la coquille de la dreissène sont mesurées à l'aide d'un pied à coulisse, à la précision 0,01 mm (Figure II.1).

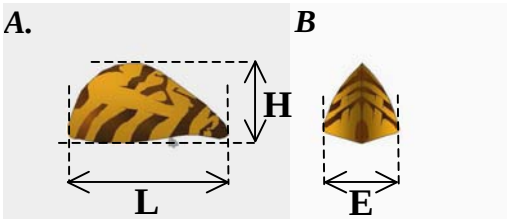


Figure II.1. Représentation schématique de la mesure des longueur (L), hauteur (H) et épaisseur (E) de coquille de la dreissène pour le calcul des indices de condition. ***A****. Vue de la valve droite.* ***B****. Vue de la face antérieure.*

Douze animaux par modalité d'exposition sont ouverts (par section des muscles adducteurs à l'aide d'un scalpel introduit entre les deux valves au niveau de la face ventrale), les tissus mous sont soigneusement détachés des valves et l'excès d'eau est évacué sur du papier absorbant selon des gestes et un temps constants (6 retournements sur une portion sèche de papier, durant 12 secondes au total). Les tissus mous ainsi égouttés sont alors immédiatement pesés (précision au 10ème de mg), de même que les valves convenablement essuyées. A ce stade, il est possible de prélever les glandes digestives destinées à l'histochimie, tandis que la totalité des tissus mous des six individus restants sont placés dans une petite feuille de papier aluminium marquée individuellement, pré-pesée et fermée de façon non étanche, afin de permettre l'évaporation des fluides corporels. Ces échantillons, ainsi que les valves, individualisées dans des bacs à glaçons alimentaires, sont placés dans une étuve à 40°C durant une semaine, puis pesés (la masse de la feuille de l'aluminium est

retranchée du total, cette pré-pesée étant nécessaire car certains des échantillons séchés peuvent rester fermement collés à l'aluminium).

Les données ainsi obtenues nous ont permis de tester différents indices de condition basés sur 12 masses fraîches ou 6 masses sèches.

- Indices basés sur la masse fraîche uniquement (n=8 à 12) :

$$IC_1 = IC_{volumique} = PF_{tissus} / (L \times H \times E) \quad (16)$$

$(g.mm^{-3})$

Adapté de Choi & Chang (2003)

$$IC_2 = IC_{massique} = PF_{tissus} / (PF_{tissus} + PF_{valves}) \quad (17)$$

$(g.mm^{-3})$

Modifié d'après Amiard-Triquet et collaborateurs (1998) et AFNOR, NFV45056

- Indices basés sur la masse sèche des tissus (et éventuellement sur la masse fraîche) (n=6) :

$$IC_3 = PS_{tissus} / PS_{valves} \quad (18)$$

$(g.g^{-1})$

Adapté de Mersch et al. (1996) ; Soto et al. (2000) ; Smolders et al,(2002) (« TCI : indice de condition tissulaire »)

$$IC_4 = PF_{tissus} / PS_{tissus} \quad (19)$$

$(g.g^{-1})$

Adapté de Soto et al,(2000), Smolders et al. (2002) (« contenu en eau »)

$$IC_5 = PS_{tissus} / L \quad (20)$$

$(g.mm^{-1})$

Adapté de Soto et al. (2000)

$$IC_6 = PS_{tissus} / H \quad (21)$$

$(g.mm^{-1})$

Adapté de Soto et al. (2000)

$$IC_7 = PS_{tissus} / E \quad (22)$$

$(g.mm^{-1})$

Adapté de Soto et al. (2000)

$$IC_8 = PS_{tissus} / (PS_{tissus} + PS_{valves}) \quad (23)$$

$(g.g^{-1})$

Adapté de Lee (1996) ; Choi & Chang (2003)

$$IC_9 = PF_{tissus} / (L \times E / H) \quad (24)$$

$(g.mm^{-1})$

Adapté de Lundebye et al. (1997)

Avec, pour l'ensemble des indices :

IC : indice de condition

PF : poids frais

PS : poids sec

L : longueur de la coquille

H : hauteur de la coquille

E : épaisseur de la coquille

Après une comparaison des résultats, nous avons jugé les indices basés sur la masse fraîche IC_1 et IC_2 potentiellement pertinents et suffisants, et avons abandonné ceux qui tenaient compte de la masse sèche afin de ne pas engager l'utilisation d'animaux supplémentaires lors des différentes expérimentations en laboratoire et *in situ*. En effet, les masses fraîches peuvent être obtenues juste avant le prélèvement de la portion de glande digestive destinée à l'histochimie (voire, d'autres organes, destinés à d'autres analyses), alors que l'obtention des masses sèches nécessite que la totalité des tissus mous soit séchée.

Ce même souci de pragmatisme nous a fait préférer par la suite **l'indice de condition volumique (IC_1)** à l'indice de condition massique (IC_2), puisque ce dernier nécessitait un nettoyage rigoureux des valves avant leur pesée, ce qui représente un travail plus long que la mesure des trois mensurations (L, H et E) réalisée rapidement au pied à coulisse.

4.2.2 Indice de condition chez Lymnaea stagnalis

Par pragmatisme, seul un indice de condition a été testé chez *L. stagnalis*. Il est impossible de disséquer l'animal en conservant intacte la coquille. Le choix s'est donc porté sur une mesure relativement équivalente à l'indice volumique basé sur le poids frais IC_1 adopté pour les dreissènes. Nous proposons d'estimer le volume de la coquille en l'assimilant à un cône. Ceci nécessite la mesure, au pied à coulisse, de l'épaisseur et de la hauteur de la coquille des lymnées (Figure II.2), les trois derniers tours de spire très fins n'étant pas pris en compte dans la mesure, puisque l'extrémité de la coquille casse facilement à cet endroit et peut être régulièrement absente sur les individus échantillonnés. Ensuite, l'animal est extrait de la coquille en cassant celle-ci délicatement à l'aide de pinces fines, égoutté sur du papier

absorbant selon le même protocole que décrit plus haut pour la dreissène, et pesé au dixième de milligramme près, avant prélèvement de la partie apicale du complexe gonado-digestif pour l'histochimie.

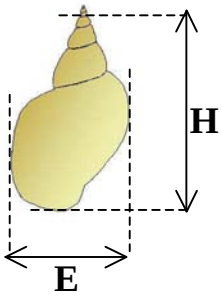


Figure II.2. Représentation schématique de la mesure de la hauteur (H) sans l'extrémité et de l'épaisseur (E) de la coquille chez la lymnée pour le calcul de l'indice de condition.

Le volume d'un cône est donné par la formule suivante :

$$V = 1/3\ \pi\ r^2\ H \qquad (25)$$

Où

V : volume

r : rayon du disque de base = E / 2

H : hauteur du cône

Un indice de condition volumique utilisant cette estimation du volume peut donc être calculé comme suit :

$$IC_{volumique} = (3\ PF_{tissus}) / (\pi\ (E/2)^2\ H) \qquad (26)$$

$(g.mm^{-1})$

Avec :

IC : indice de condition

PF : poids frais des tissus mous égouttés

H : hauteur de la coquille

E : épaisseur de la coquille, assimilée au diamètre du disque de base du cône

5 PHYSICO-CHIMIE ET PIGMENTS CHLOROPHYLLIENS, APPLICATION DU SEQ-EAU

Au cours des études *in situ*, différents paramètres physico-chimiques sont suivis (voir la liste détaillée dans la section « matériel et méthodes » propre à chaque étude) selon les méthodes et avec l'appareillage présentés ci-dessous.

5.1 PHYSICO-CHIMIE CLASSIQUE

5.1.1 *Paramètres mesurés* in situ

La température de l'eau (°C), la conductivité ($\mu S.cm^{-1}$), la saturation en oxygène (% ou $mg.L^{-1}$) et le pH sont mesurés directement sur le terrain à l'aide d'une sonde multiparamètre WTW (étude saisonnière à long terme, Chapitre III, 1ère partie, section A) ou d'appareils individuels portatifs (conductimètre, oxymètre et pH-mètre) (programme ECODYN, Chapitre III, 1ère partie, section B).

5.1.2 Paramètres mesurés au laboratoire

→ ***Mesures effectuées par Philippe Rousselle***
LIEBE-UPVM

5.1.2.1 Demandes chimique et biologique en oxygène

La demande chimique en oxygène (DCO) et la demande biologique en oxygène sur 5 jours (DBO_5) sont mesurées par méthodes volumétrique et oxymétrique, respectivement ($mg_{O2}.L^{-1}$).

5.1.2.2 Matières en suspension

Les matières en suspension (MES) sont quantifiées par gravimétrie.

5.1.2.3 Cations et anions

Pour l'analyse des cations et anions, l'eau, prélevée dans des bidons de polyéthylène de 2 L, est rapidement acidifiée (acide nitrique, 1 %) au retour du terrain. Les cations sont dosés par spectrométrie d'absorption atomique (SAA) à la flamme (Perkin-Elmer Aanalyst 100) ou

au four graphite (Varian Spectra-300). Les concentrations en anions sont obtenues par chromatographie échangeuse d'ions (Dionex).

5.1.2.4 Pigments chlorophylliens et albazod

Après prélèvement de l'eau dans des bouteilles opaques de 2 L, la méthode spectrophotométrique de Lorenzen (1967) permet de déterminer les concentrations respectives en chlorophylle a et phéopigments.

L'albazod (poids frais d'algues, bactéries, zooplancton et détritus, exprimé en $g.m^{-3}$) est mesuré par gravimétrie sur des échantillons prélevés au bateau à moteur à l'aide d'un filet à plancton.

5.2 DOSAGE DES METAUX

→ Dosages effectués par Etienne Morhain
LIEBE-UPVM

Les concentrations en métaux sont déterminées sur échantillons d'eau filtrée et acidifiée (HNO_3, 1 %), par SAA, à l'aide de deux méthodes, en fonction des concentrations :

- en flamme (Perkin-Elmer Aanalyst 100) pour les concentrations les plus élevées (généralement : Fe, Cu, Zn, Mn et Mg), selon la norme T90-112 (=FD T90-112 juillet 1998) ;
- au four à graphite (Varian Spectra-300) pour les concentrations les plus faibles (généralement : Cd, Cr, Ni, Al et Pb), selon la norme T90-119 (= NF EN ISO 15585 mai 2004).

5.3 DOSAGE DES ORGANIQUES

5.3.1 Hydrocarbures aromatiques polycycliques

→ Dosages réalisés par Laurent Jeanneau et Pierre Faure
G2R UMR 7566, Université Henri Poincaré – Nancy

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques des sédiments ont été caractérisés grâce à une extraction par solvant organique (dichlorométhane), fractionnement par chromatographie

liquide et analysés par couplage GC-MS (chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse).

5.3.2 Herbicides

Dosages réalisés sous la responsabilité de Jean-Philippe Jaeg et Jean-Pierre Cravedi
UMR 1089 XENOBIOTIQUES Institut National de Recherche Agronomique – Ecole Nationale Vétérinaire - Toulouse

Pour les dosages des herbicides, les solutions sont immédiatement congelées dans des bouteilles de verre silanisées, codées et stockées à –20°C avant envoi par transport spécial de produits surgelés.

5.3.2.1 Fomésafène dans l'eau

Le volume total des échantillons d'eau décongelés est déterminé par pesée. Ces derniers sont acidifiés (0,1 % d'acide formique) et le fomésafène contenu dans 50 mL d'eau à analyser est ensuite extrait en phase solide sur cartouche (C18, 1g). Après lavage à l'eau acidifiée, l'élution est réalisée au méthanol. Cette phase est évaporée à sec et l'échantillon ainsi traité est repris à l'acétonitrile, évaporé sous azote N_2, puis repris par 100 µL de la phase mobile acétonitrile / eau acidifiée à 0,1 % (50/50).

L'analyse des résidus est réalisée par chromatographie liquide haute performance (CLHP) (Colonne Prontosil C18 250 x 4 mm 5 µm, Bischof, ICS) à 35°C, avec une détection ultraviolet à 265 nm. La phase mobile est injectée selon un mode isocratique à 1 $mL.min^{-1}$. Le temps de rétention du fomésafène dans ces conditions est de 19 à 20 min. L'analyse quantitative est réalisée par la méthode de l'étalonnage externe (concentrations de 0,5 à 100 $ng.\mu L^{-1}$; 3 injections de 10 µL par point de gamme). La limite de détection est de 2 ng et la limite de quantification de 5-10 $\mu g.L^{-1}$.

5.3.2.2 Diquat dans l'eau

Après décongélation et décantation, le diquat contenu dans 200 mL d'eau à analyser est extrait en phase solide sur cartouche WCX (500 mg). L'élution est réalisée grâce à un mélange à parts égales d'acide chlorhydrique et de tétrahydrofurane. Après évaporation, l'échantillon est repris par 5 mL de phase mobile (acétate d'ammonium à 40 $mmol.L^{-1}$

+ 0,5 % d'acide trifluoroacétique / acétonitrile (92,5 / 7,5)) et 100 µL sont injectés pour la CLHP. Le rendement d'extraction est de 79,6 ± 5,8 % à 4 ppb et de 88,6 ± 2,6 % à 25 ppb.

La CLHP est réalisée sur colonne Hypercarb (150 x 4,6 mm ; 5 µm, Thermo Hypersil, Keystone) à 35°C, avec une détection ultraviolet à 308 nm. La phase mobile est injectée selon un mode isocratique à 1 $mL.min^{-1}$. Le temps de rétention du diquat dans ces conditions est de 4 à 4,6 min. L'analyse quantitative est réalisée par la méthode de l'étalonnage externe (concentrations de 40 $ng.mL^{-1}$ à 40 $mg.mL^{-1}$). La limite de détection est de 25 ng et la limite de quantification de 5-10 $\mu g.L^{-1}$.

5.4 STANDARDS D'EVALUATION DE LA QUALITE DE L'EAU

Afin de caractériser la qualité de l'eau, les grilles du Système d'Evalutation de la Qualité de l'Eau, version 2 (SEQ-Eau, V-2) ont été utilisées à titre indicatif, pour interpréter les données physico-chimiques disponibles lors des études *in situ* (MEDD et Agences de l'Eau, 2003). Ce système d'évaluation est certes jugé obsolète aujourd'hui, mais au niveau national, aucun système de remplacement facile à utiliser n'est à ce jour disponible (Michel Khalanski, communication personnelle), aussi avons-nous décidé de nous y référer tout de même.

Brièvement, le SEQ-Eau attribue des classes de qualité de l'eau (de très bonne à très mauvaise) auxquelles il fait correspondre des couleurs (de bleu à rouge) pour une comparaison aisée et rapide de différentes stations au niveau du territoire national. Une explication détaillée des principes généraux de cette méthode est fournie dans la présentation de la première version du SEQ-Eau (Agences de l'eau, 2000).

Normalement, ce système d'évaluation ne peut être utilisé que pour des cours d'eau, mais nous l'avons tout de même appliqué aux données disponibles sur la retenue artificielle du Mirgenbach (voir Chapitre III, 1ère partie, étude A.). En effet, cette retenue de 90 ha est tout de même ouverte : elle est alimentée par une prise d'eau au niveau de la rivière Moselle et l'eau est ensuite rejetée plus loin dans la rivière, après un temps de séjour d'une dizaine de jours. En outre, nous ne disposions pas de tous les paramètres nécessaires à l'attribution d'une note globale à chaque station (notamment, les micropolluants), ni des dix dates de

prélèvement recommandées dans le cas des expérimentations à moyen terme (Chapitre III, 1ère partie, étude B). Enfin, l'application du SEQ-Eau requiert une prise en compte des concentrations en métaux totaux dans l'eau, alors que nous ne disposions que des mesures effectuées sur eau filtrée (les classes de qualité sont donc susceptibles d'être plus déclassantes encore que celles que nous avons évaluées).

Néanmoins, pour estimer la qualité de l'eau vis-à-vis des concentrations en cuivre dissous, les Standards de Qualité Environnementale du Royaume-Uni (United Kingdom-Environmental Quality Standards, UK-EQS) fournissent des valeurs seuils (pour la moyenne annuelle et le 95ème percentile), dont nous avons également tenu compte dans l'analyse des résultats de terrain (voir le tableau des EQS pour les substances dangereuses en fonction de la dureté de l'eau :

http://www.environment-agency.gov.uk/yourenv/eff/1190084/water/213902/290690/290939/290981/?lang=_e.

6 EXPLOITATION DES DONNEES ET STATISTIQUES

Les détails concernant l'analyse statistique des résultats et l'utilisation des outils multivariés sont apportés dans la section « matériel et méthodes » propre à chaque sous-partie du chapitre de résultats (chapitre III).

Les logiciels utilisés sont :

- Statistica version 5.5 édition 99 ;
- le logiciel libre ADE-4 (autrefois disponible en ligne sur le serveur de l'Université de Lyon 1 et désormais intégré à la suite de logiciels R) pour les Analyses en Composantes Principales (Thioulouse *et al.*, 1997).

CHAPITRE III.
RESULTATS & DISCUSSIONS

Chapitre III.

RESULTATS & DISCUSSIONS

1ère partie : Expérimentations *in situ* et en laboratoire

A. Etude saisonnière à long terme des biomarqueurs cellulaires et physiologique chez *D. polymorpha*, *C. fluminea* et *D. villosus*

1 INTRODUCTION

La retenue du Mirgenbach est un lac artificiel d'une capacité de 7,3 millions de mètres cubes, 90 hectares et d'une profondeur moyenne de 7,7 m. Cette retenue a été conçue pour servir de tampon thermique et réserve d'eau de sauvegarde pour les quatre réacteurs du Centre Nucléaire de Production Electrique de Cattenom, en Moselle, depuis août 1986. Le circuit de refroidissement tertiaire de la centrale est alimenté par l'eau de la rivière Moselle (pompée avec un débit de 8,8 $m^3.s^{-1}$). Les aéroréfrigérants évaporent 3 $m^3.s^{-1}$ et les eaux de purge (5 $m^3.s^{-1}$) sont envoyées dans la retenue, au niveau d'un ouvrage de rejet. Dans la retenue, un ouvrage de prise d'eau permet un débit sortant équivalent vers la Moselle. Cette description du fonctionnement du circuit de refroidissement est ici simplifiée : en réalité, sa gestion est complexe et plusieurs options s'offrent à l'exploitant qui peut ou non fonctionner en boucle sur la retenue ou bien court-circuiter celle-ci, totalement ou partiellement.

La retenue du Mirgenbach représente un véritable écosystème. Parmi les producteurs primaires de sa biocénose peuvent être cités les macroalgues *Cladophora sp., Œdogonium sp.* et *Enteromorpha intestinalis*, ainsi que les macrophytes *Potamogeton pectinatus* et *Myriophyllum verticilatum* (Vinot, 2004). La faune comporte notamment un peuplement

piscicole varié (Dembski, 2005), composé d'espèces présentes dans la rivière et supportant les conditions lacustres, et complété ponctuellement par des empoissonnements (brochet, sandre, tanche, carpe). Durant la période de l'étude (2001-2002), en terme de biomasse, les principales espèces de l'ichtyofaune capturées aux filets maillants verticaux sont la brème, la brème bordelière, le gardon, la carpe commune, le sandre, le rotengle et la perche. En terme d'effectifs, les espèces dominantes, tous engins de capture confondus, sont la perche-soleil, la brème bordelière et le rotengle.

Le peuplement de macroinvertébrés benthiques et épibenthiques qui effectuent la totalité de leur cycle de vie en milieu aquatique comporte notamment des mollusques (dreissène, corbicules, gastéropodes du genre *Bithynia*) et des crustacés tels que l'amphipode gammaridé *Dikerogammarus villosus*, la caridine, d'origine méditerranéenne, *Atyaephyra desmarestii* (Décapodes, Atyidae) ou l'écrevisse américaine, *Orconectes limosus* (Décapodes, Astacidés) (Vinot, 2004). Le transfert des contaminants métalliques et des acides gras au sein de ce réseau trophique a notamment été étudié ces dernières années (Vinot, 2004 ; Vinot & Pihan, 2005 ;Maazouzi, 2006 ; Maazouzi *et al.*, 2007).

Dans le cadre de notre étude, la problématique écotoxicologique associée à ce site concerne essentiellement la présence de micropolluants métalliques (cuivre et zinc, provenant notamment de la corrosion des condenseurs en laiton du circuit de refroidissement de la centrale), ainsi que l'augmentation de la température de l'eau, également liée aux rejets. Les phénomènes d'évaporation de l'eau au niveau des aéroréfrigérants de la centrale occasionnent, de surcroît, une concentration des sels dissous dans le Mirgenbach d'un facteur 1,4. En outre, la confluence de la rivière avec la Meurthe et l'affluence de l'Orne et de la Fensch, qui drainent des vallées sidérurgiques, sont à l'origine d'une qualité de l'eau déjà médiocre de la Moselle à l'amont de la prise d'eau de la centrale dans la rivière, avec notamment des niveaux très élevés en chlorures.

Parmi les nombreuses études réalisées par l'UPVM autour ce site figurent notamment des contrats de suivi mensuel de la qualité hydrobiologique de la retenue (EBSE-PEE & EDF-CNP, 2001 ; EBSE-PEE & EDF-CPN, 2002b), et de la rivière Moselle à proximité (EBSE-PEE & EDF-CPN, 2001 ; EBSE-PEE & EDF-CPN, 2002a). Les caractéristiques de ce site, étudié historiquement au laboratoire, et le soutien financier d'Electricité de France (Contrat n° P71/D02102/P71L06), nous ont offert l'opportunité de mener à bien une étude saisonnière à

long terme chez la dreissène, la corbicule et le gammare, d'octobre 2000 à décembre 2002, et d'apporter des éléments de réponse à chacun des trois axes présentés dans l'introduction générale de ce document (voir figure i.2 dans l'Introduction générale, ainsi que le prochain paragraphe). Une étude de la bioaccumulation de métaux dans la chaîne trophique a été réalisée de concert, dans le cadre de la thèse d'Ingrid Vinot (2004). Pour l'exploitant, l'intérêt de ces deux études conjointes consistait notamment à évaluer l'impact, pour le biota, des rejets de cuivre et de zinc occasionnés par la corrosion des condenseurs en laiton, et la persistance éventuelle de ces effets au niveau de la rivière. Ces études entraient effectivement dans le cadre de la demande de renouvellement de l'arrêté d'autorisation de rejet prévu par la législation des ICPE.

Le **premier axe de recherche** orientant ces travaux de thèse, qui concerne l'évaluation de la pertinence de la batterie de biomarqueurs, est ici abordé sous les aspects suivants :

- par l'analyse des réponses au stress potentiellement induit par l'influence conjointe du régime thermique de la retenue, de la contamination au cuivre ou encore du phénomène de concentration des sels dissous ;
- par l'évaluation des éventuelles répercussions du rejet d'eau de la retenue sur les réponses biologiques étudiées chez les organismes de la rivière, à l'aval de l'effluent ;
- par la confrontation des réponses biologiques avec un corpus important de données physico-chimiques et trophiques, disponibles tout au long de l'étude grâce aux contrats évoqués plus haut ;
- par une comparaison des deux approches de biosurveillance (active et passive) chez la dreissène.

Le **second axe de recherche** est ici appréhendé de façon approfondie, à travers l'étude des variations saisonnières de chacun des quatre biomarqueurs cellulaires, ainsi que de l'indice gonadique chez *D. polymorpha*. L'apport du suivi saisonnier des paramètres physico-chimiques et trophiques apparaît également essentiel de ce point de vue.

La prise en compte des fluctuations de l'indice gonadique et de sa valeur moyenne comme de possibles indicateurs de stress constitue un premier pas vers l'étude du **troisième axe de recherche**, par la considération simultanée de différents niveaux d'organisation biologique. D'autre part, les facteurs de stress varient également de façon saisonnière, ce qui

offre la possibilité d'aborder le degré et type de réponse des biomarqueurs en fonction du degré de stress et d'éventuellement identifier des seuils de compensation ou de non-compensation.

Le volet résultats/discussions de cette sous-partie du document comporte :

- un premier article publié, précédé d'un résumé en français (Article 1. : Guerlet *et al.*, 2007), qui concerne les dreissènes natives et transférées ;
- une section en français sur les résultats obtenus chez les corbicules transférées ;
- un second article soumis (Article 2), sur l'application de la batterie de biomarqueurs chez les gammares natifs, accompagné également d'un résumé en français ;
- une synthèse comparative des résultats chez les quatre groupes d'animaux sentinelles.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 SITES D'ETUDE

Deux stations, traditionnellement suivies dans le cadre des contrats entre l'UPVM et la Direction des Etudes et Recherches d'EDF, ont été sélectionnées sur la Moselle en raison de leur localisation par rapport aux rejets de la centrale nucléaire de Cattenom, et une troisième, dans la retenue du Mirgenbach (Figure III.1).

La station amont ① se trouve au niveau de l'ouvrage de prise d'eau de la centrale nucléaire à proximité de Basse Ham, rive gauche de la Moselle.

La station Mirgenbach ② est localisée au-dessus de l'ouvrage de prise d'eau vers la Moselle.

La station aval ③ est située à Berg sur Moselle à environ 5 km du rejet du Mirgenbach, rive gauche de la Moselle.

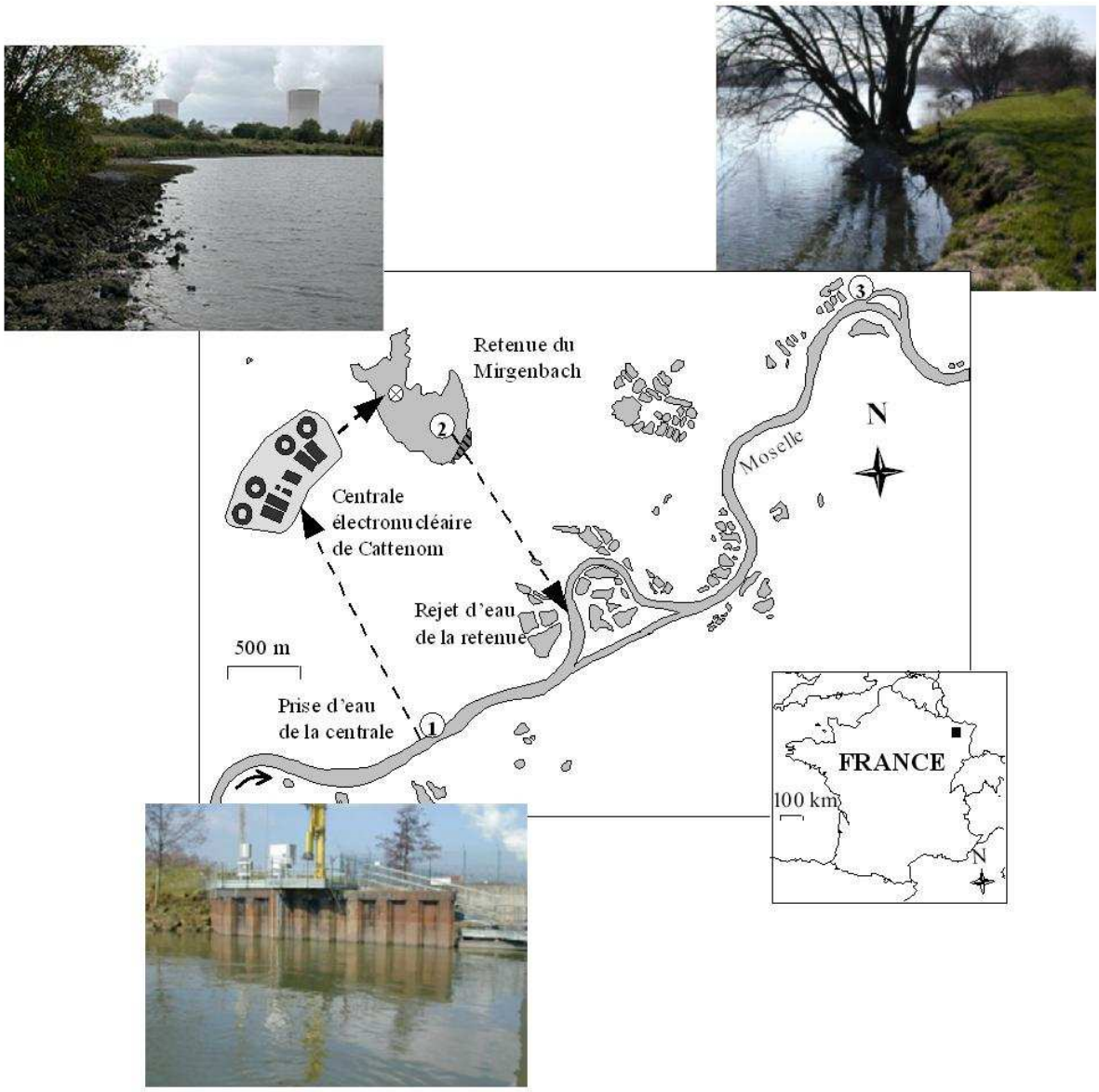


Figure III.1.A.1. Photographies des sites d'étude et localisation géographique des stations ① et ③, situées dans la Moselle, et de la station Mirgenbach ②, positionnée au-dessus de l'ouvrage de prise d'eau vers la Moselle. Au niveau de la retenue, le caractère ⊗ désigne l'ouvrage de rejet d'eau de la centrale dans le Mirgenbach.

Illustrations photographiques : Philippe Wagner

2.2 LES ORGANISMES

Le tableau III.1.A.1 présente les groupes d'invertébrés utilisés dans cette étude, ainsi que les caractéristiques de leur collecte, conditionnement, transfert (biosurveillance active) et de leur prélèvement mensuel (biosurveillance active, organismes « transférés » et passive, organismes « natifs »). Les effectifs de bivalves transférés étaient prévus pour assurer une

année de prélèvements, mais les aléas du travail de terrain (mortalité, pertes d'échantillons liés aux crues, vandalisme) ont nécessité des transferts supplémentaires (voir les dates dans le tableau III.1.A.1).

Tableau III.1.A.1. Présentation des groupes expérimentaux transférés et natifs de l'étude saisonnière à long terme

Biosurveillance active	***C. fluminea***	***D. polymorpha***
Lieu de collecte	La Moselle à Metz	La Meuse à Commercy
Mode de collecte	A la main ou à l'aide d'une pelle à sédiment et d'un tamis à grosse maille	A la main (filaments byssaux sectionnés au scalpel), sous et sur les pierres des rives
Conditions de maintien au laboratoire avant transfert	Bacs en plastique de 5 L d'eau déchlorée changée tous les 2 j (durée : de 5 à 14 j) ; température 17 ± 1°C : photopériode 16 : 8 ; apport quotidien d'une suspension algale (*Chlorella vulgaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Scenedesmus subspicatus*)	
Dates de transfert	Octobre 2000 ; mai et septembre 2001 ; avril et octobre 2002	Octobre 2000 ; juin et septembre 2001 ; avril et octobre 2002
Dispositif d'encagement	Cage en plastique rigide, munie d'un couvercle et ajourée sur les quatre côtés (maille de 1 x 6,5 cm) 	Cage en plastique rigide, munie d'un couvercle et ajourée sur les quatre côtés (maille de 1 x 6,5 cm) 
Dimensions du dispositif (cm)	60 x 40 x 30	60 x 40 x 20
Garnissage des cinq faces internes	Grillage en plastique de 5 mm de maille	
Garnissage du fond du dispositif	Revêtement de sol souple recouvert de 2 à 3 cm de sédiment de la station d'exposition 	Dalles de carrelage, fixées à l'envers (pour leur attachement par le byssus) 
Position du dispositif	4-5 m de profondeur	2-3 m de profondeur
Station ①	Attaché à la structure bétonnée de la prise d'eau	
Station ②	Attaché à une bouée	
Station ③	Attaché à la ripisylve	

Biosurveillance active et passive	***C. fluminea* transférées**	***D. polymorpha* transférées**	***D. polymorpha* natives**	***D. villosus* natifs**
Fréquence des prélèvements	Mensuelle (de novembre 2002 à décembre 2002)			
Mode de collecte	A la main ; dans les cages		A la main ; sous et sur les pierres des rives et, pour la station ②, sur le barrage	A la main et au filet troubleau ; dans les herbier, les anfractuosités des pierres et dans les cages des bivalves transférés
Effectifs prélevés	Généralement 8 (n = 5 à 8, en fonction de la disponibilité)			
Conditions de maintien avant la dissection (ayant lieu dès le retour au laboratoire)	Dans des bidons de polyéthylène de 2 L contenant l'eau du site			Dans 10-15 L d'eau du site (glacières)
Organes prélevés	Glande digestive (histochimie)	Glande digestive (histochimie) ; gonade (IG)	Glande digestive (histochimie) ; gonade (IG)	Cæca hépatopancréatiques (histochimie)

Illustrations photographiques: Philippe Wagner

NB : entre le 3 et le 12 octobre 2001, la visite décennale de la retenue a nécessité un étiage de 1,8 m au niveau du Mirgenbach. Ceci nous a contraints à encager des dreissènes autochtones dans des sachets grillagés de 8 x 20 mm (maille de 5 mm), alors attachés aux cages des moules transférées. De même, des travaux réalisés sur la rivière par Voies Navigables de France en juin 2002 ont occasionné un étiage de 30 cm à la station ① et de plus

de 1,5 m à la station ③. Un ensachement de moules natives a également été nécessaire à cette occasion. Les prélèvements des dreissènes natives ont été ainsi réalisés de novembre 2001 à juillet 2002 inclus (station ②), et de juillet 2002 à octobre et décembre 2002 (stations ③ et ①, respectivement).

Les quatre biomarqueurs cellulaires sont étudiés dans les tissus digestifs des deux espèces de bivalves et des amphipodes. Pour simplifier la considérable matrice de données résultante, et puisque seule la proportion de surface peut être évaluée pour les lipides neutres insaturés et lipofuscines, ce paramètre stéréologique est également le seul calculé pour décrire la morphométrie des systèmes lysosomal et peroxysomal.

Par ailleurs, les indices gonadiques (IG) sont uniquement déterminés chez *D. polymorpha* d'après la technique histologique exposée au point 4.1. du Chapitre II (Matériels et méthodes).

2.3 PRELEVEMENT ET ANALYSE DE L'EAU

Lors de chaque campagne mensuelle, l'eau a été prélevée dans 2 bidons de 1 L en polyéthylène, préalablement rincés avec l'eau du site et certaines mesures ont été réalisées directement *in situ*. Le tableau III.1.A.2 présente les différents paramètres physico-chimiques et biologiques ainsi suivis dans le cadre des contrats d'étude de la retenue du Mirgenbach et de la rivière Moselle, selon le protocole décrit dans la section 5.1. du Chapitre II.

Tableau III.1.A.2. Paramètres physico-chimiques et trophiques suivis mensuellement lors de l'étude saisonnière

	Station Moselle ①	Station Moselle ③	Station Mirgenbach②
Paramètres mesurés *in situ*	Température de l'eau (°C) ; saturation (%) et concentration en oxygène (mg O_2. L^{-1}) ; conductivité ($\mu S.cm^{-1}$) ; pH		
Paramètres mesurés au laboratoire	DCO (mg O_2. L^{-1}) ; $[Cu]_{eau\ brute}$ et $[Zn]_{eau\ brute}$ ($\mu g.\ L^{-1}$) ; chlorures* et sodium* ($mg.L^{-1}$) ; ammonium* (mg $NH_4^+.L^{-1}$), nitrates* (mg $NO_3^-.L^{-1}$), nitrites* (mg $NO_2^-.L^{-1}$), azote Kjeldahl* (mg $N.L^{-1}$), orthophosphates* (mg $PO_4^{3-}.L^{-1}$), phosphore total* (mg $P.L^{-1}$); chlorophylle a* et phéopigments* ($\mu g.L^{-1}$)		
	Carbonates de calcium (mg $CaCO_3.L^{-1}$) ; MES ($mg.L^{-1}$) ; concentrations en zinc, cuivre, plomb, nickel et cadmium dans les bryophytes ($\mu g.g^{-1}$)		
			Albazod ($g.m^{-3}$)

* *: Pour ces paramètres, les données ne sont pas directement disponibles pour la station aval et sont assimilées à celles de station 4 du contrat Cattenom, située en aval, à Apach (frontière luxembourgeoise), ces deux stations étant caractérisées par une physico-chimie très proche.*

2.4 ANALYSE DES DONNEES

Le seuil de significativité de l'ensemble des tests statistiques réalisés a été fixé à 5 %.

2.4.1 Statistiques

Chez tous les organismes et pour chaque mois d'échantillonnage, la significativité des différences deux à deux entre les moyennes des biomarqueurs des trois stations a été vérifiée par le test U de Mann-Whitney, Wilcoxon.

En outre, les différences inter-sites entre paramètres stéréologiques moyens durant la période entière de 26 mois ont été testées par le test des signes de Wilcoxon pour échantillons appariés.

La force des relations entre variables biologiques et physico-chimiques a été appréhendée grâce au calcul des coefficients de corrélation non paramétriques de Spearman r_S.

2.4.2 Analyses multivariées.

Les analyses en composantes principales constituent une technique efficace pour représenter simplement la structure des corrélations entre plusieurs variables originales grâce à une transformation linéaire (Jolliffe, 1986, in Machala *et al.*, 2001). Elles permettent ainsi de maximiser la variance entre catégories (entre sites, mois et/ou groupes expérimentaux d'animaux) et d'améliorer la mise en évidence de la structure d'un ensemble de données.

En raison de différences d'échelles entre variables, les ACP réalisées ici sont normées, c'est-à-dire effectuées sur des données centrées-réduites. Elles sont toutes mises en œuvres sur le logiciel ADE-4, version 2001 (Thioulouse *et al.*, 1997).

Les matrices employées pour réaliser les ACP ne pouvant contenir de valeurs manquantes, seuls les mois pour lesquels toutes les stations (ou tous les groupes expérimentaux de dreissènes) sont représentés peuvent entrer dans l'analyse considérée.

Une série d'analyses en composantes principales est réalisée sur les données disponibles simultanément pour tous les biomarqueurs des différentes espèces, afin d'expliquer les relations entre biomarqueurs et de vérifier la variabilité spatiale définie par leurs réponses. Elles sont obtenues à partir de matrices dont le nombre de colonnes ou descripteurs

correspond au nombre de biomarqueurs et le nombre de lignes ou objets correspond au nombre de stations multiplié par le nombre de réplicats (soit le nombre de mois disponibles simultanément pour les trois stations).

Les matrices des ACP présentées dans le corps du document comportent ainsi :

- 4 descripteurs (biomarqueurs cellulaires) et 54 objets pour les gammares (18 mois disponibles simultanément pour 3 stations),
- 4 descripteurs et 33 objets pour les corbicules (11 mois pour 3 stations),
- 5 descripteurs (4 biomarqueurs cellulaires et l'indice gonadique) et 51 objets pour les dreissènes transférées (17 mois pour 3 stations).
- 5 descripteurs et 45 objets pour les dreissènes natives (15 mois pour 3 stations).

Le nombre d'axes retenus est choisi en fonction des valeurs propres des différentes composantes principales (ne sont retenus que les axes pour lesquels $\lambda > 1$, c'est-à-dire les composantes principales qui expliquent plus de variabilité que les variables initiales).

Sur le cercle des corrélations, les facteurs physico-chimiques et trophiques figurent comme autant de variables supplémentaires illustratrices (n'entrant pas dans la définition des composantes). Dans un souci de clarté, seules ont généralement été conservées les variables dont le vecteur n'était pas trop proche de l'origine des axes sur le cercle des corrélations car l'information apportée par de tels vecteurs est quasiment nulle dans la dimension en question.

A l'issue de chaque ACP la significativité statistique respective des effets temporel et spatial est vérifiée à l'aide de tests de permutations aléatoires de Monte-Carlo (sur 10 000 permutations) (Manly, 1991).

NB : à titre informatif, l'accès aux valeurs des contributions respectives des effets temporel et spatial est possible, sous ADE-4, en réalisant l'étape préparatoire d'une ACP inter-groupes (Dolédec & Chessel, 1989), à la suite de l'ACP classique (module 'Discrimin', fonction 'Initialize : LinkPrep').

3 RÉSULTATS

Article 1.

Guerlet E., Ledy K., Meyer A., Giambérini L., 2007.

Towards a validation of a cellular biomarker suite in native and transplanted zebra mussel: A two-year integrative field study of seasonal and pollution-induced variations. *Aquatic Toxicology.* 81 : 377-388.

3.1 PHYSICO-CHIMIE ET PIGMENTS CHLOROPHYLLIENS

RESUME DES RESULTATS EN FRANÇAIS

Durant les 26 mois d'étude, les valeurs mesurées des différents paramètres physico-chimiques et des pigments chlorophylliens ont montré une grande proximité au fil des saisons entre les deux stations de la rivière, ① et ③ (voir l'Annexe 3). Selon les critères de qualité du SEQ-Eau-version 2, les paramètres les plus déclassants sont, en premier lieu, les concentrations en chorures et une faible transparence (voir Tableau III.1.A.3). A ces derniers viennent s'ajouter, plus ponctuellement, les taux de matières organiques oxydables (carbone organique dissous), ainsi que les concentrations en nitrates et matières phosphorées. Ces résultats ne suggèrent aucune dégradation notable de la qualité de l'eau de la rivière entre les sites amont ① et aval ③. Au contraire, au niveau du site 2 (retenue), les concentrations en cuivre, dix fois plus importantes que dans la rivière, et les températures estivales élevées sont responsables d'une diminution de la qualité de l'eau.

Tableau III.1.A.3. Classes de qualité de l'eau pour les trois stations de l'étude saisonnière à long terme, selon le SEQ-Eau-version 2, et classes de qualité vis-à-vis des concentrations en cuivre et zinc dans l'eau selon les UK-EQS pour la vie piscicole.

SEQ-Eau V2	MOOX			AZOT			NITR			PHOS			PAES			TEMP			MINE			ACID			EPRV		
Date	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③
2001																											
2002																											
26 mois																											

SEQ-Eau V2	*Cu eau µg/L*			*Zn eau µg/L*			*Zn mousses µg/g*			*Cu mousses µg/g*			*Ni mousses µg/g*			*Cr mousses µg/g*			*Pb mousses µg/g*			*Cd mousses µg/g*		
Date	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③
2001																								
2002																								
26 mois																								

UK-EQS	Cu eau µg/L			Zn eau µg/L		
Date	①	②	③	①	②	③
moy 26 mois	4	42	4	23	27	21
95ème centile	6	58	10	42	38	47

UK-EQS :

Valeur < aux UK-EQS
Valeur > aux UK-EQS

SEQ-Eau V2 : Classes de qualité pour chaque **ALTERATION** (ou *paramètre*)

Très bonne
Bonne
Passable
Mauvaise
Très mauvaise

Les classes sont soit déterminées par type d'altération (en gras), soit données à titre indicatif pour certains paramètres (qui ne suffisent pas pour qualifier à eux seuls une altération).
Abréviations des différentes altérations du SEQ-eau : MOOX : matières organiques oxydables ; AZOT : matières azotées ; NITR : nitrates ; PHOS : matières phosphorées ; PAES : particules en suspension ; TEMP : température ; MINE : minéralisation ; ACID : acidité ; EPRV : effets des proliférations végétales.

3.2 DREISSENES NATIVES ET TRANSFEREES

RESUME DES RESULTATS EN FRANÇAIS

Les **variations saisonnières** des quatre biomarqueurs cellulaires sont relativement proches entre organismes natifs et transplantés, mais très différents d'une année sur l'autre. Seuls les lipides neutres insaturés semblent présenter un schéma saisonnier de variations assez semblable les deux années. Celui-ci consiste en une augmentation des niveaux de lipides durant le printemps et/ou l'été et des niveaux minimums en automne et surtout durant l'hiver. Néanmoins, les valeurs maximales sont exceptionnellement hautes durant le printemps et l'été 2002 par rapport à celles rencontrées la première année (pouvant aller jusqu'à un facteur 80 en juin 2002 par rapport à juin 2001 en station ①). Un important bloom phytoplanctonique s'est produit dans la rivière durant le mois d'avril 2002, ce qui se traduit par une somme des concentrations en chlorophylle a et phéopigments supérieure à 130 $\mu g.L^{-1}$, contre des valeurs autour de 3 $\mu g.L^{-1}$ à la même période en 2001. Ce phénomène suggère un lien probable entre

le statut nutritionnel des moules et la quantité très importante de gouttelettes lipidiques révélées par la coloration à l'oil red O dans leurs tissus digestifs.

Certains mois, les paramètres biologiques **discriminent les stations**, et les réponses les plus fréquemment rencontrées chez les moules du réservoir consistent alors essentiellement en :

- un système lysosomal plus développé (une corrélation positive entre Sv_L et la concentration en cuivre dans l'eau ou la conductivité évoque, chez les dreissènes transférées, l'implication de ces organites dans la détoxication des métaux et l'osmorégulation, respectivement) ;
- des niveaux de lipides neutres insaturés plus bas qui suggèrent une dépense énergétique accrue pour lutter contre des niveaux de stress supérieurs chez les dreissènes du réservoir ou un effet toxique direct ou indirect du cuivre ;
- dans une moindre mesure, une accumulation accrue en lipofuscines, apparemment non pathologique par comparaison avec les données disponibles au laboratoire, ce qui, avec l'absence de prolifération peroxysomale marquée, évoque la possiblité d'un stress oxydant relativement peu prononcé dans ce contexte d'étude.

Chez les moules du réservoir, l'indice gonadique n'atteint jamais la valeur maximale de 5, contrairement aux lots échantillonnés dans la rivière, pour deux raisons :

- une désynchronisation entre sexes semble exister (femelles plus précoces que les mâles), ainsi qu'une désynchronisation interindividuelle au sein d'un même genre ;
- toute l'année sont présents des individus au repos sexuel.

Ces résultats peuvent être interprétés comme une perturbation physiologique liée à la température et/ou un effet toxique du cuivre.

Les deux ACP réalisées chez les dreissènes transplantées (17 mois entrant dans l'analyse) et natives (15 mois) à partir des résultats des quatre biomarqueurs cellulaires et du biomarqueur physiologique (IG) montrent, dans ce contexte, un plus fort pouvoir de discrimination de l'approche de biosurveillance active par rapport à la biosurveillance passive. Ces résultats suggèrent des mécanismes d'adaptation (ou, au moins, d'accommodation) des dreissènes natives par rapport à celles transférées.

ELSEVIER

Aquatic Toxicology 81 (2007) 377–388

AQUATIC TOXICOLOGY

www.elsevier.com/locate/aquatox

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

Edwige Guerlet [1], Karine Ledy, Antoinette Meyer, Laure Giambérini *

Laboratoire Ecotoxicité, Santé Environnementale, CNRS UMR 7146, Université Paul Verlaine-Metz, Rue Général Délestraint, F-57070 Metz, France

Received 8 November 2006; received in revised form 22 December 2006; accepted 22 December 2006

Abstract

Two of the questions raised in the validation process of biomarkers are their relevance in the identification and discrimination of environmental perturbations, and the influence of seasonal factors on these biological endpoints. Determining the advantages and restrictions associated with the use of native or transplanted animals and comparing their responses is also needed. To obtain this information, a 2-year integrative field study was conducted in the vicinity of a nuclear power plant in northeastern France. A station was located in the reservoir receiving the cooling waters of the plant, and two other sites were studied 2 km upstream and 5 km downstream from the reservoir's discharge in the Moselle river. Elevated temperatures, copper contamination and a 1.4-fold-concentration factor of dissolved salts affected water quality of the reservoir. Native and transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) were collected monthly and their digestive glands were processed for histochemical determinations of the lysosomal and peroxisomal systems and of the lipofuscin and neutral lipid contents. The responses were quantified using automated image analysis and stereology. Apart from neutral lipid contents, there were no systematic seasonal patterns in mussel populations or from 1 year to another. Principal Component Analyses showed a general higher discrimination potential of biological responses in transplanted organisms compared to native ones. They also pointed out the relationships between the cellular and physiological markers and abiotic factors. The present multiple biomarker integrative approach in transplanted *D. polymorpha* brings promising elements in their validation process as relevant biomonitoring tools.
© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Lysosomal and peroxisomal systems; Gonadal index; Seasonality; Multivariate analysis; Active and passive biomonitoring; *Dreissena polymorpha*

1. Introduction

During the last decades, the need to evaluate the anthropogenic environmental degradations, and the improvement of remedial actions has led to the development of environmental risk assessment (ERA) approaches based, for aquatic ecosystems, on physico-chemical, hydrological and biological criteria. In this context, the *in situ* implementation of a suite of complementary biomarkers from different levels of the biological organization is strongly recommended as part of the biomonitoring tools designed for ERA, to provide integrated information on the occurrence of general environmental stress and/or the bioavailability of contaminants, and on their health effects on the biota (*e.g.* Goksøyr et al., 1996; Moore et al., 2004).

Multivariate tools provide a synthetic illustration of the resulting complex datasets and may improve the relevance of such a multiple biomarker approach compared to the individual examination of biological responses (Machala et al., 1997; Astley et al., 1999; de Lafontaine et al., 2000; Schmolke et al., 1999; Galloway et al., 2006).

Furthermore, most of the biomarkers are biological parameters occurring constitutively in the organisms and hence submitted to natural variations caused by intrinsic and extrinsic factors such as the normal metabolism of the individuals, their ontogenic development, their reproduction, and inter- or intraspecific interactions, themselves subjected to the influence of an important sum of external factors that may vary in a seasonal way (Sheehan and Power, 1999; Kagley et al., 2003; Bodin et al., 2004; Lau et al., 2004; Petrovic et al., 2004). In addition to the relevance of the studied biological responses as potential biomarkers of environmental stress, it is of primary importance

* Corresponding author. Tel.: +33 387 378 415; fax: +33 387 378 512.
E-mail address: giamb@univ-metz.fr (L. Giambérini).
[1] Current address: Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines, UMR IFREMER 100, Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Université de Caen Basse-Normandie, Esplanade de la Paix, F-14032 Caen Cedex, France.

0166-445X/$ – see front matter © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.aquatox.2006.12.016

to assess the influence exerted by the seasons and by biotic and abiotic parameters on these endpoints, to differentiate the effects of pollution from the influence of other environmental factors and from normal seasonal physiological variations of the candidate biomarkers, in a particular geoclimatic context (Sheehan and Power, 1999).

Two approaches are possible for the implementation of multiple biomarker studies in the field: traditional passive biomonitoring, implying the use of native organisms, and active biomonitoring on individuals from a relatively pristine location deployed to all the study sites for a defined time interval. The latter approach would improve the discrimination potential of the biomarker responses among sites by reducing genetic heterogeneity between individuals from the different locations and/or compensatory adaptative mechanisms likely to occur in native populations from chronically contaminated areas (Regoli and Principato, 1995). Moreover, comparing the biological responses of native and transplanted organisms may also be useful to assess the precocity and/or stability of these biomarkers (Da Ros et al., 2002).

In the digestive tissues of marine and estuarine molluscs, morphological modifications of the peroxisomal or the lysosomal system and associated unsaturated neutral lipid and lipofuscin contents have been extensively studied for more than 20 years and are regarded as valuable early indicators of stress- and/or pollutant-induced injury (*e.g.* Moore, 1985, 1988; Cajaraville et al., 2000; Au, 2004). In freshwater invertebrates, these responses have been considered only more recently (Svendsen and Weeks, 1995; Antón et al., 2000; Giamberini and Cajaraville, 2005; Champeau and Narbonne, 2006; Guerlet et al., 2006) and less comprehensively.

In this context, a 2-year integrative study on a suite of cellular responses was conducted monthly in native and transplanted freshwater mussels, *Dreissena polymorpha*, to assess seasonal variations of these endpoints in relation to environmental factors and their reproductive status, and to address the relevance of this multiple biomarker approach to highlight an environmental stress gradient.

2. Materials and methods

2.1. Test sites

The experiment was conducted in northeastern France, at the vicinity of a nuclear power plant (four reactors of 1300 MW). Water is directly pumped from the Moselle river and conveyed to the cooling water system. Part of the cooled water flows toward a 90 ha-dammed reservoir, with a residence time of about 10 days. Mirgenbach reservoir waters are discharged into the river, 1.5 km downstream from the plant water intake.

Three stations were studied, the first one at the plant water intake, the second one in the reservoir, and the third one 4 km downstream from the discharge.

Water quality at the first site was already affected by a high salinity due to saltwork effluents located upstream and by the confluence of two anthropised streams receiving urban and industrial effluents. A high temperature characterised waters of the Mirgenbach reservoir, as well as a concentration of dissolved salts by water evaporation and a chronic copper contamination due to the corrosion of the brass exchanger of the power plant's cooling system (Vinot and Pihan, 2005).

2.2. Animals and transplantation experiments

Mature specimens of *D. polymorpha* were handpicked in the Meuse River, at a little contaminated location (Commercy, northeastern France) in October 2000. Animals of varied sizes were collected to make available a sufficient monthly number of individuals in the size class 18–24 mm during the 2-year period. Animals were rapidly carried to the laboratory in the water of origin with continuous oxygen and daily food supply (algal suspension). They were placed in 45 L polypropylene cages, with four latticed faces (5 mm-mesh) and pieces of tiling were fixed inside the cages for the mussels to attach on. The cages were immersed (2–3 m depth) at the study sites, ballasted and fixed either at a buoy (in the Mirgenbach reservoir) or hung to an infrastructure or a tree of the shore (Moselle upstream and downstream sites). Because of strong mortality and emersion of some disposals after flood events, new transplantations were carried out at the end of May and at the beginning of September 2001, then at the end of March and September 2002. Thus, the successive transplantation periods lasted from 3 to 8 months.

Native organisms were handpicked directly from the Moselle river and the Mirgenbach shores.

At each experimental site, six to eight transplanted and native mussels were collected monthly and carried to the laboratory in the water of origin within 4 h of being collected.

2.3. Water sampling and analyses

Water pH, temperature, dissolved oxygen, conductivity and transparency were monitored monthly directly in the field.

Water was rapidly carried to the laboratory in 2 L polyethylene tanks and the following analyses were performed: after water acidification (1% HNO_3), cations were measured by flame AAS (Perkin-Elmer Aanalyst 100), with the exception of NH_4^+, which was analysed by graphite furnace AAS (Varian Spectra-300); anion concentrations were determined by ion exchange chromatography (Dionex).

The chemical oxygen demand and 5-day biochemical oxygen demand (COD and BOD_5) were evaluated by volumetric and oximetric methods, respectively, and suspended matter by gravimetric method.

Surface water samples were placed in opaque tanks (2 L) for analysis of chlorophyll a and phaeo-pigments using the Lorenzen spectrophotometric method (Lorenzen, 1967).

Cu and Zn were dosed by flame AAS or by graphite furnace AAS on filtered and acidified water (1% HNO_3) according to the standards FD T90-112 and NT T90-119.

2.4. Tissue preparation

The tissues of six to eight fresh excised digestive glands were prepared for histochemistry as described in Giambérini

and Cajaraville (2005). Gonads were fixed for 48 h in aqueous Bouin's fluid, then rinsed in water and embedded in paraffin after dehydration in an ascending ethanol–toluene series. Sections 7 μm thick were stained using Toluidine Blue Stain.

2.5. Histochemistry and stereology

The lysosomal system was located in the digestive cells by the histochemical revelation of β-glucuronidase demonstrated in unfixed cryostat sections according to Cajaraville et al. (1991) and adapted to freshwater organisms by Giamberini and Cajaraville (2005). Unsaturated neutral lipids were demonstrated by oil red O staining (Moore, 1988), and lipofuscin granules were stained by the Schmorl reaction (Pearse, 1972). The histochemical revelation of the peroxisomal catalase in unfixed cryostat sections was adapted from Cajaraville et al. (1993), as described in Guerlet et al. (2006).

Cellular biomarkers were quantified on digestive tissue sections by image analysis (Analysis pro 3.0, Olympus) using a Sony tri CCD colour video camera connected to an Olympus BX 41 microscope with a 100× objective. Morphological changes in the tissue sections of every mussel were evaluated on five random fields of view (total sampling area per specimen: 15,360 μm^2). Areas not belonging to digestive tissues (connective or gonad tissues) were discarded from the analysis. In the present study, one stereological parameter among the four usually used in cellular biomarker studies was calculated (Lowe et al., 1981). The only stereological parameter shown herein to simplify the dataset is the surface density of the lysosomal and peroxisomal system and of the digestive unsaturated neutral lipid and lipofuscin contents ($Sv_L = S_L/V_C$; $Sv_P = S_P/V_C$; $Sv_{NL} = S_{NL}/V_C$ and $Sv_{LF} = S_{LF}/V_C$) where C = digestive cell cytoplasm, L = lysosomes, P = peroxisomes, NL = neutral lipids, LF = lipofuscin, S = surface, V = volume. Indeed, most of the time, the lipofuscin granules and the neutral lipid droplets formed clusters in the digestive gland cells and were difficult to separate with image analysis. In this case, diameters were not used for the stereological analysis and only the neutral lipid and lipofuscin surface densities could be calculated.

2.6. Gonadal index

Gonad maturity was assessed by microscopic observation of the slides, through the determination of a mean gonadal index (Tourari, 1988; Tourari et al., 1988). Gonad maturation can be divided into six successive stages, three of them being common to both sexes: stage 0 (apparent sexual rest), stage Ia (gametogenesis initiation) and stage E (emission of the gametes). In addition, males were attributed the following stages: stage Ib (first steps of the spermatogenesis), stage II (spermatogenesis) and stage III (sexual maturity). Females were characterized by stage Ia(PrS) (pre-synthesis: oocyte growing phase), stage Ia(S) (synthesis: reserve synthesis and increasing oocytes) and stage Ia(PostS) (post-synthesis: sexual maturity). Each stage was matched with an arbitrary score from 0 to 5: 0 for stage 0, 1 for stage Ia, 2 for stages Ib and Ia(PrS), 3 for stages II and Ia(S), 4 for stage III and Ia(PostS) and 5 for stage E. Then the following ratio gave the gonadal index:

$$GI = \frac{\sum n_i s_i}{N} \quad (1)$$

where n_i is the number of individuals in each stage, s_i the score of the stage and N is the total number of individuals. Hence, GI was equal to 0 when all the individuals of the experimental group were in sexual rest and it reached 5 when all the individuals were in the spawning period.

2.7. Statistical analyses and data processing

For all statistical analysis, the significance level was set at $\alpha = 0.05$.

For each cellular biomarker in native and transplanted mussels, significant differences between monthly-paired means were determined between the three sites using the non-parametric U-test of Mann–Whitney, Wilcoxon. Significant inter-site differences between the mean stereological values calculated on the 26-month period were assessed by the Wilcoxon signed rank test for paired data.

Spearman's correlation coefficients were calculated to investigate statistical relationships among the five cellular and physiological biomarkers, chlorophyllous pigment concentrations and physico-chemical parameters (Statistica software version 5.5, Statsoft, USA).

In order to illustrate the data synthetically, Principal Component Analyses (PCAs) were carried out on the mean values of the five biomarkers in both mussel populations (ADE-4 Software; Thioulouse et al., 1997). As data matrix should not present missing values, months for which the three sites were not represented all together have been discarded from the analyses. Hence, the PCA on the five biomarkers in native zebra mussels was obtained on five descriptors (or biomarkers) and 45 objects (3 sites × 15 months instead of 25). The initial matrix for the PCA in transplanted *Dreissena* comprised five descriptors and 51 objects (3 sites × 17 months instead of 26).

3. Results

3.1. Water physicochemistry and trophic factors

Water parameters were monitored monthly. The profiles of physicochemical and trophic factors were rather similar in both river sites. According to the quality thresholds defined in the French System of Evaluation of waterways' Water Quality, 'SEQ-Eau v2' (MEDD and Agences de l'Eau, 2003), water quality on sites 1 and 3 was strongly affected by low transparency and high chloride levels (280 ± 71.7 and 281 ± 71.7 mg L^{-1} in sites 1 and 3, respectively, with less severe trends in late winter on both years and the highest concentrations being achieved in 2002). Nitrate and phosphorous matter levels were relatively high half of the time. The COD was moderate but reached high values on some months (especially on August and November 2001). A drop in oxygen concentrations characterised summer months. A phytoplankton bloom was recorded in the Moselle river in April 2002 and relatively high levels of chlorophyllous pigments

remained for the three following months; the sum of chlorophyll a and pheopigment concentrations reached 133.4 $\mu g\,L^{-1}$ in site 1, when the same parameter had a value of 4.9 $\mu g\,L^{-1}$ in April 2001, and a mean of 10.6 $\mu g\,L^{-1}$ during the first year. According to the measured parameters during the successive monthly campaigns, no noticeable degradation of water quality was evidenced in the third site with respect to the first one.

In comparison with both river sites, Mirgenbach reservoir's temperatures measured by periodic spot sampling were higher (with a mean monthly elevation of 3.9 °C) and the maximum mean daily temperature obtained by continuous monitoring of the reservoir's waters in 2002 was 26.7 °C in 18 June. The yearly thermal range of the reservoir (29.0%) was less broad than in both other sites (45.7 and 45.2%). Similarly, the coefficients of variation of dissolved oxygen, COD, chlorophyllous pigments, PO_4^{2-} and SiO_2 concentrations and of copper and zinc levels were lower in the reservoir than in the Moselle river (for instance, 40.7% at site 1 *versus* 15.3% at site 2 in 2001 for COD). In addition to the temperature increase, water quality at the second site was also affected by a mean of 1.4-fold increase of chloride levels due to the concentration of dissolved salts, resulting from water evaporation in the power plant cooling towers. Mirgenbach's waters displayed high dissolved copper concentrations (mean value of 42 $\mu g\,L^{-1}$ and 95th percentile of 58 $\mu g\,L^{-1}$ over the 26-month period), about 10-fold higher than those monitored in the river (4.4 and 4.5 $\mu g\,L^{-1}$ at sites 1 and 3 respectively). Copper levels in the reservoir were thus considerably higher than the quality thresholds defined in the 'SEQ-Eau v2' for running waters (worst class for [total Cu] > 15 $\mu g\,L^{-1}$, when $50 < [CaCO_3] < 200\ mg\,L^{-1}$) and than the United Kingdom Environmental Quality Standards (UK EQS) for fishlife (annual average dissolved Cu > 10 $\mu g\,L^{-1}$ and 95th percentile>40 $\mu g\,L^{-1}$, when $100 < [CaCO_3] < 200\ mg\,L^{-1}$) (Environmental Agency United Kingdom, 2002; MEDD and Agences de l'Eau, 2003). In contrast, the river was not identified as a problem area towards dissolved copper according to the UK EQS.

3.2. Cellular and physiological biomarkers

Native (Table 1) and transplanted zebra mussels (Table 2) were collected monthly for the determination of four cellular (Sv_L, Sv_{LF}, Sv_{NL}, Sv_P) and one physiological marker (GI). Empty spaces in the tables reflect varied sampling problems encountered in the field during the experiment, including flood events and/or high water levels, emersion of the cages and mortality.

3.2.1. Cellular biomarkers

Apart from unsaturated neutral lipid variations, no well-defined seasonal trends were observed in the cellular biomarker responses in a systematic way from 1 year to another in native (Table 1) or transplanted (Table 2) organisms. Indeed, Sv_{NL} displayed increasing values in late winter and the maximum was reached during the spring, with very high values in the second year, during the phytoplanctonic bloom mentioned earlier. Generally, the digestive contents of neutral lipids dropped during the last steps of gametogenesis and the spawning period (when GI values were comprised between 3 and 5).

When comparing the sites' mean Sv values calculated for the whole 26-month period, lysosomal Sv_L was significantly higher in the mussels from the reservoir with respect to those from both river sites in native and transplanted *Dreissena*. In the latter, average Sv_L was also significantly higher in mussels from downstream site than in upstream mussels. Though not significantly different, the mean lipofucin contents tended to be the highest in mussels from the reservoir, whereas the unsaturated neutral lipid contents tended to be the lowest in organisms from the same site. The reservoir mussels' mean Svp values were superior to those calculated in the native mussels from the first site and in the population transplanted at site 3, respectively.

These findings were confirmed by the frequencies of significant differences of the surface densities in organisms from sites 2 and 3 with respect to mussels from upstream relative-reference site during the 2-year period (last 3 lines of Tables 1 and 2). For instance, 55% of the time, lysosomal Sv was significantly higher in mussels transplanted to the reservoir than in mussels deployed at site 1, and no difference occurred the rest of the time (Table 2). The same trends were usually found in native and transplanted organisms, as well as in mussels from the second and the third sites, but they were more pronounced in organisms from the reservoir. When significant differences occurred, they showed more frequently higher lysosomal and lower lipid Sv in mussels from the sites 2 and 3 than in those from the first site and, less markedly, greater lipofuscin accumulation.

The observed trends concerning lysosomal Sv tended to be more pronounced in transplanted than in native mussels, whereas the frequencies of higher lipofuscin Sv (Table 1, >site 1) and lower unsaturated neutral lipid Sv (Table 1, <site 1) in native *Dreissena* tended to be superior to those found in transplanted mussels (Table 2). Trends on peroxisomal Sv were the less obvious than for the other biomarkers, showing significantly higher means in native mussels from site 3 only once (hence 5.9% of the time), and in transplanted mussels from the reservoir 25% of the time. The inverse trend was found in *Dreissena* deployed at site 3, and no major tendancy was evidenced in native mussels from the reservoir.

3.2.2. Gonadal index

Briefly, both native and transplanted mussels from the reservoir displayed lower mean GI values and higher coefficients of variation over the 2-year period than those from the river sites (Tables 1 and 2). Sexual maturity was usually achieved later in transplanted than in native mussels from both river sites (with values ≥4.0 occurring 1 month later in the deployed organisms, excepted at downstream site in 2001).

3.3. PCAs

PCAs conducted on the five biomarkers showed that the main trends were rather similar in native (Fig. 1) and transplanted *Dreissena* (Fig. 2), but they were more contrasted in transplanted ones. On the correlation circle defined by the five biomarkers

Table 1
Monthly cellular and physiological biomarker values in native *D. polymorpha* (mean ± S.D.)

	Sv_L ($\times 10^{-3}$ µm^2 µm^{-3})			Sv_{LF} ($\times 10^{-4}$ µm^2 µm^{-3})			Sv_{NL} ($\times 10^{-3}$ µm^2 µm^{-3})			Sv_P ($\times 10^{-5}$ µm^2 µm^{-3})			GI		
	Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3
November 2000					4.5 ± 0.6			1.3 ± 0.4			6.1 ± 1.8			0.4	
December 2000		3.1 ± 1.1			2.2 ± 0.6			0.4 ± 0.2			6.3 ± 1.4			0.7	
January 2001		2.9 ± 0.6			3.6 ± 0.9			1.4 ± 0.5			7.5 ± 0.8			0.4	
February 2001	2.0 ± 0.7	3.8 ± 0.8	2.0 ± 0.6	4.3 ± 0.7	5.1 ± 0.7	4.2 ± 0.6	5.3 ± 1.9	2.0 ± 0.5	6.5 ± 1.8	6.2 ± 1.3	6.8 ± 0.6	5.8 ± 1.1	2.5	0.4	2.5
March 2001		2.2 ± 0.7			5.4 ± 1.2			2.5 ± 1.2			6.8 ± 1.3			0.9	
April 2001	0.6 ± 0.4	3.1 ± 1.2		4.2 ± 0.6	4.5 ± 0.6		8.3 ± 1.2	4.9 ± 1.0		6.3 ± 0.9	6.4 ± 1.2		3.0	1.4	
May 2001	3.3 ± 1.6	4.8 ± 1.4	2.1 ± 1.0	2.6 ± 1.1	3.4 ± 2.0	4.4 ± 2.8	7.2 ± 5.3	6.4 ± 7.0	9.3 ± 4.4	6.1 ± 2.1	7.3 ± 1.7	5.8 ± 2.2	3.4	2.1	3.6
June 2001	3.6 ± 1.4	6.7 ± 1.6	3.4 ± 1.0	4.4 ± 1.3	5.1 ± 3.2	4.4 ± 2.6	2.6 ± 2.1	1.1 ± 0.8	3.3 ± 2.5	6.0 ± 2.2	7.3 ± 1.6	6.3 ± 1.4	4.5	4.3	5.0
July 2001	3.9 ± 1.0	3.6 ± 0.9	4.2 ± 1.1	4.0 ± 1.8	5.4 ± 1.1	4.9 ± 2.7	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.2	0.2 ± 0.1	5.6 ± 1.1	6.6 ± 1.7	5.9 ± 1.1	5.0	4.0	5.0
August 2001	2.3 ± 0.7	3.2 ± 0.8	3.1 ± 0.5	5.4 ± 2.2	3.3 ± 1.5	4.7 ± 2.1	0.8 ± 0.4	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.2	6.0 ± 0.9	6.4 ± 1.0	6.0 ± 1.1	1.4	4.3	3.6
September 2001	3.4 ± 1.2	3.6 ± 0.9	3.4 ± 0.9	2.8 ± 0.9	2.6 ± 1.4	4.7 ± 2.1	0.2 ± 0.1	22.2 ± 21.1	0.2 ± 0.2	2.7 ± 1.4	2.9 ± 1.1	3.8 ± 3.6	0.6	2.8	2.1
October 2001	1.8 ± 0.4	3.7 ± 1.0	2.7 ± 1.2	1.1 ± 0.4	1.3 ± 0.8	1.1 ± 0.5	0.4 ± 0.3	10.8 ± 7.4	0.3 ± 0.3	1.4 ± 0.2	2.5 ± 1.1	2.7 ± 1.2	0.7	0.7	1.8
November 2001	2.3 ± 0.9	2.8 ± 1.3	4.3 ± 0.7	1.2 ± 0.6	1.7 ± 0.9	1.5 ± 0.3	0.3 ± 0.2	0.6 ± 0.6	0.2 ± 0.1	2.1 ± 1.5	1.3 ± 0.4	3.1 ± 1.9	0.9	1.6	0.8
December 2001	4.5 ± 1.7	2.9 ± 0.9		0.9 ± 0.5	1.4 ± 0.9		0.9 ± 0.7	3.5 ± 5.2		1.7 ± 0.3	1.8 ± 0.5		0.8		
January 2002	3.3 ± 0.4	4.1 ± 1.6	3.9 ± 1.5	0.7 ± 0.3	1.3 ± 0.4	0.7 ± 0.1	2.7 ± 1.9	0.6 ± 0.4	1.2 ± 1.0	1.5 ± 0.4	1.6 ± 0.6	1.5 ± 0.3	1.4	0.3	1.6
February 2002	4.7 ± 1.6	6.1 ± 2.0	4.2 ± 1.3	0.8 ± 0.3	1.0 ± 0.1	0.6 ± 0.2	5.6 ± 5.7	0.2 ± 0.1	5.6 ± 4.7	1.2 ± 0.2	1.5 ± 0.4	1.7 ± 0.3	2.1	0.9	2.0
March 2002	6.1 ± 1.7	6.8 ± 2.2		0.7 ± 0.2	0.5 ± 0.3		2.7 ± 3.4	3.2 ± 3.8		1.3 ± 0.1	1.6 ± 0.5		1.6	0.4	
April 2002	3.1 ± 1.0	3.2 ± 1.4	1.6 ± 0.5	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.4	0.8 ± 0.2	40.2 ± 13.3	1.0 ± 1.5	41.1 ± 30.9	1.5 ± 0.5	1.6 ± 0.3	4.9 ± 3.4	3.0	1.3	2.3
May 2002	1.4 ± 0.5	5.8 ± 2.5	2.5 ± 1.0	3.0 ± 1.4	6.3 ± 3.0	1.2 ± 0.6	111.2 ± 10.0	1.0 ± 0.8	120.1 ± 16.3	2.6 ± 1.0	2.3 ± 0.8	2.1 ± 0.9	4.5	1.0	4.4
June 2002	2.4 ± 1.0	5.0 ± 1.8	1.4 ± 0.6	1.6 ± 0.9	4.4 ± 1.9	2.5 ± 1.0	37.6 ± 44.0	0.2 ± 0.2	73.7 ± 47.3	2.3 ± 1.0	2.2 ± 1.0	2.0 ± 0.7	4.0	1.0	4.4
July 2002	1.3 ± 0.5	1.6 ± 0.4	1.9 ± 0.4	7.1 ± 2.6	3.8 ± 1.2	5.0 ± 1.9	45.6 ± 33.0	7.0 ± 18.3	28.0 ± 32.2	3.3 ± 2.1	12.4 ± 12.3	6.2 ± 6.8	5.0	3.0	4.9
August 2002	3.4 ± 0.7		4.4 ± 1.7	2.8 ± 1.3		4.6 ± 1.4	0.4 ± 0.2		0.9 ± 0.8	4.9 ± 2.5		4.2 ± 1.0	3.1		5.0
September 2002	4.1 ± 1.3		4.1 ± 2.0	1.9 ± 1.2		3.1 ± 1.1	0.4 ± 0.3		0.3 ± 0.1	1.7 ± 0.8		1.5 ± 0.3	1.9		0.6
October 2002	1.9 ± 0.7	4.1 ± 1.3	1.6 ± 0.7	2.5 ± 1.1	2.7 ± 0.9	1.0 ± 0.4	0.9 ± 1.3	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.2	3.4 ± 2.1	1.3 ± 0.4	1.5 ± 0.3	0.7	4.4	0.0
November 2002	4.2 ± 1.6			3.2 ± 2.1			0.4 ± 0.2			1.7 ± 0.5			0.4		
December 2002	3.6 ± 1.5			3.0 ± 1.5			2.0 ± 4.8			1.5 ± 0.3			1.0		
Mean	3.1[2]	4.0[1,3]	3.0[2]	2.7	3.2	2.9	12.6	3.3	17.2	3.2[2]	4.1[1]	3.8	2.4	1.7[3]	2.9[2]
CV (%)	42.5	35.9	36.3	64.3	55.7	61.0	206.9	157.2	192.9	60.7	67.9	50.1	65.5	84.5	57.8
Frequency of Sv changes (%)															
<Site 1	–	0.0	5.9	–	5.5	11.7	–	55.6	23.5	–	5.6	0.0			
=Site 1	–	61.1	70.6	–	77.8	70.6	–	33.3	76.5	–	88.8	94.1			
>Site 1	–	38.9	23.5	–	16.7	17.7	–	11.1	0.0	–	5.6	5.9			

Superscript figures (1, 2, and 3) indicate significant inter-site differences of mean Sv values over the whole sampling period (Wilcoxon signed-rank test for paired data, $P \leq 0.05$). Surface density (Sv). Neutral lipid (NL) and lipofuscin (LF) contents. Lysosomal (L) and peroxisomal (P) systems. Gonadal index (GI).

Table 2
Monthly cellular and physiological biomarker values in transplanted *D. polymorpha* (mean ± S.D.)

	Sv_L (10^{-3} µm².µm⁻³)			Sv_{LF} (10^{-4} µm².µm⁻³)			Sv_{NL} (10^{-3} µm².µm⁻³)			Sv_P (10^{-3} µm².µm⁻³)			GI		
Site	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
November 2000	1.8 ± 0.3	1.4 ± 0.4	2.1 ± 0.8	4.5 ± 1.3	4.6 ± 0.7	4.7 ± 1.0	1.2 ± 0.5	0.7 ± 0.3	1.3 ± 0.4	4.0 ± 1.1	5.1 ± 1.2	3.5 ± 0.8	0.4	0.9	1.3
December 2000	1.0 ± 0.3	2.3 ± 0.5	1.5 ± 0.4	1.6 ± 0.3	2.0 ± 0.5	1.7 ± 0.5	0.5 ± 0.3	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.2	6.3 ± 1.1	8.2 ± 2.5	6.2 ± 1.1	1.0	0.3	1.3
January 2001	1.1 ± 0.5	3.0 ± 0.9	1.8 ± 0.6	2.5 ± 0.4	3.3 ± 0.5	2.8 ± 0.4	3.6 ± 1.2	2.2 ± 0.4	3.6 ± 1.1	7.4 ± 1.1	10.8 ± 2.0	8.3 ± 2.2	1.3	0.7	1.2
February 2001	2.3 ± 0.6	5.8 ± 1.3	2.3 ± 1.0	3.5 ± 0.6	4.8 ± 0.8	4.1 ± 0.6	4.5 ± 0.8	2.8 ± 1.2	4.6 ± 0.8	7.8 ± 1.3	10.5 ± 1.5	7.5 ± 1.2	1.7	0.3	2.2
March 2001		1.6 ± 0.4			5.1 ± 1.0			3.4 ± 1.1			9.9 ± 1.5		2.3	0.7	2.6
April 2001	3.0 ± 1.2	2.8 ± 1.0	2.1 ± 1.3	3.9 ± 0.4	4.3 ± 0.6	4.2 ± 0.3	5.5 ± 1.4	4.1 ± 1.0	5.4 ± 1.7	8.6 ± 1.3	11.3 ± 1.4	8.8 ± 1.7	2.1	1.3	3.0
May 2001	3.4 ± 1.6	3.0 ± 0.7	2.7 ± 1.0	1.9 ± 0.8	1.9 ± 1.2	3.6 ± 1.8	3.3 ± 0.8		2.0 ± 1.7	8.1 ± 1.5	10.7 ± 1.5	8.4 ± 1.3	2.5	3.0	1.9
June 2001	2.7 ± 0.8	3.0 ± 0.7	5.7 ± 2.1	2.5 ± 1.2	1.9 ± 1.0	2.0 ± 0.9	0.6 ± 0.3	0.7 ± 0.4	1.0 ± 0.4	7.7 ± 1.3	10.5 ± 1.5	9.0 ± 1.2	3.7	3.3	4.3
July 2001	3.0 ± 0.8	5.8 ± 1.6	3.8 ± 0.7	2.3 ± 1.1	1.9 ± 1.0	2.0 ± 1.1	0.7 ± 0.8	0.5 ± 0.5	0.5 ± 0.4	3.0 ± 1.0	3.1 ± 0.7	2.8 ± 0.4	4.2	2.9	5.0
August 2001		2.7 ± 0.5	2.6 ± 1.1		1.8 ± 0.9	2.3 ± 0.6		0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.2		3.4 ± 1.1	3.0 ± 0.7	5.0	2.9	3.1
September 2001	3.1 ± 0.8	4.4 ± 1.0	3.4 ± 1.3	2.1 ± 1.1	1.9 ± 1.1	2.1 ± 1.5	0.3 ± 0.2	5.2 ± 3.5	0.2 ± 0.1	4.0 ± 1.3	2.1 ± 0.7	2.3 ± 0.8	5.0	0.8	0.7
October 2001	2.0 ± 0.6	2.6 ± 0.6	2.0 ± 0.7	0.7 ± 0.2	1.0 ± 0.3	1.1 ± 0.4	8.2 ± 10.0	1.9 ± 0.9	0.3 ± 0.1	2.7 ± 0.7	3.3 ± 1.1	2.3 ± 1.0	1.7	0.1	3.0
November 2001	2.3 ± 0.5	4.6 ± 0.9	2.7 ± 0.6	1.1 ± 0.5	1.2 ± 0.6	0.7 ± 0.2	0.1 ± 0.1	2.1 ± 1.6	0.1 ± 0.1	3.5 ± 1.5	1.2 ± 0.1	2.8 ± 1.9	1.1	0.3	0.8
December 2001	3.2 ± 0.7	4.9 ± 1.2	3.6 ± 0.8	0.8 ± 0.3	1.0 ± 0.5	1.1 ± 0.6	0.3 ± 0.2	0.7 ± 0.7	0.3 ± 0.1	1.4 ± 0.5	1.9 ± 0.4	1.7 ± 0.4	1.0	0.1	0.6
January 2002	2.4 ± 1.8	5.3 ± 4.2		2.2 ± 0.7	1.5 ± 0.7		0.3 ± 0.1	4.5 ± 7.4		2.7 ± 0.7	2.1 ± 0.5		1.1	0.0	
February 2002															
March 2002															
April 2002															
May 2002	2.4 ± 0.6	6.4 ± 2.3	2.4 ± 1.4	2.0 ± 0.6	2.6 ± 1.6	2.0 ± 0.3	83.6 ± 34.5	6.2 ± 3.5	113.2± 15.3	2.1 ± 0.6	1.6 ± 0.3	1.7 ± 0.1	3.6	1.7	2.6
June 2002	1.1 ± 0.3	3.3 ± 0.7	2.7 ± 0.8	3.2 ± 1.2	3.4 ± 1.0	2.6 ± 1.0	49.4 ± 38.1	2.5 ± 3.2	40.8 ± 29.0	4.0 ± 0.3	2.1 ± 0.6	2.6 ± 0.9	4.5	3.6	4.6
July 2002	2.1 ± 0.7	4.2 ± 3.3	1.1 ± 0.4	4.4 ± 2.1	3.6 ± 1.3	3.8 ± 1.0	0.3 ± 0.3	1.3 ± 2.0	4.6 ± 12.4	2.8 ± 1.6	6.4 ± 5.9	2.3 ± 1.9	5.0	5.0	3.6
August 2002	2.1 ± 0.6	4.2 ± 1.1	2.8 ± 0.7	3.4 ± 1.4	1.5 ± 0.7	3.2 ± 2.1	0.9 ± 0.5	1.0 ± 0.8	0.5 ± 0.2	2.6 ± 0.9	1.6 ± 0.2	4.3 ± 3.3	3.8	0.7	3.1
September 2002	1.6 ± 0.3	3.9 ± 1.5	2.8 ± 0.9	2.0 ± 0.8	2.3 ± 0.7	2.5 ± 0.4	0.4 ± 0.1	5.4 ± 5.8	0.5 ± 0.2	2.1 ± 0.6	3.0 ± 1.7	1.9 ± 1.1	0.6	1.0	1.9
October 2002	2.2 ± 1.0	4.4 ± 1.5	2.2 ± 1.3	2.2 ± 1.1	2.1 ± 0.6	4.4 ± 1.8	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.3	0.3 ± 0.1	1.5 ± 0.4	1.3 ± 0.1	1.8 ± 0.8	0.0	1.5	0.0
November 2002	3.5 ± 1.5	3.4 ± 1.6		2.7 ± 0.8	4.5 ± 3.7		16.0 ± 24.1	11.7 ± 6.6		1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.4		1.6	0.0	
December 2002	3.2 ± 1.8		5.5 ± 1.4	1.3 ± 0.3		1.9 ± 0.7	6.6 ± 12.5		16.9 ± 23.0	1.3 ± 0.1		1.5 ± 0.4	1.3		1.5
Mean	2.4 [2,3]	3.8 [1,3]	2.8 [1,2]	2.4	2.6	2.6	8.9	2.7	9.8	4.0	5.1 [3]	4.1 [2]	2.4 [2]	1.4 [1,3]	2.3 [2]
CV (%)	32.4	34.0	42.6	41.6	48.4	42.0	233.2	102.0	271.4	63.7	78.5	67.8	67.2	101.6	61.1
Frequency of significant Sv changes (%)															
< site 1	-	0.0	5.3	-	5.0	5.3	-	31.6	10.5	-	15.0	10.5			
= site 1	-	45.0	57.9	-	80.0	84.3	-	52.6	84.2	-	60.0	89.5			
> site 1	-	55.0	36.8	-	15.0	10.5	-	15.8	5.3	-	25.0	0.0			

Dotted lines separate cohorts from successive transplantations. Superscript figures (1, 2, and 3) indicate significant inter-site differences of mean Sv values over the whole sampling period (Wilcoxon signed-rank test for paired data, $P \leq 0.05$). Surface density (Sv). Neutral lipid (NL) and lipofuscin (LF) contents. Lysosomal (L) and peroxisomal (P) systems. Gonadal index (GI).

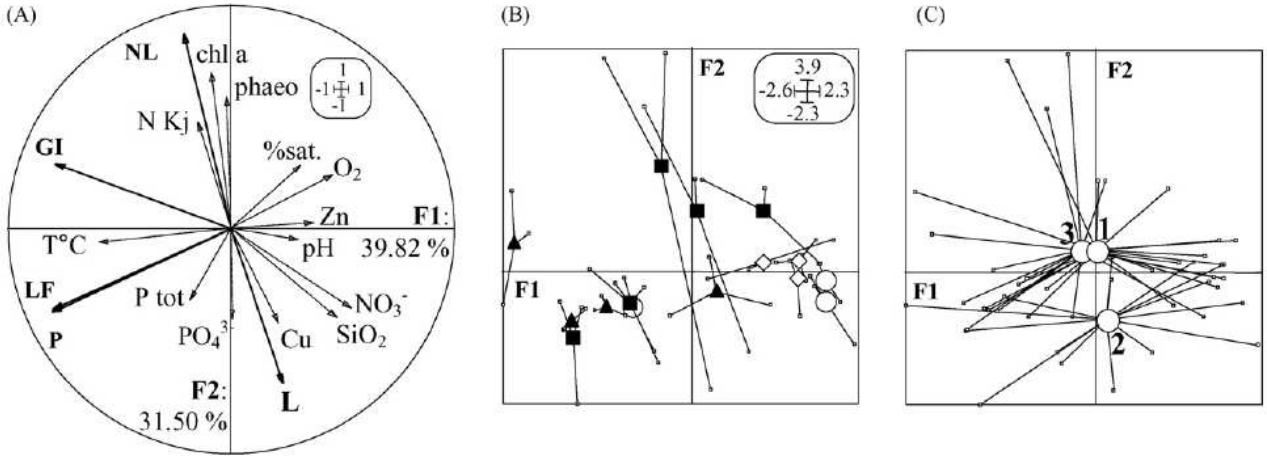


Fig. 1. Results of the PCA of the two dominant components defined by the five cellular and physiological biomarkers in native *D. polymorpha* (71.32% of the total variance). (A) Correlation circle defined by the five biomarkers (in bold); physicochemical and trophic parameters are projected as supplementary variables. (B and C) Factorial planes 1–2 of the sampling units: (B) variability of scores among dates [(◊) autumn months, (○) winter months, (■) spring months and (▲) summer months]; (C) variability of scores among sites.

in deployed zebra mussels (Fig. 2A), the F2 axis seemed to recall the hierarchy of the markers in the biological organization: from the subcellular level for lysosomes and peroxisomes (positive loadings on Factor 2) to a higher metabolic level represented by the lipid energy stocks and the reproductive stage (negative loadings on Factor 2). When considering the factorial plane F1–F2, the F1 axis seemed to be mainly defined by the seasons (Fig. 2B), with autumn and summer months mainly displaying positive loads on F1 and more spring and winter months with negative loads. Regarding the position of the sites' centres of gravity, the F2 axis seemed to correspond to the presumed stress gradient (Fig. 2C), with a discrimination between both river sites on one hand and the reservoir on the other, suggesting better conditions for energetic and reproductive metabolism in mussels from the river (positive coordinates on the F2 axis), and a higher activation of sub-cellular defence mechanisms in mussels from the Mirgenbach reservoir (negative loadings on the F2 axis).

Physico-chemical parameters were projected as supplementary variables, which did not contribute to the definition of the principal components but which coordinates in the plane F1–F2 were calculated for comparison with those from the five biomarkers. Hence, trophic factors such as chloropigments had coordinates on the F2 axis similar to those of energetic and reproductive factors (NL and GI), whereas copper and conductivity had analogous loadings on both axes of the lysosomal system (L).

Table 3 summarizes the results of both PCA conducted on native and transplanted mussels. The respective contributions of the temporal and spatial effects on the total variability show that the temporal effect contribution ranged from 62 to 70% of the total variability whereas the spatial effect only contributed to 9 and 8% of the variability in transplanted and native organisms respectively. This spatial effect was nonetheless highly significant in transplanted zebra mussels ($P = 0.009$), whereas it was only close from significant in native ones ($P = 0.073$).

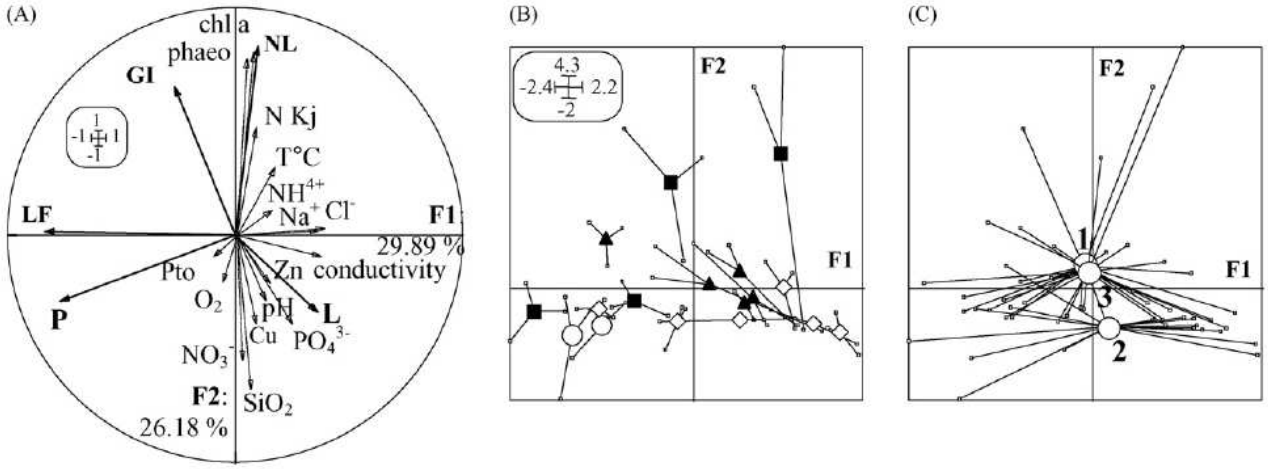


Fig. 2. Results of the PCA of the two dominant components defined by the five cellular and physiological biomarkers in transplanted *D. polymorpha* (56.06% of the total variance). (A) Correlation circle defined by the five biomarkers (in bold); physicochemical and trophic parameters are projected as supplementary variables. (B and C) Factorial plane 1–2 of the sampling units: (B) variability of scores among dates [(◊) autumn months, (○) winter months, (■) spring months and (▲) summer months]; (C) variability of scores among sites.

Table 3
Summary of the Principal Component Analyses conducted in native and transplanted mussels

	Native	Transplanted
Months entering the analysis (common to the three sites)	15/25	17/26
% Explained variability (F1–F2)	71.3	56.1
Contribution to the total variability and significance of both effects		
Temporal effect	62.7% ($P=0.000$)	70.3% ($P=0.000$)
Spatial effect	8.1% ($P=0.073$)	9.3% ($P=0.009$)

3.4. Relationships among biological and physico-chemical parameters

Spearman's correlation coefficients r_S calculated among biological and physico-chemical parameters in native and transplanted mussels are reported in Table 4. Common points were found in both populations with systematic positive correlations between unsaturated neutral lipid Sv, chlorophyll a concentrations and oxygen saturation, and negative correlations between Sv_{NL} and phosphate ions. In both native and transplanted zebra mussels, lipofuscin and peroxisomal Sv correlated positively together. Lysosomal Sv displayed positive r_S with copper concentrations and the pH. The gonadal indexes correlated positively with the temperature and chlorophyll a concentrations and negatively with silica, nitrate and zinc.

Some correlations found in this study were specific to each population. For instance, lysosomal Sv correlated positively with conductivity, temperature, sodium and chloride ions in transplanted mussels (Table 4), whereas it correlated negatively with total Kjeldhal nitrogen and phaeo-pigments in native ones (Table 4). Gonadal index correlated negatively with copper only in transplanted mussels (Table 4).

4. Discussion

The three main objectives of this field study were to assess: (i) the relevance of a cellular biomarker suite to highlight a stress gradient in the freshwater mussel *D. polymorpha*, (ii) the influence of the seasonal factors on these biological responses and (iii) the advantages and restrictions associated with the implementation of this set of cellular biomarkers in this species through passive and active biomonitoring.

4.1. Individual analysis of the five biomarkers

In the present study, data were available at intervals of relatively reduced time during two consecutive years in a given population and at the same location, and no standard seasonal profile emerged from these investigations. The definition of a seasonal basal level of each biomarker is thus impossible, even for a precise location. In the case of an environmental diagnosis including the implementation of this suite of biomarkers in *D. polymorpha*, this confirms the peremptory necessity to compare the values measured in mussels from the various study sites with those obtained in individuals from sites of relative refer-

Table 4
Spearman's correlation coefficients among stereological and 17 physico-chemical and trophic parameters in native ($n=45$; 15 months) and transplanted ($n=51$; 17 months) mussels

	Zn	Cu	SiO_2	Na^+	Cl^-	Ptot	PO_4^{3-}	N Kj	NO_3^-	NH_4	Phaeo	Chl *a*	pH	Cond	Sat%	O_2	T°C	GI	Svp	Sv_L	Sv_{LF}
Native mussels																					
Sv_{NL}	−0.06	−0.05	−0.33*	−0.16	−0.09	−0.46**	−0.56**	0.31*	−0.23	−0.22	0.48**	0.64**	0.21	−0.20	0.35*	0.25	−0.03	0.44**	0.09	−0.39**	−0.06
Sv_{LF}	−0.27	−0.08	−0.24	0.33*	0.26	0.27	0.23	−0.08	−0.30*	0.04	−0.12	0.09	−0.30*	0.20	−0.40**	−0.58**	0.59**	0.39**	0.71**	0.04	
Sv_L	0.03	0.33*	0.30*	0.00	0.10	0.03	0.17	−0.46***	0.48*	−0.06	−0.48**	−0.21	0.32*	0.18	0.11	0.13	0.00	−0.16	−0.04		
Svp	−0.46**	−0.12	−0.23	0.06	−0.00	0.18	0.08	−0.12	−0.21	−0.10	−0.10	0.11	−0.15	−0.03	−0.28	−0.42**	0.41**	0.39**			
GI	−0.34*	−0.29	−0.54**	0.17	0.23	−0.01	−0.19	0.00	−0.52**	−0.14	0.26	0.45**	−0.22	0.07	−0.08	−0.29	0.53**				
Transplanted mussels																					
Sv_{NL}	−0.00	0.05	−0.12	−0.17	−0.02	−0.25	−0.32*	0.14	−0.03	−0.45**	0.19	0.52*	0.31*	−0.09	0.42**	0.24	0.08	0.25	0.19	−0.03	0.33*
Sv_{LF}	−0.01	0.02	−0.17	−0.09	−0.21	0.08	−0.13	0.10	−0.15	−0.13	0.05	0.16	−0.07	−0.17	−0.03	−0.03	0.01	0.21	0.39**	−0.20	
Sv_L	−0.05	0.31*	0.17	0.37**	0.41**	0.05	0.32	−0.24	0.14	−0.11	−0.27	0.02	0.35*	0.44**	0.15	−0.02	0.32*	−0.01	−0.19		
Svp	−0.25	−0.18	0.11	−0.47**	−0.43**	−0.10	−0.19	−0.44*	0.25	−0.29*	−0.40**	−0.10	0.06	−0.36**	0.15	0.22	−0.26	0.19			
GI	−0.42**	−0.38**	−0.57**	0.02	−0.00	−0.15	−0.25	0.18	−0.54**	0.20	0.22	0.31*	−0.41**	−0.11	−0.33*	−0.40**	0.44**				

Surface density (Sv), Neutral lipid (NL) and lipofuscin (LF) contents. Lysosomal (L) and peroxisomal (P) systems. Gonadal index (GI). * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$.

ence. Factors that are likely to influence seasonal fluctuations of biomarkers are extremely numerous, the causal relationship between a single factor and the variations of a biomarker may be relatively complex, and synergetic or antagonistic interactions between several factors are highly probable. Attempting to elucidate all these complex influences and interactions in the field would thus be an unrealistic challenge.

Nonetheless, the examination of one of the four cellular biomarker seasonal variations individually and the comparison between years 2001 and 2002, allows a better comprehension of the influence of some environmental factors on this endpoint. Namely, the systematic correlation between chlorophyll concentrations and unsaturated neutral lipid digestive contents, as well as the concordance between the phytoplanctonic bloom and the maximal values of Sv_{NL} in mussels from the Moselle river during the spring 2002, seem to indicate the major influence of food availability on this lipid class in the digestive tissues. This is in agreement with a seasonal study of *Dreissena*'s lipid composition at two sites of Lake Saint Clair (Great Lakes system, North America) showing the same patterns of seasonal variation, and, in particular, higher maximum triacylglycerol levels at the station with the highest spring chlorophyll concentration and the lowest mussel densities (Nalepa et al., 1993). Additionally, as already mentioned in German populations of *D. polymorpha* (Sprung, 1995), a mobilisation of the unsaturated neutral lipid stocks from the digestive gland to the gonad during gamete maturation is likely to occur, since decreasing Sv_{NL} values usually preceded spawning in both zebra mussel populations during the 2 years.

As the background knowledge of these cellular and physiological responses to pollution and environmental stressors is far less accurate in the field of freshwater ecotoxicology than in marine molluscs, a brief examination of individual biomarker responses to the presumed pollution gradient is necessary here, before taking into account the suite of biomarkers as a whole by the use of multivariate analysis.

Although non-systematic, the most frequent inter-site differences in the lysosomal system response consisted of higher surface densities in the reservoir's mussels. This was in agreement with the results of physico-chemical analyses, showing a deterioration of water quality in the Mirgenbach reservoir with respect to the upstream site. Indeed, lysosomal enlargement is described as a general stress response in marine and freshwater molluscs (Giambérini and Cajaraville, 2005; Guerlet et al., 2006). Though statistical correlations do not imply systematic causal relationship, the positive correlation between lysosomal Sv and both copper concentrations and water conductivity, as well as the proximity of the loadings of these three factors on the correlation circle of the PCA of transplanted mussels may be related to the involvement of lysosomes in, respectively, metal sequestration and detoxication (Viarengo et al., 1987; Regoli, 1992; Etxeberria et al., 1994) and osmoregulation, through the generation of free amino acids by lysosome-mediated proteolysis (Moore et al., 1980; Moore, 1982; Deaton, 1987).

Digestive unsaturated neutral lipid accumulation associated with enhanced lysosomal autophagy is usually described, and would result from a lipidosis probably induced by organic contaminants (Moore, 1988). In contrast, in the present study, minimal monthly Sv_{NL} values were more frequently measured in the mussels sampled from the most impacted site. Similar results have been reported in marine mussels transplanted to a heavy metal-contaminated location (Regoli, 1992) or to the vicinity of a copper mine (Zorita et al., 2006) and in freshwater snails exposed to pulp and paper mill effluents (Guerlet et al., 2006). They may be due to a relocation of energy from lipid reserves towards defence mechanisms. In *D. polymorpha*, a negative lipid budget was evidenced as of 3 days of exposure downstream from two effluent discharges and preceded effects at a physiological and then at the organismal levels (Smolders et al., 2004). These findings support the hypothesis that the neutral lipid depletion shown in the present study may have revealed an increasing metabolic costs at high temperatures (Stoeckmann and Garton, 2002) and an impaired health status of the zebra mussels collected from the Mirgenbach reservoir. A quantitative and/or qualitative alteration of ingested food may also have influenced the digestive neutral lipid depletions, as an indirect toxic effect.

Inter-site differences of digestive lipofuscin accumulation were more often highlighted in the native than in the transplanted mussels. Oxidative stress is considered one of the main factors responsible for pathological accumulation of lipofuscin in molluscan digestive cells. In the native mussels, significant correlation of lipofuscin Sv and temperature could possibly relate to a higher oxygen consumption and mitochondrial oxyradical production resulting from thermal stress (Abele et al., 2002). Furthermore, positive correlation between Sv_{LF} and GI could be due to enhanced lipoperoxidation processes during gametogenesis. Indeed, maximal lipid peroxidation was evidenced in scallops (*Mizuhopecten yessoensis*) before spawning (Lukyanova and Khotimchenko, 1995).

When significant inter-site differences were found, a higher occurrence of increased peroxisomal surface density between the first river site and the reservoir was found in transplanted mussels only. All Sv_P values were nonetheless considerably lower than those found in *D. polymorpha* in other studies (unpublished results) and these findings, along with relatively low amounts of lipofuscin, suggest that oxidative stress was not pronounced in the studied area during these 2 years.

Differences of the gonadal index profiles in mussels from the river compared to those from the reservoir seem to result from more stressful environmental conditions for the latter. These findings were consistent with the results of several years' monitoring in the same sites (Giambérini, unpublished results), showing later sexual maturity in Mirgenbach's mussels but advanced gonadal maturity in female and lower mean GI values, which suggests a desynchronisation of their sexual cycle. In *D. polymorpha*, the activation of several temperature-dependent processes accounting for synchronized and successful reproduction would occur in the range of 10–12 °C (Neumann et al., 1993). During the presently reported study over a 26-month period, water temperatures below 12 °C were only monitored four times during isolated months in the reservoir, whereas they

appeared continuously under this threshold in both river sites from November to April. Zorita et al. (2006) reported accelerated spawning in female mussels exposed to a copper gradient for 3 weeks, which was attributed to possible acute toxicity or an effect on gamete development-hormonal regulation. Thus, both reduced yearly thermal range of the water and copper contamination may have contributed to an impaired reproduction of the zebra mussels inhabiting the reservoir.

4.2. Site discrimination by the suite of biomarkers

In the present report, the individual responses of most of the cellular and physiological biomarkers suggested an alteration of the health status of both native and transplanted zebra mussels along the stress gradient and especially in the reservoir. Nonetheless, the seasonal variations of the cellular biomarkers prevented a correct assessment of the gradient of stress on certain months, contrary to other findings on a very close set of cellular biomarkers in the marine mussel *Mytilus edulis* during a 16-month seasonal study, where at least three out of the four studied responses made the discrimination between the reference and the polluted site possible, whatever the month of investigation (Kagley et al., 2003). Although a comparison between both studies in two different environments, species and geographical zones would be hazardous, the inter-site differences in the contamination levels were probably more pronounced in the latter.

As already shown in other studies on biomarker sets (Schmolke et al., 1999), the seasonal amplitude of the variation was much broader than the amplitude of spatial differences. Nonetheless, a multivariate analysis of the whole dataset discriminates between sites, significantly in the case of transplanted mussels, and this distinction between the test sites was very close from significance in the native population. The proximity of both river sites' centres of gravity shown by PCAs suggests the absence of impact of the Mirgenbach reservoir's discharge into the river on both zebra mussel populations at the tested downstream site and regarding this set of biomarkers.

This multivariate approach also provided, for each zebra mussel population, a synthetic illustration of the whole dataset compacted on three diagrams, giving an idea of the relationships among the biomarkers and secondarily between the biomarkers and physico-chemical parameters (correlation circle), and indicating the main trends of the biomarker responses along the pollution gradient and in the time (factorial plane).

Furthermore, with both the passive and active biomonitoring approach, the high absolute coordinates of the unsaturated neutral lipid contents on the F2 axis (along which the distinction between sites was possible) and the proximity of the loadings of the lysosomal Sv and the reservoir's centre of gravity suggest that these two biomarkers were the most responsive in this experiment. In the case of transplanted mussels, the high loading of the gonadal index on the second factor also suggests an important contribution of this biomarker to the discrimination between sites, which could here account for the higher discrimination potential of the biomarker suite in the active approach.

4.3. Comparison between active and passive monitoring

The multivariate analysis has thus proved relevant to bring in elements for the assessment of the advantages and restrictions associated with active and passive biomonitoring approaches, in terms of sensitivity.

Furthermore, the suitability of transplantation experiments for the deployment of this suite of cellular biomarkers as early warning tools in freshwater molluscs was confirmed herein, as already shown in previous short-term field studies (Guerlet et al., 2006). Indeed, marked between-site differences were evidenced in the month following each of the five successive mussel transfers carried out in this study, which is consistent with the well described precocity of such cellular responses (Moore et al., 2004).

When comparing active and passive biomonitoring, some studies showed a better site-discrimination potential of the biological responses resulting from cumulative events (such as higher micronuclei frequency, digestive lipofuscin accumulation or larger lysosomal diameters) in marine native organisms chronically exposed to contaminated sites than in mussels transplanted for 1 month (Bolognesi et al., 2004; Nigro et al., 2006). On the other hand, other studies evidenced a greater sensitivity of transplanted over native organisms, being often attributed to adaptation or compensatory mechanisms developed by the latter to chronic sub-lethal pollution levels (Regoli and Principato, 1995; Da Ros and Nesto, 2005). In the present study, both trends were seen, depending on which endpoint was considered. The frequency of site-discrimination of each single biomarker response in both *Dreissena* populations showed that the responsiveness of the neutral lipid and lipofuscin contents tended to be greater in the native mussels than in the transplanted ones. The inverse trend was observed for the three other endpoints, with more frequent superior lysosomal and peroxisomal Sv values and a more pronounced desynchronisation of the reproduction in mussels transplanted to the Mirgenbach reservoir than in native ones. Thus a greater sensitivity was successively highlighted in each of the two populations, according to whether the studied biological answer seemed to result from cumulative events or to be more obvious in the transplanted organisms originating from a less disturbed environment and not having developed as many compensatory mechanisms as native individuals. Nonetheless, as mentioned earlier, the integrative approach consisting of using PCAs in both mussel populations has evidenced a higher discrimination potential of the study sites in transplanted zebra mussels than in native ones. Thus, in this study, the information brought by the whole set of biomarkers to highlight the gradient of stress seemed more complete and complementary in the transplanted than in the native mussels.

4.4. Proposals for the future implementation of this suite of biomarkers

For the implementation of this suite of cellular and physiological biomarkers in *D. polymorpha*, the choice of active or passive biomonitoring (or of a combination of both approaches)

could be determined according to the number of investigated sites, their accessibility for a direct sampling and/or the deployment of caging systems, but also according to the envisaged duration of the study and its objectives (*e.g.* trend monitoring in the time, monitoring of spatial variations, diagnosis of affected populations, or as part of site-specific risk assessment, see den Besten, 1998).

Similarly, for cost- and time-effectiveness, the composition of the suite of biomarkers should be flexible according to the duration and objectives of the study and the adopted biomonitoring approach. The earliest and most sensitive responses would be investigated preferentially in transplanted organisms and the endpoints that proved the most responsive in a context of chronical stress would be the most suitable in native organisms. The morphological modifications of the lysosomal system and the unsaturated neutral lipid contents seem to fall in both of these two categories.

Hence, the four cellular biomarkers – particularly the two above mentioned – and the physiological indice used in this experiment could advantageously be included in a suite of biomarkers covering other levels of biological organization and with various degrees of specificity, to compose a powerful battery in a maximum of contexts. In this view, one of the major advantages of histochemical biomarkers resides in the possibility of revealing the endpoints indicative of general stress first (*i.e.* the structure of the digestive lysosomal system and the unsaturated neutral lipid contents) and of stocking supplementary frozen sections for a possible later analysis of more specific responses (*i.e.* modifications of the peroxisomal system morphology and of the lipofuscin contents), in the light of the obtained results.

To our knowledge, this study represents the first report on the seasonal variations of a suite of histochemical biomarkers in a freshwater invertebrate species. It highlighted the suitability of both passive and active biomonitoring for the implementation of a cellular biomarker suite in the freshwater mussel, *D. polymorpha*, and confirmed the interest of using multivariate approaches to synthesise a complex dataset and to highlight a stress gradient, in spite of the important amplitude of the seasonal variations compared to the inter-site differences.

Acknowledgements

This work was funded by Electricité De France (EDF). Part of material support was attributed to the laboratory by the CPER-ZAM (Contrat Plan Etat Regions, Zone Atelier Moselle). We acknowledge Philippe Wagner, Jean-François Poinsaint and Ingrid Vinot for logistic assistance in the field, as well as Philippe Rousselle for technical support. Many thanks to Sharon Kruger for the final read of the English version. The authors also wish to thank Jean-Nicolas Beisel and Philippe Usseglio-Polaterra for their useful comments and suggestions on the statistical treatment of the dataset. We are very grateful to Dr. Michel Khalanski (EDF) for his critical reviewing of an earlier version of the manuscript and helpful suggestions.

References

Abele, D., Heise, K., Pörtner, H.O., Puntarulo, S., 2002. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. J. Exp. Biol. 205, 1831–1841.

Antón, A., Serrano, T., Angulo, E., Ferrero, G., Rallo, A., 2000. The use of two species of crayfish as environmental quality sentinels: the relationship between heavy metal content, cell and tissue biomarkers and physico-chemical characteristics of the environment. Sci. Total Environ. 247, 239–251.

Astley, K.N., Meigh, H.C., Glegg, G.A., Braven, J., Depledge, M.H., 1999. Multi-variate analysis of biomarker responses in *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas* from the Tees Estuary (UK). Mar. Pollut. Bull. 39, 145–154.

Au, D.W.T., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. Mar. Pollut. Bull. 48, 817–834.

Bodin, N., Burgeot, T., Stanisiere, J.Y., Bocquene, 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. Comp. Biochem. Physiol. C 138, 411–427.

Bolognesi, C., Frenzilli, G., Lasagna, C., Perrone, E., Roggieri, P., 2004. Genotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: wild versus caged mussels. Mutat. Res. 552, 153–162.

Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. Sci. Tot. Environ. 247, 295–311.

Cajaraville, M.P., Marigómez, J.A., Angulo, E., 1991. Automated measurement of lysosomal structure alterations in oocytes of mussels exposed to petroleum hydrocarbons. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 21, 395–400.

Cajaraville, M.P., Uranga, J.A., Angulo, E., 1993. Light microscopic catalase histochemistry in mussel digestive gland tissue. Histol. Histopathol. 8, 537–546.

Champeau, O., Narbonne, J.-F., 2006. Effects of tributyltin and 17[beta]-estradiol on immune and lysosomal systems of the Asian clam *Corbicula fluminea* (M.). Environ. Toxicol. Pharmacol. 21, 323–330.

Da Ros, L., Meneghetti, F., Nasci, C., 2002. Field application of lysosomal destabilisation indices in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: biomonitoring and transplantation in the Lagoon of Venice (north-east Italy). Mar. Environ. Res. 54, 817–822.

Da Ros, L., Nesto, N., 2005. Cellular alterations in *Mytilus galloprovincialis* (LMK) and *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve 1850) as biomarkers of environmental stress: Field studies in the Lagoon of Venice (Italy). Environ. Int. 31, 1078–1088.

de Lafontaine, Y., Gagne, 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.

Deaton, L.E., 1987. Hyperosmotic cellular volume regulation in the ribbed mussel *Geukensia demissa*: inhibition by lysosomal and proteinase inhibitors. J. Exp. Zool. 244, 375–382.

den Besten, P.J., 1998. Concepts for the implementation of biomarkers in environmental monitoring. Mar. Environ. Res. 46, 253–256.

Environmental Agency, United Kingdom, 2002. Environmental Quality Standards (EQS) for hardness related List 2 dangerous substances, EC Dangerous Substances Directive (76/464/EEC). Web Reference: <http://www.environment-agency.gov.uk/yourenv/eff/1190084/water/213902/290690/290939/290981/%3flang=_e>.

Etxeberria, M., Sastre, I., Cajaraville, M.P., Marigomez, I., 1994. Digestive lysosome enlargement induced by experimental exposure to metals (Cu, Cd, and Zn) in mussels collected from a zinc-polluted site. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 27, 338–345.

Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Depledge, M.H., Jones, M.B., 2006. The ECOMAN project: a novel approach to defining sustainable ecosystem function. Mar. Pollut. Bull. 53, 186–194.

Giamberini, L., Cajaraville, M.P., 2005. Lysosomal responses in the digestive gland of the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*, experimentally exposed to cadmium. Environ. Res. 98, 210–214.

Goksøyr, A., Beyer, J., Egaas, E., Grosvik, B.E., Hylland, K., Sandvik, M., Skaare, J.U., 1996. Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and their use in pollution monitoring. Mar. Pollut. Bull. 33, 36–45.

Guerlet, E., Ledy, K., Giambérini, L., 2006. Field application of a set of cellular biomarkers in the digestive gland of the freshwater snail *Radix peregra* (Gastropoda Pulmonata). Aquat. Toxicol. 77, 19–32.

Kagley, A.N., Snider, R.G., Krishnakumar, P.K., Casillas, E., 2003. Assessment of seasonal variability of cytochemical responses to contaminant exposure in the blue mussel *Mytilus edulis* (Complex). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 44, 43–52.

Lau, P.S., Wong, H.L., Garrigues, Ph., 2004. Seasonal variation in antioxidative responses and acetylcholinesterase activity in *Perna viridis* in eastern oceanic and western estuarine waters of Hong Kong. Cont. Shelf Res. 24, 1969–1987.

Lorenzen, C.J., 1967. Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations. Limnol. Oceanogr. 12, 343–346.

Lowe, D.M., Moore, M.N., Clarke, K.R., 1981. Effects of oil on digestive cells in mussels: quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. Aquat. Toxicol. 1, 213–226.

Lukyanova, O.N., Khotimchenko, Y.S., 1995. Lipid peroxidation in organs of the scallop *Mizuhopecten yessoensis* and sea-urchin *Strongylocentrotus intermedius* during the reproductive cycle. Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol. 110, 371–377.

Machala, M., Petrivalsky, M., Nezveda, K., Ulrich, R., Dusek, L., Piacka, V., Svobodova, Z., 1997. Responses of crab hepato-pancreatic 7-ethoxyresorufin-o-deethylase and glutathione-dependent enzymes to organic pollutants—a field study. Environ. Toxicol. Chem. 16, 1410–1416.

MEDD and Agences de l'Eau, 2003. Système d'Evaluation de la Qualité de l'eau des cours d'eau. Grilles d'évaluation S.E.Q. eau (version 2), 40 p. Web Reference: http://sierm.eaurmc.fr/eaux-superficielles:fichiers-telechargeables:grilles-seq-eau-v2.pdf.

Moore, M.N., Koehn, R.K., Bayne, B.L., 1980. Leucine aminopeptidase (aminopeptidase-I), *N*-acetyl-ß-hexosaminidase and lysosomes in the mussel, *Mytilus edulis* L., in response to salinity changes. J. Exp. Zool. 214, 239–249.

Moore, M.N., 1982. Lysosomes and environmental stress. Mar. Pollut. Bull. 13, 42–43.

Moore, M.N., 1985. Cellular responses to pollutants. Mar. Pollut. Bull. 16, 134–139.

Moore, M.N., 1988. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. Mar. Ecol. Progr. Ser. 46, 81–89.

Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W., Leonard, D.R.P., 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. Mutat. Res. 552, 247–268.

Nalepa, T.F., Cavaletto, J.F., Ford, M., Gordon, W.M., Wimmer, M., 1993. Seasonal and Annual Variation in Weight and Biochemical Content of the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*, in Lake St. Clair. J. Great Lake Res. 19, 541–552.

Neumann, D., Borcherding, J., Jantz, B., 1993. Growth and seasonal reproduction of dreissena polymorpha in the rhine river and adjacent waters. In: Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), Zebra Mussels—Biology, Impacts, and Control. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, pp. 95–109.

Nigro, M., Falleni, A., Del Barga, I., Scarcelli, V., Lucchesi, P., Regoli, F., Frenzilli, G., 2006. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. Aquat. Toxicol. 77, 339–347.

Pearse, A.G.E., 1972. Histochemistry, Theorical and Applied. Churchill-Livingstone, London.

Petrovic, S., Semencic, L., Ozretic, B., Ozretic, M., 2004. Seasonal variations of physiological and cellular biomarkers and their use in the biomonitoring of north adriatic coastal waters (Croatia). Mar. Pollut. Bull. 49, 713–720.

Regoli, F., 1992. Lysosomal responses as a sensitive stress index in biomonitoring heavy metal pollution. Mar. Ecol. Progr. Ser. 84, 63–69.

Regoli, F., Principato, G., 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. Aquat. Toxicol. 31, 143–164.

Schmolke, S.R., Broeg, K., Zander, S., Bissinger, V., Hansen, P.D., Kress, N., Herut, B., Jantzen, E., Kruner, G., Sturm, A., Körting, W., von Westernhagen, H., 1999. Multivariate statistical approach to the temporal and spatial patterns of selected bioindicators observed in the North Sea during the years 1995–1997. Helgol. Mar. Res. 53, 257–266.

Sheehan, D., Power, A., 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. Comp. Biochem. Physiol. C 123, 193–199.

Smolders, R., Bervoets, L., De Coen, W., Blust, R., 2004. Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. Environ. Pollut. 129, 99–112.

Sprung, M., 1995. Physiological energetics of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* in lakes. I. Growth and reproductive effort. Hydrobiologia 304, 117–132.

Stoeckmann, A.M., Garton, D.W., 2002. Flexible energy allocation in zebra mussels *(Dreissena polymorpha)* in response to different environmental conditions. J. N. Am. Benthol. Soc. 20, 486–500.

Svendsen, C., Weeks, J.M., 1995. The use of a lysosome assay for the rapid assessment of cellular stress from copper to the freshwater snail *Viviparus contectus* (Millet). Mar. Pollut. Bull. 31, 139–142.

Thioulouse, J., Chessel, D., Dolédec, S., Olivier, J.M., 1997. ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. Stat. Comput. 7, 75–83.

Tourari, A.L., 1988. Effets de l'échauffement des eaux sur le cycle de reproduction de la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha* (Bivalve: *Dreissenidae*).Etude *in situ* et en laboratoire: aspects histologiques, histochimiques et biochimiques. PhD Thesis, Metz.

Tourari, A.L., Crochard, C., Pihan, J.-C., 1988. Action de la température sur le cycle de reproduction de *Dreissena polymorpha* (Pallas) Etude "in situ" et au laboratoire. Haliotis 18, 85–98.

Viarengo, A., Moore, M.N., Mancinelli, G., Mazzucotelli, A., Pipe, R.K., Farrar, S.V., 1987. Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and accumulation in marine mussels: the effect of cadmium in the presence and absence of phenanthrene. Mar. Biol. 94, 251–257.

Vinot, I., Pihan, J.C., 2005. Circulation of copper in the biotic compartments of a freshwater dammed reservoir. Environ. Pollut. 133, 169–182.

Zorita, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Soto, M., Cajaraville, M.P., 2006. Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): an integrated biochemical, histochemical and histological study. Aquat. Toxicol. 78, S109–S116.

Tableau III.1.A.4. Valeurs mensuelles des biomarqueurs cellulaires chez les corbicules transplantées (moyenne ± écart-type).

	Sv_L (10^{-3} µm².µm^{-3})			Sv_{LF} (10^{-4} µm².µm^{-3})			Sv_{LN} (10^{-3} µm².µm^{-3})			Sv_P (10^{-5} µm².µm^{-3})		
	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③
nov-00	2,09 ± 0,59	2,87 ± 1,40		3,19 ± 0,56	3,25 ± 0,87		1,80 ± 0,31	0,79 ± 0,16		5,98 ± 1,49	8,08 ± 2,07	
déc-00	1,05 ± 0,31	1,71 ± 0,42		2,23 ± 0,60	3,18 ± 0,88		1,54 ± 0,41	0,63 ± 0,15		4,83 ± 1,96	7,43 ± 1,02	
janv-01	2,12 ± 0,98	2,28 ± 1,39		2,43 ± 0,86	2,72 ± 0,52		1,58 ± 0,36	0,57 ± 0,15		4,17 ± 2,08	5,35 ± 1,47	
févr-01	1,50 ± 0,65	1,55 ± 0,38		1,81 ± 0,53	2,31 ± 0,77		1,91 ± 0,45	0,67 ± 0,15		5,46 ± 1,51	6,29 ± 1,44	
mars-01		2,75 ± 0,49			2,82 ± 0,72			0,72 ± 0,16			7,23 ± 1,84	
avr-01		1,22 ± 0,08			4,18 ± 0,75			0,77 ± 0,11			8,24 ± 1,74	
mai-01		1,55 ± 0,74			4,16 ± 1,74			0,48 ± 0,20			8,54 ± 1,40	
juin-01	3,67 ± 1,44	4,40 ± 1,26	2,80 ± 0,78	1,68 ± 0,74	2,54 ± 1,57	2,30 ± 1,11	2,10 ± 0,76	1,17 ± 0,47	1,86 ± 0,37	2,62 ± 0,69	3,94 ± 0,83	3,58 ± 0,78
juil-01	3,38 ± 0,52	3,19 ± 0,78	2,92 ± 0,89	0,38 ± 0,09	0,52 ± 0,13	0,37 ± 0,15	0,61 ± 0,31	0,26 ± 0,10	0,53 ± 0,36	2,91 ± 0,65	4,12 ± 0,85	3,05 ± 0,40
août-01	2,44 ± 0,54	2,06 ± 0,56		0,70 ± 0,46	0,53 ± 0,14		0,35 ± 0,18	0,67 ± 0,29		3,20 ± 0,87	4,45 ± 1,11	
sept-01	3,04 ± 0,76	2,49 ± 0,88		0,59 ± 0,28	3,04 ± 2,41		0,18 ± 0,07	0,29 ± 0,15		7,27 ± 4,60	4,82 ± 6,67	
oct-01	2,39 ± 0,82	2,61 ± 0,59	2,23 ± 0,90	0,39 ± 0,23	0,84 ± 0,46	0,60 ± 0,46	0,20 ± 0,07	0,25 ± 0,06	0,35 ± 0,18	2,15 ± 0,66	2,75 ± 1,52	3,23 ± 1,43
nov-01	2,85 ± 0,90	2,45 ± 0,88	2,31 ± 0,56	0,73 ± 0,27	0,54 ± 0,15	0,47 ± 0,20	0,43 ± 0,38	1,79 ± 0,68	0,22 ± 0,12	8,21 ± 6,03	1,87 ± 0,64	3,87 ± 3,60
déc-01	2,14 ± 0,73	2,73 ± 0,52	2,61 ± 0,69	0,33 ± 0,16	0,51 ± 0,18	0,45 ± 0,18	0,60 ± 0,29	1,25 ± 1,06	0,46 ± 0,55	2,00 ± 0,46	1,24 ± 0,36	2,08 ± 0,86
janv-02	2,50 ± 0,62	2,16 ± 0,95		0,77 ± 0,31	0,56 ± 0,23		0,44 ± 0,60	0,38 ± 0,20		1,61 ± 0,35	1,58 ± 0,68	
févr-02		3,33 ± 0,98			1,15 ± 0,41			0,61 ± 0,26			1,84 ± 0,71	
mars-02												
avr-02												
mai-02	2,12 ± 0,55	4,95 ± 1,88	2,07 ± 1,39	0,88 ± 0,35	2,27 ± 1,24	0,46 ± 0,09	71,17 ± 27,37	0,22 ± 0,09	38,76 ± 14,73	2,31 ± 1,19	1,76 ± 0,21	3,68 ± 3,98
juin-02	1,79 ± 0,35	2,89 ± 0,51	3,39 ± 1,22	1,07 ± 0,32	2,17 ± 1,05	1,28 ± 0,36	24,50 ± 13,08	0,32 ± 0,22	20,57 ± 12,63	14,33 ± 7,16	1,85 ± 0,42	3,36 ± 2,02
juil-02	1,30 ± 0,50	2,19 ± 1,70	3,95 ± 2,05	1,82 ± 0,72	3,28 ± 1,60	1,22 ± 0,27	3,03 ± 1,35	1,91 ± 0,42	3,04 ± 1,68	21,25 ± 11,45	5,25 ± 4,84	44,35 ± 16,57
août-02	2,56 ± 1,19	2,96 ± 1,35	3,01 ± 1,51	1,49 ± 0,39	1,93 ± 1,07	1,80 ± 0,86	1,84 ± 0,71	0,61 ± 0,23	0,93 ± 0,34	4,38 ± 2,02	4,99 ± 2,28	6,42 ± 2,31
sept-02	3,06 ± 1,47	3,17 ± 0,92	2,69 ± 0,58	1,07 ± 0,36	1,10 ± 0,61	1,17 ± 0,33	0,19 ± 0,11	0,19 ± 0,07	0,37 ± 0,15	1,64 ± 0,37	7,46 ± 5,18	2,00 ± 0,80
oct-02	2,34 ± 1,30	7,30 ± 1,45	0,81 ± 0,33	1,33 ± 0,30	1,94 ± 0,58	1,16 ± 0,24	0,40 ± 0,25	0,19 ± 0,12	0,43 ± 0,13	6,68 ± 6,07	2,66 ± 2,08	4,13 ± 2,55
nov-02	1,58 ± 0,44	1,50 ± 0,50		1,49 ± 0,77	1,19 ± 0,25		0,46 ± 0,12	0,77 ± 0,52		1,92 ± 0,72	1,71 ± 0,47	
déc-02	6,07 ± 2,41	4,34 ± 1,89		1,06 ± 0,15	1,24 ± 0,48		0,93 ± 0,36	0,45 ± 0,25		5,45 ± 6,11	1,28 ± 0,20	
Moyenne	2,50	2,86	2,62	1,27 [2]	2,00 [1, 3]	1,03 [2]	5,71 [2]	0,67 [1]	6,14	5,42	4,36	7,25
CV (%)	43,2	46,5	30,7	59,5	58,7	61,1	285,2	69,1	201,2	88,6	57,5	170,5
Fréquence :												
Sv < ① (%)	-	0,0	9,1	-	0,0	0,0	-	45,0	18,2	-	25,0	9,1
Sv = ① (%)	-	80,0	72,7	-	75,0	100,0	-	45,0	63,6	-	55,0	72,7
Sv > ① (%)	-	20,0	18,2	-	25,0	0,0	-	10,0	18,2	-	20,0	18,2

NB : les lignes en pointillés indiquent un nouveau transfert d'organismes. Les chiffres en exposant ([1, 2] et [3]) indiquent les différences inter-sites significatives des proportions de surfaces moyennes sur l'ensemble de la période (test des signes de Wilcoxon pour échantillons appariés, p≤0,05).

3.3 CORBICULES TRANSFEREES

3.3.1 Biomarqueurs cellulaires

Le tableau III.1.A.4 présente les fluctuations des proportions de surface des quatre compartiments et contenus cellulaires étudiés chez les corbicules transférées au niveau des trois sites entre novembre 2000 et décembre 2002.

Comme pour les dreissènes, l'analyse des **profils saisonniers** des biomarqueurs cellulaires chez les corbicules transférées indique une absence de tendance saisonnière clairement identifiée et répétée au cours des deux années d'étude.

Là encore, l'influence de la disponibilité en nourriture sur les contenus des cellules digestives en lipides neutres insaturés semble déterminante. En effet, la période du printemps 2002, marquée par un bloom algal important au niveau de la rivière, correspond à une exceptionnelle augmentation de ce paramètre chez les corbicules exposées aux stations ① et ③ (élévations respectives de facteurs 116 et 56, par rapport à la moyenne des précédents mois disponibles depuis juin 2001). De surcroît, la corrélation positive entre le taux de chlorophylle a et Sv_{LN} est proche de la significativité ($r_S = 0,34$; $p = 0,0531$; voir le tableau III.1.A.5).

Tableau III.1.A.5. Coefficients de corrélation de Spearman (n = 33) entre les biomarqueurs cellulaires et les paramètres physico-chimiques et trophiques

	Zn	Cu	SiO_2	Na^+	Cl^-	Ptot	PO_4^{3-}	N Kj	NO_3^-	NH_4	phéo	chl a	pH	cond	sat%	O_2	T°C	Sv_P	Sv_{LF}	Sv_{LN}
Sv_L	-0,16	0,08	-0,01	0,26	0,27	0,19	0,17	-0,26	0,02	-0,11	-0,20	0,10	0,08	0,29	-0,04	-0,13	0,37**	-0,14	0,29	-0,26
Sv_{LN}	-0,22	-0,30	-0,56**	-0,15	0,00	-0,10	-0,35	0,22	-0,34	-0,07	-0,34	0,34	-0,20	-0,10	-0,13	-0,18	0,07	0,30	0,12	
Sv_{LF}	-0,07	0,29	-0,28	0,53**	0,31	0,28	0,13	0,15	-0,19	0,04	-0,17	0,32	0,09	0,44*	-0,17	-0,30	0,35**	0,26		
Sv_P	-0,16	-0,31	-0,24	0,21	-0,08	0,45**	0,07	0,33	-0,38**	-0,05	-0,49**	0,32	-0,19	-0,09	-0,15	-0,21	0,32			

*Proportion de surface (Sv) des systèmes lysosomal ($_L$) et peroxysomal ($_P$) et des contenus en lipofuscines ($_{LF}$) et lipides neutres insaturés ($_{LN}$) de la glande digestive. *: $P \leq 0.05$.**: $P \leq 0.01$.*

Autre fait ponctuel, mais marquant, les mois de juin et/ou juillet 2002 sont caractérisés par une soudaine augmentation de la proportion de surface du système peroxysomal chez les corbicules des deux même stations (① et ③). Ces résultats suggèrent un lien éventuel avec les niveaux de lipides neutres insaturés importants des deux mois précédents, à travers l'intervention des peroxysomes dans le métabolisme des lipides (et plus particulièrement la ß-oxydation des acides gras).

Les moyennes annuelles des proportions de surface des différents compartiments et contenus cellulaires étudiés montrent la **variabilité spatiale** des réponses de la façon suivante :

- L'ordre du gradient de pollution présumé est respecté vis-à-vis des dimensions du système lysosomal, qui sont plus importantes chez les corbicules de la retenue (Sv_L : ① < ③ < ②) ;
- Les moyennes des trois autres paramètres « éloignent » d'avantage le site ③ de la retenue, par rapport à la référence. Elles indiquent que, globalement, l'accumulation de lipofuscines a été plus importante chez les corbicules de la retenue (Sv_{LF} : ③ < ① < ②) et, qu'au contraire, les lipides neutres ont été présents en moindre quantité (Sv_{LN} : ② < ① < ③), avec un système peroxysomal moins développé (Sv_P : ② < ① < ③).

Comme l'indiquent les trois dernières lignes du Tableau III.1.A.4, ces tendances entre les sites ① et ② sont confirmées par les fréquences des différences spatiales significatives. En effet, lorsque des différences significatives existent par rapport à celles du site de « référence » ①, les corbicules de la station ② montrent plus fréquemment :

- de plus bas niveaux en lipides neutres insaturés ;
- des accumulations plus importantes de lipofuscines ;
- et une certaine tendance à un système lysosomal plus développé ;
- mais en revanche, aucune réponse claire du système peroxysomal ne se dessine.

Les tendances entre les stations amont et aval de la rivière (① et ③) sont nettement moins fréquentes et tranchées, et elles ne concernent que les systèmes lysosomal et peroxysomal.

3.3.2 ACP

L'ACP construite à partir des fluctuations de la batterie de biomarqueurs cellulaires chez *C. fluminea* est présentée sur la Figure III.1.A.2. Après examen des valeurs propres, deux axes ont été retenus (Figure III.1.A.2.A).

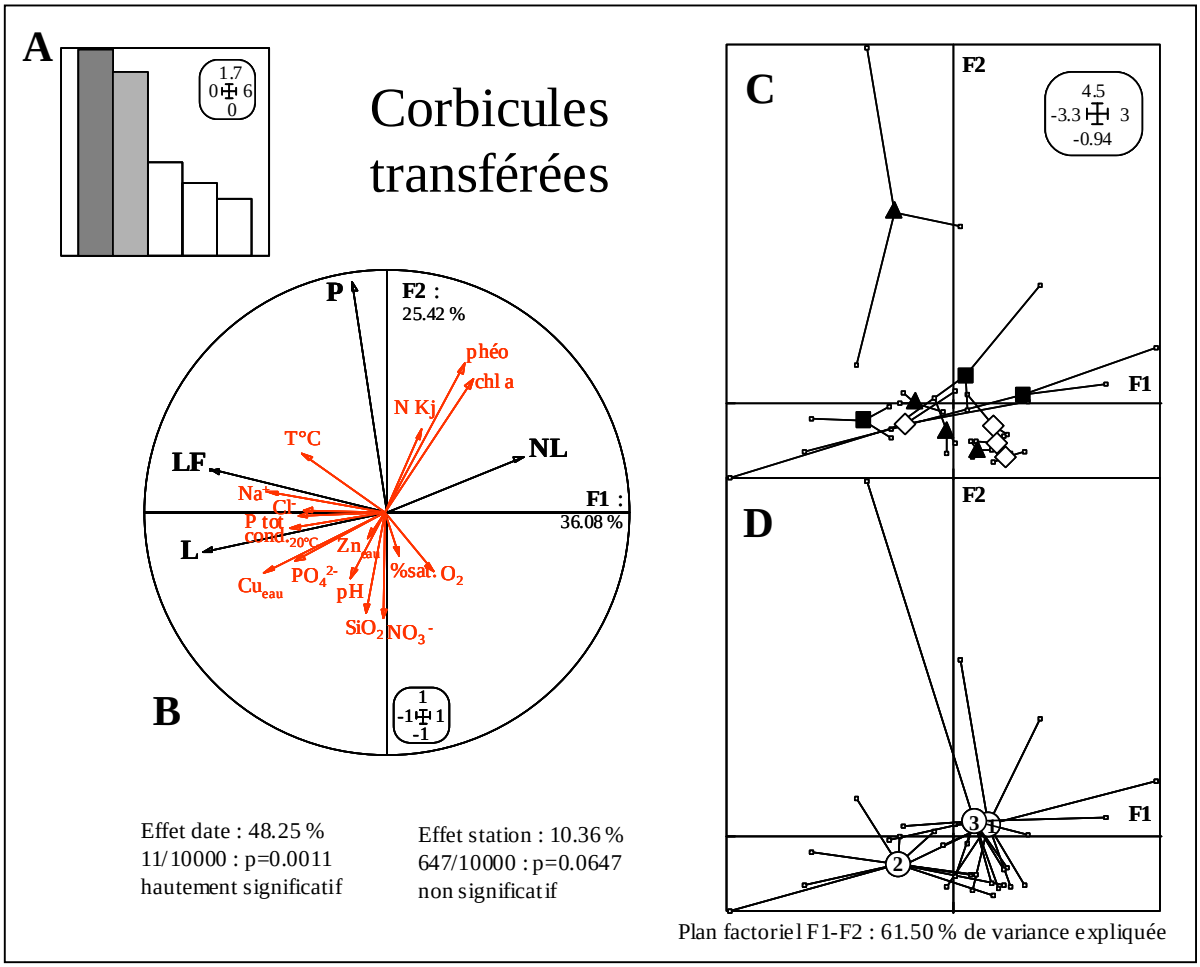


Figure III.1.A.2. Résultats de l'ACP des deux premières composantes principales définies par les quatre biomarqueurs cellulaires chez les corbicules transférées (61,50 % de la variance totale). (A) Histogramme des valeurs propres de l'ACP. (B) Cercle des corrélations sur le plan F1-F2, défini par les quatre biomarqueurs (en noir et gras) ; les paramètres physico-chimiques et les pigments chlorophylliens sont projetés comme variables supplémentaires (en rouge) – C.D. Plan factoriel F1-F2 des observations : C. variabilité temporelle (pour les mois : ◇ d'automne, ■ de printemps et ▲ d'été) – D. variabilité spatiale (centres de gravité des sites ①, ② et ③).

Les biomarqueurs cellulaires sont représentés par la proportion de surface des systèmes lysosomal (L) et peroxysomal (P), ainsi que des contenus des tissus digestifs en lipofuscines (LF) et lipides neutres insaturés (NL).

L'**analyse du cercle des corrélations** du plan factoriel F1-F2 (Figure III.3.B) indique que l'axe F1 est principalement défini par la réponse du système lysosomal, des lipofuscines

(coordonnées négatives très proches sur F1) et des lipides neutres insaturés (coordonnées positives sur F1). L'axe F2 est quant à lui principalement défini par les réponses du système peroxysomal.

La projection des paramètres physico-chimiques et trophiques comme variables supplémentaires révèle une relative proximité des coordonnées des chloropigments et de l'azote Kjeldahl (formes réduites de l'azote, à savoir azote organique et ammoniacal) avec celles des lipides (sur F1) et des peroxysomes (sur F2). Ceci suggère, là encore, un lien entre, d'une part, les facteurs qui favorisent la productivité primaire et qui la traduisent (c'est-à-dire, pour les bivalves, des facteurs reflétant la disponibilité en nourriture), et d'autre part, le métabolisme énergétique (triglycérides et organites impliqués à divers égards dans le métabolisme des lipides).

Autre fait marquant, les coordonnées de la réponse lysosomale sont également proches de celles de la conductivité et de la concentration en cuivre dans l'eau, ce qui évoque les résultats synthétisés par l'ACP des dreissènes transférées (voir Article 1, figure 2), à savoir le rôle de ces organites dans la séquestration, la détoxication des métaux, mais également dans l'osmorégulation. Néanmoins, et contrairement aux dreissènes transférées, aucune corrélation de Spearman significative ne vient appuyer cette hypothèse (tableau III.1.A.5).

La représentation des **centres de gravité des mois sur le plan factoriel F1-F2** (Figure III.3.C) ne laisse pas apparaître de structure saisonnière précise, bien que l'effet temporel soit important dans la structuration des données (plus de 48 %, d'après l'analyse inter-classes) et hautement significatif (test des permutations aléatoires de Monte Carlo, $p = 0{,}0011$).

En outre, aucun mois d'hiver n'entre malheureusement dans l'analyse en raison des lacunes dans la matrice de données. Nous avons choisi de ne pas combler ces lacunes par une moyenne des tous les autres mois sur la station en question, en raison de la très grande variabilité des données.

Une autre limite à l'analyse de la structuration des données au fil des saisons réside dans la position des trois observations d'un seul mois de prélèvement (juillet 2002, au centre de gravité représenté par un triangle noir aux coordonnées importantes sur F2). Celle-ci semble

« écraser » tout le reste du nuage de points. Ainsi, l'analyse conjointe du cercle des corrélations et de ce plan factoriel suggère le poids important de Sv_P chez les corbicules des stations ① et ③ en juillet 2002 dans la structuration des données.

Néanmoins, si les coordonnées des observations sur l'axe F2 sont – par conséquent – peu informatives, la dispersion des coordonnées des points le long de l'axe F1 est nettement plus homogène. Or, l'effet spatial (qui explique 10,36 % de la variabilité totale) s'exprime le long de cet axe, par une distinction entre les **centres de gravité des stations** ① et ③, d'une part, et de la station ② d'autre part (figure III.D). Cet effet spatial, bien que non significatif, est tout de même proche de la significativité (test des permutations aléatoires de Monte Carlo, p = 0,0647). L'axe F1 de cette ACP pourrait donc être interprété comme un gradient de perturbation, croissant depuis les coordonnées positives jusqu'aux coordonnées négatives (de droite à gauche).

Des limites à cette interprétation résident, là encore :

- dans la contribution importante, à la structuration des données, des observations relatives aux exceptionnels niveaux de lipides neutres en mai et juin 2002 chez les corbicules de la rivière ;
- et dans la différence typologique entre stations, susceptible de conditionner la physiologie des organismes à travers d'autres facteurs environnementaux que la contamination ou la température (stations lotiques pour ① et ③ et lentique pour ②).

3.4 GAMMARES NATIFS

Article 2.

Guerlet E., Ledy K., Giambérini L.

Is the freshwater gammarid, *Dikerogammarus villosus*, a suitable sentinel species for the implementation of histochemical biomarkers?

Soumis à Chemosphere (septembre 2007)

RESUME DES RESULTATS EN FRANÇAIS

Comme pour les dreissènes et les corbicules, les seules variations saisonnières répétées aux cours des années 2001 et 2002 chez les amphipodes concernent le contenu des tissus cæcaux en lipides neutres insaturés, avec des valeurs maximales au printemps et au début de l'été et des valeurs minimales à la fin de l'été et en automne. Là, encore, la productivité primaire semble influencer ce phénomène, puisqu'une corrélation positive existe entre Sv_{LN} et le taux de chlorophylle a dans l'eau (r_S = 0,28; p = 0,040). Cette fois-ci, il s'agirait d'une influence plus indirecte en raison du positionnement de *D. villosus* au sein du réseau trophique (consommateur secondaire et opportuniste).

Les tendances spatiales révélées par les moyennes générales des Sv des différents contenus et organites cellulaires, ainsi que par la fréquence des différences entre les groupes expérimentaux du site ② par rapport à ceux du site ①, indiquent que la réponse aux facteurs de stress accrus dans la retenue implique plutôt :

- des niveaux de lipides neutres supérieurs ;
- un système peroxysomal plus développé (ou plus actif) ;
- au contraire, un système lysosomal globalement moins volumineux ;
- une légère tendance à l'augmentation du contenu tissulaire des cæca en lipofuscines.

Mais globalement, ces réponses ne sont pas suffisamment prononcées pour permettre à la batterie dans son ensemble de se montrer pertinente dans la mise en évidence d'une hétérogénéité spatiale marquée et significative.

Les avantages et limites de la pertinence du choix de *D. villosus* comme espèce sentinelle pour l'application d'une suite de biomarqueurs cellulaires sont discutées :

- autour de la notion de tolérance, d'adaptation, de potentiel invasif et de positionnement au sein des communautés, en prenant notamment en compte le caractère opportuniste du régime alimentaire de cette espèce et la facilitation des espèces exotiques de même origine géographique ;
- d'un point de vue plus pratique, en considérant à la fois la facilité d'échantillonnage et certains biais dans la procédure d'analyse d'image (quantité importante de gouttelettes de lipides qui rend difficile la lecture des autres biomarqueurs).

Is the freshwater gammarid, *Dikerogammarus villosus*, a suitable sentinel species for the implementation of histochemical biomarkers?

Edwige Guerlet, Karine Ledy, Laure Giambérini*

Laboratoire Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes, CNRS UMR 7146; Université Paul Verlaine – Metz; Rue Général Délestraint; F-57070 Metz; France.

* Corresponding author, Tel: +33 (0) 387 378 415; fax: +33 (0) 387 378 512; e-mail address: giamb@univ-metz.fr

Abstract

In order to enlarge the range of potential sentinel species for the implementation of a multiple biomarker approach, spatial and monthly morphological variations of four cellular compartments and contents were assessed during two years in the hepatopancreatic caeca of the freshwater gammarid, *Dikerogammarus villosus* (Crustacea, Amphipoda), using histochemistry coupled to image analysis. Among the three study sites, the second one, located in a reservoir receiving the overheated and copper-contaminated waters of a nuclear power plant, was the most anthropised. During this passive biomonitoring survey, unsaturated neutral lipids were more abundant, the surface densities of the lysosomal and peroxisomal systems were respectively less and more important, and lipofuscin granules tended to accumulate in the amphipods from the second site compared to both others. Nonetheless, in this context, the present cellular biomarker suite, analysed through an integrative approach, was not powerful enough to highlight spatial heterogeneity significantly. This may partly result from particularities in the patterns of metal accumulation and copper physiological requirements of amphipods (haemocyanin synthesis). Nevertheless, we think that the use of this Ponto-Caspian non-indigenous species in biomonitoring surveys deserves further investigation, owing to its current position in freshwater and brackish European ecosystems, considering both biomass and functioning. Cellular responses, which still tended to highlight spatial heterogeneity during this survey, could be studied in parallel with endpoints at other levels of the biological organization to compose a more powerful biomarker suite. Furthermore, comparing biological responses to environmental stress in this invasive species and less competitive autochthonous gammarids could be of great interest.

Keywords: Cellular biomarker suite; passive biomonitoring; amphipod; lysosome; peroxisome; lipofuscin, unsaturated neutral lipids.

1. Introduction

To improve the use of biomarkers in a maximum number of situations, it is of great interest to develop these biomonitoring tools in different taxa (Brown *et al.*, 2004; Cheung *et al.*, 2006). An efficient multi-species approach would make available relevant indicators of stress in organisms differing by their sensitivity to stress or pollution, physiology, functional group in a community, and compartment of the ecosystem they are mainly exposed to, such as the water column, the sediment or their interface (Sanchez and Tarazona, 2002; Brown *et al.*, 2004; Cheung *et al.*, 2006). For practical reasons and for the sake of ecological realism, the development and validation of a suite of biomarkers in different species assures its widespread implementation, according to the presence of the different taxa, their habitat type (Brown *et al.*, 2004) and to their accessibility in the field.

Gammaridean amphipods are common epibenthic invertebrates in European inland ecosystems (Schmitz, 1992). Thus, an increasing number of studies report the development and implementation of general stress or more specific biomarkers in freshwater gammarids. They include, for instance, the measurement of (i) enzyme activities such as the cholinesterase, the glutathione-S-transferase (McLoughlin *et al.*, 2000), the DT-diaphorase (Kutlu *et al.*, 2003) or the glutathione peroxidase (Kutlu and Susuz, 2004), (ii) the protein hsp70 in *Gammarus pulex* (Triebskorn *et al.*, 2002), (iii) biomarkers of endocrine effects (Gagné *et al.*, 2005; Schirling *et al.*, 2005) or (iv) haemolymph sodium and potassium concentrations in *Gammarus fossarum* (Felten *et al.*, 2006).

Nonetheless to our knowledge, no study on cellular biomarkers in freshwater gammarids has been reported in the literature, even though approaches coupling histochemistry and image analysis, previously developed and well-documented in marine organisms (e.g. Moore, 1985; Cajaraville *et al.*, 2000; Au, 2004), have recently shown promising results in freshwater invertebrates. They include general stress responses of the lysosomal system in the hepatopancreas of two freshwater crayfishes, *Austropotamobius pallipes* and *Pacifastacus leniusculus* (Antón *et al.*, 2000), and in the digestive gland of the freshwater molluscs *Dreissena polymorpha* (Giambérini and Cajaraville, 2005), *Corbicula*

fluminea (Champeau and Narbonne, 2006), *Radix peregra* (Guerlet *et al.*, 2006) and *Physa acuta* (Zaldibar *et al.*, 2007). The morphometric analysis of the lysosomal system can be accompanied by the concomitant assessment of other cellular responses, in a multiple biomarker approach. Hence, lipofuscin and unsaturated neutral lipid contents or structural changes in peroxisomal system were also evidenced in *D. polymorpha* (Guerlet *et al.*, 2007).

The hepatopancreatic caeca (midgut glands or ventral caeca) appear as interesting structures for a trial to adapt such a cellular biomarker suite in freshwater gammarids. Indeed, the crustacean hepatopancreas can be considered the counterpart of the molluscan digestive gland, assuming a role in digestive enzyme secretion, food absorption and nutrient storage, but also in metal homeostasis (Mardsen and Rainbow, 2004), including probably haemocyanin synthesis (Bentley and Hurd, 1995) and metal detoxication by the lysosomal system (Weeks, 1992; Nassiri *et al.*, 2000).

In amphipods, this organ comprises a pair of hepatopancreatic ducts arising ventrally near the junction of the fore- and the midgut, and the ducts are themselves divided into two pairs of tapered, blind caeca. Three zones are usually described: a distal zone of embryonic cells, a transitional zone, and a long proximal mature and secretory zone. The latter is characterised by a simple columnar epithelium with an apical brush border, and enclosed in a thin muscle network. Two cell types form the epithelium of the proximal zone: light-staining R-cells and large basophilic vacuolated B-cells. This zone would be the main site for digestive enzyme secretion, absorption and storage of both lipids and metals (Schultz, 1976; Schmitz, 1992).

The brackish and fresh water gammarid, *Dikerogammarus villosus*, is a Ponto-Caspian species present in Western European hydrosystems since the mid 90's. This exotic species feeds on various food sources, in an opportunistic way. Its diet includes macrophytes, particulate organic matter, bivalve pseudofaeces and macroinvertebrates, including gammarids (Dick and Platvoet, 2000). Thus, *D. villosus* became one of the prevailing amphipod species in the northeastern France hydrosystems (Devin *et al.*, 2001, 2005).

To enlarge the range of potential freshwater sentinel species used for the implementation of a cellular biomarker suite, we tested, in *D. villosus*, the applicability of the histochemical demonstration of the lysosomal and peroxisomal systems, and of unsaturated neutral lipid and lipofuscin contents. The responsiveness of morphological changes of these

cellular organelles and contents to environmental stress was assessed, during a two-year field study.

2. Materials and methods

Sites and sampling

The experiment was conducted in northeastern France, at the vicinity of a nuclear power plant. Three stations were studied, the first one at the plant water intake into the Moselle river (a tributary of the Rhine River), the second one in the plant's reservoir (Mirgenbach reservoir) receiving the overheated waters from the cooling system, and the third one 4 km downstream from the discharge of the reservoir's waters into the river (5.5 km downstream from site 1).

Water quality at the first site was already affected by a high salinity due to saltwork effluents located upstream and by the confluence of two anthropised streams receiving urban and industrial effluents. A high temperature characterised waters of the Mirgenbach reservoir (site 2), as well as a concentration of dissolved salts by water evaporation. A chronic copper contamination of the reservoir's waters was due to the corrosion of the brass exchanger of the power plant's cooling system (Vinot and Pihan, 2005; Guerlet *et al.*, 2007).

At the three study sites, *D. villosus* (6-10 mm length) were handpicked or captured monthly with a dip net on porous stones and in macrophytes patches, from November 2000 to December 2002.

Water samplings and physico-chemical analyses were performed as described in Guerlet *et al.* (2007).

Dissection

At each date and sampling site, eight individuals were dissected. To obtain the four caeca, an individual was held straight between the thumb and the forefinger; the cephalothorax was held with a pair of fine-tipped forceps, carefully pulled anteriorly and removed from the rest of the body. The hepatopancreatic caeca thus remained attached to the cephalothorax, and the whole was then processed for histochemistry.

Histochemistry and stereology

The tissues were cryoprotected in a phosphate buffer (pH 7.4; 0.05 M) with 7% sucrose at 4°C for 10 min. Excess buffer was carefully drained with absorbent paper and the tissues were embedded in cryomatrix (Thermo-Shandon), frozen in nitrogen vapours and stored at -60/-70°C until required.

The cephalothorax served as a marker to identify the proximal part of the caeca (mature secretory zone), which could thus be oriented and cut transversally. Sections (8 µm) were obtained in a Leica CM3000 cryostat (Leica Instruments GmbH, Germany) at a cabinet temperature of −28◦C/−30◦C, collected onto warm glass slides and stored at −70◦C until required for the different staining procedures.

The lysosomal system was located in the digestive cells by the histochemical revelation of β-glucuronidase demonstrated in unfixed cryostat sections according to Cajaraville *et al.* (1991) and adapted to freshwater organisms by Giambérini and Cajaraville (2005). Unsaturated neutral lipids were demonstrated by oil red O staining (Moore, 1988), and lipofuscin granules were stained by the Schmorl reaction (Pearse, 1972). The histochemical revelation of the peroxisomal catalase in unfixed cryostat sections was adapted from Cajaraville *et al.* (1993), as described in Guerlet *et al.* (2006).

The surface densities of the lysosomal (Sv_L) and peroxisomal (Sv_P) systems and of the digestive unsaturated neutral lipid (Sv_{NL}) and lipofuscin (Sv_{LF}) contents were evaluated by image analysis (Analysis pro 3.0, Olympus) on five microscopic fields of view according to the equations developed by Lowe *et al.* (1981).

Statistics

For all statistical analysis, the significance level was set at $\alpha = 0.05$.

For each cellular biomarker, significant differences between monthly-paired means were determined between the 3 sites using the non-parametric U-test of Mann-Whitney, Wilcoxon.

Spearman's correlation coefficients were calculated to investigate statistical relationships between the 4 cellular biomarkers and physico-chemical parameters (Statistica software version 5.5, Statsoft, USA).

In order to illustrate the data synthetically, Principal Component Analyses (PCAs) were carried out on the mean monthly values of the 4 biomarkers (ADE-4 software; Thioulouse *et al.*, 1997). As data matrix should not present missing values, months for which the 3 sites were not represented all together have been discarded from the analyses. Hence, the PCA was obtained on 4 descriptors (or biomarkers) and 54 objects (3 sites x 18 months instead of 25). The three first principal components (PCs), having eigenvalues of more than one, were retained in the analysis. The significance of the temporal and spatial effects' respective contributions to the total variability was tested by Monte Carlo multiple permutation tests (Manly, 1991).

Table 1 Monthly cellular biomarker values in *D. villosus* (mean ± sd)

	Sv_L (10^{-3} µm².µm^{-3})			Sv_{LF} (10^{-6} µm².µm^{-3})			Sv_{NL} (10^{-2} µm².µm^{-3})			Sv_P (10^{-7} µm².µm^{-3})		
Site	Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3
nov-00	2.15±0.95	3.96±2.11	3.52±1.31	10.49±2.18	11.17±1.50	10.93±2.08	4.15±0.53	5.61±1.09	4.45±0.64	5.24±1.53	8.16±1.23	6.56±0.75
dec-00	1.60±0.58	1.08±0.26	2.28±1.39	9.65±2.39	12.37±2.04	10.72±1.96	6.17±1.03	7.03±1.38	6.23±1.29	5.21±1.55	7.27±1.96	6.08±2.65
jan-01	2.67±0.76	1.10±0.64		8.14±1.66	9.68±0.97		6.78±1.40	8.17±0.98		3.99±1.42	6.42±1.10	
feb-01	1.70±0.86	1.90±0.39		6.73±2.20	7.87±1.99		7.85±0.97	9.01±0.84		3.19±1.08	5.16±1.07	
mar-01		1.35±0.65			9.93±1.32			9.87±1.27			6.31±1.31	
apr-01		2.01±0.83			10.65±2.15			10.27±1.58			6.57±1.26	
may-01	2.80±1.97	2.06±0.85	3.38±1.54	9.79±2.20	7.87±1.95	11.18±4.05	7.12±2.18	6.77±2.92	7.04±2.47	5.18±0.83	6.89±1.20	5.58±1.35
jun-01	2.38±1.58	3.12±1.01	3.23±1.07	6.90±2.55	8.51±2.45	6.51±2.62	8.47±2.47	10.48±3.28	7.93±2.31	4.66±1.63	6.47±1.30	4.91±0.92
jul-01	2.59±0.78	5.31±1.20	5.14±3.02	5.72±2.77	4.52±2.27	5.66±2.57	5.41±2.59	6.33±2.14	4.73±1.97	5.08±0.72	6.68±1.09	5.26±0.87
aug-01	2.53±1.98	2.75±1.96	3.77±1.56	8.02±1.90	6.28±2.95	5.27±1.65	2.97±1.27	5.18±2.67	4.47±2.06	6.02±1.42	6.93±1.42	6.34±1.54
sep-01	3.27±1.16	5.21±2.23	3.00±1.46	8.95±3.69	10.54±4.35	8.23±4.48	2.50±1.36	3.35±1.01	3.31±2.22	1.92±0.99	3.17±1.64	2.05±1.05
oct-01	2.05±1.02	2.54±0.72	2.87±1.33	2.83±1.00	6.68±4.32	5.88±3.14	3.68±1.10	3.38±1.19	3.39±1.81	1.89±1.12	1.82±0.58	2.75±0.58
nov-01	2.80±0.70	4.41±1.65	3.45±0.83	2.85±1.17	4.54±2.10	3.02±0.75	5.58±2.69	7.23±3.70	4.74±2.59	1.94±0.55	2.49±0.54	2.29±0.90
dec-01	2.86±1.49	3.69±1.12	1.85±0.73	3.68±1.72	3.26±1.30	3.89±1.92	6.04±1.33	9.97±3.11	7.06±3.08	3.16±0.24	3.52±3.60	2.48±0.96
jan-02	4.47±2.65	1.32±1.33		6.17±4.43	5.13±1.78		9.46±2.14	9.93±2.03		2.31±0.81	1.75±0.37	
feb-02	4.07±1.71	2.53±1.04	3.41±1.42	9.81±3.37	5.01±2.61	4.01±1.01	8.65±2.65	7.17±1.64	8.42±1.48	2.00±0.29	1.93±0.56	2.20±0.54
mar-02	4.89±3.47	1.33±0.77		5.03±2.59	4.12±1.55		8.14±2.14	8.82±1.44		2.48±1.08	2.32±0.66	
apr-02	4.01±1.09	2.58±1.58	2.43±1.06	4.10±2.40	2.99±0.83	3.38±0.98	7.44±1.58	7.55±1.20	7.56±2.42	1.77±0.25	1.79±0.44	1.64±0.21
may-02	2.58±0.62	0.97±0.73	2.17±0.65	5.09±1.32	4.92±2.14	4.57±1.88	10.17±3.74	10.24±2.90	9.74±5.80	4.08±1.75	3.79±1.76	3.34±1.11
jun-02	2.92±1.16	1.79±0.72	1.08±0.46	7.08±2.73	7.15±2.29	7.10±2.66	10.52±2.35	10.94±2.99	7.95±1.36	3.28±0.89	2.72±0.89	2.64±1.08
jul-02	4.80±0.45	2.63±1.11	2.32±0.94	3.92±1.04	4.18±1.91	4.21±2.04	8.05±3.21	6.33±2.21	6.90±4.03	2.66±0.68	3.52±1.12	2.86±1.31
aug-02	1.76±0.52	1.96±1.05	3.41±1.76	23.14±4.93	15.15±6.18	9.43±2.14	4.43±2.35	3.41±1.23	4.59±2.39	2.08±0.60	1.62±0.30	1.78±0.60
sep-02	4.65±2.75	2.54±1.61		7.71±5.21	13.80±3.64		1.34±1.14	3.73±0.62		1.80±0.31	1.99±0.55	
oct-02	0.70±0.36	3.21±2.85	1.59±0.62	11.74±5.65	12.32±3.58	8.15±3.19	4.55±2.28	4.44±1.47	4.52±2.07	1.90±0.64	1.80±0.21	2.30±0.94
nov-02	2.23±1.32	2.46±0.70		8.93±1.66	12.75±3.97		4.60±2.22	6.41±3.20		1.69±0.35	1.79±0.27	
dec-02	1.68±1.32	4.26±1.84	4.95±2.40	6.52±2.97	8.61±4.58	5.48±2.37	6.64±2.84	3.87±3.00	7.24±3.66	1.43±0.23	1.47±0.18	1.83±0.43
Mean	2.84 [2]	2.62 [1]	2.99	7.62	8.08 [3]	6.53 [2]	6.28	7.13	6.13	3.12 [2]	4.01 [1, 3]	3.49 [2]
CV (%)	39.5	47.2	35.3	54.2	43.5	40.9	38.8	35.0	30.7	45.9	56.8	50.2
Frequency of Sv changes (%)												
< Site 1		20.8	11.1		4.2	11.1		0.0	5.6		0.0	0.0
= Site 1		70.8	66.7		91.7	77.8		79.2	94.4		79.2	100.0
> Site 1		8.3	22.2		4.2	11.1		20.8	0.0		20.8	0.0

Superscript figures (1, 2, and 3) indicate significant inter-site differences of mean Sv values over the whole sampling period (Wilcoxon signed-rank test for paired data, P≤0.05). Surface density (Sv). Neutral lipid (NL) and lipofuscin (LF) contents. Lysosomal (L) and peroxisomal (P) systems.

3. Results and discussion

Systematic seasonal variations of the cellular biomarker surface densities were evidenced from one year to the other only for unsaturated neutral lipid Sv_{NL}, which displayed maximum values in spring and early summer, and minimum values in late summer and in autumn (Table 1). This parameter correlated positively with the chlorophyll a concentrations (r_S = 0,28; p = 0,040), suggesting that the neutral lipid content of this omnivorous amphipod was indirectly linked to the productivity of the food web.

Spatial trends are summarized in the last lines of Table 1. The mean values obtained on the whole sampling period show no significant differences between river sites (1 and 3). In comparison with the 'reference' (site 1), the gammarids collected in the reservoir (site 2) displayed significantly lower mean Sv_L and higher Sv_P. Lipofuscin contents where significantly superior at site 2 compared with site 3, and unsaturated neutral lipid levels also tended to be higher in *D. villosus* from the reservoir.

The three last lines of Table 1 indicate the frequency of significant differences between the monthly values. They show that significant differences between the relative reference (site 1), and both downstream sites were fairly rare. When significant differences occurred, they showed more frequent higher unsaturated neutral lipid and peroxisomal surface densities in the gammarids from the reservoir (site 2), lower lysosomal Sv_L in the latter and, inversely, more frequent higher Sv_L in *D. villosus* caught at site 3 with respect to site 1. Lipofuscin contents did not exhibit any clear spatial trend at either of the downstream sites; neither did Sv_{NL} and Sv_P at the third site.

The three first PCs were retained for the PCA. As evidenced on the F1-F3 correlation circle (Fig.1A), the first PC was mainly defined by the responses of the lipofuscin and unsaturated neutral lipid contents (respectively, high negative and positive loadings on the F1 axis). The F2 axis seemed mainly defined by the lysosomal Sv_L (not shown), and the third one by the peroxisomal Sv_P. The stress gradient seemed reflected on the F3 axis, as shown by the weight of the sites' centres of gravity on the factorial map F1-F3 (Fig.1B), with a distinction between river sites (1 and 3) on the one hand, and the reservoir on the other hand (site 2). The contribution of the spatial effect to the total variability was negligible and far from significance (2.0 %; p = 0.841), in contrast to the temporal effects (75.1 % ; p = 0.000).

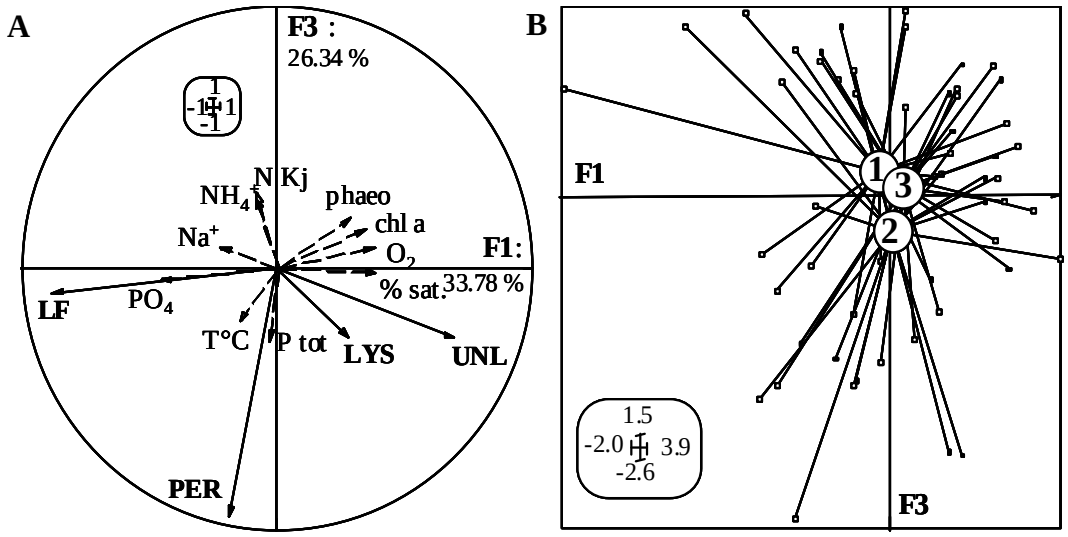


Fig.1. Results of the PCA of the first and third components defined by the five cellular and physiological biomarkers in *D. villosus* (60.20 % of the total variance). (A) Correlation circle defined by the four biomarkers (in bold); physicochemical and trophic parameters are projected as supplementary variables (dotted rows). (B) Factorial plane 1-3 of the sampling units: variability of scores among sites.

In this context, the suite of cellular biomarkers deployed in *D. villosus* did not seem powerful enough to discriminate between sites, even though the physico-chemical characterisation of the three sites has highlighted a stress gradient, with a deterioration of water quality in the range site 1 ≥ site 3 > site 2 (Guerlet *et al.*, 2007). The most degrading parameters between the upstream river site and the reservoir were high temperatures (never below 9°C in winter) and elevated dissolved copper concentrations (mean [Cu] = 42.0 µg.L^{-1}, ranging from 19.8 to 58.5 µg.L^{-1} in the reservoir, versus mean [Cu] = 4.4 µg.L^{-1}, ranging from 2.0 to 13.2 µg.L^{-1} at site 1).

In *D. polymorpha* studied in parallel in the same context (Guerlet *et al.*, 2007), the results of both PCAs conducted in 'native' and deployed mussels on the same four cellular biomarkers and a gonadal index, evidenced a higher site-discrimination potential of the biological responses in transplanted organisms (9.3 % of the total variability, p=0.0087), whereas the spatial effect was only close to being significant in 'native' ones (8.1 % of the total variability, p=0.0730). Hence, this could result from adaptation or compensatory mechanisms developed by the latter to chronic sub-lethal pollution levels. Such an accommodation to chronic stress of the freshwater gammarid *D. villosus* inhabiting the

reservoir may have also accounted for the lack of responsiveness in the cellular biomarker suite. Indeed, amphipods inhabiting metal-contaminated areas use the same physiological systems for handling trace metals as amphipods from control sites, but these systems are potentially more active in the first category of animals (Nassiri *et al.*, 2000). Amphipods detoxify metals such as copper by storing them in their ventral caeca, in the lysosomal system (presumably as a breakdown-product of metallothioneins) and these metals can be discharged into the lumen, in association with lipid globules, presumably by means of cell apoptosis (Nassiri *et al.*, 2000).

During this study, the mean copper body concentrations were significantly higher in animals from site 2 compared with both other sites (respective mean concentrations ± standard deviation in sites 1, 2 and 3 (in $\mu g.g^{-1}$): 106 ± 20; 135 ± 19; 113 ± 14) (Vinot, 2004). But copper could be metabolically unavailable through efficient detoxication systems. The reported body concentrations are nonetheless in the same order of magnitude, which seems to demonstrate the relative regulation ability of this species, contrarily to zebra mussels, who accumulated copper (respective mean concentrations ± standard deviation in sites 1, 2 and 3 (in $\mu g.g^{-1}$): 21 ± 7; 340 ± 180; 23 ± 10) (Vinot, 2004).

However, lysosomal Sv_L was more frequently inferior to controls in amphipods from site 2. This response of the lysosomal system is the opposite of lysosomal enlargement that is usually described in invertebrates exposed to metals or to increased salinity (Pipe and Moore, 1985; Antón *et al.*, 2000; Guerlet *et al.* 2007), which is somewhat surprising. It can be hypothesised that the detoxication cycle, involving metallothioneins (MTs) and the lysosomal breakdown of copper-bounded MTs and/or cellular renewal, may follow a discontinuous rhythm (Taylor and Anstiss, 1999), which rate does not correspond to the monthly sampling regime.

Lipofuscin is known to accumulate in response to elevated lipoperoxidation, while copper catalyses oxidative stress through Fenton reaction (Yin, 1996). However, lipofuscin only tended to be higher in the gammarids from site 2 and no pronounced oxidative stress was evidenced in *D. villosus* from the most metal-contaminated site. In the marine amphipod *Gammarus locusta*, lipoperoxidation increased as of one day of exposure to copper (4 $\mu g.L^{-1}$); however metallothionein induction exerted a protective effect against copper-catalysed oxidative stress from the 6th day, leading to a return of lipoperoxidation products to control levels (Correia *et al.*, 2002). Hence, efficient copper detoxication through metallothionein

binding, as well as enhanced peroxisomal detoxication of reactive oxygen species, is likely to have prevented large lipofuscin accumulation in the gammarids collected in the reservoir.

In contrast to *D. polymorpha*, which exhibited lipid depletions in the same context, amphipods had higher Sv_{NL} values in the most contaminated site than in the river. Hormetic effects of copper contamination were in evidence on the growth and the reproduction of *G. locusta* exposed to copper-spiked sediment (Correia *et al.*, 2001). Although copper is not the only variable factor among the three sites, such a hormetic effect on the energetic metabolism (and thus unsaturated neutral lipid levels) may also exist here. Further, the invasive potential of this Ponto-Caspian species may partly result from high tolerance to stress.

As for the technical applicability of this suite of cellular biomarkers in the freshwater gammarid *D. villosus*, the available tissue surface on the sections was sometimes limited because of the fragility of the tissues. Furthermore, the large amounts of lipid droplets could mask the other cellular contents and compartments and were likely to slightly skew the image analysis procedure when unsaturated neutral lipid contents reached their higher levels (underestimation of Sv_L, Sv_{LF} and Sv_P). But the collection of *D. villosus* was rather easy, including during moderated water risings, when other invertebrates such as bivalves may be unreachable.

4. Conclusion

To our knowledge, this represents the first report on the use of the freshwater Ponto-Caspian amphipod, *Dikerogammarus villosus*, for the implementation of a multiple biomarker approach. Admittedly, the deployment of the present cellular biomarker suite in bivalves seemed technically easier and more relevant to highlight a stress gradient, in this particular context (Guerlet *et al.*, 2007). This may partly result from differences in their patterns of metal accumulation and copper physiological requirements (haemocyanin synthesis in amphipods). Nevertheless, we think that the use of *D. villosus* in biomonitoring surveys deserves further investigation, owing to its current position in freshwater and brackish European ecosystems, considering both biomass and functioning. Cellular responses, which still tended to highlight spatial heterogeneity during this survey, could be studied in parallel with endpoints at other levels of the biological organization to compose a more powerful

biomarker suite. Furthermore, comparing biological responses to environmental stress in this invasive species and less competitive autochthonous gammarids could be of great interest.

5. Acknowledgments

Electricité De France funded this work and a material support was attributed to the laboratory by the CPER-ZAM (Contrat Plan Etat Regions, Zone Atelier Moselle). We acknowledge Philippe Wagner, Jean-François Poinsaint and Ingrid Vinot for their logistic assistance in the field, as well as Philippe Rousselle for technical support. Many thanks to Sharon Kruger for the final read of the English version.

6. References

Antón, A., Serrano, T., Angulo, E., Ferrero, G., Rallo, A., 2000. The use of two species of crayfish as environmental quality sentinels, the relationship between heavy metal content, cell and tissue biomarkers and physico-chemical characteristics of the environment. Sci. Total Environ. 247, 239-251.

Bentley, C.B., Hurd, H., 1995. Depressed protein and copper content of the midgut gland in an intermediate host, *Gammarus pulex* (Crustacea), infected with cystacanths of *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala). J. Invertebr. Pathol. 66, 1-5.

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. Aquat. Toxicol. 66, 267-278.

Cajaraville, M.P., Marigómez, J.A., Angulo, E., 1991. Automated measurement of lysosomal structure alterations in oocytes of mussels exposed to petroleum hydrocarbons. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 21, 395-400.

Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula, a practical approach. Sci. Total Environ. 247, 295-311.

Champeau, O. Narbonne, J.-F., 2006. Effects of tributyltin and 17ß-estradiol on immune and lysosomal systems of the Asian clam *Corbicula fluminea* (M.). Environ. Toxicol. Pharmacol. 21, 323-330.

Cheung, V.V., Depledge, M.H., Jha, A.N., 2006. An evaluation of the relative sensitivity of two marine bivalve mollusc species using the Comet assay. Mar. Environ. Res. 62, 301–305.

Correia, A.D., Costa, F.O., Neuparth, T., Diniz, M.E., Costa, M.H., 2001. Sub-lethal effects of copper-spiked sediments on the marine amphipod *Gammarus locusta*, evidence of hormesis? Ecotox. Environ. Restor. 4, 32-38.

Correia, A.D., Livingstone, D.R., Costa, M.H., 2002. Effects of water-borne copper on metallothionein and lipid peroxidation in the marine amphipod *Gammarus locusta*. Mar. Environ. Res. 54, 357-360.

Devin, S., Beisel, J.-N., Bachmann, V., Moreteau, J.-C., 2001. *Dikerogammarus villosus* (Amphipoda, gammaridae), another invasive species newly established in the Moselle River and French hydrosystems. Ann. Limnol. – Int. J. Lim. 37, 21-27.

Devin, S., Bollache, L. Noël, P.-Y., Beisel, J.-N., 2005. Patterns of biological invasions in French freshwater systems by non-indigenous macroinvertebrates. Hydrobiologia 551, 137-146.

Felten, V., Baudoin, J.M., Guérold, F., 2006. Physiological recovery from episodic acid stress does not mean population recovery of *Gammarus fossarum*. Chemosphere 65, 988-998.

Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., 2005. Altered exoskeleton composition and vitellogenesis in the crustacean *Gammarus sp.* collected at polluted sites in the Saguenay Fjord, Quebec, Canada. Environ. Res. 98, 89-99.

Giambérini, L., Cajaraville, M.P., 2005. Lysosomal responses in the digestive gland of the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*, experimentally exposed to cadmium. Environ. Res. 98, 210-214.

Guerlet, E., Ledy, K., Giambérini, L., 2006. Field application of a set of cellular biomarkers in the digestive gland of the freshwater snail *Radix peregra* (Gastropoda, Pulmonata). Aquat. Toxicol. 77, 19-32.

Guerlet, E., Ledy, K., Meyer, A., Giambérini, L. 2007. Towards a validation of a cellular biomarker suite in native and transplanted zebra mussels: A two-year integrative field study of seasonal and pollution-induced variations. Aquatic Toxicol. 81, 377-388.

Kutlu, M., Sümer, S., Özata, A., 2003. DT-Diaphorase [NADPH, Quinone Acceptor Oxidoreductase] in *Gammarus pulex*, Kinetics and some biochemical properties. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 71, 520-526.

Kutlu, M. Susuz, F., 2004. Biochemical properties of glutathione peroxidase in *Gammarus pulex*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 73, 432-436.

Manly, B.F.J., 1991. Randomization and Monte Carlo methods in biology. Chapman & Hall, London.

Mardsen, I.D., Rainbow, P.S., 2004. Does the accumulation of trace metals in crustaceans affect their ecology - the amphipod example? J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 300, 373-408.

Mc Loughlin, N., Yin, D., Maltby, L., Wood, R.M., Yu, H., 2000. Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. Environ. Toxicol. Chem. 9, 2085-2092.

Moore, M.N. 1985. Cellular responses to pollutants. Mar. Pollut. Bull. 16, 134-139.

Moore, M.N. 1988. Cellular and histopathological effects of a pollutant gradient -summary. Mar. Ecol. Progr.-Ser. 46, 109-110.

Nassiri, Y., Rainbow, P.S., Amiard-Triquet, C., Rainglet, F., Smith, B.D., 2000. Trace-metal detoxification in the ventral caeca of *Orchestia gammarellus* (Crustacea, Amphipoda). Mar. Biol. 136, 477-484.

Pipe, R.K., Moore, M.N., 1985. Ultrastructural changes in the lysosomal-vacuolar system in digestive cells of *Mytilus edulis* as a response to increased salinity. Mar. Biol. 87, 157-163.

Sanchez, P., Tarazona, J.V., 2002. Development of a multispecies system for testing reproductive effects on aquatic invertebrates. Experience with *Daphnia magna*, *Chironomus prasinus* and *Lymnaea peregra*. Aquat. Toxicol. 60, 249–256.

Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Nagel, R., Triebskorn, R., Köhler, H.-R., 2005. Endocrine effects in *Gammarus fossarum* (Amphipoda), Influence of wastewater effluents, temporal variability, and spatial aspects on natural populations. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 49, 53-61.

Schmitz, E.H., 1992. Amphipoda. Microscopic anatomy of invertebrates. In: Harrison, F.W., Humes, A.G. (Eds.). 9, Crustacea. Wiley-Liss, New York, pp. 443-528.

Schultz, T.W., 1976. The ultrastructure of the hepatopancreatic caeca of *Gammarus minus* (Crustacea, Amphipoda). J. Morphol. 149, 383-400.

Taylor, H.H., Anstiss, J.M., 1999. Copper and haemocyanin dynamics in aquatic invertebrates. Mar. Freshwater Res. 50, 907-931.

Triebskorn, R., Adam, S., Casper, H., Honnen, W., Pawert, M., Schram, M., Schwaiger, J., Köhler, H.R., 2002. Biomarkers as diagnostic tools for evaluating effects of unknown past water quality conditions on stream organisms. Ecotoxicology 11, 451-465.

Vinot, I. 2004. Impact des rejets de cuivre et zinc en milieu aquatique. PhD Thesis, Université de Metz, Metz, France. ftp://ftp.scd.univ-metz.fr/../pub/Theses/2004

Vinot, I., Pihan J.-C., 2005. Circulation of copper in the biotic compartments of a freshwater dammed reservoir. Environ. Pollut. 133, 169-182.

Weeks, J.M. 1992. Copper-rich granules in the ventral caeca of talitrid amphipods (Crustacea; Amphipoda, Talitridae). Ophelia 36, 119-133.

4 DISCUSSION GENERALE – COMPARAISONS DES TROIS ESPECES ET DEUX APPROCHES (PASSIVE ET ACTIVE)

4.1 COMPARAISONS AVEC LE MAXIMUM DE DONNEES DISPONIBLES

Afin de fournir une vision d'ensemble des résultats acquis au cours des 26 mois d'étude, le Tableau III.1.A.6 synthétise les tendances des biomarqueurs mesurés dans les tissus digestifs des quatre groupes expérimentaux d'organismes.

Tableau III.1.A.6. Résumé des principales tendances mesurées dans la réponse des biomarqueurs chez les quatre groupes expérimentaux d'organismes au cours de l'étude saisonnière de 26 mois

	Sv_L	Sv_{LF}	Sv_{LN}	Sv_P	IG
***D. polymorpha* transférées**	(+) cond., Cl^-, Na^+, pH, T°C, Cu	(+) Sv_P, Sv_{LN}	(+) chl a, sat, Sv_{LF}, pH (-) NH_4^+, PO_4^{3-}	(+) Sv_{LF} (-) Na^+, N_{Kj}, Cl^-, phéo, cond, NH^{4+}	Désynchronisé (+) T°C, chl a (-) SiO_2, NO_3^-, Zn, pH, O_2, Cu, sat
***D. polymorpha* natives**	(+) Cu, pH, SiO_2 (-) phéo, N_{Kj}, Sv_{LN}	(+) Sv_P, T°C, GI, Na^+ (-) O_2, sat, pH, NO_3^-	(+) chl a, phéo, GI, sat, N_{Kj} (-) PO_4^{3-}, Ptot, Sv_L, SiO_2	(+) Sv_{LF}, T°C, IG (-) Zn, O_2	Légèrement désynchronisé (+) T°C, Sv_{LN}, chl a, Sv_{LF}, Sv_P (-) SiO_2, NO_3^-, Zn
***C. fluminea* transférées**	(+) T°C	(+) Na^+, cond., T°C	(-) SiO_2	(+) phéo, Ptot (-) NO_3^-	
***D. villosus* natifs**	(+) (-) N_{Kj}	(+) Ptot, PO_4^{3-} (-) Sv_{LN}	(+) sat, O_2, chl a (-) PO_4^{3-}, Ptot, Sv_{LF}		

< = >

Fréquence des différences significatives des proportions de surface Sv chez les organismes de la station ② par rapport à ceux de la station ①. Les aires de couleur sont proportionnelles à la fréquence de ces différences.

Les corrélations significatives avec d'autres paramètres sont indiquées dans la case inférieure (r_S, $p<0.05$) et sont notées en couleur lorsqu'elles se retrouvent chez plusieurs organismes.

L : système lysosomal ; LF : lipofuscines ; LN : lipides neutres insaturés ; P : peroxysomes.

Les aires colorées sont proportionnelles aux fréquences des différences de moyennes entre les organismes des stations ② et ①. Ces fréquences ont été déjà présentées dans les trois

dernières lignes des tableaux 1 et 2 de l'Article 1, du tableau III.1.A.4 de la partie de résultats concernant les corbicules et du tableau 1 de l'Article 2. Les cases inférieures du tableau rappellent l'occurrence de corrélations significatives entre biomarqueurs et les autres facteurs disponibles. Les tendances conservées entre groupes d'animaux (dreissènes natives et transférées ou mollusques ou tous lots confondus) sont alors mises en évidence grâce à trois couleurs.

Le Tableau III.1.A.7 rappelle également les caractéristiques des ACP conduites à partir des valeurs des biomarqueurs chez ces quatre lots d'organismes.

Tableau III.1.A.7. Résumé des ACP et des analyses inter-groupes réalisées chez les quatre groupes expérimentaux d'organismes au cours de l'étude saisonnière de 26 mois

Catégorie	Nombre de mois (communs aux trois sites)	Axes pris en compte	% de variabilité expliquée	Analyse inter-groupes : contribution à la variabilité totale (%)	
				Effet temporel	Effet spatial
D. polymorpha transférées	17/26	F1-F2	56,1	70,3 (p = 0,0000)	9,3 (p = 0,0087)
D. polymorpha natives	15/25	F1-F2	71,3	62,7 (p = 0,0000)	8,1 (p = 0,0730)
C. fluminea transférées	11/26	F1-F2	61,5	48,3 (p = 0,0011)	10,4 (p = 0,0847)
D. villosus natifs	18/26	F1-F3	60,2	75,1 (p = 0,0000)	2,0 (p = 0,8411)

Les grands traits à retenir de ces deux tableaux et de l'ensemble des résultats sont discutés dans les paragraphes suivants.

4.1.1 La question de la saisonnalité…

La **variabilité temporelle** des réponses biologiques mesurées est considérablement plus importante que la variabilité spatiale, chez les quatre lots d'invertébrés étudiés.

Certains facteurs environnementaux semblent exercer une importante influence sur les biomarqueurs ou, du moins, varier de concert avec ces derniers car des corrélations

significatives ont été mises en évidence entre les données biologiques et les données physico-chimiques et trophiques, dont certaines communes à plusieurs lots d'organismes (Tableau III.1.A.6). Par exemple, la température présente une corrélation positive avec les proportions de surface du système lysosomal et des lipofuscines, ainsi qu'avec l'indice gonadique, chez deux lots d'invertébrés (mais pas systématiquement les mêmes). En outre, un lien entre la productivité primaire (et donc la quantité de nourriture) et les niveaux de lipides neutres insaturés est fortement suggéré par les corrélations entre chloropigments et Sv_{LN}, chez les deux lots de dreissènes et les gammares natifs ; il en va de même pour l'ACP construite à partir des résultats obtenus chez les corbicules. Ces tendances nécessitent une confirmation dans d'autres contextes *in situ* (et notamment au cours des études suivantes). De même, la nature de chaque relation demande à être vérifiée, notamment en conditions contrôlées. S'agit-il de relations de cause à effet directes, indirectes ou encore de simples concomitances ? La force de la relation entre Sv_{LN} et la chlorophylle a étant supérieure chez les dreissènes par rapport aux corbicules transférées, ceci suggère qu'il ne s'agirait pas d'une simple concomitance chez les bivalves, puisqu'il existe effectivement une dépendance trophique moins forte de la corbicule vis-à-vis du phytoplancton (elle est également racleur de sédiments).

En outre, hormis pour les lipides neutres, les résultats de cette étude suggèrent une **absence de « règles saisonnières » simples** sur le comportement des compartiments et contenus cellulaires étudiés, pouvant être résumées par des assertions du type « tel contenu cellulaire (ou le volume de tel compartiment) est maximal à telle saison, entre tel et tel mois » (cela resterait à confirmer en confrontant plus de deux années de données). Pourtant, comme évoqué plus haut, certains facteurs environnementaux semblent fortement liés aux réponses biologiques étudiées. Ainsi, le simple fait que les conditions environnementales, liées notamment à la météorologie, soient éminemment variables d'une année sur l'autre au niveau d'un même site peut expliquer cette absence de « règle saisonnière » fixe. En outre, lorsque des règles saisonnières se dessinent (pour les lipides), les valeurs peuvent être extrêmement différentes d'une année sur l'autre, en fonction des facteurs du milieu.

Ainsi, ces résultats ont mis en évidence l'absence de niveaux de base saisonniers des différents paramètres cellulaires étudiés, qui puissent servir de valeurs de référence. Il s'avère donc, pour le moment, impossible de s'affranchir d'une comparaison des valeurs avec celles obtenues sur un site de « référence relative ».

4.1.2 Pertinence de la batterie pour la mise en évidence d'une hétérogénéité spatiale…

Les **schémas de réponse des bivalves** concordent entre eux, mais diffèrent assez fortement de ceux des amphipodes (Tableau III.1.A.7). Lorsque des différences inter-sites significatives sont montrées (ce qui n'est pas le cas la majorité du temps), elles consistent plus fréquemment en une augmentation de la surface lysosomale, des niveaux inférieurs en lipides neutres insaturés et une accumulation accrue de lipofuscines chez les bivalves de la station la plus anthropisée (site ②).

Chacun de ces types de réponses est plus ou moins prononcé en fonction du groupe expérimental de mollusques et l'ordre des fréquences durant la période d'étude est le suivant :

- Système lysosomal (augmentation de Sv_L) :
  ⇒ dreissènes transférées > dreissènes natives > corbicules transférées
- Lipides neutres insaturés (diminution de Sv_{LN}) :
  ⇒ dreissènes natives > dreissènes *transférées* ≈ corbicules *transférées*
- Lipofuscines (augmentation de Sv_{LF}) :
  ⇒ corbicules transférées > *dreissènes* transférées ≈ *dreissènes* natives

Lorsque des fréquences très proches sont trouvées, le *dénominateur commun* est l'approche de biosurveillance active pour les niveaux de lipides neutres et, au contraire, l'espèce pour les lipofuscines.

Ainsi, la plus grande fréquence des déplétions de lipides chez les dreissènes natives pourrait résulter d'un stress chronique plus « installé » que chez les dreissènes et corbicules transférées (Bolognesi *et al.*, 2004 ; Nigro *et al.*, 2006 ; Guerlet *et al.*, 2007). Cette interprétation suggère donc une plus grande pertinence de ce biomarqueur à travers l'approche de biosurveillance passive.

Néanmoins, cette réponse supérieure des dreissènes natives aux facteurs de stress chroniques ne résulte pas nécessairement d'une sensibilité supérieure, puisque la moyenne annuelle de Sv_{LN} tend à être supérieure chez les dreissènes natives du site ② par rapport aux dreissènes transférées (3,3 et $2{,}7.10^{-2}$ µm.µm^{-2}, respectivement), de même que l'amplitude des

variations (coefficients de variation sur l'ensemble de la période de 157 et 102 %, respectivement). Ceci pourrait refléter une plus grande plasticité de la réponse des dreissènes natives par rapport aux transférées, une plus forte propension à mobiliser les réserves énergétiques et à les reconstituer facilement, témoignant de leur adaptation ou, au moins, de leur acclimatation à un environnement aux conditions plus difficiles. La question de la variabilité des réponses et de son intérêt comme critère d'évaluation croisé avec les valeurs moyennes sera abordée plus en détail dans la 2ème partie de ce Chapitre III.

Une légère différence dans le même sens est également visible à propos de l'accumulation de lipofuscines, à savoir une fréquence très légèrement supérieure, de même qu'une moyenne et un coefficient de variation supérieurs chez les dreissènes natives par rapport aux transférées (Sv_{LF} = 3,2 contre 2,6 $.10^{-5}$ $\mu m^2.\mu m^{-3}$; CV = 55,7 contre 48,4 %).

Néanmoins, l'accumulation de lipofuscines semble également répondre à des critères plus propres aux espèces, puisque la proximité des résultats est plus importante entre lots de dreissènes qu'entre lots de bivalves transférés. Les moyennes indiquent que les niveaux de lipofuscines des corbicules sont plus bas que chez les dreissènes, mais plus tranchés entre stations.

Le **schéma de réponse des gammares**, est différent de ceux des bivalves. Il est encore moins discriminant, malgré le nombre plus important de mois où les comparaisons entre les sites sont possibles. Lorsque des différences existent entre le site ② et le site ①, il s'agit le plus souvent de :

- Lipides neutres insaturés plus abondants ;
- Système lysosomal moins volumineux ;
- Système peroxysomal plus volumineux ;
- Tendance à l'accumulation des lipofuscines.

En se référant aux résultats des analyses inter-classes relatives à l'effet spatial (Tableau III.1.A.7) la **pertinence de la batterie de biomarqueurs chez les différentes espèces ou selon l'approche** (passive ou active) semble décroissante selon l'ordre suivant :
⇒ dreissènes transférées > dreissènes natives > corbicules transférées > gammares natifs.

Néanmoins, une limite réside dans le manque d'homogénéité entre les données comparées. En effet, les ACP ont été construites à partir des données mensuelles complètes, c'est-à-dire disponibles simultanément aux trois stations d'étude. Par exemple, le plus fort pouvoir discriminant des données intégrées dans l'ACP des dreissènes transférées par rapport à celle des dreissènes natives peut éventuellement résider dans le nombre plus important de mois entrant dans l'analyse (17 contre 15) et également à la nature de ces mois.

C'est pour cette raison que le paragraphe suivant s'attache à comparer les différents lots d'animaux sur des bases identiques.

4.2 COMPARAISONS EN CONDITIONS HOMOGENES

Le tableau III.1.A.8 résume les conditions de réalisation et résultats d'ACP complémentaires, réalisées de façon à comparer les données des quatre différents lots d'organismes de façon homogène.

Lorsque le nombre de mois entrant dans l'analyse se trouve ainsi réduit, plus aucun lot ne montre d'effet spatial véritablement significatif, mais il est tout de même possible de comparer l'importance de la variabilité expliquée par l'hétérogénéité spatiale et le degré de « non significativité ».

La **comparaison entre biosurveillance active et passive** chez les dreissènes semble toujours montrer un plus fort pouvoir discriminant de la batterie complète (quatre biomarqueurs cellulaires et un biomarqueur physiologique) chez les dreissènes transférées.

Tableau III.1.A.8. Résumé des ACP réalisées chez les quatre lots d'organismes sur des mois identiques dans un but comparatif

Lots	ACP n°	Nombre de descripteurs	Nombre d'objets	Axes pris en compte	% de variabilité expliquée	Analyse inter-groupes : contribution à la variabilité totale (%)	
						Effet temporel	Effet spatial
Dreissènes transférées	2	5	30 (10 mois x 3 sites) Mois : févr, juin, juil, sept, oct, nov 2001, mai, juin, juil, oct 2002	F1 x F2	58,00	65,69 (p = 0,0000)	11,65 (p = 0,0633)
Dreissènes natives	3				70,68	57,88 (p = 0,0000)	9,51 (p = 0,1964)
Dreissènes transférées	5	4	24 (8 mois x 3 sites) Mois : févr, juin, juil, sept, oct, nov 2001, mai, juin, juil, oct 2002	F1 x F2	61,51	63,99 (p = 0,0000)	12,06 (p = 0,1825)
Dreissènes natives	6				73,76	56,66 (p = 0,0008)	12,97 (p = 0,1519)
Corbicules transférées	7				61,99	46,01 (p = 0,0080)	14,17 (p = 0,0734)
Gammares natifs	8				69,90	78,10 (p = 0,0000)	2,80 (p = 0,9613)

La **comparaison entre espèces sentinelles** montre que :

- l'ordre de pertinence suggéré par les comparaisons avec un maximum de données (voir Tableau III.1.A.7 et paragraphe 4.1.2) n'est plus conservé :

⇒ corbicules transférées > dreissènes natives > dreissènes transférées > gammares natifs.

- en conditions homogènes (c'est-à-dire en ne conservant plus que les 8 mois communs à tous les lots, ainsi que les seuls biomarqueurs cellulaires), la pertinence de la batterie, est cette fois-ci plus importante chez les corbicules que chez les dreissènes transférées. Ce phénomène semble fortement lié au retrait, dans l'ACP, des données de l'indice gonadique, qui étaient responsables d'une part importante de la pertinence de la batterie dans l'ACP des dreissènes transférées (Guerlet *et al.*, 2007). La comparaison entre ces deux lots mériterait d'être renouvelée une fois que les indices gonadiques des corbicules auront été déterminés (Laure Giambérini, indice en cours de développement).

- la batterie de biomarqueurs étudiée, dans ce contexte, chez *D. villosus*, reste la moins pertinente de toutes pour la mise en évidence d'une hétérogénéité spatiale entre ces trois sites. Bien que ces trois espèces fassent partie des espèces non-indigènes bien établies dans les hydrosystèmes du nord-est de la France et partagent des traits biologiques et écologiques qui contribuent à leur potentiel invasif, tels que l'eurythermie pour *D. polymorpha* et *D. villosus* (Devin *et al.*, 2005 ; Wijnhoven *et al.*, 2003), ce dernier peut présenter un potentiel de résistance aux facteurs de stress de la retenue du Mirgenbach (cuivre, chorures…) supérieur à celui des bivalves. Sur les populations de la Moselle, il a été effectivement montré que ce gammare est nettement plus résistant que la corbicule à la salinité, avec des CL_{50} respectives de 28 ‰ après 48 h (Devin, 2003), contre seulement 4,65 ‰ après 24 h (Devin, 2000), sachant que la salinité de la Moselle se situe aux alentours de 1,7 – 1,9 ‰, plaçant donc celle de la retenue autour de 2,4 – 2,6 ‰. De plus, son régime alimentaire opportuniste, nettement plus diversifié que celui des bivalves, le soumet potentiellement moins fortement à des effets toxiques indirects des contaminants métalliques sur la ressource microalgale. Enfin, le cuivre entre dans la composition de l'hémocyanine, et les cæca hépatopancréatiques des amphipodes pourraient justement jouer un rôle dans l'hémopoïèse (Bentley & Hurd, 1995), ce qui pourrait également expliquer une tolérance supérieure au cuivre de *D. villosus* par rapport aux bivalves. Malheureusement, si des données de toxicité du cuivre pour les bivalves sont disponibles (ex : $LOEC_{10h}$ (perturbation de la filtration) = 15 $\mu g.L^{-1}$ chez *D. polymorpha*, d'après (Mouabad & Pihan, 1992), il ne semble pas que cela soit le cas, à notre connaissance, pour cette espèce de gammare. Or les variations de sensibilité semblent relativement importantes chez les différentes espèces de gammares et selon les conditions de test (voir les tableaux I-11 et I-13 de la thèse de Vinot (2004), ce qui rend difficile la comparaison entre bivalves et amphipodes en général.

L'élucidation du rôle des processus d'adaptation (génétique, sur une longue échelle de temps), d'acclimatation ou accommodation mériterait des investigations supplémentaires. Dans cette optique, les études peuvent se concentrer sur la différence de résistance de ces espèces, et parmi elles, de populations soumises à une pression anthropique plus ou moins

prononcée ou à un bruit de fond naturel en métaux important, par exemple (Nassiri *et al.*, 2000 ; Mardsen & Rainbow, 2004 ; Zaldibar *et al.*, 2006).

L'ensemble des résultats de cette étude a orienté nos choix d'espèces, de composition de la batterie et de type d'approche dans l'étude suivante, en considérant de concert la pertinence des résultats et des aspects d'ordre plus pratique (voir l'introduction du point B de cette partie du Chapitre III, qui suit).

B. Etude de la persistance spatiale et temporelle des réponses cellulaires et de l'indice de condition chez *D. polymorpha*

Programme National / ACI-FNS :
«ECCO» ECosphère COntinentale : processus et modélisation.
Action thématique « ECODYN » ECOtoxicologie et écoDYNamique des contaminants.

Conséquences écotoxicologiques de la confluence de la Fensch avec la Moselle et étude intégrée de l'écodynamique de la pollution métallique et organique.

1 INTRODUCTION

Cette étude a été menée dans le cadre du programme national « ECosphere COntinentale : processus et modélisation » (ECCO), et plus particulièrement de son action thématique « ECOtoxicologie et écoDYNamique des contaminants » (ECODYN), mise en place par l'Institut National des Sciences de l'Univers (INSU) du CNRS. ECODYN associe « l'étude du devenir des contaminants au sein des milieux continentaux (approche « écodynamique »), à celle des transferts vers les êtres vivants et des perturbations structurales et fonctionnelles engendrées sur les différents niveaux d'organisation biologique (approche écotoxicologique) ».

Les résultats qui suivent ont été, plus particulièrement, acquis au sein du volet « Conséquences écotoxicologiques de la confluence de la Fensch avec la Moselle et étude intégrée de l'écodynamique de la pollution métallique et organique » (Masfaraud *et al*., 2005).

La Fensch est un petit affluent de la Moselle de 14 km de long et qui draine un bassin-versant de 83 km² (contre les 28 150 km² occupés par celui de la Moselle, principal affluent du Rhin). Au cours de la révolution industrielle, la vallée de la Fensch connut une implantation massive de l'industrie lourde (notamment minière) et elle est encore de nos jours le siège d'une activité industrielle importante (cokerie, aciérie, laminoir). Le cours d'eau qui draine cette vallée s'en trouve donc fortement anthropisé, avec une pollution à la fois organique (HAP, effluents de stations d'épuration) et métallique. Les investigations se sont portées sur les impacts de sa confluence avec la Moselle sur la qualité des différents

compartiments de la rivière (eau, matières en suspension, sédiments), sur la présence de micro-organismes polluorésistants (résistance aux métaux et dégradation des hydrocarbures) et sur l'état de santé d'espèces sentinelles animales (*D. polymorpha* et *C. fluminea*) et végétale (*Fontinalis antipyretica*), en tenant compte de la biodisponibilité de certains contaminants.

La mise en œuvre de cette étude régionale en Lorraine a impliqué de nombreux acteurs dans les laboratoires suivants, sous la responsabilité de Laure Giambérini et Jean-François Masfaraud :

- le LIEBE (anciennement Laboratoire ESE) UMR 7146, CNRS–UPVM (Metz), au sein duquel ont été abordés les effets de la confluence sur le compartiment microbien, les bryophytes et les bivalves ;
- le LEM UMR 7569, CNRS–INPL (Vandœuvre les Nancy), où ont été analysés et caractérisés les polluants métalliques sur diverses matrices ;
- le G2R UMR 7566, CNRS–UHP Nancy I (Vandœuvre les Nancy), en charge de l'analyse des polluants organiques.

Les résultats relatifs au volet « biomarqueurs cellulaires » acquis dans ce cadre alimentent principalement le **troisième axe de recherche** adopté dans ces travaux de doctorat, qui concerne la valeur pronostique des outils utilisés. La question du lien entre des effets aux niveaux subcellulaire, tissulaire et physiologique est ici abordée, ainsi que la chronologie des évènements le long de l'échelle de l'organisation biologique.

Afin d'apporter des éléments de réponse à la délicate question de la réversibilité des effets et de compiler des données pour une future identification des seuils de non-compensation et d'irréversibilité, des transferts de décontamination ont été menés en parallèle.

Enfin, les données disponibles concernant la contamination du milieu et la physico-chimie classique de l'eau fournissent des indications utiles à l'exploration des **premier** et **second axes de recherche**, respectivement (pertinence de la batterie de biomarqueurs et influence d'autres facteurs).

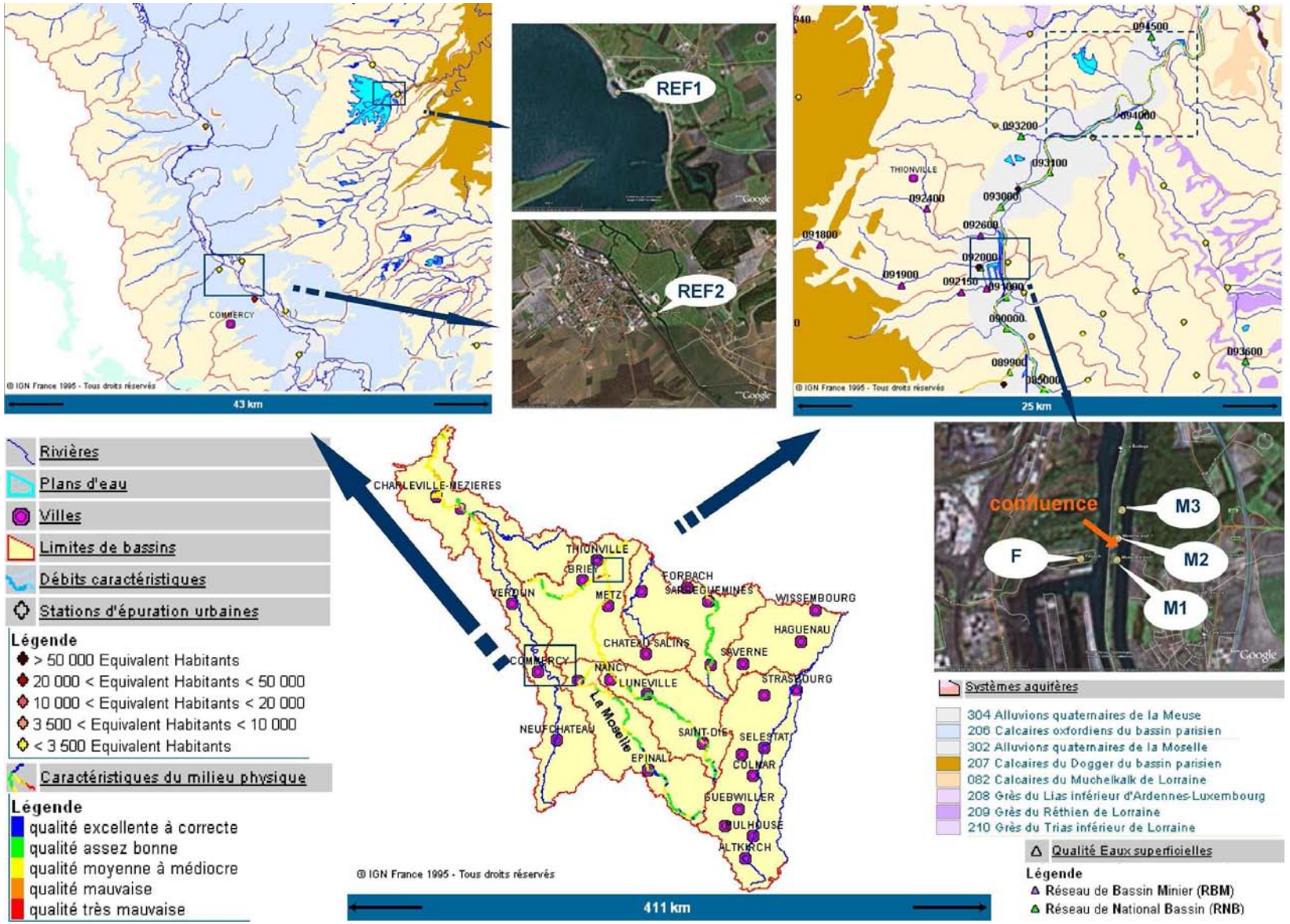


Figure III.1.B.1. Présentation des sites d'étude utilisés lors du programme ECCO-ECODYN (Sources : SIERM et Google Earth)
[NB : Noter la localisation des sites de l'étude saisonnière à long terme à l'aval des stations du programme ECODYN (cadre en pointillés)].

2 EXPERIMENTATIONS *IN SITU* : REPONSES DES BIOMARQUEURS CELLULAIRES ET INDICES DE CONDITION CHEZ *D. POLYMORPHA* TRANSFEREE SUR LA FENSCH ET SUR LA MOSELLE, A L'AMONT ET L'AVAL DE LA CONFLUENCE. ETUDE DE LA REVERSIBILITE DES REPONSES

Article 3.

Guerlet E., Vasseur P., Giambérini L.

Spatial and temporal persistence of cellular responses to environmental pollution in the freshwater zebra mussel, *Dreissena polymorpha*

Prochainement soumis à Environmental Research

(après modifications mineures)

RESUME DE L'ARTICLE EN FRANÇAIS

Cette étude s'est déroulée sur deux ans. La première expérimentation *in situ* a eu lieu au printemps et à l'été 2004, la seconde durant la même période en 2005.

2.1 EXPERIMENTATION N°1 (PRINTEMPS-ETE 2004) : ETUDE DE LA REVERSIBILITE

Les différentes stations étudiées (voir Figure III.1.B.1) sont les suivantes :

- la station F, située sur la Fensch, quelques dizaines de mètres avant la confluence ;
- la station M1, au niveau de la Moselle, à environ 100 mètres à l'amont de la confluence ;
- la station M2, située à environ 100 m à l'aval de la confluence.

Le choix s'est porté, dans un premier temps, sur une biosurveillance active avec *D. polymorpha*, en raison de la pertinence de cette dernière approche lors de l'étude

saisonnière à long terme, et de la disponibilité d'effectifs importants au niveau du site d'origine de ces bivalves. Ce dernier est situé dans le plan d'eau artificiel de la Madine (1100 ha), réservoir d'eau potable et siège d'activités de loisir situé dans le département de la Meuse, qui est considéré comme une référence relative (notée Ref1).

La première expérimentation (2004) consiste en un suivi sur 90 jours de la réponse de la batterie de biomarqueurs chez des dreissènes transférées. Après 15 jours d'exposition, cette occasion, un transfert de décontamination d'une durée de 15 jours vers le site d'origine Ref1 est également réalisé, afin d'apporter des éléments de réponse à la question de la réversibilité des effets biologiques (voir la représentation schématique du plan expérimental, Figure 1 de l'Article 3).

Les réponses biologiques étudiées sont :

- la morphologie du système lysosomal (Vv_L, Nv_L, S_L/V_L), du contenu tissulaire digestif en lipofuscines (Sv_{LF}) et en lipides neutres insaturés (Sv_{LN}) ;
- l'occurrence d'éventuelles atteintes histopathologiques ;
- l'évolution de la condition (IC_1) ;
- et une simple vérification de la survie dans les lots prélevés.

Elles sont analysées à la lueur des informations disponibles concernant la biodisponibilité des contaminants (concentrations corporelles en métaux et HAP).

Les réponses biologiques, selon le gradient de perturbation M1<M2<F, sont les suivantes :

- **Manifestations cellulaires précoces** : diminution importante des quantités en lipides neutres insaturés, d'autant plus précoces que la contamination est importante (dès 3 jours pour la station F) ; aux stations M1 et M2 : gonflement lysosomal à 3 jours ; à la station la moins anthropisée (M1) : accumulation ponctuelle importante de lipofuscines à 3 jours ;
- **Manifestations cellulaires plus tardives (à partir de 15 jours) :** diminution des paramètres lysosomaux (c'est-à-dire des proportions volumique, de surface et numérique et de la taille individuelle des particules), initiée d'autant plus tôt que la

station est fortement contaminée ; poursuite de la déplétion extrême en lipides neutres, dont le degré correspond au gradient de contamination ;

- **Manifestations plus tardives aux niveaux supérieurs de l'organisation biologique** : absence d'atteintes histopathologiques, mais indice de condition diminué à partir de 15 jours ; mortalité croissante le long du gradient (pour atteindre 100 % entre 30 et 90 jours sur la Fensch).

La période de post-exposition de 15 jours n'induit aucune dépuration des métaux, mais elle permet, en revanche, une dépuration totale des HAP. Cette période ne conduit pas à une restauration des paramètres cellulaires et de l'indice de condition, mais permet néanmoins de "freiner" la déplétion en lipides, et se traduit également par une accumulation de lipofuscines chez les moules précédemment exposées à la station F, signe d'une détoxication active (accumulation de déchets de la lipoperoxydation). Un effet bénéfique évident du transfert de décontamination sur la survie est mis en évidence.

Les corrélations calculées à partir des données sur la biodisponibilité des contaminants indiquent que des concentrations corporelles croissantes en métaux (à l'exception du cadmium), et en HAP (12 parmi les 16 listés par l'US-EPA), correspondent généralement à un nombre accru et une taille individuelle plus faible des lysosomes et une condition réduite.

2.2 EXPERIMENTATION N°2 (PRINTEMPS-ETE 2005) : ETUDE D'UN GRADIENT SPATIAL PLUS ETENDU

La seconde année, après analyse des résultats précédents, la station F n'est plus étudiée afin de prendre en compte une situation de stress plus nuancée et en raison d'effets létaux trop prononcés au niveau de cette station. En revanche, une troisième station (M3) est placée dans la Moselle, à 300 m à l'aval de la station M2 (voir Figure III.1.B.1) afin d'étudier la persistence des effets le long d'un gradient plus étendu. Pour des raisons pratiques, une autre station de référence (Ref2) a été choisie dans la rivière Meuse. Cette étude réalisée en 2005 implique à la fois l'utilisation de dreissènes transférées originaires de Ref2, mais également de corbicules natives de la station M1, encagées et transférées aux sites M2 et M3 (aucune dreissène native n'ayant été trouvée sur M1). Les résultats relatifs aux corbicules ne sont pas traités dans l'article 3, mais dans le paragraphe suivant (voir le point 3 de cette section de résultats).

Les résultats relatifs au compartiment lysosomal, au contenu cellulaire en lipides neutres insaturés et à l'indice de condition montrent des tendances analogues à celles observées l'année précédente, mais celles-ci s'avèrent moins tranchées. Une accumulation en lipofuscines est mise en évidence à la station de contamination intermédiaire (M3) à la fin de l'expérimentation (30 jours). Le degré de stress croissant selon le gradient M1≤M3<M2 est néanmoins suggéré par les autres réponses biologiques des dreissènes (mortalité comprise).

Par rapport à 2004, des corrélations analogues entre réponses biologiques et concentrations corporelles en contaminants sont mises en évidence.

Au final, certains de ces résultats, atypiques par rapport à ceux précédemment obtenus en milieu d'eau douce (diminution des paramètres lysosomaux le long du gradient, accumulations de lipofuscines aux stations moyennement contaminées ou encore aux sites faiblement anthropisés après exposition préalable à une contamination intense), soulignent la nécessité d'acquérir des connaissances supplémentaires sur les mécanismes de toxicité au niveau subcellulaire, selon les types de contamination.

Spatial and temporal persistence of biological responses to environmental pollution in the freshwater zebra mussel.

Edwige Guerlet [a], Paule Vasseur [a], Laure Giambérini [a] *

[a] Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes, UMR CNRS 7146; Université Paul Verlaine – Metz; Rue Général Délestraint; F-57070 Metz, France.

* Corresponding author, Tel: +33 (0) 387 378 415; fax: +33 (0) 387 378 512; e-mail address: giamb@univ-metz.fr

Abstract

The validation of a suite of cellular biomarkers for biomonitoring studies necessitates a good knowledge of the meaning of early responses to environmental stress in terms of individual health. This requires confirmation of linkages between the cellular and higher levels of the biological organisation, as well as the reversibility of these cellular responses to stressors. With this aim, field experiments were performed on deployed freshwater zebra mussels in the vicinity of the confluence of a small heavily anthropised stream with a larger river. The investigations focused on the cellular, tissular and individual levels, and the persistence of the measured responses was tested both after a depuration-transplantation and at an increased distance from the confluence. This study demonstrated various degrees of stress persistence after an initial exposure to a pollution-gradient, followed by two weeks of depuration at the site of origin, and has produced the first clues in the investigation of the sensitivity of Dreissena's cellular biomarkers to more or less subtle variations of environmental contamination. Decreased digestive lysosomal volume and unsaturated neutral lipid contents, and lipofuscin accumulation preceded effects on the mussels' condition. Relationships were found between the biological responses and the tissular concentrations in some metals and PAHs, which suggests their probable relevance as early warning tools for the assessment of environmental stress-induced impairments of the biota's health. Moderate positive effects of the depuration period were evidenced by a limitation of the neutral lipid depletion and mortality, and by higher lipofuscin contents, interpreted as an accumulation of detoxication endproducts. The results have also underlined the necessity of carrying out further investigation for a better understanding of the various response patterns of cellular

biomarkers in freshwater molluscs experimentally exposed to different classes of contaminants.

Keywords

Program ECCO – ECODYN; suite of biomarkers; lysosomes; lipofuscin; unsaturated neutral lipids; condition index; recovery.

Abbreviations

L, lysosomes; LF, lipofuscin; NL, neutral lipids; Nv, numerical density; Sv, surface density; S/V, surface-to-volume ratio; Vv, volume density; CI, conditon index.

Funding

This work was funded by the Program 'ECCO-ECODYN' of the CNRS-INSU and by the 'Zone Atelier Moselle' of the Lorraine Regional Council.

1.Introduction

In both laboratory and field studies, cellular endpoints in molluscs have shown a great precocity and sensibility in response to exposure to selected metals or xenobiotics, complex mixtures of contaminants and various environmental stress factors such as temperature, starvation, salinity or hypoxia (Moore, 1985, 1988; Cajaraville *et al.*, 2000; Au, 2004). When compensation mechanisms are overwhelmed, pathological effects at the tissular or whole-organism level may accompany cellular responses. The lysosomal system plays a crucial role in maintaining homeostasis; perturbations of these organelles may impair the physiology and induce, for instance, alterations in heart rate (Wedderburn *et al.*, 2000). Cellular lipid depletions may cause energy losses and an increased vulnerability of the organisms (Lemly, 1996) and/or impaired growth (Smolders *et al.*, 2004). Actually, the link is rarely shown between these early changes and proven subsequent effects at the whole organism level in biomonitoring studies (Moore, 2004). Further, when wondering from which degree of cellular responses deleterious effects are likely to occur on individual fitness, on population and community dynamics and structure or on the full ecosystem health, uncertainty grows as one ascends the hierarchical ladder of the biological organisation (Moore, 2004; Smolders *et al.*, 2004).

Concomitantly assessing early biological responses to environmental stress and medium-term effects at a higher – but relatively close – level of the biological organisation may thus provide the first clues to attempt to highlight compensation thresholds, beyond which deleterious effects for individual health may appear.

The determination of such thresholds also requires studying the reversibility of the aforementioned early responses, after a return to initial and/or more favourable conditions. Recovery of lysosomal membrane stability was evidenced in flatfishes and marine mussels several months after major pollution events (Einsporn *et al.*, 2005; Cajaraville *et al.*, 2006). Freshwater fishes placed in clean water for two months after semi-field exposure to a contaminated stream exhibited total recovery from hepatic cytological alterations that included increased numbers of the lysosomes (Gernhöfer *et al.*, 2001). The marine snail, Littorina littorea, was experimentally exposed for 5 days to 335 µg.L^{-1} fluoranthene and showed lysosomal destabilisation. After an 8-day recovery period lysosomal stability returned to control levels (Lowe *et al.*, 2006). Marine mussels from a Zn-polluted site exhibiting enlarged digestive lysosomes showed a reduction of their lysosomal size after short-term depuration in clean water in the laboratory (Etxeberria *et al.*, 1994). On the contrary, deleterious effects of toxin-producing microalgae on the lysosomal membrane stability were maintained after a recovery period in the oyster, Crassostrea virginica (Keppler *et al.*, 2005).

Such data on the reversibility of cellular responses to stress is available in marine organisms and freshwater fishes. Studies on the recovery potential of impaired cellular functions in freshwater invertebrates are now needed.

With this aim, field experiments were performed on deployed freshwater bivalves, in spring-summer 2004 and 2005 in the vicinity of the confluence of a small heavily anthropised stream with the River Moselle (north-eastern France). The investigations focused on cellular, tissular and individual levels, and the persistence of the measured responses was tested both after a depuration-transplantation and at an increased distance from the confluence.

2. Materials and methods

2.1. Context and study sites

The two experiments were conducted in the framework of the national program “Ecosphere continentale - Ecotoxicologie et Ecodynamique des Contaminants” (ECCO-ECODYN) of the CNRS-INSU. The present results are part of a regional study in Lorraine (north-eastern France) meant to characterize the ecodynamics of metallic and organic

contaminants and their ecotoxic effects in the area of confluence of two streams, the Fensch and the river Moselle. The river Moselle is the main affluent of the Rhine and drains a watershed of a total area of 28 150 km². The valley of the Fensch, a 14-km long tributary occupying a small watershed of 83 km², used to be highly industrialised in the first half of the 20th century, and is still occupied by an important industrial activity, including steelworks and coal industry. Domestic sewage and drainage of urban surfaces also generate significant pollution inputs. At the confluence, the flow rates of the Moselle and the Fensch are about 146 and 2.45 $m^3.s^{-1}$ respectively.

Three sites were chosen for the implementation of the first experiment (spring-summer 2004): one station in the Fensch (49°19.869 N, 006°09.847 E, referred to as "F") and two other sites ("M1": 49°19.836 N, 06°10.118 E and "M2": 49°29.027 N, 006°10.153 E) located in the River Moselle approximately 100 m upstream and downstream from the confluence. Descriptions of the sediment's extractable organic matter (EOM) at the molecular scale (Jeanneau *et al.*, 2006) and of the mineralogy and composition of the waters, suspended particles and sediments (Montarges-Pelletier *et al.*, 2007) were performed in parallel.

In light of the results obtained during the first campaign, a third station located 300 m further downstream from the confluence was studied in the river Moselle ("M3": 49°20.05 N, 06°10.10 E) during the second experiment (spring-summer 2005), and the ecotoxic effects on transplanted mussels were not studied anymore at the F site.

For the sampling of the mussels and the "depuration"-transplantation in the first experiment (2004), a relative reference site was selected in Lake Madine, a drinking water reservoir ("Ref1": 48°55.03 N, 005°44.05 E). For practical reasons, the site where mussels were collected before the deployment in the river Moselle was located in the river Meuse, another relative reference site ("Ref2": 48°45.22 N, 005°36.23 E) during the second campaign (2005).

2.2. Animals' deployment and sampling

First field study (spring-summer 2004: depuration-transplantation)

About 1 100 specimens of zebra mussels, Dreissena polymorpha, were collected on the 28th of May 2004 on buoys and their chains at Ref1 and kept in the laboratory in continuously aerated water of origin with daily food supply. They were measured and evenly distributed into 30 cages made of garden netting, containing natural ropes as a fixation substratum. One

week after the collection, 10 cages were transplanted to each of the sites M1, M2 and F. Two cages per station were sampled at each site after 3, 15, 30 and 90 days of exposure. At day 15, 2 cages per site were deployed back to Ref1 and collected 15 days after the depuration-transplantation (hence at day 30). This experimental design is summarised on Figure1.

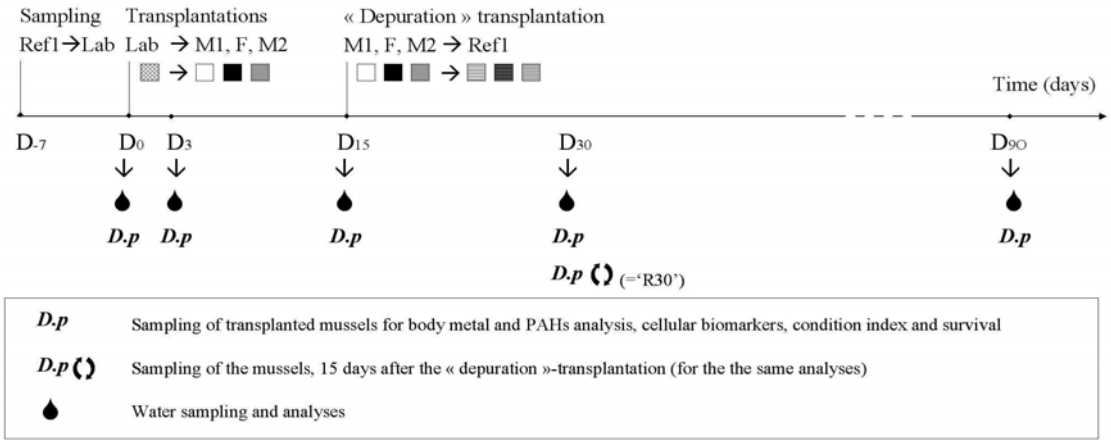


Figure 1. Experimental design for the first field study (spring-summer 2004).

Second field study (spring-summer 2005: increased spatial gradient)

About 860 zebra mussels were handpicked on the shores at Ref2, kept in the laboratory and encaged in the same conditions as described above, and 18 cages were transplanted to the sites M1, M2 and M3 for 3, 15 and 30 days.

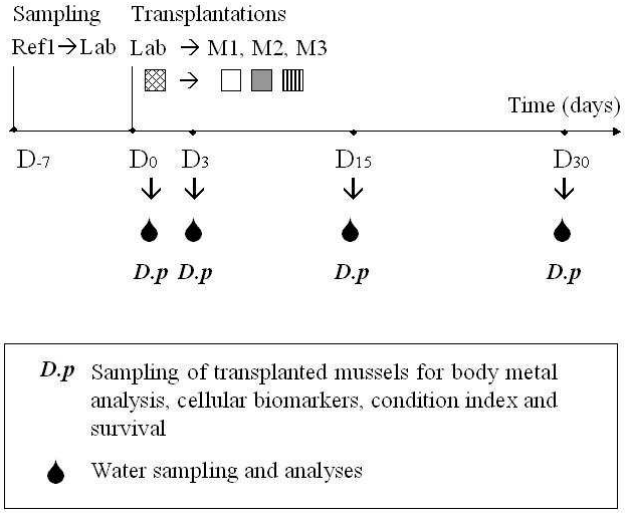


Figure2. Experimental design for the first field study (spring-summer 2004).

2.3. Water sampling and analyses

At each sampling date, water conductivity and pH were measured directly in the field. Water was sampled in 2 L-polyethylene tanks and rapidly acidified (1% HNO_3) for the determination of cations by flame AAS (Perkin-Elmer Aanalyst 100) or by graphite furnace AAS (Varian Spectra-300), and of anion concentrations by ion exchange chromatography (Dionex). The chemical oxygen demand and 5-day biochemical oxygen demand (COD and BOD_5) were evaluated by volumetric and oximetric methods, respectively, and suspended matter (SM) by gravimetric method. Surface water samples were placed in opaque bottles (2 L) for analysis of chlorophyll a and phaeo-pigments using the Lorenzen spectrophotometric method.

Metal concentrations in water were monitored in spring-summer 2005 at day 3 : Fe, Cu, Zn, Mn and Mg were dosed by flame AAS, Cd, Cr, Ni, Al and Pb by graphite furnace AAS, on filtered and acidified water (1% HNO_3).

2.4. Survival, biometry and tissue preparation

At each sampling date, 2 cages per site were rapidly carried back to the laboratory in the water of origin and dead animals were counted.

For the determination of metal and PAHs body burdens, the soft tissues of 17 to 24 individuals were removed from the shells, mopped up on absorbent paper and frozen at -20°C in polyethylene bags.

The shells of 8 individuals (19.9 ± 1.8 mm in spring-summer 2004 or 23.8 ± 1.6 mm in spring-summer 2005) were cleaned of any surface deposit or epibiont using a scalpel and absorbent paper. Their maximum length, height and width were measured with a calliper rule to the nearest 0.01 mm. The soft tissues were then removed and excess body fluid absorbed with absorbent paper. The soft tissue wet weights were obtained on a Precisa electronic balance to the nearest 0.1 mg.

The digestive glands of the same individuals were cryoprotected, frozen and cut for histochemical staining as described in Giamberini and Cajaraville (2005).

During the second experiment (Spring-summer 2005), only part of the digestive glands were excised for histochemistry and all the remaining tissues were fixed in Bouin’s Fixative for the assessment of histopathological effects.

2.5. Metals and PAHs tissular concentrations

Metal analysis was performed on triplicates of 4 individuals. All samples were dried (70°C) to a constant weight (around 95 mg per triplicate), ground in a mortar and digested by acid attack (HNO_3, 36%) (Vinot and Pihan, 2005). Cu, Fe and Zn were dosed by flame AAS, Ni, Pb, Cd and Cr by graphite furnace AAS.

The quantification of the 16 PAHs listed by the US-EPA was performed at the laboratory G2R UMR 7566 CNRS/UHP (Nancy, North eastern France) by coupled GPC-MS after specific extraction and purification steps (adapted from Baumard *et al.*, 1997, 1999; Camus *et al.*, 2003; Orbea *et al.*, 2002). Mussel soft tissues were freeze dried and then digested for 4 h under reflux in 30 mL of an ethanolic solution of KOH (2 $mol.L^{-1}$). After cooling, addition of 30 mL of water in the system and filtration, the digest was extracted in a 250 mL funnel five times with 20 mL of n-hexane and dichloromethane (3:2). The extract was then dried with Na_2SO_4 and concentrated under N_2 flux. After exchange of solvent (EtOH, n-hexane, DCM by cyclohexane) using a Zymark Turbovap LV and filtration, the extract was fractionated by liquid chromatography on a silica microcolumn using a solvent mixture of n-hexane and DCM (2:1). This fraction containing aliphatic and aromatic hydrocarbons was then concentrated under N_2 flux and its volume was fitted at 1 mL. After adding the perdeuterated internal standard (naphthalene d8, acenaphtene d10, phenanthrene d10, chrysene d12, perylene d12) this solution was then injected in GC-MS to analyse quantitatively the PAHs.

2.6. Histochemistry

The lysosomal system was located in the digestive cells by the histochemical revelation of β-glucuronidase demonstrated in unfixed cryostat sections according to Cajaraville *et al.* (1991) and adapted to freshwater organisms by Giambérini and Cajaraville (2005). Unsaturated neutral lipids were demonstrated by oil red O staining (Moore, 1988), and lipofuscin granules were stained by the Schmorl reaction (Pearse, 1972).

Cellular biomarkers were quantified on digestive tissue sections by image analysis (Analysis pro 3.0, Olympus) using a Sony tri CCD colour video camera connected to an Olympus BX 41 microscope with a 100-x objective. Morphological changes in the tissue sections of each mussel were evaluated on 5 random fields of view (total sampling area per specimen: 63 172 μm^2). Areas not belonging to digestive tissues (connective or gonad tissues)

were discarded from the analysis. One to four stereological parameters were calculated depending on the biomarker (Lowe *et al.*, 1981). They include lysosomal volume density ($Vv_L = V_L/V_C$), surface density ($Sv_L = S_L/V_C$), surface to volume ratio (S_L/V_L) and numerical density ($Nv_L = N_L/V_C$) where C = digestive cell cytoplasm, L = lysosomes, N = number, S = surface, V = volume. Most of the time, the lipofuscin granules and the neutral lipid droplets formed clusters in the digestive gland cells and were difficult to separate with image analysis. In this case, diameters were not used for the stereological analysis and only the lipofuscin and neutral lipid surface densities could be calculated ($Sv_{LF} = S_{LF}/V_C$ and $Sv_{NL} = S_{NL}/V_C$) where C = digestive cell cytoplasm, LF = lipofuscin, NL = neutral lipids, V = volume and S = surface.

2.7. Histopathology

Fixed samples were rinsed in tap water for one day, then dehydrated in an ascending alcohol-toluene series and embedded in paraffin wax. Serial sections of the proximal, central and distal part of the soft tissues (5 µm thick) were stained using Toluidine Blue Stain.

2.8. Condition index

The Condition Index (CI), expressed in $mg.mm^{-3}$, was calculated as follows:

$CI = m / (L \times h \times w)$ (1)

Where: m = soft tissue wet weight (mg), L = shell length, h = shell height and w = shell width (mm).

2.9. Data processing and statistics

For the first experiment (spring-summer 2004), differences between paired mean values of the three cellular biomarkers and the CI were assessed by the unilateral U-test of Mann-Whitney, Wilcoxon (the significativity threshold was set at $2(1-\underline{P}) \leq 0.05$). For the second experiment (spring-summer 2005), the time, sites and their interaction effects were assessed by two-way ANOVAs on the stereological parameters and the CI, after adequate transformation of the variables when necessary, to achieve independence of the mean and the standard deviation as well as homoscedasticity (assessed by Brown-Forsythe test) and were followed by Duncan's post-hoc tests for the determination of significant paired mean differences. Spearman correlation coefficients were calculated among the biological parameters, and with metal and PAHs body concentrations. For the ANOVAs and correlation coefficients, the significativity level was set at $\underline{P} \leq 0.05$.

3. Results

3.1. First field study (spring-summer 2004: depuration-transplantation)

3.1.1. Water physico-chemistry and chloropigments

Mean values of water physico-chemical parameters and chloropigments monitored during the first experiment are reported in the first columns of Table 1.

Table 1. Water physico-chemical parameters and chloropigments (mean ± sd) during both experiments

	Reversibility experiment (2004)			Increased spatial gradient experiment (2005)		
	M1	F	M2	M1	M2	M3
BOD_5 ($mg.L^{-1}$)	1.8 ± 0.3	10.1 ± 3.7	7.6 ± 3.4	2.1 ± 0.6	4.6 ± 0.6	2.8 ± 0.4
COD ($mg.L^{-1}$)	30.5 ± 6.5	33.3 ± 7.2	41.0 ± 8.7	18.3 ± 3.8	26.7 ± 5.7	24.0 ± 8.7
NH^{4+} ($mg.L^{-1}$)	0.16 ± 0.09	1.11 ± 0.40	0.78 ± 0.32	0.07 ± 0.01	0.64 ± 0.66	0.40 ± 0.20
NKj ($mg_N.L^{-1}$)	0.88 ± 0.15	1.79 ± 0.30	1.52 ± 0.51	0.82 ± 0.22	1.47 ± 0.57	1.08 ± 0.40
NO_2^- ($mg.L^{-1}$)	0.09 ± 0.04	0.53 ± 0.10	0.39 ± 0.05	0.10 ± 0.04	0.48 ± 0.11	0.25 ± 0.04
NO_3^- ($mg.L^{-1}$)	4.51 ± 0.92	5.31 ± 1.27	4.54 ± 0.82	7.13 ± 1.21	6.51 ± 0.68	6.45 ± 0.52
PO_4^{3-} ($mg.L^{-1}$)	0.25 ± 0.04	0.31 ± 0.17	0.21 ± 0.14	0.28 ± 0.12	0.29 ± 0.06	0.29 ± 0.09
Ptot ($mg_P.L^{-1}$)	0.17 ± 0.05	0.33 ± 0.19	0.34 ± 0.34	0.17 ± 0.04	0.30 ± 0.11	0.27 ± 0.12
Chl a ($\mu g.L^{-1}$)	4.9 ± 4.8	1.9 ± 0.7	5.3 ± 3.0	2.6 ± 1.2	3.2 ± 2.0	4.1 ± 2.6
Phaeo ($\mu g.L^{-1}$)	6.5 ± 2.5	2.0 ± 0.6	5.6 ± 5.5	3.6 ± 1.2	6.5 ± 3.5	7.7 ± 4.5
PH	7.8 ± 0.0	7.8 ± 0.2	7.8 ± 0.1	8.1 ± 0.1	8.0 ± 0.1	8.0 ± 0.1
SM ($mg.L^{-1}$)	13.6 ± 10.3	27.5 ± 14.9	42.1 ± 63.1	5.0 ± 2.0	13.1 ± 5.2	21.8 ± 14.9
Cond ($\mu S.cm^{-1}$)	1578 ± 212	1596 ± 174	1571 ± 171	1603 ± 61	1586 ± 64	1593 ± 59
Cl^- ($mg.L^{-1}$)	384 ± 55	270 ± 66	307 ± 53	368 ± 17	300 ± 10	340 ± 18
SO_4^{2-} ($mg.L^{-1}$)	120 ± 15	250 ± 37	188 ± 21	110 ± 14	164 ± 20	133 ± 13
Ca^{2+} ($mg.L^{-1}$)	159 ± 18	160 ± 21	158 ± 18	158	144	157
Mg^{2+} ($mg.L^{-1}$)	17.2 ± 2.4	23.9 ± 2.5	21.6 ± 2.1	14.7	16.7	15.3
Na^+ ($mg.L^{-1}$)	133 ± 23	145 ± 22	133 ± 23	101	100	95
Br ($mg.L^{-1}$)	0.29 ± 0.05	0.74 ± 0.14	0.74 ± 0.19	0.33 ± 0.24	0.43 ± 0.20	0.34 ± 0.15
Cr ($\mu g.L^{-1}$)	-	-	-	11.4	9.9	13.4
Cu ($\mu g.L^{-1}$)	-	-	-	2.3	2.8	2.5
Ni ($\mu g.L^{-1}$)	-	-	-	8.0	10.2	9.0
Pb ($\mu g.L^{-1}$)	-	-	-	0.30	0.42	0.21
Zn ($\mu g.L^{-1}$)	-	-	-	12.2	17.9	14.6

Considering the quality thresholds defined in the French System of Evaluation of waterways' Water Quality, 'SEQ-Eau v2' (MEDD and Agences de l'Eau, 2003), they showed a rather good general water quality at the M1 site, except for relatively high COD values (fair

quality) and the mineralisation, considerably altered by high chlorine concentrations (very poor quality). In addition to high chlorine and moderate COD levels, higher values of the BOD_5, sulfate and nitrite concentrations, and, to a lesser extent, of ammonium, total phosphate, Kjedhal nitrogen and suspended matter were consistent with the poor water quality usually described in the Fensch. At the M2 site, maximal COD and suspended matter levels were monitored. Other parameters displayed fairly similar values as at the F site (Ptot and NKj) or intermediate values with respect to both other sites (BOD_5, NH_4^+, NO_2^- and SO_4^{2-}). The remaining parameters did not contribute to any supplementary degradation of the water quality compared to the M1 site.

3.1.2. Tissular concentrations of metals and PAHs

After 3 days of transplantation, iron tissular concentrations had more than doubled and tripled in the mussels of the M2 and F sites respectively, and 1.5- to 2.1-fold increases of lead levels were evidenced (Table 2). After 15 days, nickel concentrations had increased in all the organisms and zinc levels had risen in Dreissena deployed in the Fensch. The transplantation to Ref1 did not exert any depuration on the metal body concentrations.

As soon as 3 days after transplantation, the total PAHs body concentrations showed a 2- and 1.5-fold increase in mussels transplanted at the F and M2 sites respectively, and remained high after 15 days transplantation in the Fensch. The predominant PAHs at Ref1 (Benzo[a]pyrene > phenanthrene > anthracene > benzo[k]fluoranthene > fluoranthene > acenaphtylene > pyrene) were usually nearly the same in mussels deployed at M1. In organisms transplanted to the Fensch, pyrene, fluoranthene, benzo[k]fluranthene, benzo[a]pyrene, phenanthrene and indeno[1,2,3-cd]pyrene strongly accumulated in tissues with respect to controls and to M1-mussels. In Dreissena's tissues at M2, pyrene and fluoranthene levels, about 2.5 higher than the concentrations measured in M1-mussels, suggested the influence of the confluence of the Fensch with the Moselle. When taken back to Ref1, the organisms initially deployed for 15 days at M1 and F showed a reduction of their tissular PAHs contents: the concentrations returned to control levels in organisms previously deployed at F and were twice as low as those from M1.

Table 2. Metal (µg.g^{-1}dw) and PAHs (µg.g^{-1}dw) body concentrations in D. polymorpha during the first experiment (Spring-summer 2004)

		M1					F			M2			
Day	0	3	15	30	R30	90	3	15	R30	3	15	30	R30
Cd	0.73	0.82	0.50	0.46	0.65	0.71	0.72	0.62	0.74	0.69	0.34	0.37	0.55
Pb	0.88	1.16	0.78	0.79	0.72	2.76	1.32	2.39	2.04	1.87	1.16	2.04	1.56
Ni	5.96	7.27	9.88	4.77	7.80	6.51	5.98	9.72	10.61	6.42	10.09	8.64	12.11
Cu	17.2	17.0	21.9	17.7	19.0	25.9	18.9	20.5	22.3	19.7	17.2	19.0	17.0
Zn	118	125	110	87	101	117	113	156	130	120	125	124	128
Fe	341	452	1102	283	1511	1578	1065	1235	1860	824	1310	955	2093
Naph	0.52	0.59	0.65	0.41	0.25	0.76	0.81	0.64	0.67	0.52	-	0.59	-
Ayl	1.61	1.34	1.27	1.20	n.d.	n.d.	2.29	2.03	1.67	1.57	-	1.12	-
Aen	0.68	0.56	n.d.	0.48	0.34	0.89	1.43	1.00	0.70	0.80	-	0.55	-
F	1.23	0.96	0.89	0.89	0.63	1.69	1.75	1.55	1.27	1.20	-	0.99	-
Pn	2.26	1.95	1.77	1.61	1.17	3.16	3.32	2.91	2.34	2.38	-	2.15	-
An	2.23	1.93	1.56	1.56	1.14	3.07	3.23	2.83	2.31	2.35	-	2.13	-
Fl	1.87	1.58	1.41	1.35	0.90	2.44	5.20	4.82	1.81	3.89	-	1.47	-
Py	1.45	1.20	1.08	1.06	0.69	1.91	4.80	4.58	1.40	3.15	-	1.14	-
BaA	0.68	0.64	0.53	0.50	0.41	1.02	2.15	3.03	0.74	1.30	-	0.64	-
Ch	0.84	0.75	0.65	0.65	0.36	1.16	2.15	2.79	0.87	1.33	-	0.73	-
IP	n.d.	2.11	n.d.	n.d.	0.42	n.d.	3.45	3.15	n.d.	2.47	-	1.71	-
BbF	1.06	0.88	0.82	0.79	0.54	1.47	2.02	2.47	1.10	1.30	-	0.90	-
BkF	1.97	1.63	1.49	1.47	1.02	2.71	3.27	3.59	2.04	1.94	-	1.41	-
BaP	2.48	1.95	1.85	1.85	1.31	3.42	3.54	3.51	2.58	2.44	-	1.76	-
DhA	n.d.	1.15	1.06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.36	-	n.d.	-
Bghi	1.06	0.88	0.89	n.d.	n.d.	n.d.	1.52	1.39	n.d.	1.08	-	0.75	-
ΣPAHs	**19.9**	**20.1**	**15.9**	**13.8**	**9.17**	**23.7**	**40.9**	**40.3**	**19.5**	**29.1**	**-**	**18.0**	**-**

Naph, Naphthalene; Ayl, Acenaphtylene; Aen, Acenaphtene; F, Fluorene; Pn, Phenanthrene; An, Anthracene; Fl, Fluoranthene; Py, Pyrene; BaA, Benzo[a]anthracene; Ch, Chrysene ; IP, Indeno[1.2.3-cd]pyrene;BbF, Benzo[b]fluoranthene; BkF, Benzo[k]fluoranthene; BaP, Benzo[a]pyrene; DhA, Di Benzo[a.h]anthracene; Bghi, Benzo[g.h.i]perylene. R30, recovery transplantation

3.1.3. Cellular biomarkers

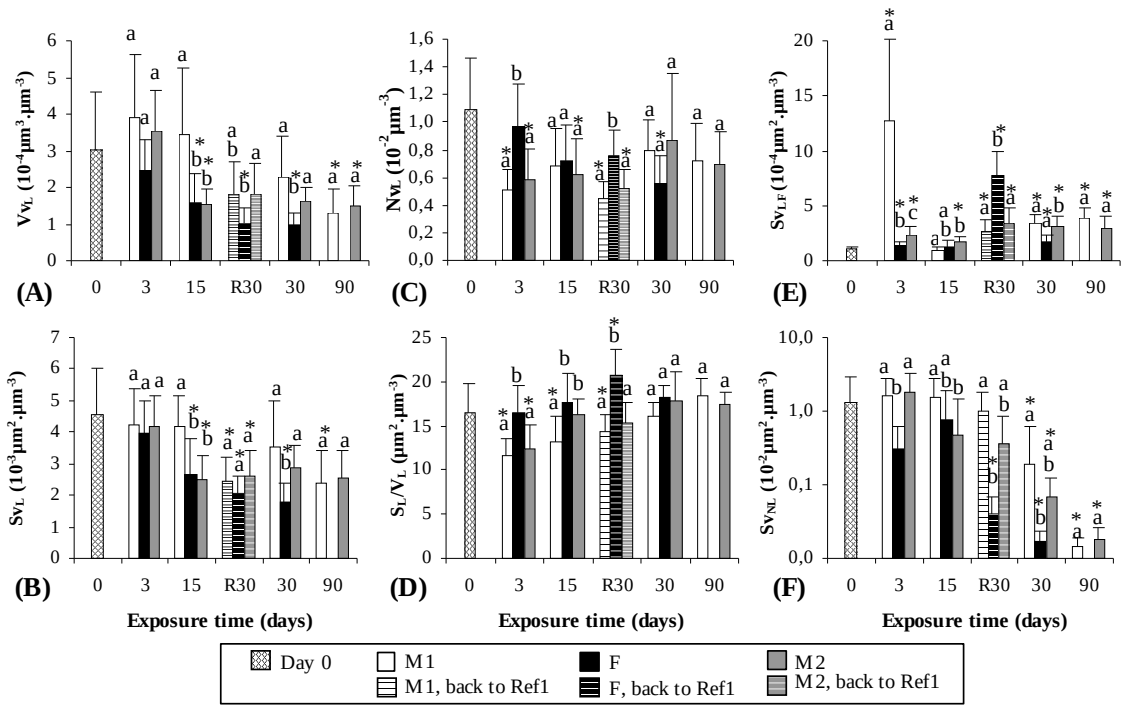


Figure 3. Cellular responses of transplanted D. polymorpha during the first experiment (spring-summer 2004): Lysosomal volume density (Vv_L), surface density (Sv_L), numerical density (Nv_L) and surface-to-volume ratio (S_L/V_L); surface densities of the unsaturated neutral lipid (Sv_{NL}) and the lipofuscin (Sv_{LF}) contents R, Recovery transplantation. Histogram bars represent mean + SD. For each exposure time, different letters indicate significant differences between sites and asterisks show significant differences compared with controls (Mann Whitney Wilcoxon's U-test, 2(1-P) ≤ 0.05).

A diminution of Dreissena's digestive lysosomal volume and surface densities was evidenced in the time (Figure 3A & B) and this trend was more or less pronounced according to the site. Vv_L was systematically inferior to controls (D0) in mussels deployed to the F site after 15 days. This was also observed in organisms transplanted downstream from the confluence (M2) at D15 and D90, and then in mussels from the less anthropised site (M1) at the end of the experiment. Decreasing Nv_L and S_L/V_L (ratio classically interpreted as the inverse of the mean lysosomal vacuole size) after 3 days of exposure (Figure 3C & D) indicated less numerous and larger lysosomes in mussels transplanted to both Moselle-river sites (M1 and M2), which corresponds to lysosomal enlargement. The consecutive increase of S_L/V_L, significant from day 30 in mussels at M1 and between 3 and 15 days in mussels from M2, seemed to account for the above-described diminution of Vv_L. Inversely, in D.

polymorpha from the F site, the Vv_L decrease was mainly due to lower Nv (and only secondarily to higher S_L/V_L).

A clear progressive decrease of Sv_{NL} was evidenced during the time (notice the logarithmic scale on Figure 3E), leading to a depletion of 85, 95 and 99 % of the digestive unsaturated neutral lipid contents in mussels transplanted to the sites M1, M2 and F respectively, after 30 days of exposure. This depletion reached 99 % of the initial contents in surviving Dreissena from sites M1 and M2 after 90 days. When comparing Sv_{NL} values in mussels from the three sites, the depletion was the most pronounced -or at least equivalent- in the experimental groups deployed to the most impacted site (F) or those transferred back to Ref 1 after an initial exposure at this location.

Lipofuscin tended to accumulate within digestive tissues (Figure 3F), showing significantly higher Sv_{LF} from 3 days in all groups of Dreissena (except at day 15 at M1 and F). A noticeable 11-fold increase of Sv_{LF} was evidenced between the deployment and day 3 in mussels from the M1 site but this parameter returned to control values between 3 and 15 days. No well-defined and systematic spatial trends were found in the response of the digestive lipofuscin contents. Nonetheless, Sv_{LF} tended to be inferior in the groups deployed to F than in both other sites, with the exception of the mussels from the depuration-transplantation.

The 15-day depuration-transplantation did not lead to any restoration of the initial conditions of the cellular biomarkers, but it seemed to limit the neutral lipid depletion in the mussels deployed back to Ref1 with respect to those maintained on the three test sites. This difference at 30 days was significant at M1 and F sites ($2(1-P)=0.0147$ and $2(1-P)=0.0295$ respectively). Significantly lower Sv_L and Nv_L were also found in mussels after 15 days depuration in Ref1 in comparison to those maintained at the M1 site ($2(1-P)=0.0379$ and $2(1-P)=0.0019$ respectively). Higher lipofuscin accumulation was found in Dreissena transplanted back to Ref1 after an initial exposure to F than in those maintained at the later site ($2(1-P)=0.0007$).

3.1.4. Individual effects

3.1.4.1. Condition index

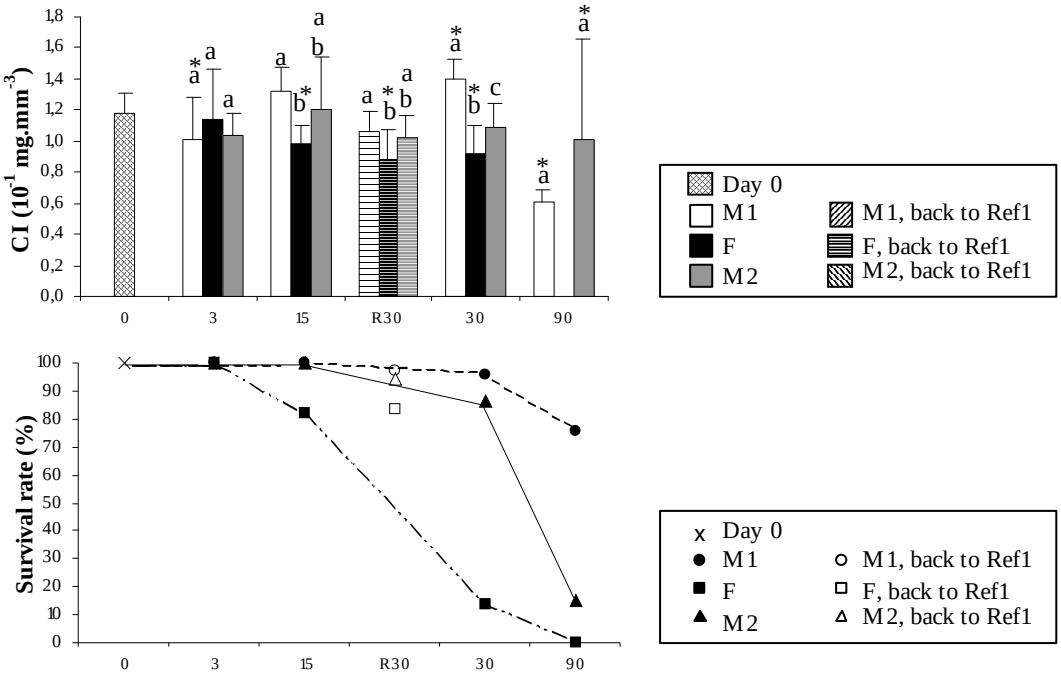


Figure 4. Condition index (A) and survival rate (B) of transplanted D. polymorpha during the first experiment (spring-summer 2004). R30, Recovery transplantation. For each exposure time, different letters indicate significant differences between sites and asterisks show significantly different means compared with controls (Mann Whitney, Wilcoxon's U-test, 2(1-P) ≤ 0.05).

In mussels exposed to M1, after an initial decrease observed at the 3rd day, the CI increased up to 30 days, and dropped between this date and 90 days (Figure 4A). From 15 days of exposure, a significantly lower condition was evidenced in the mussels deployed at the most contaminated site (F) and the CI remained lower than in controls and M1-mussels at 30 days. In Dreissena transplanted to M2, CI values were similar to controls and were comprised between those of both other sites.

In mussels previously deployed at both Moselle sites and transferred back to Ref1, the CI were lower at 30 days than in the organisms remaining at M1 and M2. In mussels returned to Ref1 after an initial exposure at the F site, the depuration period had no effect on CI values.

3.1.4.2. Survival

The mortality checked in the two cages taken at each site and each sampling date (ie. on approximately 72 individuals) gave an idea of the scale of the lethal effects on transplanted Dreissena.

Figure 4B suggests that survival was in keeping with the pollution-gradient (M1>M2>F), with strong lethal effects in the mussel population exposed to the Fensch, leading to a total absence of surviving individuals between 30 and 90 days of exposure in the remaining cages. The comparison among mussels on the three sites and those turned back to Ref1 at 30 days suggests a beneficial effect of the depuration period on survival, especially in mussels previously exposed to the Fensch and secondarily in those from M2.

3.1.5. Relationships among cellular biomarkers and CI, and with metal and PAHs tissular concentrations

Among measured biological responses, Vv_L, Sv_L, Sv_{NL} and CI correlated positively together, and the lysosomal Nv_L and S_L/V_L correlated negatively with the unsaturated neutral lipid contents (Table 3). Spearman's correlation coefficients calculated on Sv_{LF} showed that increased digestive lipofuscin deposit correlated with less neutral lipid contents.

Increased tissular concentrations in lead, zinc, copper, iron and nickel corresponded to lower CI, Vv_L, Sv_L, Nv_L and/or individual size of the revealed lysosomal vacuoles, and for the two first cited metals to higher lipofuscin accumulation. Twelve out of the 16 measured PAHs tissular concentrations correlated negatively with the mussels' condition and positively with Nv_L and/or S_L/V_L.

Table 3. Spearman correlation coefficients among cellular biomarkers and CI (n=113) and with metal (n=104) and PAHs (n=88) tissular concentrations during the first experiment (Spring-summer 2004)

	Vv_L	Sv_L	Nv_L	S_L/V_L	Sv_{NL}	Sv_{LF}	CI
Sv_L	**0.941***						
Nv_L	0.114	0.408*					
S_L/V_L	**-0.713***	**-0.460***	**0.555***				
Sv_{NL}	**0.572***	**0.447***	**-0.212***	**-0.589***			
Sv_{LF}	-0.115	-0.101	-0.056	0.091	**-0.278***		
CI	**0. 307***	**0.278***	0.050	**-0.255***	**0.286***	**-0.236***	
Cd	0.118	0.136	0.056	0.002	0.103	0.249*	**-0.346***
Pb	**-0.326***	**-0.239***	0,152	**0.399***	**-0.381***	**0.315***	**-0.576***
Ni	**-0.347***	**-0.398***	-0.222*	0.119	-0.059	0.114	-0.156
Cu	**-0.238***	-0.176	0.132	**0.293***	**-0.239***	-0.009	**-0.297***
Zn	**-0.219***	**-0.209***	-0.026	0.188	-0.037	**0.229***	**-0.351***
Fe	**-0.513***	**-0.549***	-0.204*	**0.273***	**-0.270***	0.177	**-0.404***
Na	-0.198	-0.103	**0.222***	**0.325***	**-0.300***	-0.008	**-0.379***
Ayl	0.118	0.183	0.275*	0.104	0.163	-0.308*	-0.016
Aen	-0.161	-0.084	0.217*	0.302*	-0.207	-0.056	**-0.485***
F	**-0.245***	-0.119	0.328*	**0.441***	**-0.334***	-0.093	**-0.477***
Pn	-0.157	-0.059	**0.262***	**0.333***	**-0.243***	-0.124	**-0.483***
An	-0.168	-0.068	**0.269***	**0.345***	**-0.266***	-0.099	**-0.481***
Fl	-0.002	0.073	**0.237***	0.194	-0.049	-0.240*	**-0.386***
Py	-0.002	0.073	**0.237***	0.194	-0.049	-0.240*	-0.386*
BaA	-0.099	-0.026	**0.215***	**0.255***	-0.102	-0.187	**-0.433***
Ch	-0.088	-0.020	0.206	**0.243***	-0.101	-0.147	**-0.435***
IP	0.187	0.130	-0.084	-0.222*	0.279*	-0.148	-0.136
BbF	-0.175	-0.086	**0.244***	0.329*	-0.193	-0.179	-0.467*
BkF	-0.157	-0.066	**0.263***	**0.333***	-0.174	-0.186	**-0.416***
BaP	-0.141	-0.042	**0.290***	**0.337***	-0.202	-0.156	**-0.399***
DhA	0.559*	0.439*	-0.298*	-0.587*	0.550*	0.058	0.095
Bghi	0.384*	0.404*	0.172	-0.192	0.403*	-0.622*	0.085
ΣPAHs	0.076	0.124	0.158	0.081	0.018	-0.162	**-0.394***

**: significant r_s ($p \leq 0.05$); figures in bold highlight significant correlations from the same sign in both experiments*

3.2. Second field study (spring-summer 2005: increased spatial gradient)

3.2.1. Water physico-chemistry and chloropigments

Mean values of water physico-chemical parameters and chloropigments monitored during the second experiment are reported in the three last columns of Table 1. Apart from very high chlorine levels and a fair quality towards metal concentrations (chromium, copper, nickel and zinc), water quality using the measured parameters could be described as good at the M1 site. A moderate degradation at both downstream sites, more pronounced at the closest from the confluence (M2), could be related to increased SO_4^{2-}, Ptot, NO_2^-, NH_4^+, NKj, COD and BOD_5. Cu, Ni, Pb and Mg^{2+} concentrations also ranged in the order corresponding to the

gradient of pollution defined by the proximity of the confluence (M1<M3<M2), but without marked alteration of the water quality (MEDD and Agences de l'Eau, 2003).

3.2.2. Tissular concentrations of metals and PAHs

The evolution of tissular concentrations of metals, reported in Table 4, revealed that the organisms progressively accumulated most monitored metals (Pb, Fe, Zn, Cu and Ni), to reach levels up to 10-fold higher than controls after 30 days (see lead concentrations at M2). The tissular concentrations of Pb, Ni, Fe and Cu ranged according to the presumed stress gradient (M1 < M3 ≤ M2). PAHs accumulated in the three experimental groups during the time. At 30 days, PAHs concentrations also ranged according to the stress gradient (M1 < M3 < M2), being more than twice as high at M2 than at M1.

Table 4. Metal (µg.g^{-1}dw) and PAHs (µg.g^{-1}dw) body concentrations in D. polymorpha during the second experiment (Spring-summer 2005)

		M1			M2			M3		
Day	0	3	15	30	3	15	30	3	15	30
Cd	0.40	0.33	0.31	0.66	0.33	0.30	0.41	0.40	0.48	0.40
Pb	0.23	0.34	0.52	1.07	1.05	1.32	2.34	0.82	1.32	2.20
Ni	4.93	4.44	4.92	7.54	5.25	4.45	8.77	5.12	5.17	6.27
Cu	8.97	9.14	16.7	17.8	11.3	15.2	20.4	12.1	17.0	20.3
Zn	83.3	89.0	114	185	104	110	185	104	166	169
Fe	118	278	375	585	447	587	1043	410	638	1090
Na	0.25	0.32	0.56	0.38	0.33	0.43	0.56	0.41	0.58	0.51
Ayl	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.34	2.15	5.57	n.d.	2.32	3.42
Aen	0.38	0.49	0.56	0.57	1.00	0.43	0.83	0.55	0.35	0.51
F	2.27	2.75	3.15	3.22	3.17	2.05	5.01	2.47	1.97	2.91
Pn	0.80	0.72	1.00	1.44	1.36	1.13	2.49	0.90	1.06	1.19
An	n.d.	n.d.	3.70	5.93	3.99	3.31	7.66	3.04	3.55	4.91
Fl	1.97	2.09	2.60	4.17	4.30	3.65	6.21	2.79	3.07	3.58
Py	0.29	0.32	0.40	0.64	1.78	1.74	1.66	0.98	0.96	0.66
BaA	n.d.	5.23	6.60	10.58	7.24	6.79	14.71	5.58	6.82	8.89
Ch	n.d.	1.77	2.30	n.d.	2.52	2.52	4.97	2.05	2.40	3.05
IP	9.92	14.3	17.0	n.d.	4.35	10.5	31.9	7.43	13.4	20.4
BbF	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.07	5.19	15.27	3.54	6.52	n.d.
BkF	n.d.	n.d.	1.27	n.d.	0.35	0.89	2.88	0.56	1.22	1.52
BaP	3.11	n.d.	5.45	8.96	1.39	3.52	10.52	2.38	4.37	6.53
DhA	10.4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11.1	n.d.	n.d.	14.2	n.d.
Bghi	3.48	4.98	5.91	9.71	1.51	3.69	10.86	2.58	4.66	7.07
ΣPAHs	**32.9**	**33.0**	**50.5**	**45.6**	**38.7**	**59.0**	**121.1**	**35.3**	**67.4**	**65.2**

3.2.3. Cellular biomarkers

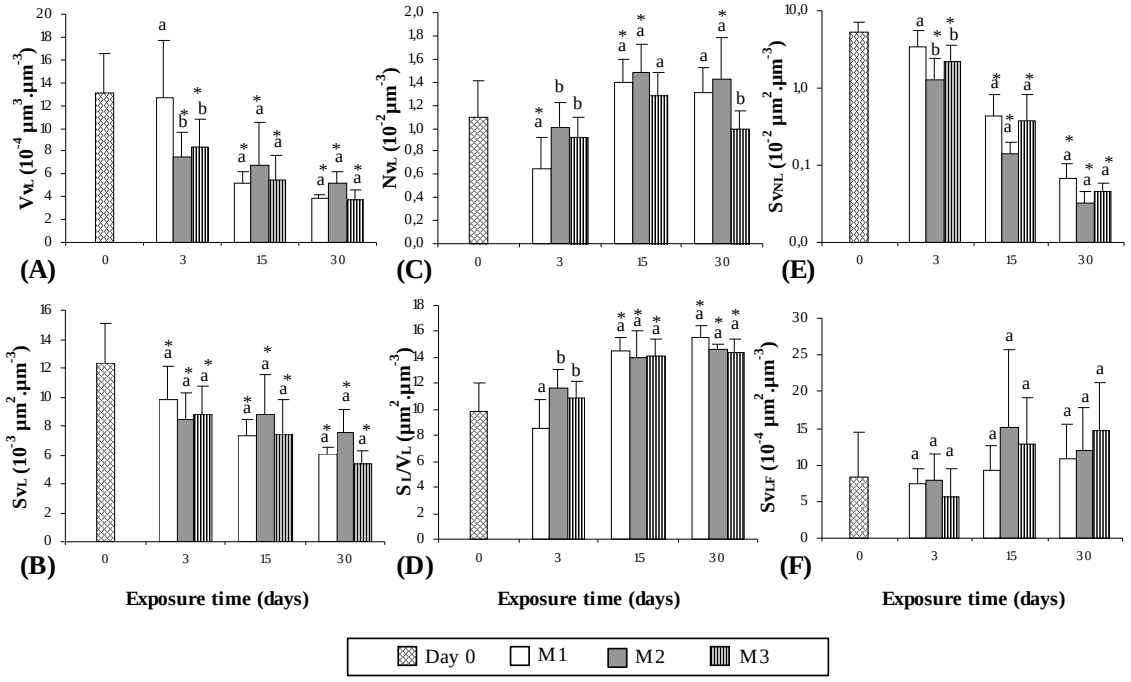


Figure 5. Cellular responses of transplanted D. polymorpha during the second experiment (spring-summer 2004): same legends as Figure 3.

During the second experiment (Spring-summer 2005), transplanted Dreissena exhibited a reduction of the volume (Figure 5A) and surface (Figure 5B) densities of the digestive lysosomal system, also characterized by more numerous (Figure 5C) and smaller (Figure 5D) vacuoles. They also showed a continuous decrease of the unsaturated neutral lipid contents (Figure 5E).

Table 5. Results of the two-way Anova's performed on the three cellular biomarkers and the CI at 30 days to assess the effects of the depuration transplantation, of the sites and of their interaction.

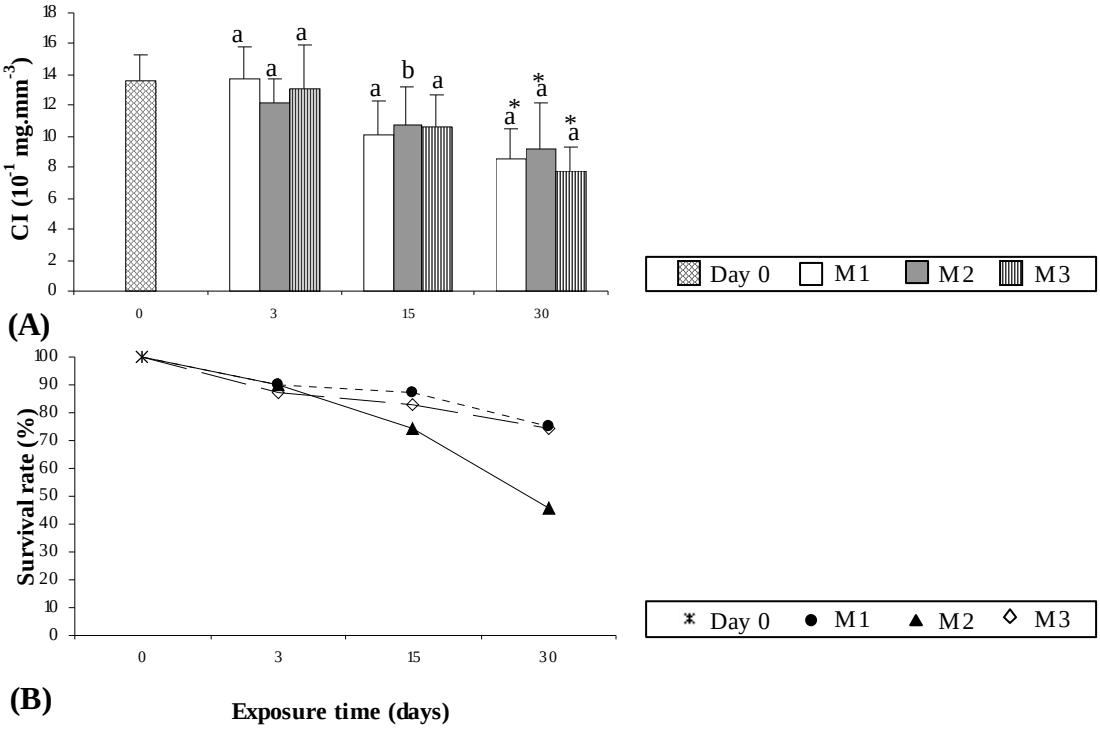
Parameter	Sites (d.f.=2)		Time (d.f.=3)		Interaction (d.f.=6)		Residual d.f.
	F-values	P(F)	F-values	P(F)	F-values	P(F)	
Lysosomal system							81
Vv_L	0.99	0.3756	43.22	0.0000*	2.45	0.0312*	
Sv_L	1.02	0.3647	32.93	0.0000*	0.98	0.4452	
Nv_L	4.21	0.0182*	17.63	0.0000*	2.34	0.0392*	
S_L/V_L	0.57	0.5674	55.60	0.0000*	2.70	0.0192*	
Neutral lipid							80
$LogSv_{NL}$	4.96	0.0093*	188.05	0.0000*	0.92	0.4828	
Lipofuscin							81
$LogSv_{LF}$	0.26	0.7687	5.73	0.0013*	0.66	0.6804	
Condition Index							82
CI	0.88	0.4191	9.88	0.0000*	1.38	0.2344	

Exposure time exerted an effect on all the stereological parameters (Table 5), and the effects of the sites or of the interaction between sites and time were significant on three lysosomal and the neutral lipid parameters. Thus, Vv_L and Sv_{NL} responses were greater in mussels exposed to both downstream sites as early as 3 days of transplantation compared to those from M1 (more progressive and noticeable only from 15 days on). Lipofuscin granules accumulated significantly in D. polymorpha from M3 between 3 and 15 days (P=0.0154), though no significant inter-site difference of Sv_{LF} was evidenced at each sampling date between the three stations (Figure 5F).

3.2.4. Histopathology

No marked histopathological alteration was observed on the microscopic slides.

3.2.5. Individual effects



Condition index (A) and survival rate (B) of transplanted D. polymorpha during the second experiment (spring-summer 2005); For each exposure time, different letters indicate significant differences between sites and asterisks show significantly different means compared with controls (Mann Whitney, Wilcoxon's U-test, 2(1-P) ≤ 0.05).

3.2.5.1. Condition index

During the second experiment, time exerted a significant effect on the mussels' condition (Table 5), leading to a decrease of the CI evidenced after 30 days in the three sites (Figure 6A), but without marked inter-site differences.

3.2.5.2. Survival

The survival rates in the cages sampled after 15 days, and mostly after 30 days of exposure (Figure 6B), suggests that survival was more affected in mussels transplanted at the closest site downstream from the confluence of the Fensch with the River Moselle (M2) than at both other sites (M1 and M3).

3.2.6. Relationships among cellular biomarkers and CI, and with metal and PAHS tissular concentrations

Table 6. Spearman correlation coefficients (n=77) among cellular biomarkers and CI and with metal and PAHs tissular concentrations during the second experiment (Spring-summer 2005)

	Vv_L	Sv_L	Nv_L	S_L/V_L	Sv_{NL}	Sv_{LF}	CI
Sv_L	**0.950***						
Nv_L	-0.197	0.062					
S_L/V_L	**-0.854***	**-0.696***	**0.614***				
Sv_{NL}	**0.814***	**0.724***	**-0.371***	**-0.778***			
Sv_{LF}	-0.256*	-0.248*	0.094	0.237*	**-0.327***		
CI	**0.564***	**0.511***	-0.191	**-0.511***	**0.588***	**-0.284***	
Cd	-0.368*	-0.330*	0.016	0.293*	-0.360*	0.079	**-0.339***
Pb	**-0.742***	**-0.640***	0.351*	**0.720***	**-0.898***	**0.373***	**-0.677***
Ni	**-0.629***	**-0.549***	0.250*	0.563*	-0.809*	0.403*	-0.556*
Cu	**-0.533***	-0.472*	0.118	**0.447***	**-0.628***	0.180	**-0.522***
Zn	**-0.590***	**-0.498***	0.309*	0.566*	-0.818*	**0.387***	**-0.526***
Fe	**-0.768***	**-0.654***	0.384*	**0.764***	**-0.874***	0.350*	**-0.674***
Na	-0.520*	-0.417*	**0.418***	**0.560***	**-0.633***	0.319*	**-0.442***
Ayl	-0.331*	-0.294*	0.111	0.260*	-0.551*	0.305*	-0.347*
Aen	-0.217	-0.226*	-0.017	0.170	-0.295*	-0.092	**-0.229***
F	**-0.298***	-0.297*	0.004	**0.256***	**-0.405***	-0.003	**-0.344***
Pn	-0.594*	-0.489*	**0.344***	**0.597***	**-0.752***	0.274*	**-0.535***
An	-0.683*	-0.590*	**0.306***	**0.652***	**-0.813***	0.287*	**-0.635***
Fl	-0.462*	-0.383*	**0.268***	0.462*	-0.648*	0.213	**-0.401***
Py	-0.156	-0.118	0.154	0.151	-0.299*	0.071	-0.084
BaA	-0.671*	-0.584*	**0.274***	**0.628***	-0.829*	0.320*	**-0.611***
Ch	-0.305*	-0.265*	0.179	**0.273***	-0.547*	0.281*	**-0.303***
IP	-0.131	-0.132	0.065	0.128	-0.330*	0.229*	-0.217
BbF	-0.026	0.045	**0.287***	0.125	-0.212	0.087	0.011
BkF	-0.425*	-0.357*	**0.294***	**0.423***	-0.604*	0.286*	**-0.414***
BaP	-0.685*	-0.542*	**0.493***	**0.749***	-0.807*	0.350*	**-0.642***
DhA	0.105	0.199	0.336*	0.044	0.143	0.163	0.165
Bghi	-0.540*	-0.474*	0.246*	0.561*	-0.693*	0.303*	-0.548*
ΣPAHs	-0.606*	-0.489*	0.444*	0.639*	-0.789*	0.417*	**-0.536***

**: significant r_s ($p \leq 0.05$); figures in bold highlight significant correlations from the same sign in both experiments*

Significant correlations among the parameters obtained during the second experiment were fairly similar to those found for the first experiment (see numbers in bold on Table 6), but were usually stronger and more numerous. Thus, the previously described relationships between metal concentrations and the cellular and physiological biomarkers were more systematically found, cadmium included. Similarly, the same kinds of relationships as in 2004 were found between most PAHs and biomarkers, with more frequent negative correlations with Vv_L, Sv_L, Sv_{NL} and positive correlations with Sv_{LF}, additionally.

4. Discussion

In the present study, the physico-chemical analyses and the profiles of metal and PAHs bioaccumulation by the zebra mussels confirmed the presence of a pollution gradient, with a degradation of water quality in the range M1≥M3≥M2>F.

The cellular biomarker responses made the inter-site distinction possible more or less efficiently. The responses of the lysosomal system and the unsaturated neutral lipid contents seemed to discriminate the most among sites, whereas inter-site differences of lipofuscin contents were not systematic and only evidenced during the first experiment, which implied the exposure to the most impacted site.

Nonetheless, the diminution of the lysosomal system volume density (associated with more numerous and smaller lysosomes) and the neutral lipid depletions along the pollution gradient did not correspond to the most frequently described responses in molluscs. Factors as varied as metals (Etxeberria *et al.*, 1994; Giambérini and Cajaraville, 2005), short term exposure to phthalates (DEHP) in water or via intramuscular injection (Marigomez and Baybay-Villacorta, 2003) or extreme environmental conditions commonly cause lysosomal enlargment, considered as a general stress response in the molluscan digestive cells. More intricate responses of the lysosomal compartment are usually reported in marine molluscs exposed to certain classes of organic contaminants, mostly PAHs. They include lysosomal fusions consecutive to membrane destabilisations, pluriphasic lysosomal responses showing for instance a transient lysosomal enlargement followed by decreased lysosomal size and number after one to three weeks of exposure (Moore, 1988; Marigomez and Baybay-Villacorta, 2003). These specific lysosomal responses to PAHs are usually accompanied by unsaturated neutral lipid lysosomal and cytoplasmic accumulations interpreted as the result of chemically induced lipidosis (Moore, 1988; Marigomez and Baybay-Villacorta, 2003). In the

present study, the significant correlations between some lysosomal stereological parameters and the tissular concentrations of most monitored PAHs suggest a possible causal relationship between this class of contaminants and the responses of the digestive lysosomal system of D. polymorpha, though no unsaturated neutral lipid accumulation was associated with this phenomenon. As already suggested in the literature, the lysosomal size reduction may also correspond to fission of lysosomes or to changes in the turnover of these organelles and/or of digestive cells (Cajaraville *et al.*, 1995; Marigomez and Baybay-Villacorta, 2003).

Although they are less frequently reported than neutral lipid accumulations, depletions of oil red O reactive lipid droplets have been described in marine and freshwater molluscs exposed to environmental pollution, especially in metal contaminated locations (Regoli, 1992; Guerlet *et al.*, 2006; Zorita *et al.*, 2006). This phenomenon, particularly pronounced in the present study, could result from a relocation of energy from lipid reserves towards defence mechanisms, but also from a quantitative and/or qualitative alteration of ingested food due to a modification of available resources or to a reduced filtering activity. In Dreissena, these assumptions can be reinforced by the major part occupied by the neutral lipid triacylglycerol (rather than glycogen) in their energy reserves, contrary to most other bivalves (Nalepa *et al.*, 1993; Sprung, 1995).

Lipofuscin intracellular granular pigments result from the degradation of various endogenous and exogenous compounds such as protein or ascorbic acid and especially lipid (through lipoperoxidation). They are formed in secondary lysosomes and may then accumulate in final residual bodies and in the cytoplasm (Yin, 1996). In spring-summer 2004, the largest amounts of lipofuscin were found at the first sampling date at M1, and this isolated phenomenon in the lowest impacted site after only 3 days of exposure is somewhat surprising and could possibly be due to higher heterophagy caused by increased food availability just after the transplantation. Lower levels at the most impacted site could result from an avoidance reaction (valve closure), leading to anaerobiosis, which is likely to reduce the cellular antioxidant compounds and the lipoperoxidation level in the digestive gland of molluscs (Viarengo et al, 1989).

Cellular biomarkers using histochemistry in freshwater molluscs were developed too recently to fully understand the different response patterns to various stressors of the lysosomal system and of associated digestive unsaturated neutral lipid and lipofuscin contents. In the light of the present results, a mechanistic approach in laboratory exposure of

freshwater molluscs to various classes of organic environmental contaminants would be useful to improve the use of cellular biomarkers in field experiments.

To bring in clues to establish a linkage between early responses at the cellular level and effects at higher levels of the biological organisation, a condition index was studied in parallel, as an indication of the mussels' nutritional status and stress. The CI decreased in the time, and -during the first experiment implying the most contaminated site- along the pollution gradient. As classically described in the literature, significant negative correlations were found between the CI and most metal and PAHs tissular concentrations, which is consistent with the assumption that energy reserves potentially available for growth would have been depleted in favour of energy-costly detoxication processes (Bender *et al.*, 1988; Nicholson and Lam, 2004), as already mentioned above for the decreasing neutral lipid contents. Some of the cellular responses were significant as soon as 3 days of exposure and preceded the effects on the mussels' condition, noticeable after 15 days in 2004 and 30 days in 2005 (except for a punctual decrease of the CI after 3 days of exposure to M1 site in 2004). This confirms the usefulness of cellular responses as early warning tools.

Thus, the parallel study of cellular biomarkers and other endpoints at higher levels of the biological organisation seems to merit further investigation, to ideally identify to which degree of effects on the cellular biomarkers probable injuries to the mussels' health would appear.

For a correct assessment of such compensation thresholds, it also seems essential to consider the possible reversibility of the cellular responses and to analyse their sensitivity to highlight various degrees of contamination along pollution gradients.

A total depuration of supplementary PAHs accumulated during the initial 15-day exposure to the test sites was evidenced in the mussels returned to Ref1 for 2 weeks, but the only obvious positive effect of the depuration transplantation on the studied cellular endpoints was a limitation of the neutral lipid depletion, without restoration of the initial stocks. The high lipofuscin contents evidenced in mussels previously deployed at the most contaminated site may result from an accumulation of indigestible autophagy end-products in tertiary lysosomes meant to exocytosis during the depuration, as already suggested in marine snails

initially exposed to phenanthrene, after 3-days recovery period (Pipe and Moore, 1986). This accumulation of lipoperoxidation products during the depurative transplantation may be a consequence of the generation of reactive oxygen species during oxygen re-exposure (Pannunzio and Storey, 1998), if valve closure and a subsequent decrease of antioxidant capacities had previously occurred in the Fensch. At the individual level, a positive effect on the survival of mussels previously deployed in the Fensch was also evidenced.

The degree of contamination of the initial exposure to the three sites seemed to exert an influence on the efficiency of the depuration transplantation. Indeed, inter-site differences of Nv_L, S_L/V_L, Sv_{LF} and CI were not identical in depurated and exposed mussels at 30 days.

These findings confirm the interest to study the cellular biomarker responses after depuration periods to better understand the involvement of the lysosomal system, lipofuscin deposit and unsaturated neutral lipid contents in the recovery processes, and to make sufficient data available to attempt to assess the compensation thresholds beyond which deleterious effects will appear at higher levels of the biological organisation.

Differences between the upstream site and both downstream sites in four out of six stereological parameters after a short 3 day-exposure suggest that the Fensch waters still exerted a slight influence on the mussels' cellular functions at an increased distance from the confluence (second experiment). However the effects of this moderate alteration of water quality seemed to be compensated for after a longer exposure, as confirmed by the absence of marked histopathological alterations and of differences in the condition of mussels from the three locations.

5. Conclusion

This study has shown various degrees of stress persistence after an initial exposure to a pollution-gradient followed by two weeks of depuration at the site of origin, and has brought first clues to investigate the sensitivity of Dreissena's cellular biomarkers to more or less subtle variations of environmental contamination. These early responses preceded effects at the individual level, which tends to confirm their relevance as early warning tools for the assessment of environmental stress-induced impairments of the biota's health.

6. Acknowledgements

We acknowledge J.F. Masfaraud for his involvement in the leading of the project, and all the members of the 3 laboratories who participated in both campaigns for their help in the field. Many thanks to P. Faure, L. Jeanneau, E. Morhain and P. Rousselle for the PAHs and metal dosing and the physico-chemical analyses, and to A. Meyer for her invaluable technical support. The authors wish to thank Sharon Kruger for her careful correction of the English.

7. References

Au, D.W.T., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. Mar. Pollut. Bull. 48, 817-834.

Bender, M.E., Hargis, Jr, W.J., Huggett, R.J., Roberts Jr, M.H., 1988. Effects of polynuclear aromatic hydrocarbons on fishes and shellfish: An overview of research in virginia. Mar. Environ. Res. 24, 237-241.

Cajaraville, M.P., Marigómez, J.A., Angulo, E., 1991. Automated measurement of lysosomal structure alterations in oocytes of mussels exposed to petroleum hydrocarbons. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 21, 395-400.

Cajaraville, M. P., Abascal I., Etxeberria, M. & Marigómez, I., 1995, Lysosomes as cellular markers of environmental pollution: time- and dose-dependent responses of the digestive lysosomal system of mussels after petroleum hydrocarbon exposure, Environ. Toxicol. Water Qual. 10, 1-8.

Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach., Sci. Total Environ. 247, 295-311.

Cajaraville, M.P, Garmendia, L., Orbea, A., Werding, R., Gómez-Mendikute, A., Izagirre, U., Soto, M., Marigómez, I., 2006. Signs of recovery of mussels health two years after the Prestige oil spill, Mar. Environ. Res. 62, S337-S341.

Einsporn, S., Broeg, K., Koehler, A., 2005. The Elbe flood 2002—toxic effects of transported contaminants in flatfish and mussels of the Wadden Sea. Mar. Pollut. Bull. 50, 423-429.

Etxeberria, M., Sastre, I., Cajaraville, M.P., Marigómez, I., 1994. Digestive lysosome enlargement induced by experimental exposure to metals (Cu, Cd, and Zn) in mussels collected from a zinc-polluted site. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 27, 338-345.

Gernhöfer, M., Pawert, M., Schramm, M., Müller, E., Triebskorn, R., 2001. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery 8, 241-260.

Giamberini, L. Cajaraville, M.P., 2005. Lysosomal responses in the digestive gland of the freshwater mussel, Dreissena polymorpha, experimentally exposed to cadmium. Environ. Res. 98, 210-214.

Guerlet, E., Ledy, K., Giambérini, L., 2006. Field application of a set of cellular biomarkers in the digestive gland of the freshwater snail Radix peregra (Gastropoda, Pulmonata). Aquat. Toxicol. 77, 19-32.

Jeanneau, L., Faure, P., Montarges-Pelletier, E., Ramelli, M., 2006. Impact of a highly contaminated river on a more important hydrologic system: Changes in organic markers. Sci. Tot. Env. 372, 183-192.

Keppler, C.J., Hoguet, J., Smith, K., Ringwood, A.H., Lewitus, A.J., 2005. Sublethal effects of the toxic alga Heterosigma akashiwo on the southeastern oyster (Crassostrea virginica). Harmful Algae 4, 275-285.

Lowe, D.M., Moore, M.N., Clarke, K. R, 1981. Effects of oil on digestive cells in mussels: Quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. Aquat. Toxicol. 1, 213-226.

Lowe, D.M., Moore, M.N., Readman, J.W., 2006. Pathological reactions and recovery of hepatopancreatic digestive cells from the marine snail Littorina littorea following exposure to a polycyclic aromatic hydrocarbon. Mar. Environ. Res. 61, 457-470.

Marigómez, I., Baybay-Villacorta, L., 2003. Pollutant-specific and general lysosomal responses in digestive cells of mussels exposed to model organic chemicals. Aquat. Toxicol. 64, 235-257.

MEDD and Agences de l'Eau, 2003. Système d'Evaluation de la Qualité de l'eau des cours d'eau. Grilles d'évaluation S.E.Q. eau (version 2), 40p. http://sierm.eaurmc.fr/eaux-superficielles:fichiers-telechargeables:grilles-seq-eau-v2.pdf

Montarges-Pelletier, E., Jeanneau, L., Faure, P., Bihannic, I., Barres, O., Lartiges, B.S., 2007. The junction of Fensch and Moselle rivers, France; mineralogy and composition of river materials. Environ. Geol. 53, 85-102.

Moore, M.N., 1985. Cellular responses to pollutants. Mar. Pollut. Bull. 16, 134-139.

Moore, M.N., 1988. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. Mar. Ecol., Progr. Ser. 46, 81-89.

Nalepa, T.F., Cavaletto, J.F., Ford, M., Gordon, W.M., Wimmer, M., 1993. Seasonal and Annual Variation in Weight and Biochemical Content of the Zebra Mussel, Dreissena polymorpha, in Lake St. Clair. J. Great Lake Res. 19, 541-552.

Nicholson, S., Lam, P.K.S., 2005. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel Perna viridis (Mytilidae: Bivalvia). Environ. Int. 31, 121-132.

Pannunzio, T.M., Storey, K.B., 1998. Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod Littorina littorea. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 221, 277-292.

Pearse, A.G.E., 1972. Histochemistry, theorical and applied. London, Churchill-Livingstone.

Pipe, R.K., Moore, M.N., 1986. An ultrastructural study on the effects of phenanthrene on lysosomal membranes and distribution of the lysosomal enzyme β-glucuronidase in digestive cells of the periwinkle Littorina littorea. Aquat. Toxicol. 8, 65-76.

Regoli, F., 1992. Lysosomal responses as a sensitive stress index in biomonitoring heavy metal pollution. Mar. Ecol. Progr. Ser. 84, 63-69.

Smolders, R., Bervoets, L., De Coen, W., Blust, R., 2004. Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization., Environ. Pollut. 129, 99-112.

Sprung, M., 1995. Physiological Energetics of the Zebra Mussel Dreissena polymorpha in Lakes I. Growth and Reproductive Effort. Hydrobiologia 304, 117-132.

Viarengo, A., Pertica, M., Canesi, L., Accomando, R., Mancinelli, G., Orunesu, M., 1989. Lipid peroxidation and level of antioxidant compounds (GSH, viamin E) in the digestive glands of mussels of three different age groups exposed to anaerobic and aerobic conditions. Mar. Environ. Res. 28, 291-295.

Vinot, I., Pihan, J.C., 2005. Circulation of copper in the biotic compartments of a freshwater dammed reservoir. Environ. Pollut. 133, 169-182.

Wedderburn, J., McFadzen, I., Sanger, R.C., Beesley, A., Heath, C., Hornsby, M., Lowe, D., 2000. The field application of cellular and physiological biomarkers, in the mussel *Mytilus edulis*, in conjunction with early life stage bioassays and adult histopathology. Mar. Poll. Bull. 40, 257-267.

Yin, D., 1996. Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. Free Radic. Biol. Med. 21, 871-888.

Zorita, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Soto, M. Cajaraville, M.P., 2006. Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): An integrated biochemical, histochemical and histological study. Aquat. Toxicol. 78, S109-S116.

3 CONFRONTATION DES RESULTATS OBTENUS CHEZ LA DREISSENE TRANSFEREE A CEUX MIS EN EVIDENCE CHEZ LA CORBICULE NATIVE

Au cours de l'expérimentation n°2, conduite durant le printemps-été 2005, un transfert de corbicules natives du site M1 vers les deux stations situées en aval a été réalisé (l'approche passive réelle, n'impliquant que des organismes natifs de chaque site, n'était pas applicable car cette espèce n'a pas été retrouvée aux stations M2 et M3).

Une centaine de corbicules a été répartie en quatre lots homogènes : l'un exploité le jour même et les trois autres placés dans des sachets grillagés et déposés à chacune des trois stations, légèrement enfoncés dans le sédiment (le jour de transfert correspondant au J15 de l'expérimentation sur les dreissènes). Les trois contenus et compartiment cellulaires ont été étudiés dans les tissus digestifs des corbicules après 15 jours d'encagement.

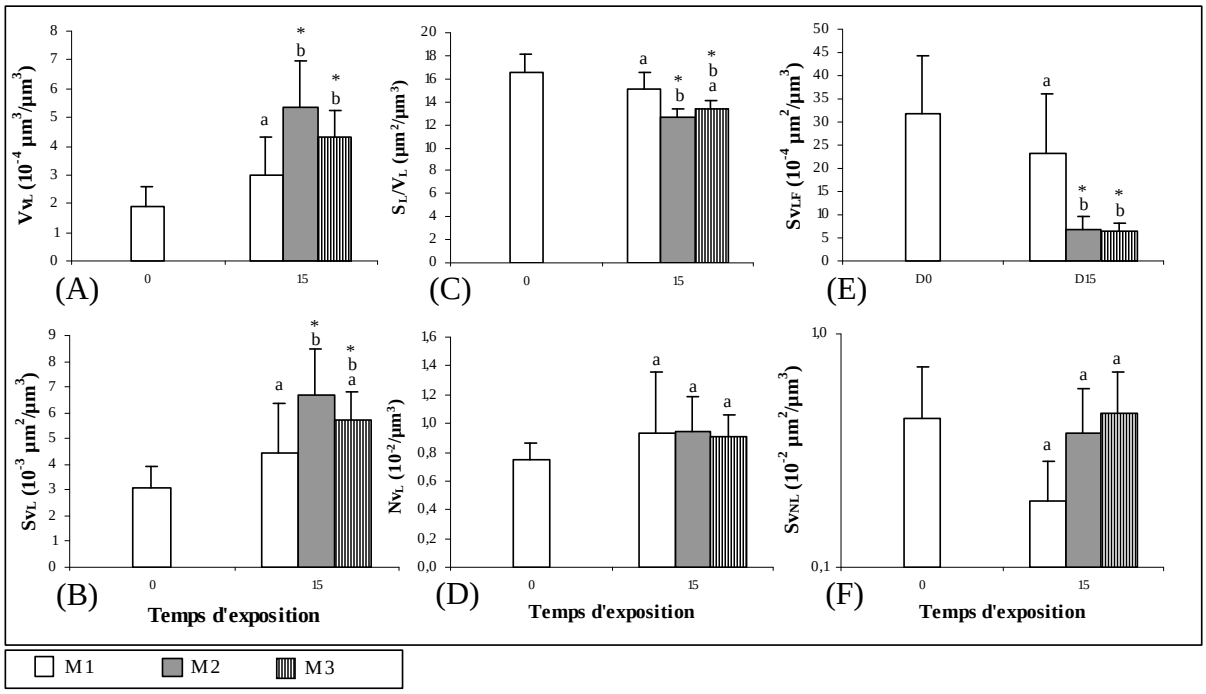


Figure III.1.B.2. Effets cellulaires du déploiement de corbicules natives le long du gradient sur la Moselle au cours de l'expérimentation ECODYN, printemps-été 2005. Les lettres indiquent les moyennes significativement différentes (test post-hoc de Duncan, $p \leq 0,05$, après transformation logarithmique des variables Sv_{LN} et Sv_{LF} ; sauf Nv_L : U de Mann-Whitney, Wilcoxon, $2(1-p) \leq 0.05$).

Le profil entre stations après transfert indique un système lysosomal globalement plus volumineux chez les corbicules exposées aux deux stations aval M2 et M3 (Figure III.1.B.2.A et B), résultat exclusivement lié à une taille individuelle plus importante des lysosomes (Figure III.1.B.2.C), plutôt qu'à des variations de leur nombre (Figure III.1.B.2.D). Les amas

de lipofuscines sont significativement moins abondants aux stations M2 et M3 qu'à l'amont avant et après transfert (Figure III.1.B.2.E). Si aucun effet temporel (F=0,11 ; p=0,741), spatial (F=1,25 ; p=0,297) ou de l'interaction de ces deux facteurs (F=1,25 ; p=0,297) n'est montré par l'ANOVA conduite sur les résultats des contenus en lipides neutres, ces derniers tendent à rester semblables aux niveaux initiaux chez les corbicules exposées aux deux stations aval, tandis qu'ils semblent tout de même chuter chez les organismes encagés à l'amont (Figure III.1.B.2.F).

Les schémas de réponse des corbicules natives ou vivant à proximité des sites à ce gradient de contamination n'ont donc peu de rapports avec ceux qui ont été observés chez les dreissènes transférées provenant de deux populations bien distinctes (Ref1 et Ref2).

Les **réponses lysosomales** des corbicules correspondent d'avantage aux profils attendus en cas de stress général (gonflement lysosomal).

Les résultats obtenus sur le **contenu tissulaire en lipofuscines** à l'aval de la confluence avec la Fensch suggèrent un éventuel délai trop court pour que les déchets de la lipoperoxydation ne s'accumulent (et dans ce cas, la pertinence de cette réponse en terme de précocité se pose) ou une inhibition de la détoxication (mais les résultats sur la structure du système lysosomal ne vont pas dans ce sens). Les niveaux plus importants à l'amont pourraient plutôt résulter (i) soit d'un niveau physiologique basal pour cette station (avec notamment une contribution trophique conséquente), (ii) soit d'une détoxication en continu chez ces corbicules acclimatées aux conditions de M1, mais pas à celles des stations M2 et M3. L'absence de population naturelle à ces deux sites pourtant proches du précédent pose d'ailleurs la question de l'adéquation des conditions écologiques et/ou du niveau de contamination pour l'établissement et la survie à moyen terme de cette espèce à ces endroits.

Enfin, les tendances quelque peu surprenantes observées sur les **contenus tissulaires en lipides neutres insaturés** suggèrent la possible concomitance de deux effets antagonistes : (i) l'un qui serait responsable d'une diminution chez les corbicules restées à l'amont (stress de l'encagement, fluctuation qualitative ou quantitative des apports trophiques, mobilisation pour un processus physiologique quelconque) et (ii) l'autre qui, à l'aval de la confluence, contrecarrerait le premier phénomène (lipidose chimiquement induite par la présence de contaminants organiques fortement lipophiles, fréquemment rapportée dans la littérature et que nous n'avons jamais constatée). Il est impossible de conclure sans études supplémentaires

et la variabilité intra-groupes importante de ces résultats (responsable de leur non-significativité) ne permet pas, pour l'heure, de donner de poids à cette hypothèse.

4 EXPERIMENTATION EN LABORATOIRE ET A COURT-TERME SUR LA REPONSE DE *D. POLYMORPHA* A DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'EAU DE LA FENSCH

L'analyse des résultats obtenus chez les moules exposées directement dans la Fensch lors de l'expérimentation *in situ* menée durant l'été 2004 est à l'origine de certaines hypothèses qui seront vérifiées lors de la présente expérimentation. L'importante mortalité, les faibles indices de condition et niveaux structuraux du système lysosomal, des lipofuscines et des lipides neutres insaturés suggèrent une hypothèse alternative au stress engendré par la contamination multiple des sites d'étude : une possible réaction d'évitement des dreissènes. Ainsi la mortalité pourrait être consécutive au jeûne, et éventuellement à l'anoxie plutôt qu'à un effet direct des contaminants.

Afin de vérifier cette hypothèse d'évitement et d'évaluer les effets spécifiques à court terme des apports d'eau de la Fensch au niveau de la confluence avec la Moselle, une expérimentation a été conduite du 12 au 18 avril 2005, consistant à exposer *D. polymorpha* à différentes concentrations d'eau de la Fensch représentatives, d'une part, d'une situation estivale (période des expérimentations *in situ*, et situation d'étiage : dilution au 30ème), d'autre part, d'une situation moyenne au cours de l'année (dilution au 50ème). Ces concentrations ont été déterminées par analyse du débit relatif de la Fensch par rapport à celui de la Moselle durant 4 ans (janvier 1999 à décembre 2002, moyennes mensuelles de données quotidiennes de la DIREN (« Banque HYDRO »), complétées pour l'année 2001 par des données mensuelles ponctuelles de l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse ; sites consultés le 05/04/2005 : http://www.lorraine.ecologie.gouv.fr/SPC/bulquo.htm; http://www.eau-rhin-meuse.fr/Berm/htm/debits/debit_mos_av.htm ; voir l'annexe 4).

4.1 MATERIEL ET METHODES

4.1.1 Organismes

Les organismes utilisés proviennent de la population de *D. polymorpha* de la Meuse à Commercy (Ref2). Plus de 500 individus ont été récoltés le 4 avril 2005 et acclimatés au laboratoire dans une salle climatisée à 17 ± 1 °C avec une photopériode analogue à la photopériode naturelle (13h15 : 10h45), dans l'eau du site aérée en continu. Les dreissènes sont nourries quotidiennement par l'apport d'algues congelées (*Chlorella vulgaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Scenedesmus subspicatus*, environ 2 à 4.10^4 ∝.mL^{-1}.j^{-1}). Les moules sont placées le 8 avril sur la face rugueuse de 25 carreaux de carrelage de 33 x 6,5 cm (préalablement rincés, acidifiés à 0,8 % d'acide acétique et rincés deux fois 10 h dans de l'eau déminéralisée).

4.1.2 Prélèvement et conditionnement de l'eau

Le 12 avril 2005, de l'eau des stations M1 et F est ramenée au laboratoire (respectivement 9 et 3 bidons de 5 L) et utilisée immédiatement pour le début de l'exposition. L'eau restante pour un changement après 3 jours est conservée en chambre froide à 4°C et à l'obscurité, puis portée à la température de la pièce quelques heures avant ce changement d'eau.

4.1.3 Modalités d'exposition

Les expositions sont réalisées dans 25 bouteilles d'eau de source en polyéthylène dont la partie supérieure a été découpée. Les morceaux de carrelage sur lesquels sont fixées les moules sont immergés verticalement dans 800 mL de milieu, avec un léger bullage en continu. Les différentes modalités d'exposition sont les suivantes :

- **Source** : eau de la source Terres de Flein, commercialisée sous la marque Telle Qu'Elle ;
- **F/50S** : dilution au 1/50ème d'eau brute de la Fensch dans l'eau de source ;
- **F/30S** : dilution au 1/30ème d'eau brute de la Fensch dans l'eau de source ;
- **Moselle** : eau brute de la station M1 ;

- **F/50M** : dilution au 1/50ème d'eau brute de la Fensch dans l'eau brute de la station M1 ;
- **F/30M** : dilution au 1/30ème d'eau brute de la Fensch dans l'eau brute de la station M1 ;
- **Fensch** : eau brute de la Fensch ;
- **Fensch filtrée** : eau de la Fensch filtrée sur papier Whatmann ;
- **Fensch filtrée + mousses** : eau de la Fensch filtrée sur papier Whatman et comportant une poignée de bryophytes *F. antipyretica*.

Les 8 premières modalités sont testées durant 1, 3 et 7 jours (avec 3 dispositifs d'exposition pour chacune), tandis que les moules exposées à la dernière modalité ne sont prélevées qu'après 7 jours (1 dispositif unique). Un changement d'eau est réalisé à mi-exposition (fin de la 3ème journée) dans les 9 dispositifs restants. La minéralisation de l'eau de source est présentée en annexe 6.

4.1.4 Contrôle et prélèvement des organismes

Quotidiennement, un examen visuel des dispositifs (par transparence) permet de vérifier la survie et la filtration des moules. A l'issue des temps d'exposition (1, 3 et 7 jours), les dispositifs sont sacrifiés et les moules prélevées sur les carreaux au fur et à mesure des dissections.

4.1.5 Biomarqueurs cellulaires

En raison du temps d'exposition réduit, l'indice de condition n'a pas été mesuré. Les paramètres stéréologiques précédemment étudiés lors des expositions *in situ* sont suivis (Vv_L, Sv_L, Nv_L, Sv_{LF} et Sv_{LN}).

4.1.6 Statistiques

En raison de l'inéligibilité de la plupart des données à un traitement statistique paramétrique, même après transformation des variables (dépendance de la moyenne et de l'écart type et significativité des tests d'homoscedasticité de Levene et Brown-Forsythe), la significativité des différences deux à deux est vérifiée par le test unilatéral de Mann-Whitney, Wilcoxon ($2(1-p) \leq 0,05$).

4.2 RESULTATS ET DISCUSSION

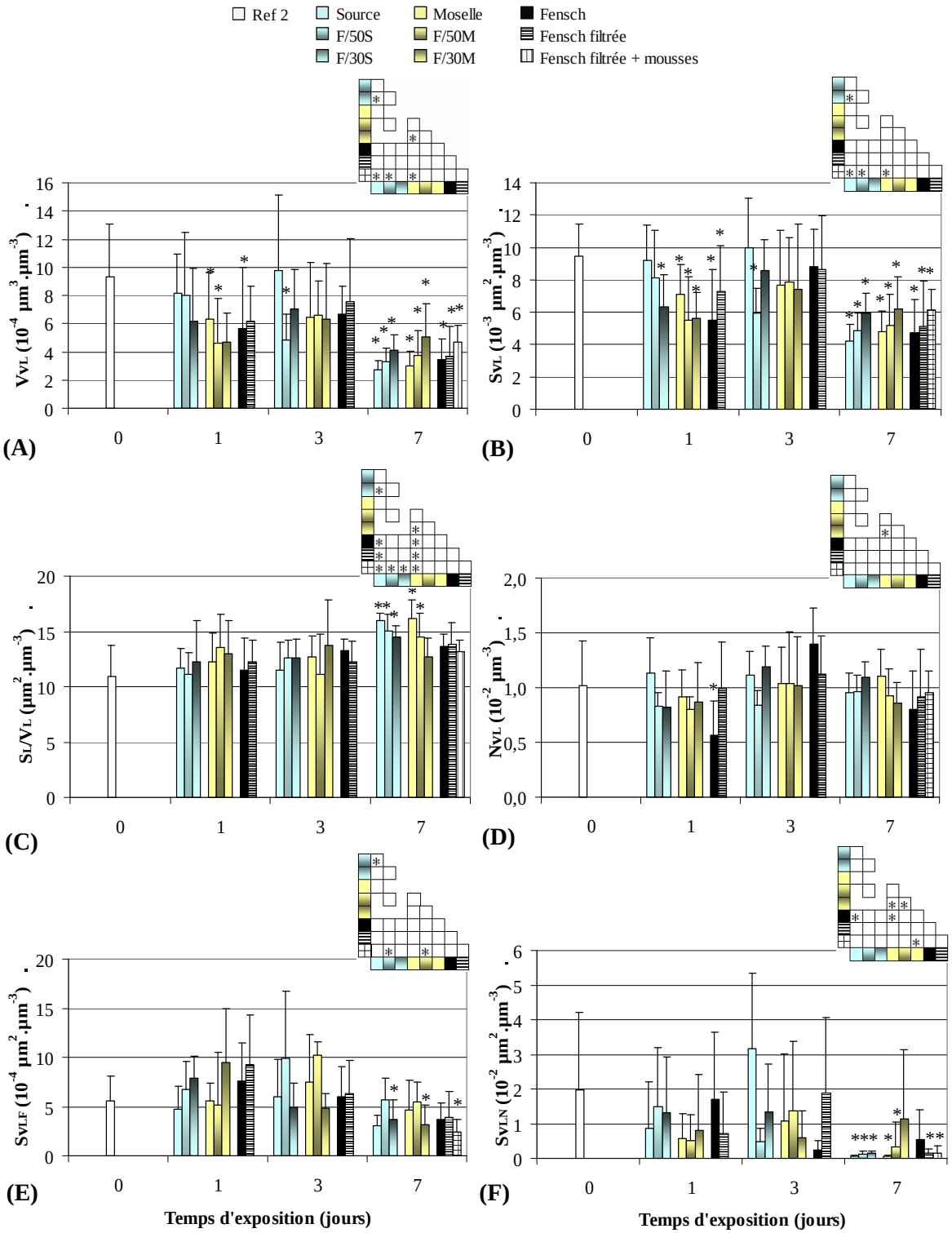


Figure III.1.B.3. Réponses cellulaires à l'exposition de D. polymorpha à l'eau de la Fensch, filtrée ou non, et diluée dans l'eau de la Moselle et de l'eau de source. Les astérisques indiquent les différences significatives par rapport au début de l'expérimentation (moules originaires de Ref2)et les matrices indiquent la significativité des différences deux à deux à 7 jours (test unilatéral de Mann-Whitney, Wilcoxon, 2(1-p) ≤ 0,05).

Au cours des expositions, nous n'avons pas constaté de mortalité importante ni – au cours de nos vérifications quotidiennes ponctuelles – de cessation de la filtration des moules aux conditions d'exposition les plus sévères.

Les résultats des expositions aux différentes modalités montrent tout d'abord une **grande variabilité intra-groupes**, surtout aux deux premières dates, quelle que soit la réponse cellulaire étudiée. Ainsi, le coefficient de variabilité (CV) moyen des paramètres lysosomaux et des lipides neutres décroit systématiquement entre le premier et le septième jour pour tous les paramètres stéréologiques à l'exception de Sv_{LF} (voir Figure III.1.B.3A à E). Par exemple, la réponse la plus variable, à savoir Sv_{LN} (Figure III.1.B.3E), présente un CV moyen compris entre 144 et 113 % entre J1 et J7. Les CV moyens des cinq autres paramètres stéréologiques se situent entre 10 et 54 % (pour S_L/V_L à 7 j et Vv_L à 1 j, respectivement). Ces résultats semblent refléter le temps d'accomodation aux conditions expérimentales, pour des dreissènes qui ont déjà subi des épisodes de stress successifs avant le début de l'expérimentation (prélèvement en milieu naturel 8 jours plus tôt et section du byssus au scalpel, mise en stabulation, synthèse d'un nouveau byssus, puis changement de milieu). Nous nous concentrerons donc sur l'interprétation des résultats après 7 jours.

Les **paramètres stéréologiques lysosomaux** synthétiques (proportions volumique et de surface, Figure III.1.B.3A et B) sont, à 7 jours, tous inférieurs au témoin (Ref2, J0). Les tendances précédemment observées *in situ* ne sont cependant pas retrouvées ici, puisque l'apport d'eau de la Fensch dans l'eau de source ou de la Moselle ne provoque aucune diminution des paramètres lysosomaux (Vv_L, Sv_L, Nv_L et taille individuelle). Elle induit au contraire une augmentation de la taille des lysosomes (baisse de S_L/V_L, Figure III.1.B.3C) et des deux paramètres synthétiques, Vv_L et Sv_L, ainsi qu'une proportion numérique accrue, dans le cas de l'eau de la Fensch la plus concentrée dans l'eau de la Moselle (Figure III.1.B.3D). Ces réponses correspondraient d'avantage à un gonflement lysosomal dépendant de la dose, classiquement rapporté dans la littérature. Cependant, les paramètres lysosomaux des dreissènes exposées à l'eau de la Fensch brute ou filtrée ne présentent pas de gonflement lysosomal suffisant pour que les paramètres synthétiques Vv_L et Sv_L soient plus élevés que chez les moules exposées à l'eau de source ou l'eau de la Moselle. En effet, bien que la taille des lysosomes soit significativement plus importante chez les organismes exposés aux trois modalités d'eau de la Fensch par rapport à l'eau de source ou de M1, leur nombre qui tend à

être inférieur empêche le système lysosomal d'être globalement plus volumineux. Pourtant, ce sont bien les diminutions parallèles de S_L/V_L et Nv_L qui sont décrites comme les élargissement lysosomaux les plus sévères (Marigómez & Baybay-Villacorta, 2003), ce qui confirme l'intérêt d'étudier les différents paramètres stéréologiques de concert. Ces réponses, différentes de celles observées sur le terrain suggèrent qu'une fraction des polluants apolaires (notamment les HAP) a pu être adsorbée sur les parois en plastique des dispositifs et se retrouver moins disponible. Ainsi, les différences de schémas de réponses observées entre le terrain et cette expérimentation en laboratoire pourraient résulter d'une modification du mélange de contaminants, avec éventuellement une contribution relative plus importante des métaux par rapport aux contaminants apolaires dans le cas présent.

Après 7 jours d'expérimentation, les **niveaux tissulaires en lipofuscines** présentent des valeurs maximales aux concentrations intermédiaires d'eau de la Fensch (avec notamment une différence significative entre l'eau de source et F/50S), ce qui évoque les résultats obtenus sur le terrain à l'été 2005, au niveau de la station intermédiaire du gradient de contamination, M2.

Les **niveaux tissulaires de lipides neutres insaturés** ont globalement diminué par rapport aux témoins après une semaine d'exposition aux différentes modalités. Cependant, ces déplétions sont limitées, voire inexistantes chez les moules exposées aux mélanges des eaux de la Moselle et de la Fensch ou à l'eau de la Fensch brute. Bien qu'une lipidose chimiquement induite soit envisageable, il est également possible qu'un facteur trophique explique ces résultats. En effet, nous n'avions pas constaté ce genre d'accumulation importante de lipides sur le terrain (pourtant en l'absence de diminution de la biodisponibilité des contaminants liée à l'adsorption sur plastique) . Deux éléments plaident plutôt en faveur de l'hypothèse trophique, à savoir l'absence d'apport alimentaire de notre part en cours d'exposition, tandis que la quantité de lipides est maximale lorsque s'additionnent les matières en suspension de la Moselle et de la Fensch (F/30M), plutôt qu'en présence des matières en suspension les plus contaminées de la Fensch seule.

Dans l'optique de bioessais futurs, notamment avec des eaux multi-contaminées, ces résultats préliminaires suggèrent deux améliorations nécessaires :

- Exposition dans des dispositifs en verre pour limiter l'adsorption des contaminants apolaires et saturation préalable des sites de fixation avant introduction des organismes ;
- Apports trophiques, même en cas d'expositions de court-terme (inférieures à une semaine), pour limiter les déplétions en lipides neutres non liées aux modalités à tester. Les caractéristiques quantitatives et qualitatives idéales de l'apport trophique restent encore à définir (la filtration des dreissènes est stimulée par des concentrations de l'ordre de la dizaine de milliers de cellules algales (*Chlorella)* par millilitre de milieu (Mouabad, 1991)[1] ; cependant, une expérimentation conduite durant les présents travaux de thèse et non présentée ici indique qu'une telle concentration est insuffisante pour éviter les déplétions de lipides neutres de la glande digestive en bioessai).

L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre du programme ECODYN souligne la nécessité d'acquérir, chez les invertébrés d'eau douce, des connaissances supplémentaires sur les schémas de réponses des compartiments et contenus cellulaires étudiés à diverses classes de contaminants ainsi qu'à des mélanges plus ou moins complexes. Dans cette optique, l'étude qui suit s'intéresse aux effets de deux contaminants organiques, à savoir des herbicides, appliqués seuls ou en mélange avec un adjuvant, sur la structure du système lysosomal digestif du gastéropode *L. stagnalis*.

[1] Le taux de filtration des dreissènes est divisé par un facteur d'environ 4,5 lorsque la concentration algale passe de 10^4 à 10^6 ⊄.mL^{-1} (Mouabad, 1991).

C. Effets de deux herbicides, appliqués seuls ou en mélange avec un adjuvant, sur le système lysosomal digestif de *L. stagnalis*

Programme « ERRUP »
Evaluation et Réduction des Risques Liés à l'Utilisation des Pesticides.

«CEREMEL » Changements d'Echelle et évaluation du Risque Ecotoxicologique de MELanges entre substances actives herbicides et adjuvant.

1 INTRODUCTION

1.1 CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

Cette étude s'inscrit dans le cadre du programme « Evaluation et Réduction des Risques Liés à l'Utilisation des Pesticides » proposé par le Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable. Elle s'intègre dans la première partie du projet « Changement d'Echelle et évaluation du Risque Ecotoxicologique de MELange entre substances actives herbicides et adjuvant », appartenant au Volet 2 du programme « Evaluation des effets chroniques des pesticides sur des systèmes biologiques intégrés », et, en particulier, au Sous-volet 2-1 intitulé « Analyse des effets des pesticides à différents niveaux d'organisation biologique ».

L'objectif de ce projet de recherche consiste à évaluer les effets de deux herbicides, le diquat et le fomésafène, ainsi que les possibles interactions avec un adjuvant tensioactif à base de polyéthoxylates de nonylphénol, l'Agral 90, chez deux espèces d'eau douce, la lymnée, *Lymnaea stagnalis*, et l'épinoche, *Gasterosteus aculeatus*. Les investigations portent, au niveau individuel, sur les systèmes de défense et la régulation de la reproduction et, au niveau populationnel, sur les traits d'histoire de vie. La **première phase du programme**, à laquelle appartiennent les résultats présents, concerne des études de court terme des réponses précoces de chacune des espèces (tests monospécifiques). Une **seconde phase** lui a succédé, au cours de l'automne 2006, qui consiste en des expositions de plus long terme en écosystèmes simplifiés (microcosmes), mais dont les résultats ne font pas partie de ces travaux de thèse.

L'intérêt du programme CEREMEL se conçoit à différents égards (Lagadic *et al.*, 2007).

- Il contribue notamment au **développement d'outils de diagnostic, voire de prévision**, des effets biologiques, applicables dans une démarche d'évaluation du risque écotoxicologique ; il participe à la validation des méthodologies (i) mises en œuvre dans le cadre de différents scénarios d'exposition des organismes (bioessais et tests en microcosmes) et (ii) impliquées dans l'évaluation de différents critères d'effets biologiques (biomarqueurs, traits d'histoire de vie et performances précoces de la descendance de géniteurs exposés aux xénobiotiques). En d'autres termes, le **changement d'échelle s'opère donc à deux niveaux**, par la confrontation des résultats observés (i) en complexifiant le scénario d'exposition (du test monospécifique au microcosme ; dans ce dernier cas, les organismes peuvent interagir entre eux et avec le milieu physique, notamment le sédiment, et la contamination peut également se faire par voie trophique) ; (ii) et en gravissant les étages de l'échelle biologique (du niveau subcellulaire au niveau populationnel) ;
- Il apporte des informations sur les **effets de mélanges** binaires herbicide-adjuvant, encore trop peu étudiés, malgré le réalisme de ce type d'exposition et les interactions complexes des effets des mélanges de xénobiotiques. De telles interactions vont souvent au-delà d'une simple additivité des effets des produits pris isolément. Pourtant, additionner les effets est généralement la seule démarche d'évaluation que les experts en réglementation se voient obligés d'appliquer, par manque de données fiables sur les mélanges. Or, des potentialisations ou synergies peuvent se manifester (toxicité plus élevée que la somme des effets des produits isolés), tout comme des effets antagonistes (toxicité réduite du mélange). Le but n'est pas ici de caractériser de façon stricte les différentes interactions possibles du mélange herbicide-adjuvant, ce qui, avec les méthodes classiques, nécessiterait des plans expérimentaux très lourds, où un grand nombre de modalités croisées sont testées. Il s'agit plutôt d'évaluer la toxicité globale des produits à court et moyen terme, dans des conditions réalistes (concentrations susceptibles d'être rencontrées dans les hydrosystèmes et respect des proportions d'usage des constituants du mélange).

Plus concrètement encore, dans le **contexte actuel de la mise en place de la nouvelle politique réglementaire européenne** (REACH), ce programme fournit (i) des données précieuses sur les effets biologiques des trois substances testées dans des conditions

environnementalement réalistes et (ii) des contributions méthodologiques pour conforter et étayer les procédures d'évaluation des risques écotoxicologiques des mélanges pesticide-adjuvant en milieu aquatique.

Le programme CEREMEL, coordonné par Laurent Lagadic (INRA Rennes), implique divers acteurs appartenant aux structures suivantes :

- l'équipe 'Ecotoxicologie et Qualité des Milieux', UMR 985 INRA-ENSAR 'Ecobiologie et Qualité des hydrosystèmes Continentaux' (Rennes) chargée de la mesure de biomarqueurs (énergétiques, enzymes de biotransformation, stéroïdes) et de la détermination des performances individuelles précoces chez les lymnée ;
- l'UMR 6553 CNRS-Université de Rennes 1 'Ecobio', concernée par la mesure de biomarqueurs immunologiques (burst oxydatif, production d'ERO, stabilité lysosomale hémocytaire) ;
- l'U3E (INRA, Rennes), chargée de l'élevage des lymnées, et, pour le volet rennais et la seconde phase (microcosmes), de la mise en place et du suivi des dispositifs expérimentaux, des prélèvements et mesures et des cultures algales ;
- l'UMR 1089 INRA-ENVT 'Xénobiotiques' (Toulouse), pour le volet analytique ;
- l'Unité Evaluation des Risques Ecotoxiologiques, équipe 'Modèles cellulaires et biomarqueurs' de l'INERIS (Verneuil-en Halatte), pour la mesure de biomarqueurs du stress oxydant, d'enzymes de biotransformation et du taux plasmatique de vitellogénine chez l'épinoche ;
- le LIEBE (anciennement Laboratoire ESE) UMR 7146, CNRS–UPVM (Metz), au sein duquel ont été mesurés des biomarqueurs de stress oxydant et de stress général (structure du système lysosomal) ;
- le Laboratoire de Biologie et d'Ecophysiologie de l'Université de Franche-Comté (Besançon), pour le suivi histologique du complexe gonado-digestif des lymnées.

1.2 LES SUBSTANCES TESTEES

Le **fomésafène** (5-(2-chloro-4-(trifluorométhyl)-phenoxy)-N-méthylsulfonyl-2-nitrobenzamide), appartient à la famille des éthers de diphényle et à la classe des « peroxidizing herbicides ». Il doit son pouvoir désherbant à l'inhibition de la

protoporphyrinogène oxydase, enzyme responsable de la synthèse des hèmes, et donc de la production de chlorophylle. Il s'agit d'un herbicide à action immédiate et à diffusion nulle ou très faible. Utilisées pour le désherbage des cultures de soja et de haricot, les formulations contenant cette substance active sont interdites à la vente depuis le 31 août 2007, et à l'usage à compter du 31 décembre 2007 (Décision en date du 28 avril 2007, Vu le règlement N°1336/2003 de la Commission du 25 juillet 2003 modifiant le règlement N°2076/2002, Vu l'avis au JORF du 18 août 2002 complété par l'avis du 26 mars 2004, fin de la possibilité de maintenir en vigueur les autorisations à base de fomésafène ; http://e-phy.agriculture.gouv.fr). La dose préconisée de la formulation FLEX Pack avant interdiction était d'environ 1 $L.ha^{-1}$ (soit 250 $g.ha^{-1}$ de fomésafène) pour le soja, pouvant être appliquées en une seule fois ou en deux applications successives de la demi-dose à 3-5 jours d'intervalle. Le fomésafène peut être dégradé par la lumière et les micro-organismes, phénomène accéléré en conditions anaérobies. Son temps de demi-vie dans le sol est de 100 jours (Martin, 2000). Il semble difficile de trouver des données sur les concentrations environnementales en fomésafène dans les eaux de surface françaises. Ce pesticide ne fait pas partie des substances les plus recherchées : il est, par exemple, absent de la liste des pesticides susceptibles d'être dosés aux différentes stations couvertes par le Système d'Information sur l'Eau de l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse. D'autre part, dans une synthèse des activités réalisées de 1997 à 2004 par le groupe de travail PHYT'EAUVERGNE sur le bassin versant du Luzeray, dans l'Allier, il apparaît que le fomésafène n'a été recherché que très ponctuellement au cours de cette étude (2003), et ne figure pas dans la liste des produits détectés (Phyt'Eauvergne, 2004). Pour l'année 2000, 191 tonnes de substances actives de type éthers de diphényle (bifénox, fluoroglycofène-éthyl, oxyfluorfène et fomésafène) ont pourtant été commercialisées en France (Comité de la Prévention et de la Précaution, 2002).

Le **diquat** (ion 1-1'-éthylène-2,2'-dipyridilium), herbicide dipyridylé, exerce une action dessiccative sur les parties aériennes des plantes, en inhibant la photosynthèse par le détournement d'électrons à la sortie du photosystème I. Tout comme le fomésafène, il s'agit d'un herbicide à action immédiate et à diffusion nulle ou très faible, perturbateur des membranes cellulaires (Martin, 2000). Son usage est autorisé en France pour le désherbage de diverses cultures (avocatier, bananier, céréales avant récolte, divers agrumes, pavot oeillette, poirier, vigne, etc.…), ainsi que pour la dessiccation des parties aériennes (lin, pommes de terre, haricots, lupin, soja, tournesol, etc.…), et pour la destruction de rejets de vigne

(réglementation en vigueur, en date des 07/12/2001 et 22/06/2006 selon les usages ; http://e-phy.agriculture.gouv.fr). L'application de doses variant de 1 à 5 $L.ha^{-1}$ est recommandée pour l'emploi de la formulation REGLONE 2, commercialisée par Syngenta, soit 200 à 1000 $g.ha^{-1}$ de substance active, en fonction des usages. Son temps de demi-vie dans les sols est de l'ordre de 1000 jours et il n'est ni assimilable par les plantes, ni dégradé par les micro-organismes (Martin, 2000). Le diquat, qui présente une forme ionisée, montre une très forte affinité pour les argiles et les particules du sol, et, lorsqu'il se retrouve dans un hydrosystème, il disparaît rapidement de la colonne d'eau, pour se lier fortement aux sédiments (Pratt *et al.*, 1990). En effet, lorsque le diquat est appliqué dans l'eau même des rivières (pour le contrôle des lentilles d'eau en Australie), la concentration initialement dosée de 3,51 $mg.L^{-1}$ diminue très rapidement pour se retrouver sous les limites de détection à peine une heure plus tard (Peterson *et al*., 1997). Ces propriétés justifient l'évaluation des effets les plus précoces d'expositions au diquat chez les organismes principalement inféodés à la colonne d'eau.

L'intervention de ces deux herbicides dans les mécanismes de toxicité cellulaire pour les modèles animaux utilisés dans le programme CEREMEL est résumée dans la figure III.1.C.1.

L'Agral 90®, utilisé comme agent mouillant, consiste en un mélange de polyéthoxylates de nonylphénol (NPEOs). Cet adjuvant présente une activité surfactante, conférée par la forte hydrophobicité du nonylphénol et la substitution en para d'une longue chaîne de radicaux éthanol (comportant jusqu'à une centaine d'unités). De nombreuses études s'intéressent à la toxicité des NPEOs, croissante alors que la longueur de la chaîne éthoxylée diminue et que la chaîne hydrophobe augmente (Lagadic *et al.*, 2007). Des effets perturbateurs endocriniens du nonylphénol et de ses dérivés mono- et diéthoxylés ont ainsi été rapportés chez différents groupes de vertébrés (effets œstrogène-mimétiques), et des altérations de la reproduction et/ou du développement ont été montrés chez divers invertébrés aquatiques (pour plus de détails, voir Pachura-Bouchet, 2005). Les valeurs de toxicité aiguë du nonylphénol (CL50 et CE50) pour les organismes aquatiques se situent généralement dans une fourchette comprise entre 100 et 1000 $\mu g.L^{-1}$ et une toxicité chronique pour la reproduction peut s'exprimer, chez les microcrustacés, dès quelques dizaines de microgrammes par litre (Pachura-Bouchet, 2005). La prise de conscience de la toxicité des NPEOs de la part des pouvoirs publics et des industriels a permis une diminution de leur

utilisation, et le taux moyen dans la plupart des eaux de surface avoisine le microgramme par litre. Néanmoins, les sites contaminés où les stations d'épuration de l'eau municipales ou industrielles sont inefficaces ou absentes connaissent des concentrations pouvant atteindre plusieurs centaines de microgrammes par litre de nonylphénol (Pachura-Bouchet, 2005).

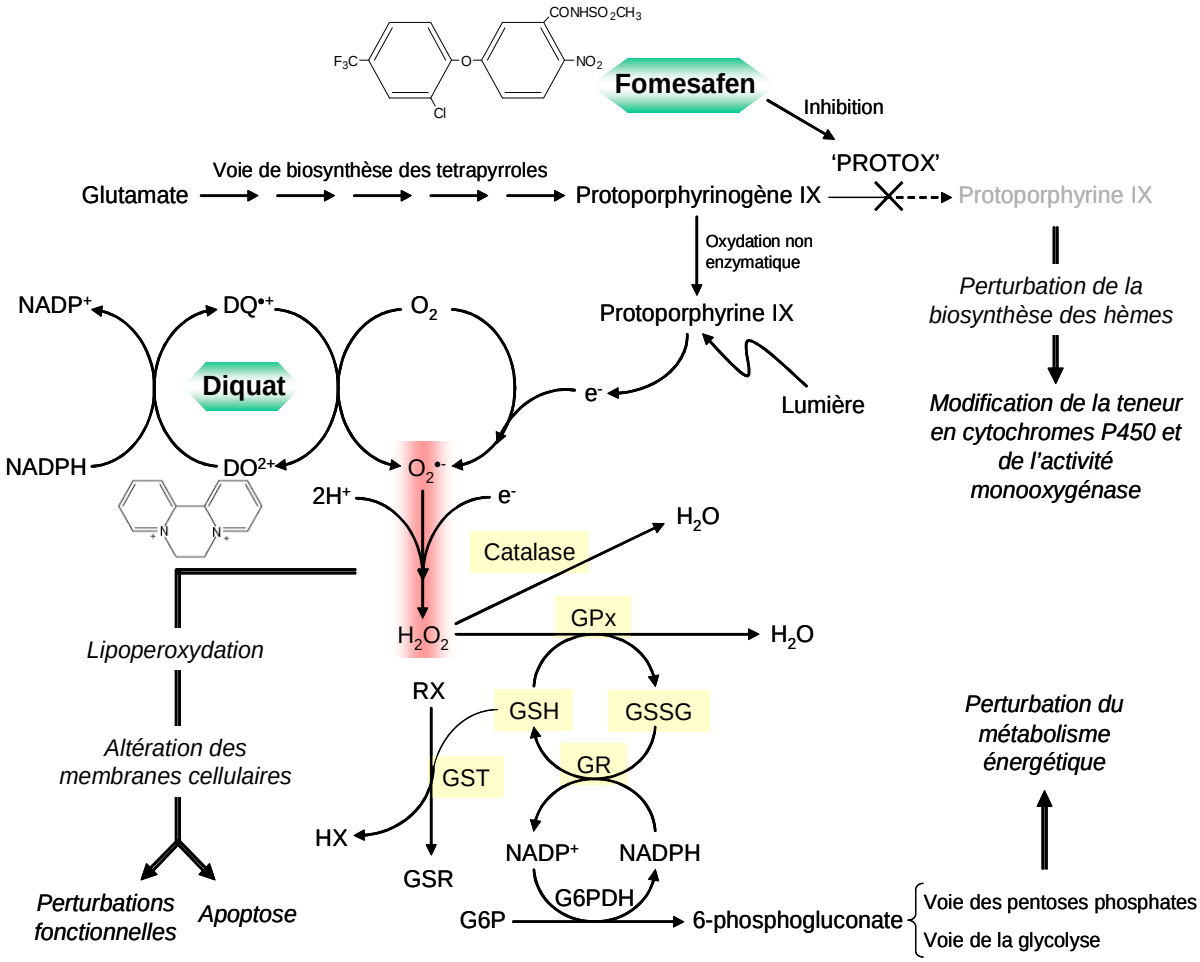


Figure III.1.C.1 (Lagadic et al., 2007). Représentation schématique des mécanismes par lesquels le diquat et le fomésafène peuvent agir à l'échelle cellulaire. Pour les deux herbicides, la toxicité est médiée par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (en rouge). Le fomésafène inhibe la protoporphyrinogène-oxydase (PROTOX), dernière enzyme de la voie de biosynthèse des hèmes, ce qui conduit à l'accumulation de protoporphyrinogène IX oxydé de façon non-enzymatique en protoporphyrine IX, laquelle produit, sous l'action de la lumière, des espèces radicalaires de l'oxygène. Le diquat est transformé, par addition d'un électron célibataire, en radical réactif qui réagit avec l'oxygène moléculaire pour former un anion superoxyde. Les ERO sont à l'origine de dommages à de nombreux constituants protéiques et lipidiques des cellules, notamment au niveau des membranes avec, pour conséquence, des perturbations fonctionnelles et des processus chimio-induits de mort cellulaire.

1.3 MISE EN ŒUVRE DU « VOLET MESSIN » DU PROGRAMME ET APPORTS AU TRAVAIL DE THESE

D'un point de vue pratique, les expérimentations ont été menées en équipe et ont également impliqué Renaud Denoyelle et Carole Cossu-Leguille, qui se sont intéressés aux systèmes antioxydants du complexe gonado-digestif de la lymnée.

Les apports des tests monospécifiques à la démarche appliquée au long de ces travaux de thèse se situe, tout d'abord, au niveau du **premier axe de recherche**, concernant la pertinence des réponses cellulaires étudiées pour la mise en évidence d'effets précoces de contaminants – en l'occurrence deux herbicides et leur adjuvant – sur la santé des individus. Le **troisième axe de recherche**, qui s'intéresse au potentiel pronostique offert par ces outils, est également abordé, par le biais de l'étude parallèle de réponses biologiques appartenant à des niveaux supérieurs de l'échelle biologique (indices de condition et mise en relation de nos données avec celles obtenues par d'autres participants au programme, concernant notamment la croissance, la reproduction et les performances des juvéniles issus de parents exposés).

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 ORGANISMES

Les lymnées (23-30 mm pour l'expérimentation du fomésafène, et 20-29 mm pour l'expérimentation du diquat) proviennent de l'élevage de l'Unité Expérimentale Ecologie et Ecotoxicologie (U3E) de l'INRA de Rennes. Elles ont été acheminées en une journée dans des glacières, entre des couches de papier absorbant imbibé d'eau et des feuilles fraîches de papyrus. Les animaux sont acclimatés au laboratoire durant au minimum 12 jours avant expérimentation, à raison d'environ 250 individus par aquarium de 30 L, contenant une couche de graviers et de l'eau déchlorée aérée en continu, sous une photopériode de 14 : 10. Les organismes sont nourris de laitue biologique (organisme certificateur Ecocert) deux à trois fois par semaine.

2.2 PRODUITS UTILISES

Les herbicides sont utilisés sous la forme de formulations commerciales FLEX Pack, comprenant 1 L de fomésafène (250 $g.L^{-1}$) sous forme de sel de sodium et 0,6 L d'Agral 90 (945 $g.L^{-1}$de NPEOs), et REGLONE 2 (200 $g.L^{-1}$ de diquat). L'usage de solvant ne s'avère pas nécessaire en raison de la miscibilité des produits à l'eau. Les intoxications sont réalisées à partir d'une solution commerciale identique pour tous les participants au programme.

2.3 PLAN EXPERIMENTAL

La figure III.1.C.2. résume le protocole expérimental et les différents prélèvements des organismes et des solutions d'intoxication, décrits en détail dans les paragraphes suivants.

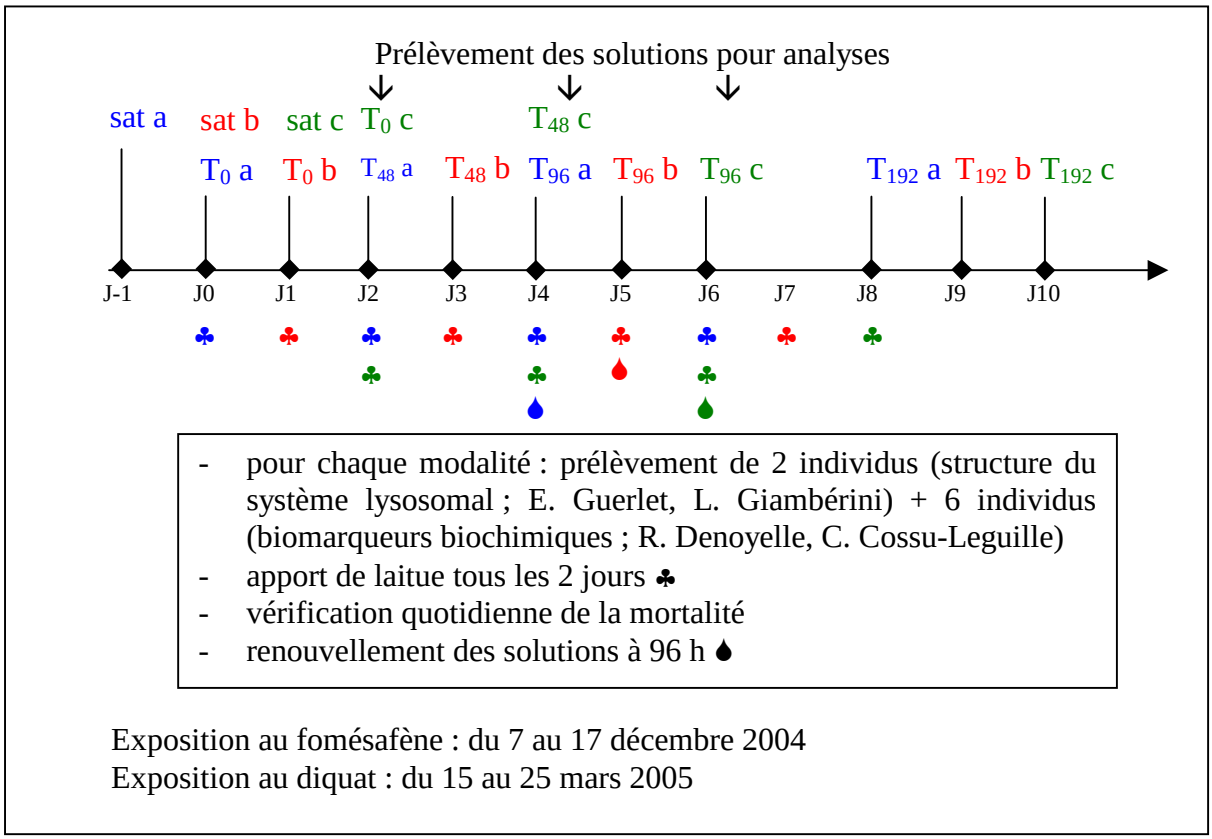


Figure III.1.C.2. Protocole expérimental de l'étude de la réponse des marqueurs cellulaires, physiologique et histopathologique chez L.stagnalis exposée pendant 8 jours au diquat ou au fomésafène associés à l'Agral 90 en conditions expérimentales.

Une lettre (a, b ou c) désigne chaque réplicat ; les temps de prélèvement des organismes, dates d'apport de nourriture et de changements des solutions sont représentés selon différentes couleurs (respectivement bleu, rouge et vert). Sat : saturation des sites de fixation des produits testés sur le plastique des dispositifs expérimentaux ; Tx : point de prélèvement (x : temps en heures) des 13 groupes expérimentaux (4 concentrations d'herbicide, 4 concentrations de NPEOs de l'Agral 90, 4 concentrations du mélange et témoins).

2.4 CONCENTRATIONS NOMINALES TESTEES

Pour les mélanges, le rapport des concentrations correspond à celui recommandé dans les conditions d'emploi des produits dans l'agriculture, à savoir un ratio [NPEOs de l'Agral 90] / [herbicide] de 2,25. Les concentrations en NPEOs de l'Agral 90 testées sont 0 ; 10 ; 50 ; 100 et 500 µg/L. A ces concentrations correspondent des concentrations en fomésafène ou en diquat 0 ; 4,4 ; 22,2 ; 44,4 et 222,2 µg/L. Les deux herbicides sont appliqués individuellement et en mélange avec l'Agral 90. L'adjuvant est également utilisé seul afin d'évaluer sa toxicité propre et de pouvoir caractériser les modalités de son interaction avec les deux herbicides. Pour des raisons d'organisation, les expositions aux cinq modalités (fomésafène (F), diquat (D), agral 90 (A) seuls et mélanges FA et DA) ont été menées en deux phases au niveau de notre laboratoire : un premier bioessai concerne les modalités F, A et FA (décembre 2004), et le second est axé autour des modalités D, A et DA (mars 2005).

2.5 MODALITES D'EXPOSITION

Les expérimentations sont réalisées dans une salle climatisée à 17 ± 1 °C avec une photopériode 14 : 10. Les lymnées sont exposées en triplicats, par groupes de 8 individus par modalité (concentration x date de prélèvement), dans des bouteilles en polyéthylène d'eau minérale filmées (voir Figure III.1.C.3.) contenant 800 mL de milieu, ce qui correspond à 117 dispositifs expérimentaux.



Figure III.1.C.3. (A) Vue d'ensemble et (B) de détail des dispositifs expérimentaux utilisés lors des bioessais.

Les dilutions sont réalisées dans de l'eau de source de la marque Telle Qu'Elle® (source Terres de Flein) (voir la minéralisation en Annexe 6). Un changement de milieu est opéré après le prélèvement des organismes du 4ème jour. Les lymnées sont nourries tous les deux jours avec 970 ± 15 mg de laitue biologique pour 8 individus. Le début de l'expérimentation est décalé de 24 h pour chacun des trois réplicats pour des raisons d'organisation (voir Figure III.1.C.2).

Pendant une période préliminaire de 24 h avant l'exposition des organismes, les solutions d'intoxication sont introduites dans les dispositifs expérimentaux afin de saturer les sites de fixation du plastique, et ces solutions sont renouvelées au moment de l'introduction des organismes.

Des solutions mères d'Agral 90® et de fomésafène ou de diquat sont préparées quotidiennement, diluées dans l'eau de source, pour atteindre les concentrations de 945 $mg.L^{-1}$ pour l'adjuvant et 100 $mg.L^{-1}$ pour l'herbicide en question. A partir de ces solutions mères, quatre solutions de travail par modalité (D, A, DA ou F, A, FA) sont préparées.

Afin de perturber le moins possible les lymnées, la vidange des dispositifs expérimentaux est effectuée précautionneusement par le goulot des bouteilles, sans sortir les animaux de celles-ci.

2.6 CONTROLE ANALYTIQUE DES CONCENTRATIONS D'EXPOSITION

Afin de contrôler les concentrations réelles des substances actives herbicides auxquelles ont été exposés les organismes, des prélèvements d'environ 300 mL d'eau ont été réalisés à T0, T48 et T96 dans les dispositifs du troisième réplicat (c) contenant les solutions de diquat ou de fomésafène, ainsi que les deux types de mélanges. Les échantillons ont été immédiatement congelés à –20°C dans des bouteilles de polyéthylène alimentaire. Aucun dosage de NPEOs n'a été réalisé en raison du caractère coûteux et chronophage du dosage des différentes formes composant un mélange de NPEOs. Les dosages du fomésafène et du diquat ont été réalisés au sein de l'UMR 1089 INRA-ENVT 'Xénobiotiques', sous la responsabilité de J.-P. Cravedi et J.-Ph. Jaeg, selon les protocoles décrits dans le paragraphe 5.3.2 du chapitre II. Matériels et Méthodes.

2.7 CONTROLE ET PRELEVEMENT DES ORGANISMES

Quotidiennement, la survie des organismes est vérifiée aisément (une lymnée morte est dans un premier temps rétractée dans sa coquille, ses tissus mous sont plus clairs et moins turgescents et dégagent très rapidement une odeur caractéristique, puis le corps est totalement séparé de la coquille). Les individus morts sont ôtés des dispositifs afin d'éviter une pollution du milieu et les phénomènes de nécrophagie.

Après 48, 96 et 192 h d'exposition, les individus sont mesurés et pesés pour la détermination des indices de condition (cf. Chapitre II, §4.2.2), puis les complexes glande digestive / ovotestis des organismes sont prélevés pour les procédures histochimiques (cf. Chapitre II, §2.2.1). Toutes ces mesures concernent deux individus par réplicat, soit n = 6 individus par modalité.

2.8 BIOMARQUEUR CELLULAIRE ETUDIE

Le stress oxydatif engendré par les herbicides implique qu'il aurait été intéressant d'évaluer ses manifestations possibles sur la structure du système peroxysomal et sur le contenu cellulaire en lipofuscines. Néanmoins, les tissus digestifs de *L. stagnalis* comportent trois grands types de granules minéraux, qui piègent notamment les métaux non essentiels, et qui correspondent à une succession de stades de maturation (de « petits » à « jaunes », en passant par « verts » ; (Desouky, 2006)). Ces granules se colorent non spécifiquement au cours de toutes les différentes procédures histochimiques habituellement mises en œuvre au sein du laboratoire et occasionnent un bruit de fond, rendant l'analyse des lames plus longue, voire impossible. Ce type de granules n'était pas ou peu présent dans les tissus digestifs des autres gastéropodes utilisés précédemment au laboratoire, comme l'illustre la Figure III.1.C.4 (Ledy, 2002 ; Guerlet *et al.*, 2006).

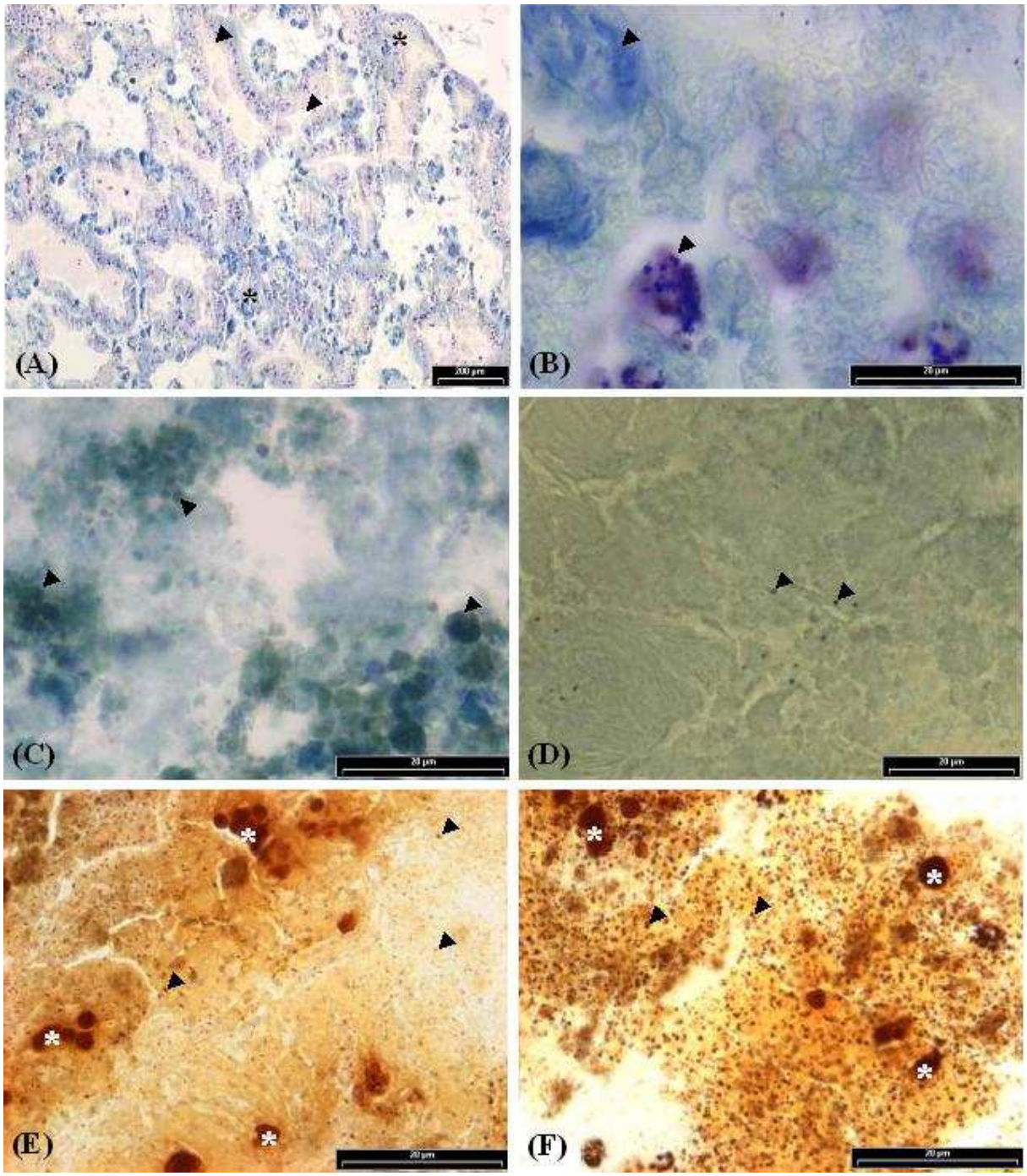


Figure III.1.C.4. Particularités de la glande digestive de L. stagnalis. (A) Vue d'ensemble de la glande digestive avec ses canaux (flèches) et tubules (astérisque) et (B) détail des granules minéraux (coloration au bleu de toluidine). (C) Manque de spécificité de la mise en évidence des lipofuscines chez L. stagnalis, avec coloration des granules minéraux (flèches) et (D) comparaison avec R. peregra, chez qui l'absence de granules permet de bien distinguer les lipofuscines (flèches). (E) Mise en évidence du système lysosomal digestif chez L. stagnalis témoin avant intoxication et (F) exposée à 222 µg.L^{-1} de fomésafène durant 4 jours. Les lysosomes montrent une réaction positive lors de l'activation de la ß-glucuronidase (flèches), tout comme les granules minéraux (astérisques), qu'il est néanmoins aisé d'évincer de la procédure d'analyse d'images.

Ainsi, seule la mise en évidence de la structure du système lysosomal a été réalisée chez cette espèce et la procédure d'analyse d'images a été adaptée : les gros amas irréguliers

positifs à la révélation de la ß-glucuronidase, correspondant aux granules, ont été écartés de l'analyse (par fixation d'une taille maximale des particules détectées de 2 µm et par élimination manuelle, si nécessaire).

2.9 MARQUEUR PHYSIOLOGIQUE ETUDIE

Les données morphométriques acquises chez *L. stagnalis* nous ont permis de tester l'indice de condition $IC_{volumique}$ (n = 6).

2.10 ANALYSES STATISTIQUES

Pour les paramètres stéréologiques lysosomaux, tout comme pour l'indice de condition, la significativité des différences deux à deux est vérifiée par le test non paramétrique de Mann-Whitney, Wilcoxon ($p \leq 0,05$).

3 RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1 EXPOSITION AU FOMESAFENE, A L'AGRAL ET A LEUR MELANGE

3.1.1 Concentrations de fomésafène mesurées

Le Tableau III.1.C.1 indique que les concentrations en fomésafène mesurées sont, étrangement, toujours moyennement à très supérieures aux concentrations nominales, et que le mélange avec l'Agral ne semble pas influencer ce phénomène dans un sens ou l'autre. Les hypothèses pour expliquer ces résultats inattendus peuvent concerner (i) une éventuelle erreur dans la préparation des solutions, (ii) un relargage à partir des dispositifs « saturés », (iii) un problème d'ordre analytique.

Tableau III.1.C.1. Concentrations mesurées dans les dispositifs expérimentaux au cours de l'exposition des lymnées au fomésafène seul ou en mélange avec l'Agral 90®

Modalité	Code	Concentration nominale ($\mu g.L^{-1}$)	Concentration mesurée ($\mu g.L^{-1}$) (moy ± e.t ; n = 3 dates)
Fomésafène seul	F1	0	-
	F2	4,4	5,4 ± 0,6
	F3	22,2	32,9 ± 3,6
	F4	44,4	73,4 ± 12,5
	F5	222,2	305,7 ± 26,8
Fomésafène en mélange	FA1	0	-
	FA2	4,4	5,1 ± 0,9
	FA3	22,2	31,3 ± 2,6
	FA4	44,4	62,3 ± 2,2
	FA5	222,2	332,2 ± 8,4

3.1.2 Réponses du système lysosomal

3.1.2.1 Exposition au fomésafène

Après 2 jours d'exposition, une diminution ponctuelle de la proportion volumique du système lysosomal est observée chez les lymnées exposées à 32,9 ± 3,6 µg/L de fomésafène, mais pas aux doses les plus élevées (Figure III.1.C.5.A). En outre, à la concentration maximale testée, l'augmentation conjointe de la proportion numérique (Figure III.1.C.5.B) et du ratio surface-sur-volume (Figure III.1.C.5.C) indique des lysosomes significativement plus nombreux et plus petits (puisque S/V s'interprète comme l'inverse de la taille des lysosomes).

Au bout de 4 jours d'exposition, les lymnées exposées à la concentration maximale présentent une proportion volumique lysosomale plus importante (Figure III.1.C.5.D), liée à une augmentation de la taille individuelle de ces organites (diminution de S_L/V_L, Figure III.1.C.5.F).

Après 8 jours (=192 h), les profils des paramètres stéréologiques décrivant la structure du système lysosomal sont dans l'ensemble identiques à ceux mis en évidence à 2 jours d'exposition (Figure III.1.C.5.G-H-I).

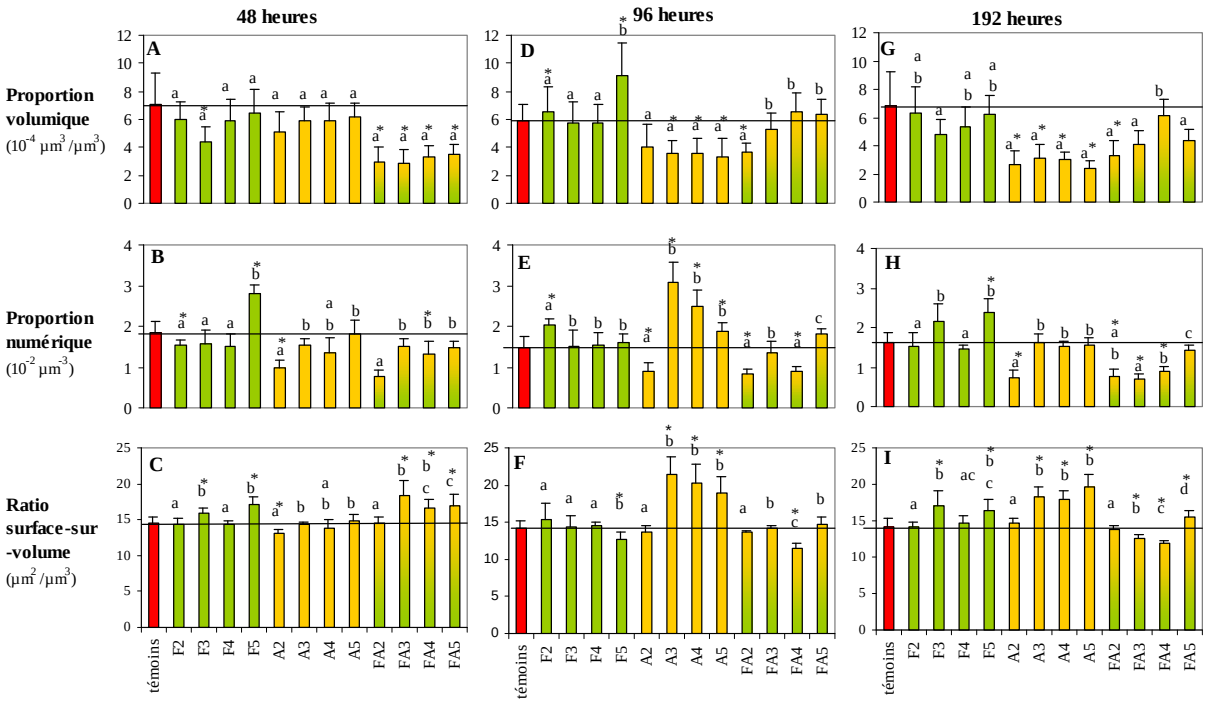


*Figure III.1.C.5. Evolution de la structure du système lysosomal digestif des lymnées (L. stagnalis) exposées au fomésafène, à l'Agral® 90 et au mélange durant 192 h. Fx, Ax et FAx : concentrations croissantes en fomésafène, NPEOs de l'Agral® 90 et mélange. Sont représentés les moyennes et écart-types. Les lettrines différentes indiquent des moyennes statistiquement différentes pour chacun des traitements, isolément des deux autres (F, A ou FA) ; * : différence par rapport au témoin (test U).*

3.1.2.2 Exposition à l'Agral 90®

Après 2 jours d'exposition, aucune variation significative de Vv_L n'est mise en évidence chez les lymnées exposées à l'Agral 90®, quelles que soient les concentrations testées. En revanche, les tissus digestifs des lymnées exposées à la plus faible concentration de NPEOs (10 µg/L) présentent une diminution de Nv_L (Figure III.1.C.5.B) allant de paire avec une diminution de S_L/V_L, soit une augmentation de la taille individuelle des lysosomes (Figure III.1.C.5.C). Ce type de phénomène est classiquement interprété comme un gonflement lysosomal, voire une fusion des organites liée à une déstabilisation des membranes (Lowe *et al.*, 1981 ; Marigómez & Baybay-Villacorta, 2003). Néanmoins, les groupes expérimentaux exposés aux concentrations supérieures ne montrent pas ce type de résultat.

Entre le 4ème et le 8ème jour d'exposition, la diminution de la proportion volumique du système lysosomal par rapport aux témoins, significative à partir de le concentration de 50 µg/L de NPEOs, est liée à une diminution importante de la taille des organites (Figure

III.1.C.5.F), non compensée par une augmentation de leur nombre (Figure III.1.C.5.E). La tendance à une diminution de Vv_L chez les lymnées exposées à la plus faible concentration par rapport aux témoins, est liée au contraire à une diminution de Nv_L (Figure III.1.C.5.H).

La situation après 8 jours d'intoxication confirme cette tendance : la faible Vv_L des lymnées exposées aux 3 concentrations les plus fortes (Figure III.1.C.5.G) est liée à une taille des organites plus faible (S_L/V_L élevé, Figure III.1.C.5.I), tandis que les individus exposés à 10 µg/L de NPEOs présentent une Vv_L identique, mais liée quant à elle à un nombre plus faible d'organites (Figure III.1.C.5.H).

3.1.2.3 Exposition au mélange Fomésafène-Agral 90®

Après 2 jours, la proportion volumique lysosomale des lymnées exposées au mélange est significativement réduite par rapport aux témoins, indépendamment de la concentration testée (Figure III.1.C.5.A). Comme dans le cas de l'Agral seul après 8 jours d'exposition, cette baisse de Vv_L est en relation avec une proportion numérique réduite à la plus faible dose (Figure III.1.C.5.B) et avec un ratio surface-sur-volume plus important aux trois concentrations les plus élevées (Figure III.C.5.C).

Au bout de 4 jours d'exposition, les seules différences significatives par rapport aux témoins consistent en de plus faibles proportions volumique (Figure III.1.C.5.D) et numérique (Figure III.1.C.5.E) à la plus basse concentration (ces paramètres restant identiques à ceux mesurés à 2 jours), ainsi qu'en la présence de lysosomes moins nombreux et plus volumineux à 44 µg/L de fomésafène et 100 µg/L de NPEOs (Figure III.1.C.5.E-F), ce qui évoque un phénomène isolé de gonflement lysosomal ou de fusions.

Entre 4 et 8 jours, aucune évolution des paramètres stéréologiques n'est toujours constatée chez les lymnées exposées à la plus faible concentration. Aux deux niveaux d'intoxication intermédiaires, les niveaux bas de Nv_L et S_L/V_L évoquent encore des fusions des lysosomes (Figure III.1.C.5.H-I).

3.1.3 Indice de condition

Hormis une diminution de l'indice de condition à la dose de fomésafène la plus élevée après 2 jours d'expérimentation, aucune modification de ce marqueur physiologique n'est mise en évidence chez les lymnées au cours de cette expérimentation (voir Figure III.1.C.6).

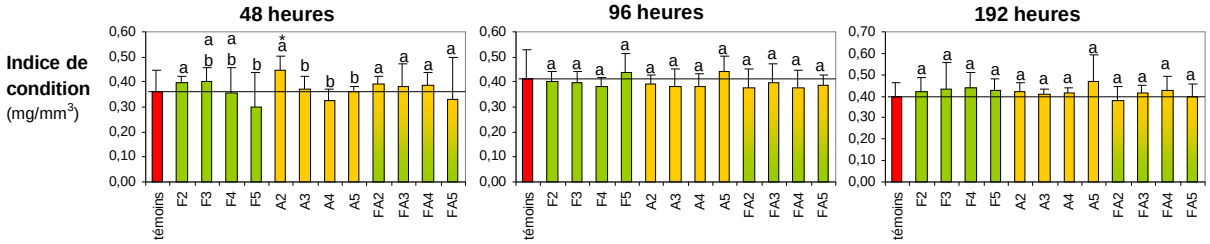


*Figure III.1.C.6. Evolution de l'indice de condition des lymnées (L. stagnalis) exposées au fomésafène, à l'Agral 90 et au mélange durant 192 heures. . Fx, Ax et FAx : concentrations croissantes en fomésafène, NPEOs de l'Agral® 90 et mélange. Sont représentés les moyennes et écart-types. Les lettrines différentes indiquent des moyennes statistiquement différentes pour chacun des traitements, isolément des deux autres (F, A ou FA) ; * : différence par rapport au témoin (test U, p<0,05).*

3.1.4 Survie

Comme l'indique le Tableau III.1.C.2, la mortalité est restée faible durant l'expérimentation (d'où le choix d'une représentation sous forme de tableau plutôt que de courbes, peu lisibles).

Tableau III.1.C.2. Mortalité dans les dispositifs (en terme d'effectifs) au cours de l'exposition au fomésafène, appliqué seul ou en mélange avec l'adjuvant

Temps (jours)	Mortalité témoin	Survie témoins	Mortalité fomésafène				Mortalité Agral 90®				Mortalité mélange				Effectifs théoriques
			F2	F3	F4	F5	A2	A3	A4	A5	FA2	FA3	FA4	FA5	
0		216													72
1		216													72
2	1	215								1					72
3		143				1					1				48
4	1	142	1	1	1	3	1	1			1		2		48
5		70													24
6		70												1	24
7		70													24
8	2	68	1					1		1				2	24
Total	**5**	**/ 216**	**2**	**1**	**1**	**4**	**1**	**2**		**2**	**2**		**2**	**3**	**/ 72**

Elle semble néanmoins se manifester en fonction du temps et ce, quelle que soit la modalité testée, à l'issue des périodes de 4 jours sans renouvellement de l'eau. Cette baisse de

la survie avant changement du milieu suggère une éventuelle toxicité liée à une pollution par les métabolites azotés, plutôt que des effets létaux des traitements.

3.1.5 Discussion

Les paramètres stéréologiques calculés chez les lymnées exposées à la plus forte concentration testée de fomésafène (222 µg/L) indiquent, après 2 jours d'exposition, la présence de lysosomes plus nombreux et plus petits, qui atteignent au bout de 4 jours une taille plus importante. Or, des réductions de la taille des lysosomes, accompagnées d'une stabilité membranaire lysosomale accrue ont été décrites chez des mollusques marins exposés à court-terme et à de faibles concentrations de xénobiotiques organiques, tandis que de plus longues périodes d'intoxication provoquaient un accroissement de la taille de ces organites et des déstabilisations membranaires (Marigómez & Baybay-Villacorta, 2003). Ce type de résultats est interprété comme un possible effet stabilisateur de certaines classes de polluants (particulièrement les hydrocarbures du pétrole) lors d'expositions modérées, précédant un effet déstabilisateur à de fortes expositions (Moore, 1988b). La structure du système lysosomal digestif d'organismes exposés à des xénobiotiques organiques peut évoluer de façon encore plus complexe et ces effets pluriphasiques ne sont pas complètement élucidés actuellement (Marigómez & Baybay-Villacorta, 2003). Ainsi, il est possible de soupçonner des effets délétères du fomésafène sur la structure du système lysosomal digestif de *L. stagnalis* à la plus forte concentration appliquée, mais cette hypothèse devrait être confirmée par des études à plus long terme (plusieurs semaines).

Les effets propres de l'Agral 90® sont plus évidents que ceux du fomésafène et se manifestent dès 10 µg/L, puis de façon différente à partir de 50 µg/L, par une baisse de la proportion volumique du système lysosomal liée à une diminution du nombre de lysosomes et/ou de leur taille. En raison de l'activité surfactante de l'Agral 90®, des effets indirects d'ordre physique sur les membranes cellulaires peuvent être envisagés pour expliquer l'évolution de la structure du système lysosomal, tels qu'une réduction des apports de substrats par endocytose.

Dès 48 heures d'exposition, le mélange fomésafène/Agral 90® provoque des effets significatifs analogues à ceux observés chez les lymnées exposées à l'Agral seul lors d'une

exposition plus longue. De surcroît, des fusions de lysosomes pouvant être provoquées par une déstabilisation membranaire apparaissent entre 96 et 192 heures, ce qui témoigne ici d'une potentielle toxicité du mélange, bien que l'activité surfactante de l'adjuvant soit censée réduire le niveau d'exposition interne, et module donc potentiellement les effets de l'herbicide sur ces organismes (Jumel *et al.*, 2002). Néanmoins, l'absence de fusions ou de gonflement lysosomal au plus fort niveau d'exposition reste ici inexpliquée.

Aux niveaux supérieurs de l'organisation biologique (condition et survie), aucun effet clairement tranché des deux substances utilisées seules ou en mélange n'a été mis en évidence, hormis une diminution réversible de la condition à la plus forte concentration de fomésafène après 2 jours d'exposition.

3.2 EXPOSITION AU DIQUAT, A L'AGRAL ET A LEUR MELANGE

3.2.1 Concentrations de diquat mesurées

Tableau III.1.C.3. Concentrations mesurées dans les dispositifs expérimentaux au cours de l'exposition des lymnées au diquat seul ou en mélange avec l'Agral 90®

Modalité	Code	Concentration nominale ($\mu g.L^{-1}$)	Concentration mesurée ($\mu g.L^{-1}$) (moy ± e.t ; n = 3 dates)
Diquat seul	D1	0	-
	D2	4,4	4,1 ± 0,9
	D3	22,2	15,9 ± 3,3
	D4	44,4	42,8 ± 5,3
	D5	222,2	243,2 ± 51,2
Diquat en mélange	DA1	0	-
	DA2	4,4	3,6 ± 0,2
	DA3	22,2	18,6 ± 1,9
	DA4	44,4	44,9 ± 6,1
	DA5	222,2	334,8 ± 11,9

Les concentrations dosées sont plus proches des concentrations nominales dans le cas du diquat, par rapport au fomésafène (Tableau III.1.C.3). Seule la concentration la plus forte est sensiblement plus élevée que la nominale, particulièrement dans le cas du diquat en

mélange avec l'Agral 90®. En l'absence de sédiment dans les dispositifs, la concentration de diquat ne diminue pas entre le début de l'expérimentation et le 4ème jour (détail non présenté ici).

3.2.2 Réponses du système lysosomal

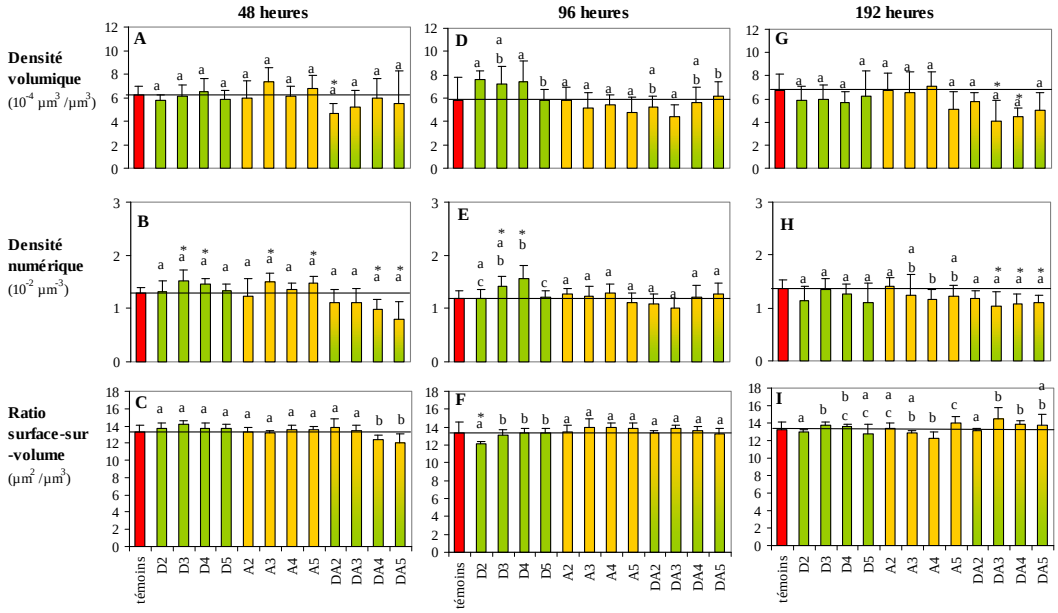


*Figure III.1.C.7. Evolution de la structure du système lysosomal digestif de L. stagnalis exposée au diquat, à l'Agral 90® et au mélange durant 192 h. Dx, Ax et DAx : concentrations croissantes en diquat, NPEOs de l'Agral 90® et mélange. Sont représentés les moyennes et écart-types. Les lettrines différentes indiquent des moyennes statistiquement différentes pour chacun des traitements, isolément des deux autres (D, A ou DA) ; * : différence par rapport au témoin (test U, p<0,05).*

Pour des raisons d'organisation, les expositions au diquat et au fomésafène n'ont pu être réalisées conjointement. Ainsi, les **expositions à l'Agral 90®** ont été menées à deux reprises et les effets constatés lors de la première exposition sont nettement moins prononcés lors de la seconde. La diminution de Vv_L, liée à une taille réduite des organites, ne correspond plus qu'à une tendance chez les individus exposés aux trois plus fortes concentrations à 4 jours (Figure III.1.C.7.D-F) et uniquement à 500 µg/L après 8 jours (Figure III.1.C.7.G-I).

Les uniques effets significatifs de l'**exposition au diquat appliqué seul** consistent en une augmentation de Nv_L chez les lymnées exposées aux deux concentrations intermédiaires après 2 et 4 jours (Figure III.1.C.7.B-E). Ces effets ne sont pas observés à la concentration maximale testée, ni après 8 jours d'expérimentation.

Les effets du **mélange diquat-Agral®** sont, (i) à 2 jours, une tendance au gonflement lysosomal / fusion aux deux plus fortes doses (diminution parallèle de Nv_L et S_L/V_L, voir Figure III.1.C.7.B-C) et, (ii) à 8 jours une diminution de Vv_L et Nv_L aux trois concentrations les plus fortes (Figure III.1.C.7.G-H), qui évoque les effets indirects sur les membranes invoqués plus haut.

3.2.3 Indices de condition

Aucune modification de l'indice de condition n'est mise en évidence chez les lymnées au cours de cette expérimentation (voir Figure III.1.C.8).

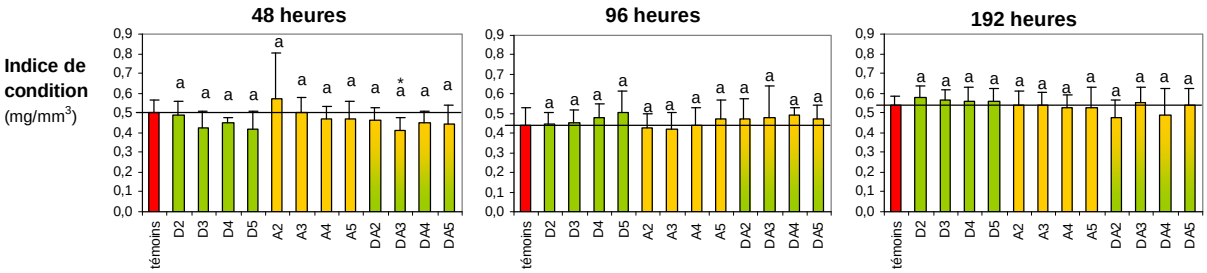


*Figure III.1.C.8. Evolution de l'indice de condition de L. stagnalis exposée au diquat, à l'Agral 90® et au mélange durant 192 h. Dx, Ax et DAx : concentrations croissantes en diquat, NPEOs de l'Agral 90® et mélange. Sont représentés les moyennes et écart-types. Les lettrines différentes indiquent des moyennes statistiquement différentes pour chacun des traitements, isolément des deux autres (D, A ou DA) ; * : différence par rapport au témoin (test U, p<0,05).*

3.2.4 Survie

Dans l'ensemble des dispositifs, la mortalité en cours d'expérimentation reste, là encore, relativement faible, et n'augmente pas de façon dépendante de la concentration. Comme pour la première expérimentation, la mortalité ne semble donc pas imputable au traitement.

Tableau III.1.C.4. Mortalité dans les dispositifs (en terme d'effectifs) au cours de l'exposition au diquat, appliqué seul ou en mélange avec l'adjuvant

Temps (jours)	Mortalité témoin	Survie témoins	Mortalité diquat				Mortalité Agral 90®				Mortalité mélange				Effectifs théoriques
			D2	D3	D4	D5	A2	A3	A4	A5	DA2	DA3	DA4	DA5	
0		216													72
1		216													72
2		216								1					72
3	2	142	1				1	1				2	1		48
4		142													48
5	3	67										1			24
6		67		1			1	1							24
7		67													24
8	1	66	1	1	1							2	3		24
Total	**6**	**/ 216**	**2**	**2**	**1**		**2**	**2**		**1**		**5**	**4**		**/ 72**

4 SYNTHESE ET MISE EN RELIEF DES RESULTATS PRESENTS AVEC CEUX OBTENUS A D'AUTRES NIVEAUX DE L'ORGANISATION BIOLOGIQUE

4.1 ANALYSE INDIVIDUELLE DE NOS RESULTATS

Les réponses lysosomales à l'exposition aux différentes modalités ne se sont pas révélés très tranchées ou typiques. Aucune réponse claire et nette aux herbicides seuls n'a été mise en évidence (Tableau III.1.C.5).

Tableau III.1.C.5. Synthèse des résultats obtenus lors des bioessais CEREMEL

	A	F	FA	D	DA
Structure du système lysosomal	**4 et 8 j :** 10 µg/L ↘ nombre 50 à 500 µg/L ↘ taille	**2 j :** ↘ nombre ↘ taille **4 j :** ↗ taille	**2 j :** idem A à 8 j **4 j** : FA4 ; **8 j** : FA3, FA4 : fusions ou gonflement	**2 et 4 j :** D3 et D4 : tendance ↗ nombre	**2 j :** DA4, DA5 : ↘ nombre ↗ taille **8 j** : ↘ nombre, ↘ Vv_L
Interprétations	Tendance : ↘ activité lysosomale liée aux propriétés surfactantes ?	Possible effets pluriphasiques à 305 ± 27 µg/L ?	Effets de F légèrement plus accentués ? Mais manque de lien dose-réponse.	-	Gonflement lysosomal précoce et réversible, puis effets de l'Agral à 8 j ?
Condition	-	**2 j :** F5 : ↘ CI réversible	-	-	-
Survie	-	-	-	-	-

- : pas d'effet notable

Les gonflements et/ou fusions des lysosomes évoqués par les réponses aux deux mélanges (réponse précoce et réversible pour la modalité DA, réponse plus tardive et moins liée à la dose pour FA) semblent indiquer une autophagie accrue. Celle-ci peut s'expliquer par la dégradation de matériel endogène endommagé par la lipoperoxydation, mais aussi par une accélération du turn-over cellulaire pour l'alimentation des systèmes de détoxication en matière première.

Les modes d'actions sur le système lysosomal diffèrent entre l'Agral 90®, d'une part, et les deux herbicides, d'autre part. Les réponses lysosomales aux mélanges ne peuvent pas, de ce point de vue, résulter d'effets additifs *sensus stricto* des herbicides et de l'adjuvant. Néanmoins, bien que l'Agral 90® soit censé limiter l'exposition des organismes aquatiques aux herbicides (Jumel *et al.*, 2002), les effets des mélanges semblent légèrement plus prononcés et plus lisibles que ceux des herbicides appliqués seuls. Des connaissances supplémentaires sur les mécanismes d'interaction entre les surfactants non-ioniques et le système lysosomal, au sein de son environnement cellulaire, seraient nécessaires pour expliquer ce phénomène.

En outre, les différences observées au niveau des réponses lysosomales des lymnées exposées à l'Agral 90® à quelques mois d'intervalle dans des conditions analogues posent la question de la reproductibilité des bioessais. Il se peut que ce phénomène réside en partie dans des différences physiologiques liées à la période (décembre ou mars), bien que les individus proviennent d'un élevage en conditions contrôlées.

4.2 INTERPRETATIONS A LA LUEUR DE L'ENSEMBLE DES RESULTATS DU PROGRAMME CEREMEL

Les autres réponses biologiques, étudiées par les différents participants au programme CEREMEL, incluent notamment (Lagadic *et al.*, 2007) :

- une **production d'ERO accrue** dans les hémocytes des lymnées exposées au fomésafène pendant 48 h. Il est intéressant de noter que, tout comme pour les gonflements lysosomaux digestifs, qui n'ont été mesurés qu'aux concentrations intermédiaires, aucune relation concentration-réponse n'a été mise en évidence au

regard de cette production d'oxyradicaux (maximum constaté à la concentration nominale de 22 µg.L^{-1}). Néanmoins, et contrairement à ce que nous avons constaté, la présence de l'adjuvant annihile cette réponse ;

- une **inhibition de l'activité des monooxygénases cytochrome P450-dépendantes (EROD)** chez les épinoches exposées au diquat seul, qui coïncide avec le mode d'action de cet herbicide (perturbation de la voie de biosynthèse des hèmes) ;

- en microcosmes (2ème phase du programme), une **lipoperoxydation** a été mise en évidence après 8 et 16 h d'exposition dans les hémocytes de lymnées exposées au diquat seul, et après 16 h chez les gastéropodes exposés au fomésafène et aux deux types de mélanges (DA et FA) ;

- l'étude de la fragilité membranaire des lysosomes hémocytaires, chez la lymnée, montre des **tendances à une déstabilisation des membranes** induite par tous les traitements et semblant plus prononcée, à 48 h, chez les organismes exposés aux mélanges qu'aux trois produits appliqués seuls ;

- l'exposition aux trois substances tend à **inhiber la phagocytose hémocytaire** (effet hautement significatif dans le cas du diquat) témoignant de perturbations fonctionnelles, vraisemblablement engendrées par les atteintes structurelles (lipoperoxydation pour les herbicides et action détergente perméabilisante pour l'Agral 90®). Les effets des herbicides sont accentués par la présence de l'adjuvant (potentialisation par prolongation de la mise en contact du fomésafène et effets cumulatifs avec le diquat) ;

- le nombre de cas d'**apoptose** des hémocytes (attestée par la fluorescence de la fluorescéine) augmente fortement chez les lymnées exposées au diquat pendant 48 h, en fonction de la concentration et par rapport aux animaux exposés au fomésafène ou à l'Agral ;

- une **limitation de la croissance** est notée chez les lymnées exposées à la plus forte concentration de diquat, appliqué seul ou, dans une moindre mesure, en mélange avec l'Agral ;

- une **baisse de la fécondité** chez les lymnées exposées à la plus forte concentration du mélange diquat-Agral a également été montrée. Cette modalité affecte également les **performances des juvéniles** issus de parents exposés (durée minimale de développement et taux d'éclosion). Certains de ces effets sont toutefois atténués en conditions plus réalistes (microcosmes), en raison de la plus faible persistance du diquat dans ces conditions. Par ailleurs, une exposition directe de pontes issues de parents non exposés à la plus forte concentration de ce mélange entraîne une absence totale d'éclosion.

Finalement, bien que n'étant pas les plus lisibles des réponses étudiées, les variations morphologiques du système lysosomal digestif s'inscrivent donc dans un schéma de réponse toxique progressif assez cohérent. Les mécanismes à l'origine de ces modifications structurelles lysosomales – et les implications de ces dernières – peuvent être en partie éclairés par la confrontation des résultats dans leur ensemble :

*⇒ la **production d'ERO** liée à l'exposition aux herbicides initie une séquence de **lipoperoxydation**, qui engendre des **instabilités membranaires** et peut conduire à des **dysfonctionnements du système lysosomal** ou **à un état d'alerte** de ce dernier (gonflement et/ou fusions suggérant une autophagie accrue). Or, la rupture des membranes lysosomales est considérée par Antunes et collaborateurs (2001) comme un des facteurs initiateurs de l'**apoptose** induite par le stress oxydant. Ce dernier phénomène, signe d'effets cytotoxiques sévères, favorise toutefois l'élimination des cellules perturbées ou lésées tout en **préservant dans une certaine mesure l'intégrité tissulaire**.*

Chez les lymnées exposées au diquat et dans une moindre mesure au fomésafène, ce type de séquence est fortement suggéré par l'ensemble des effets mis en évidence. Les « trous » et incertitudes dans la séquence des réponses pourraient provenir du choix des « fenêtres temporelles » de mesure (par exemple, apparition et disparition probable, au cours des premières 24 h, des ERO provenant du diquat, et par conséquent non mesurées à 48 h)

(Lagadic *et al.*, 2007). Si le choix de ces « fenêtres temporelles » n'est pas totalement arbitraire, il est tout de même assez difficile à établir *a priori*.

Certaines des réponses aux mélanges suggèrent plutôt une limitation des effets des herbicides par la présence de l'adjuvant (effet protecteur vis-à-vis de leur impact sur le glutathion total et/ou les activités monooxygénases, atténuation des effets sur la croissance à la plus forte concentration de mélange diquat-agral et légère limitation des effets du diquat sur les performances individuelles de la descendance).

D'autres, à savoir l'induction de certaines enzymes antioxydantes (GST, GPx de l'épinoche), l'inhibition de la phagocytose ou les modifications structurelles du compartiment lysosomal digestif (lymnée), suggèrent une potentialisation des effets de l'un ou l'autre herbicide par l'adjuvant.

Les résultats des expérimentations en microcosmes, en cours d'exploitation, devraient permettre de confirmer, infirmer et/ou préciser les tendances observées sur la structure du système lysosomal, ainsi que sur son interaction avec les autres systèmes. Ces précisions et apports se feront en tenant compte de conditions plus propices à une évaluation des risques plus réaliste (en considérant, notamment, l'influence du compartiment sédimentaire sur la biodisponibilité des substances testées). Néanmoins, cette première approche suggère déjà que l'exposition des organismes aquatiques au diquat et au fomésafène, engendre un stress oxydatif surmontable, mais qui, en présence de facteurs de stress multiples, représente néanmoins un risque potentiel pour leur état de santé et, par extension, celui de l'écosystème. En outre, dans les conditions d'application de ces herbicides, l'adjuvant à base de NPEOs utilisé, est dénué d'effets propres sur la majorité des réponses étudiées par l'ensemble des partenaires du programme, hormis celles qui dépendent assez directement de l'intégrité membranaire (Lagadic *et al.*, 2007). Pourtant, il module l'amplitude de certaines des réponses aux herbicides, soit en limitant ou annulant les effets soit, au contraire, en les potentialisant.

2ème partie : Vers une validation…

Valeur diagnostique (et pronostique ?) de la batterie de marqueurs :

test de différents outils d'analyse
(analyses multivariées, indices intégratifs, système expert…)

Comme nous l'avons déjà évoqué dans l'introduction de ce document, pour une exploitation optimale des données acquises dans le cadre d'études multi-biomarqueurs, des stratégies intégratives de traitement et de présentation des données sont nécessaires.

Elles permettent de réduire la complexité de l'analyse des résultats en les appréhendant de façon synthétique. Lorsque la batterie de réponses étudiées est bien composée, un traitement des données intégratif pertinent devrait fournir une indication rapide et facilement interprétable sur l'état de santé individuel des organismes étudiés.

Cette partie des résultats est dédiée à la comparaison de trois outils d'analyse intégrée des réponses de la batterie de biomarqueurs cellulaires (et, éventuellement, physiologiques), appliqués à quelques-unes unes des études de terrain concernant les mollusques (dreissène et lymnée) conduites par notre équipe. Parmi les outils disponibles, nous avons choisi de poursuivre l'exploration de la pertinence des **analyses en composantes principales**. Nous avons également testé l'applicabilité d'un indice intégratif de plus en plus utilisé : **l'IBR (Integrated Biomarker Response)** de Beliaeff et Burgeot (2002). Enfin, le troisième volet de cette partie du document consiste en une analyse rétrospective des données, préambule à l'adaptation, à *D. polymorpha*, du **système expert DiSAV** développé par Dagnino et collaborateurs (2007) chez la moule marine *Mytilus edulis*.

1 ANALYSES MULTIVARIEES : EXEMPLE DE L'ACP

Comme nous l'avons montré dans la partie 1.A du présent chapitre de résultats (Etude saisonnière à long terme), les ACP permettent d'obtenir une vision synthétique d'une matrice de résultats conséquente et de déterminer quelle part de la variabilité des données est imputable à une hétérogénéité spatiale. Afin de vérifier si ce type d'analyse constitue un mode de traitement des données pertinent à une échelle temporelle plus modeste et dans d'autres contextes, quatre ACP supplémentaires sont construites. Elles concernent les deux expérimentations *in situ* réalisées chez *D. polymorpha* dans le cadre du programme ECODYN (Figures III.2.1. et III.2.2. ; résultats présentés en détail dans la partie 1.B du présent chapitre), ainsi que les données obtenues chez le gastéropode, *R. peregra*, exposé à des effluents de l'industrie papetière (Figures III.2.3. et III.2.4. ; résultats présentés dans l'Article 4 en annexe 1).

Bien que quatre paramètres stéréologiques soient disponibles pour le système lysosomal (ainsi que pour le système peroxysomal chez *R. peregra*), nous avons choisi de ne construire les ACP qu'à partir des proportions de surface (Sv_L et Sv_P) car il s'agit du seul paramètre commun entre les quatre compartiments et contenus cellulaires étudiés. En effet, faire figurer quatre paramètres lysosomaux et peroxysomaux, contre un seul indice relatif au contenu en lipofuscines ou en lipides neutres, aurait conduit à une analyse déséquilibrée, avec un poids trop lourd accordé aux organites par rapport aux autres biomarqueurs.

Pour l'expérimentation Ecodyn n°1, les concentrations tissulaires en contaminants figurent sur le cercle des corrélations comme variables supplémentaires. Pour ce faire, quelques données absentes ont été remplacées par d'autres afin de pouvoir tout de même introduire ces variables illustratrices dans la représentation du cercle des corrélations (Figure III.2.1.A). Il s'agit des concentrations en métaux et HAP corporelles au site F à R30, remplacées par celles de F à 30 j, et des concentrations corporelles en HAP chez les moules de M2 à 15 j et R30, assimilées à celles des moules de M1 aux dates correspondantes.

Les quatre figures sont commentées dans les paragraphes qui les suivent.

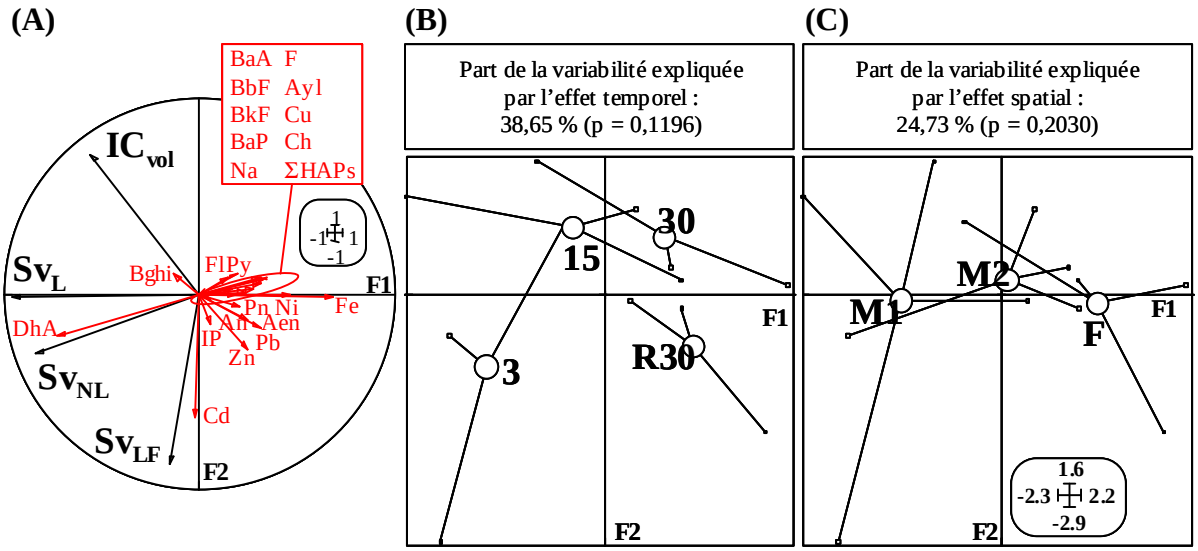


Figure III.2.1. ACP de la réponse des biomarqueurs cellulaires et physiologique chez les dreissènes de l'expérimentation ECODYN n°1 (2004) (66,9 % de la variance totale). (A) Cercle des corrélations sur le plan F1-F2, défini par les quatre biomarqueurs (en noir et gras) ; les concentrations corporelles en métaux et HAP figurent comme variables supplémentaires (en rouge) – (B.C) Plan factoriel F1-F2 des observations : (B) variabilité temporelle (centres de gravité des dates de prélèvement en jours) – (C) variabilité spatiale (centres de gravité des sites M1, M2 et F). - Na, Naphthalene ; Ayl, Acenaphtylene ; Aen, Acenaphtene ; F, Fluorene ; Pn, Phenanthrene ; An, Anthracene ; Fl, Fluoranthene ; Py, Pyrene ; BaA, Benzo[a]anthracene ; Ch, Chrysene ; IP, Indeno[1.2.3-cd]pyrene ; BbF, Benzo[b]fluoranthene ; BkF, Benzo[k]fluoranthene ; BaP, Benzo[a]pyrene ; DhA, Di Benzo[a.h]anthracene ; Bghi, Benzo[g.h.i]perylene – Cd, cadmium ; Cu, cuivre ; Fe, fer ; Ni, nickel ; Pb, plomb ; Zn, zinc – R30, transfert de restauration à 30 jours.

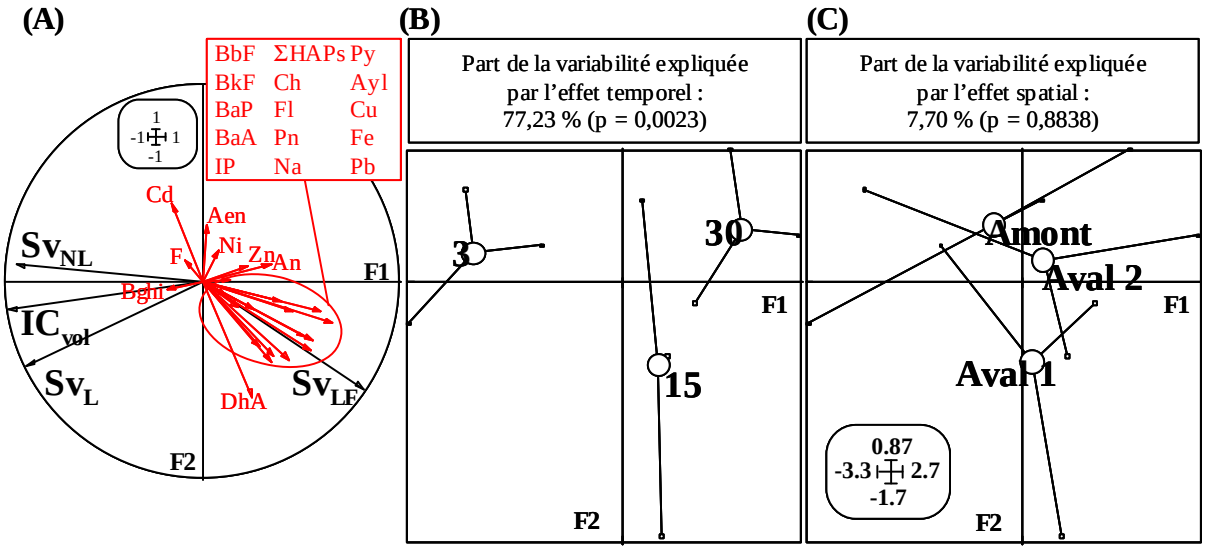


Figure III.2.2. ACP de la réponse des biomarqueurs cellulaires et physiologique chez les dreissènes de l'expérimentation ECODYN n°2 (2005) (74,1 % de la variance totale). Même légendes que la figure III.2.1.

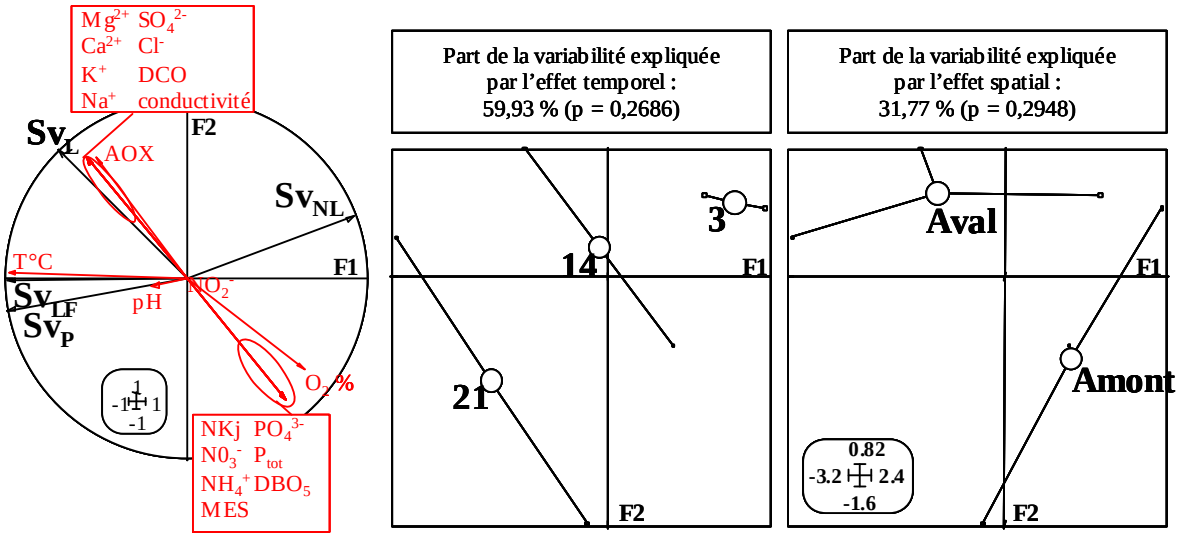


Figure III.2.3. ACP de la réponse des biomarqueurs cellulaires chez les lymnées exposées à proximité d'un rejet d'usine de pâte à papier blanchissant au chlore (Ton-BPPME) (98,2 % de la variance totale)
(A) Cercle des corrélations sur le plan F1-F2, défini par les quatre biomarqueurs (en noir et gras) ; les paramètres physico-chimiques figurent comme variables supplémentaires (en rouge) – (B.C) Plan factoriel F1-F2 des observations : (B) variabilité temporelle (centres de gravité des dates de prélèvement en jours) – (C) variabilité spatiale (centres de gravité des sites) – AOX, concentrations en composés organo-halogénés adsorbables.

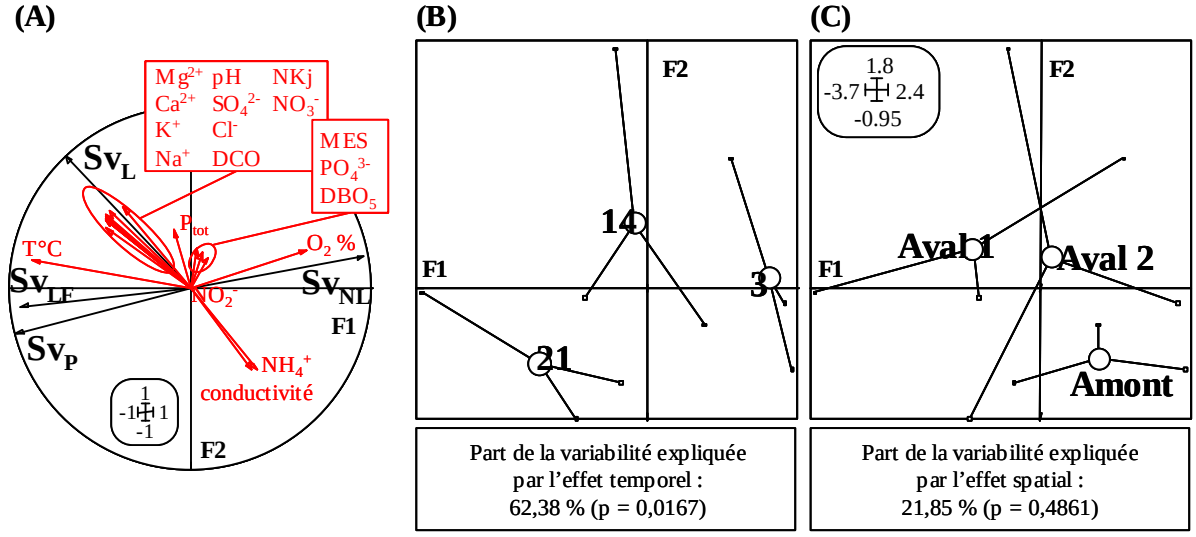


Figure III.2.4. ACP de la réponse des biomarqueurs cellulaires chez les lymnées exposées à proximité d'un rejet de papeterie (Moselle PPME) (95,3 % de la variance totale). Même légendes que la figure III.2.3.

Un **gradient de stress** peut être mis en évidence grâce à la confrontation du cercle des corrélations avec le plan factoriel sur lequel figurent les centres de gravité des stations étudiées (ou des différents traitements dans le cas d'un bioessai). De même, les **principales tendances des réponses individuelles des biomarqueurs** sont résumées par ce biais.

Ainsi, pour la première étude ECODYN (figure III.2.1), le gradient de contamination et de stress s'oriente le long de l'axe F1 (des coordonnées négatives vers les coordonnées positives). Les tendances associées à ce gradient sont les suivantes :

- une plus forte biodisponibilité de la majorité des métaux et HAP, à l'exception du cadmium qui s'exprime plutôt sur F2, du dibenzo[a,h]anthracène qui décroît le long de F1 et de certains autres HAP qui s'expriment peu dans le plan F1-F2 (tels que le benzo[g,h,i]perlylène ou encore l'indéno[1,2,3]pyrène) ;
- trois des quatre réponses biologiques présentent de fortes coordonnées négatives sur F1 (Sv_L, Sv_{LN} et IC_{vol}), indiquant une diminution de leur valeurs lorsque la contamination augmente.

L'axe F2 est, quand-à-lui, principalement défini par la réponse du contenu tissulaire digestif en lipofuscines (qui, lui, ne participe pas à la mise en évidence du gradient de contamination).

Dans le cas de la seconde expérimentation *in situ* du programme ECODYN (figure III.2.2), le gradient de contamination et de stress s'exprime moins nettement, et les trois sites ont plutôt tendance à se distinguer le long de l'axe F2.

Le gradient de contamination et de stress, pour les études d'impact des effluents papetiers, s'oriente selon une diagonale : depuis les coordonnées positives sur F1 et négatives sur F2[2], jusqu'aux coordonnées négatives sur F1 et positives sur F2 (figures III.2.3 et III.2.4).

Contrairement aux études ECODYN, les réponses synthétisées par les ACP des études d'impact des effluents papetiers, sont plutôt les suivantes :

- la contamination de l'eau, occasionnée par l'effluent de l'usine de pâte à papier blanchissant au chlore, s'exprime à travers l'augmentation de paramètres tels que la température ou les concentrations en composés organo-halogénés adsorbables (AOX) et la diminution du taux de saturation en oxygène ;
- le long du gradient, c'est principalement l'augmentation de la proportion de surface lysosomale qui s'exprime, et secondairement, l'augmentation de SV_{LF} et Sv_P, et la diminution des contenus cellulaires en lipides neutres insaturés.

[2] Le sens des réponses selon les axes des ACP n'a pas d'importance en lui-même : il est totalement aléatoire et arbitraire. Faire une même ACP à deux reprises sous ADE-4 peut conduire à un inversement des coordonnées négatives et positives des variables sur les axes, sans que cela ne modifie en rien l'information portée par les graphiques, ni leur interprétation.

Dans une perspective purement appliquée et pour un œil entraîné, une ACP complète semble donc pouvoir quasiment se substituer à l'analyse des graphiques de chaque réponse individuelle.

Dans l'analyse des résultats d'une ACP en terme de diagnostic de biosurveillance environnementale, l'une des principales questions posées concerne généralement la **contribution de l'effet spatial à la variabilité totale** et la **significativité** de ce dernier. Dans ces quatre analyses, bien que l'effet spatial explique une part non négligeable de la variabilité totale (entre 21 et 32 % pour trois d'entre-elles), celui-ci n'est jamais significatif (p_{min} = 0,2030, dans le cas de la première expérimentation ECODYN). Au contraire, dans le cadre de l'expérimentation à long terme, une faible part de la variabilité était due à un effet spatial (entre 2,0 et 10,4 %), pourtant cet effet était bien significatif chez les dreissènes transférées et proche de la significativité chez les dreissène natives et les corbicules transférées (voir le Tableau III.1.A.7 dans la partie 1A du présent chapitre). Néanmoins, l'aspect visuel des plans factoriels des quatre ACP construites à partir des études à moyen terme (ECODYN et industrie papetière) montre bien une distinction entre les centres de gravité des stations. Les valeurs de p élevées proviennent certainement du manque de puissance statistique lié aux faibles nombres d'observations dans les matrices (compris entre 6 et 12, contre, par exemple, 54 observations pour l'ACP des dreissènes transférées de l'étude saisonnière).

Les observations, dans toutes ces analyses, comportent les valeurs moyennes des paramètres pour chaque modalité (station x date). En travaillant sur des données individuelles, le nombre d'observations augmente considérablement, de même que la significativité des effets.

Sous ADE-4, la mise en œuvre des ACP à partir des données individuelles est toutefois plus fastidieuse et exigeante puisqu'elle nécessite :

- une correspondance exacte des valeurs de tous les paramètres pour chaque individu ;
- de disposer du même nombre d'individus pour chaque modalité ; il peut donc être nécessaire de remplacer les vides par des valeurs moyennes (en cas de mortalité ayant réduit la taille de l'échantillon ou de problème technique ponctuel durant l'analyse d'images) ;
- de réaliser l'ACP deux fois, en ordonnant une première fois les données par stations, puis une deuxième fois par dates.

Entre les deux méthodes (ACP sur des valeurs moyennes ou individuelles), le cercle des corrélations est sensiblement identique, de même que les positions des centres de gravité sur le plan factoriel (par exemple, pour l'expérimentation ECODYN n°1, comparer l'ACP sur les moyennes de la figure III.2.1. et celle sur les données individuelles de la figure III.2.5.).

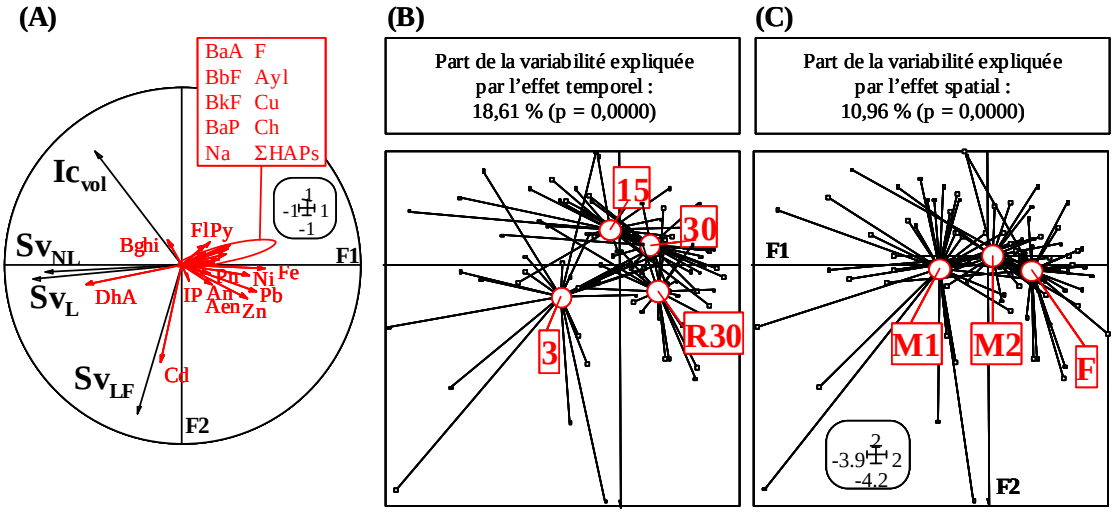


Figure III.2.5. ACP construite à partir des valeurs individuelles des biomarqueurs cellulaires et physiologique chez les dreissènes de l'expérimentation ECODYN n°1 (2004) (67,45 % de la variance totale). Même légendes que la figure III.2.1. Noter la similitude des coordonnées des vecteurs et des centres de gravité des dates de prélèvement et des sites d'étude avec la figure III.2.1.

En revanche, la significativité des effets augmente considérablement en réalisant l'ACP sur des données individuelles (voir le bilan des comparaisons, tableau III.2.1). C'est donc bien cette dernière méthode qu'il convient de privilégier, bien qu'elle soit plus longue à mettre en oeuvre.

Tableau III.2.1. Significativité statistique des ACP conduites sur des valeurs individuelles (ind) ou sur des moyennes (moy)

Etude	Nombre de modalités (stations x dates)	Nombre d'observations		% de variabilité expliquée		Contribution de l'effet spatial à la variabilité totale (%)	
		moy	ind	moy	ind	moy	ind
ECODYN n°1	12 (3 x 4)	12	96	66,9	67,5	24,7 (p = 0,2030)	11,0 (p = 0,0000)
ECODYN n°2	9 (3 x 3)	9	72	95,2	74,1	7,7 (p = 0,8838)	3,1 (p = 0,3374)
Ton-BPPME	6 (2 x 3)	6	48	98,2	88,5	31,8 (p = 0,2948)	26,4 (p = 0,0000)
Moselle-PPME	9 (3 x 3)	9	72	95,3	90,6	21,9 (p = 0,4861)	18,5 (p = 0,0001)

2 INDICES INTEGRATIFS : EXEMPLE DE L'IBR (« INTEGRATED BIOMARKER RESPONSE », BELIAEFF ET BURGEOT, 2002)

2.1 INTRODUCTION

Plusieurs indices intégrant la réponse d'une batterie de biomarqueurs ont été développés ces dernières années dans un contexte d'écotoxicologie aquatique (voir la revue de Wosniok et collaborateurs (2005)). Cette approche permet de résumer l'information, précédemment portée par plusieurs variables, en une variable unique, de la façon la plus pertinente possible.

Un tel indice présente l'avantage de faciliter l'interprétation des résultats et leur communication, et peut être le critère d'évaluation utilisé pour des comparaisons spatiales ou une surveillance (spatio)-temporelle de tendances (Wosniok *et al.*, 2005).

L'un des indices les plus utilisés est l'Integrated Biomarker Response (IBR) proposé par Beliaeff et Burgeot (2002) (voir, par exemple, Bodin *et al.*, 2004 ; Broeg & Lehtonen, 2006 ; Damiens *et al.*, 2007) ;

2.2 MODE DE CALCUL

Les différentes étapes du calcul de l'IBR sont les suivantes :

① pour chacun des n biomarqueurs composant l'indice (avec $n \geq 3$), calcul des **valeurs moyennes X_i** $_{(i = 1 \text{ à } n)}$ par lot expérimental (par exemple un lot = un couple « date x station »), s'il ne s'agit pas déjà de valeurs individuelles issues de l'analyse de pools ;

② calcul de la **moyenne générale *m*** et de **l'écart type *s*** de l'ensemble des X_i ;

③ **standardisation des X_i** selon la formule :

$$Y_i = (X_i - m) / s \qquad (27)$$

④ **prise en compte du type de réponse de chaque biomarqueur individuel**, en définissant

$$Z_i = Y_i \qquad (28)$$

dans le cas d'une activation (ou d'une augmentation de la taille des compartiments et contenus cellulaires dans le cas des paramètres stéréologiques) et

$$Z_i = -Y_i \qquad (29)$$

dans le cas d'inhibitions (ou de diminutions d'un paramètre) ;

⑤ calcul des **scores individuels** S_i des biomarqueurs par la formule :

$$S_i = Z_i + |min| \qquad (30)$$

où |min| représente la valeur absolue du Z_i minimal parmi tous les lots ; les S_i ainsi obtenus sont tous positifs ;

⑥ représentation des résultats sur des diagrammes en radar (un par lot), dont les coordonnées correspondent aux différents S_i ;

⑦ calcul des aires individuelles définies par la connexion des positions de chaque score individuel S_i avec le suivant S_{i+1} ; chaque aire A_i est donnée par la formule :

$$A_i = S_i / 2 \,.\, \sin\beta \,(S_i \cos\beta + S_{i+1} \,.\, \sin\beta) \qquad (31)$$

Où

$$\beta = \arctan [(S_{i+1} \,.\, \sin\alpha) / (S_i - S_{i+1} \,.\, \cos\alpha) \qquad (32)$$

où

$$\alpha = 2\pi / n \text{ radians et } S_{n+1} = S_1 \qquad (33)$$

Une version simplifiée du calcul des A_i est proposée par S. Devin (communication personnelle) selon la formule suivante (voir explication sur la Figure III.2.6) :

$$A_i = ½ \sin (2\pi / n) \,.\, S_1 \,.\, S_2 \qquad (34)$$

C'est cette formule qui est appliquée dans le présent manuscrit.

⑧ calcul de l'IBR selon la formule :

$$IBR_{lot} = \Sigma_{(i = 1 \text{ à } n)} A_i \qquad (35)$$

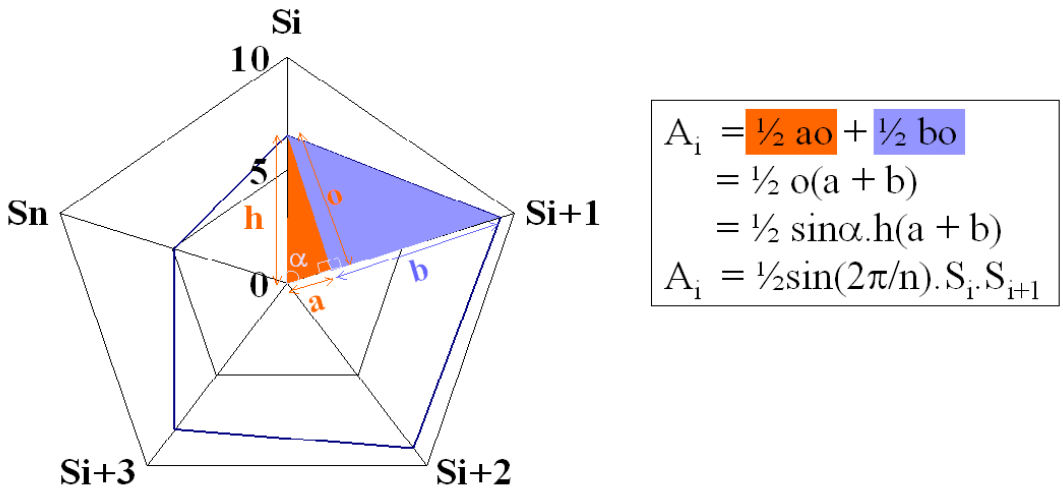


Figure III.2.6. Mode de calcul des aires Ai pour la détermination de l'IBR.

2.3 APPLICATION A LA BATTERIE DE BIOMARQUEURS CELLULAIRES ET PHYSIOLOGIQUE

Une des limites de l'IBR réside dans la variabilité de cet indice en fonction de l'ordre dans lequel se succèdent les différents biomarqueurs. En effet, une alternance de scores faibles et élevés réduit l'aire du diagramme et donc l'indice, tandis que celui-ci est important lorsque plusieurs biomarqueurs à scores élevés sont adjacents (les deux côtés du triangle délimité par ces derniers étant grands, l'aire est importante).

La **succession des biomarqueurs autour du diagramme en radar** adoptée ici suit celle de l'échelle biologique, à savoir : peroxysomes < lysosomes < lipofuscines < lipides neutres insaturés < indice de condition (soit, en terme de paramètres $Vv_P < Vv_L$ ou $Sv_L < Sv_{LF} < Sv_{LN} < IC_1$). Il aurait été possible de les faire se succéder en fonction de leur pertinence (en accolant notamment les réponses morphométriques des lysosomes et des lipides neutres insaturés), afin de maximiser l'IBR. Cependant, cette pertinence des réponses individuelles est susceptible de varier en fonction du contexte, tandis que la hiérarchie au sein de l'échelle d'organisation du vivant semble un choix plus emprunt de réalisme biologique, plus universel et moins subjectif [3]. Une fois ce choix opéré, il convient de suivre systématiquement cet ordre pour pouvoir comparer les IBR entre eux.

Le calcul de l'IBR est appliqué aux données issues :

- de l'étude saisonnière à long terme, présentée au Chapitre III.1.A (Figure III.2.7) ;
- du programme ECODYN chez *D. polymorpha in-situ*, exploité au Chapitre III.1.B (Figures III.2.8 et III.2.9) ;

[3] l'ordre dans la hiérarchie biologique adopté par les chercheurs peut toutefois être sujet à discussion, dans la mesure où les variations des contenus dits lysosomaux en lipides neutres et en lipofuscines sont placés par Dagnino et collaborateurs (2007) dans les réponses cellulaires, tandis que ces auteurs présentent les fluctuations de Vv_L comme des réponses au niveau tissulaire. De notre point de vue, les lipides neutres et lipofuscines sont des contenus lysosomaux et cytoplasmiques et nous les plaçons donc au niveau cellulaire, voire tissulaire, mais nous considérons en revanche les réponses propres des organites que sont les lysosomes comme des réponses plutôt subcellulaires à cellulaires (même si elles peuvent influencer l'intégrité tissulaire tout entière)… Finalement, pour assigner un niveau d'organisation biologique à un biomarqueur, doit-on se baser sur le niveau structurel auquel il appartient ou sur le niveau fonctionnel de l'échelle biologique, auquel son comportement aura des conséquences ?

- des expérimentations autour des effluents de l'industrie papetière chez *Radix peregra*, qui figurent dans l'article 4, en annexe 1 (Figure III.2.10 et III.2.11).

NB : Les résultats seront commentées d'un seul tenant, à la suite de la figure III.2.11.

Les axes des diagrammes en radar peuvent représenter les scores individuels (biomarqueurs), les sites ou les dates. Afin d'identifier visuellement, dans une première approche, l'étendue de la participation de chaque réponse individuelle à l'IBR final, nous nous sommes concentrés sur la première possibilité.

Le tableau III.2.2. récapitule les biomarqueurs entrant dans le calcul de l'IBR pour chaque étude et le type de réponse observé, qui oriente le signe des Z_i dans l'étape ④ et donc la valeur finale d'IBR (voir le § 2.2 de cette partie, sur le mode de calcul). Pour chaque biomarqueur étudié, malheureusement, le type de réponse (activation/augmentation ou inhibition/diminution) ne s'est pas révélé toujours identique d'une étude à l'autre. Ceci pose le problème de la subjectivité des choix de l'opérateur, de la signification des réponses en terme de santé individuelle et, pour l'heure et dans ce contexte précis, de l'impossibilité d'une application à l'aveugle de ce type d'outil.

En outre, les variations de composition de la batterie empêchent une comparaison directe des valeurs trouvées entre les différentes études, qui se seraient pourtant avérées particulièrement intéressantes dans le cas de toutes les stations situées le long du continuum amont-aval de la Moselle (proximité d'Epinal pour les effluents de papeterie, puis stations du programme ECODYN et enfin proximité de la centrale électronucléaire de Cattenom pour l'étude saisonnière à long terme).

Tableau III.2.2. Biomarqueurs entrant dans le calcul de l'IBR dans les différentes expérimentations et chez les diverses espèces sentinelles utilisées

Biomarqueur	Type de réponse	Etude
Structure du système peroxysomal		
Sv_P	↗	Saisonnière (*Dp*, *Cf*, *Dv*)
		Industries papetières (*Rp*)
Structure du système lysosomal		
Sv_L	↗	Saisonnière (*Dp*, *Cf*)
Sv_L	↘	Saisonnière (*Dv*)
Vv_L	↗	Industries papetières (*Rp*)
Vv_L	↘	ECODYN (*Dp*)
Contenu en lipofuscines		
Sv_{LF}	↗	Saisonnière (*Dp*, *Cf*, *Dv**)
		Industries papetières (*Rp*)
		ECODYN (*Dp*)
Contenu en lipides neutres insaturés		
Sv_{LN}	↘	Saisonnière (*Dp*, *Cf*), industries papetières,
		ECODYN (*Dv*)
Sv_{LN}	↗	Saisonnière (*Dv*)
Indice de condition	↘	ECODYN (*Dv*)

*Cf : Corbicula fluminea ; Dp : D. polymorpha ; Dv : Dikerogammarus villosus ; Rp : Radix peregra ; * : choix arbitraire du signe de Z en l'absence de type de réponse tranché.*

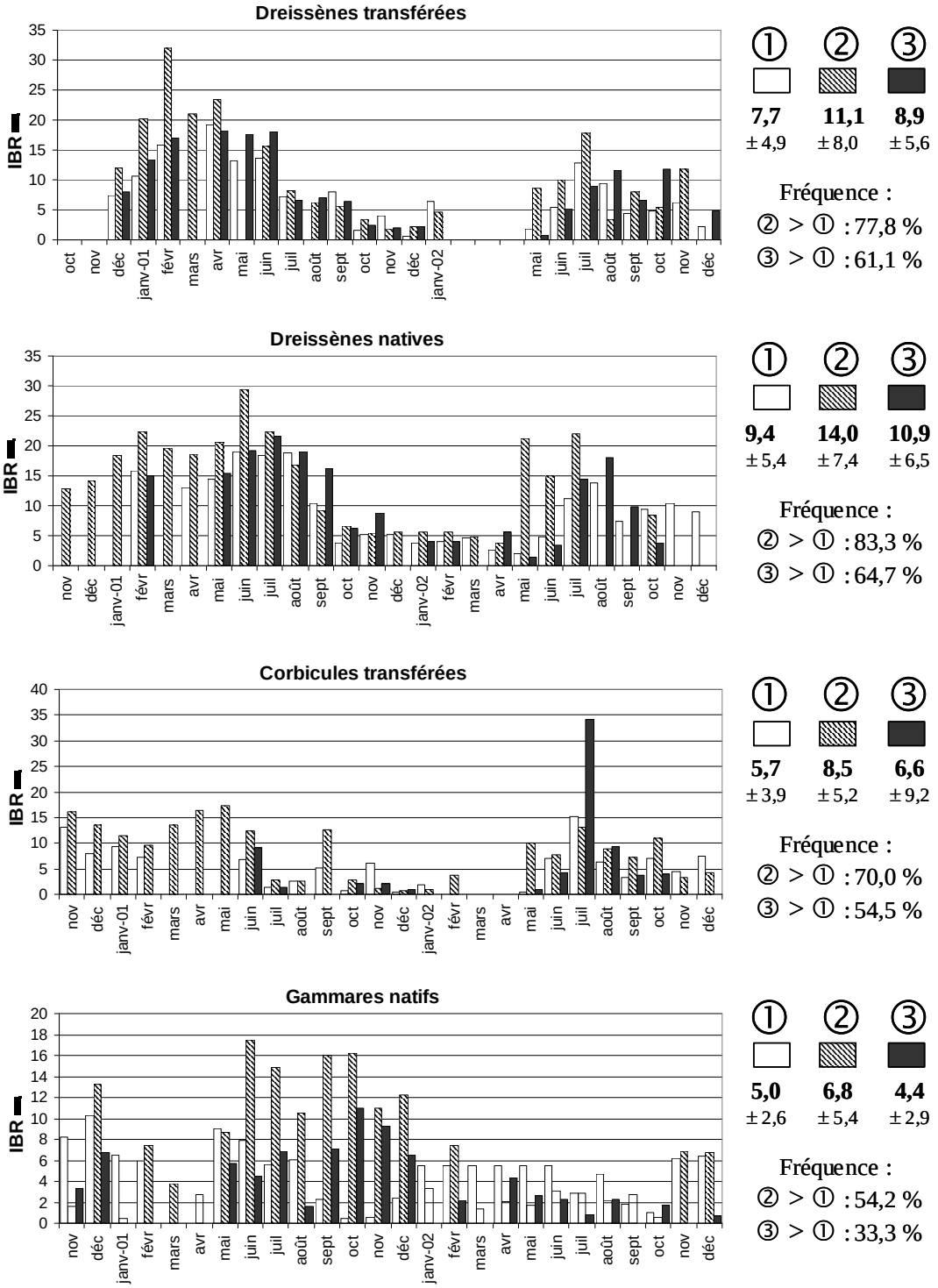


Figure III.2.7. Application de l'indice IBR aux résultats de l'étude saisonnière à long terme : histogrammes des valeurs mensuelles de l'IBR ; pour chacune des trois stations, les moyennes et écart-types sur l'ensemble de la période sont indiqués à droite de la figure, ainsi que la fréquence des différences entre stations.

Rappelons que le gradient de contamination et de stress pour cette étude était le suivant : ① < ③ < ②. La variabilité saisonnière de l'IBR est très forte pour une même station.

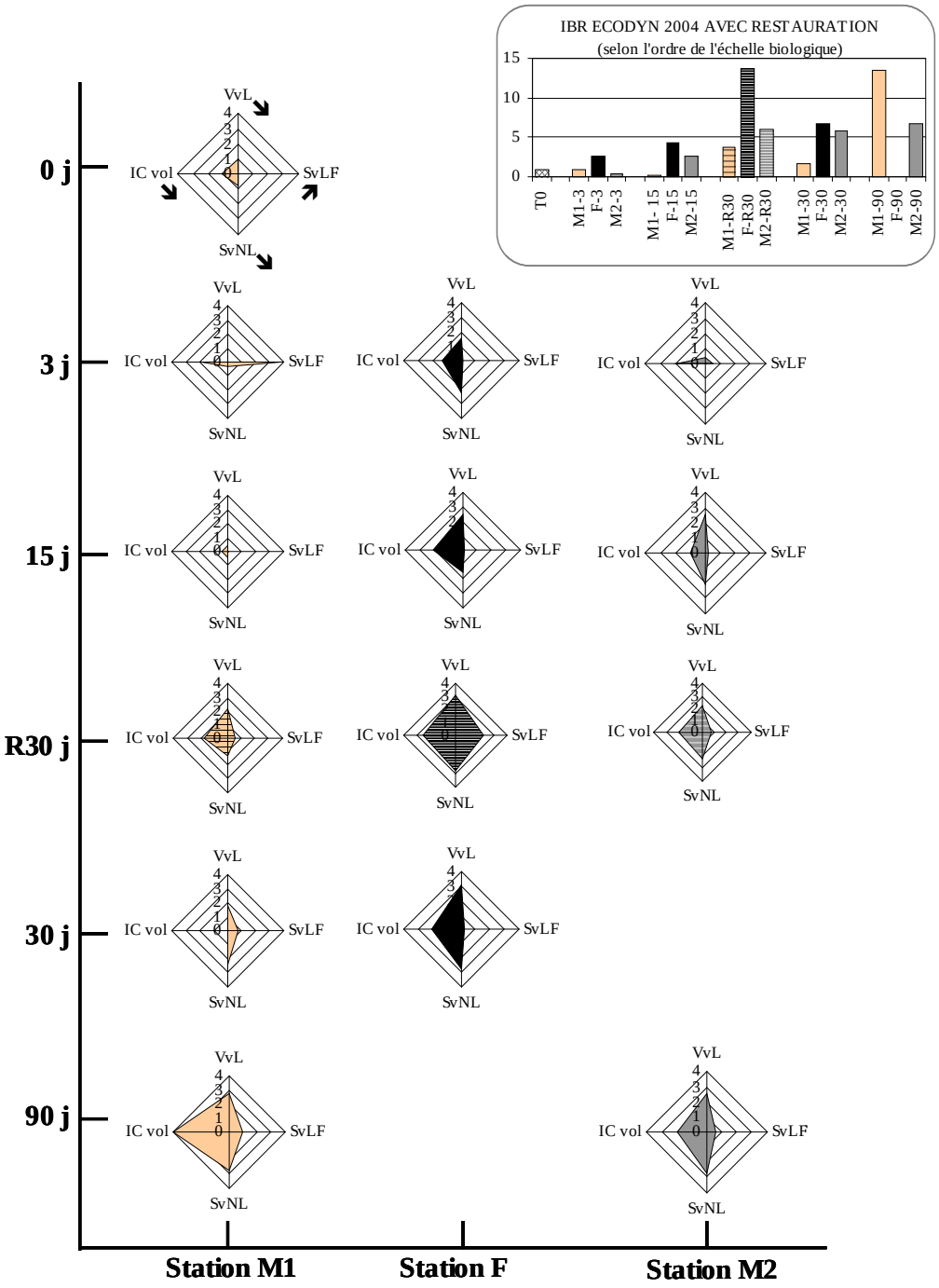


Figure III.2.8. Application de l'indice IBR aux résultats de l'expérimentation ECODYN n°1 (2004)

Dans le cadre de l'expérimentation ECODYN, le gradient de contamination et de stress suivait l'ordre : M1 < M2 < F.

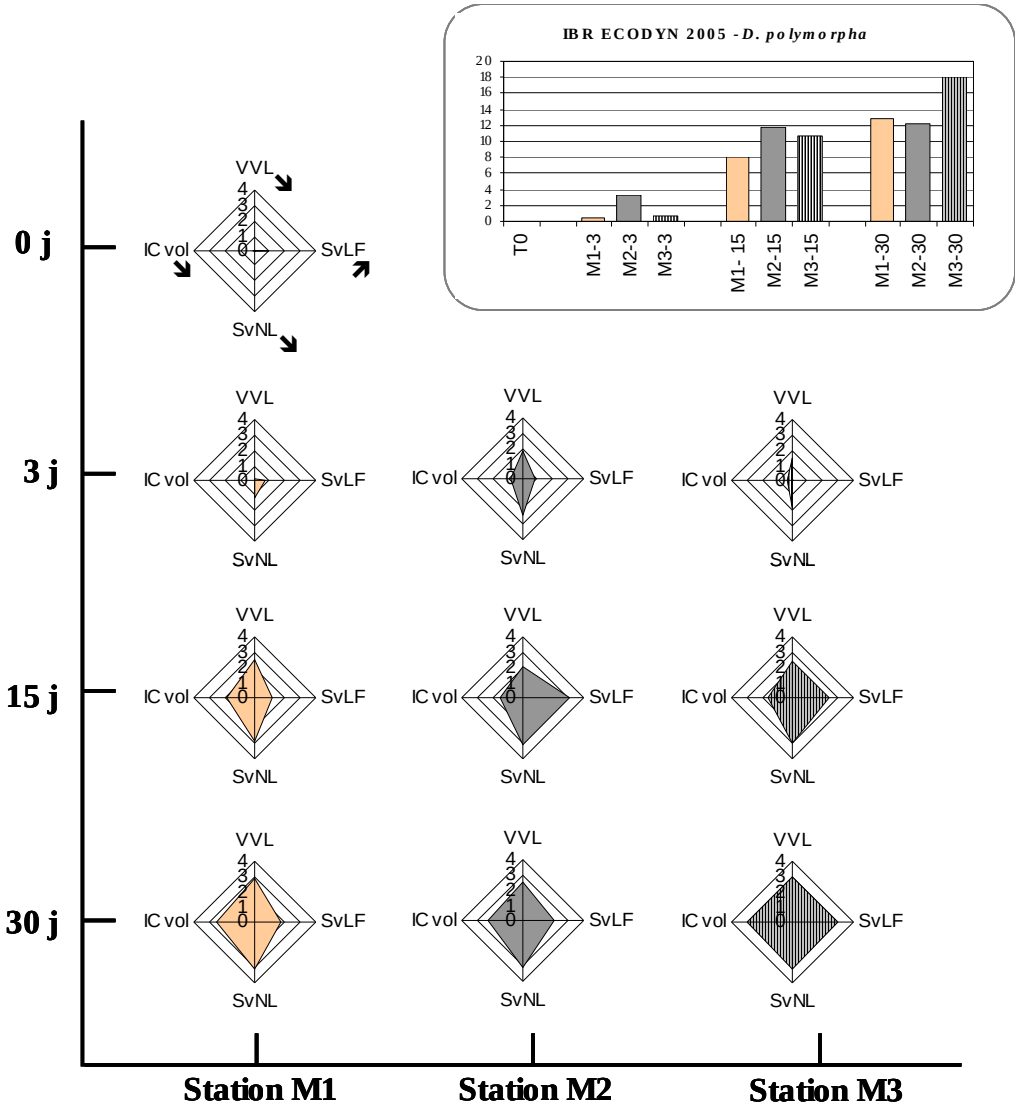


Figure III.2.9. Application de l'indice IBR aux résultats de l'expérimentation ECODYN n°2 (2005)

Dans ce volet du programme ECODYN, le gradient était M1 < M3 < M2.

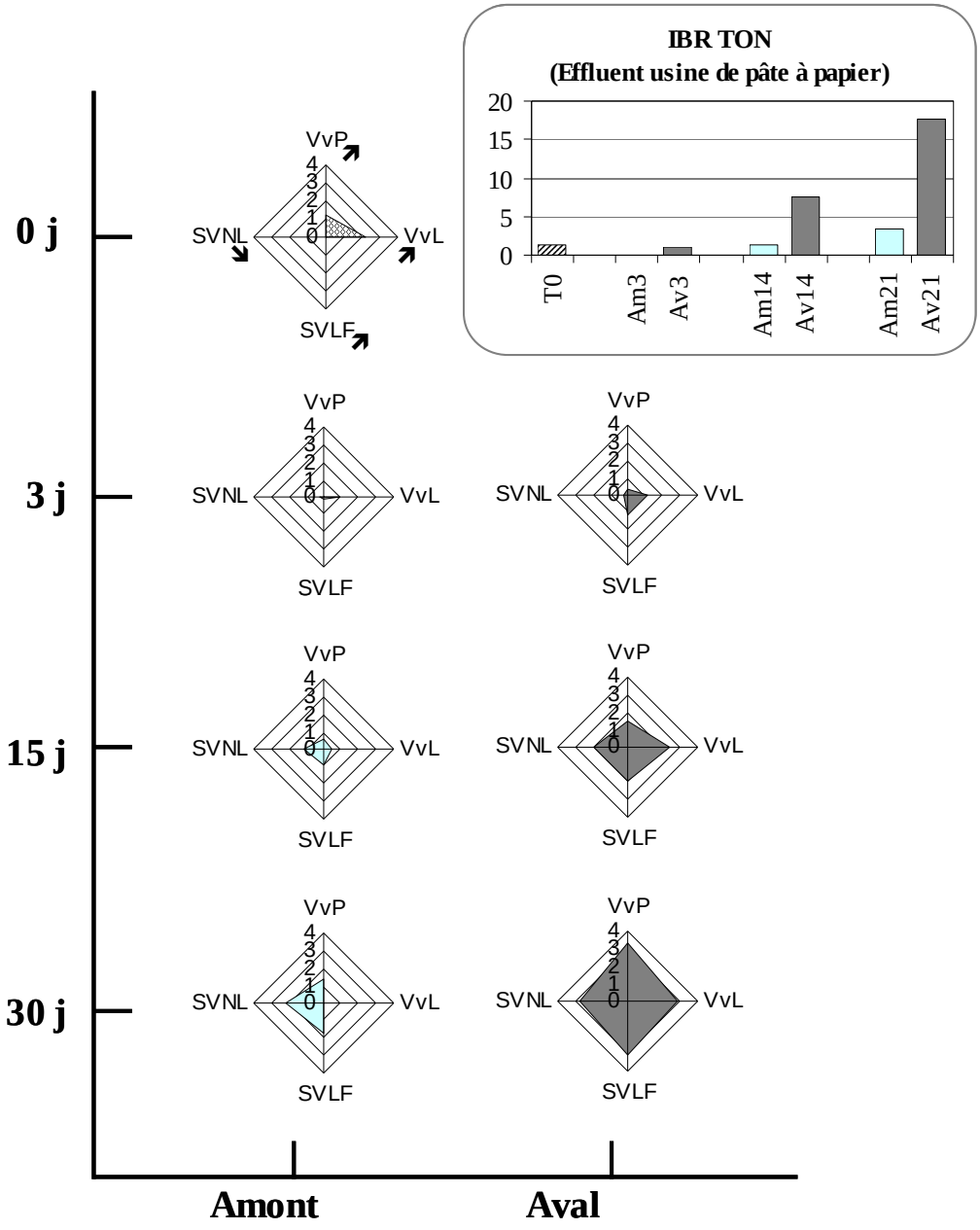


Figure III.2.10. Application de l'indice IBR aux résultats de l'exposition de R. peregra à un effluent d'usine de pâte à papier blanchissant au chlore (rivière Ton, voir Article 4)

Au cours de cette étude évaluant l'impact d'un effluent d'usine de pâte à papier blanchissant au chlore sur les réponses cellulaires d'un gastéropode, le gradient de contamination et de stress pour les organismes suivait le continuum amont < aval du point de rejet.

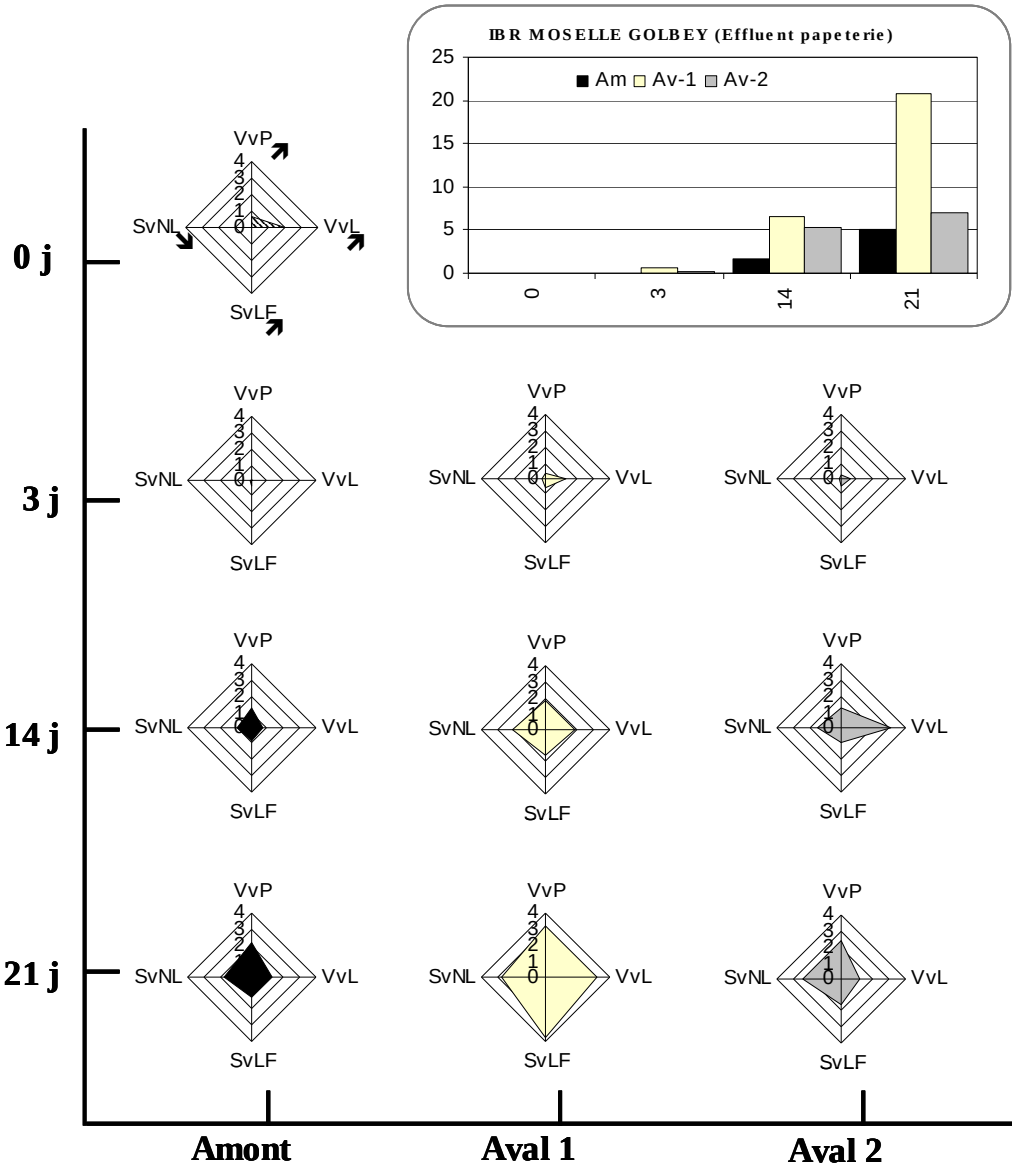


Figure III.2.11. Application de l'indice IBR aux résultats de l'exposition de R. peregra à un effluent de papeterie (rivière Moselle, voir Article 4)

Enfin, le gradient de contamination et de stress mesuré autour de l'effluent de papeterie suivait l'ordre : amont < aval 2 < aval 1.

Il ressort de l'analyse de ces cinq figures que l'IBR permet de mettre en évidence les différents gradients de stress que l'analyse individuelle des biomarqueurs ne parvenait pas systématiquement à identifier. Pour l'étude saisonnière à long terme, par exemple, la fréquence d'un diagnostic en accord avec le gradient de contamination ① < ② est comprise entre 70 et 83 % chez les bivalves en considérant l'IBR, ce qui est nettement supérieur aux

fréquences des différences significatives tirées de l'analyse individuelle des biomarqueurs (cf. Tableau III.1.A.6).

Pour les études d'impact des effluents d'usines papetières (Figures III.2.9 et 10), où les réponses individuelles étaient déjà bien tranchées (voir Article 4, annexe 1), l'écart entre les IBR des différentes stations traduit parfaitement bien les différents degrés de stress, particulièrement à l'issue des trois semaines d'exposition.

Dans le cas de l'expérimentation ECODYN (Figure III.2.8), l'influence de la réponse des contenus cellulaires en lipofuscines semble parfois fausser le diagnostic, notamment en période de dépuration. En effet, ce marqueur ne s'exprime, dans ce cas, que chez des moules placées dans un site où, vraisemblablement, la pression des facteurs responsables de la lipoperoxydation devient moindre (2004 : transferts de la Fensch vers Ref1, et, à 3 jours, de Ref1 vers la station Moselle amont M1, où les hydrocarbures se sont avérés moins biodisponibles ou moins présents).

Néanmoins, cet indice permet une appréhension rapide et synthétique des résultats de la batterie. Dans une perspective de biosurveillance environnementale appliquée, il semble prometteur pour s'affranchir d'une analyse individuelle pointue des biomarqueurs, à condition de toujours disposer d'informations supplémentaires pour guider le diagnostic (physico-chimie, contaminants) au cours de l'étape du choix du signe de Z.

3 PERSPECTIVE D'ADAPTATION DU SYSTEME EXPERT « DISAV ES » PROPOSE PAR DAGNINO *ET AL.* (2007)

A ce stade d'expérience acquise au sein de notre équipe sur les biomarqueurs cellulaires chez les invertébrés aquatiques, l'un de nos objectifs majeurs réside dans une compilation de l'ensemble des résultats au sein d'une base de données. Son exploitation doit nous permettre d'acquérir une vision d'ensemble synthétique sur les différents profils de réponse en fonction du type de stress, sur la variabilité des données ou encore sur les seuils de sévérité des réponses. Bien conçue et enrichie au fur et à mesure des nouvelles expérimentations, cette

base de données permettra d'extraire rapidement les informations nécessaires pour répondre à diverses questions transversales, pour une meilleure compréhension globale du comportement des biomarqueurs cellulaires en milieu dulçaquicole. Le développement récent d'un système expert chez la moule marine nous offre l'opportunité de tester une ébauche de cette future et volumineuse base de données, pour extraire rapidement certaines informations nécessaires à la prochaine adaptation de ce système expert chez la dreissène.

3.1 PRINCIPE ET FONCTIONNEMENT

L'un des objectifs ultimes du développement de biomarqueurs comme outils de diagnostic environnemental consiste en la mise au point d'un système expert d'aide à la décision et à l'interprétation des données, simple d'accès et utilisable par les gestionnaires de l'environnement, pour la classification des sites dans les études de biosurveillance environnementale. C'est ce que Dagnino et collaborateurs (2007) ont proposé récemment pour l'interprétation des résultats d'une batterie de biomarqueurs chez la moule marine, *Mytilus edulis*.

Sans trop entrer dans les détails, le principe du système expert « DiSAV ES » est exposé dans les paragraphes suivants.

La réponse intégrée d'une batterie de biomarqueurs[4] est traduite en terme d'**état de santé des individus (« niveau de stress »)** sur une échelle de A (bonne santé, absence de stress) à E (état pathologique). Un ensemble de **règles de décisions** est mis en œuvre par le système pour l'obtention de ce diagnostic. Ces règles tiennent notamment compte du niveau de l'organisation biologique auquel se manifeste chaque réponse : cellule, tissu et organisme entier. Le système intègre également la signification biologique des réponses (stress général, génotoxicité, exposition à des métaux lourds, exposition à des xénobiotiques organiques), leur

[4] L'ensemble des mesures figurant déjà dans le système comprend la stabilité lysosomale membranaire, les contenus lysosomaux en lipofuscines et en lipides neutres, les dommages à l'ADN, la fréquence des micronoyaux, les contenus en métallothionéines, les activités de l'acétylcholinestérase, de la catalase et de la benzo[a]pyrène monoxygènase, le ratio lysosomes / cytoplasme ($\approx Vv_L$) le stress on stress. L'utilisateur peut ajouter des biomarqueurs supplémentaires, à condition de spécifier leur niveau d'organisation biologique, leur signification biologique et le type de profil.

type de profil (augmentation, diminution ou courbe en cloche), le pourcentage de réponses affectées, ainsi que certaines interactions entre systèmes.

Ce dernier point concerne plus particulièrement la stabilité lysosomale, qui témoigne, lorsqu'elle est très basse, d'une dégradation accrue des protéines en général. Or, certains paramètres présentant un profil de réponse de type « courbe en cloche » sont des quantités de protéines qui peuvent rester inchangées, voire diminuer, en cas de stress important. Ainsi, le degré de stabilité lysosomale peut être examiné par le système pour évaluer si une valeur de contenu protéique (métallothionéines, enzymes de phase I, Hsp…) se situe dans la portion croissante ou décroissante d'une courbe en cloche.

A chaque réponse individuelle est assigné un niveau d'altération (sur une échelle à 4 degrés), selon de dépassement de seuils par rapport aux témoins, fixés par les concepteurs du système. Le biomarqueur le plus sensible de la batterie sert de « Paramètre Guide » et il oriente prioritairement les décisions prises par le système. Le pourcentage de biomarqueurs appartenant aux différents niveaux d'altération est notamment pris en compte dans l'attribution du niveau de stress.

Les recommandations des concepteurs du système, pour une application pertinente même en cas d'utilisation d'un nombre assez réduit de biomarqueurs, sont les suivantes : (i) utiliser au minimum trois biomarqueurs de stress au profil de réponse croissante ou décroissante, (ii) faire figurer au minimum deux réponses au niveau d'organisation du tissu et/ou de l'organisme, et (iii) inclure l'étude de la stabilité lysosomale, en tant que biomarqueur « le plus représentatif du développement du syndrome de stress ».

3.2 LIMITES A UNE UTILISATION DIRECTE DU SYSTEME SUR LES RESULTATS DE LA BATTERIE DE BIOMARQUEURS CELLULAIRES CHEZ LES ESPECES SENTINELLES DULÇAQUICOLES

Dans l'optique d'une adaptation du système expert DiSAV ES aux invertébrés dulçaquicoles, et en particulier aux réponses cellulaires et physiologiques étudiées, les points qui semblent les plus critiques sont les suivants :

- Les types de réponses au stress des compartiments cellulaires étudiés ne se sont pas révélées toujours identiques au cours de nos travaux. Or, le DiSAV ES semble fonctionner selon le principe d'un profil de réponse fixe par biomarqueur ;
- Même en cas de type de réponse très typique d'un biomarqueur, ce profil chez les espèces que nous avons l'habitude d'étudier en eau douce peut être diamétralement opposé à celui qui est habituellement mis en évidence chez *M. edulis* (respectivement, déplétions et accumulations de lipides neutres insaturés) ;
- Les seuils d'altération ont également été déterminés sur la base des réponses de *M. edulis* et il convient de vérifier que ces niveaux sont appropriés pour les espèces dulçaquicoles candidates.

Les « niveaux d'altérations » (NA : non altéré ; puis, + ; ++ et +++ ou - ; -- ; ---) sont attribués à partir des valeurs des « facteurs d'altérations » (FA = moyenne testée / moyenne témoin). Les seuils sont les suivants :

- pour les paramètres décroissants : les petites différences par rapport au témoin, inférieures à 20 %, sont considérées comme normales, même si elles sont statistiquement significatives ; ainsi les trois valeurs seuils de FA qui délimitent les quatre niveaux d'altération (NA : non altéré ; puis, - ; -- ; ---) sont : 0,80 ; 0,50 et 0,15 ;
- pour les paramètres croissants ou de type « courbe en cloche », les valeurs seuils de FA entre niveaux d'altération (NA ; + ; ++ et +++) sont : 1,20 ; 2,00 et 3,00.

3.3 PREALABLE A L'UTILISATION D'UN SYSTEME EXPERT CHEZ *D. POLYMORPHA* : DETERMINATION DES SEUILS DE REPONSE

Afin d'identifier les seuils de réponse, une vaste étude rétrospective des données accumulées par l'équipe ces dernières années doit être entreprise. A l'issue de ces travaux de thèse, une première approche de compilation et traitement des données est initiée dans ce sens. Elle constitue une proposition de méthodologie pour la poursuite de cet objectif.

La première étape consiste à réunir l'ensemble des résultats biologiques au sein d'une **base de données**. Pour cette approche préliminaire, nous nous sommes limités à l'ensemble des résultats acquis par l'équipe (Laure Giambérini, Karine Ledy et Edwige Guerlet) chez la dreissène au cours d'expérimentations *in situ*. Il restera ensuite à étendre ce travail aux résultats acquis chez cette même espèce dans le cadre de bioessais en conditions contrôlées, puis à chacune des autres espèces (*C. fluminea*, *U. tumidus*, *R. peregra*, *L. stagnalis*, *D. villosus*), étudiées sur le terrain ou en laboratoire.

La base de données est construite sur un tableur Excel, à partir de toutes les données biologiques individuelles acquises dans le cadre de l'expérimentation saisonnière à long terme (Chapitre III.1.A), des deux expérimentations *in situ* du programme ECODYN (Chapitre III.1.B) et d'une exposition à moyen terme sur le Ton, aux abords de l'usine de pâte à papier blanchissant au chlore (BPPME) (Ledy, 2002). Il en résulte une matrice de données de 6677 lignes, concernant 1347 individus différents. Les paramètres inclus dans la base pour chacune des études figurent dans le tableau III.2.3.

A partir de cette base, il est possible d'obtenir les valeurs moyennes et coefficients de variation pour chaque site et temps de prélèvement. Les **résultats sont exprimés**, lorsqu'un T0 est disponible, **par rapport à une référence temporelle**, et systématiquement **par rapport à une référence spatiale** (station située en amont du rejet ou de la confluence). Pour chaque étude, chaque site et éventuellement chaque approche (biosurveillance active ou passive), les pourcentages moyens et médians des valeurs par rapport aux témoins sont calculés aux sites subissant la perturbation, de même que les pourcentages minimaux, maximaux et les 5ème et 95ème centiles de leur distribution.

Tableau III.2.3. Paramètres stéréologiques et physiologiques incorporés dans la base de données

	Paramètres stéréologiques							**Paramètres physiologiques**	
Expérimentation	**Sv_P**	**Vv_L**	**Sv_L**	**Nv_L**	**S_L/V_L**	**Sv_{LF}**	**Sv_{LN}**	**IC_{vol}**	**IG**
Saisonnière à long terme	✓		✓			✓	✓		✓
ECODYN 2004 et 2005		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Ton-BPPME	✓		✓			✓	✓		

Ces données par étude sont rassemblées afin de calculer des **moyennes générales des valeurs des paramètres biologiques** (pondérées par le nombre d'individus étudiés dans chacune des expérimentations), ainsi que des indices de l'étendue des données (valeurs minimales, maximales ; 5ème et 95ème centiles minimaux et maximaux). Les même paramètres sont déterminés sur **les pourcentages par rapport aux témoins**, éléments qui doivent être suffisamment connus pour établir correctement les seuils de réponse. Dans une première approche, ces réponses par rapport aux témoins sont éventuellement divisées en deux catégories distinctes pour un même paramètre biologique, lorsque celui-ci ne se comporte pas toujours de la même façon le long du gradient (augmentation ou diminution)[5]. L'**identification du sens de variation** se fait à partir de l'observation des valeurs médianes des pourcentages par rapport à la station témoin[6].

Les résultats de cette première approche chez *D. polymorpha in situ* sont résumés dans le tableau III.2.4.

[5] Elles pourront plus tard être considérées comme des réponses de type courbe en cloche si c'est bien le degré de stress qui définit la portion de la courbe dans laquelle on se situe. Mais il se peut que la situation soit plus complexe et dépende fortement du type de stress (voir la synthèse finale, point 1.1).

[6] Les médianes sont privilégiées par rapport aux moyennes. En effet, des erreurs d'interprétation du type de variation peuvent survenir lorsque le calcul des moyennes inclut des valeurs extrêmes ponctuelles, comme c'est le cas chez les dreissènes natives du Mirgenbach (station ② de l'étude saisonnière) qui présentent, en septembre 2001, une valeur moyenne de Sv_{LN} équivalente à 10 882 % de celle calculée chez les dreissènes de la station ① !). Le pourcentage moyen par rapport à cette station pour l'ensemble de la période atteint alors 837 %, tandis que la médiane n'est que de 43 %...

Tableau III.2.4. Valeurs moyennes et dispersion des différents paramètres biologiques étudiés in situ chez D. polymorpha et pourcentage de réponse par rapport aux témoins, traduits en niveaux d'altération

	Biomarqueurs cellulaires							**Paramètres physiologiques**	
	Système peroxysomal	**Système lysosomal**				**Lipofuscines**	**Lipides neutres insaturés**		
Paramètre	**Sv_P**	**Vv_L***	**Sv_L**	**Nv_L***	**S_L/V_L***	**Sv_{LF}**	**Sv_{LN}**	**IC_{vol}**	**IG**
N	999	206	1137	206	206	1262	1347	208	1195
Valeurs des paramètres biologiques									
Unités	$\mu m^2.\mu m^{-3}$	$\mu m^3.\mu m^{-3}$	$\mu m^2.\mu m^{-3}$	μm^{-3}	$\mu m^2.\mu m^{-3}$	$\mu m^2.\mu m^{-3}$	$\mu m^2.\mu m^{-3}$	$\mu m.\mu m^{-3}$	-
Facteur multiplicatif	10^{-4}	10^{-4}	10^{-3}	$.10^{-3}$	-	10^{-4}	10^{-3}	10^{-1}	-
Moyenne	1,16	4,00	3,45	8,73	15,01	3,28	9,44	1,07	2,17
Minimum	0,121	0,980	0,634	4,42	8,50	0,511	0,100	0,604	0,00
5ème centile	0,129	0,988	1,10	4,58	9,09	0,643	0,112	0,707	0,01
95ème centile	20,4	11,9	9,59	14,7	20,31	14,7	83,0	1,38	5,00
Maximum	20,5	12,6	9,84	14,8	20,68	15,1	120	1,40	5,00
CV moyen (%)	26,7	32,1	29,3	24,1	11,1	33,8	63,9	17,1	-
Pourcentage par rapport au témoin (%)									
Type de variation	↗	↘	↗	↘	↗	↗	↗ ↘	↘	↘	↘
Référence spatiale									
Moyenne	115,0 NA	88,1 NA	154,8 +	95,1 NA	110,9 NA	107,7 NA	124,2 +	110,5 NA	337,0 NA	99,3 NA	107,6 NA
Moyenne des médianes	118,4 NA	93,2 NA	143,6 +	95,9 NA	113,1 NA	109,9 NA	132,6 +	87,4 NA	70,8 -	94,1 NA	79,4 NA
Minimum	34,4 NA	43,1 - -	49,7 NA	50,1 -	70,9 NA	92,9 NA	39,5 NA	10,7 - - -	0,5 - - -	65,7 -	0,0 - - -
5ème centile	51,7 NA	43,5 - -	57,2 NA	52,1 -	75,9 NA	93,4 NA	39,6 NA	16,7 - - -	0,8 - - -	67,0 NA	0,0 - - -
95ème centile	221,7 ++	131,5 NA	417,0 +++	123,9 NA	188,0 +	144,5 +	318,1 +++	270,3 NA	421 NA	156,7 NA	485,2 NA
Maximum	372,6 +++	131,6 NA	482,3 +++	124,3 NA	191,0 +	144,8 +	321,5 +++	295,1 NA	10882 NA	167,2 NA	612,5 NA
Référence temporelle (expérimentations à court-terme uniquement) (%)									
Moyenne	129,8 +	52,5 -	136,3 +	60,0 -	78,9 NA	115,1 NA	174,8 +	363,2 NA	26,9 - -	83,2 NA	
Minimum	96,6 NA	28,8 - -	87,8 NA	39,1 - -	40,6 NA	86,3 NA	67,5 NA	126,3 NA	0,6 - - -	51,1 -	
5ème centile	97,5 NA	30,1 - -	88,2 NA	40,0 - -	44,0 NA	88,6 NA	76,4 NA	127,7 NA	0,8 - - -	56,3 -	
95ème centile	186,1 +	92,6 NA	212,5 ++	82,6 NA	135,4 +	154,7 +	437,0 +++	681,1 NA	97,6 NA	114,4 NA	
Maximum	187,3 +	96,7 NA	215,5 ++	86,9 NA	135,8 +	157,5 +	444,4 +++	771,5 NA	100,7 NA	118,7 NA	

** : pour ces trois paramètres, seules les deux expérimentations ECODYN ont été prises en compte dans la base de données pour le moment et les tendances mise en évidences ne doivent pas être considérées comme les réponses les plus typiques – (NA) non altéré*

Aux sites les plus anthropisés, les pourcentages de variation par rapport aux témoins spatiaux (tous temps confondus) sont traduits en niveaux d'altération, tels qu'ils sont actuellement définis dans le DiSAV ES développé pour *M. edulis* (voir § 3.2), afin de vérifier leur adéquation chez *D. polymorpha* (Tableau III.2.5).

La même démarche est appliquée aux pourcentages par rapport à la référence temporelle, sur l'ensemble des stations étudiées à moyen terme (partie basse du tableau). Toutefois, le sens réel de la réponse est respecté et nous n'appliquons pas le profil de réponse fixé dans le DiSAV ES (qui est toutefois signalé à la dernière ligne du tableau), ni le profil médian déterminé dans le tableau III.2.5.

Tableau III.2.5. Seuils d'altération du DiSAV ES appliqués aux réponses mesurées chez D. polymorpha

		Biomarqueurs cellulaires							**Paramètres physiologiques**	
	Site	**Sv_P**	**Vv_L***	**Sv_L**	**Nv_L***	**S_L/V_L***	**Sv_{LF}**	**Sv_{LN}**	**IC_{vol}**	**IG**
Référence spatiale										
Et.saisonnière active										
	③	NA		+			NA	NA		NA
	②	NA		+			NA	–		– –
Et.saisonnière passive										
	③	+		NA			NA	NA		NA
	②	+		+			+	– –		–
ECODYN 2004										
	M2		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
	F		–	–	+	+	NA	– – –	–	
ECODYN 2005										
	M3		NA	NA	NA	NA	NA	–	NA	
	M2		NA	NA	NA	NA	+	– –	NA	
Ton-BPPME										
	aval	+		+			++	–		
Référence temporelle										
ECODYN 2004										
	M1		–	–	–	NA	+++	– –	NA	
	M2		–	–	–	NA	+++	– – –	NA	
	F		–	–	–	NA	+++	– –	NA	
ECODYN 2005										
	M1		–	–	NA	+	NA	– –	NA	
	M3		– –	–	NA	+	+	– –	–	
	M2		– –	–	+	+	+	– – –	–	
Ton-BPPME										
	amont	NA		NA			+	–		
	aval	+		+			+++	–		
Profil selon le DiSAV ES			↗	(↗)			↗	↗		

NA : non altéré

L'échelle de niveaux d'altération est entièrement représentée, de - - - à + + +, ce qui suggère que, dans une première approche, les seuils définis chez *M. edulis* permettent également de rendre compte d'une gamme de réponses assez étendue chez *D. polymorpha.*

Néanmoins, il s'agit d'une approche tout à fait préliminaire, destinée à acquérir une idée de l'étendue générale des réponses. Le système ne tient compte que des réponses significatives et l'étape suivante consistera à ne conserver dans l'analyse que ces dernières. En outre, il serait intéressant d'affiner la connaissance des seuils de réponse, en tenant compte de chaque date car une approche basée uniquement sur les moyennes et médianes par site peut « écraser » l'amplitude des réponses. Avant de conclure sur la question de l'adaptation des seuils du DiSAV ES à *D. polymorpha*, il conviendra également d'incorporer les résultats des bioessais de laboratoire à l'analyse. Enfin, pour une utilisation efficace du système, il est recommandé de disposer d'une batterie conséquente de biomarqueurs appartenant aux différents niveaux de l'organisation biologique. D'autres réponses, issues d'un travail collaboratif, devraient donc aussi figurer dans l'analyse, afin de fixer les seuils les plus adéquats possibles pour *D. polymorpha*.

Lorsque plusieurs paramètres stéréologiques sont disponibles pour un même compartiment cellulaire, il est raisonnable de ne conserver que le plus intégrateur (proportion de volume ou de surface) et d'exclure la proportion numérique et le ratio S/V. En effet, ces paramètres sont très fluctuants et suivent des schémas dynamiques complexes, dont le système expert ne pourrait certainement pas tenir compte, même s'ils étaient élucidés. Il importe également d'éviter d'intégrer trop de réponses redondantes qui risquent de surestimer le stress, puisque le pourcentage de biomarqueurs présentant un certain niveau d'altération (de NA à - - - ou + + +) influence la détermination du niveau de stress (de A à E).

Comme déjà évoqué lors des essais d'utilisation de l'IBR, pour la majorité des systèmes étudiés se pose le problème d'une absence de profil fixe des réponses. L'examen du tableau III.2.5 suggère qu'en l'absence de données sur la stabilité lysosomale (qui est présentée par

les concepteurs du DiSAV ES comme le paramètre le plus intégrateur de l'état de santé individuel), la déplétion en lipides pourrait servir de paramètre guide chez *Dreissena polymorpha*. En effet, il s'agit de la réponse la plus constante, à la fois dans son profil et dans son potentiel discriminatif entre sites. Certes, ce profil est diamétralement opposé à celui qui est souvent rapporté chez les moules marines. Nous ne pouvons exclure la possibilité d'accumulations de lipides neutres chez *D. polymorpha* exposée à un milieu contaminé. Mais ce type de réponse, jamais rencontré chez les mollusques dulçaquicoles à notre connaissance, pourrait être spécifique des effets de certains contaminants bien particuliers, tels que les HAP (Moore, 1988b), tandis que la déplétion semble plutôt appartenir aux réponses de stress général.

Il est certainement possible de modifier le fonctionnement du système en accordant plus de souplesse à son utilisation (profils de réponse modulables). Cependant, cela remet en question la possibilité d'un travail en aveugle, sans a priori sur le gradient de stress, tout comme pour l'IBR. En outre, cela peut aller à l'encontre de la principale raison d'être d'un système expert, à savoir sa simplicité d'utilisation et son universalité.

4 BILAN COMPARATIF DES DIFFERENTES APPROCHES

Les principaux traits de l'analyse comparative des différents outils intégratifs testés sont rassemblés dans le tableau III.2.6.

Tableau III.2.6. Comparaison détaillée des différents outils d'analyse intégrative de la batterie de biomarqueurs

Outil	Avantages	Inconvénients et limites
ACP	✓ Possibilité de mise en relation les données biologiques et physico-chimiques, sans toutefois que ces dernières n'influent sur le profil de l'ACP (variables illustratives) ✓ Approche statistique possible ✓ Application possible sans aucun a priori sur le gradient de stress : le profil de réponse (augmentation ou diminution) est mis en évidence grâce à la confrontation du cercle des corrélations et du plan factoriel. Il ne doit pas être indiqué au logiciel par l'opérateur. L'expertise de celui-ci, dans la confrontation de toutes les réponses, guide le diagnostic. ✓ Application pertinente envisageable avec une batterie réduite (réponses cellulaires + un indice physiologique, par exemple) ✓ La représentation graphique conserve les informations sur les réponses individuelles des biomarqueurs ✓ Modifications assez réduites de la structure globale de l'ACP et du pouvoir discriminatif en cas d'ajout de paramètres redondants [7]	✓ Mise en œuvre et lecture nécessitant une certaine expérience ✓ Le nombre d'observations (= nombre de lignes de données, de type date x station) doit être assez supérieur au nombre de variables (=nombre de colonnes ; variables biologiques, voire physico-chimiques), avec toutefois la possibilité de bâtir l'ACP sur les variables les plus importantes et de faire figurer les autres comme variables illustratives ✓ La matrice doit être complète : si une modalité est manquante, les modalités liées ne peuvent figurer dans l'analyse (par ex. l'absence de données pour une date sur une seule des stations entraîne l'impossibilité de faire figurer la date dans toute l'analyse) ✓ L'interprétation de la position des biomarqueurs sur le cercle des corrélations peut être complexe et donne très peu d'informations fiables d'ordre biologique
IBR	✓ Mise en œuvre aisée ✓ Lecture facile ✓ Possibilité de comparer les valeurs d'indices entre expérimentations différentes <u>à condition que l'indice soit calculé de façon identique (même biomarqueurs, même ordre)</u> ✓ Une valeur par modalité (temps x date) ✓ La représentation graphique conserve les informations sur les réponses individuelles des biomarqueurs, dont l'examen est toutefois facultatif ✓ Possibilité de représenter et de confronter les diagrammes en radar inter-sites des contaminants biodisponibles à celui de l'IBR (Damiens *et al.*, 2007)	✓ Influence potentiellement déterminante de l'ordre des biomarqueurs sur la valeur de l'IBR ✓ Impossibilité d'application de l'IBR sans aucun a priori sur le gradient de stress dans le cas d'un caractère fluctuant des types de réponses (inhibition ou activation possibles pour un même biomarqueur) ✓ Surestimation du stress en cas de redondance des réponses intégrées à l'IBR ✓ Pas d'échelle absolue des valeurs de l'IBR, forte variabilité saisonnière
Système Expert DiSAV : analyse *a priori*, avant essai d'adaptation	✓ Utilisable par les gestionnaires de l'environnement ✓ Prise en compte des différents niveaux de l'organisation biologique pour une réelle évaluation du risque ✓ Système pouvant être enrichi par de nouveaux biomarqueurs, à condition de renseigner le niveau d'organisation, la signification biologique de la réponse et le type de profil ✓ Echelle d'état de santé fixe et universelle, de A à E	✓ Fixisme du profil de réponse des biomarqueurs ✓ Le nombre de biomarqueurs entrant dans chacune des catégories (cellulaire, tissulaire, individuel) doit être suffisant, et équilibré entre catégories ✓ Pas d'intégration parallèle des données physico-chimiques ✓ Quasiment aucune information sur les réponses individuelles n'est apparente[8] ✓ Surestimation des effets en cas de redondance des biomarqueurs

[7] Vérification effectuée sur l'ACP des données moyennes ECODYN 2004 (ajout de Vv_L, S_L/V_L et Nv_L) : la significativité de l'effet spatial augmente assez lentement (de p = 0,2030 à p = 0,1163, malgré trois ajouts)

[8] Les seules indications fournies par le système concernent la possible exposition aux métaux lourds ou à des contaminants organiques en cas de réponse positive des métallothionéines ou de l'activité AChE

Ces avantages et inconvénients des trois approches sont résumés dans la figure III.2.12.

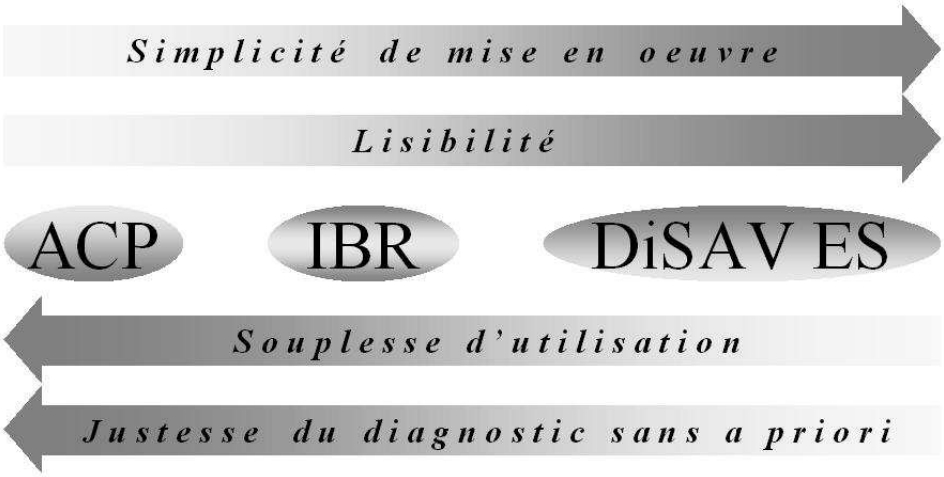


Figure. III.2.12. Comparaison synthétique des trois outils d'intégration de la réponse de la batterie de biomarqueurs chez les organismes dulçaquicoles.

Ainsi, ces outils d'intégration de la réponse de la batterie de biomarqueurs présentent tous trois un intérêt non négligeable, tels qu'ils ont été appliqués (ou, dans le cas du système expert, tel qu'il serait utilisé, une fois adapté à *D. polymorpha*, sans modification majeure du principe). Le choix de l'un ou l'autre pourrait se faire en fonction de l'objectif.

Désire t'on effectuer un diagnostic simple et rapide en se contentant de rentrer des données dans un logiciel qui compile le tout ? Le système expert pourrait alors s'avérer l'outil de choix. En revanche, une fois la note attribuée, toute information fine sur le détail des atteintes individuelles est perdue. Tel qu'il est conçu, le DiSAV ES entraîne, en outre, un risque important de diagnostic erroné, dans le cas de profils mouvants des biomarqueurs.

Préfère t'on un diagnostic plus fin, pouvant intégrer des paramètres physico-chimiques, et qui évite un maximum le risque d'interprétation erronée (ce qui demeure le critère le plus important) ? L'ACP semble alors l'outil idéal parmi les trois. Elle nécessite, en revanche, un niveau d'expertise bien plus poussé.

Enfin, une situation intermédiaire est offerte par l'application de l'IBR.

Pour approcher une réelle évaluation du risque environnemental, aucun de ces trois outils ne dispense l'opérateur de composer une batterie de biomarqueurs équilibrée (évitant les redondances) et, dans la mesure du possible, suffisamment complète :

- représentation de différents niveaux de l'organisation biologique,
- recherche d'un éventail d'atteintes toxiques ou de réponses d'alerte au niveau des principaux systèmes ou structures cibles (ADN, glande digestive, système neuroendocrinien, système immunitaire, membranes…),
- aide au diagnostic par la prise en compte de différents types de biomarqueurs (stress général, exposition ou effets de catégories spécifiques de contaminants…).

L'étape suivante consistera à déployer ces outils chez différentes espèces sentinelles en parallèle (notamment pour les raisons invoquées dans le point 1.2.4. de l'introduction, relatif aux intérêts de l'approche multi-espèce).

CHAPITRE IV.

DISCUSSION GENERALE

Chapitre IV.
DISCUSSION GENERALE

1 ELEMENTS DE REPONSE AUX TROIS GRANDS OBJECTIFS

1.1 PERTINENCE DANS LA MISE EN EVIDENCE DE CONTAMINATIONS

Dans quelle mesure les réponses des biomarqueurs cellulaires et physiologiques étudiés dans ces travaux permettent-elles de mettre en évidence la présence ou l'effet de polluants ?

Il s'agit de la question générale et introductive, qui englobe toutes les interrogations orientant cet axe de recherche. Explorons-les successivement.

- **Existe-t-il différents types de réponses au stress en général, chez les organismes étudiés ?**

Nous avons bien mis en évidence des gonflements lysosomaux, décrits comme un biomarqueur de stress général, des accumulations de lipofuscines, notamment dans des situations où les facteurs prooxydants étaient très présents (AOX et cuivre dans les effluents papetiers), et des augmentations de la taille et/ou du nombre des peroxysomes dans les tissus digestifs des organismes étudiés.

Néanmoins, d'autres types de réponses se sont également exprimés lorsque croissait le niveau de contamination environnementale. Il s'agit, tout d'abord, de diminutions du volume global du système lysosomal, avec des lysosomes généralement plus petits et plus nombreux (chez les gammares de l'étude saisonnière, les dreissènes du programme ECODYN et les lymnées exposées à l'agral). Dans certains cas, ce type de réponse était accompagné par une

absence d'accumulation de lipofuscines, alors même qu'elle avait lieu aux sites les moins anthropisés (voir article 2 sur l'expérimentation ECODYN n°1, après 3 jours).

La structure du système peroxysomal ne répond pas systématiquement au stress, mais nous n'avons constaté aucune réponse inverse aux proliférations (c'est-à-dire aucune diminution importante de la proportion de surface peroxysomale le long d'un gradient de stress).

Les réponses les plus souvent décrites dans la littérature veulent que les lipides neutres insaturés s'accumulent généralement dans chez les organismes aquatiques exposés à des contaminants organiques (Köhler, 1991 ; Au *et al.*, 1999 ; Fåhraeus-Van Ree & Payne, 1999) ou à des situations de contamination multiples (Moore, 1988b ; Krishnakumar *et al.*, 1994 ; Petrovic *et al.*, 2004). Bien au contraire, notre équipe a mis en évidence, dans la majorité des expérimentations, des déplétions de lipides neutres insaturés, parfois très sévères.

Les seules exceptions notables concernent les gammares vivant à proximité de la centrale électronucléaire de Cattenom, qui présentaient des contenus cellulaires en lipides neutres généralement plus élevés sur la retenue du Mirgenbach (station ②) que dans la Moselle (stations ① et ③), ainsi qu'une augmentation chez cette même espèce transférée pendant 21 jours sur le Ton à l'amont (+ 15 %) et à l'aval (+ 70 %) de l'effluent d'une usine de pâte à papier blanchissant au chlore (travaux de thèse de Karine Ledy).

Dans ces deux situations, tous les mollusques étudiés en parallèle montraient une déplétion en lipides. Ainsi, il existe bien différents types de réponses des contenus tissulaires digestifs en lipides neutres insaturés, mais ce sont les facteurs inhérents à la physiologie propre des espèces qui semblent principalement à l'origine de ce phénomène.

Nous ne pouvons pas trancher, dans l'état actuel de nos connaissances, sur la coexistence des deux types de réponse (accumulations pathologiques et déplétions) au sein d'une même espèce, suggérée par les résultats obtenus chez les corbicules vivant à l'amont de la confluence de la Fensch avec la Moselle et transférées à l'aval pour 15 jours (voir § III.B.3), ainsi que chez les dreissènes soumises, au laboratoire, à l'eau de la Fensch (voir § III.B.4.2). Cependant, des bioessais supplémentaires, en conditions trophiques contrôlées sont indispensables pour en savoir d'avantage sur la question.

- **Existe-t-il des schémas de réponses différents selon les classes de polluants ?**

- ***Profils de réponse du système lysosomal selon le type de contamination***

Comme l'ont montré l'étude saisonnière à long terme et des bioessais sur les effets du cuivre ou du cadmium chez la dreissène (Ledy, 2002 ; Giamberini & Cajaraville, 2005) ; voir tableau I.2), les réponses du système lysosomal à une contamination métallique correspondent plutôt à un gonflement lysosomal et donc à un profil croissant de Vv_L et Sv_L. A l'inverse, la contamination multiple de la Fensch, caractérisée par des niveaux élevés en contaminants organiques, et notamment en HAP, induit un profil décroissant de Vv_L et Sv_L. Or, le benzo[a]pyrène (500 $\mu g.L^{-1}$) et la fraction solubilisée d'un pétrole brut (à hauteur de 5 % du volume d'eau de mer) provoquent des réponses à évolution complexe dans le temps (21 jours d'étude au total) chez la moule marine *M. galloprovincialis* (Marigómez & Baybay-Villacorta, 2003). Il s'agit d'une succession complexe de phases de gonflement et de diminution de la taille des lysosomes. Dans le cadre des expérimentations *in situ* du programme ECODYN, nous n'avons montré aucun gonflement lysosomal, mais il se peut que la fenêtre temporelle de mesure n'ait pas permis de mettre en évidence une telle alternance.

A ce stade des connaissances acquises sur les effets du stress sur le système lysosomal digestif des invertébrés dulçaquicoles, il apparaît nécessaire de mettre en œuvre des bioessais destinés à mieux cerner les profils des réponses cellulaires aux majeures classes de contaminants en conditions réalistes, en commençant par les HAP. Les interactions entre substances aux effets différents (par exemple, métaux et HAP) appliqués en mélange mériteraient également d'être explorées pour pouvoir affiner les diagnostics *in situ*.

- ***Différents profils de réponses des lipides neutres insaturés aux diverses classes de contaminants ?***

La majeure part de nos investigations a concerné les mollusques, chez lesquels la déplétion semble être la principale réponse générale de stress. Néanmoins, une accumulation, réponse plus rare et plus spécifique à certaines classes de contaminants organiques, est susceptible d'être rencontrée. C'est ce que peuvent suggérer les expositions des corbicules à l'aval de la confluence avec la Fensch et les expositions en laboratoire de la dreissène à l'eau des sites M1 et F. En l'absence de contrôle des apports trophiques, il est difficile de trancher sur l'origine de ces niveaux en lipides plus élevés. Proviennent-ils d'une perturbation du métabolisme lipidique liée aux contaminants organiques (HAP) ou d'une quantité supérieure

de matières en suspension susceptible d'augmenter les apports nutritifs des bivalves filtreurs ? Dans le cas des dreissènes, nous avons préféré privilégier l'hypothèse trophique (voir la discussion du Chapitre III.B.4). Chez les corbicules, l'absence de contrôle des apports alimentaires nous empêche totalement de conclure (voir le § III.B.3).

- ***Spécificité de la réponse du système peroxysomal ?***

La réponse de ce biomarqueur était sans équivoque chez les invertébrés soumis à un stress oxydatif important après transfert à l'aval des rejets des deux usines de l'industrie papetière (voir le tableau III.2.5, l'article 4 et la thèse de Karine Ledy (2002)). Dans le cas de l'étude saisonnière à long terme, ce biomarqueur a moins clairement répondu, et l'augmentation globale du volume peroxysomal semble être un marqueur spécifique de stress oxydatif chez les mollusques dulçaquicoles étudiés.

- **Le degré de réponse reflète t-il le gradient de contamination ?**

Dans la plupart des expérimentations réalisées au sein de l'équipe, les réponses considérées individuellement et/ou de façon intégrée (ACP et IBR) se sont exprimées de façon plus prononcée le long du gradient de contamination dans le cas des expérimentations *in situ* (effluents papetiers, proximité de la centrale électronucléaire, abords de la confluence de la Fensch avec la Moselle). Elles s'étaient également montrées dépendantes de la concentration lors de précédentes intoxications aux métaux (Ledy, 2002 ; Giamberini & Cajaraville, 2005).

Cela se traduit, *in situ*, par des corrélations entre les paramètres stéréologiques et les concentrations en contaminants. Des corrélations positives ont été montrées entre les concentrations en cuivre dans l'eau ou les tissus des dreissènes et le gonflement lysosomal (étude saisonnière, article 1, et bioessai chez la dreissène, Ledy, 2002). Dans le second cas, la teneur corporelle en cuivre a également augmenté parallèlement avec l'accumulation de lipofuscines, la déplétion des lipides et l'accroissement de surface peroxysomale. Dans les situations où le profil de la réponse lysosomale est inversé (programme ECODYN), les corrélations sont mises en évidence entre les teneurs corporelles en métaux, voire en HAP, et la diminution du volume lysosomal. En revanche, les concentrations de la plupart des contaminants sont toujours corrélées avec les déplétions de lipides neutres et les accumulations de lipofuscines (plomb, zinc et HAP).

Dans le cas de la réponse du système peroxysomal le manque occasionnel de reflet du degré de contamination *in situ* semble tout simplement résider dans sa spécificité. En l'absence de stress oxydant prononcé, les variations de structure de ces organites ne reflètent pas nécessairement le gradient de contamination et peuvent être en relation avec les autres rôles physiologiques de ce système.

Au cours des expositions des lymnées aux deux herbicides et à l'adjuvant, aucune corrélation des modifications de la structure lysosomale digestive n'a été mise en évidence avec l'augmentation progressive des concentrations. Visuellement, cette absence de relation linéaire est d'ailleurs générale à l'ensemble des mesures biologiques effectuées dans le cadre du programme CEREMEL. L'interaction entre temps d'exposition et concentration de substance peut être à l'origine de ce phénomène. Lorsque certains des événements de la cascade d'effets se produisent de façon plus ou moins fugace et précoce en fonction du degré de contamination, ils peuvent décaler le cadre de lecture de la totalité des événements suivants. Si ce type de décalage survient au début de la chaîne d'effets, il se peut qu'aucune relation linéaire entre effets et concentrations ne soit mise en évidence, malgré le faisceau d'indices désignant un syndrome de stress lié au traitement.

- **Quels sont les biomarqueurs les plus pertinents ?**

La dreissène est l'espèce pour laquelle nous disposons de la plus grande quantité de données.

Le biomarqueur le plus précoce, qui initie l'augmentation de l'IBR dès trois jours et s'exprime généralement pleinement après deux semaines d'exposition, est le **gonflement lysosomal**. De plus, ce type de réponse du système lysosomal est incontestablement la réponse la plus déterminante à moyen terme pour la mise en évidence du stress par chacune des deux méthodes intégratives (études d'une durée comprise entre 21 et 90 jours).

Dans le cas de l'ACP, la diminution de la proportion volumique lysosomale est aussi la réponse la plus pertinente pour mettre en évidence le gradient. En examinant les coordonnées moyennes de Sv_L ou Vv_L pour le calcul de l'IBR, ce **profil décroissant du système lysosomal** arrive en première position, ex aequo avec la déplétion en lipides neutres.

A long terme, les deux biomarqueurs les plus pertinents pour la mise en évidence du gradient de contamination chez *D. polymorpha* sont également le **gonflement lysosomal** et la **déplétion en lipides neutres insaturés**.

La **déplétion en lipides neutres** répond bien dès trois jours dans le cadre des expérimentations ECODYN et à partir de deux semaines d'exposition pour les études des effluents papetiers. Ce biomarqueur représente, par ailleurs, le type de réponse le plus constant que nous ayons mis en évidence chez les mollusques, au sein de l'équipe, depuis son adaptation aux organismes dulçaquicoles durant la thèse de Karine Ledy. Son inconvénient majeur réside dans la forte variabilité au sein d'un même groupe expérimental (puisque le coefficient de variation moyen calculé à partir de la base de données atteint 64 % !). Cela induit parfois un manque de significativité des réponses, bien qu'elles reflètent généralement le profil spatial de façon fidèle et précoce. Vraisemblablement, cette variabilité est en grande partie due à des différences liées au sexe ; nous avons effectivement observé des quantités de lipides neutres insaturés nettement supérieures chez les mâles exposés aux abords de la confluence avec la Fensch en juin-juillet 2004. Ces différences proviennent certainement d'un métabolisme énergétique propre à chaque sexe en période de gamétogenèse tardive ou de ponte, mais peuvent également être liées à une désynchronisation pathologique de la reproduction entre mâles et femelles. Il est impossible de déterminer le sexe des dreissènes vivantes et de les trier en conséquence avant exposition. Ponctuellement, un sexe-ratio plus ou moins déséquilibré selon les groupes peut donc diminuer fortement la pertinence de ce biomarqueur cellulaire.

Dans la hiérarchie de la pertinence des réponses individuelles vient ensuite l'**accumulation de lipofuscines**. Les ACP comme les IBR montrent que la contribution de cette réponse à la discrimination du gradient de contamination est plus tardive (autour de deux à trois semaines d'exposition) et moins importante (coordonnées plus éloignées de celles du gradient ou plus faibles, respectivement). Dans le cas de l'expérimentation ECODYN 2004, l'accumulation de lipofuscines ne contribue pas à la définition du gradient, en raison de l'effet retardé de la lipoperoxydation chez les dreissènes mises en dépuration après un séjour de 15 jours sur la Fensch.

Au cours des études aux abords des effluents papetiers, l'apport de **l'augmentation globale de la surface peroxysomale** à la pertinence de la batterie constitue la réponse la plus tardive : initiée à 14 jours, elle s'exprime pleinement à 21 jours et constitue, à ce stade uniquement, la réponse la plus discriminative entre sites.

En revanche, les variations de structure du système peroxysomal sont de trop faible amplitude et insuffisamment liées au gradient spatial pour être responsables d'une part importante de la pertinence de la batterie dans le contexte de l'étude à long terme des abords de la centrale.

- **Les démarches de biosurveillance active et passive sont-elles toutes deux pertinentes ?**

L'intégration des données par ACP ou calcul de l'IBR montre que ces deux approches sont pertinentes pour la mise en évidence d'un gradient de contamination au cours d'une étude saisonnière à long terme. L'ACP en conditions homogènes et l'IBR montrent que le pouvoir discriminatif entre sites est légèrement supérieur à travers l'approche passive. Néanmoins, cette tendance s'inverse lorsqu'un maximum de données est pris en compte. Or, la possibilité de disposer de données les plus complètes possibles fait également partie des critères qui peuvent guider le choix vers l'une ou l'autre des approches. En l'occurrence, le trio de stations était plus souvent représenté de concert à travers l'approche active (encagement).

1.2 SAISONNALITE, NIVEAUX DE BASE ET INFLUENCE D'AUTRES FACTEURS

- **Reproductibilité et niveaux de base saisonniers…**

L'étude de la suite composée de quatre biomarqueurs cellulaires et d'un biomarqueur physiologique sur un même site durant deux années consécutives n'a montré ni valeurs saisonnières constantes, ni même de profil saisonnier bien établi, à l'exception toutefois des quantités en lipides neutres insaturés, croissantes en fin d'hiver et maximales au printemps. L'absence de niveaux de base pour chacun des biomarqueurs étudiés ne permet donc pas la définition de valeurs de référence saisonnière.

Pourtant, les études de surveillance spatio-temporelle de tendances (cf. den Besten *et al.*, 2001) réalisées durant ces travaux de thèse ont bien montré la pertinence de cette approche en l'absence de niveaux de base car elles incluaient une site de « référence relative ».

En revanche, dans le cadre d'un dépistage à large échelle sur des hydrosystèmes différents, qui drainent par exemple des bassins versants aux propriétés géologiques très variables, la question du choix du site dit « de référence » devient nettement plus problématique. Les micropolluants ne sont pas les seuls facteurs responsables des fluctuations des réponses cellulaires. Les paramètres physico-chimiques de l'eau influencent également la structure des compartiments et contenus cellulaires étudiés. Il est donc très hasardeux de comparer les valeurs absolues trouvées aux diverses stations et d'attribuer les différences aux seules variations du degré de contamination. Une piste à envisager peut résider dans une tentative de modélisation des données biologiques (biomarqueurs individuels ou indice intégratif de type IBR) en fonction des paramètres environnementaux disponibles les plus pertinents (par exemple par régression multiple). Nous pourrions alors utiliser ce modèle pour identifier l'écart attribuable à un stress supplémentaire (contamination), par rapport à une situation idéale dans le contexte physico-chimique donné. Néanmoins, cela nécessite un considérable corpus de données, dont nous ne disposons pas pour le moment.

En l'absence de site et de modèle « de référence », il est alors nécessaire de se concentrer sur les différences par rapport à une référence temporelle (jour de transfert) qui montrent malheureusement un plus faible pouvoir de discrimination entre sites (voir le tableau III.2.5).

- **Existe-t-il des périodes critiques pour l'application de la suite de biomarqueurs ?**

La comparaison des IBR mensuels deux à deux, sur les stations ① et ② de l'étude saisonnière, montre que le diagnostic de stress « ① < ② » est rarement erroné (3 ou 4 mois sur 18 chez les dreissènes natives et transférées respectivement). Ces moments correspondent à la période de la ponte (IG proche de 5) ou lui succèdent (chute brutale de l'IG) en Moselle, tandis que la reproduction se trouve décalée chez les dreissènes de la retenue.

Le coût énergétique de la reproduction étant considérable chez les bivalves, la période encadrant de près la ponte ne constitue pas le meilleur moment pour une application pertinente de la batterie de biomarqueurs si la reproduction des animaux n'est pas synchrone entre sites. Le problème se pose surtout dans un contexte de biosurveillance passive ou de biosurveillance active sur plusieurs mois. En cas de biosurveillance active de durée réduite, la synchronisation de la reproduction réduit ce biais.

- **Quels facteurs environnementaux exercent une influence majeure ?**

Parmi les facteurs environnementaux surveillés, celui qui semble exercer l'influence la plus notable sur un biomarqueur est le taux de chlorophylle a dans l'eau, dont la corrélation positive systématique avec les lipides neutres insaturés des dreissènes évoque l'origine alimentaire principale des triglycérides corporels chez cette espèce. Parmi les autres corrélations mises en évidence (par exemple, entre le pH et Sv_L), il est difficile de voir un lien étiologique entre le facteur environnemental et le biomarqueur ; il pourrait s'agir de simples concomittances ou d'une dépendance commune à un autre facteur, non mesuré.

1.3 VALEUR PREDICTIVE, ECHELLE DES REPONSES, REVERSIBILITE

- **Liens entre les effets mesurés aux niveaux sub-cellulaire et individuel et succession temporelle…**

Dans le cadre du programme ECODYN, les résultats voient se succéder une déplétion précoce en lipides neutres (3 jours), suivie de diminutions de l'indice de condition et d'une mortalité croissante (15 jours). Les premières manifestations de la structure du système lysosomal et du contenu tissulaire en lipofuscines surviennent également entre le premier et le troisième jour. Mais les profils de réponse décroissants de ces deux marqueurs, qui finissent ensuite par s'imposer, ne sont pas mis en évidence avant les réponses au niveau supérieur d'organisation biologique qu'est l'individu.

Ainsi, si les réponses cellulaires au stress peuvent être reliées à des effets au niveau individuel, seuls les profils de réponse les plus basiques (déplétion lipidique, gonflement lysosomal…) précèdent réellement ces effets dans le temps. Les autres types de réponse peuvent être trop complexes et pluriphasiques pour pouvoir être identifiés plus précocement.

- **Est-il possible d'identifier des seuils de compensation et de réversibilité ?**

Les premières données dont nous disposions, acquises au cours de l'étude ECODYN (figure IV.1), montrent qu'une déplétion des quantités de lipides neutres insaturés s'amorce d'autant plus précocément que la contamination est forte. En début d'exposition, ces contenus cellulaires sont même susceptibles d'augmenter aux stations moyennement contaminées (courbes bleue et verte).

Dans le cas le plus sévère, lorsque la déplétion initiale atteint 75 % dès le troisième jour d'exposition (courbes oranges), le transfert de dépuration ne s'oppose pas à une poursuite irréversible et fatale du phénomène d'épuisement des réserves (flèche, indiquant une mortalité massive). Aux stations moins anthropisées, la diminution des contenus en lipides neutres est plus ou moins fortement compensée par une période de dépuration de 15 jours, selon le degré de contamination initial, mais sans restauration des valeurs initiales.

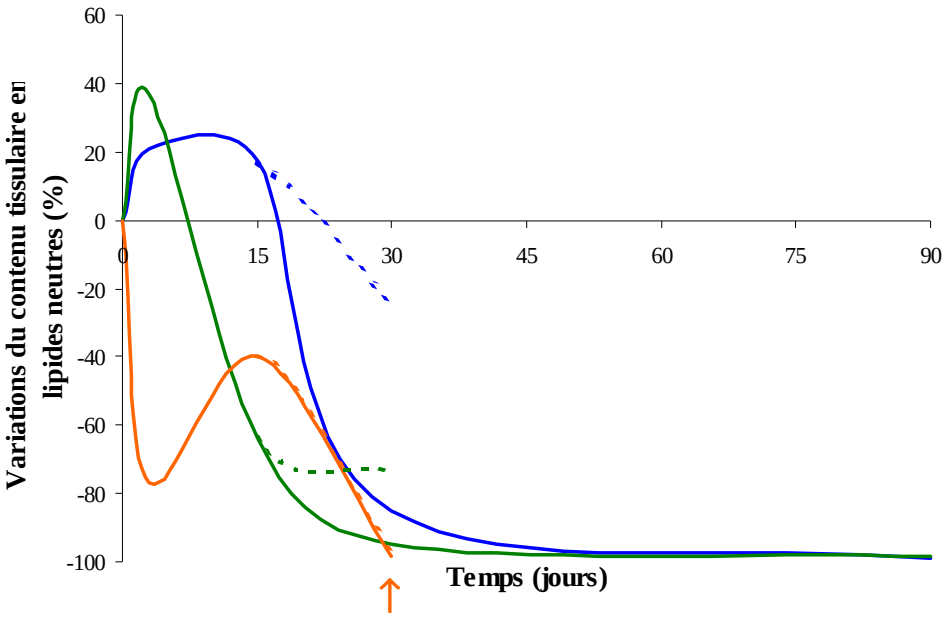


Figure IV.1. Influence d'une période de dépuration de 15 jours sur le contenu en lipides neutres insaturés dans les tissus digestifs des dreissènes de l'étude ECODYN 2004. Les pointillés figurent la réponse durant la dépuration. Les courbes bleue, verte et orange désignent respectivement les réponses des moules transférées sur les stations M1, M2 et F (construites à partir de n = 6-8 données à 3, 15, 30 et 90 jours).

Les données qui concernent les autres biomarqueurs étudiés dans le cadre de cette étude n'ont pas permis de montrer une quelconque réversibilité des profils de réponse.

2 PROPOSITIONS POUR DES APPLICATIONS FUTURES DE LA BATTERIE DE BIOMARQUEURS

2.1 AMELIORATIONS INDIVIDUELLES DES BIOMARQUEURS : LE CAS DES LIPOFUSCINES

- ***Amélioration technique***

Une amélioration technique envisageable, pour distinguer les lipofuscines correctement dans les tissus riches en granules minéraux (*Lymnaea stagnalis*), consisterait à exploiter leur autofluorescence[9].

- ***Démarche expérimentale et interprétation***

A l'exception des résultats obtenus à l'aval des effluents de l'industrie papetière (Ledy, 2002 ; Guerlet *et al.*, 2006), le biomarqueur « accumulation de lipofuscines », appliqué et interprété de façon traditionnelle, s'est rarement avéré très pertinent pour la mise en évidence des gradients de contamination, au cours de nos expérimentations.

Néanmoins, trois résultats singuliers, obtenus par notre équipe chez *D. polymorpha*, attirent l'attention :

- Lors d'une intoxication au cuivre d'une durée de 30 jours, aucune accumulation de lipofuscines n'a été constatée durant cette période ; en revanche, ces pigments tendaient à s'accumuler en période de post-intoxication (30 jours de dépuration), chez les moules précédemment exposées aux deux plus fortes concentrations (20 et 40 $\mu g.L^{-1}$) (Ledy, 2002).
- Une très importante accumulation de lipofuscines a été constatée chez les dreissènes transférées au site le moins contaminé lors de l'expérimentation n°1 du programme ECODYN (article 3) ; or, ces moules provenaient du port de plaisance de la retenue de la Madine, référence toute relative puisqu'il s'est avéré que les concentrations corporelles en HAP étaient plus élevées au début de l'expérimentation (c'est-à-dire après 7 jours de stabulation au laboratoire dans l'eau de la Madine) et les niveaux en

[9] Les longueurs d'onde idéales sur lesquelles travailler restent à déterminer ; dans les cellules épithéliales rétiniennes humaines, par exemple, le spectre d'émission des lipofuscines se situe entre 540 et 655 nm, après excitation à des longueurs d'ondes de 364, 488, 568 et 633 nm (Marmorstein *et al.*, 2002).

métaux étaient du même ordre de grandeur que chez les moules du site M1, le moins contaminé du gradient testé ;

- Au cours de cette dernière étude, ce sont les moules remises en dépuration à la Madine après un séjour de deux semaines au site le plus anthropisé (Fensch) qui ont montré des niveaux plus élevés de lipofuscines que les groupes expérimentaux provenant de la Moselle, alors qu'aucune différence entre les trois sites n'était visible en cours d'exposition.

Une accumulation de lipofuscines en post-intoxication avait également été montrée après trois jours de dépuration chez des gastéropodes marins précédemment exposés au phénanthrène (Pipe & Moore, 1986).

Toutes ces données suggèrent qu'une autre façon d'appréhender l'accumulation de lipofuscines pourrait se révéler bien plus pertinente qu'elle ne l'est aujourd'hui. Certaines situations permettront de mesurer une accumulation de lipofuscines proportionnelle à la lipoperoxydation subie en cours d'exposition. En revanche, une absence d'accumulation de lipofuscines ne signifie pas que les conditions d'exposition n'ont pas induit de lipoperoxydation, il peut s'agir au contraire d'une inhibition de leur formation (inhibition de l'autophagie lysosomale ?) ou d'un effet tardif. Afin de distinguer les degrés de contamination en absence d'accumulation, nous proposons une mise en dépuration des organismes après exposition et un diagnostic selon le principe exposé dans la figure IV.1.

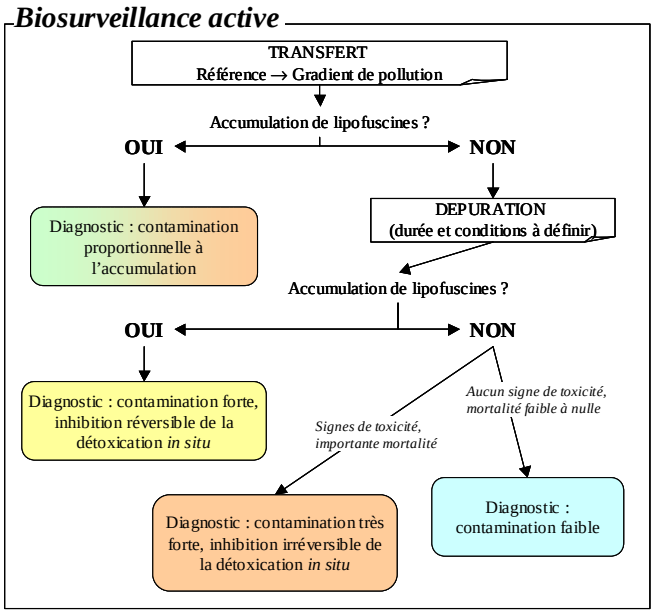


Figure IV.2. Proposition d'un arbre de décision pour l'utilisation des lipofuscines comme biomarqueur de détoxication des effets de la lipoperoxydation.

2.2 QUELLES REPONSES PROPOSER EN PRIORITE ?

Bien évidemment pour une application très concrète en évaluation des risques, les réponses étudiées au cours de ces travaux ne constituent pas à elles-seules une batterie idéale. Broeg et Lehtonen (2006) recommandent de privilégier les biomarqueurs de stress général et de limiter le nombre de biomarqueurs spécifiques dans une batterie étudiée de façon intégrative, pour éviter une surestimation du risque liée à d'éventuelles redondances.

Si nous ne devions proposer qu'une ou deux réponses devant figurer dans la batterie idéale, il s'agirait de l'étude de la structure du système lysosomal, comme biomarqueur de turn-over cellulaire et du contenu tissulaire en lipides neutres insaturés comme biomarqueur de statut énergétique et de disponibilité des ressources. Ces deux biomarqueurs présentent l'intérêt de figurer sur une sorte de « plate-forme centrale de redistribution » d'énergie et de matière première (acides aminés, glucides simples pour la glycosylation, acides gras), ce qui les implique dans une majorité de réponses au stress général. Il semble donc très judicieux de tenir compte des modifications de ces organites et contenu cellulaires sous cette forme ou une forme proche (stabilité lysosomale, modèles bioénergétiques…) dans la batterie de biomarqueurs éligible d'un système expert pertinent.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Ces dernières années, les premières conceptions de « l'approche biomarqueurs » ont été progressivement enrichies par de nouveaux points de vue, de nouveaux concepts. La généralisation des approches de type multimarqueur, notamment, « redonne du souffle » à cette pratique, et permet de contourner les impasses de l'inéligibilité systématique des réponses étudiées au statut de biomarqueur idéal et universel. Chacune des réponses individuelles a montré de fortes potentialités, mais également ses limites. Les deux outils d'intégration des données testés (ACP et IBR) se sont avérés très performants pour une mise en évidence de plusieurs gradients de stress et ont repoussé ces limites. Grâce à leur utilisation, une trame se tisse et le sens jaillit de la forêt de données. A travers la vision plus globale et synthétique qu'ils apportent, un syndrome de stress peut se révéler plus facile à identifier, alors que l'analyse trop cloisonnée de chaque réponse individuelle ne soulève parfois que de nouvelles questions… certes très intéressantes d'un point de vue fondamental, mais qui peuvent s'avérer limitatives dans une démarche appliquée.

De telles approches intégratives sont à présent disponibles à différents degrés d'expertise et de précision. Cette flexibilité offre des perspectives d'application des suites de biomarqueurs encore plus vastes qu'elles ne l'étaient jusqu'ici. Ainsi, leur contribution pourra s'étendre depuis l'analyse intégrée des facteurs et mécanismes impliqués dans un syndrome de stress dans une situation bien ciblée, jusqu'à des études de biosurveillance de routine réalisées par les gestionnaires de l'environnement.

Mais il reste encore de nombreuses connaissances à acquérir sur la batterie de biomarqueurs mise en œuvre dans ces travaux. Avec le recul, les réponses cellulaires au stress semblent malheureusement moins stéréotypées et balisées qu'on ne les imaginait au départ. La nécessité d'encore mieux appréhender leur sens biologique et leurs implications à d'autres niveaux d'intégration semble impérative. Dans cette quête de la compréhension de la biocomplexité, chère au Pr. M. N. Moore (Moore *et al.*, 2004), le travail de collaboration s'avère, plus que jamais, nécessaire et porteur de perspectives passionnantes…

Dans l'optique de compléter les connaissances sur ces outils et de les appliquer au mieux, un certain nombre de perspectives est envisageable, à plus ou moins longue échéance. Il serait nécessaire de :

- poursuivre la construction et l'exploitation de la base de données ;
- adapter le système expert DiSAV à *D. polymorpha* dans un premier temps, puis chez les autres espèces dulçaquicoles traditionnellement étudiées au sein du laboratoire ;
- compléter la batterie de biomarqueurs cellulaires par l'étude de la stabilité lysosomale ;
- mettre en place une approche mécanistique pour identifier et expliquer les profils de réponses aux contaminants organiques, prioritairement de type HAP ;
- engager une approche mécanistique de l'accumulation de lipofuscines en phase de dépuration, afin de vérifier s'il s'agit d'une inhibition, d'un effet tardif ou plutôt d'une coexistence des deux phénomènes ;
- poursuivre l'étude de la réversibilité des réponses individuelles et identifier des seuils d'alertes pour la batterie de biomarqueurs cellulaires tout entière en mettant en relation les écarts de l'IBR (par rapport à une référence temporelle ou spatiale) avec le degré de réponse d'un indicateur de dépassement des seuils de compensation (stress on stress, par exemple) ;
- modéliser de façon simple la réponse aux métaux et aux HAP en fonction de la concentration et du temps ;
- complexifier, la modélisation en intégrant d'autres variables environnementales et/ou biotiques (statut reproducteur, parasitisme…) ;
- et enfin, réaliser des surveillances spatio-temporelles des tendances intégrant à la fois la présente batterie de biomarqueurs et des indicateurs à l'échelle populationnelle et communautaire, en encadrant une modification environnementale dans le temps (nouveau rejet domestique ou industriel, ou au contraire action de remédiation). Cette démarche permettra d'identifier, à terme, les profils de réponse de la batterie dont la valeur pronostique deviendra alors très concrète et avérée (« tels type de profil et degré de réponse de la batterie, x jours après la modification environnementale, risque de précéder tel type d'effet à l'échelle populationnelle et/ou communautaire, à telle échéance »).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aarab, N., Mora, P., Daubèze, M. & Narbonne, J.-F. (2005) In vitro detection and quantification of testosterone metabolites in aquatic organisms. *Analytical Letters*, 38, 629-640.

Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A. & Bourdineaud, J.P. (2004) Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquatic Toxicology*, 67, 347-357.

Achard-Joris, M., Gonzalez, P., Marie, V., Baudrimont, M. & Bourdineaud, J.-P. (2006) Cytochrome *c* oxydase subunit gene is up-regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves. *BioMetals*, 19, 237-244.

Agences de l'eau (2000) Système d'Evaluation de la Qualité de l'eau des cours d'eau. S.E.Q. eau, version 1. Principes généraux. In Les études des Agences de l'Eau, Vol. 64, pp. 27.

Allen, J.I. & Moore, M.N. (2004) Environmental prognostics: Is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk assessment? *Marine Environmental Research*, 58, 227-232.

Alzieu, C. (2000) Impact of tributyltin on marine invertebrates. *Ecotoxicology*, 9, 71-76.

Amiard, J.C. (1994) Surveillance de la qualité des milieux aquatiques par les biomarqueurs. *IREPOLIA, La Chronique*, 9, 2.

Amiard, J.C., Caquet, T. & Lagadic, L. (1998). Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. In Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement (eds L. Lagadic, T. Caquet, J.C. Amiard & F. Ramade), pp. XXI-XXXI. Lavoisier, Paris.

Amiard-Triquet, C., Altman, S., Amiard, J.C., Ballan-Dufrancais, C., Baumard, P., Budzinski, H., Crouzet, C., Garrigues, P., His, E., Jeantet, A.Y., Menastria, R., Mora, P., Mouneyrac, C., Narbonne, J.F. & Pavillon, J.F. (1998) Fate and effects of micropollutants in the Gironde estuary, France : a multidisciplinary approach. *Hydrobiologia*, 373-374, 259-279.

Antunes, F., Cadenas, E. & Brunk, U.T. (2001) Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H2O2 is a consequence of lysosomal rupture. *The Biochemical Journal*, 356, 549-555.

Astley, K.N., Meigh, H.C., Glegg, G.A., Braven, J. & Depledge, M.H. (1999) Multi-variate Analysis of Biomarker Responses in *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas* from the Tees Estuary (UK). *Marine Pollution Bulletin*, 39, 145-154.

Au, D.W. & Wu, R.S. (2001) A field study on EROD activity and quantitative hepatocytological changes in an immature demersal fish. *Environmental Pollution*, 115, 23-32.

Au, D.W.T., Wu, R.S.S., Zhou, B.S. & Lam, P.K.S. (1999) Relationship between ultrastructural changes and EROD activities in liver of fish exposed to Benzo[a]pyrene. *Environmental Pollution*, 104, 235-247.

Axiak, V., George, J.J. & Moore, M.N. (1988) Petroleum hydrocarbons in the marine bivalve *Venus verrucosa:* accumulation and cellular responses. *Marine Biology*, 97, 225-230.

Barfield, M.L., Farris, J.F. & Black, M.C. (2001) Biomarker and bioaccumulation responses of asian clams exposed to aqueous cadmium. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 63A, 495-510.

Barrett, A.J. & Heath, M.F. (1977). Lysosomal enzymes. In Lysosomes a laboratory handbook (ed J.T. Dingle), pp. 19-127. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Basack, S.B., Oneto, M.L., Fuchs, J.S., Wood, E.J. & Kesten, E.M. (1998) Esterases of *Corbicula fluminea* as biomarkers of exposure to organophosphorus pesticides. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61, 569-576.

Baudrimont, M., Andres, S., Metivaud, J., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C. & Boudou, A. (1999) Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (River Lot, France): II. Metallothionein response to metal exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 2472-2477.

Bayne, B.L., Thompson, R.J. & Widdows, J. (1976). physiology I. In Marine mussels: their ecology and physiology (ed B.L. Bayne), pp. 121-206. Cambridge University Press, London.

Beisel, J.N. (2006) http://www.invabio.univ-metz.fr/envahisseurs2.htm.

Beisel, J.N. & Devin, S. (2006) http://www.invabio.univ-metz.fr:z_dikerogammarus_villosus.htm.

Beliaeff, B. & Burgeot, T. (2002) Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 1316-1322.

Bentley, C.B. & Hurd, H. (1995) Depressed protein and copper content of the midgut gland in an intermediate host, *Gammarus pulex* (Crustacea), infected with cystacanths of *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala). *Journal of Invertebrate Pathology*, 66, 1-5.

Beyer, J., Sandvik, M., Hylland, K., Fjeld, E., Egaas, E., Aas, E., Skare, J.U. & Goksoyr, A. (1996) Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (Platichthys flesus L.) and Atlantic cod (Gadus

morhua L.) exposed by caging to polluted sediments in Sorfjorden, Norway. *Aquatic Toxicology*, 36, 75-98.

Binelli, A., Galassi, S. & Provini, A. (2001) Factors affecting the use of *Dreissena polymorpha* as a bioindicator: the PCB pollution in Lake Como (N. Italy). *Water, Air, and Soil Pollution*, 125, 19-32.

Björkerud, S. (1964) Isolated lipofuscin granules - a survey of a new field. *Advances in Gerontology Research*, 1, 257-288.

Bocchetti, R. & Regoli, F. (2006) Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere*, 65, 913-921.

Bodin, N., Burgeot, T., Stanisiere, J.Y., Bocquene, 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*, 138C, 411-427.

Bolognesi, C., Frenzilli, G., Lasagna, C., Perrone, E. & Roggieri, P. (2004) Genotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* : wild versus caged mussels. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 552, 153-162.

Borcherding, J. (1992) Valve movement of the mussel *Dreissena polymorpha* as a monitoring system for bodies of water. *Schriftenreihe Des Vereins Fur Wasser-, Boden-Und Lufthygiene*, 89, 361-373.

Britvic, S. & Kurelec, B. (1999) The effect of inhibitors of multixenobiotic resistance mechanism on the production of mutagens by *Dreissena polymorpha* in waters spiked with premutagens. *Aquatic Toxicology*, 47, 107-116.

Broeg, K. & Lehtonen, K.K. (2006) Indices for the assessment of environmental pollution of the Baltic Sea coasts: Integrated assessment of a multi-biomarker approach. *Marine Pollution Bulletin*, 53, 508-522.

Broeg, K., Westernhagen, H.v., Zander, S., Korting, W. & Koehler, A. (2005) The "bioeffect assessment index" (BAI): A concept for the quantification of effects of marine pollution by an integrated biomarker approach. *Marine Pollution Bulletin*, 50, 495-503.

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.

Bruner, K.A., Fisher, S.W. & Landrum, P.F. (1995) The role of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, in contaminant cycling : II. Zebra mussel contaminant accumulation from algea and suspended particles, and transfer to the benthic invertebrate, *Gammarus fasciatus*. *Journal of Great Lake Research*, 20, 745-750.

Brunk, U.T. & Cadenas, E. (1988) The potential intermediate role of lysosomes in oxygen free radical pathology. Acta Pathologica, *Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 96, 3-13.

Brunk, U.T., Jones, C.B. & Sohal, R.S. (1992) A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis. *Mutation Research*, 275, 395-403.

Brunk, U.T., Zhang, H., Dalen, H. & Öllinger, K. (1995) Exposure of cells to nonlethal concentrations of hydrogen peroxide induces degeneration-repair mechanisms involving lysosomal destabilization. *Free Radical Biology and Medecine*, 19, 813-822.

Buisson, S. (2006) Niveau de contamination et effets des pesticides sur l'huître creuse, *Crassostrea gigas* dans deux secteurs de la Baie des Veys : aspects analytiques, physiologiques et histo-pathologiques. Master 2 Recherche "Ecotoxicité et Biodiversité", Université Paul Verlaine - Metz, 41.

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.

Burgeot, T. (1999) Des organismes sous stress. In Programme scientifique Seine-Aval, pp. 1-35, Rouen.

Byrne, P.A. & Halloran, J.O. (1999) Aspects of Assaying Sediment Toxicity in Irish Estuarine Ecosystems. *Marine Pollution Bulletin*, 39, 97-105.

Cajaraville, M.P., Marigomez, J.A. & Angulo, E. (1990) Short-term toxic effects of 1-naphthol on the digestive gland-gonad complex of the marine prosobranch *Littorina littorea* (L): a light microscopic study. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 19, 17-24.

Cajaraville, M.P., Diez, G., Marigomez, I.A. & Angulo, E. (1991a) Consequences of keeping *Mytilus* in the laboratory as assessed by different cellular condition indices. *Helgoländer Meeresunters*, 45, 445-464.

Cajaraville, M.P., Marigómez, J.A., Angulo, E. (1991b) Automated measurement of lysosomal structure alterations in oocytes of mussels exposed to petroleum hydrocarbons. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 21, 395-400.

Cajaraville, M.P., Volkl, A. & Fahimi, H.D. (1992) Peroxisomes in digestive gland cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Biochemical, ultrastructural and immunocytochemical characterisation. European Journal of Cell Biology, 59, 255-264.

Cajaraville, M.P., Abascal, I., Etxeberria, M. & Marigomez, I. (1995a) Lysosomes as cellular markers of environmental pollution: time- and dose-dependent responses of the digestive lysosomal system of mussels after petroleum hydrocarbon exposure. Environmental Toxicology and Water Quality, 10, 1-8.

Cajaraville, M.P., Robledo, Y., Exteberria, M. & Marigomez, J.A. (1995b). Cellular biomarkers as useful tools in the biological monitoring of environmental pollution molluscan digestive lysosomes. In Cell biology in Environmental Toxicology, pp. 29-55. University of Basque Country Press Service, Bilbo.

Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C. & Viarengo, 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.

Cajaraville, M.P., Cancio, I., Ibabe, A. & Orbea, A. (2003) Peroxisome proliferation as a biomarker in environmental pollution assessment. *Microscopy Research and Technique*, 61, 191-202.

Cancio, I. & Cajaraville, M.P. (2000) Cell biology of peroxisomes and their characteristics in aquatics organisms. *International Review of Cytology*, 119, 201-293.

Cancio, I., Orbea, A., Völkl, A., Fahimi, H.D. & Cajaraville, M.P. (1998) Induction of peroxisomal oxidases in mussels: comparison of effects of lubricant oil and benzo(a)pyrene with two typical peroxisome proliferators on peroxisome structure and function in *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 149, 64-72.

Cancio, I., Ibabe, A. & Cajaraville, M.P. (1999) Seasonal variation of peroxisomal enzyme activities and peroxisomal structure in mussels *Mytilus galloprovincialis* and its relationship with the lipid content. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 123C, 135-144.

Capuzzo, J.M. & Leavitt, D.F. (1988) Lipid composition of the digestive glands of *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas* in response to pollutant gradients. *Marine Ecology - Progress Series*, 46, 139-145.

Cau, P. (1990) Microscopie quantitative. Stéréologie, autoradiographie et immunocytochimie quantitatives. Editions INSERM, Paris, 262 p.

Cavaletto, J.F. & Gardner, W.S. (1999). Seasonal dynamics of lipids in freshwater benthic invertebrates. In Lipids in freshwater ecosystems (eds M.T. Arts & B.C. Wainman), Springer-Verlag, New York, pp. 109-131.

Cavaletto, M., Ghezzi, A., Burlando, B., Evangelisti, V., Ceratto, N. & Viarengo, A. (2002) Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 131, 447-455.

Champeau, O. & Narbonne, J.-F. (2006) Effects of tributyltin and 17[beta]-estradiol on immune and lysosomal systems of the Asian clam *Corbicula fluminea* (M.). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 21, 323-330.

Cheung, V.V., Wedderburn, R.J. & Depledge, M.H. (1998) Molluscan lysosomal responses as a diagnostic tool for the detection of a pollution gradient in Tolo Harbour, Hong Kong. *Marine Environmental Research*, 46, 237-241.

Cheung, V.V., Depledge, M.H. & Jha, A.N. (2006) An evaluation of the relative sensitivity of two marine bivalve mollusc species using the Comet assay. *Marine Environmental Research*, 62, S301–S305.

Chèvre, N., Gagné, F. & Blaise, C. (2003) Development of a biomarker-base index for assessing the ecotoxic potential of aquatic sites. *Biomarkers*, 8, 287-298.

Choi, Y.H. & Chang, Y.J. (2003) Gametogenic cycle of the transplanted-cultured pearl oyster, *Pinctada fucata martensii* (Bivalvia: Pteriidae) in Korea. *Aquaculture*, 220, 781-790.

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.

Comité de la Prévention et de la Précaution (2002). Risques sanitaires liés à l'utilisation des produits phytosanitaires. Ministère de l'Ecologie, du Développement et de l'Aménagement durables, fihe descriptive, 47 p.

Connell, D., Lam P, Richardson, B. & Wu, R. (1999). Ecological risk assessment. In Introduction to ecotoxicology, pp. 145-456. Blackwell Science, Oxford, 145-456.

Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C. & Vasseur, P. (1997). Biomarqueurs du stress oxydant chez les animaux aquatiques. In Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux (eds L. Lagadic, T. Caquet, J.C. Amiard & F. Ramade), Masson, Paris, pp. 149-163.

Czech, P., Weber, K. & Dietrich, D.R. (2001) Effects of endocrine modulating substances on reproduction in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis* L. *Aquatic Toxicology*, 53, 103-114.

Da Ros, L., Nasci, C., Campesan, G., Sartorello, P., Stocco, G. & Menetto, A. (1995) Effects of Linear Alkylbenzene Sulphonate (LAS) and Cadmium in the Digestive Gland of Mussel, *Mytilus sp*. *Marine Environmental Research*, 39, 321-324.

Da Ros, L., Nasci, C., Marigomez, I. & Soto, M. (2000) Biomarkers and trace metals in the digestive gland of indigenous and transplanted mussels, *Mytilus galloprovincialis*, in Venice Lagoon, Italy. Marine Environmental Research, 50, 417-423.

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.

Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Loquès, F., Roméo, M. & Salbert, V. (2007) Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. *Chemosphere*, 66, 574-583.

De Duve, C. (1974) Les lysosomes. *La Recherche*, 49, pp. 815-826.

de Lafontaine, Y., Gagne, 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.

Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Moal, J., Pouvreau, S. & Samain, J.-F. (2006) Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassotrea gigas* during an experimental reproductive cycle. *Aquaculture*, 254, 571-582.

Dembski, S. (2005) Stratégies d'occupation spatiale en milieu lacustre : réponses de l'ichtyofaune dans un réservoir échauffé, non stratifié. Thèse de Doctorat de Sciences de la Vie - Spécialité Hydrobiologie, Université Paul Verlaine - Metz, 183 p.

den Besten, P.J. (1998) Concepts for the implementation of biomarkers in environmental monitoring. *Marine Environmental Research*, 46, 253-256.

den Besten, P.J., Valk, S., Van Weerlee, E., Nolting, R.F., Postma, J.F. & Everaarts, J.M. (2001) Bioaccumulation and biomarkers in the sea star Asterias rubens (Echinodermata: Asteroidea): a North Sea field study. *Marine Environmental Research*, 51, 365-387.

Depledge, M.H. (1994). The rational basis for the use of biomarkers as ecological tools. In Non destructive biomarkers in vertebrates (eds M.C. Fossi & C. Leonzio), Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 271-295.

Desouky, M.M.A. (2006) Tissue distribution and subcellular localization of trace metals in the pond snail *Lymnaea stagnalis* with special reference to the role of lysosomal granules in metal sequestration. *Aquatic Toxicology*, 77, 143-152.

Devin, S. (2000) Importance des espèces exotiques au sein du peuplement benthique de la Moselle et mise en évidence d'une pression de sélection sur les populations de corbicule *Corbicula spp*. DEA de Sciences Agronomiques, Université de Metz, 49 p.

Devin, S. (2003) Les invasions biologiques des milieux d'eau douce : Analyse du rôle des traits biologiques et écologiques d'un nouvel envahisseur (*Dikerogammarus villosus*, Gammaridae, Crustacea) dans le processus invasif. Thèse de doctorat Sciences de la Vie, option Hydrobiologie Animale, Université Paul Verlaine - Metz, 193 p.

Devin, S., Bollache, L., Noël, P.-Y. & Beisel, J.-N. (2005) Patterns of biological invasions in French freshwater systems by non-indigenous macroinvertebrates. *Hydrobiologia*, 551, 137-146.

Dimitriadis, V.K. & Koukouzika, N. (2003) Effect of sampling procedures, transportation stress and laboratory maintenance on the structure and function of the digestive gland epithelium of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Biology*, 142, 915-924.

Dolédec, S. & Chessel, D. (1989) Rythmes saisonniers et composntes stationnelles en milieu aquatique II-Prise en compte et élimination d'effets dans un tableau faunistique. *Acta Oecologica, Oecologica Generalis*, 10, 207-232.

Domouhtsidou, G.P. & Dimitriadis, V.K. (2001) Lysosomal and lipid alterations in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.) as biomarkers of environmental stress. *Environmental Pollution*, 115, 123-137.

Dondero, F., Dagnino, A., Jonsson, H., Capri, F., Gastaldi, L. & Viarengo, A. (2006) Assessing the occurrence of a stress syndrome in mussels (*Mytilus edulis*) using a combined biomarker/gene expression approach. *Aquatic Toxicology*, The Stavanger Workshop - Biological Effects of Environmental Pollution (BEEP) in marine coastal ecosystem - The Stavanger mescosom exposure studies, 78, S13-S24.

Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M.C., Babut, M. & Vasseur, P. (1997) Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic Toxicology*, 39, 93-110.

EBSE-PEE & EDF-CNP (2001a). Etude hydrobiologique de la retenue du Mirgenbach, Document de synthèse - Année 2000. Université de Metz - UFR-Sci-FA, Metz, 138 p.

EBSE-PEE & EDF-CPN (2001b). Etude et suivi hydrobiologique du site et du Centre de Production d'Electricité de Cattenom. Université de Metz - UFR-Sci-FA, Metz, 102 p.

EBSE-PEE & EDF-CPN (2002a). Etude et suivi hydrobiologique du site et du Centre de Production d'Electricité de Cattenom. Université de Metz - UFR-Sci-FA, Metz.

EBSE-PEE & EDF-CPN (2002b). Etude hydrobiologique de la retenue du Mirgenbach, Document de synthèse - année 2001. Université de Metz - UFR-Sci-FA, Metz, 109 p.

Etxeberria, M., Sastre, I., Cajaraville, M.P. & Marigomez, I. (1994) Digestive lysosome enlargement induced by experimental exposure to metals (Cu, Cd, and Zn) in mussels collected from a zinc-polluted site. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 27, 338-345.

Etxeberria, M., Cajaraville, M.P. & Marigomez, I. (1995) Changes in digestive cell lysosomal structure in mussels as biomarkers of environmental stress in the Urdaibai estuary (Biscay Coast, Iberian Peninsula). *Marine Pollution Bulletin*, 30, 599-603.

Fåhraeus-Van Ree, G.E. & Payne, J.F. (1999) Enzyme cytochemical responses of mussels (*Mytilus edulis*) to resin acid constituents of pulp mill effluents. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 63, 430-437.

Fåhraeus-Van Ree, G.E. & Spurrell, D.R. (2000) Effect of toxaphene on isolated hepatocytes of the yellowtail flounder, *Pleuronectes ferrugineus* storer. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46, 289-297.

Felten, V. & Guérold, F. (2004) Haemolymph [Na^+] and [Cl^-] loss in *Gammarus fossarum* exposed in situ to a wide range of acidic streams. *Diseases of Aquatic Organisms*, 61, 113-121.

Forbes, V.E. & Forbes, T.L. (1997). Ecotoxicologie, théorie et applications. INRA Editions, Versailles, 256 p.

Gabbott, P.A. (1976). Energy metabolism. In Marine mussels: their ecology and physiology (ed B.L. Bayne),. Cambridge University Press, London, pp. 293-355.

Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Burgeot, T. & Renault, T. (2006) Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biology and Toxicology*, 22, 1-14.

Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J. & Gauthier-Clerc, S. (2002) Alteration of the biochemical properties of female gonads and vitellins in the clam *Mya arenaria* at contaminated sites in the Saguenay Fjord. *Marine Environmental Research*, 53, 295-310.

Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Depledge, M.H. & Jones, M.B. (2006) The ECOMAN project: A novel approach to defining sustainable ecosystem function. *Marine Pollution Bulletin* - Recent Developments in Estuarine Ecology and Management, 53, 186-194.

Gee (1992) Soft sediment meiofauna community responses to environmental pollution gradients in the German Bight and at a drilling site off the Dutch coast. *Marine Ecology - Progress Series*, 91, 289-302.

Giamberini, L. & Pihan, J. (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.

Giamberini, L. & Cajaraville, M.P. (2005) Lysosomal responses in the digestive gland of the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*, experimentally exposed to cadmium. *Environmental Research*, 98, 210-214.

Goksøyr, A., Beyer, J., Egaas, E., Grosvik, B.E., Hylland, K., Sandvik, M. & Skaare, J.U. (1996) Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus)* and their use in pollution monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, 33, 36-45.

Gossiaux, D.C., Landrum, P.F. & Fisher, S.W. (1998) The assimilation of contaminants from suspended sediment and algae by the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Chemosphere*, 36, 3181-3197.

Guerlet, E. (2002) Utilisation de biomarqueurs cellulaires chez la dreissène (*Dreissena polymorpha*) pour l'évaluation de l'impact de la centrale électronucléaire de Cattenom. DEA de Toxicologie de l'Environnement, Université de Metz, 39 p.

Guerlet, E., Ledy, K. & Giamberini, L. (2006) Field application of a set of cellular biomarkers in the digestive gland of the freshwater snail *Radix peregra* (Gastropoda, Pulmonata). *Aquatic Toxicology*, 77, 19-32.

Guerlet, E., Ledy, K., Meyer, A. & Giambérini, L. (2007) Towards a validation of a cellular biomarker suite in native and transplanted zebra mussels : A two-year integrative field study of seasonal and pollution-induced variations. *Aquatic Toxicology*, 81, 377-388.

Guolan, H. & Yong, W. (1995) Effects of tributyltin chloride on marine bivalve mussels. *Water Research*, 29, 1877-1884.

Holtzman, E. (1989) Lysosomes, New York and London, 439 p.

Issemann, I. & Green, S. (1990) Activation of a member of the steroid receptor hormone superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 347, 645-650.

Jeanneau, L., Faure, P., Montarges-Pelletier, E. & Ramelli, M. (2006) Impact of a highly contaminated river on a more important hydrologic system: Changes in organic markers. *Science of the Total Environment*, 372, 183-192.

Jumel, A., Coutellec, M.-A., Cravedi, J.-P. & Lagadic, L. (2002) Nonylphenol polyethoxylate adjuvant mitigates the reproductive toxicity of fomesafen on the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* in outdoor experimental ponds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 1876-1888.

Kaag, N.H.B.M., Foekema, E.M. & Scholten, M.C.T. (1998) Ecotoxicity of contaminated sediments, a matter of bioavailability. *Water Science and Technology*, 37, 225-231.

Kadar, E., Salanki, J., Jugdaohsingh, R., Powell, J.J., McCrohan, C.R. & White, K.N. (2001) Avoidance responses to aluminium in the freshwater bivalve *Anodonta cygnea*. *Aquatic Toxicology*, 55, 137-148.

Kagley, A.N., Snider, R.G., Krishnakumar, P.K. & Casillas, E. (2003) Assessment of Seasonal Variability of Cytochemical Responses to Contaminant Exposure in the Blue Mussel *Mytilus edulis* (Complex). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44, 43 - 52.

Katz, M.L. (2002) Potential reversibility of lipofuscin accumulation. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 34, 311-317.

Khessiba, A., Romeo, M. & AIssa, P. (2005) Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane. *Environmental Pollution*, 133, 275-281.

Köhler, A. (1991) Lysosomal perturbations in fish liver as indicator for toxic effects of environmental pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100C, 123-127.

Köhler, A., Deisemann, H. & Lauritzen, B. (1992) Histological and cytochemical indices of toxic injury in the liver of dab *Limanda limanda*. *Marine Ecology - Progress Series*, 91, 141-153.

Kraak, M.H.S., Lavy, D., Peeters, W.H.M. & Davids, C. (1992) Chronic ecotoxicity of copper and cadmium to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Archive Environmental Contamination and Toxicology*, 23, 363-369.

Krishnakumar, P.K., Casillas, E. & Varanasi, U. (1994) Effect of environmental contaminants on the health of *Mytilus edulis* from Puget Sound, Washington, USA. I. Cytochemical measures of lysosomal responses in the digestive cells using automatic image analysis. *Marine Ecology - Progress Series*, 106, 249-261.

Krishnakumar, P.K., Casillas, E. & Varanasi, U. (1997) Cytochemical responses in the digestive tissue of *Mytilus edulis* complex exposed to microencapsulated PAHs or PCBs. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118C, 11-18.

Kutlu, M. & Susuz, F. (2004) Biochemical properties of glutathione peroxidase in *Gammarus pulex*. *Bulletin of Environmental Contaminant and Toxicology*, 73, 432-436.

Lagadic, L., Azam, D., Coeurdassier, M., Cossu-Leguille, C., Coutellec, M.-A., Cravedi, J.-P., Dellous, G., Denoyelle, R., Giambérini, L., Gorzerino, C., Guerlet, E., Heydorff, M., Hillenweck, A., Lefeuvre-Orfilla, L., Ollitrault, M., Porcher, J.-P., Quemeneur, A., Russo, J., Sanchez, W., Vasseur, P. & De Vaufleury, A. (2007). Changements d'échelle et évaluation du risque écotoxicologique de mélanges entre substances actives herbicides et adjuvant - Rapport final, INRA, Rennes, 78 p.

Lagadic, L., Caquet, T. & Amiard, J.C. (1997) Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. In Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux (eds L. Lagadic, T. Caquet, J.C. Amiard & F. Ramade), Masson, Paris, pp. 1-9.

Lecointre, G. & Le Guyader, H. (2001) Classification phylogénétique du vivant Belin, Paris, 543 p.

Ledy, K. (2002) Développement de biomarqueurs cellulaires de contamination chez plusieurs espèces aquatiques dulçaquicoles. Approche multiparamétrique *in situ* et au laboratoire, Université de Metz, 235 p.

Lee, S., Y. (1996) Distribution pattern and interaction of two infaunal bivalves, *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve) and *Anomalocardia squamosa* (Linnaeus) (Bivalvia: Veneridae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 201, 253-273.

Leglize, L. & Crochard, C. (1987) Vérification expérimentale du choix de *Dreissena polymorpha* Pallas (lamellibranche) comme bioindicateur de contamination métallique. *Naturaliste Canadien*, 114, 315-323.

Lekube, X., Cajaraville, M.P. & Marigomez, I. (2000) Use of polyclonal antibodies for the detection of changes induced by cadmium in lysosomes of aquatic organisms. *Science of the Total Environment*, 247, 201-212.

Livingstone, D.R., Chipman, J.K., Lowe, D.M., Minier, C., Mitchelmore, C.L., Moore, M.N., Peters, L.D. & Pipe, R.K. (2000) Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids. *International Journal of Environment & Pollution*, 13, 56-91.

Lorenzen, C.J. (1967) Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography*, 12, 343-346.

Lowe, D.M. (1988) Alterations in cellular structure of *Mytilus edulis* resulting from exposure to environmental contaminants under field and experimental conditions. *Marine Ecology - Progress Series*, 46, 91-100.

Lowe, D.M. & Clarke, K.R. (1989) Contaminant-induced changes in the structure of the digestive epithelium of *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 15, 345-358.

Lowe, D.M. & Pipe, R.K. (1994) Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. *Aquatic Toxicology*, 30, 357-365.

Lowe, D.M. & Fossato, V.U. (2000) The influence of environmental contaminants on lysosomal activity in the digestive cells of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon. *Aquatic Toxicology*, 48, 75-85.

Lowe, D.M., Moore, M.N. & Clarke, K.R. (1981) Effects of oil on digestive cells in mussels: Quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. *Aquatic Toxicology*, 1, 213-226.

Lucas, A. & Beninger, P.G. (1985) The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture*, 44, 187-200.

Lukyanova, O.N. & Khotimchenko, Y.S. (1995) Lipid peroxidation in organs of the scallop *Mizuhopecten yessoensis* and sea-urchin *Strongylocentrotus intermedius* during the reproductive cycle. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 110B, 371-377.

Lundebye, A.K., Langston, W.J. & Depledge, M.H. (1997) Stress proteins and condition index as biomarker of tribuyutin exposure and effect in mussels. *Ecotoxicology*, 6, 127-136.

Maarouf, A. & Pihan, J.C. (1987) Bioaccumulation du zinc par la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Haliotis*, 16, 569-570.

Maazouzi, C. (2006) Utilisation des acides gras comme traceurs de la matières organique dans la chaîne trophique d'une retenue artificielle (Mirgenbach - Nord Est France), Université Paul Verlaine - Metz, 267 p.

Maazouzi, C., Masson, G., Izquierdo, M.S. & Pihan, J.-C. (2007) Fatty acid composition of the amphipod *Dikerogammarus villosus*: Feeding strategies and trophic links. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 147A, 868-875.

Machala, M., Dusek, L., Hilscherova, K., Kubinova, R., Jurajda, P., Neca, J., Ulrich, R., Gelnar, M., Studnickova, Z. & Holoubek, I. (2001) Determination and multivariate statistical analysis of biochemical responses to environmental contaminants in feral freshwater fish *Leuciscus cephalus* L. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 1141-1148.

Manly, B.F.J. (1991) Randomization and Monte Carlo methods in biology Chapman & Hall, London, 399 p.

Mardsen, I.D. & Rainbow, P.S. (2004) Does the accumulation of trace metals in crustaceans affect their ecology - the amphipod example? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 300, 373-408.

Marigómez, I. & Baybay-Villacorta, L. (2003) Pollutant-specific and general lysosomal responses in digestive cells of mussels exposed to model organic chemicals. *Aquatic Toxicology*, 64, 235-257.

Marigómez, I., Orbea, A., Olabarrieta, I., Etxeberria, M. & Cajaraville, M.P. (1996) Structural Changes in the Digestive Lysosomal System of Sentinel Mussels as Biomarkers of Environmental Stress in Mussel-Watch Programmes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113C, 291-297.

Marmorstein, A.D., Marmorstein, L.Y., Sakaguchi, H. & Hollyfield, J.G. (2002) Spectral profiling of autofluorescence associated with lipofuscin, Bruch's membrane, and sub-RPE deposits in normal and AMD eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43, 2435-2441.

Martin, H. (2000). Classes de mode d'action des herbicides, [en ligne], Adresse URL : http://www.gov.on.ca/OMAFRA/french/crops/facts/00-062.htm#2.

Masfaraud, J.-F., Giambérini, L., Bauda, P., Béraud, E., Billard, P., Cossu-Léguille, C., Cotelle, S., Dazy, M., Doyen, P., Faure, P., Férard, J.-F., Guerlet, E., Jeanneau, L., Lartiges, B., Mansuy-Huault, L., Montarges-Pelletier, E., Parant, M., Poupin, P., Richer, C., Rodius, F., Rokbani, A., Rouiller, M.-C., Solfato, P., & Vasseur, P. (2005) Conséquences écotoxicologiques de a confluence de la Fensch avec la Moselle et étude intégrée de l'écodynamique de la pollution métallique et organique. In Colloque du programme ECCO - Volet thématique ECODYN, Toulouse, 6 p.

MEDD et Agences de l'Eau, ed. (2003) Système d'Evaluation de la Qualité de l'Eau des cours d'eau. Grilles d'évalutation SEQ-Eau (version 2)., [en ligne] http://sierm.eaurmc.fr/eaux-superficielles/fichiers-telechargeables/grilles-seq-eau-v2.pdf, 40 p.

Mersch, J., Jeanjean, A., Spor, H. & Pihan, J.C. (1992). The freshwater mussel *Dreissena polymorpha* as a bioindicator for trace metals, organochlorines and radionuclides. In The zebra mussel *Dreissena polymorpha*. Limnol.Aktuell (eds D. Neumann & H.A. Jenner), Vol. 4,. Gustav Fisher-Verlag, Stuttgart, pp. 227-244.

Mersch, J., Wagner, P. & Pihan, J.-C. (1996) Copper in indigenous and transplanted zebra mussels in relation to changing water concentrations and body weight. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, 886-893.

Minier, C., Abarnou, A., Jaouen-Madoulet, A., Le Guellec, A.-M., Tutundjian, R., Bocquené, G., Leboulenger, F. (2006) A A pollution-monitoring pilot study involving contaminant and biomarker measurements in the Seine Estuary, *France*, using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). Environmental Toxicology and Chemistry, 25, 112-119.

Monserrat, A.J., Benavides, S.H., Berra, A., Farina, S., Vicario, S.C. & Porta, E.A. (1995) Lectin histochemistry of lipofuscin and certain ceroid pigments. *Histochemistry and Cell Biology*, 103, 435-445.

Montarges-Pelletier, E., Jeanneau, L., Faure, P., Bihannic, I., Barres, O. & Lartiges, B.S. (2007) The junction of Fensch and Moselle rivers, France; mineralogy and composition of river materials. *Environmental Geology*, 53, 85-102.

Moore, M.N. (1976) Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive cells of the common mussel, *Mytilus edulis*, and changes induced by thermal stress. *Cell Tissue Research*, 175, 279-287.

Moore, M.N. (1982) Lysosomes and environmental stress. *Marine Pollution Bulletin*, 13, 42-43.

Moore, M.N. (1988a) Cellular and histopathological effects of a polluant gradient -summary. *Marine Ecology Progress Series*, 46, 109-110.

Moore, M.N. (1988b) Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Marine Ecology - Progress Series*, 46, 81-89.

Moore, M.N. (1991) Lysosomal changes in the response of molluscan hepatopancreatic cells to extracellular signals. *Histochemical Journal*, 23, 495-500.

Moore, M.N. & Allen, I.J. (2002) A computational model of the digestive gland epithelial cell of marine mussels and its simulated responses to oil-derived aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, 54, 579-584.

Moore, M.N. & Allen, I.J. (2003) Environmental Prognostics: Biomarkers, Modelling and Explanatory Frameworks for the Harmful Effects of Chemical Pollutants. In Discussion paper for the GEF-STAP Workshop on "The use of Bioindicators, Biomarkers and Analytical Methods for the Analysis of POPs in Developing Countries", Japan.

Moore, M.N., Allen, J.I. & Somerfield, P.J. (2006) Autophagy: Role in surviving environmental stress. *Marine Environmental Research*, 62, S420-S425.

Moore, M.N., Lowe, D.M. & Fieth, P.E.M. (1978) Responses of lysosomes in the digestive cells of the common mussel, *Mytilus edulis*, to sex steroids and cortisol. *Cell Tissue Research*, 188, 1-9.

Moore, M.N., Lowe, D.M. & Moore, S.L. (1979) Induction of lysosomal destabilisation in marine bivalve molluscs exposed to air. *Marine Biology Letters*, 1, 47-57.

Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W. & Paul Leonard, D.R. (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.

Mora, P., Michel, X. & Narbonne, J.-F. (1999) Cholinesterase activity as potential biomarker in two bivalves. Environmental Toxicology and Pharmacology, 7, 253-260.

Mouabad, A. (1991) Toxicité comportementale et physiologique (filtration, respiration) des métaux lourds (Cu, Zn, Hg, Cd et Pb) chez la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha* Pallas. Thèse de doctorat Sciences de la Vie, Ecotoxicologie, Université de Metz, 275 p.

Mouabad, A. & Pihan, J.C. (1992). The pumping behaviour response of *Dreissena polymorpha* to pollutants; A method for toxicity screening. In The zebra mussel *Dreissena polymorpha* (eds D. Neumann & H.A. Jenner), Vol. Limnologie Aktuell 4, Gustav Fisher-Verlag, Stuttgart , pp. 147-154.

Narbonne, J.F., Daubeze, M., Clerandeau, C. & Garrigues, P. (1999) Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in European coasts. *Biomarkers*, 4, 415-424.

NAS/NRC (1989). Biologic Markers in Reproductive Toxicology. National Academy Press., Washington, DC.

Nasci, C., DaRos, L., Campesan, G., VanVleet, E.S., Salizzato, M., Sperni, L. & Pavoni, B. (1999) Clam transplantation and stress-related biomarkers as useful tools for assessing water quality in coastal environments. *Marine Pollution Bulletin*, 39, 255-260.

Nassiri, Y., Rainbow, P.S., Amiard-Triquet, C., Rainglet, F. & Smith, B.D. (2000) Trace-metal detoxification in the ventral caeca of *Orchestia gammarellus* (Crustacea : Amphipoda). *Marine Biology*, 136, 477-484.

Nicholson, S. (1999) Cytological and physiological biomarker responses from green mussels, *Perna viris* (L.) transplanted to contaminated sites in Hong ong coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, 39, 261-268.

Nicholson, S. & Lam, P.K.S. (2005) Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel Perna viridis (Mytilidae: Bivalvia). *Environment International*, 31, 121-132.

Nigro, M., Falleni, A., Barga, I.D., Scarcelli, V., Lucchesi, P., Regoli, F. & Frenzilli, G. (2006) Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: Transplanted versus native mussels. *Aquatic Toxicology*, 77, 339-347.

Noguchi, T., Takada, Y. & Fujiwara, S. (1979) Degradation of uric acid to urea and glyoxalate in peroxisomes. *Journal of Biology and Chemistry*, 254, 5272-5275.

Olsen, Y. (1999). Lipids and essential fatty acids in aquatic food webs : What can freshwater ecologists learn from mariculture ? In Lipids in freshwater ecosystems (eds M.T. Arts & B.C. Wainman), Springer-Verlag, New York, pp. 161-199.

Orbea, A., Marigomez, I., Fernandez, C., Tarazona, J.V., Cancio, I. & Cajaraville, M.P. (1999) Structure of peroxisomes and activity of the marker enzyme catalase in digestive epithelial cells in relation to PAH content of mussels from two Basque estuaries (Bay of Biscay): Seasonal and site-specific variations. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36, 158-166.

Ortiz-Zarragoitia, M. & Cajaraville, M.P. (2005) Effects of selected xenoestrogens on liver peroxisomes, vitellogenin levels and spermatogenic cell proliferation in male zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 141C, 133-144.

Ortiz-Zarragoitia, M. & Cajaraville, M. (2006) Biomarkers of Exposure and Reproduction-Related Effects in Mussels Exposed to Endocrine Disruptors. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50, 361-369.

Owen, G. (1972) Lysosomes, peroxisomes and bivalves. *Science Progress Oxford*, 60, 299-318.

Pachura-Bouchet, S. (2005) Toxicité et effets sur le développement d'*Hydra attenuata* des polluants hydriques et du nonylphénol (NP), Thèse de Doctorat en Toxicologie de l'Environnement, Université Paul Verlaine-Metz, 127 p.

Parant, M. & Pain, S. (2001) Potential use of multixenobiotic defense mechanism (mxdm) in *Dreissena polymorpha* as a biomarker for the monitoring of freshwater pollution. *Water Research*, 35, 3743-3748.

Pavlica, M., Klobucar, G.I.V., Mojas, N., Erben, R. & Papes, D. (2001) Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 490, 209-214.

Pearse, A.G.E. (1972) Histochemistry, theorical and applied, 3ème Ed.. Churchill-Livingstone, London, 1518 p.

Pellerin-Massicotte, J. & Tremblay, R. (1998). La fragilité lysosomale en tant que biomarqueur cytologique. In Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement (eds L. Lagadic, T. Caquet, J.C. Amiard & F. Ramade), Tec & Doc Lavoisier, Paris, pp. 225-242.

Peterson, H.G., Boutin, C., Freemark, K.E., & Martin, P.A. (1997) Toxicity of hexazinone and diquat to green algae, diatoms, cyanobacteria and duckweed. *Aquatic Toxicology*, 39, 111-134.

Petrovic, S., Ozretic, B., Krajnovic-Ozretic, M. & Bobinac, D. (2001) Lysosomal membrane stability and metallothioneins in digestive gland of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) as biomarkers in a field study. *Marine Pollution Bulletin*, 42, 1373-1378.

Petrovic, S., Semencic, L., Ozretic, B. & Ozretic, M. (2004) Seasonal variations of physiological and cellular biomarkers and their use in the biomonitoring of north adriatic coastal waters (Croatia). *Marine Pollution Bulletin*, 49, 713-720.

Phyt'Eauvergne (2004). Rapport de synthèse des activités réalisées sur le bassin versant de Luzeray (03) - Décembre 1997 - mars 2004. Groupe régional d'action contre les pollutions des eaux par les produits phytosanitaires & Fédération régionale de défense contre les organismes nuisibles en Auvergne, 59 p.

Pipe, R.K. & Moore, M.N. (1985) Ultrastructural changes in the lysosomal-vacuolar system in digestive cells of *Mytilus edulis* as a response to increased salinity. *Marine Biology*, 87, 157-163.

Pipe, R.K. & Moore, M.N. (1986) An ultrastructural study on the effects of phenanthrene on lysosomal membranes and distribution of the lysosomal enzyme ß-glucuronidase in digestive cells of the periwinkle *Littorina littorea*. *Aquatic Toxicology*, 8, 65-76.

Pipe, R.K., Porte, C. & Livingstone, D.R. (1993) Antioxidant enzymes associated with the blood cells and haemolymph of the mussel *Mytilus edulis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 3, 221-233.

Porta, E.A., Berra, A., Monserrat, A.J. & Benavides, S.H. (2002) Differential lectin histochemical studies on lipofuscin (age-pigment) and on selected ceroid pigments. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 34, 193-203.

Porte, C., Solé, M., Albaigés, J. & Livingstone, D.R. (1991) Responses of mixed-function oxigenase and antioxidant enzyme system of *Mytilus* sp. to organic pollution. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 100C, 183-186.

Pratt, J.R., Bowers, N.J. & Cairns, J., J. (1990) Effect of sediment on estimates of diquat toxicity in laboratory microcosms. *Water Research*, 24, 51-57.

Radi, A.A.R. & Matkovics, B. (1988) Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of carp tissues. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 90C, 69-72.

Rao, M.S. & Reddy, J.K. (1991) An overview of peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 93, 205-209.

Regoli, F. (1992) Lysosomal responses as a sensitive stress index in biomonitoring heavy metal pollution. *Marine Ecology - Progress Series*, 84, 63-69.

Regoli, F. (1998) Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 34, 48-63.

Regoli, F., Nigro, M. & Orlando, E. (1998) Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquatic Toxicology*, 40, 375-392.

Ringwood, A.H., Conners, D.E. & Keppler, C.J. (1998) Effects of natural and anthropogenic stressors on lysosomal destabilization in oysters (*Crassostrea virginica*). *Marine Ecology -;Progress Series*, 166, 163-171.

Riveros, A., Zuniga, M., Hernandez, A. & Camano, A. (2002) Cellular biomarkers in native and transplanted populations of the mussel *Perumytilus purpuratus* in the intertidal zones of San Jorge Bay, Antofagasta, Chile. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42, 303-312.

Robertson, A. & Lauenstein, G.G. (1998) Distribution of chlorinated organic contaminants in dreissenid mussels along the southern shores of the Great Lakes. *Journal of Great Lakes Research*, 24, 608-619.

Roditi, H.A., Fisher, N.S. & Sanudo-Wilhelmy, S.A. (2000) Uptake of dissolved organic carbon and trace elements by zebra mussels. *Nature*, 407, 78-80.

Roe, S.L. & MacIsaac, H.J. (1998) Temporal variation of organochlorine contaminants in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* in Lake Erie. *Aquatic Toxicology*, 41, 125-140.

Roméo, M., Mourgaud, Y., Geffard, A., Gnassia-Barelli, M., Amiard, J.-C. & Budzinski, H. (2003a) Multimarker approach in transplanted mussels for evaluating water quality in Charentes, France, coast areas exposed to different anthropogenic conditions, *Environmental Toxicology*, 18, 295-305.

Russo, J. & Lagadic, L. (2004) Effects of environmental concentrations of atrazine on hemocyte density and phagocytic activity in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). *Environmental Pollution*, 127, 303-311.

Russo, J., Lefeuvre-Orfila, L. & Lagadic, L. (2007) Haemocyte-specific responses to the peroxidizing herbicide fomesafen in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). *Environmental Pollution*, 146, 420-427.

Russo, J. & Madec, L. (2007) Haemocyte apoptosis as a general cellular immune response of the snail, *Lymnaea stagnalis*, to a toxicant. *Cell & Tissue Research*, 328, 431-441.

Sahagian, D.L. & Proussevitch, A.A. (1998) 3D particle size distributions from 2D observations: stereology for natural applications. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 84, 173-196.

Sanchez, P. & Tarazona, J.V. (2002) Development of a multispecies system for testing reproductive effects on aquatic invertebrates. Experience with *Daphnia magna*, *Chironomus prasinus* and *Lymnaea peregra*. *Aquatic Toxicology*, 60, 249–256.

Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Nagel, R.T., R. , & Köhler, H.-R. (2005) Endocrine effects in *Gammarus fossarum* (Amphipoda): Influence of wastewater effluents, temporal variability, and spatial aspects on natural populations. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 49, 53-61.

Schmolke, S., Broeg, K., Zander, S., Bissinger, V., Hansen, P., Kress, N., Herut, B., Jantzen, E., Kruner, G., Sturm, A., Körting, W. & Westernhagen, H., von (1999) Multivariate statistical approach to the temporal and spatial patterns of selected bioindicators observed in the North Sea during the years 1995-1997. *Helgoland Marine Research*, 53, 257-266.

Sheehan, D. & Power, A. (1999) Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 123C, 193-199.

Smaoui-Damak, W., Rebai, T., Berthet, B. & Hamza-Chaffai, A. (2006) Does cadmium pollution affect reproduction in the clam *Ruditapes decussatus*? A one-year case study. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143, 252-261.

Smital, T., Sauerborn, R., Pivcevic, B., Krca, S. & Kurelec, B. (2000) Interspecies differences in P-glycoprotein mediated activity of multixenobiotic resistance mechanism in several marine and freshwater invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 126C, 175-186.

Smolders, R., Bervoets, L. & Blust, R. (2002) Transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) as active biomonotors in an effluent-dominated river. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 1889-1896.

Soto, M., Ireland, M.P. & Marigómez, I. (2000) Changes in mussel biometry on exposure to metals: implications in estimation of metal bioavailability in `Mussel-Watch' programmes. *The Science of The Total Environment*, 247, 175-187.

Sprung, M. (1995) Physiological Energetics of the Zebra Mussel *Dreissena polymorpha* in Lakes I. Growth and Reproductive Effort. *Hydrobiologia*, 304, 117-132.

Strandberg, J.D., Rosenfield, J., Berzins, I.K. & Reinisch, C.L. (1998) Specific localization of polychlorinated biphenyls in clams (*Mya arenaria*) from environmentally impacted sites. *Aquatic Toxicology*, 41, 343-354.

Svardh, L. (1999) Bacteria, granulocytomas, and trematode metacercariae in the digestive gland of *Mytilus edulis* : seasonal and interpopulation variation. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74, 275-280.

Tachet, H., Richoux, P., Bournaud, M. & Usseglio-Polatera, P. (2000) Invertébrés d'eau douce. Systématique, biologie, écologie CNRS Edition, Paris, 588 p.

Tanguy, A., Boutet, I., Laroche, J. & Moraga, D. (2005) Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. *FEBS Journal*, 272, 390-403.

Taylor, M.R. & Harrison, P.T.C. (1999) Ecological effects of endocrine disruption: current evidence and research priorities. *Chemosphere*, 19, 1237-1248.

Teh, S.J., Werner, I. & Hinton, D.E. (2000) Sublethal effects of chromium-VI in the Asian clam (*Potamocorbula amurensis*). *Marine Environmental Research*, 50, 295-300.

Terman, A. & Brunk, U.T. (2004) Molecules in focus: Lipofuscin. *The International Journal of Biochemical and Cell Biology*, 36, 1400-1404.

Thioulouse, J., Chessel, D., Dolédec, S. & Olivier, J.M. (1997) ADE-4: A multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing*, 7, 75-83.

Timmermans, B.M.H., Hummel, H. & Bogaards, R.H. (1996) The effect of polluted sediment on the gonadal development and embryogenesis of bivalves. *The Science of The Total Environment*, 187, 231-236.

Tourari, A. (1988) Effets de l'échauffement des eaux sur le cycle de reproduction de la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha* (bivalve : Dreissenidae). Etude "in situ" et en laboratoire: aspects histologiques, histochimiques et biochimiques. Thèse de doctorat : Sciences de la vie, Ecotoxicologie, Université de Metz, 193 p.

Triebskorn, R., Adam, S., Casper, H., Honnen, W., Pawert, M., Schram, M., Schwaiger, J. & Köhler, H. (2002) Biomarkers as diagnostic tools for evaluating effects of unknown past water quality conditions on stream organisms. *Ecotoxicology*, 11, 451-465.

Van der Oost, R., Vindimian, E., Van den Brink, P.J., Satumalay, K., Heida, H. & Vermeulen, N.P.E. (1997) Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). III. Statistical analyses of relationships between contaminant exposure and biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 39, 45-75.

Vasseur, P., Garric, J., Pihan, J.C., Exinger, A., Slomianny, C. & collaborateurs, e.l. (2000). Validation d'indicateurs biologiques de la contamination des écosystèmes hydriques dulçaquicoles et de ses effets toxiques. Programme PNETOX. Université de Metz, Cemagref de Lyon, Université L. Pasteur de Strasbourg, INSERM U 42 de Lille, 32 p.

Viarengo, A. & Canesi, L. (1991) Mussel as biological indicators of pollution. *Aquaculture*, 94, 225-243.

Viarengo, A., Zanicchi, G., Moore, M.N. & Orunesu, M. (1981) Accumulation and detoxification of copper by the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam.: a study of the subcellular distribution in the digestive gland cells. *Aquatic Toxicology*, 1, 147-157.

Viarengo, A., Moore, M.N., Mancinelli, G., Mazzucotelli, A., Pipe, R.K. & Farrar, S.V. (1987) Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and accumulation in marine mussels: the effect of cadmium in the presence and absence of phenanthrene. *Marine Biology*, 94, 251-257.

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M. & Livingstone, D.R. (1991a) Seasonal variations in the antioxidant defense systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 100C, 187-190.

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D.R. & Orunesu, M. (1991b) Age-related lipid peroxidation in the digestive gland of mussels : the role of the antioxidant defense systems. *Experientia*, 47, 454-457.

Viarengo, A. & Nott, J.A. (1993) Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 104C, 355-372.

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Mancinelli, G., Accomando, R., Smaal, A.C. & Orunesu, M. (1995) Stress on Stress Response: A Simple Monitoring Tool in the Assessment of a General Stress Syndrome in Mussels. *Marine Environmental Research*, 39, 245-248.

Vidal, M.-L., Basseres, A. & Narbonne, J.-F. (2001) Potential biomarkers of trichloroethylene and toluene exposure in *Corbicula fluminea*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 9, 87-97.

Vinot, I. (2004) Impact des rejets de cuivre et zinc en milieu aquatique. Thèse de Doctorat, Sciences de la Vie, Ecotoxicologie, Université de Metz, 393 p.

Vinot, I. & Pihan, J.C. (2005) Circulation of copper in the biotic compartments of a freshwater dammed reservoir. *Environmental Pollution*, 133, 169-182.

Waldmann, P., Pivcevic, B., Müller, W.E., Zahn, R.K. & Kurelec, B. (1995) Increased genotoxicity of acetylaminofluorene by modulators of multixenobiotic resistance mechanism: studies with the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Mutation Research*, 342, 113-123.

Wijnhoven, S., van Riel, M.C. & van der Velde, G. (2003) Exotic and indigenous freshwater gammarid species: physiological tolerance to water temperature in relation to ionic content of the water. *Aquatic Ecology*, 37, 151-158.

Wilkins, R.M., Ahmend, S. & Mantle, D. (1999) Comparative effect of fenitrothion treatment on intracellular protease activities in insecticide-resistant and susceptible strains of *Musca domestica*. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 124C, 109-116.

Winston, G.W., Moore, M.N., Straatsburg, I. & Kirchin, M.A. (1991) Decreased stability of digestive gland lysosomes from the common mussel *Mytilus edulis* L. by in vitro generation of oxigen-free radicals. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology*, 21, 401-408.

Wosniok, W., Broeg, K. & Feist, S.W. (2005). Review of the helth indices used for the interpretation of data obtained from biological effects monitoring activities and associated research studies using pathology and disease, 2005 WGPDMO Report, Annex 8, 9 p.

Yin, D. (1996) Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Radical Biology and Medicine*, 21, 871-888.

Zaldibar, B., Rodrigues, A., Lopes, M., Amaral, A., Marigomez, I. & Soto, M. (2006) Freshwter molluscs from volcanic areas as model organisms to assess adaptation to metal chronic pollution. *The Science of the Total Environment*, 371, 168-175.

Zhao, M., Antunes, F., Eaton, J.W. & Brunk, U.T. (2003) Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *European Journal of Biochemistry*, 270, 3778-3786.

Zorita, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Soto, M. & Cajaraville, M.P. (2006) Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): An integrated biochemical, histochemical and histological study. The Stavanger WorkshopBiological Effects of Environmental Pollution (BEEP) in marine coastal ecosystem - The Stavanger mescosom exposure studies, 78, S109-S116.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Article 4

Article 4.

Guerlet E., Ledy K., Giambérini, L., 2006,

Field application of a set of cellular biomarkers in the digestive gland of the freshwater snail *Radix peregra* (Gastropoda, Pulmonata).

Aquatic Toxicol. 77 : 19-32

ELSEVIER

Aquatic Toxicology 77 (2006) 19–32

AQUATIC TOXICOLOGY

www.elsevier.com/locate/aquatox

Field application of a set of cellular biomarkers in the digestive gland of the freshwater snail *Radix peregra* (Gastropoda, Pulmonata)

Edwige Guerlet, Karine Ledy, Laure Giambérini *

Laboratoire Ecotoxicité, Santé Environnementale, CNRS UMR 7146, Université de Metz, Rue Général Délestraint, F-57070 Metz, France

Received 4 February 2005; received in revised form 7 October 2005; accepted 19 October 2005

Abstract

An active biomonitoring study was performed in the vicinity of two pulp and paper mill effluents (PPMEs) released in two different streams in northeastern France. Freshwater gastropods, *Radix peregra* (=*Lymnaea peregra* or *Lymnaea pereger*), were transplanted for 0, 3, 14 and 21 days at two to three sites located upstream and downstream from the mill discharge points in both rivers. Lysosomal and peroxisomal systems, as well as lipofuscin and neutral lipids, were tested using histochemical methods on cryostat sections of digestive gland tissues, and stereological data were obtained by image analysis. Evidence of structural changes in the lysosomal system was found in animals exposed to both effluents, comprising general stress responses such as enlarged and more numerous lysosomes; and also possible specific pluri-phasic effects. Modifications of the lysosomal and cytoplasmic contents of lipid-related materials were also described, namely enhanced lipofuscin deposit and neutral lipid depletion. The peroxisomal proliferation in exposed snails seems to show its implication in oxidative stress detoxication, without preventing higher lipoperoxidation, as indicated by the increased amounts of digestive lipofuscin. Structural changes of the lysosomal and peroxisomal systems, digestive lipofuscin and neutral lipid contents have potential for use as early cellular biomarkers in *Radix peregra* exposed to environmental stressors, which deserve further investigations.
© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Biomarkers; Histochemistry; Lysosomal and peroxisomal systems; Freshwater gastropod; Pulp and paper mill effluents

1. Introduction

When using biomarkers deployed in the field in order to identify early biological effects of anthropic pollution, it is strongly recommended to study several responses concomitantly, as a "suite of biomarkers" (den Besten, 1998). At a cellular level, responses to xenobiotics and other stressors have been widely studied for over 20 years in marine and estuarine organisms, providing fast and sensitive indication of environmental pollution, before the appearance of deleterious effects at higher levels of biological organization (Moore, 1985; Cajaraville et al., 2000; Au, 2004). Though numerous studies report pollution-induced cellular and/or tissue damage in freshwater organisms (Mather-Mihaich and Di Giulio, 1991; Bucher et al., 1992; Czech et al., 2001), their use as so called cellular biomarkers in the field of freshwater ecotoxicology is far less developed than in marine and estuarine research. To our knowledge, it concerns mainly a few fish (see VALIMAR project: Triebskorn et al., 2001) and invertebrate species, including snails (Svendsen and Weeks, 1995), zebra mussels (Giambérini and Pihan, 1997; Giambérini and Cajaraville, 2005), crayfishes, (Anton et al., 2000) and crabs (Schuwerack and Lewis, 2003a, 2003b).

In this context, the lysosomal system appears as one of the most studied cellular compartments, because it provides generalized cellular stress responses, notably due to its crucial role in cellular turnover and detoxication, comprising the sequestration and accumulation of a wide range of metals and xenobiotics (Moore, 1980; Moore et al., 2004). Several lysosomal responses to numerous contamination scenarios or stress factors have been described; they are particularly widely studied in molluscs, whose digestive endolysosomal system is particularly well developed owing to its involvement in intracellular digestion (Owen, 1972). These responses include destabilisations of the lysosomal membrane, which can give rise to cellular injuries due to lysosomal dysfunction and possible leakage of hydrolases

Abbreviations: AOX, adsorbable organo-halogenated compounds; (B)PPME, (bleached) pulp and paper mill effluent; L, lysosomes; LF, lipofuscin; NL, neutral lipids; Nv, numerical density; P, peroxisomes; Sv, surface density; S/V, surface-to-volume ratio; Vv, volume density

* Corresponding author. Tel.: +33 387 378 415; fax: +33 387 378 512.
E-mail address: giamb@sciences.univ-metz.fr (L. Giambérini).

0166-445X/$ – see front matter © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.aquatox.2005.10.012

into the cytoplasm in severe instances (Moore, 1980; Moore et al., 2004). Stereological studies have also often shown structural variations of the lysosomal compartment (i.e. modifications of the number and/or size of digestive lysosomes) after laboratory or field exposure to organic xenobiotics, metals or complex mixtures of contaminants (e.g. Lowe et al., 1981; Etxeberria et al., 1994; Marigómez et al., 1996; Giambérini and Cajaraville, 2005). Such parameters may give interesting insights into the dynamics of this cellular compartment, and possible clues about the mechanisms of toxic action (abnormal enlargement or modification of fusion events).

In secondary lysosomes, oxidative and non-oxidative catabolism of lipids and other endogenous or exogenous compounds, like proteins, ascorbic acid or polyenic compounds produce insoluble lipofuscin granules (Yin, 1996). Lysosomal and cytoplasmic accumulations of lipofuscin have been reported in molluscan digestive cells after exposure to organic and metallic contaminants (Viarengo et al., 1987; Moore, 1988; Regoli, 1992) or to oxidative stressors (Cavaletto et al., 2002), in laboratory experiments and/or in field exposure to complex mixtures of contaminants (Moore, 1988; Krishnakumar et al., 1994). A rapid accumulation of lipofuscin is considered pathogenic and is often described as the result of enhanced autophagocytic processes (Moore, 1988).

Unsaturated neutral lipids, comprising sterides, cerides and sterols, form droplets localised in secondary lysosomes and in the cytoplasm. In molluscs, they consist mainly of triglycerides of alimentary origin or resulting from a de novo synthesis, using acetyl-CoA produced by the catabolism of glycogen (Gabbott, 1976). They principally represent a nutritive storage product intended for gametogenesis and secondary energetic resources for the growth when glycogen reserves are depleted. Increased tissular levels of unsaturated neutral lipids are often associated with lysosomal damage (Moore, 1988; Krishnakumar et al., 1994; Abele et al., 1998; Domouhtsidou and Dimitriadis, 2000) and such accumulations are regarded as specific biomarkers of organic pollution (Marigómez and Baybay-Villacorta, 2003). Nonetheless, other stressors such as metal contamination are likely to deplete digestive unsaturated neutral lipid contents (Regoli, 1992).

The peroxisomal system consists of enzyme-containing organelles, which are mainly involved in the β-oxidation of fatty acids, but also in other metabolic functions such as the synthesis of cholesterol and bile acids as well as the catabolism of amino acids, purines or polyamines. Moreover, they influence the excretion of some xenobiotic metabolites. Peroxisomal activities also comprise oxidative reactions using dioxygen and generating hydrogen peroxide and other reactive oxygen species that are then detoxified by catalase and other peroxisomal antioxidant enzymes. For a complete review of peroxisomal characteristics, including their biogenesis, proliferation mechanisms and metabolic functions in aquatic organisms, see Cancio and Cajaraville (2000). Peroxisomal proliferative responses include enhanced number and size of organelles, as well as activation of peroxisomal enzymes, mediated by the action of nuclear peroxisome proliferator activated receptors. Such responses may be generated by organic pollution, but also show strong seasonal variations (Orbea et al., 1999).

Pulp and paper mill effluents are complex mixtures of xenobiotics such as metals, phenols, dioxin, furans, lignocellulose compounds, catechols, polycyclic aromatic hydrocarbons, fatty acids, resin acids and other undetermined organic compounds (Suntio et al., 1988). They are known to induce various responses on biota at different levels of biological organization, such as the induction of the multixenobiotic defence mechanism in the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha* (Pain and Parant, 2003), increased EROD activities and peroxisome proliferation in the hepatocytes of channel catfish (*Ictalarus punctatus*) (Mather-Mihaich and Di Giulio, 1991) or concomitant impairment of biological endpoints from the molecular level (DNA damage) to imbalanced structure of fish community (Adams et al., 1992).

Field exposure to such heavily contaminated effluents provides a useful test for the adaptability and responsiveness of a set of cellular biomarkers in freshwater invertebrates. With this aim, freshwater gastropods *Radix peregra* (=*Lymnaea peregra/Lymnaea pereger*) were exposed to two pulp and paper mill effluents in northeastern France for 21 days and the digestive lysosomal and peroxisomal structures as well as lipofuscin and neutral lipids contents were investigated, using histochemistry coupled to automated image analysis.

2. Materials and methods

2.1. Study sites

The first transplantation experiment was conducted in April–May 2000 in the Ton River (Ecouviez, northeastern France), which receives the waste waters from a chlorine bleaching pulp and paper mill (Ton-BPPME, Fig. 1A), producing wood free pulp for the production of high quality wood free coated paper (350 000 t/year). Test sites were established approximately 3 km above and 2.5 km below the mill discharge area. With respect to the upstream site, the water on the downstream site was previously described as highly contaminated with organohalogenated compounds (Hayer et al., 1996).

A second study was conducted simultaneously in the Moselle River (Golbey, northeastern France) in the effluent receiving area of a pulp and paper mill (Moselle-PPME, Fig. 1B), which produces both deinked pulp from recovered paper (1.200 t/day) and thermo-mechanic pulp (350 t/day), used for the production of newsprint paper (590.000 t/year). The studied sites were located 200–300 m upstream and downstream (downstream 2) of the mill sewer, and a supplementary site was chosen just 10 m below the discharge point (downstream 1).

2.2. Animals and transplantation experiments

Gastropods *Radix peregra* (6–8 mm in shell length) were collected from a relatively pristine stream (Les Vallières, Ars Laquenexy, northeastern France) during the first half of April 2000. Animals were rapidly carried to the laboratory in the water of origin and acclimatized to laboratory conditions in

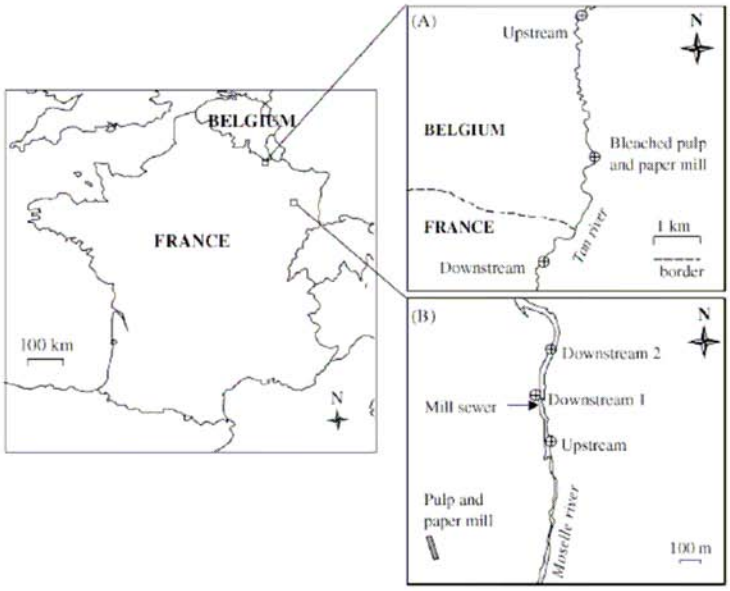


Fig. 1. Location of the experimental sites in the Ton River (A) and the Moselle River (B) in relation to both pulp and paper mill discharge points.

dechlorinated tap water with continuous oxygen. Fragments of wood covered with biofilm and aquatic plants collected simultaneously in the stream were placed in the tanks as a food supply. The water was kept at 19 ± 1 °C and changed every 2 days. After 1 week, eight specimens were kept as controls, and three plastic gridcages (150 mm × 200 mm, 2.5 mm mesh) containing 12 individuals were immersed at each of the five studied sites. One cage per site was collected after 3, 14 and 21 days of exposure.

2.3. Water sampling and analyses

This study was not carried out with the intent to characterize fully the composition and the biological hazards of both effluents, but nonetheless the results of the partial physico-chemical analyses performed here gives interesting insights into several stressor levels and the general water quality at the studied sites.

Water pH, temperature, dissolved oxygen and conductivity were monitored directly in the field. Water was rapidly carried to the laboratory in 2 l polyethylene tanks and the following analyses were performed: after water acidification (1% HNO_3), cations were measured by flame AAS (Perkin-Elmer Aanalyst 100), with the exception of NH^{4+}, which were analyzed by graphite furnace AAS (Varian Spectra-300); anion concentrations were determined by ion exchange chromatography (Dionex).

The chemical oxygen demand and 5-day biochemical oxygen demand (COD and BOD_5) were evaluated by volumetric and oximetric methods, respectively, and suspended matter by gravimetric method.

Fe, Cu and Zn were dosed by flame AAS, Cd, Cr and Pb by graphite furnace AAS on filtered and acidified water (1% HNO_3).

For the determination of organo-halogenated compounds (AOX), which represent a surrogate measure of organically bound chlorine, water was sampled in 1 l tinted glass bottles and the analyses were performed by IRH Environnement (Nancy, France), following the method NF EN 1485.

Hydrogen peroxide levels were estimated thanks to analytical test strips (Peroxide-Test, Merckoquant®, Merck).

2.4. Tissue preparation

The tissues of eight fresh excised digestive glands were cryoprotected in 0.05 M Sörensen buffer containing 7% sucrose, embedded in aqueous medium (Cryomatrix, ThermoShandon, USA) and frozen in liquid nitrogen vapours. Sections (8 μm) were cut in a Leica CM3000 cryostat (Leica Instruments GmbH, Germany) at a cabinet temperature of −28 °C/−30 °C, collected onto warm glass slides and stored at −70 °C until required for the different staining procedures, which were all preceded by a progressive warming up of the slides, kept for 3 h at 4 °C.

2.5. Histochemistry

2.5.1. Lysosomal β-glucuronidase

The lysosomal system was localised in the digestive cells by a histochemical test for β-glucuronidase demonstrated in unfixed cryostat sections according to Cajaraville et al. (1991) and adapted to freshwater organisms by Giambérini and Cajaraville (2005).

2.5.2. Lipofuscin granules

The sections were fixed in Baker's formol for 15 min and stained for lipofuscin using Schmorl reaction (Pearse, 1972). Sections were stained for 10 min in a 1% ferric chloride and 1% freshly prepared potassium ferricyanide solution (ratio 3:1, v/v), rinsed in 1% acetic acid and distilled

water and then were mounted in glycerol gelatine. The lipofuscin granules were stained in blue in the digestive gland cells.

2.5.3. Neutral lipids

Neutral lipids were demonstrated by oil red O staining (Moore, 1988). The cryotome sections were fixed in Baker's formol for 15 min. They were rinsed in triethylphosphate (60%) and stained in a freshly prepared and filtered oil red O solution (1% oil red O solution in 60% triethylphosphate). Then the sections were rapidly differentiated in 60% triethylphosphate, rinsed in distilled water and mounted in glycerol gelatine. The neutral lipids were recognizable as red droplets.

2.5.4. Peroxisomal catalase

The histochemical revelation of the peroxisomal catalase was performed in unfixed cryostat sections modified from Cajaraville et al. (1993). Fixation of the slides was performed at 4 °C for 5 h in 4% formaldehyde buffered with 0.05 M Sörensen solution at pH 7.4. After the fixation and rinsing in the same buffer, the incubation was carried out in the dark at 42 °C for 40 min in a freshly prepared medium containing 0.2% 3,3′-diaminobenzidine tetrahydrochloride as substrate, 0.3% hydrogen peroxide and 0.01 M imidazole in Teorell-Stenhagen buffer at pH 10.4. Following incubation, the sections were rinsed in the latter buffer, then in water and mounted in glycerol gelatine. The brown-stained reaction product was located within the peroxisomes of the digestive cells.

2.6. Stereology

Cellular biomarkers were quantified on digestive tissue sections by image analysis (Analysis pro 3.0, Olympus) using a Sony tri CCD colour video camera connected to an Olympus BX 41 microscope with a 100× objective. Morphological changes in the tissue sections of six to eight snails were evaluated on five random fields of view (total sampling area per specimen: 24 700 μm^2). Areas not belonging to digestive cells (connective or gonad tissues) were discarded from the analysis. One to four stereological parameters were calculated depending on the biomarker (Lowe et al., 1981). They include lysosomal and peroxisomal volume density ($Vv_L = V_L/V_C$ and $Vv_P = V_P/V_C$), surface density ($Sv_L = S_L/V_C$ and $Sv_P = S_P/V_C$), surface-to-volume ratio (S_L/V_L and S_P/V_P) and numerical density ($Nv_L = N_L/V_C$ and $Nv_P = N_P/V_C$) where C = digestive cell cytoplasm, L = lysosomes, P = peroxisomes, N = number, S = surface, V = volume. Most of the time, the lipofuscin granules and the neutral lipid droplets formed clusters in the digestive gland cells and were difficult to separate with image analysis. In this case, diameters were not used for the stereological analysis and only the lipofuscin and neutral lipid surface densities could be calculated ($Sv_{LF} = S_{LF}/V_C$ and $Sv_{NL} = S_{NL}/V_C$) where C = digestive cell cytoplasm, LF = lipofuscin, NL = neutral lipids, V = volume and S = surface.

2.7. Statistical analyses

All statistical analysis were undertaken with STATISTICA software, version 5.5 (StatSoft, USA). The stereological parameters were tested by two-way analysis of variance (ANOVA) in order to investigate the effects of time (T), sites (S) and their interaction (T × S) on the four biomarker responses. Significant differences between paired means were determined using the multiple-range comparison test of Duncan. In order to achieve homoscedasticity (assessed by Brown–Forsythe test) in the Ton-experiment, three parameters calculated on peroxisomal system were transformed prior analysis ($\log_{10} Vv_P$, $\log_{10} Nv_P$ and inverse S_P/V_P).

Pearson's correlation coefficients were calculated to investigate statistical relationships among the stereological and physico-chemical parameters, without values collected at day 0 because no data were available on AOX levels at this sampling date for the Ton-experiment, and without AOX for the Moselle-experiment, since they were monitored only at 21 days.

For all statistical analysis, the significance level was set at $\alpha = 0.05$.

3. Results

3.1. Ton-BPPME experiment

3.1.1. Physico-chemical analysis

The results of the physico-chemical analyses performed on the water from both sites of the Ton-BPPME experiment are reported in Table 1. They showed an almost 10-fold increase of AOX levels between upstream and downstream sites, consistent with previous studies carried out in the same area (Hayer et al., 1996). Simultaneously, water upstream from the discharge displayed higher temperatures (differences between sites ranging from 2.4 to 3.8 °C), as well as an enhanced conductivity, in agreement with higher minerals (see Cl^-, SO_4^{2-} and Na^+). An increase of metals (copper contamination already exists upstream from the sewer) also contributed to a deterioration of water quality between the two sites. Nevertheless, apart from these increases of three metals, AOX and temperature, general water quality is altered both up and downstream of the discharge, according to French standards (Agences de l'eau, 2000).

3.1.2. Lysosomal system

Results concerning the lysosomal compartment in the digestive glands of *Radix peregra* in the Ton-experiment are illustrated in Fig. 2. The two-way ANOVAs (Table 2) showed that the effects of the time and the sampling sites on the four lysosomal stereological parameters were significant, as well as their interaction (with the exception of the S_L/V_L ratio for this latter effect). Lysosomal volume, surface and numerical densities (Vv_L, Sv_L and Nv_L) displayed higher values from the 14th day, and S_L/V_L, which is interpreted as the inverse of lysosomal size, was lower at 21 days in snails transplanted at the downstream site compared with those transplanted upstream.

Table 1
Results of the physico-chemical analysis carried out on the Ton-BPPME

Parameters	Units	Upstream	Downstream
AOX[a]	$\mu g\ Cl\ l^{-1}$	14.0 ± 4.7	132.8 ± 7.1
pH[a]		7.9 ± 0.2	7.9 ± 0.1
T[a]	°C	10.5 ± 2.2	13.7 ± 2.7
Conductivity 20 °C[a]	$\mu S\ cm^{-1}$	403 ± 3.5	675 ± 9.9
Dissolved O_2[a]	%	89.2 ± 2.8	88.1 ± 3.2
H_2O_2[b]	$mg\ l^{-1}$	<1	1–3
Suspended matter[c]	$mg\ l^{-1}$	63.0 ± 33.4	44.0 ± 7.0
COD[c]	$mg\ l^{-1}$	16.5 ± 3.5	21.0 ± 2.8
BOD_5[c]	$mg\ l^{-1}$	6.4 ± 0.7	5.0 ± 0.5
Cl^{-}[c]	$mg\ l^{-1}$	9.3 ± 0.4	27.1 ± 1.1
SO_4^{2-}[c]	$mg\ l^{-1}$	22.1 ± 2.3	89.9 ± 4.0
Ca^{2+}[c]	$mg\ l^{-1}$	74.6 ± 4.4	88.2 ± 0.7
Na^{+}[c]	$mg\ l^{-1}$	6.4 ± 0.0	42.1 ± 1.5
Mg^{2+}[c]	$mg\ l^{-1}$	3.8 ± 0.1	3.9 ± 0.2
K^{+}[c]	$mg\ l^{-1}$	2.3 ± 0.4	5.3 ± 0.4
NH^{4+}[c]	$mg\ N\ l^{-1}$	0.18 ± 0.04	0.14 ± 0.05
NO^{2-}[c]	$mg\ N\ l^{-1}$	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01
NO^{3-}[c]	$mg\ N\ l^{-1}$	1.45 ± 0.21	1.26 ± 0.28
N Kjedahl[c]	$mg\ N\ l^{-1}$	2.3 ± 1.83	1.00 ± 0.38
PO_4^{3-}[c]	$mg\ P\ l^{-1}$	0.066 ± 0.006	0.055 ± 0.003
P total[c]	$mg\ P\ l^{-1}$	0.315 ± 0.059	0.215 ± 0.022
Cd[d]	$\mu g\ l^{-1}$	<0.1	0.6
Cr[d]	$\mu g\ l^{-1}$	0.4	1.8
Cu[d]	$\mu g\ l^{-1}$	49	85
Fe[d]	$\mu g\ l^{-1}$	0.11	0.27
Ni[d]	$\mu g\ l^{-1}$	1.5	1.9
Pb[d]	$\mu g\ l^{-1}$	3.2	5.4
Zn[d]	$\mu g\ l^{-1}$	14	19

Results are given as mean ± S.D. (parameters determined on two or more dates) or as single value (one date only).

[a] Parameters were monitored at transplantation day (day 0) and at day 3, day 14 and day 21, either directly in the field (pH, O_2, T (°C), conductivity), or later in the laboratory (AOX).

[b] H_2O_2 was monitored in the field at the end of the experiment.

[c] Water was sampled at day 3 and day 21.

[d] Water for metal determination was sampled at the beginning of the experiment.

These results indicate the occurrence of more numerous lysosomes that became larger at the end of the exposure to the effluent.

3.1.3. Lipofuscin content

The results of the two-way ANOVA on Sv_{LF} indicated highly significant effects of time, sites and their interaction (Table 2). Indeed, digestive lipofuscin accumulated significantly in all the animals (Fig. 3), but this accumulation was greater and faster in gastropods exposed to the PPME than in non-exposed ones.

3.1.4. Neutral lipid content

Significant temporal and spatial effects were exerted on the digestive unsaturated neutral lipid content (Table 2). Decreased amounts of lipid droplets were quantified in both samples from 14 days of exposure (Fig. 4). Furthermore, this depletion was more pronounced in gastropods transplanted downstream from the sewer, to achieve a loss of about 62 and 30% of their digestive neutral lipid reserves after 3 weeks of experiment in comparison to controls and to snails from the upstream site, respectively.

3.1.5. Peroxisomal system

The influence of time and sites were significant on Sv_P and Vv_P according to the two-way ANOVAs. These two parameters displayed higher values downstream from the sewer after 14 and 21 days, respectively (Fig. 5). Time was the only significant effect on S_P/V_P and Nv_P. Hence, peroxisomal surface-to-volume ratio was higher in all the samples with respect to controls, indicating smaller peroxisomes from 3 days on. In parallel, the numerical density of peroxisomes was greater from 14 days in snails from both sites.

3.1.6. Relationships among stereological and physico-chemical parameters

Neutral lipid Sv_{NL} and dissolved O_2 correlated positively together, and negatively with peroxisomal Vv_P, Sv_P and Nv_P, lipofuscin Sv_{LF}, and temperature (Table 3). No significant correlations were found between stereological parameters and AOX levels, or between lysosomal and other biological responses. Nonetheless, AOX tended to correlate positively with lysosomal Vv_L and Sv_L ($P = 0.054$ and $P = 0.059$, respectively).

3.2. Moselle-PPME experiment

3.2.1. Physico-chemical analysis

The results of the physico-chemical analysis of the water from the three sites on the Moselle River are shown in Table 4. Among noticeable features, the temperature increased along the stream, higher values being always achieved near the discharge area (downstream 1). The COD and the conductivity (as well as Cl^{-}, SO_4^{2-} and most of the cations) presented the same spatial trends. AOX and Cu levels increased slightly between upstream and downstream 2, and were considerably lower just below the sewer.

These findings could be explained by the possible presence of chelating agents at the latter site. Indeed, clay added to industrial wastewaters is known to chelate metals, which may thus precipitate with organic matter and deposit on the sediment. Similarly, an important part of organo-halogenated compounds (AOX) are highly hydrophobic and likely to accumulate on lignin and chlorolignin macromolecules, as well as on suspended matter, which strongly lessens their bioavailability in the discharge area of the effluent (Kukkonen, 1992). With increasing distance from the sewer and diminishing AOX concentrations, these compounds may then be desorbed from the organic matter.

3.2.2. Lysosomal system

From 3 days of exposure, Vv_L, Sv_L and Nv_L were significantly greater in snails directly exposed to the Moselle-PPME (downstream 1) than in non-exposed ones (upstream), except at 14 days (Fig. 6). The only significant increases of lysosomal volume, surface and numerical densities in organisms from downstream 2 with respect to upstream were observed at 14 days. No spatial effect was exerted on S_L/V_L (Table 5), but a significant increase of this ratio in snails directly exposed to the sewer compared with controls ($P = 0.024$) indicated a slight

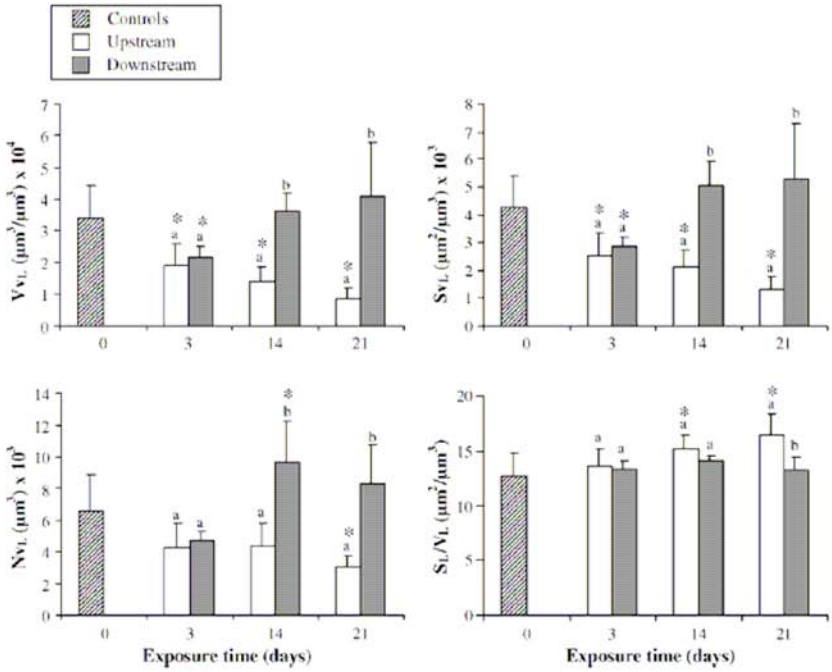


Fig. 2. Lysosomal volume density (Vv_L), surface density (Sv_L), numerical density (Nv_L) and surface-to-volume ratio (S_L/V_L) in the digestive gland of *R. peregra* exposed to the Ton-BPPME for 21 days. Histogram bars represent means + S.D. For each exposure time, different letters indicate significant differences between upstream and downstream means and asterisks show significant differences compared with controls (Duncan's test, $P<0.05$).

diminution of individual lysosomal size after 3 days of exposure. Then, the inverse trend was observed in this experimental group between 3 and 21 days ($P=0.017$), showing an increase of the lysosomal particle size, initiated at the end of the experiment in organisms from downstream 1 site.

3.2.3. Lipofuscin content

The two-way ANOVA showed no significant spatial or temporal effect (Table 5). Nonetheless, a significant accumulation of lipopigments was evidenced in animals directly exposed to the effluent from 14 days, and a less pronounced and non-significant

Table 2
Summary of the results of the two-way ANOVAs indicating the effects of in situ exposure to the Ton-BPPME (exposure time, station and their interaction) on the four biomarkers measured in the digestive gland of *Radix peregra*

Biomarkers	Time (d.f. = 3)		Station (d.f. = 1)		Interaction (d.f. = 3)		Residual d.f.
	F-values	*P*(*F*)	*F*-values	*P*(*F*)	*F*-values	*P*(*F*)	
Lysosomal system							31
Vv_L	4.261	0.0125*	24.83	<0.0001*	7.484	0.0007*	
Sv_L	3.790	0.0200*	29.09	<0.0001*	8.491	0.0003*	
S_L/V_L	3.917	0.0176*	5.165	0.0301*	2.129	0.1166	
Nv_L	3.551	0.0256*	21.63	<0.0001*	6.258	0.0019*	
Lipofuscin							55
Sv_{LF}	194.8	<0.0001*	137.1	<0.0001*	16.81	<0.0001*	
Neutral lipid							56
Sv_{NL}	73.91	<0.0001*	5.599	0.0215*	1.809	0.1559	
Peroxisomal system							54
$Log_{10}\ Vv_P$	18.58	<0.0001*	8.905	0.0043*	1.864	0.1467	
Sv_P	41.65	<0.0001*	14.34	0.0004*	3.246	0.0288*	
$Log_{10}\ S_P/V_P$	15.24	<0.0001*	0.698	0.4073	0.355	0.7858	
$Log_{10}\ Nv_P$	13.47	<0.0001*	1.214	0.2755	0.149	0.9302	

P(*F*), probability of the Fisher's *F* ratio; d.f., degree of freedom; Vv, volume density; Sv, surface density; S/V, surface-to-volume ratio; Nv, numerical density. 'Log_{10}' precedes the parameter when data were transformed prior analysis to achieve homoscedasticity (Brown–Forsythe, $P<0.05$).
* Indicate the significance ($P<0.05$).

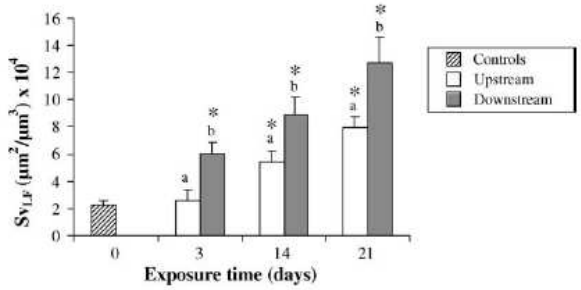


Fig. 3. Lipofuscin surface density (Sv_{LF}) in the digestive gland of *R. peregra* exposed to the Ton-BPPME for 21 days. Histogram bars represent means + S.D. For each exposure time, different letters indicate significant differences between upstream and downstream means and asterisks show significant differences compared with controls (Duncan's test, $P < 0.05$).

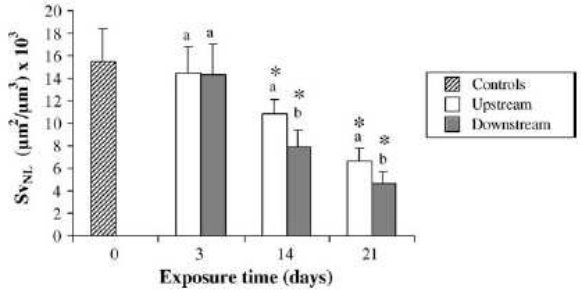


Fig. 4. Neutral lipid surface density (Sv_{NL}) in the digestive gland of *R. peregra* exposed to Ton-BPPME for 21 days. Histogram bars represent means + S.D. For each exposure time, different letters indicate significant differences between upstream and downstream means and asterisks show significant differences compared with controls (Duncan's test, $P < 0.05$).

increase of lipofuscin deposits was also observed in both other sites (Fig. 7).

3.2.4. Neutral lipid content

The neutral lipid content in the digestive gland of *Radix peregra* in the Moselle-PPME experiment showed highly significant temporal and spatial evolution (Table 5). Findings, illustrated in Fig. 8, were consistent with those observed in the Ton-BPPME experiment. The depletion of neutral lipids, initiated between 3 and 14 days in all the samples and continuous until the end of the experiment, was more pronounced in snails collected downstream from the sewer (downstream 1 Sv_{NL} values being inferior to downstream 2 only at the 14th day). This phenomenon was even more pronounced than in snails transplanted to the Ton River, since it reached at the end of the experiment a neutral lipid loss of 85 and 73% compared with initial levels, and 69 and 44% in comparison to non-exposed snails, in animals from downstream 1 and downstream 2, respectively.

3.2.5. Peroxisomal system

Time exerted a significant effect on the four peroxisomal stereological parameters, whereas spatial effects were only significant on Sv_P and Nv_P (Table 5). These two parameters displayed higher values in snails from downstream 1 with respect to both other sites from 14 days (with the exception of Nv_P at 21 days). As in the Ton-BPPME experiment, peroxisomal S_P/V_P were higher in test groups than in controls, suggesting a rapid decrease of peroxisomal size, which was then maintained through the whole 21-day period (Fig. 9).

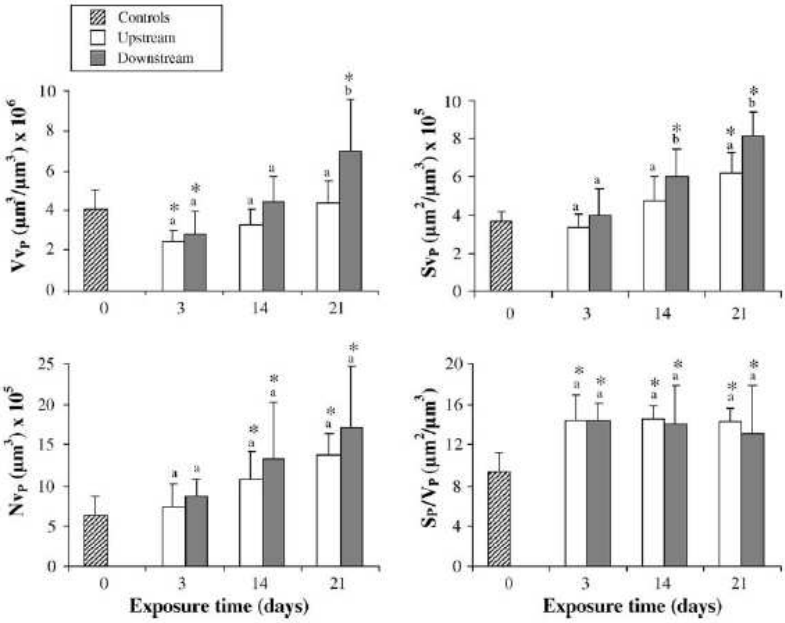


Fig. 5. Peroxisomal volume density (Vv_P), surface density (Sv_P), numerical density (Nv_P) and surface-to-volume ratio (S_P/V_P) in the digestive gland of *R. peregra* exposed to the Ton-BPPME for 21 days. Histogram bars represent means + S.D. For each exposure time, different letters indicate significant differences between upstream and downstream means and asterisks show significant differences compared with controls (Duncan's test, $P < 0.05$).

Table 3
Pearson's correlation coefficients ($n=6$) among stereological and three physico-chemical parameters in the Ton-BPPME experiment (on days 3, 7 and 21)

	Vv_L	Sv_L	S_L/V_L	Nv_L	Sv_{LF}	Sv_{NL}	Vv_P	Sv_P	S_P/V_P	Nv_P	T (°C)	AOX
O_2	−0.770	−0.783	0.177	−0.784	−0.963**	0.827*	−0.898*	−0.897*	0.844*	−0.893*	−0.968**	−0.701
AOX	0.804	0.795	−0.669	0.731	0.605	−0.195	0.444	0.389	−0.552	0.353	0.609	
T (°C)	0.679	0.700	−0.038	0.721	0.975**	−0.884*	0.912*	0.931**	−0.784	0.938**		
Nv_P	0.532	0.542	0.130	0.545	0.955**	−0.980**	0.972**	0.995**	−0.825*			
S_P/V_P	−0.799	−0.772	0.394	−0.667	−0.868*	0.730	−0.930**	−0.872*				
Sv_P	0.573	0.575	0.052	0.555	0.965**	−0.960**	0.990**					
Vv_P	0.649	0.642	−0.078	0.593	0.962**	−0.915*						
Sv_{NL}	−0.404	−0.425	−0.298	−0.464	−0.886*							
Sv_{LF}	0.669	0.670	−0.085	0.643								
Nv_L	0.942**	0.969**	−0.523									
S_L/V_L	−0.714	−0.671										
Sv_L	0.996**											

Volume density (Vv), surface density (Sv), surface-to-volume ratio (S/V) and numerical density (Nv) of the lysosomal (subscript L) and peroxisomal (subscript P) system, and of the lipofuscin (subscript LF) and neutral lipid (subscript NL) contents of the digestive gland.
Temperature (T, °C), adsorbable organo-halogenated compounds (AOX) and dissolved dioxygen (O_2).
* $P \leq 0.05$.
** $P \leq 0.01$.

Table 4
Results of the physico-chemical analysis carried out on the Moselle-PPME

Parameters	Units	Upstream	Downstream 1	Downstream 2
AOX[a]	$\mu g\,Cl\,l^{-1}$	40.0	<10.0	57.0
pH[b]		7.16 ± 0.04	7.79 ± 0.07	7.59 ± 0.05
T[b]	°C	12.2 ± 2.9	14.0 ± 2.6	13.2 ± 2.8
Conductivity 20 °C[b]	$\mu S\,cm^{-1}$	92 ± 5.7	270 ± 10.6	161 ± 2.1
Dissolved O_2[b]	%	99.6 ± 4.1	100.2 ± 4.6	95.7 ± 4.4
H_2O_2[c]	$mg\,l^{-1}$	<10	0	1
Suspended matter[d]	$mg\,l^{-1}$	5.3 ± 2.3	5.4 ± 2.8	8.0 ± 2.8
COD[d]	$mg\,l^{-1}$	9.0 ± 1.4	24.9 ± 1.4	18.7 ± 4.2
BOD_5[d]	$mg\,l^{-1}$	1.8 ± 0.6	1.8 ± 0.9	2.4 ± 0.3
Cl^{-}[d]	$mg\,l^{-1}$	9.7 ± 0.5	24.0 ± 2.3	16.4 ± 1.6
SO_4^{2-}[d]	$mg\,l^{-1}$	7.5 ± 1.5	32.4 ± 3.6	18.0 ± 1.4
Ca^{2+}[d]	$mg\,l^{-1}$	7.2 ± 0.6	14.6 ± 3.6	10.2 ± 0.5
Na^{+}[d]	$mg\,l^{-1}$	8.0 ± 0.3	33.3 ± 1.0	18.0 ± 0.0
Mg^{2+}[d]	$mg\,l^{-1}$	1.4 ± 0.1	2.1 ± 0.2	1.7 ± 0.0
K^{+}[d]	$mg\,l^{-1}$	1.6 ± 0.2	3.6 ± 0.1	2.4 ± 0.0
NH^{4+}[d]	$mg\,N\,l^{-1}$	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.07
NO^{2-}[d]	$mg\,N\,l^{-1}$	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
NO^{3-}[d]	$mg\,N\,l^{-1}$	0.71 ± 0.02	0.83 ± 0.23	0.76 ± 0.08
N Kjedahl[d]	$mg\,N\,l^{-1}$	0.53 ± 0.02	0.60 ± 0.04	0.60 ± 0.00
PO_4^{3-}[d]	$mg\,P\,l^{-1}$	0.055 ± 0.025	0.055 ± 0.025	0.056 ± 0.027
P total[d]	$mg\,P\,l^{-1}$	0.097 ± 0.043	0.103 ± 0.040	0.116 ± 0.028
Cd[e]	$\mu g\,l^{-1}$	0.1	0.2	<0.1
Cr[e]	$\mu g\,l^{-1}$	0.5	1.6	1.0
Cu[e]	$\mu g\,l^{-1}$	14.0	4.0	23.0
Fe[e]	$\mu g\,l^{-1}$	0.14	0.13	0.20
Ni[e]	$\mu g\,l^{-1}$	1.3	<0.5	0.8
Pb[e]	$\mu g\,l^{-1}$	3.6	2.8	2.7
Zn[e]	$\mu g\,l^{-1}$	17.0	17.0	20.0

Results are given as mean ± S.D. (parameters determined on two or more dates) or as single value (one date only).
[a] Water for AOX quantification was prelevel at day 21 for further analysis.
[b] Parameters were monitored at transplantation day (day 0) and at day 3, day 14 and day 21 directly in the field (pH, O_2, T (°C), conductivity).
[c] H_2O_2 was monitored in the field at the end of the experiment.
[d] Water was sampled at day 0 and day 21.
[e] Water for metal determination was sampled at the beginning of the experiment.

3.2.6. *Relationships among stereological and physico-chemical parameters*

In general, the same trends as in the Ton-BPPME experiment were found (Table 6), except for lysosomal parameters. Here, the lysosomal size (inverse from the S_L/V_L ratio) correlated positively with the lipofuscin content and the peroxisomal Vv_P and Sv_P, and negatively with the neutral lipid Sv_{NL}. Lysosomal Vv_L and Sv_L correlated positively with temperature.

4. Discussion

This study was aimed at testing the field applicability of a set of candidate cellular biomarkers in *Radix peregra* and demonstrating their relevancy in the detection of early biological responses during an in situ exposure to point-source anthropogenic stressors. To our knowledge, this represents the first reported investigation on subcellular changes using histochemistry and automated image analysis in a freshwater gastropod species.

In situ exposure to two different PPME induced short-term variations on the structure of the snails' digestive lysosomal system and on associated lipofuscin and neutral lipid contents, and to a lesser extent to the peroxisomal system.

These field studies consisted in exposure to a whole array of stressors of varied nature, implying multiple organic and metallic contamination, as well as variations of abiotic factors such as temperature. The lysosomal system, which is known to respond to a wide range of xenobiotics and stressors may thus be subjected to synergistic and/or antagonistic effects of certain classes of contaminants/stress factors present in this complex mixture. Moreover, even in the case of laboratory exposures to organic contaminants, the lysosomal system may behave in complex and not fully understood patterns, depending in particular on the nature of the contaminant, as well as the exposure level (Marigómez and Baybay-Villacorta, 2003).

Indeed, the occurrence of smaller and more numerous lysosomes, 3 days after the transplantation in animals exposed at

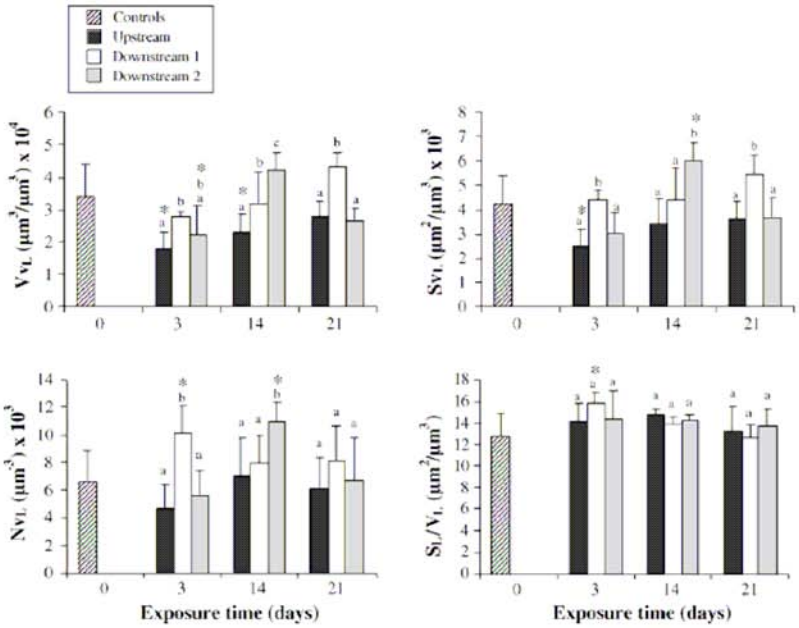


Fig. 6. Lysosomal volume density (Vv_L), surface density (Sv_L), numerical density (Nv_L) and surface-to-volume ratio (S_L/V_L) in the digestive gland of *R. peregra* exposed to the Moselle-PPME for 21 days. Histogram bars represent means + S.D. For each exposure time, different letters indicate significant differences between sites and asterisks show significantly different means compared with controls (Duncan's test, $P < 0.05$).

the immediate vicinity of the Moselle-PPME, and evolving towards lysosomal enlargement after 3 weeks of exposure, may correspond to a biphasic response, which has been hypothesized in marine organisms exposed to organic contaminants. Lysosomal size reduction, accompanied with higher lysosomal membrane stability, have been described at short exposure times and low concentrations, whereas long-term exposure to hydrocarbons were responsible for lysosomal enlargement and reduced membrane stability (for review, see Marigómez and Baybay-Villacorta, 2003). The possibility of a stabilising effect of certain classes of organic pollutants (especially petroleum hydrocarbons) at low exposures, opposed to a subsequent destabilising effect at high exposures has been evoked by Moore (1988). Nonetheless, this assumption must be carefully considered since the increase of the lysosomal size after 3 days of exposure leads to a return to the initial surface-

Table 5
Summary of the results of the two-way ANOVAs indicating the effects of in situ exposure to the Moselle-PPME (exposure time, station and their interaction) on the four biomarkers measured in the digestive gland of *Radix peregra*

Biomarkers	Time (d.f. = 3)		Station (d.f. = 2)		Interaction (d.f. = 6)		Residual d.f.
	F-values	*P*(*F*)	*F*-values	*P*(*F*)	*F*-values	*P*(*F*)	
Lysosomal system							48
Vv_L	8.302	0.0001*	7.683	0.0013*	4.220	0.0017*	
Sv_L	5.621	0.0022*	8.656	0.0006*	4.468	0.0011*	
S_L/V_L	4.246	0.0097*	0.008	0.9913	0.740	0.6202	
Nv_L	2.431	0.0765	4.447	0.0169*	3.026	0.0137*	
Lipofuscin							66
Exp Sv_{LF}	1.947	0.1305	2.025	0.1401	1.947	0.0861	
Neutral lipid							75
Sv_{NL}	112.5	<0.0001*	10.78	<0.0001*	3.243	0.0069*	
Peroxisomal system							65
Vv_P	35.30	<0.0001*	2.592	0.0826	0.556	0.7636	
Log_{10} Sv_P	172.4	<0.0001*	9.163	0.0003*	1.670	0.1425	
S_P/V_P	36.55	<0.0001*	0.443	0.6440	0.581	0.7443	
Nv_P	74.46	<0.0001*	9.283	0.0003*	2.917	0.0140	

P(*F*), probability of the Fisher's *F* ratio; d.f., degree of freedom; Vv, volume density; Sv, surface density; S/V, surface-to-volume ratio; Nv, numerical density. 'Exp' and 'Log_{10}' precede the parameter when data were transformed prior analysis to achieve homoscedasticity (Brown–Forsythe, $P < 0.05$).
* Indicate the significance ($P < 0.05$).

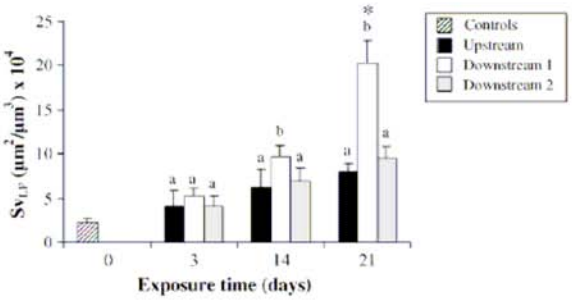


Fig. 7. Lipofuscin surface density (Sv_{LF}) in the digestive gland of *R. peregra* exposed to the Moselle-PPME for 21 days. Histogram bars represent means + S.D. For each exposure time, different letters indicate significant differences between sites and asterisks show significantly different means compared with controls (Duncan's test, $P < 0.05$).

to-volume ratio, and not to irrefutable evidence of lysosomal enlargement.

The general diminution of the lysosomal volume density in snails exposed upstream to the Ton-BPPME was due to a reduction of the individual lysosomal volume from 14 days, followed by a lessening of their number. Though a stabilising effect induced by relatively low levels of organic contaminants already present in the water is possible, further factors may contribute to the changes in this cellular compartment. Indeed, a slight diminution of food intake, either due to reduced food availability or as a behavioural consequence of the transplantation or of the caging, could also account for such decreased morphometric lysosomal parameters, as long as this situation does not reach starvation level, which, on the contrary, is likely to induce lysosomal enlargement in marine gastropods and mussels (Moore, 1988).

Lastly, the lysosomal enlargement observed in snails exposed to both effluents may result from the combined influence of various stressors, among which are very high levels of copper in the Moselle River. Indeed, metals have been shown to induce such enlargement of lysosomes or increases in their number in laboratory and field studies (Regoli, 1992; Etxeberria et al., 1994; Kadar et al., 2001).

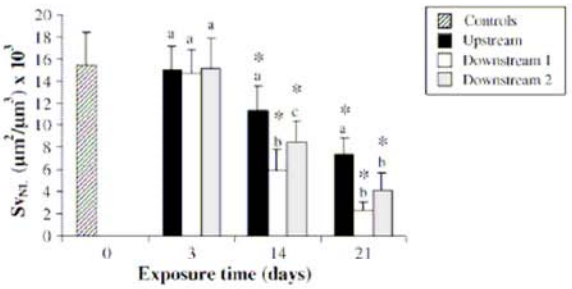


Fig. 8. Neutral lipid surface density (Sv_{NL}) in the digestive gland of *R. peregra* exposed to the Moselle-PPME for 21 days. Histogram bars represent means + S.D. For each exposure time, different letters indicate significant differences between sites and asterisks show significantly different means compared with controls (Duncan's test, $P < 0.05$).

Pathological accumulations of lipofuscin are frequently associated with lysosomal enlargement (Moore, 1988; Regoli, 1992; Krishnakumar et al., 1994; Cavaletto et al., 2002) and/or membrane destabilisation (Moore, 1988; Abele et al., 1998; Cavaletto et al., 2002) in marine bivalve species and are mainly considered as the result of an enhanced autophagy of lipoperoxidation products by lysosomes (Moore, 1988). Our findings showed a time- and pollution gradient-dependant accumulation of lipofuscin in the digestive tubules of snails, which correlates with the lysosomal size increase in the Moselle-PPME experiment. These results are in keeping with the presence in the water of oxidative stressors such as hydrogen peroxide as well as AOX, which dehalogenation during phase I biotransformation may generate radical metabolites likely to induce lipid peroxidation, either directly or after reaction with oxygen (Cossu et al., 1997). The enhanced deposit of lipopigments also observed in snails transplanted at both upstream sites may be related to higher oxidative stress in the streams compared with their water of origin, but also to increased lipoperoxidation due to the gametogenesis. Indeed, maximal lipid peroxidation was evidenced in scallops (*Mizuhopecten yessoensis*) before spawning (Lukyanova and Khotimchenko, 1995). *R. peregra* usually lay eggs in late spring and summer (Krkač, 1979; Gaten, 1986) and the experiment was conducted in late April–May, placing it during the late gametogenesis period.

In addition to this latter phenomenon, lipoperoxidation may also occur directly in lysosomes, in the presence of the superoxide anion $O_2^{-}\cdot$ or hydrogen peroxide, originating mostly from mitochondria (Brunk et al., 1992). Reduced transition metals such as iron or copper may catalyze these reactions and the intralysosomal catabolism of metal-scavenging metallothioneins may explain the presence of these metals in the lysosomes (Viarengo and Nott, 1993). High copper concentrations in the studied streams are likely to have contributed to such catalytic activity after the intake and metabolisation of the metal by the snails. This alternative intralysosomal lipoperoxidation concerns mostly unsaturated fatty acids (Brunk et al., 1992) and may thus account for part of the later discussed reduction of digestive neutral lipid levels, which correlate negatively with the lipofuscin accumulation (see Table 6).

Several deleterious effects may result from lipofuscin accumulation. Indeed, intralysosomal overload of lipofuscin may lead to a "saturation" state, preventing the lysosomes from further accumulating lipoperoxidation products originating from cellular turnover, hence causing cellular damage and decreased adaptability (Brunk and Cadenas, 1988). Furthermore, these swollen residual bodies would be statistically more likely than unloaded lysosomes to trap newly synthesized enzymes, thus decreasing autophagocytotic capacity (Terman et al., 1999; Brunk and Terman, 2002).

Nonetheless, possible secondary protective effects against oxidative stress may result from this enhanced lipofuscinogenesis, insofar as these lipopigments do not interfere with cellular functions (Brunk and Cadenas, 1988). Lastly, in the specific case of molluscan digestive cells, lipofuscin granules would play a possible role in metal detoxication by absorbing metals onto their surface and through the excretion of the residual bodies

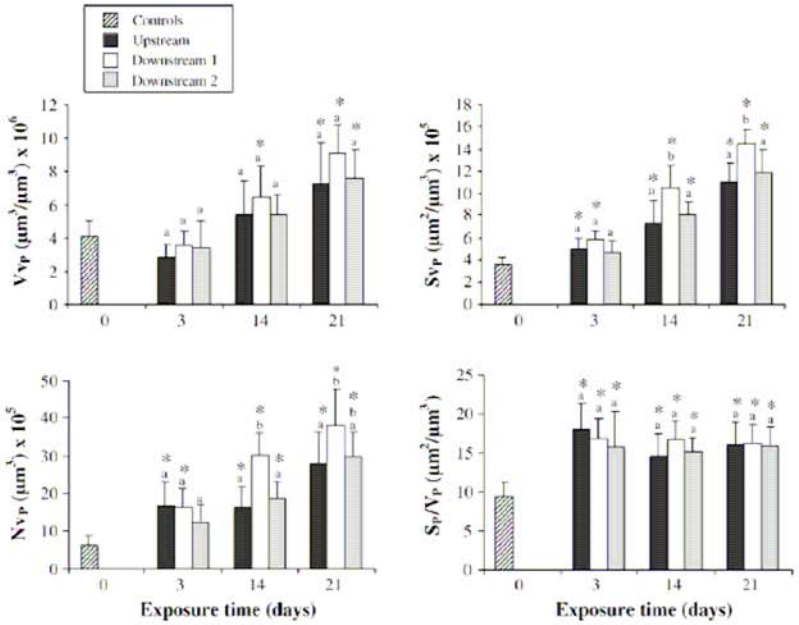


Fig. 9. Peroxisomal volume density (Vv_P), surface density (Sv_P), numerical density (Nv_P) and surface-to-volume ratio (S_P/V_P) in the digestive gland of *R. peregra* exposed to the Moselle-PPME for 21 days. Histogram bars represent means + S.D. For each exposure time, different letters indicate significant differences between sites and asterisks show significantly different means compared with controls (Duncan's test, $P < 0.05$).

into the lumen of the digestive tubules (Viarengo and Nott, 1993).

Our findings show a time- and pollution gradient-dependant depletion of digestive neutral lipids in *Radix peregra* transplanted at the vicinity of the two PPME. Contrary to this phenomenon, unsaturated neutral lipids significantly accumulated in the digestive cells of mussels (*Mytilus edulis*) during a 15-day laboratory exposure to the prototype resin acids usually found in PPMEs, and this was accompanied by an accumulation of tertiary lysosomes (Fåhraeus-Van Ree and Payne, 1999). In marine organisms exposed to organic contaminants and other stressors, such neutral lipid deposit, when associated with lysosomal alterations, is frequently attributed to a "chemically induced lipidosis" (Moore, 1988; Krishnakumar et al., 1994; Abele et al., 1998; Domouhtsidou and Dimitriadis, 2000; Marigómez and Baybay-Villacorta, 2003). Though stress-related neutral lipid diminution seems to be much less often mentioned in the literature, our findings are in agreement with other field studies performed in several freshwater organisms. A loss of lipid vacuoles was observed in the hepatocytes of three fish species living in the receiving areas of PPMEs (Adams et al., 1992; Barker et al., 1994; Mercer et al., 1997). Additionally, depletion of cellular lipids was shown in the digestive gland of the freshwater crab, *Potamonautes warreni*, chronically exposed

Table 6
Pearson's correlation coefficients ($n = 9$) among stereological and two physico-chemical parameters in the Moselle-PPME experiment (on days 3, 7 and 21)

	Vv_L	Sv_L	S_L/V_L	Nv_L	Sv_{LF}	Sv_{NL}	Vv_P	Sv_P	S_P/V_P	Nv_P	T (°C)
O_2	−0.425	−0.305	0.650	−0.014	−0.480	0.726*	−0.759*	−0.699*	0.537	−0.558	−0.676*
T (°C)	0.767*	0.726*	−0.453	0.508	0.700*	−0.886**	0.860**	0.827**	−0.516	0.727*	
Nv_P	0.569	0.421	−0.773*	0.077	0.888**	−0.934**	0.926**	0.970**	−0.083		
S_P/V_P	−0.264	−0.294	−0.240	−0.291	−0.050	0.213	−0.286	−0.147			
Sv_P	0.624	0.486	−0.766*	0.147	0.887**	−0.987**	0.989**				
Vv_P	0.621	0.484	−0.756*	0.149	0.862**	−0.972**					
Sv_{NL}	−0.665	−0.543	0.740*	−0.208	−0.839**						
Sv_{LF}	0.705*	0.556	−0.733*	0.194							
Nv_L	0.738*	0.881**	0.302								
S_L/V_L	−0.404	−0.174									
Sv_L	0.969**										

Volume density (Vv), surface density (Sv), surface-to-volume ratio (S/V) and numerical density (Nv) of the lysosomal (subscript L) and peroxisomal (subscript P) system, and of the lipofuscin (subscript LF) and neutral lipid (subscript NL) contents of the digestive gland.
Temperature (T, °C) and dissolved dioxygen (O_2).
* $P \leq 0.05$.
** $P \leq 0.01$.

to high cadmium concentrations (Schuwerack and Lewis, 2003b), as well as in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*) transplanted to a heavy metal contaminated site (Regoli, 1992).

The observed neutral lipid depletion in *R. peregra* may thus be due to an enhanced consumption of these energetic resources in stressed organisms (Regoli, 1992) to sustain cellular detoxication processes. Furthermore, PPME may contain numerous substances responsible for endocrine disruptions to the biota, and virtually all metabolic and developmental functions are subjected to (neuro-)endocrine control (Francois et al., 2003). The possible link between endocrine disrupting effects of the exposure to the PPMEs and decreasing stocks of non-polar lipids may thus be considered and merits further investigations.

Furthermore, the neutral lipid depletion was a general phenomenon observed in all the transplanted snails with respect to controls. This may correspond to a mobilization of neutral lipids for the gametogenesis, since reserves are usually transferred from the somatic tissues to the gonad before reproduction, in molluscs (Gabbott, 1983). A more or less pronounced reduction of food intake according to the degree of stress is also likely to contribute to the neutral lipid depletion, as already mentioned earlier in the discussion concerning the lysosomal system. Indeed, during fasting periods, molluscs use preferentially their carbohydrate reserves and then lipids, followed by proteins (Gabbott, 1976) and this neutral lipid diminution may thus succeed an earlier glycogen depletion.

In the present study, the structure of the digestive peroxisomal system of the snails exposed to both effluents showed an increase of its volume and surface densities relative to more numerous organelles, whereas their size remained constant. A proliferative response is suggested by these results and is consistent with the occurrence of higher AOX, hydrogen peroxide and temperatures downstream both sewers. Similarly, Mather-Mihaich and Di Giulio (1991) reported an induction of hepatic catalase and of two β-oxidation enzymes, indicating peroxisome proliferation in *Ictalarus punctatus* experimentally exposed to a BPPME. Peroxisome proliferation was also observed at the ultrastructural level in *Cottus gobio* living downstream from two treated paper mills' effluent discharges, with respect to fishes caught upstream (Bucher et al., 1992), but no increase of catalase activity was associated to this response (Bucher et al., 1993).

Additionally, an enhancement of lipoperoxidation just before reproduction, as suggested by the increased lipofuscin deposit, would contribute to activate peroxisomal detoxication of resulting reactive oxyradicals. This antioxidant peroxisomal activity seems nevertheless to be insufficient to prevent the accumulation of lipofuscin.

This field investigation using freshwater gastropods has highlighted interest in studying concomitantly four cellular compartments in a context of complex mixed contamination. Indeed, these responses did not always correlate together and have brought complementary information, as well as a body of evidence suggesting the occurrence of general, oxidative and possible nutritive and reproductive stresses. Deployment of cellular responses using histochemical tests on cryostat sections of molluscan digestive gland and quantified by image analysis has been shown to have potential for use as early biomarkers of harmful effect in freshwater ecotoxicology. Further investigations are necessary in order to elucidate the underlying physiological and/or toxic mechanisms, such as laboratory exposure to individual stressors, implying the concomitant use of histological and physiological indices to provide the most accurate knowledge possible on the reproductive and nutritional status.

Acknowledgements

Antoinette Meyer and Philippe Rousselle are gratefully acknowledged for technical help. The authors wish to thank Sharon Kruger for the final reading of the English version and the CPER-ZAM (Contrat Plan Etat Regions, Zone Atelier Moselle) for the material support to the laboratory.

References

Abele, D., Burlando, B., Viarengo, A., Portner, H.O., 1998. Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol. 120, 425–435.

Adams, S.M., Crumby, W.D., Greeley Jr., M.S., Shugart, L.R., Saylor, C.F., 1992. Responses of fish populations and communities to pulp mill effluents: a holistic assessment. Ecotoxicol. Environ. Saf. 24, 347–360.

Agences de l'eau, 2000. Système d'Evaluation de la Qualité de l'eau des cours d'eau. S.E.Q. eau, version 1. Principes généraux, vol. 64. Les études des Agences de l'Eau, pp. 1–27.

Anton, A., Serrano, T., Angulo, E., Ferrero, G., Rallo, A., 2000. The use of two species of crayfish as environmental quality sentinels: the relationship between heavy metal content, cell and tissue biomarkers and physico-chemical characteristics of the environment. Sci. Total Environ. 247, 239–251.

Au, D.W.T., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. Mar. Pollut. Bull. 48, 817–834.

Barker, D.E., Khan, R.A., Lee, E.M., Hooper, R.G., Ryan, K., 1994. Anomalies in sculpins (*Myoxocephalus* spp.) sampled near a pulp and paper mill. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 26, 491–496.

Brunk, U.T., Cadenas, E., 1988. The potential intermediate role of lysosomes in oxygen free radical pathology. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 96, 3–13.

Brunk, U.T., Jones, C.B., Sohal, R.S., 1992. A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis. Mutat. Res. 275, 395–403.

Brunk, U.T., Terman, A., 2002. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. Free Rad. Biol. Med. 33, 611–619.

Bucher, F., Hofer, R., Salvenmoser, W., 1992. Effects of treated paper mill effluents on hepatic morphology in male bullhead (*Cottus gobio* L.). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 23, 410–419.

Bucher, F., Hofer, R., Krumschnabel, G., Doblander, C., 1993. Disturbances in the prooxidant–antioxidant balance in the liver of bullhead (*Cottus gobio* L.) exposed to treated paper mill effluents. Chemosphere 27, 1329–1338.

Cajaraville, M.P., Marigómez, J.A., Angulo, E., 1991. Automated measurement of lysosomal structure alterations in oocytes of mussels exposed to petroleum hydrocarbons. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 21, 395–400.

Cajaraville, M.P., Uranga, J.A., Angulo, E., 1993. Light microscopic catalase histochemistry in mussel digestive gland tissue. Histol. Histopathol. 8, 537–546.

Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. Sci. Total Environ. 247, 295–311.

Cancio, I., Cajaraville, M.P., 2000. Cell biology of peroxisomes and their characteristics in aquatics organisms. Int. Rev. Cyt. 119, 201–293.

Cavaletto, M., Ghezzi, A., Burlando, B., Evangelisti, V., Ceratto, N., Viarengo, A., 2002. Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. Comp. Biochem. Physiol., Toxicol. Pharmacol. 131, 447–455.

Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Vasseur, P., 1997. Mécanismes de formation et effets des espèces réactives de l'oxygène. In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. (Eds.), Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Masson, Paris, pp. 125–147.

Czech, P., Weber, K., Dietrich, D.R., 2001. Effects of endocrine modulating substances on reproduction in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis* L. Aquat. Toxicol. 53, 103–114.

den Besten, P.J., 1998. Concepts for the implementation of biomarkers in environmental monitoring. Mar. Environ. Res. 46, 253–256.

Domouhtsidou, G.P., Dimitriadis, V.K., 2000. Ultrastructural localization of heavy metals (Hg, Ag, Pb, and Cu) in gills and digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 38, 472–478.

Etxeberria, M., Sastre, I., Cajaraville, M.P., Marigómez, I., 1994. Digestive lysosome enlargement induced by experimental exposure to metals (Cu, Cd, and Zn) in mussels collected from a zinc-polluted site. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 27, 338–345.

Fåhraeus-Van Ree, G.E., Payne, J.F., 1999. Enzyme cytochemical responses of mussels (*Mytilus edulis*) to resin acid constituents of pulp mill effluents. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 63, 430–437.

Francois, E., Wang, D.-Y., Fulthorpe, R., Liss, S.N., Edwards, E.A., 2003. DNA microarrays for detecting endocrine-disrupting compounds. Biotechnol. Adv. 22, 17–26.

Gabbott, P.A., 1976. Energy metabolism. In: Bayne, B.L. (Ed.), Marine Mussels: Their Ecology and Physiology. Cambridge University Press, London, pp. 293–355.

Gabbott, P.A., 1983. Developmental and seasonal metabolic activities in marine molluscs. In: Hochachka, P.W. (Ed.), The Mollusca. Academic Press, New York, pp. 165–217.

Gaten, E., 1986. Life cycle of *Lymnaea peregra* (Gastropoda: Pulmonata) in the Leicester cancal, U.K., with an estimate of annual production. Hydrobiologia 315, 45–54.

Giambérini, L., Cajaraville, M.P., 2005. Lysosomal responses in the digestive gland of the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*, experimentally exposed to cadmium. Environ. Res..

Giambérini, L., Pihan, J.C., 1997. Lysosomal changes in the hemocytes of the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha* experimentally exposed to lead and zinc. Dis. Aquat. Org. 28, 221–227.

Hayer, F., Wagner, P., Pihan, J.C., 1996. Monitoring of extractable organic halogens (EOX) in chlorine bleached pulp and paper mill effluents using four species of transplanted aquatic molluscs. Chemosphere 33, 2321–2334.

Kadar, E., Salanki, J., Jugdaohsingh, R., Powell, J.J., McCrohan, C.R., White, K.N., 2001. Avoidance responses to aluminium in the freshwater bivalve *Anodonta cygnea*. Aquat. Toxicol. 55, 137–148.

Krkač, N., 1979. Temperature and reproductive cycle relations in *Radix peregra* O.F. Muller. Malacologia 18, 227–232.

Krishnakumar, P.K., Casillas, E., Varanasi, U., 1994. Effect of environmental contaminants on the health of *Mytilus edulis* from Puget Sound, Washington, USA. I. Cytochemical measures of lysosomal responses in the digestive cells using automatic image analysis. Mar. Ecol. Prog. Ser. 106, 249–261.

Kukkonen, J., 1992. Effects of lignin and chlorolignin in pulp mill effluents on the binding and bioavailibility of hydrophobic organic pollutants. Water Res. 26, 1523–1532.

Lowe, D.M., Moore, M.N., Clarke, K.R., 1981. Effects of oil on digestive cells in mussels: quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. Aquat. Toxicol. 1, 213–226.

Lukyanova, O.N., Khotimchenko, Y.S., 1995. Lipid peroxidation in organs of the scallop *Mizuhopecten yessoensis* and sea-urchin *Strongylocentrotus intermedius* during the reproductive cycle. Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol. 110, 371–377.

Marigómez, I., Orbea, A., Olabarrieta, I., Etxeberria, M., Cajaraville, M.P., 1996. Structural changes in the digestive lysosomal system of sentinel mussels as biomarkers of environmental stress in Mussel-Watch programmes. Comp. Biochem. Physiol. Part C: Pharmacol. Toxicol. 113, 291–297.

Marigómez, I., Baybay-Villacorta, L., 2003. Pollutant-specific and general lysosomal responses in digestive cells of mussels exposed to model organic chemicals. Aquat. Toxicol. 64, 235–257.

Mather-Mihaich, E., Di Giulio, R.T., 1991. Oxidant, mixed-function oxidase and peroxisomal responses in channel catfish exposed to a bleached Kraft mill effluent. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20, 391–397.

Mercer, I.R.G., Barker, D.E., Khan, R.A., 1997. Stress-related changes in cunner, *Tautogolabrus adspersus*, living near a paper mill. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 58, 442–447.

Moore, M.N., 1980. Cytochemical determination of cellular responses to environmental stressors in marine organisms. Rapp. P.-v. Réun. Cons. int. Explor. Mer. 179, 7–15.

Moore, M.N., 1985. Cellular responses to pollutants. Mar. Pollut. Bull. 16, 134–139.

Moore, M.N., 1988. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. Mar. Ecol., Prog. Ser. 46, 81–89.

Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W., Leonard, P., 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. Mutat. Res. 552, 247–268.

Orbea, A., Marigómez, I., Fernandez, C., Tarazona, J.V., Cancio, I., Cajaraville, M.P., 1999. Structure of peroxisomes and activity of the marker enzyme catalase in digestive epithelial cells in relation to PAH content of mussels from two Basque estuaries (Bay of Biscay): seasonal and site-specific variations. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 36, 158–166.

Owen, G., 1972. Lysosomes, peroxisomes and bivalves. Sci. Prog. 60, 299–318.

Pain, S., Parant, M., 2003. Response of multixenobiotic defence mechanism in *Dreissena polymorpha* exposed to environmental stress. Chemosphere 52, 1105–1113.

Pearse, A.G.E., 1972. Histochemistry, Theoretical and Applied, vol. II. Churchill-Livingstone, London.

Regoli, F., 1992. Lysosomal responses as a sensitive stress index in biomonitoring heavy metal pollution. Mar. Ecol. Prog. Ser. 84, 63–69.

Schuwerack, P.M.M., Lewis, J.W., 2003a. Cellular responses to increasing Cd concentrations in the freshwater crab, *Potamonautes warreni*, harbouring microbial gill infesites. Cell Tissue Res. 313, 335–346.

Schuwerack, P.M.M., Lewis, J.W., 2003b. The mode of action of acute and chronic concentrations of waterborne Cd in the digestive gland of the acclimated infested freshwater crab (*Potamonautes warreni*). Cell Tissue Res. 312, 249–263.

Suntio, L.R., Shiu, W.Y., Mackay, D., 1988. A review of the nature and properties of chemicals present in pulp mill effluent. Chemosphere 17, 1249–1290.

Svendsen, C., Weeks, J.M., 1995. The use of a lysosome assay for the rapid assessment of cellular stress from copper to the freshwater snail *Viviparus contectus* (Millet). Mar. Pollut. Bull. 31, 139–142.

Terman, A., Abrahamsson, N., Brunk, U.T., 1999. Ceroid/lipofuscin-loaded human fibroblasts show increased susceptibility to oxidative stress. Exp. Gerontol. 34, 755–770.

Triebskorn, R., Böhmer, J., Braunbeck, T., Homnen, W., Köhler, H.R., Lehman, R., Oberremm, A., Schaiger, J., Segner, H., Schürmann, G., Traunspurger, W., 2001. The project VALIMAR (VALIdation of bioMARkers for the assessment of small stream pollution): objectives, experimental design, summary of results, and recommendations for the application of biomarkers in risk assessment. J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery 8, 161–178.

Viarengo, A., Moore, M.N., Mancinelli, G., Mazzucotelli, A., Pipe, R.K., Farrar, S.V., 1987. Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and accumulation in marine mussels: the effect of cadmium in the presence and absence of phenanthrene. Mar. Biol. 94, 251–257.

Viarengo, A., Nott, J.A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. C: Comp. Pharmacol. Toxicol. 104, 355–372.

Yin, D., 1996. Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. Free Rad. Biol. Med. 21, 871–888.

Annexe 2 : fiches-protocoles détaillées

MISE EN EVIDENCE DU SYSTEME LYSOSOMAL

Adapté de :
Cajaraville, M.P., Marigómez, J.A., Angulo, E. (1991b) Automated measurement of lysosomal structure alterations in oocytes of mussels exposed to petroleum hydrocarbons. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 21, 395-400.

- Coupes congelées de 8 µm placées **3 h** à 4°C, puis **5 min** à température ambiante.
  Mettre en route le bain-marie 1 h avant la révélation à 37°C, allumer l'agitation au moment de l'incubation.

- Incubation pendant **30 min** à 37°C sous agitation dans le milieu (préparé 3 h à l'avance) contenant :
  - *Tampon acétate (pH 4,5) 0.05 M*
  - *Bicarbonate de sodium 50 mM*

  Réserver quelques mL du mélange pour y dissoudre le substrat par la suite.
  - *Alcool polyvinylique 20 % (masse/volume)*

  Ajouter le PVA en pluie, très progressivement pour éviter la formation de grumeaux**, agitation douce**, en chauffant légèrement. Ecraser les mottes à la cuillère si besoin.
  - *Substrat : 1-Naphthol AS-BI-β-D-glucuronide, dilué dans le mélange réservé*

  Veiller à bien répartir le substrat dans l'ensemble de la solution, mélanger à la cuillère si besoin.
  - *NaCl 2.5 % (espèces marines uniquement)*

- Rincer dans une *solution de NaCl 0.05 M* (soit 1.77 g / L) à température ambiante.
  Rincer dans de grands contenants pour avoir plus d'espace et bien ôter l'alcool polyvinylique.

- Incubation pendant **10 min** à température ambiante sous agitation, dans le milieu contenant :
  - *le sel de diazonium (Fast garnet Sigma) 0.1 %*
  - *Tampon phosphate 0.05 M pH 7.4*
  - *NaCl 2.5 % (espèces marines uniquement)*

  Milieu stable quelques heures.

- Post-fixation au Formol de Baker calcique pendant **10 min** à température ambiante.

- Rinçage à l'eau bidistillée.

- Facultatif : contre-coloration dans une solution de fast Green 0.1 % (Sigma) suivie d'un rinçage à l'eau bidistillée

- Montage en milieu aqueux, gélatine de Kaiser.

PROTOCOLE DE REVELATION DES LIPOFUSCINES

Adapté de la technique de Schmorl dans :

MOORE M. N., 1988. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics, Marine Ecology - Progress Series, 46, 81-89.

- Coupes congelées de 8 µm (10 µm) placées **3 h** à 4°C.
- Post-fixation au Formol de Baker calcique pendant **15 min** à 4°C.
- Rinçage dans eau distillée.
- *Incubation pendant **8 min** (unio, bythinia) ou **10 min** (poisson, dreissène, corbicule et gammare) dans du chlorure ferrique (1%) et du ferricyanure de potassium (1%) dans un rapport 3 : 1. (15 min :* Sunetta scripta *et* Perna viridis*)*

  Préparer le mélange extemporanément car sa durée de vie est de 10 min !

- *Rinçage dans l'acide acétique (1%) pendant **1 min**.*
- *Rinçage à l'eau distillée.*
- *Montage en milieu aqueux, gélatine de Kaiser.*

PROTOCOLE DE REVELATION HISTOCHIMIQUE DES LIPIDES NEUTRES INSATURES

Adapté de la technique de Lillié et Ashburn (1943) modifiée par :

MOORE M. N., 1988. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics, Marine Ecology - Progress Series, 46, 81-89.

- Coupes congelées de 8 µm (10 µm chez Moore) placées **3 h** à 4°C.
- Post-fixation au Formol de Baker calcique pendant **15 min** à 4°C.
- Rinçage dans eau distillée pendant **3 min**.
- *Placer dans triéthylphosphate (60%) dans eau distillée pendant **3 min** à 20°C.*

  Bien agiter la solution de triéthylphosphate 30-45 min avant emploi pour que le mélange soit complètement homogène et refroidi (car il chauffe à 60°C).

- *Incubation pendant **15 min** à 20°C dans triéthylphosphate (60%) et oil red O (1%) dans eau distillée.*

  Préparer le colorant 2 h au moins et 24 h au plus avant usage, laisser reposer 1 h et filtrer sur filtre Whatman avant emploi.

- *Différenciation dans triéthylphosphate (60%) dans eau distillée pendant **30 sec**.*
- *Rinçage à l'eau distillée.*
- *Montage en milieu aqueux, gélatine de Kaiser (ou dans milieu de montage aqueux sans UV et contenu lipidique déterminé au microdensimètre Vickers M85 à 530 nm).*

Ne pas appuyer sur les lamelles pendant le montage et stocker les lames à plat!

PROTOCOLE DE REVELATION HISTOCHIMIQUE DE LA CATALASE PEROXYSOMALE

Adapté de :

CANCIO I., ORBEA A., VÖLKL A., FAHIMI H. D. et CAJARAVILLE M. P., 1998. Induction of peroxisomal oxidases in mussels: comparison of effects of lubricant oil and benzo(a)pyrene with two typical peroxisome proliferators on peroxisome structure and function in *Mytilus galloprovincialis*, Toxicology and Applied Pharmacology, 149, 64-72.

- Coupes congelées de 8 µm placées **3 h** à 4°C.

- Fixation : Formaldéhyde 4 % dans tampon P (pH 7.4, 0.05 M) à 4°C pendant **5 h** (avec sucrose 6% et NaCl 2% en milieu marin).
  Dissoudre le formaldéhyde à chaud, puis laisser refroidir à 4°C

- Rinçage dans tampon P (pH 7.4, 0.05 M).

- Incubation dans le noir à 42°C pendant **40 min** dans un milieu contenant :
  - 0.2 % DAB (3-3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride)
  - 0.3 % H_2O_2
  - 0.01 M imidazole

  Dans tampon Theorell-Stenhagen (pH 10.4, 0.01 M).

  Préparer le milieu d'incubation 1 h à l'avance, dans le noir, et chauffer légèrement juste avant usage (42°C)

- *Rinçage dans le tampon Theorell-Stenhagen (pH 10.4, 0.01 M).*

- *Rinçage à l'eau distillée.*

- *Montage en milieu aqueux, gélatine de Kaiser (ou déshydratation et montage à l'Eukitt).*

Tampons et réactifs

Formol de Baker calcique :

- Formol 30 % (neutralisé à la soude) : 100 mL
- $CaCl_2$: 20 g
- Eau bidistillée qsp 1 L

Stockage 4°C.

Bicarbonate de sodium 50 mM :

- $NaHCO_3$: 4.2 g
- Eau bidistillée qsp 1 L

Stockage 4°C.

Tampon acétate 0.05M, pH 4.5 :

- Acétate de sodium ($NaCH_3$ COO, 3 H_2O) : 6.12 g
- Eau bidistillée : 450 mL
- Acide acétique : 6.3 mL
- NaCl : 2.5 g (espèces marines uniquement)
- Eau bidistillée qsp 1 L

Ajuster pH à 4.5.

Stockage 4°C.

Tampon phosphate (Sörensen) 0.1 M, pH 7.4 :

- Phosphate de disodium (Na_2HPO_4 , 12 H_2O) : 28.92 g
- Monosodium de phosphate (NaH_2PO_4 , 10 H_2O) : 2.65 g
- Eau bidistillée qsp 1 L

Ajuster pH à 7.4.

Stockage 4°C.

Tampon Theorell-Stenhagen (p 1825 histochimie n°2) :

pH 10.4 à 18°C : *Solution A = 100 mL*

Solution B = 81.8 mL acide chlorhydrique 0.1N

Solution C = 318.2 mL eau distillée.

Solution A : *Acide phosphorique = V mL*

Acide citrique = V' mL

Acide borique = 0.354 g

Soude 1 N = 34.3 mL

Eau distillée qsp 100 mL.

Titration :

Acide phosphorique : 35 mL acide phosphorique à 85 % dans 1 L d'eau distillée

Titrer avec la soude N (virage phénolphtaléine pH 8.2)

Soit V le volume de la solution qui correspond à 100 mL de soude

Acide citrique : dissoudre 70 g d'acide citrique dans 1 L d'eau distillée

Titrer avec la soude N (virage phénolphtaléine pH 8.2)

Soit V' le volume de la solution qui correspond à 100 mL de soude

→ *Titrer un petit volume connu de l'acide (ex : 5 mL), noter le volume de soude N pour arriver au virage, en déduire V pour 100 mL de soude*

Annexe 3 : Données physico-chimiques et trophiques de l'étude saisonnière

STATION ①	température °C	O_2 mg/L	saturation en O_2 %	DCO mg O_2/L	conductivité µS/cm	pH	Cu µg/L	Zn µg/L	Cl^- mg/L	Na^+ mg/L	K^+ mg/L	SiO_2 mg/L	chlorophylle a µg/L	phéopigments µg/L	NH_4^+ mg/L	NO_3^- mg/L	NO_2^- mg/L	N Kj mg/L	PO_4^{3-} mg/L	P tot mg/L	MES mg/L	Secchi m	$CaCO_3$ mg/L
nov-00	9,9	9,8	90	30	1410	8,1	5,3	37,0	300	87	5,4	3,5	1,1	7,2	0,18	11,6	0,13	0,73	0,40	0,29	7,6	0,55	160
déc-00	9,5	9,4	85	18	1270	7,9	13,2	43,0	267	84	3,5	3,5	0,4	1,5	0,25	11,7	0,16	0,51	0,35	0,18	15,0	0,70	180
janv-01	7,1	11,4	97	21	1073	8,0	2,8	13,8	241	69	4,3	7,5	1,7	3,8	0,15	9,8	0,10	0,87	0,28	0,26	56,0	0,30	170
févr-01	7,3	11,5	99	21	999	8,0	3,2	23,7	181	66	4,2	7,5	1,1	2,0	0,19	10,1	0,10	0,63	0,26	0,22	33,6	0,60	170
mars-01	9,1	10,4	93	21	730	7,9			142	53	3,6	5,9	2,7	3,6	0,11	9,1	0,11	1,08	0,28	0,33	18,8	0,30	140
avr-01	10,3	10,9	101	15	955	8,0	2,6	13,8	195	67	3,8	6,8	2,9	2,0	0,18	9,5	0,06	0,49	0,26	0,09	2,4	0,85	160
mai-01	13,0	10,0	98	19	810	8,0	3,9	12,7	142	53	3,6	7,4	3,7	3,5	0,18	8,9	0,12	0,70	0,24	0,19	28,8	0,60	140
juin-01	18,6	6,7	74	10	1481	7,7	2,8	7,7	344	116	5,5	1,5	4,1	4,1	0,46	7,5	0,14	0,62	0,40	0,20	15,2	1,00	150
juil-01	23,3	4,9	59	20	1429	7,5	3,9	20,0	365	129	5,6	1,6	1,2	2,3	0,34	6,3	0,13	1,09	0,53	0,24	13,2	1,10	120
août-01	21,9	4,2	49	42	1080	7,4	3,0	10,1	261	107	6,3	2,2	1,1	2,9	0,35	5,7	0,12	0,82	0,65	0,30	27,2	1,20	120
sept-01	16,0	6,5	68	18	1342	7,7	2,1	8,1	288	137	6,1	2,0	1,1	2,7	0,35	7,4	0,19	0,79	0,67	0,29	7,0	1,95	140
oct-01	15,6	7,5	78	31	1261	7,8	2,9	39,0	291	91	5,3	8,6	0,5	3,8	0,32	10,0	0,13	0,80	0,54	0,25	15,6	1,20	150
nov-01	7,7	10,8	94	40	1463	7,9	2,0	16,0	327	90	6,2	7,0	1,9	6,5	0,28	11,9	0,10	0,82	0,34	0,24	32,8	0,50	140
déc-01	6,6	11,0	93	24	1328	8,0	5,9	39,0	320	90	5,1	7,9	0,1	3,3	0,38	11,4	0,14	0,74	0,30	0,18	20,4	0,80	160
janv-02	4,1	12,1	96	18	1313	7,9	2,9	30,0	277	96	5,1	8,1	0,5	1,2	0,60	11,9	0,12	0,73	0,32	0,17	10,0	1,10	190
févr-02	8,4	10,9	96	10	864	8,0	3,1	11,0	167	52	4,2	7,4	1,3	4,3	0,13	9,9	0,10	0,15	0,28	0,18	64,4	0,35	160
mars-02	7,8	10,6	92	17	957	7,9	3,9	15,0	178	66	6,2	8,9	2,1	1,3	0,26	10,3	0,12	0,54	0,26	0,15	10,0	1,20	160
avr-02	11,1	16,4	154	27	1238	8,6	3,9	30,0	288	97	5,1	1,5	78,4	55,0	0,25	7,9	0,10	1,19	0,01	0,18	22,8	0,80	150
mai-02	16,8	10,1	107	25	1487	8,2	6,4	20,0	371	116	6,0	0,4	40,9	17,6	0,16	7,9	0,19	1,00	0,19	0,16	12,8	1,15	140
juin-02	20,2	8,5	97	18	1397	8,0	5,4	25,0	343	125	6,2	0,2	34,7	26,7	0,31	6,0	0,23	1,25	0,31	0,22	15,6	1,00	130
juil-02	22,7	4,7	56	12	1475	7,5	4,8	25,0	376	140	8,4	2,1	13,9	10,9	0,47	4,1	0,14	1,18	0,42	0,26	14,0	0,65	140
août-02	21,0	4,6	53	12	1353	7,4	6,4	15,0	310	151	8,6	5,4	1,6	7,3	0,48	5,4	0,13	1,33	0,62	0,32	19,0	0,90	140
sept-02	20,8	6,3	72	15	1466	7,6	5,7	16,0	355	137	6,9	5,6	3,3	4,2	0,45	5,4	0,10	1,01	0,51	0,22	5,8	1,60	130
oct-02	15,7	8,1	84	12	1430	7,8	4,8	28,0	337	138	7,1	6,0	4,0	7,7	0,39	6,4	0,15	1,11	0,45	0,27	12,2	0,70	130
nov-02	10,0	9,2	84	16	1142	8,0	3,1	52,0	302	79	4,8	7,4	1,7	10,0	0,23	10,9	0,11	1,01	0,24	0,27	18,6	0,30	180
déc-02	6,0	8,7	72	10	1299	8,0	5,5	13,0	305	94	5,1	7,4	0,1	1,5	0,35	11,1	0,21	0,65	0,30	0,15	9,2	1,20	160
moyenne	**13,1**	**9,0**	**86,1**	**20,1**	**1232,8**	**7,9**	**4,4**	**22,6**	**279,7**	**97,3**	**5,5**	**5,1**	**7,9**	**7,6**	**0,3**	**8,8**	**0,13**	**0,8**	**0,4**	**0,22**	**19,5**	**0,9**	**150,4**
médiane	**10,7**	**9,6**	**90,7**	**18,0**	**1306,0**	**7,9**	**3,9**	**20,0**	**295,5**	**92,5**	**5,4**	**6,0**	**1,7**	**3,8**	**0,3**	**9,3**	**0,13**	**0,8**	**0,3**	**0,2**	**15,4**	**0,8**	**150,0**
écart-type	**6,0**	**2,8**	**21,2**	**8,4**	**228,8**	**0,3**	**2,3**	**12,0**	**71,7**	**30,0**	**1,3**	**2,8**	**17,5**	**11,2**	**0,1**	**2,4**	**0,04**	**0,3**	**0,2**	**0,06**	**14,4**	**0,4**	**18,4**

NB : Les valeurs minimales sur la période de 26 mois sont indiquées en bleu et les maxima en rouge.

STATION ②	température °C	O_2 mg/L	saturation en O_2 %	DCO mg O_2/L	conductivité µS/cm	pH	Cu µg/L	Zn µg/L	Cl^- mg/L	Na^+ mg/L	K^+ mg/L	SiO_2 mg/L	chloro-phylle a µg/L	phéo-pigments µg/L	NH_4^+ mg/L	NO_3^- mg/L	NO_2^- mg/L	N Kj mg/L	PO_4^{3-} mg/L	P tot mg/L	MES mg/L	Secchi m	$CaCO_3$ mg/L
nov-00	14,9	9,9	101	36	2140	8,6	44,0	24,0	573	170	nd	12,0	0,1	2,4	0,16	17,6	0,2	0,40	0,96	0,38	nd	1,10	nd
déc-00	13,8	9,4	94	26	1750	9,3	33,5	38,0	433	126	nd	11,8	0,4	1,2	0,08	16,8	nd	0,50	0,63	0,27	nd	0,80	nd
janv-01	11,1	11,3	106	27	1560	8,3	33,2	23,0	355	117	nd	11,6	0,4	0,7	0,05	16,5	nd	0,56	0,55	0,23	nd	0,90	nd
févr-01	12,5	10,3	100	38	1330	8,4	42,0	27,0	273	88	nd	10,8	1,3	0,9	0,05	15,8	nd	0,56	0,49	0,21	nd	0,90	nd
mars-01	13,6	9,6	95	27	1350	8,8	52,2	29,0	337	108	nd	8,9	2,4	2,2	0,02	15,4	nd	0,58	0,49	0,24	nd	0,40	nd
avr-01	14,0	9,5	95	22	1050	8,2	49,5	25,0	206	70	nd	8,6	3,2	1,8	0,08	13,7	nd	0,64	0,42	0,22	nd	0,65	nd
mai-01	17,2	8,1	87	27	1210	8,7	56,6	26,0	252	87	nd	4,2	2,1	1,3	0,17	14,2	0,1	1,07	0,34	0,19	nd	0,90	nd
juin-01	21,4	10,1	117	33	1650	8,4	24,6	17,0	370	138	nd	7,0	0,9	1,5	0,17	11,7	nd	0,63	0,51	2,20	nd	1,10	nd
juil-01	24,9	7,9	97	35	1950	8,3	19,8	16,0	500	158	nd	10,7	0,9	1,4	0,17	10,6	nd	0,57	0,63	0,26	nd	1,10	nd
août-01	25,2	7,2	89	35	1670	8,3	21,3	15,0	425	148	nd	6,1	1,7	2,0	0,07	10,0	nd	0,52	0,80	0,31	nd	1,00	nd
sept-01	20,6	8,7	100	30	1730	8,5	27,0	20,0	405	179	nd	7,3	6,0	4,7	0,11	11,0	nd	0,54	0,95	0,38	nd	1,00	nd
oct-01	20,4	8,4	96	35	1960	8,6	33,0	16,0	458	170	nd	8,9	4,9	3,2	0,07	17,3	nd	0,80	0,83	0,12	nd	0,90	nd
nov-01	16,7	9,8	104	33	1990	8,4	35,0	27,0	504	160	nd	12,7	1,2	1,4	0,10	17,3	nd	0,68	0,84	0,33	nd	1,25	nd
déc-01	12,5	10,1	98	28	1700	8,4	47,0	38,0	401	128	nd	11,6	0,3	1,8	0,23	16,1	nd	0,74	0,59	0,25	nd	0,80	nd
janv-02	8,9	11,8	105	nd	1640	8,6	49,0	31,0	360	120	nd	11,5	0,5	1,3	0,20	17,5	nd	0,72	0,53	0,25	nd	0,60	nd
févr-02	13,1	9,8	96	nd	1820	8,5	58,0	29,0	344	96	nd	12,6	0,7	0,6	0,09	20,5	nd	0,21	0,56	0,23	nd	0,85	nd
mars-02	11,3	10,9	103	nd	1300	8,6	52,1	20,0	252	86	nd	11,7	2,4	0,9	0,12	16,4	nd	0,38	0,44	0,19	nd	0,70	nd
avr-02	14,8	10,1	103	nd	1360	8,5	58,5	28,0	309	99	nd	9,9	1,1	1,5	0,18	16,4	nd	0,81	0,43	0,19	nd	0,50	nd
mai-02	16,5	8,8	93	nd	1660	8,3	56,5	41,0	413	129	nd	2,2	5,6	6,9	0,32	10,8	nd	0,90	0,27	0,17	nd	0,85	nd
juin-02	22,7	7,7	91	nd	2016	8,4	55,8	25,0	574	173	nd	4,4	2,0	1,9	0,37	11,9	nd	0,90	0,45	0,19	nd	1,70	nd
juil-02	22,4	6,3	74	nd	2527	8,3	41,7	25,0	582	188	nd	6,9	1,2	3,1	0,15	10,0	nd	0,91	0,69	0,30	nd	0,90	nd
août-02	24,8	6,1	75	nd	2608	8,7	39,7	23,0	512	215	nd	6,5	10,7	4,6	0,24	10,4	nd	1,17	0,86	0,34	nd	0,80	nd
sept-02	23,9	10,3	125	nd	1980	8,6	26,6	32,0	462	184	nd	7,5	25,6	11,4	0,11	9,4	nd	0,87	0,78	0,35	nd	1,10	nd
oct-02	19,0	10,9	121	nd	1890	8,5	45,1	36,0	440	180	nd	8,0	2,3	2,6	0,12	10,8	nd	0,68	0,76	0,31	nd	1,20	nd
nov-02	15,7	9,5	99	nd	1642	8,5	34,7	28,0	408	116	nd	9,8	1,9	2,2	0,14	12,3	nd	0,56	0,63	0,26	nd	1,80	nd
déc-02	11,2	9,3	88	nd	1726	8,8	55,5	37,0	320	103	nd	12,4	0,1	2,3	0,07	17,1	nd	0,65	0,50	0,22	nd	0,90	nd
moyenne	**17,0**	**9,3**	**98,2**	**30,9**	**1739**	**8,5**	**42,0**	**26,8**	**403**	**136**		**9,1**	**3,1**	**2,5**	**0,14**	**14,1**		**0,7**	**0,6**	**0,33**		**0,95**	
médiane	**16,1**	**9,6**	**97,5**	**31,5**	**1713**	**8,5**	**43,0**	**26,5**	**407**	**129**		**9,4**	**1,5**	**1,9**	**0,12**	**14,8**		**0,6**	**0,6**	**0,25**		**0,90**	
écart-type	**4,9**	**1,4**	**11,5**	**4,8**	**365**	**0,2**	**12,2**	**7,2**	**102**	**39**		**2,9**	**5,2**	**2,3**	**0,08**	**3,2**		**0,2**	**0,2**	**0,39**		**0,31**	

NB : Les valeurs minimales sur la période de 26 mois sont indiquées en bleu et les maxima en rouge.

STATION ③	température °C	O_2 mg/L	saturation en O_2 %	DCO mg O_2/L	conductivité µS/cm	pH	Cu µg/L	Zn µg/L	Cl^- mg/L	Na^+ mg/L	K^+ mg/L	SiO_2 mg/L	chloro-phylle a µg/L	phéo-pigments µg/L	NH_4^+ mg/L	NO_3^- mg/L	NO_2^- mg/L	N Kj mg/L	PO_4^{3-} mg/L	P tot mg/L	MES mg/L	Secchi m	$CaCO_3$ mg/L
nov-00	9,8	9,8	89	32	1220	8,0	8,8	57,0	284	85	5,3	3,6	*1,9*	*6,1*	*0,15*	*13,0*	*0,12*	*0,93*	*0,43*	*0,31*	10,4	nd	150
déc-00	9,6	9,5	86	20	1250	7,9	10,1	51,0	253	80	3,5	3,5	*0,7*	*1,8*	*0,24*	*13,2*	*0,17*	*0,50*	*0,38*	*0,18*	7,0	nd	180
janv-01	7,1	11,8	101	23	1082	8,0	3,9	22,4	241	70	4,2	7,3	*2,0*	*3,5*	*0,15*	*11,2*	*0,10*	*1,19*	*0,30*	*0,28*	53,2	nd	160
févr-01	7,4	11,8	101	14	1021	8,0	4,9	10,4	199	66	4,1	7,5	*1,1*	*1,5*	*0,16*	*12,4*	*0,11*	*0,53*	*0,29*	*0,18*	19,6	nd	170
mars-01	9,1	10,0	90	24	745	7,9			145	48	3,6	6,2	*5,3*	*9,6*	*0,08*	*10,0*	*0,10*	*0,99*	*0,26*	*0,35*	20,4	nd	140
avr-01	11,1	10,2	96	15	996	8,0	1,7	15,8	196	70	3,9	6,9	*2,0*	*1,3*	*0,14*	*11,6*	*0,06*	*0,78*	*0,28*	*0,13*	2,4	nd	170
mai-01	13,2	9,9	98	20	818	8,0	1,5	9,7	153	56	3,5	6,4	*4,0*	*3,2*	*0,13*	*10,2*	*0,12*	*0,68*	*0,13*	*0,17*	34,4	nd	140
juin-01	18,8	6,9	76	10	1470	7,8	1,3	9,9	344	115	5,4	1,5	*3,7*	*3,8*	*0,22*	*8,6*	*0,12*	*0,38*	*0,37*	*0,18*	19,6	nd	150
juil-01	23,1	5,7	68	21	1478	7,6	1,9	13,1	369	126	5,7	1,6	*1,6*	*2,4*	*0,24*	*7,2*	*0,15*	*0,64*	*0,53*	*0,24*	16,4	nd	120
août-01	21,9	5,0	59	44	1180	7,5	1,8	10,4	270	116	6,8	2,3	*1,7*	*2,7*	*0,14*	*8,4*	*0,12*	*0,58*	*0,65*	*0,28*	28,8	nd	130
sept-01	16,2	6,3	66	15	1353	7,8	1,9	16,6	290	139	6,4	2,0	*0,5*	*1,9*	*0,30*	*8,6*	*0,18*	*0,66*	*0,74*	*0,29*	8,2	nd	140
oct-01	15,8	7,3	76	31	1272	7,8	4,6	22,0	288	92	5,3	8,2	*0,4*	*2,5*	*0,17*	*11,1*	*0,10*	*0,70*	*0,47*	*0,22*	12,8	nd	150
nov-01	7,8	10,8	94	43	1362	7,9	5,3	19,0	337	93	6,0	7,3	*1,9*	*6,3*	*0,27*	*12,8*	*0,10*	*0,78*	*0,38*	*0,23*	42,0	nd	130
déc-01	6,7	11,2	95	26	1366	7,9	5,9	29,0	323	92	5,1	8,0	*0,1*	*2,3*	*0,33*	*12,5*	*0,15*	*0,69*	*0,30*	*0,18*	30,8	nd	160
janv-02	4,0	12,1	95	22	1327	8,0	4,0	21,0	284	97	5,3	8,4	*0,7*	*0,8*	*0,51*	*12,9*	*0,12*	*0,65*	*0,31*	*0,15*	8,8	nd	190
févr-02	8,2	11,4	100	10	886	8,0	6,4	15,0	175	53	4,0	7,2	*1,9*	*3,9*	*0,11*	*10,9*	*0,10*	*0,12*	*0,28*	*0,27*	54,4	nd	160
mars-02	8,0	10,7	93	15	936	8,0	3,6	12,0	172	64	7,3	8,8	*3,2*	*1,9*	*0,22*	*12,1*	*0,12*	*0,48*	*0,26*	*0,16*	17,2	nd	160
avr-02	10,9	17,2	161	28	1225	8,7	2,9	13,0	263	93	4,5	1,0	*80,8*	*57,3*	*0,20*	*9,4*	*0,09*	*1,08*	*0,01*	*0,15*	25,6	nd	150
mai-02	17,2	11,3	121	23	1465	8,3	3,4	18,0	371	109	5,9	0,3	*50,9*	*18,8*	*0,07*	*8,8*	*0,17*	*0,82*	*0,11*	*0,13*	12,4	nd	140
juin-02	20,0	7,3	83	18	1395	7,8	4,2	24,0	343	119	6,2	0,3	*35,8*	*21,9*	*0,15*	*7,1*	*0,18*	*1,62*	*0,29*	*0,18*	10,0	nd	140
juil-02	22,2	6,1	71	13	1478	7,5	3,4	21,0	398	144	7,7	2,0	*33,0*	*17,5*	*0,13*	*6,0*	*0,16*	*1,00*	*0,43*	*0,26*	15,6	nd	150
août-02	21,0	4,8	55	12	1447	7,5	3,3	16,0	315	162	8,7	5,0	*1,1*	*5,8*	*0,32*	*7,0*	*0,13*	*0,71*	*0,67*	*0,32*	30,4	nd	140
sept-02	21,1	5,4	62	15	1529	7,7	9,8	15,0	357	143	7,2	6,0	*0,5*	*3,6*	*0,21*	*7,0*	*0,10*	*0,74*	*0,55*	*0,22*	10,0	nd	140
oct-02	15,8	8,2	85	11	1519	7,8	8,5	28,0	337	144	7,8	5,4	*0,1*	*4,1*	*0,33*	*7,9*	*0,17*	*1,04*	*0,57*	*0,26*	10,6	nd	140
nov-02	9,7	9,1	83	16	1174	8,0	3,4	21,0	302	83	4,7	6,8	*1,9*	*10,0*	*0,20*	*12,3*	*0,10*	*0,80*	*0,24*	*0,27*	15,6	nd	180
déc-02	6,3	9,9	83	11	1307	8,0	5,9	29,0	309	97	5,0	7,2	*0,1*	*1,5*	*0,27*	*12,3*	*0,21*	*0,65*	*0,30*	*0,15*	13,0	nd	160
moyenne	**13,2**	**9,2**	**88,0**	**20,5**	**1242,3**	**7,9**	**4,5**	**20,8**	**281,5**	**98,3**	**5,5**	**5,0**	**9,1**	**7,5**	**0,2**	**10,2**	**0,13**	**0,8**	**0,4**	**0,22**	**20,4**		**151,5**
médiane	**11,0**	**9,9**	**87,7**	**19,0**	**1289,5**	**7,9**	**3,9**	**18,0**	**289,0**	**93,0**	**5,3**	**6,1**	**1,9**	**3,5**	**0,2**	**10,5**	**0,12**	**0,7**	**0,3**	**0,2**	**16,0**		**150,0**
écart-type	**5,9**	**2,8**	**21,3**	**9,2**	**226,6**	**0,2**	**2,6**	**11,6**	**71,7**	**31,5**	**1,4**	**2,8**	**19,4**	**11,6**	**0,1**	**2,3**	**0,03**	**0,3**	**0,2**	**0,06**	**13,6**		**16,9**

NB : Les valeurs minimales sur la période de 26 mois sont indiquées en bleu et les maxima en rouge. Les chiffres en italique se rapportent à des données collectées à l'aval de la station ③.

Annexe 4 : Débits relatifs caractéristiques de la Fensch

Débit relatif de la Fensch et dilution associée par saison

1998-2001 (données agence de l'eau, **1 mesure / mois**)

	tous mois				hiver				printemps				été				automne				tous sauf été			
	u	dil	m	dil	u	dil	m	dil	u	dil	m	dil	u	dil	m	dil	u	dil	m	dil	u	dil	m	dil
moy	2,3	1/44	2,1	1/48	1,6	1/64	1,6	1/64	2,0	1/49	1,9	1/52	4,0	1/25	3,6	1/28	1,4	1/71	1,2	1/80	1,7	1/59	1,6	1/63
e.t.	1,8		1,5		0,7		0,6		1,0		1,2		2,7		2,2		0,7		0,5		0,9		0,9	
95%	5,3	1/19	4,6	1/22	2,7	1/37	2,5	1/40	3,7	1/27	3,9	1/26	8,5	1/12	7,1	1/14	2,5	1/40	2,1	1/47	3,1	1/32	3,0	1/33

1999-2002 (données **incomplètes** DIREN, **1 moyenne de données quotidiennes / mois** : 2000, 10 mois ; 2001 : 1 mois ; 2002 : 11 mois)

moy	2,0	1/50			1,0	1/100			2,0	1/49			3,5	1/28			1,2	1/83			1,4	1/70		
e.t.	1,3				0,2				0,8				1,5				0,5				0,7			
95%	4,2	1/24			1,3	1/80			3,3	1/30			6,0	1/17			2,0	1/50			2,6	1/39		

1999-2002 (données **incomplètes** DIREN, **avec comblement par données agence de l'eau**)

moy	1,9	1/52			1,1	1/90			2,0	1/51			3,3	1/31			1,2	1/83			1,4	1/69		
e.t.	1,2				0,3				0,7				1,5				0,5				0,7			
95%	3,9	1/25			1,6	1/64			3,2	1/31			5,8	1/17			2,0	1/50			2,5	1/40		

u=débit relatif de la Fensch par rapport à uckange (moselle amont) en %
m=débit relatif de la Fensch par rapport à manom (moselle aval) en %
dil = taux de dilution

moy *Taux de dilution représentatif d'une tendance centrale de la saison*
95% *Taux de dilution représentatif des plus hauts débits relatifs de la saison (du "pire" apport de la Fensch en Moselle)*

Annexe 5 : Caractéristiques de l'eau de source employée pour les expositions respectives des dreissènes et des lymnées à différentes dilutions de l'eau de la Fensch et aux herbicides (CEREMEL)

Eau de la source Terres de Flein

Minéralisation ($mg.L^{-1}$)	
Calcium	116
Magnésium	4,2
Sodium	8
Potassium	2,5
Bicarbonates	333
Chlorures	15
Sulfates	24,5
Nitrates	<1
Résidu à sec	370
pH	**7,2**

Résumé

Pour valider une suite de biomarqueurs cellulaires en milieu dulçaquicole, nous avons étudié la structure des systèmes lysosomal et peroxysomal et les variations de contenus en lipofuscines et lipides neutres insaturés dans les tissus digestifs de plusieurs invertébrés, à travers une approche couplant histochimie et analyse d'images.

Les expérimentations *in situ* et bioessais à plus ou moins long terme ont montré la pertinence des réponses cellulaires étudiées pour la mise en évidence de gradients de contamination. Les profils de réponse les plus communs chez les mollusques incluent un gonflement lysosomal, des déplétions de lipides neutres insaturés, une accumulation de lipofuscines et/ou un système peroxysomal plus volumineux. Ces réponses cellulaires précoces peuvent être associées, au niveau individuel, à une désynchronisation de la reproduction entre individus ou à une diminution de l'indice de condition. Chez l'amphipode, *Dikerogammarus villosus*, les profils de réponse du système lysosomal et des lipides neutres sont inversés et la batterie s'est avérée moins pertinente pour la mise en évidence d'un gradient de contamination.

L'étude mensuelle à long terme (2 ans) a souligné l'absence de niveaux de base saisonniers de ces biomarqueurs et l'influence importante de la disponibilité trophique sur les contenus tissulaires en lipides neutres.

Une mise en dépuration de 15 jours du bivalve, *Dreissena polymorpha*, sur son site d'origine, n'a pas montré de réversibilité du profil des réponses cellulaires à un gradient de contamination *in situ*, mais elle a tout de même de limité la déplétion des lipides neutres, aux niveaux intermédiaires de contamination.

Les réponses cellulaires les plus précoces et discriminatives sont le gonflement lysosomal et la déplétion en lipides neutres. Une comparaison d'outils d'analyse intégrative a montré le pouvoir discriminatif accru de la suite de biomarqueur entière, par rapport aux réponses individuelles. Le choix de ces outils en fonction de leur simplicité, de leur souplesse d'utilisation et de la justesse du diagnostic est discuté.

Mots-clefs : approche multi-biomarqueurs ; lysosomes ; peroxysomes ; lipides neutres insaturés ; lipofuscines ; *Dreissena polymorpha ; Corbicula fluminea ; Dikerogammarus villosus ; Lymnaea stagnalis* ; *Integrated Biomarker Response* ; *Analyse en Composantes Principales.*