UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES TECHNOLOGIE SANTE (547)

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS - INTERACTIONS

Spécialité : Ecotoxicologie

Présentée et soutenue publiquement par

Alexandra LEPOUTRE

Le 11 février 2019

MOLLUSQUES BIVALVES : BIOINDICATEURS DE CONTAMINATION DES EAUX DOUCES PAR LES CYANOTOXINES MICROCYSTINES ET LA TOXINE ENVIRONNEMENTALE B-N-METHYLAMINO-L-ALANINE (BMAA) ?

Thèse dirigée par **Alain GEFFARD**

JURY

M. Bastiaan IBELINGS,	Professeur,	Université de Genève,	Rapporteur
M. Vitor VASCONCELOS,	Professeur,	Faculté des sciences de Porto,	Rapporteur
Mme. Cécile BERNARD,	Professeur,	Muséum National d'Histoire Naturelle,	Examinatrice et Présidente
Mme Nicoletta RICCARDI,	Chargée de recherche	Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR),	Examinatrice
M. Alain GEFFARD,	Professeur,	Université de Reims Champagne Ardenne,	Directeur de thèse
Mme. Emilie LANCE	Maître de Conférences,	Université de Reims Champagne Ardenne,	Encadrante

Remerciements

J'aimerai maintenant souligner le fait que cette thèse est le fruit d'un travail d'équipe composées de personnes de tous horizons qui m'ont guidé par leur bienveillance, leur esprit critique et aussi leur bonne humeur. Ainsi, voudrais donc profiter de ce petit encart pour remercier toutes celles et ceux qui m'ont aidées directement ou indirectement.

Je remercie tout d'abord la région Champagne-Ardenne pour avoir financé cette thèse ainsi que L'I.S EC2CO, l'ANSES et le PIREN-SEINE pour leur financement de projets dans lesquels j'ai eu le plaisir d'être impliquée. Je tiens également à remercier le réseau Franco-Néerlandais pour m'avoir attribuée la bourse EOLE, qui m'a permis de me déplacer pendant ma thèse.

Un grand merci à mes rapporteurs Pr. Bas Ibelings et Pr. Vitor Vasconcelos pour m'avoir donné le feu vert pour soutenir cette thèse, à Nicoletta Riccardi pour avoir accepté d'être examinatrice et Pr. Cécile Bernard pour avoir présidé ce jury de thèse. Merci à tous d'avoir pris de votre temps pour juger ce travail de thèse et pour m'avoir apporté des éléments me permettant de prendre plus de recul pour l'améliorer.

Je remercie également les membres de mes comités de pilotages : Dr. Zouher Amzil, Luc Brient, Pr. Myriam Bormans et Pr. Claudia Wiegand. Merci pour vos conseils et pour m'avoir permis de maintenir le bon cap.

Je porte une attention toute particulière à l'équipe de l'UMRI-02 SEBIO, en particulier sur le site de Reims. Merci à chacun d'entre vous pour votre gentillesse et votre bienveillance. Grâce à vous tous, j'ai eu la joie de transformer des heures de travail en réels moments de plaisir constructif.

Je voudrais adresser maintenant de sincères et profonds remerciements aux deux personnes qui m'ont supervisée pendant ma thèse. En effet, l'aboutissement de ce travail repose en grande partie sur la qualité de l'encadrement dont j'ai bénéficié. Ainsi, je tiens à remercier Pr. Alain Geffard, mon directeur de thèse. Qui, malgré ses nombreux engagements, a toujours été disponible pour m'aider à prendre du recul et pour m'apporter de précieux conseil.

Je souhaite aussi chaleureusement remercier mon encadrante Dr. Emilie Lance, pour sa confiance, sa bienveillance, son dynamisme et sa bonne humeur, qui m'ont permis de travailler dans de très bonnes conditions. Merci aussi pour les moments partagés lors de nos nombreux déplacements entre Reims et Rennes.

Je remercie notamment Dr. Aurélie Bigot-Clivot et Dr. Elise David, pour avoir été toujours disponibles et à l'écoute, toujours avec gentillesse, enthousiasme et bonne humeur. Aurélie je te remercie particulièrement pour ta confiance lors de mes stages de Licence et Master. J'ai toujours en mémoire notre installation, surement trop en avance sur son temps, pour activer le PMA, et les bons moments qui ont suivis ces premières utilisations.

Merci aussi au Pr. Stéphane Betoulle pour ses bons conseils et sa bienveillance et ce depuis ma Licence. Sans l'entretien que nous avons eu en M1 je n'aurais pas persévéré dans le domaine de la recherche et je n'aurais jamais découvert ce domaine dans lequel j'ai trouvé ma place, et pour cela je vous suis très reconnaissante.

Merci au Dr. Iris Barjhoux pour tant de choses. Un vrai coach ! Ce fut un réel plaisir de partager son bureau et je lui suis immensément reconnaissante pour tous nos échanges, ses conseils et sa bonne humeur. Et un grand merci aussi pour le temps passé à démystifier les statistiques !

Merci également à Dr. Mélissa Palos Ladeiro d'avoir accepté de m'encadrer pour mon tout premier stage - j'ai l'impression que c'était hier ! - et de m'avoir fait découvert l'écotox et les dreissènes.

Un grand merci également à Laurence Delahaut pour sa gentillesse.

Merci aussi à Lauris, Hakim, Virginie et Gaby, anciens thésards du labo pour votre acceuil, ainsi qu'à mes nouveaux compagnons de pause-café : Elo, Max, Fanny, Cindy et Clément. Je vous souhaite bon courage et succès pour la suite. J'ajouterai un grand merci à Antoine Le Guernic pour sa gentillesse, tes bons conseils professionnels et personnels.

Un grand merci également à Pr. Jean-Marc Porcher et Olivier Palluel pour m'avoir accueillie à l'INERIS le temps de procéder aux travaux d'analyses.

Pendant cette thèse j'ai eu la chance d'aller sur le terrain et de rencontrer de nombreuses personnes sans qui ce travail ne serait pas ce qu'il serait. Ainsi, je tiens à adresser un grand Merci à M. Philippe Courtin pour m'avoir permis d'intégrer le comité scientifique du Lac de L'Ailette et d'avoir pu étudier ce site pendant 2 ans. Merci à vous et à votre équipe du Syndicat Mixte de l'Ailette pour votre appui technique et votre gentillesse.

Merci beaucoup à Luc Brient pour ses conseils et au personnel de Mynyvel pour son aide en terres bretonne. J'ai une pensée émue pour M. Yves Le Médec, pour sa gentillesse et son aide inestimable lors des campagnes de terrain

Dankjewel to Miquel, Els, Wendy and all the Wageningen team! Thank you all of you for making me feel at home during my stay in your lab. Thank you also to Hans Zweers, that I have not met yet, but that allowed me to have an almost complete dataset for my defence.

Un grand merci à tous les stagiaires qui ont participés à ce travail : Nadia, Benjamin, Emilie, Théo, Valentin, Julien, Marine et Sarah ! Sans vous tous je serais encore à la paillasse à l'heure actuelle, merci pour le travail que vous avez accompli ! Travailler avec vous tous m'a beaucoup appris. J'ai réellement apprécié votre dynamisme et votre bonne humeur. Travailler avec vous tous fut un réel plaisir. Je vous souhaite à tous une bonne continuation !

Un grand merci à Sylvain Vrignaud d'avoir accepté d'identifier les bivalves utilisés pendant cette thèse.

Pour finir, je souhaite à remercier du fond du cœur toute ma famille et mes amis. Merci pour votre soutient et vos encouragements. Eh oui, il y a un peu de vous aussi dans toute cette aventure !

Cette thèse est le fruit de nombreux mois de travail, et de nombreux échanges et contacts. Il est probable que j'ai omis de citer quelques noms. Si cela est le cas, veuillez m'en excuser mais sachez que ce qui est écrit ici ne représente qu'une infime partie de ma gratitude envers chacune des personnes qui m'a accompagnée lors de cette aventure.

Spéciale dédicace à Jacques Lepage, Marie-Thérèse Lepoutre et Elie Lepoutre !

Résumé :

La fréquence et l'intensité des proliférations de cyanobactéries toxiques dans les eaux douces augmentent depuis plusieurs années, y compris dans celles utilisées pour l'adduction d'eau potable ou les activités récréatives. Parmi les cyanotoxines, les hépatotoxines microcystines (MCs) sont les plus fréquemment synthétisées et les plus étudiées, alors que peu de données sont disponibles sur l'occurrence de la neurotoxine β-méthylamino-L-alanine (BMAA), également produite par des diatomées. En raison des fortes variations spatio-temporelles des efflorescences de cyanobactéries, les prélèvements ponctuels d'eau comme outils de diagnostic ou de surveillance de la présence de cyanotoxines semblent peu adaptés et sont susceptibles de sous-estimer le risque. En revanche, l'utilisation d'outils intégrateurs telles des espèces bioaccumulatrices, comme les bivalves, peut s'avérer pertinent. La glande digestive des invertébrés est connue pour être l'organe cible majoritaire de l'accumulation des MCs, à la fois sous une forme libre rapidement éliminée, et sous une forme liée à des protéines ayant un temps de résidence plus long dans les tissus. Cependant, peu de données sont disponibles concernant l'organotropisme et les différentes fractions d'accumulation de la BMAA. Cette thèse a contribué à (i) évaluer la pertinence des bivalves *Dreissena polymorpha* et *Anodonta anatina* comme outils de biosurveillance de la présence de BMAA et d'organismes producteurs de MCs dans les eaux douces, et (ii) identifier les fractions d'accumulation des toxines les plus pertinentes pour caractériser le niveau et la dynamique de contamination environnementale. Les résultats montrent que la BMAA est accumulée par les bivalves à la fois sous forme libre et associée aux polypeptides de faible poids moléculaire, sans organe cible particulier, soulignant l'utilisation possible de l'analyse de la fraction totale (libre et liée) comme proxy de contamination. L'analyse de la BMAA dans le corps entier de *D. polymorpha* permet d'évaluer le niveau de contamination du milieu aux concentrations environnementales de BMAA dissoute testées (10 à 50 µg/L) ; les glandes digestives d'*A. anatina* permettant de révéler la présence de la BMAA dans le milieu à partir de 50 µg /L. Concernant la présence de cyanobactéries productrices de MCs dans l'eau, ingérées par les deux espèces, les MCs libres quantifiées chez les bivalves reflètent plus fidèlement les variations temporelles de contamination du milieu que les MCs totales, particulièrement chez *D. polymorpha,* en raison de ses capacités de détoxification. L'accumulation de MCs libres chez *D. polymorpha* permet également de discriminer différents niveaux de contamination environnementale (10 *vs.* 100 µg/L MCs intracellulaires). Chez *A. anatina*, les fortes capacités d'accumulation de MCs, dès 1 µg/L MCs intracellulaires dans le milieu, associée à une élimination tardive, restreignent son usage à l'indication d'une présence/absence de contamination, sans évaluation fine de son intensité ni de sa temporalité.

Mots-clés : Cyanobactéries, Bivalves, Bioaccumulation, Microcystines, β-N-méthylamino-L-alanine, Bioindicateurs

Abstract :

The frequency and intensity of toxic cyanobacterial blooms in fresh waters used for drinking water supply or recreational activities have increased for several years. Among the cyanotoxins, the hepatotoxins microcystin (MCs) are the most frequently produced by cyanobacteria and the most studied, whereas few data are available on the occurrence of the neurotoxin β-methylamino-L-alanine (BMAA), also produced by diatoms. Due to spatio-temporal variations in cyanobacterial bloom location, monitoring the cyanotoxins by punctual water sampling, as tools for diagnosing or monitoring the presence of cyanotoxins, may underestimate the risk. By contrast, the use of integrative tools, such as sentinel bivalve species, may be relevant. MCs accumulate mainly in the digestive gland of invertebrates in two forms: free in the cells, rapidly eliminated, and covalently bound to proteins, having a longer residence time in tissues. However, few data are available on the organotropism and the different accumulation fraction of BMAA. This thesis contributed (i) to evaluate the relevance of the bivalves *Dreissena polymorpha* and *Anodonta anatina* as tools for biomonitoring of BMAA and MC-producers in fresh waters, and (ii) to identify the most appropriate fraction of each toxin that should be analysed in bivalve tissues in order to characterize the level and dynamic of environmental contaminations. Results reveal that BMAA is accumulated by bivalves both in free fraction and associated to low molecular weight polypeptides, without target organ, underling the interest to analyse the total BMAA (free and bound) in bivalves to biomonitor this toxin in water. The analysis of BMAA in *D. polymorpha* whole body allows the evaluation of the water contamination level at environmental concentrations of dissolved BMAA tested (10 to 50 µg /L); *A. anatina* digestive glands allowing to reveal the presence of BMAA from 50 µg/L. Regarding the presence of MC producers in the water, ingested by both species, the quantification of free MCs in bivalves reflects more accurately the temporal variations of the environmental contamination than total MCs, particularly in *D. polymorpha*, because of its high detoxification capacities. The quantification of free MCs in *D. polymorpha* also allows discriminating environmental contamination levels (10 *vs*. 100 µg/L intracellular MCs). The high capacity of MC accumulation by *A. anatina*, from 1 µg /L intracellular MCs in the medium, associated with a slow elimination, seemed to restrict its use to the indication of the presence/absence of MC producers in waters, without any detailed assessment of the intensity nor the temporal dynamics of the contamination.

Keywords : Cyanobacteria, Bivalves, Bioaccumulation, Microcystins, β-N-methylamino-L-alanine, Bioindicators

Sommaire

Table des matières

Introduction générale 1

Chapitre I : Synthèse bibliographique et présentation du travail ... 11

I. La problématique des cyanobactéries 13

I.1. Position taxonomique et diversité morphologique et écologique 13

I.2. Capacités de proliférations de cyanobactéries 17

I.3. Impact des cyanobactéries sur le fonctionnement et l'usage des écosystèmes et sur la santé humaine 17

II. Les cyanotoxines MCs et la toxine environementale BMAA 22

II.1. Les microcystines 22

II.2. La β-N-Méthylamino-L-alanine 31

III. Surveillance des cyanobactéries et des cyanotoxines en eau douce 37

III.1. Seuils d'alerte 37

III.2. Méthodologies et limites 40

III.3. Intérêt de l'utilisation d'espèces sentinelles pour la surveillance des milieux aquatiques 42

IV. Les bivalves dulcicoles proposés comme espèces sentinelles 47

IV.1. Anodonta anatina 47

IV.2. Dreissena polymorpha 49

IV.3. Les différentes voies possibles d'intoxication des bivalves par les cyanotoxines 52

V. Présentation du sujet de thèse et objectifs 57

Chapitre II : Distribution des différentes fractions d'accumulation de la BMAA dans les organes de *D. polymorpha* 62

I. Synthèse des travaux menés 64

II. Abstract 67

III. Introduction 67

III.1. Material and Methods 70

III.2. Mussels sampling and acclimation 70

III.3. Exposure 70

IV. Results 73

V. Discussion 76

V.1. Organ distribution of BMAA in *D. polymorpha* over time of exposure and depuration ... 76

V.2. BMAA accumulation fractions in tissues of *D. polymorpha* 78

V.3. BMAA kinetics of accumulation and elimination within tissues 79
VI. Conclusion 80
VII. References 81

Chapitre III : Etude des cinétiques d'accumulation et d'élimination de la BMAA chez *D. polymorpha* et *A. anatina* exposés par balnéation à un gradient de concentrations environnementales de BMAA 86

I. Synthèse des travaux menés 88
II. Abstract 91
III. Introduction 92
IV. Materials and methods 94
IV.1. Mussels acclimatation 94
IV.2. Experimental design 95
IV.3. Total BMAA extraction and analysis 95
IV.4. Data treatment and statistics 96
V. Results 96
VI. Discussion 100
VI.1. Relevance of the use of both models as bioindicators of the presence of BMAA in fresh waters 102
VII. Conclusion 103
VIII. References 104

Chapitre IV : Etude des cinétiques d'accumulation et d'élimination des MCs libres et totales chez *D. polymorpha* et *A. anatina* exposés à différentes densités de cyanobactéries productrices de MCs. ... 110

I. Synthèse des travaux menés 112
II. Abstract 114
III. Introduction 115
IV. Materials and methods 118
IV.1. Biological materials 118
IV.2. Measurement of the ingestion of cyanobacteria filaments and MCs by bivalves 120
IV.3. Quantification of free MCs by ELISA 121
IV.4. Determination of total MCs content in bivalve tissues by LC-MS/MS 122
IV.5. Calculation of MC exposure, of percentage of accumulation and of condition index 123
IV.6. Statistics 124
V. Results 124

V.1. Condition indexes and mortality 124
V.2. Ingestion of MC-producing cyanobacteria *P. agardhii* by the bivalves 125
V.3. Accumulation and elimination of free and total MCs in digestive glands of *A. anatina* . 127
V.4. Accumulation and elimination of free and total MCs in whole *D. polymorpha* 128
V.5. Accumulation factors 131
VI. Discussion 133
VI.1. Free and total MC kinetics and accumulation capacities of *A. anatina* 133
VI.2. Free and total MCs kinetics and accumulation capacities of *D. polymorpha* 135
VI.3. Potential use of the two bivalves as bioindicators of the presence of MC-producing cyanobacteria in fresh waters 137
VI.4. Which MC fraction, free or total, in mussel tissues, best reveals the contamination levels and dynamic of MC-producing cyanobacteria in fresh waters? 139
VII. Conclusion 140
VIII. References 141

Chapitre V : Evaluation in situ de la pertinence de *D. polymorpha* et *A. anatina* comme outils de biosurveillance des MCs et de la BMAA en eau douce 148

I. Synthèse des travaux menés 150
II. Abstract 153
III. Introduction 154
IV. Materials and methods 157
IV.1. Biological materials 157
IV.2. Sites characterization and caging 158
IV.3. Physiological status of bivalves 159
IV.4. Free and total MC contents in phytoplankton biomass and bivalves 159
IV.5. Identification and quantification of cyanobacteria 160
IV.6. Statistics 160
V. Results 161
V.1. Phytoplankton 161
V.2. MCs in phytoplankton samples and accumulation of free and total MCs by *A. anatina* and *D. polymorpha* 166
V.3. Condition index 169
VI. Discussion 169
VII. Conclusion 173
VIII. References 175

Chapitre VI : Discussion générale 182

I. Détermination des organes cibles et des fractions d'accumulation de la BMAA chez un bivalve d'eau douce. 187

II. Pertinence des deux modèles pour la biosurveillance de la BMAA dans les eaux douces 189

III. Détermination du bivalve et de la fraction d'accumulation de MCs les plus pertinents pour la biosurveillance des organismes producteurs de MCs dans les milieux. 191

IV. Applicabilité et transposition à grande échelle de l'utilisation des bivalves *A. anatina* et *D. polymorpha* pour la biosurveillance des cyanotoxines dans les masses d'eau douces 196

Conclusion générale et perspectives 204

Références bibliographiques 208

Annexes 232

Liste des figures

Figure 1 : (A) Représentation schématique de l'organisation interne d'une cellule de cyanobactérie, modifié d'après Baulina, 2012. (B) Photographie de la coupe transversale d'une cellule de *Microcystis aeruginosa* en cours de division cellulaire, agrandissement x 31 500 (Walsby, 1975)..... 13

Figure 2 : Illustration de la diversité morphologique existant au sein du groupe des cyanobactéries d'après Dvořák et al., 2015. a *Chroococcus subnudus*, b *Ch. limneticus*, c *Cyanothece aeruginosa*, d *Snowella litoralis*, e *Microcystis aeruginosa*, f *Pleurocapsa minor*, g *Planktothrix agardhii*, h *Limnothrix redekei*, i *Arthrospira jenneri*, j *Johanseninema constricum*, k *Phormidium* sp., l, m *Oscillatoria* sp., n *Schizothrix* sp., o *Tolypothrix* sp., p *Katagnymene accurata*, *q Dolichospermum planctonicum*, r *Dolichospermum* sp., s *Nostoc* sp., t *Nodularia moravica*, u, v *Stigonema* sp. Echelle : a–u = 10 µm, v = 20 µm..... 14

Figure 3 : Différentes localisation des efflorescences de cyanobactéries dans la colonne d'eau dans les zones de climat tempéré d'après Salmaso et al (2017). La ligne pointillée indique la limite inférieure de la zone euphotique. Sont représentés : les efflorescences au niveau de la surface de l'eau (1 et 2), dans la colonne d'eau (3, 5 et 6), au-dessus de la zone euphotique (3), s'étendant jusqu'à la fin de la zone euphotique (5), et pendant le brassage d'eau hivernal (6). Sont également représentées les efflorescences sous la glace et métalimnétiques (4), et les efflorescences de cyanobactéries benthiques (8). 15

Figure 4 : Résumé des réponses écologiques et des impacts associés à la formation d'un bloom de cyanobactéries. Modifié d'après Havens, 2008. 18

Figure 5 : Impacts économiques des proliférations de cyanobactéries en eau douce. Modifié d'après Hamilton et al., 2013. 19

Figure 6 : Structure générale des microcystines 23

Figure 7 : Lien entre la sensibilité et la sélectivité des différentes méthodes d'analyse des MCs. D'après Chorus and Bartram, 1999. 26

Figure 8 : Représentation des principales méthodes analytiques permettant de détecter et/ou quantifier les MCs libres dans les matrices biologiques. Modifié d'après Merel et al (2013). 28

Figure 9 : Occurrence des MCs libres dans le lac Taihu, Chine. D'après Jia et al. (2016). 29

Figure 10 : Transfert trophique des MCs libres dans les écosystèmes aquatiques et terrestres. D'après Moy et al. (2016). 30

Figure 11 : Structure de la BMAA et de ses isomères (Jiang et al., 2012) 31

Figure 12 : Hypothèse de la biomagnification de la BMAA sur l'ile de Guam. D'après Cox et al. (2003). 33

Figure 13 : Schéma représentant les différentes fractions de BMAA pouvant être extraites : BMAA totale, BMAA libre, BMAA associée aux polypeptides de faible poids moléculaire (PM), BMAA associée aux polypeptides de haut poids moléculaire. Modifié d'après Faassen, 2017. 35

Figure 14 : Biomagnification de la BMAA en milieu marin. D'après Jonasson et al.(2010).. 36

Figure 15 : Images satellites montrant la dynamique spatiotemporelle d'un bloom de cyanobactéries observé au niveau du Lac Taihu [30.88N à 31.68N, 119.88E à 120,88E, position annotée sur la carte Google Earth (C)] le 27 novembre 2015. Par temps clair (A1-A7) et lors de l'apparition d'une couverture nuageuse (A8). D'après Qi et al., 2018. 40

Figure 16 : Distribution de *A. anatina* (gris) et *Anodonta* sp. (bleu) en Europe. Les aires en gris représentent les aires historiques de distribution de l'espèce. Les points noirs représentent les populations connues après 1991. D'après Lopes-Lima et al (2017). 48
Figure 17 : Cycle biologique de *A. anatina*. Modifié d'après McIvor, 2004; Madill, 2005;Hinzmann et al., 2013; Mollusca of Belarus, 2018. 48
Figure 18 : Photographie d'*A. anatina* et du sillon laissé par le déplacement de l'individu sur le substrat (A) et d'un individu enfoui dans le substrat (B). 49
Figure 19 : Jeunes dreissènes (moins d'un an) 50
Figure 20 : Aire de répartition de *D. polymorpha* en 2008 (rouge), comprenant les zones natives (vert). D'après Gray, 2008. 50
Figure 21 : Cycle biologique de *D. polymorpha*. Adapté d'après Ludyanskiy et al (1993) ;Ackerman et al. (1994); Khalanski (1997); Dionisio Pires et al (2003); U.S Geological Survey, (2017). 52
Figure 22 : Schématisation de la digestion chez les bivalves. D'après Willer and Aldridge, 2017. 52
Figure 23 : Representation of the extraction procedures of various BMAA fractions (total, free, associated to low or high molecular weight polypeptides), adapted from Faassen (2017). 71
Figure 24 : Total BMAA concentrations in gills (yellow), gonad (green), digestive gland (blue dots), mantle (orange), muscles and foot (red) and hemolymph (blue, secondary axis) of *D. polymorpha* during the exposure (from day 1 to 21: blue area) and the depuration (from day 22 to 42: white area). Regarding the hemolymph, technical difficulties prevented the quantification of total BMAA in samples from day 25, although BMAA was detected at each sampling day of the experiment. 74
Figure 25: Mean ± SEM concentrations of BMAA associated to LMWP (orange lines), associated to HMWP (green lines) and free BMAA (dark blue lines) in soft tissues of *D. polymorpha*, during the exposure (from day 1 to 21: blue area) and the depuration (from day 22 to 42: white area). 75
Figure 26 Diagram representation of hypothetical pathway of dissolved BMAA within *D. polymorpha*. Thick arrows indicate major pathways, whereas minor hypothetical transport is shown by thin arrows. Other hypothetical pathways are indicated in dotted lines. Figure adapted from Ricciardi et al. (2016). 78
Figure 27 : Mean ± SEM total BMAA concentrations in digestive glands of *A. anatina* exposed to 1 (A), 10 (B) and 50 (C) µg/L of dissolved BMAA, and in controls (E0), during the exposure (E) and the depuration (D), n=3. * Indicates a significant difference in the BMAA concentrations in tissues between two dates (Mann-Whitney test, p < 0.05). 97
Figure 28 : Mean ± SEM total BMAA concentrations in whole *D. polymorpha* exposed to 1 (A), 10 (B) and 50 (C) µg/L of dissolved BMAA, during the exposure (E) and the depuration (D), n=3. * Indicates a significant difference in the BMAA concentrations in tissues be 99
Figure 29. Mean ± S.E.M number of filaments of *P. agardhii* ingested per day by (A) *A. anatina* and (B) *D. polymorpha*, during exposure to a density of filaments producing an equivalent of 10 µg (grey lines) and 100 µg (black lines) MCs/L, n = 2 aquariums. Days in which the water was completely renewed are indicated with an arrow. 126
Figure 30. Mean ± S.E.M concentrations (µg/g DW) of free (A) and total (B) MCs accumulated in digestive glands of A. anatina exposed to *P. agardhii* producing an equivalent of 1 (white), 10 (grey) and 100 (black) µg MCs/L, during the exposure (E, blue background) and the depuration (D, white background),

n = 3 pools of 6 individuals. No significant difference between concentrations of the same sampling time (Kruskal-Wallis test, p > 0.05). 128

Figure 31. Mean ± S.E.M concentrations (µg/g DW) of free (A) and total (B) MCs accumulated in whole *D. polymorpha* exposed *P. agardhii* producing an equivalent of 1 (white), 10 (grey) and 100 (black) µg MCs/L, measured by ELISA, during the exposure (E, blue background) and the depuration (D, white background), n = 3 pools of 6 individuals. * Indicates a significant difference between concentrations at the same time (Kruskal-Wallis test, p < 0.05). 131

Figure 32: Location of the sampling sites during the two-year investigation period 159

Figure 33 : Proportional abundance of phytoplankton taxonomical classes in the Bièvre site BI (a), Lake Center LC (b) and Ailette site AI (c) of the Ailette Lake, between May and August 2016. 161

Figure 34: Proportional abundance of cyanobacteria species in BI (green), LC (orange) and AI (blue) in 2016. The number in circles indicates percentages occupied by each species in terms of number of cyanobacterial cells, this information is also related to sizes of circles. Species in orange are known to be able to produce MCs. 162

Figure 35 : Densities of cyanobacteria cells (green) and MC-producing cyanobacteria (orange) in BI (A), LC (B) and AI (C) sites of the Ailette Lake in 2016 163

Figure 36 : Proportional abundance of phytoplankton taxonomical classes in the two investigated sites Bièvre (BI, a) and Ailette (AI, b) of the Ailette Lake in August 2017. 164

Figure 37: Proportional abundance of cyanobacteria species in BI (green) and AI (blue) in August 2017. The number in circles indicates percentages occupied by each species in terms of number of cyanobacterial cells, this information is also related to sizes of circles. Species in orange are known to be able to produce MCs. 165

Figure 38 : Densities of cyanobacteria (green) and MC-producing cyanobacteria (orange) in the two investigated sites BI (A) and AI (B) of the Ailette Lake in 2017 166

Figure 39 : Accumulation (µg/g DW) of free MC (white columns) and total MCs (light grey columns) in *A. anatina* (AN), and of free MCs (dark grey columns) and total MCs (black columns) *D. polymorpha* (DP), caged from May to November 2016 in BI (a), LC (b) and AI (c). Intracellular MC concentrations in water are represented by black pastilles. N/D indicates that the analysis was not performed. 167

Figure 40: Accumulation (µg/g DW) of free MC (white columns) and total MCs (light grey columns) in *A. anatina* (AN), and of free MCs (dark grey columns) and total MCs (black columns) *D. polymorpha* (DP), caged in August 2017 in BI (a) and AI (b). Intracellular MC concentrations in water are represented by black pastilles. N/D indicates that the analysis was not performed. 168

Figure 41 : Arbre de décision pour choisir l'outil de biosurveillance pouvant être utilisé afin d'étudier la présence de cyanobactéries productrices de MCs 199

Figure 42 : Arbre de décision pour choisir l'outil de biosurveillance pouvant être utilisé afin d'étudier la présence de BMAA dissoute 200

Liste des tableaux

Tableau 1 : Représentation des différentes catégories de cyanotoxines, les principales espèces productrices ainsi que le mode d'action étant à l'origine de cette classification. D'après Wiegand and Pflugmacher (2005) ; Hudnell (2008) ; Rzymski and Poniedziałek (2012) ; Rastogi et al (2014)..... 21

Tableau 2 : Recommandations de l'OMS à propos de la présence de cyanobactéries dans les eaux de baignade (Chorus and Bartram, 1999)..... 39

Tableau 3 : Occurrence des MCs libres dans des bivalves d'eau douce..... 44

Tableau 4 : Occurrence de la BMAA dans des bivalves sous différentes fractions : totale, libre et associée à des polypeptides de faible poids moléculaire (PFPM) 45

Tableau 5 : Concentration en MCs libres dans les différents tissus des bivalves d'eau douce..... 54

Tableau 6 : Cumulated percentage of BMAA accumulation (cum % acc) in the digestive glands of *A. anatina* and in whole body of *D. polymorpha*. 100

Tableau 7 : Fresh weight / dry weight ratios per tissue (unpublished studies by the authors)..... 124

Tableau 8 : Cumulated percentage of MC accumulation (cum %acc), amount of ingested MCs (ng)/ mussel between two sampling times, difference in the amount of MCs accumulated (ng) between the same sampling times, and temporary percentage of MC accumulation (temp % acc) of the same time range. 132

Tableau 9 : Percentage of MC-producing cyanobacteria, in density and biovolume, among the entire cyanobacterial community in BI, LC and AI sites of the Ailette Lake from May to August 2016. 164

Tableau 10 : Percentage of MC-producing cyanobacteria, in density and biovolume, among the entire cyanobacterial community in the two investigated sites BI and Al of the Ailette Lake in August 2017.166

Table 1 : Cumulated percentage of BMAA accumulation (cum % acc) in the digestive glands of *A. anatina* and in whole body of *D. polymorpha*. 100

Table 2 : Fresh weight / dry weight ratios per tissue (unpublished studies by the authors) 124

Table 3. Cumulated percentage of MC accumulation (cum %acc), amount of ingested MCs (ng)/ mussel between two sampling times, difference in the amount of MCs accumulated (ng) between the same sampling times, and temporary percentage of MC accumulation (temp % acc) of the same time range. 132

Table 4 : Percentage of MC-producing cyanobacteria, in density and biovolume, among the entire cyanobacterial community in BI, LC and AI sites of the Ailette Lake from May to August 2016. 164

Table 5: Percentage of MC-producing cyanobacteria, in density and biovolume, among the entire cyanobacterial community in the two investigated sites BI and Al of the Ailette Lake in August 2017.166

Introduction générale

Les écosystèmes d'eau douce ne représentent qu'une faible fraction du volume total de l'eau sur Terre. En effet, parmi le milliard de mètres cubes d'eau présents sur la planète, seulement 2,5 % de ce volume est sous forme d'eau douce. Les deux tiers sont sous forme de glace dans les glaciers et les calottes glaciaires. Il a ainsi été estimé que seulement 0,77 % de l'eau présente sur terre est retenue dans les lacs, les rivières, les zones humides, les aquifères souterrains, les pores du sol, les végétaux et enfin dans l'atmosphère (Daily, 1997). Les écosystèmes d'eau douce fournissent des services écosystémiques importants tels que l'approvisionnement en eau potable et l'irrigation des cultures. Ils procurent également un habitat à de nombreuses espèces animales ou végétales dont certaines fournissent à l'homme des ressources alimentaires via des secteurs comme la pêche ou la pisciculture. Enfin, ces écosystèmes peuvent également être lieux d'activités récréatives, ayant des retombées économiques sur les infrastructures environnantes (Daily, 1997; Harrison et al., 2010). La valeur globale de tous les services fournis par les écosystèmes aquatiques d'eau douce est difficilement mesurable, mais représenterait plusieurs milliards de dollars (Daily, 1997). Cependant, ces écosystèmes sont menacés par l'augmentation des pressions anthropiques (rejets de polluants, urbanisation) et par le réchauffement climatique (Jackson et al., 2001; Moss et al., 2011). Ces éléments, associés à l'enrichissement en éléments nutritifs (notamment en azote et phosphore), accroissent l'eutrophisation des écosystèmes, et entraînent une augmentation de l'intensité et de la fréquence des proliférations de phytoplancton, et notamment de cyanobactéries, dans le monde entier (Paerl and Huisman, 2008; Whitehead et al., 2009; Meriluoto et al., 2016).

Les cyanobactéries, microorganismes photosynthétiques, font partie des plus anciens organismes apparus sur Terre il y a 3,5 milliards d'année (Schopf, 2000). Ces organismes ont été observés dans une large gamme de niches écologiques comprenant les écosystèmes dulçaquicoles, saumâtres, marins mais aussi en milieu terrestre (Whitton and Potts, 2000). Dans les eaux douces, les cyanobactéries se développent dans la colonne d'eau, appartenant ainsi à la communauté phytoplanctonique. D'autres sont benthiques, et prolifèrent sur des supports (sédiments, pierres, feuilles de macrophytes). Les cyanobactéries ont des capacités de proliférations importantes. Elles peuvent conduire à l'apparition d'épais tapis à la surface de l'eau ou d'importantes densités de cellules dans la colonne d'eau (Chorus and Bartram, 1999). Ces phénomènes sont appelées blooms ou efflorescences, et sont caractérisés comme tel à partir d'un seuil de 20 000 cellules/mL (Oliver and Ganf, 2000). Les blooms ont des effets

néfastes sur les écosystèmes dulcicoles, avec des répercussions sur différents secteurs économiques comme l'aquaculture ou la pêche (Hamilton et al., 2013).

De plus, les cyanobactéries sont capables de synthétiser des métabolites secondaires dont certains, qualifiés de toxines, sont néfastes pour la santé humaine et animale (Chorus and Bartram, 1999). La structure chimique de ces composés présente une grande variabilité et comprend entre autres des peptides cycliques, des alcaloïdes ou des acides aminés non-protéinogènes. Les cyanotoxines actuellement décrites ont été regroupées en cinq catégories en fonction des effets qu'elles induisent chez les organismes (Dittmann and Wiegand, 2006) : les hépatotoxines, les neurotoxines, les cytotoxines, les dermatotoxines et les toxines irritantes.

Parmi les cyanotoxines, les microcystines (MCs) sont les plus fréquemment retrouvées lors des efflorescences de cyanobactéries, quelle que soit la latitude (Campos and Vasconcelos, 2010). Ces hépatotoxines sont produites durant les phases de croissance des cyanobactéries et restent majoritairement intracellulaires. Elles sont libérées dans le milieu lors de la senescence des cyanobactéries, et se retrouvent sous formes dissoutes ou adsorbées sur des particules en suspension. Les MCs sont des polypeptides formés de sept acides aminés, dont deux sont variables et vont déterminer l'identité des variants. A ce jour, 246 variants de MCs ont été identifiés (Spoof and Arnaud, 2017). Cette famille de cyanotoxines est la plus étudiée, et les mécanismes d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion des MCs dans les organismes sont globalement connus (Campos and Vasconcelos, 2010; Schmidt et al., 2014; Meriluoto et al., 2016).

Les MCs sont connues pour avoir un tropisme vers le foie des vertébrés et la glande digestive des invertébrés (Zurawell et al., 2005). Une fois dans les cellules, les MCs interagissent et inhibent l'activité des protéines phosphatases (Ppases), via la formation de liaisons réversibles ou de liaisons covalentes avec ces protéines. L'inhibition de l'activité de déphosphorylation des enzymes Ppases entraine une cascade de réactions cellulaires, dont la déstructuration du cytosquelette et la perte des jonctions inter-cellulaires. Ceci peut conduire à une hémorragie intra-hépatique, et à la mort en cas d'intoxication aigue (van Apeldoorn et al., 2007; Campos and Vasconcelos, 2010). Deux fractions de MCs peuvent être analysées dans les matrices biologiques : les MCs libres (non liées de manière covalente aux protéines) et les MCs totales (libres et liées aux protéines). L'analyse des cinétiques d'accumulation et d'élimination de ces

fractions chez un gastéropode d'eau douce a montré que les MCs libres étaient plus rapidement éliminées que les MCs liées aux protéines, dont le temps de résidence dans les tissus serait potentiellement lié aux renouvellement des protéines auxquelles elles sont associées (Lance et al., 2010c).

Les MCs sont accumulées par des organismes présents à tous les niveaux du réseau trophique, aussi bien chez des consommateurs primaires ingérant des cyanobactéries (e.g., zooplancton, bivalves, gastéropodes, poissons) que chez des consommateurs secondaires (e.g., poissons) pouvant ingérer des proies contaminées (Kotak et al., 1996; Zurawell et al., 1999; Ibelings et al., 2005; Gkelis et al., 2006; Sotton et al., 2014; Lance et al., 2010a; Papadimitriou et al., 2012; Barda et al., 2015; Paldavičienė et al., 2015; Flores et al., 2018). Chez les consommateurs primaires, l'intoxication se fait principalement par ingestion de cyanobactéries, la voie d'intoxication par les MCs dissoutes étant mineure (Yokoyama and Park, 2002; Lance et al., 2010a).

A ce jour, contrairement aux MCs, peu de données sont disponibles concernant la β-N-Méthylamino-L-alanine (BMAA). Cette neurotoxine est potentiellement impliquée dans le développement de la pathologie neurodégénérative Sclérose Latérale Amyotrophique/Parkinson/Démence (SLA-PDC), ou maladie de Charcot (Cox et al., 2003). Environ 5 à 10 % des formes de SLA-PDC seraient d'origine génétique, les autres étant d'origine environnementale, sans qu'un agent causal ait été formellement identifié (Holtcamp, 2012). Le lien étiologique entre cette pathologie et la BMAA n'est pas démontré à ce jour, mais la voie d'intoxication humaine proposée serait une exposition chronique, à long terme, via l'alimentation. En effet, il a été montré que des organismes aquatiques destinés à la consommation humaine, tels que des moules bleues (*Mytilus edulis*) et des huitres (*Crassostrea virginica*), accumulent de la BMAA dans leurs tissus (Christensen et al., 2012; Réveillon et al., 2016a). Ces organismes semblent être contaminés par l'ingestion de producteurs. Cependant, très peu de données sont disponibles concernant l'identification de ces producteurs (actuellement deux espèces de cyanobactéries et des diatomées), ou l'occurrence de la BMAA dans les milieux aquatiques, sous forme intracellulaire ou dissoute. De même, les organes cibles d'accumulation de la BMAA chez les organismes ne sont pas connus à ce jour. Cependant, une méta-analyse critique des des données disponibles issues des expérimentations *in vitro* et *in vivo* a mis en évidence le caractère neurotoxique de cette molécule (Anses, 2017).

Une fois dans les cellules des organismes contaminés, la BMAA pourrait s'associer ou s'intégrer à des protéines pendant la traduction des ARN messagers en chaînes de polypeptides (Dunlop et al., 2013; Glover et al., 2014). Cette hypothèse est toutefois controversée (Onselen et al., 2017). A ce jour, plusieurs formes d'accumulation de la BMAA dans les organismes cibles ont été mises en évidence : BMAA libre, associée aux polypeptides de faible poids moléculaire, et associée aux polypeptides de haut poids moléculaire. La BMAA totale, étant la somme de toutes ces fractions (Faassen, 2017). La BMAA étant une petite (118.1 Da) molécule hydrophile pour laquelle sept isomères ont été identifiés (Jiang et al., 2012), son analyse est complexe et requiert l'utilisation de méthodes d'analyse très sélectives comme la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) (Faassen, 2014).

Les méthodes actuelles de suivi des cyanotoxines et de leurs producteurs sont basées sur une surveillance visuelle de l'aspect des masses d'eau couplée à des échantillonnages d'eau. La fréquence recommandée est de deux prélèvements par mois, mais celle-ci peut augmenter en cas de changement de l'aspect de l'eau (Meriluoto et al., 2016). Cependant, grâce à leurs capacités de se développer massivement en quelques heures, et de se déplacer verticalement dans la colonne d'eau et horizontalement sous la force des vents, les efflorescences de cyanobactéries présentent une forte variabilité spatio-temporelle. Ainsi, un prélèvement ponctuel d'eau peut ne pas être représentatif de l'historique de contamination, et risque de sous-estimer le niveau de contamination de l'eau par l'omission d'un bloom survenant entre deux dates de prélèvements (Pobel et al., 2011). En revanche, l'utilisation d'outils intégrateurs telles des espèces bioaccumulatrices, comme les bivalves, peut s'avérer pertinent pour mieux connaitre les niveaux de contaminations des masses d'eau par les cyanobactéries et leurs toxines.

Les espèces bioindicatrices sont des organismes ayant la capacité d'accumuler des substances présentes dans l'environnement d'une telle manière que la concentration dans leurs tissus peut fournir une base pour estimer le niveau de contamination de l'environnement (Gadzała-Kopciuch et al., 2004). Comme il peuvent représenter un outil intégrateur de la contamination du milieu, les bivalves d'eau douce ont été proposés en tant que bioindicateurs de la présence de nombreux composés et organismes tel que des métaux, des composés organochlorés, des

éléments trace métalliques et des parasites (Camusso et al., 1994; Kerambrun et al., 2016; Baqar et al., 2018; Su et al., 2018).

Dans ce contexte, le premier objectif de cette thèse a été d'évaluer la pertinence de l'utilisation des bivalves d'eau douce *Anodonta anatina* et *Dreissena polymorpha* comme outils de biosurveillance de la présence de BMAA et de cyanobactéries productrices de MCs dans les écosystèmes dulcicoles. La démarche adoptée fut tout d'abord d'analyser la distribution de la BMAA dans les tissus de *D. polymorpha* afin de déterminer si cette toxine avait un organe cible, qui pourrait être prélevé chez les bivalves dans le cadre d'une biosurveillance. Cette étape n'a pas été réalisée pour les MCs, en raison des connaissances disponibles concernant son organotropisme.

L'étude de la pertinence de l'utilisation des deux modèles en tant qu'espèces sentinelles fut ensuite basée sur des études menées en laboratoire, appuyées par des campagnes d'encagement *in situ* dans des zones sujettes à des proliférations de cyanobactéries. Les deux bivalves ont été exposés en laboratoire à un gradient de cyanobactéries productrices de MCs car celles-ci sont majoritairement intracellulaires (dans les cyanobactéries) dans le milieu. *D. polymorpha* et *A. anatina* ont également été exposés à un gradient de BMAA dissoute apr balnéation, car peu de données sont disponibles sur la biodisponibilité de la BMAA en milieu naturel et aucun organisme produisant de la BMAA de manière continue en laboratoire n'a été mis en évidence.

Le second objectif visait à identifier les fractions d'accumulation des deux toxines (MCs et BMAA) les plus pertinentes à analyser dans les tissus des bivalves pour caractériser le niveau et la dynamique de la contamination environnementale.

Ce manuscrit de thèse a été structuré en six chapitres :

Le chapitre 1 est consacré à une synthèse bibliographique sur les cyanobactéries et les problématiques liées à leur présence. Puis seront abordés la description des cyanotoxines MCs et BMAA, les organismes étant capables de les produire, leurs mécanismes d'action et leur occurrence en milieu naturel. Seront ensuite abordés la surveillance des cyanobactéries et des cyanotoxines en eaux douces avec une description des seuils d'alerte existant, des méthodologies existantes pour surveiller les cyanobactéries et les cyanotoxines ainsi que leurs

limites. Ensuite seront présentés l'intérêt de l'utilisation d'espèces sentinelles pour la surveillance des milieux naturels, les critères requis pour pouvoir qualifier une espèce en tant que sentinelle, les deux modèles d'étude *A. anatina* et *D. polymorpha,* et les différentes voies possibles d'intoxication des bivalves par les cyanobactéries et les cyanotoxines. Enfin, les différentes méthodologies d'analyse des MCs et de la BMAA seront présentées. Les objectifs de cette thèse sont décrits en conclusion de ce premier chapitre.

Le chapitre 2 présente une étude réalisée en collaboration avec le Dr. E. Faassen (RIKILT et Aquatic Ecology and Water Quality Management Group, Wageningen University, Pays-Bas) et le Dr M. Lürling (Aquatic Ecology and Water Quality Management Group, Wageningen University, Pays-Bas), et qui a fait l'objet d'un séjour de 2 mois aux Pays Bas pendant la thèse. Cette étude porte sur la distribution des différentes formes de BMAA (libre, associée à des polypeptides de faible et haut poids moléculaire, et totale) dans les différents organes de *D. polymorpha*. Pour cela, en raison de l'absence d'identification d'une espèce phytoplanctonique capable de synthétiser de la BMAA de manière stable, *D. polymorpha* fut exposée à de la BMAA dissoute dans l'eau pendant 21 jours, suivi de 21 jours dans de l'eau saine.

Le chapitre 3 présente une étude réalisée en collaboration avec le Dr. E. Faassen, le Dr. M. Lürling et le Dr. H. Zweers (Department of Microbial Ecology, Netherlands Institute of Ecology (NIOO-KNAW), Wageningen, Pas-Bas) et porte sur l'étude des cinétiques d'accumulation et d'élimination de la BMAA totale dans les glandes digestives d'*A. anatina* et dans les individus entiers *D. polymorpha* exposés par balnéation à des concentrations environnementales de BMAA (1, 10 et 50 µg BMAA dissoute/L) pendant 21 jours, suivi de 42 jours de dépuration. La glande digestive d'*A. anatina* a été selectionnée comme organe cible afin de proposer un outil de biosurveillance de la BMAA commun avec la biosurveillance des MCs.

Le chapitre 4 présente une étude menée en laboratoire dans laquelle les deux modèles de bivalves ont été exposés à trois densités d'une souche de *Planktothrix agardhii* productrice de MCs, produisant un équivalent de 1, 10 et 10 µg MCs/L pendant 21 jours d'exposition suivi de 21 jours de dépuration. Afin de déterminer la fraction de MCs (libre ou totale) la plus pertinente à utiliser dans le cadre de la biosurveillance des écosystèmes aquatiques, ces deux fractions ont été analysées dans chacun des modèles à différentes dates des périodes d'exposition et de dépuration.

Le chapitre 5 présente les résultats obtenus lors l'utilisation des deux bivalves dans le cadre de deux campagnes menées *in situ* dans des sites d'un lac dans l'Aisne (lac de l'Ailette), où les cyanobactéries prolifèrent chaque année. Pour chacun des bivalves, les MCs libres et totales ont été mesurées ainsi que la BMAA totale dans les tissus. Ils ont été ensuite comparés à la concentration de MCs intracellulaires, dans le phytoplancton prélevé dans les sites.

Le chapitre 6 représente une synthèse et une discussion des résultats, orientées sur la possibilité de proposer les bivalves comme outil intégrateur de la contamination du milieu par la BMAA et les cyanobactéries productrices de MCs.

Ce manuscrit se termine par une conclusion générale et des perspectives de futures recherches.

Chapitre I : Synthèse bibliographique et présentation du travail

I. La problématique des cyanobactéries

I.1. Position taxonomique et diversité morphologique et écologique

Les cyanobactéries sont des êtres vivants unicellulaires, faisant partie des premiers organismes apparus sur Terre il y a 3,5 milliards d'années (Schopf, 2000). En tant qu'organismes photosynthétiques, les cyanobactéries seraient à l'origine de l'oxygène atmosphérique terrestre (Kasting and Siefert, 2002). De nos jours, en plus de l'oxygène qu'elles génèrent, les cyanobactéries tendent à avoir un intérêt économique et sociétal. En effet, certaines espèces sont considérées comme source non négligeable de nutriments et comme compléments alimentaires (e.g., *Spirulina sp*), mais également comme une source de biocarburants et pouvant être potentiellement intégrées dans la conception de bâtiments bioénergétiques (Mazard et al., 2016).

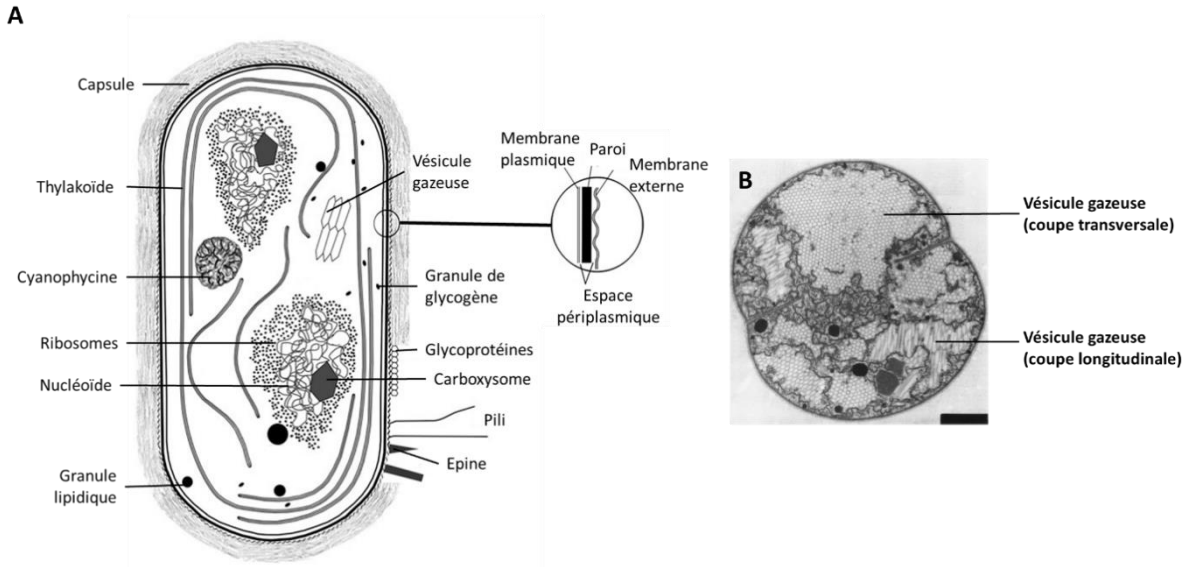

Figure 1 : (A) Représentation schématique de l'organisation interne d'une cellule de cyanobactérie, modifié d'après Baulina, 2012. (B) Photographie de la coupe transversale d'une cellule de *Microcystis aeruginosa* en cours de division cellulaire, agrandissement x 31 500 (Walsby, 1975).

Du point de vue de leur organisation interne (Figure 1), les cyanobactéries possèdent des caractéristiques propres aux procaryotes et aux eucaryotes photosynthétiques. Tout comme les procaryotes, les cyanobactéries ont une paroi et sont dépourvues de membrane nucléaire et d'organites, le génome étant libre dans les cellules. Cependant, comme les eucaryotes photosynthétiques, elles possèdent des pigments photosynthétiques, tel que la chlorophylle, associées à la membrane des thylakoïdes, présents en périphérie des cellules (Vermaas, 2001).

La présence d'un pigment bleu qui leur est spécifique, nommée phycocyanine, fait qu'elles ont longtemps été nommées algues bleues ou algues bleu-vert. Cette complémentarité de structures présentes chez les procaryotes et les eucaryotes au sein du même organisme est à l'origine du fait que la nomenclature des cyanobactéries est régie par deux codes internationaux dont les critères diffèrent : le code international de nomenclature des procaryotes (I.C.N.P), et le code international de nomenclature botanique (I.C.N.B) (Oren and Ventura, 2017). De plus, grâce à l'amélioration constante des méthodes d'analyse moléculaires, la classification des cyanobactéries est régulièrement remaniée (Meriluoto et al., 2016).

La diversité morphologique des cyanobactéries est considérable (Figure 2). En effet, les espèces peuvent être unicellulaires, coloniales ou filamenteuses.

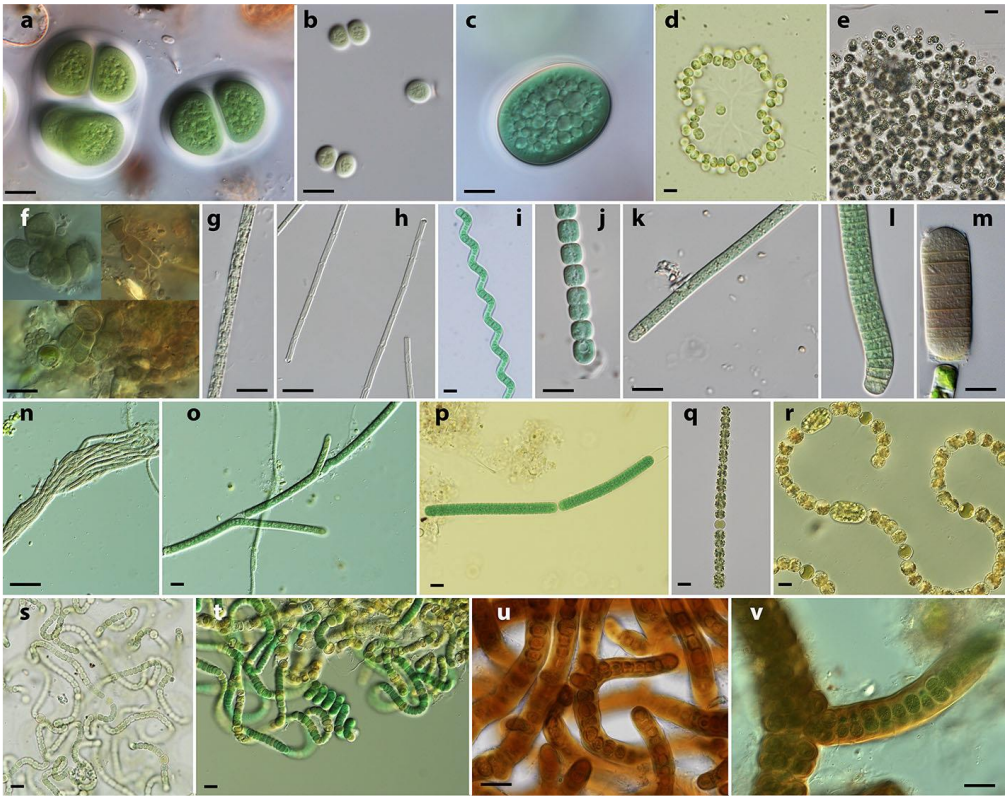

Figure 2 : Illustration de la diversité morphologique existant au sein du groupe des cyanobactéries d'après Dvořák et al., 2015. a *Chroococcus subnudus*, b *Ch. limneticus*, c *Cyanothece aeruginosa*, d *Snowella litoralis*, e *Microcystis aeruginosa*, f *Pleurocapsa minor*, g *Planktothrix agardhii*, h *Limnothrix redekei*, i *Arthrospira jenneri*, j *Johanseninema constricum*, k *Phormidium* sp., l, m *Oscillatoria* sp., n *Schizothrix* sp., o *Tolypothrix* sp., p *Katagnymene accurata*, q *Dolichospermum planctonicum*, r *Dolichospermum* sp., s *Nostoc* sp., t *Nodularia moravica*, u, v *Stigonema* sp. Echelle : a–u = 10 µm, v = 20 µm.

En plus de cette diversité de formes, les cyanobactéries sont ubiquistes (Whitton and Potts, 2000). Des espèces ont été identifiées dans des glaciers (Vincent 2000; Quesada and Vincent

2012), dans les régions semi-arides et désertiques (Hu et al., 2012), au niveau des sources thermales (Ward and Castenholz, 2000), des cheminées hydrothermales (Elsaied and Naganuma, 2001) et dans des écosystèmes hypersalins (Oren, 2012). Les cyanobactéries peuvent également occuper différentes niches écologiques au sein d'un même habitat (Figure 3). Ainsi, les cyanobactéries d'eau douce peuvent se développer en suspension dans la colonne d'eau, et seront alors qualifiées comme étant planctoniques, ou se développer à la surface du sédiment, de support rocheux ou macrophytiques, et seront dans ce cas qualifiées de benthiques. Les cyanobactéries sont également présentes dans les milieux terrestres anthropisés, tel que sur les façades d'immeubles ou de monuments (Barberousse et al. 2006; Albertano 2012).

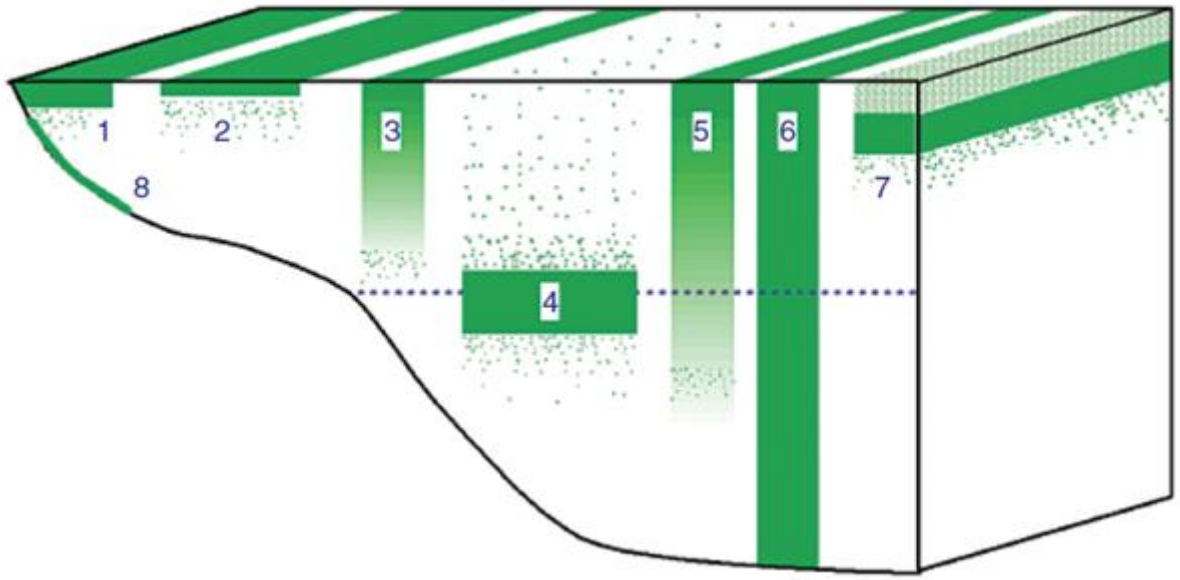

Figure 3 : Différentes localisation des efflorescences de cyanobactéries dans la colonne d'eau dans les zones de climat tempéré d'après Salmaso et al (2017). La ligne pointillée indique la limite inférieure de la zone euphotique. Sont représentés : les efflorescences au niveau de la surface de l'eau (1 et 2), dans la colonne d'eau (3, 5 et 6), au-dessus de la zone euphotique (3), s'étendant jusqu'à la fin de la zone euphotique (5), et pendant le brassage d'eau hivernal (6). Sont également représentées les efflorescences sous la glace et métalimnétiques (4), et les efflorescences de cyanobactéries benthiques (8).

Lorsque les conditions sont favorables (vents faibles, températures élevées), les cellules vont se multiplier via une reproduction asexuée (Chorus and Bartram, 1999), formant des efflorescences potentiellement visibles à la surface de l'eau. Lorsque les conditions du milieu deviennent défavorables, tel qu'un déficit d'approvisionnement en énergie lumineuse, une baisse des température ou un brassage de l'eau (Hense and Beckmann, 2010), ces colonies peuvent se désagréger. Ceci peut soit conduire à la lyse des cellules, soit être suivi par la

formation de formes de résistance (hormogonies ou akinètes) (Kumar et al., 2010). Ces structures permettent aux cellules de rentrer en dormance sur ou dans le sédiment. Les processus de maturation/resuspension vont débuter quand les conditions seront à nouveau favorables, entrainant la germination : les cellules vont pouvoir s'élever dans la colonne d'eau pour atteindre la zone euphotique (Hense, 2010).

Les cyanobactéries possèdent des caractéristiques physiologiques et morphologiques leur conférant un avantage compétitif vis-à-vis des autres espèces présentes dans la communauté phytoplanctonique. Une des premières différences physiologiques concerne les optima de température. Bien que ces valeurs varient en fonction des espèces, il a été montré que les optima de température des cyanobactéries (au-delà de 25°C), sont plus élevés que pour les algues vertes et les diatomées (Chorus and Bartram, 1999). Ainsi, lors d'épisodes de chaleurs supérieurs à 25°C, la croissance des algues vertes et des diatomées va décliner pour la plupart des espèces, alors que les cyanobactéries vont atteindre leur optima de croissance (Paerl and Otten, 2013). Ce qui, à l'échelle de l'écosystème, se traduira par une dominance des cyanobactéries par rapport aux autres espèces phytoplanctoniques (Rasconi et al., 2017). De plus, l'augmentation de la température des masses d'eau stagnantes peut entrainer une stratification de la colonne d'eau, formant plusieurs zones distinctes : l'épilimnion en surface, riche en oxygène mais dont les apports en nutriments sont limités, le métalimnion représentant la zone euphotique, et l'hypolimnion, formé par les couches d'eau plus profondes dépourvues de luminosité et riches en nutriments. Lorsque cette stratification perdure, les espèces phytoplanctoniques vont épuiser les ressources présentes dans l'épilimnion et le métalimnion, ce qui peut conduire à leur déclin. Or, cette stratification peut être favorable aux cyanobactéries dont certaines espèces sont capables de se déplacer dans la colonne d'eau et d'effectuer des migrations verticales diurnes entre les eaux de surfaces, ensoleillées, et les eaux profondes, riches en nutriments, afin d'optimiser leur exploitation du milieu (Paerl and Huisman, 2009). Cette mobilité s'effectue grâce à la présence des vésicules gazeuses (Walsby, 1975), retrouvées notamment chez les espèces des genres *Microcystis*, *Anabaena, Planktothrix* et *Oscillatoria* (Thomas and Walsby, 1985; Ibelings et al., 1991; Walsby et al., 1997; Hašler and Poulíčková, 2003). Ces mouvements ne sont pas négligeables. En effet, il a été mesuré en milieu naturel que des colonies de *Microcystis* sp et *Anabaena* sp pouvaient migrer jusqu'à 12 m de profondeur (Ganf and Oliver, 1982). Les cyanobactéries sont également pourvues de pigments surnuméraires par rapport aux autres espèces phytoplanctoniques, tel que les phycocyanines et les phycoérythrines. Ceux-ci leur

permettent d'exploiter une plus large gamme des rayonnements lumineux et ainsi, une meilleure utilisation des ressources en énergie (Huisman et al., 1999). Enfin, certaines espèces de cyanobactéries, notamment celles appartenant au genres *Anabaenea* et *Nostoc*, sont capables de fixer de l'azote atmosphérique grâce à la présence de cellules spécialisées, les hétérocystes, leur permettant de se maintenir lors d'une carence en azote dans le milieu (Kumar et al., 2010).

I.2. Capacités de proliférations de cyanobactéries

Lorsque les conditions sont favorables (e.g., températures élevées, faibles turbulences), les cyanobactéries vont se développer massivement, créant des phénomènes appelés efflorescences ou 'blooms'. Sous nos latitudes, les efflorescences de cyanobactéries ont lieu majoritairement en périodes estivales. Les efflorescences de cyanobactéries sont caractérisées par une rapide production de biomasse, dont le seuil de densité cellulaire a été fixé à 20 000 cellules/mL (Oliver and Ganf, 2000), et par la dominance d'une ou plusieurs espèces de cyanobactéries dans la communauté phytoplanctonique (Humbert and Fastner, 2017). La durée d'un bloom est variable : ce phénomène peut durer quelques jours ou plusieurs semaines voir plusieurs années (Humbert and Fastner, 2017). Plusieurs facteurs favorisent le développement des efflorescences de cyanobactéries. Ceux-ci peuvent être divisés en deux catégories : les processus naturels et les émissions anthropiques conduisant à l'eutrophisation (Sellner et al., 2003). Ainsi, le développement des cyanobactéries sera facilité par des températures supérieures à 25°C, une faible vitesse du courant de l'eau favorisant la stratification verticale, un pH légèrement alcalin, une faible salinité et la présence d'azote et de phosphore (Paerl et al., 2001). Ces deux derniers facteurs peuvent être conditionnés par les activités anthropiques (Smith, 2003). Les efflorescences de cyanobactéries représentent un risque croissant vis-à-vis des écosystèmes et de la santé humaine et animale, car leurs fréquences et leurs sévérités augmentent en lien avec le réchauffement climatique (Mooij et al., 2005; Manning and Nobles, 2017) , et l'augmentation des apports en phosphore et en azotes issus des activités humaines (Peñuelas et al., 2013).

I.3. Impact des cyanobactéries sur le fonctionnement et l'usage des écosystèmes et sur la santé humaine

Les cyanobactéries n'engendrent pas uniquement des nuisances visuelles. En effet, ces cellules sont capables de synthétiser des composés altérant l'odeur et le goût de l'eau tel que

la géosmine et le 2-méthylisobornéol (Izaguirre and Taylor, 2004). Elles sont également capables de synthétiser des endotoxines, nommées cyanotoxines, libérées dans le milieu lors de la mort cellulaire pour certaines, ou excrétées dans le milieu pendant la phase de croissance. Ainsi, par leur présence, les cyanobactéries peuvent perturber les écosystèmes et l'économie locale. De plus, celles-ci peuvent nuire à la santé humaine et animale.

I.3.1. Impacts écologiques

Mis à part la synthèse de toxines et leurs impacts sur la santé animale, les cyanobactéries vont pouvoir, par leur présence, avoir des effets délétères sur les écosystèmes (Figure 4).

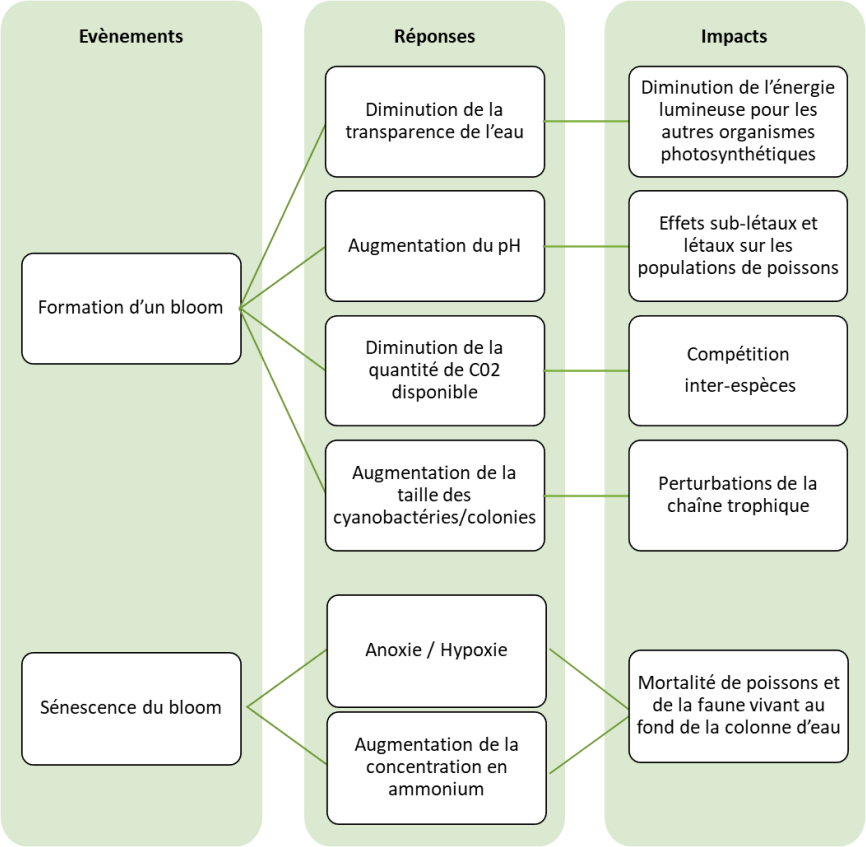

Figure 4 : Résumé des réponses écologiques et des impacts associés à la formation d'un bloom de cyanobactéries. Modifié d'après Havens, 2008.

I.3.2. Impacts économiques

La présence des efflorescences de phytoplancton dans les masses d'eau peut entrainer des pertes financières dans différents secteurs économiques (Figure 5).

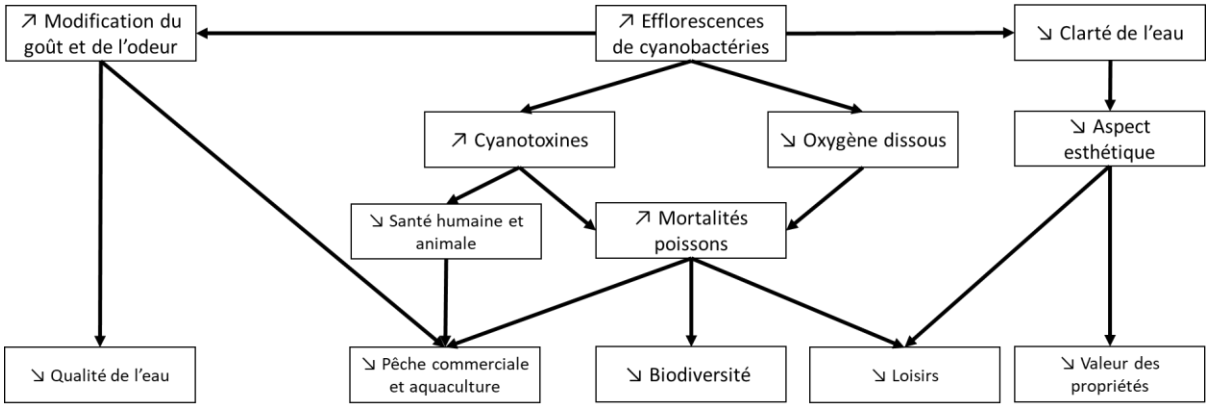

Figure 5 : Impacts économiques des proliférations de cyanobactéries en eau douce. Modifié d'après Hamilton et al., 2013.

Les proliférations de cyanobactéries peuvent entrainer un cout additionnel lié à la surveillance des sites utilisés pour la baignade ou l'adduction d'eau potable, à l'information du grand publique et à la gestion et formation du personnel (Hamilton et al., 2013). Celles-ci nécessitent également la mise en place de structures permettant d'augmenter le niveau de traitement de l'eau et la mise en place de traitements spécifiques (e.g., ultrafiltration, nanofiltration, filtration sur charbon actif) afin d'éliminer les cyanotoxines de l'eau potable (Chorus and Bartram, 1999; Hamilton et al., 2013). Les dépenses liées au traitements additionnels de l'eau ne sont pas négligeables : par exemple, des efflorescences de cyanobactéries en Nouvelle-Zélande ont conduit à l'amélioration d'une station d'épuration pour une somme de plus de 5 millions de dollars NZ (Hamilton et al., 2013). Egalement, la présence de cyanobactéries peut avoir un impact sur divers secteurs comme la pêche et l'aquaculture (Sanseverino et al., 2016). Ainsi, il a été estimé que les cyanobactéries engendraient une perte de 29 000 à 118 000 £ par an dans le secteur de la pêche commerciale au Royaume-Uni (Hamilton et al., 2013). De plus, au-delà d'un certain seuil de densité de cyanobactéries, variant en fonction des pays, leur présence peut conduire à la fermeture des zones de pêche et des zones récréatives, ce qui va avoir pour conséquence une diminution de l'attractivité pour la structure et une baisse des diverses activités commerciales qui y sont liées (Hamilton et al., 2013; Sanseverino et al., 2016). Globalement, il a été estimé en Australie que les couts globaux liés à la présence des cyanobactéries d'élèvent entre 180 à 240 millions de dollars par an (Steffensen, 2008).

I.3.3. Impacts sanitaires

Certaines cyanobactéries sont capables de synthétiser des métabolites secondaires toxiques, appelés cyanotoxines. Celles-ci peuvent être regroupées en cinq classes en fonction des effets qu'elles induisent chez les organismes (Tableau 1) (Wiegand and Pflugmacher, 2005). En lien avec la production de ces toxines, les cyanobactéries sont impliquées dans de nombreux cas de mortalités animales et dans des pathologies humaines. Les structures chimiques de ces cyanotoxines sont variables comme par exemple des peptides cycliques (microcystines), des alcaloïdes (cynlindrospermopsine), ou des acides aminés non-protéinogènes (β-N-Méthylamino-L-alanine).

Un des premiers rapport d'empoisonnement lié aux cyanobactéries pourrait dater de 1000 ans en Chine, suite au décès de soldats ayant consommé de l'eau issue d'une rivière dont la coloration était verte (Chorus and Bartram, 1999). La première mention d'intoxication aigue liée aux cyanobactéries chez des animaux domestiques, reportée dans la littérature scientifique date de 1878 (Francis, 1878). Depuis, les cas de mortalités concernent surtout la faune sauvage et domestique (Stewart et al., 2008; Backer et al., 2013). Les cas de mortalité humaine sont plus rares, et sont souvent associés à la présence de cyanotoxines dans l'eau potable (e.g., au Brésil, région de Bahia, 2000 cas de gastro-entérites dont 88 mortels en 42 jours), ou dans l'eau utilisée pour les dialyses (Brésil, Caruraru, 1996, 60 personnes décédées). Le nombre d'intoxications humaines est probablement sous-estimé en raison de la difficulté du diagnostic et de la méconnaissance de la problématique des cyanobactéries. Une revue récente (Wood, 2016) montre que les cyanotoxines ont un impact significatif sur la santé humaine et animale à travers le monde. De plus, chez l'homme, il semblerait que la tranche d'âge la plus exposée aux risques que représentent les cyanotoxines soit celle correspondant aux enfants, car ceux-ci restent de manière générale plus longtemps dans l'eau que les adultes et sont plus sujets à ingérer de l'eau contaminée (Weirich and Miller, 2014). De plus, l'impact des cyanotoxines sur cette catégorie d'âge risque d'être plus important, à dose reçue égale, comparée aux adultes car les enfants ont une plus faible masse corporelle et leur physiologie diffère de celle des adultes car ils sont en cours de développement (Bearer, 1995; Weirich and Miller, 2014).

Tableau 1 : Représentation des différentes catégories de cyanotoxines, les principales espèces productrices ainsi que le mode d'action étant à l'origine de cette classification. D'après Wiegand and Pflugmacher (2005) ; Hudnell (2008) ; Rzymski and Poniedziałek (2012) ; Rastogi et al (2014).

Catégories de cyanotoxines	Cyanotoxines	Principaux genres de cyanobactéries productrices	Principaux effets toxiques
Hépatotoxines	Microcystines	*Microcystis*	Inhibition de protéines phosphatases et déstructuration des cellules hépatiques
		Planktothrix	
		Anabaena	
	Nodularines	*Nodularia*	
Neurotoxines	Anatoxines	*Anabaena*	Agoniste nicotinique à acétylcholine ou inhibition de l'acétylcholinestérase entrainant une inhibition de la transmission nerveuse, et une paralysie des muscles striés squelettiques
		Aphanizomenon	
		Cylindrospermopsis	
		Planktothrix	
		Microcystis	
		Oscillatoria	
	Saxitoxines	*Aphanizomenon*	Blocage des canaux sodiques entrainant une inhibition de la transmission nerveuse
		Anabaena	
		Cylindrospermopsis	
		Lyngbya	
	β-N-Méthylamino-L-alanine	*Nostoc* *Leptolyngbya* + Incertitudes à ce jour	Agoniste de récepteurs du glutamate, entrainant une excitotoxicité
Cytotoxines	Cylindrospermopsine	*Cylindrospermopsis*	Dommages cytogénétiques de l'ADN
		Aphanizomenon	
		Anabaena	
Dermatotoxines	Lyngbyatoxin	*Lyngbya*	Agent inflammatoire et activateur de la protéine kinase C inflammatoire
	Aplysiatoxin		
Toxines irritantes	Lipopolysaccharides	Potentiellement toutes les cyanobactéries	Irritations

Parmi les cyanotoxines, les microcystines (MCs) sont les plus fréquemment retrouvées lors des phénomènes de blooms, quel que soit la latitude (Campos and Vasconcelos, 2010). En effet, il a été estimé que celles-ci pouvaient être présentes dans 50 à 75 % des phénomènes d'efflorescence de cyanobactéries (Ettoumi et al., 2011). Les MCs ont également été détectées dans les différents niveaux des réseaux trophiques, un aspect détaillé dans le paragraphe II.1.5. Ces toxines sont sujettes à des recommandations de l'OMS vis-à-vis de leur concentration dans l'eau de boisson et dans les eaux de baignade (Chorus and Bartram, 1999). L'ensemble de ces caractéristiques fait que les MCs ont été choisies parmi les deux toxines d'intérêt de cette thèse. La seconde cyanotoxine étant la BMAA (β-N-Méthylamino-L-alanine), une toxine environnementale émergente, pour laquelle peu de données de présence environnementale ou de toxicologie animale sont disponibles à ce jour.

II. Les cyanotoxines MCs et la toxine environementale BMAA

II.1. Les microcystines

Les MCs ont été nommées d'après *Microcystis aeruginosa*, espèce à partir de laquelle elles ont été isolées pour la première fois (Carmichael, 1992). Leur poids moléculaire est compris entre 900 et 1 100 Daltons.

Les MCs (Figure 6) sont composées de sept acide aminés, formant un peptide cyclique dont la structure générale est : cyclo-(D-alanine-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-glutamate-Mdha). Le groupement Mdha est une le N-méthyldéhydroalanine, et le groupement Adda (3-amino-9-méthoxy-2,6,8-triméthyl-10-phényldéca-4,6-diénoïque) représente une chaîne latérale hydrophobe relativement bien conservée (Garthwaite et al., 2008). Parmi les acides aminés composant les MCs, deux sont variables (X et Z) et vont déterminer l'identité des variants de MCs. Pour cela, chaque variant est nommé d'après les acides aminés occupant les positions X et Z. Par exemple, le variant le plus souvent recherché et quantifié est MC-LR, comportant les acides aminés leucine (L) et arginine (R). Les multiples combinaisons possibles mènent à l'identification de 246 variants identifiés à ce jour (Spoof and Arnaud, 2017).

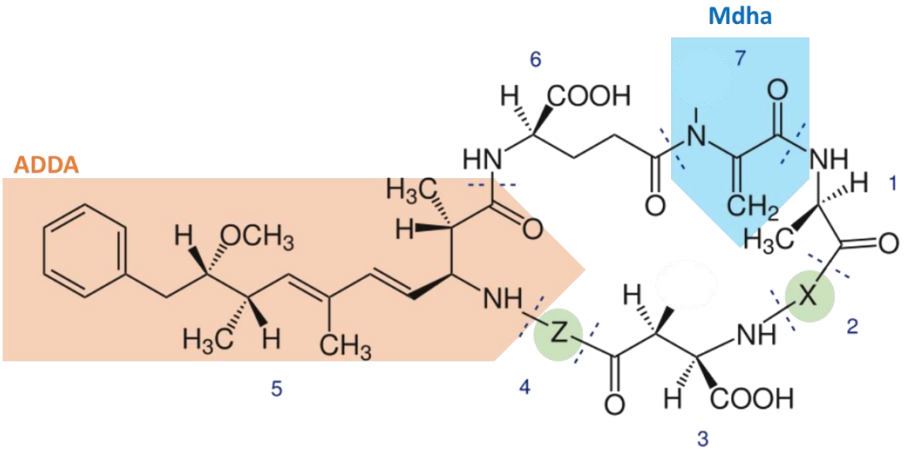

Figure 6 : Structure générale des microcystines

Le coefficient de partage des MCs (LogK_{OW}, mesurant l'affinité d'un composé pour l'eau ou l'octanol) varie en fonction des variants (McCord et al., 2018). Pour MC-LR, cette valeur est d'environ −1 à pH 7, indiquant que les MCs sont solubles dans l'eau (Schmidt et al., 2014). Cependant, il existe des différences entre les variants et certains sont plus hydrophobes. Les MCs sont stables à haute température et peuvent résister à l'ébullition (Schmidt et al., 2014). De plus, il a été montré que ces cyanotoxines peuvent résister à des températures élevées (40°C) associées à un pH élevé ou bas (van Apeldoorn et al., 2007). Les MCs sont majoritairement intracellulaires (dans les cyanobactéries) lors des efflorescences, et sont relarguées dans le milieu lors de la mort cellulaire. En Europe, les concentrations en toxines dissoutes sont comprises entre la limite de détection, comprise entre 0,1 et 1,5 µg/L selon les méthodes de quantification (WHO, 2017), et 89 µg MCs/L (Ledreux et al., 2010) ou 5595 µg/g DW estimés en biomasse phytoplanctonique (Fastner et al., 1999). De fortes concentrations en MCs dissoutes sont observées au moment de la sénescence naturelle des blooms ou après des traitements algicides. Une fois dissoutes dans le milieu, les MCs peuvent être dégradées par des microorganismes en quelques jours (90% de dégradation en 5 jours selon Christoffersen et al. (2002)). Les MCs peuvent également être adsorbées sur des particules en suspension ou sur le sédiment (Corbel et al., 2014; Pham and Utsumi, 2018). Des études ont montré que la fraction adsorbée ne dépassait pas plus de 20 % des MCs présentes dans la colonne d'eau (Corbel et al., 2014). Celles-ci peuvent être remise en suspension dans l'eau par des organismes fouisseurs de sédiments comme les carpes (Kolmakov, 2014).

II.1.1. Organismes producteurs

Les microcystines sont produites par de nombreux genres de cyanobactéries dont les principaux sont détaillés dans le Tableau 1. En zone tempérée, le genre le plus répandu dans les lacs eutrophes est *Planktothrix* (Scheffer et al., 2008), une cyanobactérie filamenteuse capable de produire des MCs. Les concentrations en MCs intracellulaires (dans la biomasse de cyanobactéries) ou dissoutes dans l'eaune sont pas toujours corrélées avec la densité de cyanobactéries présentes (Kotak and Zurawell, 2007). Ceci serait lié au fait que toutes les espèces de cyanobactéries ne produisent pas de MCs, et que, au sein d'une même espèce, toutes les souches ne sont pas productrices (Carmichael, 1992). De plus, il peut exister une variabilité de production par les souches productrices en fonction de facteurs environnementaux. Les raisons à l'origine de cette disparité pourraient potentiellement s'expliquer par la présence ou l'absence des gènes responsables de la synthèse des MCs, et par l'activation ou non de ces gènes en fonction des souches (Kurmayer et al., 2004). Le rôle des MCs pour ces organismes est encore inconnu, tout comme l'influence des facteurs environnementaux sur leur synthèse. Par exemple, il a été observé que l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des MCs pouvait être liée à l'intensité lumineuse (Kaebernick et al., 2000). Ainsi, la densité ou la biomasse de cyanobactéries, même en considérant uniquement les cyanobactéries potentiellement productrices de MCs, ne sont pas des indicateurs fiables de la présence de MCs dans le milieu.

II.1.2. Mécanismes d'action toxique

Après pénétration dans l'organisme, les MCs sont reconnues pour avoir un tropisme vers les organes contenant des transporteurs d'anions organiques (OATPs), qui sont exprimés dans le tractus gastro-intestinal, le foie, les reins et au niveau de la barrière hémato-encéphalique (Runnegar et al., 1981; Eriksson et al., 1990; Fischer et al., 2005; Kim, 2003). A l'intérieur des cellules, les MCs peuvent interagir avec les protéines phosphatases (PPases), provoquant leur inhibition, via deux mécanismes : la formation d'une liaison à interaction faible de nature hydrophobe, réversible, entre le groupement Adda des MCs et les PPases (Craig et al., 1996), et, après quelques heures, le groupement Mdha peut former une liaison covalente (pont disulfure) avec des cystéines présentes au niveau des sous-unités catalytiques des Ppases (Craig et al., 1996; Hastie et al., 2005; Maynes et al., 2006; Campos and Vasconcelos, 2010). Cependant, toutes les PPases ne sont pas inactivées en présence de MCs : alors que les PP1, la PP2A, la PPP4 et la PPP5 sont inhibées en présence de MCs, ce n'est pas le cas de la PP2C

(Honkanen et al., 1990; Hastie et al., 2005). Les PPases permettent la phosphorylation des protéines et jouent ainsi un rôle majeur dans l'activité cellulaire (McConnell and Wadzinski, 2009). L'inactivation des PPases conduit à une augmentation de la phosphorylation des protéines, entrainant une atteinte de la structure du cytosquelette, la perte de la forme des cellules affectées pouvant conduire à l'hémorragie par la perte des jonctions cellulaires (van Apeldoorn et al., 2007; Campos and Vasconcelos, 2010). De plus, les MCs sont connues pour engendrer un stress oxydant, et un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène et la défense antioxydante (Amado and Monserrat, 2010; Campos and Vasconcelos, 2010). Il a été montré que les MCs peuvent entrainer la production d'espèces réactives de l'oxygène, pouvant conduire à une augmentation de la peroxydation des lipides, des dommages à l'ADN, des dommages mitochondriaux et une altération du système de défense antioxydant chez des organismes aquatiques (Amado and Monserrat, 2010). Les MCs pourraient également induire des effets génotoxiques indirects via l'induction d'un stress oxydant, comme observé avec la lignée cellulaire Hep G2 issue d'un hépatocarcinome d'origine humaine (Žegura et al., 2004). Plusieurs études ont mis en évidence l'altération de la concentration de glutathion (GSH), substrat de plusieurs enzymes de biotransformation, suite à une exposition à des MCs (Hudnell, 2008; Amado and Monserrat, 2010). De plus, une intoxication aux MCs peut entrainer des altérations physiologiques et histologiques comme observé chez des invertébrés et chezdes poissons (Malbrouck and Kestemont, 2006; Lance et al., 2010).

II.1.3. Impact des MCs sur la santé humaine et animale

Les MCs sont responsables de nombreux cas d'empoisonnements d'humains et d'animaux. L'évènement de contamination humaine ayant eu les retombées les plus dramatiques est survenu lors de la contamination par des MCs d'eau utilisée pour des dialyses, reçue par intraveineuse par une centaine de patients, entrainant la mort de plus de 60 personnes en trois mois en 1996 au Brésil (Azevedo et al., 2002). Egalement, il a été suggéré qu'une exposition chronique aux MCs, présentes dans l'eau de boisson, pourrait être associée à des lésions hépatiques observées chez des enfants en Chine (Li et al., 2011). De nombreux cas d'intoxication et de mortalité de faune domestique (chiens, bétail) et sauvage (poissons, loutres, oiseaux) ont été reportés suite à l'ingestion de cyanobactéries productrices de MCs (Mez et al., 1997; Backer et al., 2013; Wood et al., 2016).

II.1.4. Analyse des MCs dans les matrices biologiques

Plusieurs outils et méthodes permettent d'analyser la présence de MCs dans l'eau, sous formes dissoute ou intracellulaire (dans la biomasse de cyanobactéries) L'existence d'une liaison covalente entre les MCs et les PPases dans les matrices biologiques, fait que deux fractions peuvent être analysées : les MCs libres (non liées de manière covalente aux PPases) ou les MCs totales (MCs libres et MCs liées aux protéines). Chacune des méthodes ayant une sensibilité et une sélectivité différente (Figure 7).

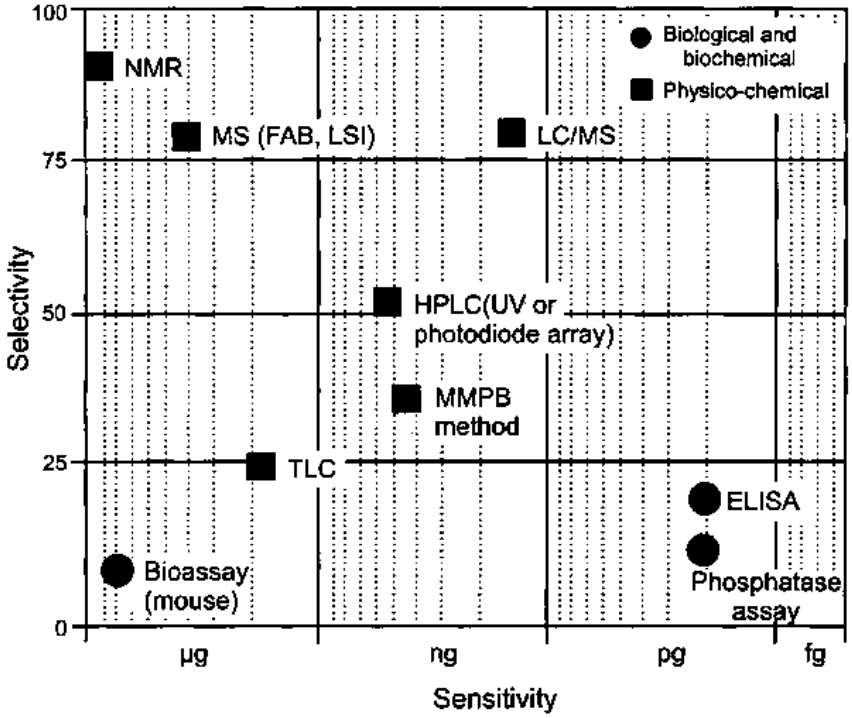

Figure 7 : Lien entre la sensibilité et la sélectivité des différentes méthodes d'analyse des MCs. D'après Chorus and Bartram, 1999.

II.1.4.a. MCs libres

L'extraction des MCs dans le but de mesurer la concentration en MCs libres nécessite l'utilisation de solvants. Un des solvants les plus utilisés est le méthanol, recommandé car il permet d'obtenir une bonne efficacité d'extraction (Chorus and Bartram, 1999). Le méthanol peut être utilisé pur (Mitsoura et al., 2013; Lance et al., 2014), ou dilué (Sipia et al., 2001; Mohamed and Hussein, 2006), une pratique qui permettrait d'améliorer le taux de recouvrement des MCs les plus polaires (Chorus and Bartram, 1999).

Différents outils ont été décrits dans la littérature pour analyser les MCs libres dans les bivalves d'eau douce (Figure 8) tel que chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) seule (Yokoyama and Park, 2002; Ibelings et al., 2005) ou couplée avec un spectromètre de masse simple (LC-MS) ou en tandem (LC-MS/MS) (Dionisio Pires et al., 2004; Wood et al., 2006). Cependant, ces méthodes sont couteuses et les analyses sont limitées aux variants pour lesquels des standards sont disponibles. L'utilisation de MALDI-TOF MS a été proposée pour détecter des MCs libres dans les tissus de bivalves. Cette technique aurait pour avantage d'être rapide, de ne nécessiter que de peu de matériel biologique, et ne comporterai pas d'étape de purification de l'échantillon (Welker et al., 2002; Lauceri et al., 2017). Cependant, cette méthode requiert l'achat d'équipements lourds et ces performances seraient limitées dans les mélanges complexes (Welker et al., 2002).

Une des méthodes dont l'usage tend à se répandre est le dosage immuno-enzymatique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). En effet, celle-ci ne nécessite pas l'achat d'équipement aussi couteux que la LC-MS/MS (Meriluoto et al., 2016), et serait une méthode rapide, sensible (Metcalf et al., 2000) et facile à utiliser (Gaget et al., 2017). Le principal inconvénient de cette méthode serait son incapacité à identifier les variants de MCs et son potentiel à générer de faux positifs (Meriluoto et al., 2016), bien que ce risque ne fut pas observé dans le cadre d'une comparaison des concentrations de MCs libres mesurées par ELISA et par LC-MS/MS dans des tissus de gastéropodes (Lance et al., 2010c). Les tests ELISA ont déjà été appliqués afin de déterminer la concentration en MCs libres d'échantillons de bivalves d'eau douce (Wood et al., 2006; Woller-Skar, 2009; Paldavičienė et al., 2015; Preece et al., 2015; Lauceri et al., 2017).

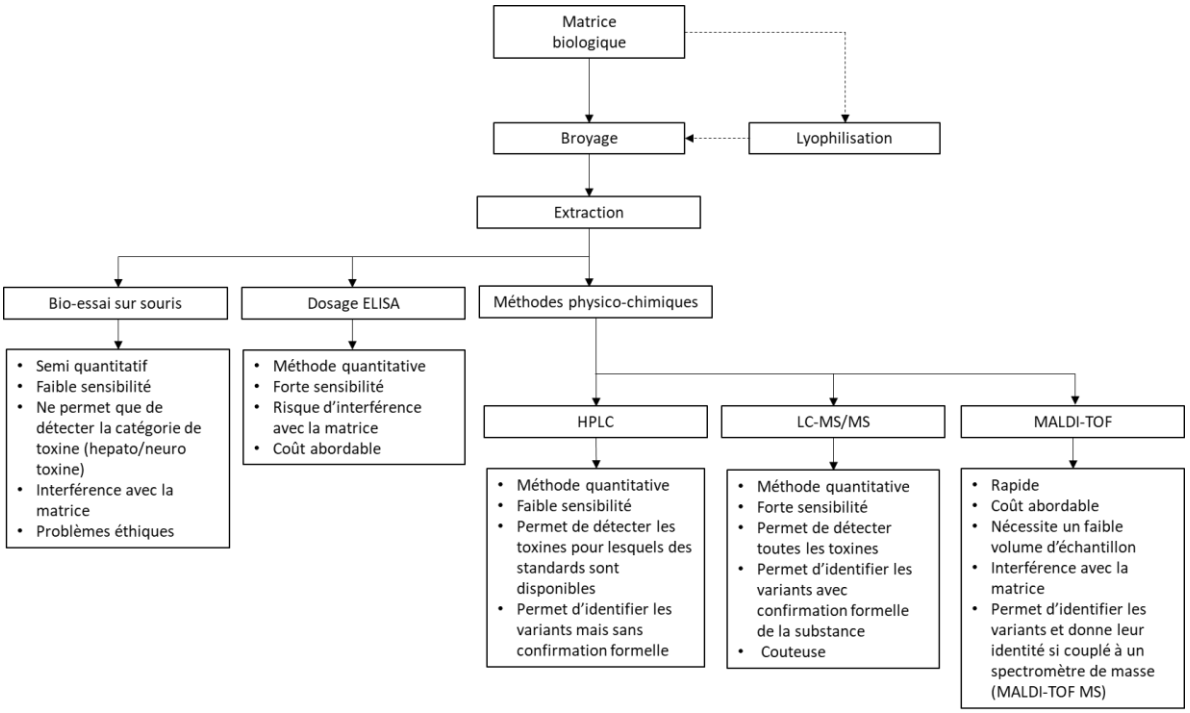

Figure 8 : Représentation des principales méthodes analytiques permettant de détecter et/ou quantifier les MCs libres dans les matrices biologiques. Modifié d'après Merel et al (2013).

II.1.4.b. MCs totales

L'évaluation de la quantité totale de MCs (incluant les MCs libres et celles liées de manière covalente aux protéines) dans un échantillon est peu utilisée car elle est chronophage et requiert l'utilisation d'équipements lourds comme la GC-MS ou la LC-MS/MS (Meriluoto et al., 2016). L'avantage de cette méthode est qu'elle permet d'effectuer un criblage de toutes les formes de MCs au sein des tissus (libres et liées) et comprend l'analyse de tous les variants de MCs, y compris ceux pour lesquels il n'y a pas de solutions standard à ce jour. Ainsi, elle permet une quantification plus réaliste de la teneur accumulée par les organismes.

D'un point de vue mécanistique, un clivage des MCs est induit, afin de libérer un fragment des MCs nommé MMPB (acide 2-méthyl-3-méthoxy-4-phenylbutyrique) qui provient du groupement Adda. Comme ce groupement n'est pas impliqué dans la liaison covalente des MCs aux Ppases, ce clivage s'opère sur les MCs libres et liées dans les tissus (Neffling et al., 2010). Ce clivage peut être effectué soit par une oxydation de type Lemieux (Sano et al., 1992), où par ozonolyse (Harada et al., 1996). Parce que le MMPB n'existerait pas naturellement, il a été décrit comme un marqueur unique de la présence de MCs dans l'environnement (Suchy and Berry, 2012). Suite à cette lyse, deux types d'extraction peuvent être appliqués :

l'extraction dite « liquide-liquide » basée sur l'utilisation d'acétate d'éthyle (Williams et al., 1997), ou l'extraction en phase solide sur cartouche (SPE) (Ott and Carmichael, 2006). Le dosage du MMPB est effectué ensuite par GC-MS ou LC-MS/MS.

II.1.5. Occurrence des MCs en milieu naturel

Les MCs ont été détectées dans des organismes de tous les niveaux trophiques des écosystèmes aquatiques (Figure 9), mais également chez certains de leurs prédateurs terrestres, ce qui indique que certains transports vectoriels doivent avoir lieu (Hudnell, 2008). Cependant, ces molécules ont un faible coefficient de partage et sont sujettes à la dégradation et à l'excrétion à tous les niveaux de la chaine trophique. Ainsi, plutôt qu'un phénomène de biomagnification, procédé au cours duquel la concentration de toxine dans les tissus augmente le long des maillons de la chaine trophique, la biodilution semble se produire dans les réseaux trophiques (Ibelings et al., 2005; Hudnell, 2008; Larson et al., 2014).

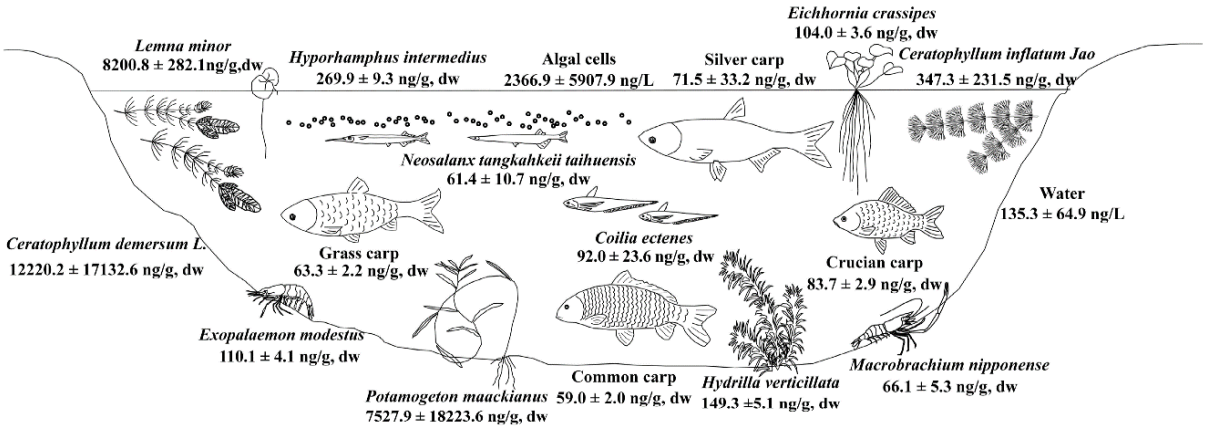

Figure 9 : Occurrence des MCs libres dans le lac Taihu, Chine. D'après Jia et al. (2016).

Des MCs libres ont été mesurées dans des organismes appartenant au zooplancton, consommateurs primaires de phytoplancton (Kotak et al., 1996; Ferrão-Filho et al., 2002; Ibelings et al., 2005; Smith and Haney, 2006; Sotton et al., 2014). Grace à leur capacités d'accumuler des MCs, les communautés zooplanctoniques peuvent agir comme des vecteurs pour les espèces carnivores ou omnivores (Martins and Vasconcelos, 2009), et ainsi représenter un lien important entre les producteurs primaires et les consommateurs secondaires comme les poissons (Ferrão-Filho et al., 2002). D'autres macro-invertébrés peuvent représenter des vecteurs de MCs dans les écosystèmes aquatiques. Ainsi, les mollusques bivalves, organismes filtreurs en contact direct avec les cyanobactéries, sont capables d'accumuler des MCs. Une synthèse de leurs capacités d'accumulation est présentée ci-dessous, dans la partie I.3 (Tableau 3Tableau 3 : Occurrence des MCs libres dans des

bivalves d'eau douce). Les gastéropodes vivant en eau douce peuvent également se nourrir de cyanobactéries, de par leur régime alimentaire de brouteurs de phytoplancton, et accumuler des MCs libres dans leurs tissus (Kotak et al., 1996; Zurawell et al., 1999; Lance et al., 2010a; Gkelis et al., 2006), et les transférer à leurs prédateurs (Lance et al., 2014). Des macro-invertébrés benthiques comme les crevettes d'eau douce (Chen and Xie, 2005a; Jia et al., 2016) ou les écrevisses (Tricarico et al., 2008) accumulent également des MCs libres. Des MCs libres ont également été mesurées en milieu naturel dans des tissus de vertébrés aquatiques (poissons phytoplanctonophages, omnivores ou carnivores) ou terrestres (tortue, canard et oiseau d'eau), dont l'intoxication peut être directe par ingestion de cyanobactéries ou par exposition aux MCs dissoutes, ou indirecte par ingestion de proies contaminées (Freitas de Magalhães et al., 2001; Chen et al., 2009; Papadimitriou et al., 2009; Zhang et al., 2009; Jia et al., 2016; Wituszynski et al., 2017; Flores et al., 2018). Le transfert trophique des MCs n'est pas limité aux écosystèmes aquatiques, des organismes comme les chauves-souris peuvent être contaminées lors de l'ingestion d'insectes dont les larves et nymphes sont aquatiques (Woller-Skar et al., 2015). Des MCs ont également été retrouvées dans des oiseaux autres que les espèces aquatiques tel que les passereaux (Figure 10), lors de l'ingestion de proies contenant des MCs (Moy et al., 2016).

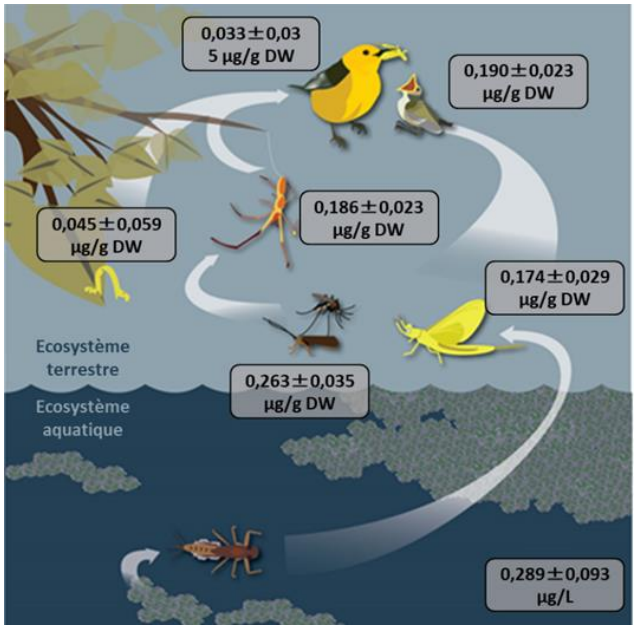

Figure 10 : Transfert trophique des MCs libres dans les écosystèmes aquatiques et terrestres. D'après Moy et al. (2016).

II.2. La β-N-Méthylamino-L-alanine

La β-N-Méthylamino-L-alanine (BMAA) est un acide aminé de 118 Da, non protéinogène, car elle n'est pas incorporée dans les protéines lors de la traduction des ARN messagers par les ribosomes. La BMAA est un composé hydrophile, comme le reflète son log(K_{OW}) de -4. Sept isomères de la BMAA ont été décrits à ce jour (Figure 11) : le 2,4-diaminubutyric acid (DAB), la N-(2-aminoéthyl)glycine (AEG), la β–amino-N-méthylalanine (BAMA), le 2,3-diaminobutanoic acid, le 3,4-diaminobutanoic acid, le 3-amino-2-(aminomethyl)propanoic acid et le 2,3-diamino-2-methylpropanoic acid (Jiang et al., 2012).

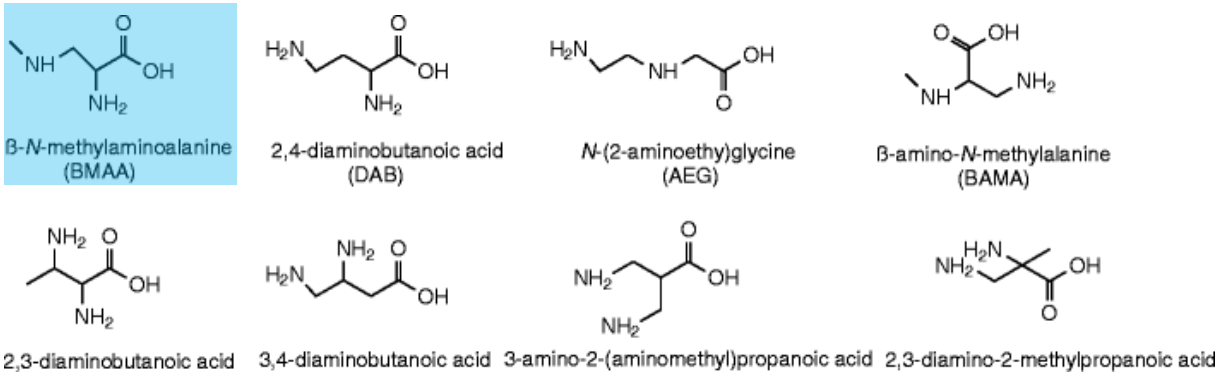

Figure 11 : Structure de la BMAA et de ses isomères (Jiang et al., 2012)

II.2.1. Organismes producteurs

Historiquement, une étude basée sur l'analyse de 30 souches de cyanobactéries appartenant à 21 genres différents a mis en évidence la production de BMAA par 97 % des espèces de cyanobactéries (Cox et al., 2005). Cependant, l'amélioration des techniques de détection et l'introduction de techniques plus spécifiques comme la LC-MS/MS a remis en cause cette hypothèse (Faassen, 2014). Seulement deux espèces de cyanobactéries (des genres *Nostoc sp*, *Leptolyngbya*) ont été formellement identifiées à ce jour comme productrices de BMAA. De plus, la BMAA peut être également produite par des diatomées ainsi que des dinoflagellés (Berntzon et al., 2013; Jiang et al., 2013; Réveillon et al., 2016b, 2015a). Quant aux isomères, il a été montré que le DAB est produit par des bactéries en tant que constituants de la paroi cellulaire du peptidoglycane ou de métabolite secondaire (Ploux et al., 2017).

II.2.2. Mécanismes d'action

Contrairement aux MCs, à ce jour, aucune donnée n'existe concernant l'ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion) de la BMAA dans les organismes. Cependant, il a été mis en évidence qu'a pH physiologique, la BMAA aurait la capacité de s'associer à des ions bicarbonate, formant un adduit dont la structure est analogue à celle du glutamate, pouvant ainsi se fixer aux récepteurs du glutamate des motoneurones, entrainant une excitotoxicité (Weiss and Choi, 1988; Lobner, 2009). Cette excitotoxicité répétée peut être à l'origine de la mort des motoneurones. La BMAA pourrait également inhiber la synthèse et /ou la stimulation de la dégradation de la glutamine (Nunn and Ponnusamy, 2009), inhiber l'antiporteur cystéine/glutamate des cellules, entrainant une diminution de la concentration en glutamate des cellules, favorisant ainsi la formation d'un stress oxydatif (Lobner, 2009). Il a également était supposé que la BMAA pourrait se lier ou s'intégrer à des protéines au cours de leur synthèse (Dunlop et al., 2013). Cependant, cette hypothèse est actuellement critiquée (Onselen et al., 2017). La BMAA pourrait également se lier à la neuromélanine, un pigment présent dans la rétine et certaines zones du cerveau, la molécule pourrait ainsi être stockée au long terme puis relarguée petit à petit, entrainant des pathologies neurodégénératives (Delcourt et al., 2017).

II.2.3. Impact de la BMAA sur la santé humaine et animale

La BMAA serait potentiellement impliquée dans le développement d'une pathologie cérébrale neurodégénérative appelée syndrome Sclérose Latérale Amyotrophique/Parkinson/démence (SLA-PDC), ou maladie de Charcot (Cox et al., 2003), dont 10% des formes sont d'origine génétique et 90% d'origine environnementale (Holtcamp, 2012). L'excitotoxicité des motoneurones que provoque la BMAA dans le cadre d'une contamination à long terme, serait responsable de la paralysie progressive des muscles lisses et striés observée dans les cas de SLA. La paralysie progressive des muscles respiratoires et de ceux liés à la déglutition entraine la mort en 3 à 5 ans environ après le diagnostic de la pathologie neurodégénérative. Historiquement, le lien entre la BMAA et le syndrome SLA/PDC a été suggéré sur l'ile de Guam, lieu où l'incidence de la maladie était 50 à 100 fois supérieure comparé au reste du monde (Torres et al., 1957) et où de la BMAA avait été détectée dans le cerveaux de personnes atteints de la maladie de Charcot (Murch et al., 2004). Il fut supposé que l'intoxication humaine serait liée à l'ingestion chronique de nourriture contenant de la BMAA suite à un

phénomène de biomagnification (Figure 12). Ainsi, l'homme ingérerait des chauve-souris (*Pteropus mariannus mariannus*) frugivores, qui elles-mêmes auraient consommées des graines de cycas (*Cycas micronesica*), plante avec laquelle des cyanobactéries du genre *Nostoc* productrices de BMAA vivent en symbiose au niveau des racines (Cox et al., 2003; Murch et al., 2004). La particularité de ce phénomène de biomagnification de la BMAA est que cette molécule étant hydrophile, celle-ci ne s'accumulerait pas dans les lipides, mais s'associerait au long terme à des protéines (Murch et al., 2004).

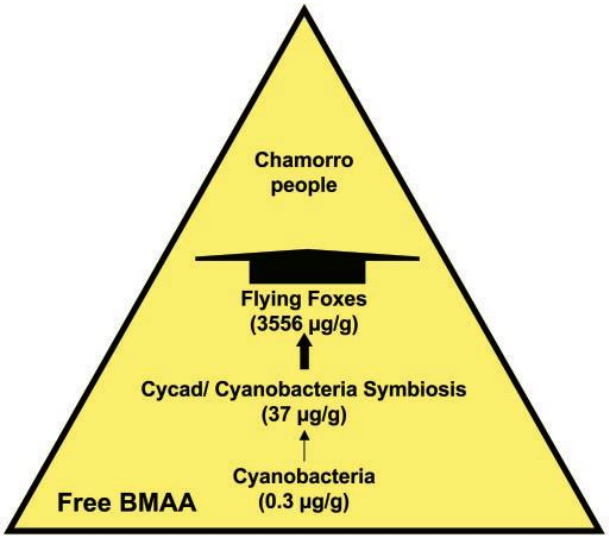

Figure 12 : Hypothèse de la biomagnification de la BMAA sur l'ile de Guam. D'après Cox et al. (2003).

Cependant, cette hypothèse est sujette à des controverses (Chernoff et al., 2017), d'autant plus que l'analyse de la BMAA dans des tissus de chauve-souris provenant de Guam s'est révélée négative lors de l'utilisation de méthode analytique plus sensibles que celles utilisées auparavant (Foss et al., 2018). Les données issues des expérimentations *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence le caractère neurotoxique de la BMAA, et un mode d'action cohérent avec les symptômes observés dans les cas de SLA (Anses, 2017). Cependant, le lien entre la BMAA et la maladie de Charcot reste à être démontré. La présence aux Etats-Unis d'une zone de sur-incidence de SLA chez les populations vivant aux abords de lacs régulièrement contaminés par les cyanobactéries (Caller et al., 2009), soulève la nécessité d'acquérir des données d'occurrence de cette neurotoxine dans les milieux.

II.2.4. Analyse de la BMAA dans les matrices biologiques

II.2.4.a. Extraction

L'analyse de la concentration de BMAA dans les matrices biologiques peut s'effectuer en utilisant divers procédés d'extraction (Figure 13), chacun informant sur la fraction dans laquelle la BMAA est présente (Faassen, 2017). La BMAA peut en effet s'accumuler sous différentes formes dans les tissus : la forme libre, la forme associée à des polypeptides de faible poids moléculaire et associée à des polypeptides de haut poids moléculaire. Il est également possible d'analyser la BMAA totale, qui représente la somme de ces différentes fractions. La nature de l'association ente la BMAA et les polypeptides n'est pas encore définie, et certains auteurs pensent qu'elle nécessite l'intervention de processus biologiques (Main et al., 2017). Il a été également supposé que la BMAA pourrait s'incorporer à la place de la sérine, lors de la synthèse des polypeptides dans des cellules humaines (Dunlop et al., 2013). Mais cette hypothèse est sujette à des controverses (Onselen et al., 2017). L'analyse de la quantité totale de BMAA dans un échantillon est effectuée par hydrolyse de la totalité des tissus, ce qui permet d'accéder au contenu cellulaire et de rompre les potentielles liaisons entre la BMAA et les polypeptides. La quantité de BMAA libre accumulée dans les tissus est évaluée, en mesurant la concentration de BMAA dans le surnageant d'un échantillon extrait avec un solvant polaire comme l'acide trichloracétique (TCA) et centrifugé (figure 12). Une hydrolyse acide (HCl) de ce même surnageant va permettre de quantifier la BMAA associée aux polypeptides de faibles poids moléculaire (« BMAA FPM »). L'analyse du culot de l'échantillon, après hydrolyse, informe sur la concentration de BMAA associée aux polypeptides de haut poids moléculaire (« BMAA HPM ») (Figure 13).

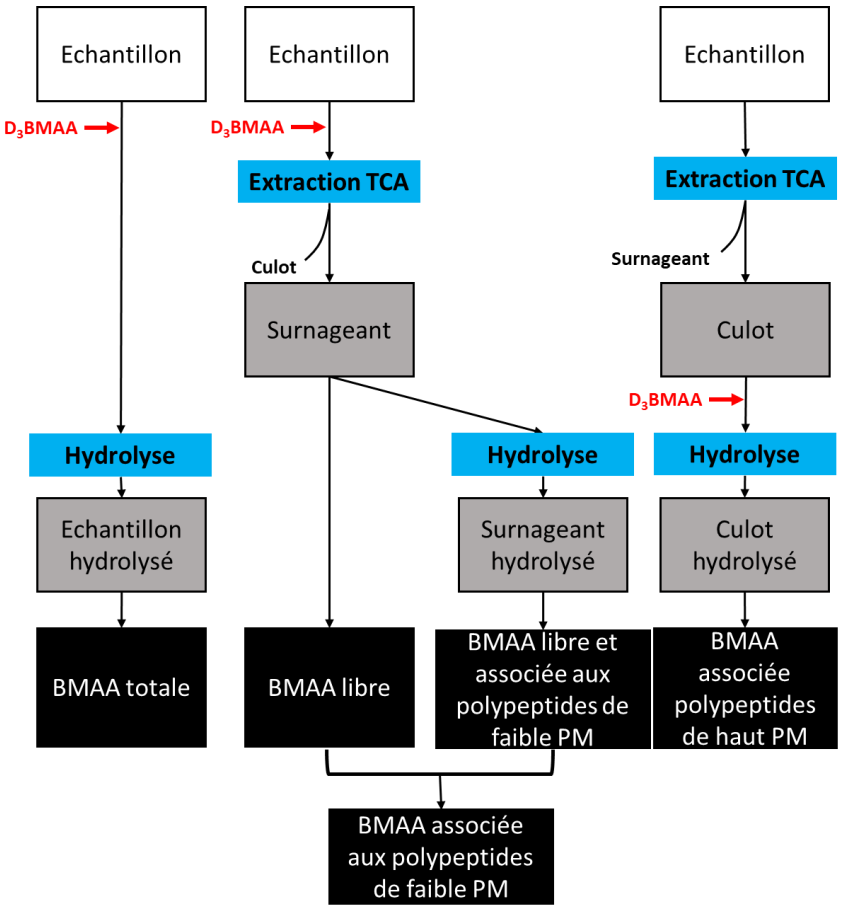

Figure 13 : Schéma représentant les différentes fractions de BMAA pouvant être extraites : BMAA totale, BMAA libre, BMAA associée aux polypeptides de faible poids moléculaire (PM), BMAA associée aux polypeptides de haut poids moléculaire. Modifié d'après Faassen, 2017.

II.2.4.b. Analyse

Plusieurs outils et méthodes existent afin d'analyser la présence de BMAA dans des matrices biologiques (Anses, 2017). Cependant, la nature hydrophile de ce composé, la potentielle coexistence de nombreux isomères et l'absence de chromophore dans ce composé fait que l'identification et le dosage de la BMAA peut être difficile et, en fonction des outils utilisés, cette étape peut générer de faux-positifs et est donc sujette à des controverses. Les premières méthodes d'analyse appliquées à la mesure de la BMAA dans les tissus étaient issues de celles développées pour l'analyse des acides aminés. L'absence de chromophore fait qu'une dérivation, étape qui consiste à ajouter aux molécules un marqueur fluorescent, doit être appliquée avant l'analyse par fluorescence en chromatographie liquide couplée à un détecteur fluorimétrique (LC-FLD) (Anses, 2017). Or cette pratique n'est pas sélective et peut induire un risque de surestimation de la concentration en BMAA. La LC-MS/MS peut également être utilisée avec ou sans dérivation. Celle-ci a pour avantage de pouvoir

discriminer la BMAA des différents isomères et donc de permettre une analyse spécifique de ce composé dans les matrices biologiques (Anses, 2017). Des tests ELISA, moins couteux, ont été récemment développés mais leur efficacité n'a pas encore été suffisamment caractérisée. Leur usage est actuellement préconisé afin d'établir une probabilité de présence de la toxine, suivie par l'utilisation de méthodes plus sélectives afin de confirmer l'information (Faassen, 2016).

II.2.5. Occurrence de la BMAA en milieu naturel

Les quelques études ayant évalué la présence de BMAA en eaux douces, que ce soit sous forme dissoute ou intracellulaire (dans la biomasse phytoplanctonique), rapportent des concentrations comprises entre 0,3 µg/L (Roy-Lachapelle et al., 2015) et 39,6 µg BMAA/L (Al-Sammak et al., 2014). La plupart des concentrations sont exprimées en biomasse phytoplanctonique et varient entre 2,3 ng/g (Jonasson et al., 2010) et 42 µg/g (Faassen et al., 2009). La BMAA a également été mesurée chez des organismes marins (Jonasson et al., 2010) et d'eau douce (Lage et al., 2015), et certains auteurs ont montré que la BMAA pouvait être biomagnifiée dans les réseaux trophiques aquatiques (Figure 14).

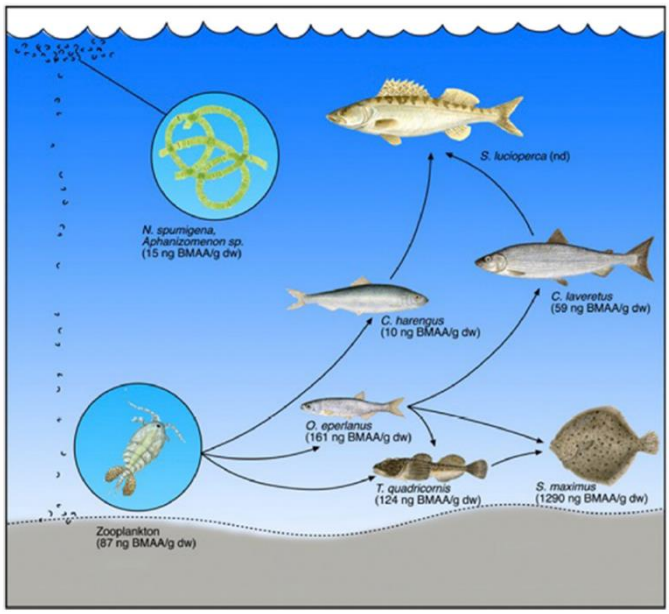

Figure 14 : Biomagnification de la BMAA en milieu marin. D'après Jonasson et al.(2010)..

Une des inquiétudes vis-à-vis de cette toxine est que celle-ci a été mesurée dans des organismes destinés à la consommation humaine, principalement dans des consommateurs primaires (bivalves et crustacés) en Europe, aux États-Unis et au Canada (Jonasson et al., 2010;

Jiang et al., 2014; Réveillon et al., 2016a, 2015a; Lance et al., 2018), mais aussi dans des consommateurs secondaires comme les requins (Mondo et al., 2014). Par exemple, de la BMAA a été systématiquement retrouvée dans des moules marines échantillonnées le long des côtes françaises, sous forme libre et associée à des polypeptides de faible poids moléculaire dans les tissus (Réveillon et al., 2016a). Une revue de l'occurrence de la BMAA dans les écosystèmes aquatiques a mis en évidence que la forme sous laquelle la BMAA était la plus souvent présente dans les matrices environnementales était la forme associée à des polypeptides de faibles poids moléculaire (Lance et al., 2018).

III. Surveillance des cyanobactéries et des cyanotoxines en eau douce

III.1. Seuils d'alerte

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a proposé des seuils d'alerte en fonction de la concentration en cyanobactéries et cyanotoxines dans l'eau de boisson et dans les eaux récréatives. Ces seuils sont associés à des recommandations en termes de suivi et de gestion (Chorus and Bartram, 1999). En ce qui concerne l'eau de boisson, il existe un seuil limite de concentration de MCs dissoutes à ne pas dépasser, de 1 µg eqMC-LR/L (Chorus and Bartram, 1999). Pour les zones de baignade ou d'activités récréatives, trois seuils de densité cellulaire de cyanobactéries ont été définis (

Tableau 2)

Tableau 2 : Recommandations de l'OMS à propos de la présence de cyanobactéries dans les eaux de baignade (Chorus and Bartram, 1999).

Observation	Niveau de risque	Risque	Action recommandées
< 20 000 cellules de cyanobactéries/ml	Pas de risque		Pas de recommandations
20 000 cellules de cyanobactéries/ml ou 10 µg chlorophylle a/L	Risque potentiel léger et / ou faible, probabilité d'effets néfastes sur la santé	Troubles non liés à la présence de cyanotoxines mais liés aux effets irritants et allergènes de certains composés produits par les cyanobactéries	• Transmission de l'information aux autorités compétentes • Information des visiteurs
>100 000 cellules de cyanobactéries/ml ou 50 µg chlorophylle a/L	Probabilité modérée d'effets indésirables	Forte probabilité d'irritations. Risque d'effets indésirables liés à la présence des cyanotoxines	• Transmission de l'information aux autorités compétentes • Surveillance quotidienne de l'apparition de bloom • Application de mesures préventives dans les zones sujettes aux proliférations • Déclenchement de campagnes d'information pour sensibiliser le publique et éviter le contact avec les blooms • La restriction de la baignade peut être envisagée
Formation d'écume de cyanobactérie à la surface de l'eau	Risque élevé d'effets néfastes sur la santé	Risque d'empoisonnement aigu pouvant être potentiellement létal	• Transmission de l'information aux autorités compétentes • Actions immédiates afin d'empêcher le contact avec l'écume de cyanobactéries • Fermeture des zones de baignade et zones liées à toute activité nautique

III.2. Méthodologies et limites

Une des difficultés rencontrées lors du suivi des cyanobactéries et de leurs toxines dans les masses d'eau réside dans la forte variabilité spatiotemporelle du développement des efflorescences de cyanobactéries. En effet, les cyanobactéries peuvent migrer horizontalement, de manière passive, sous effets des vents et des mouvements des masses d'eau (Deng et al., 2016), ce qui peut conduire à l'accumulation de biomasse dans la zone littorale. De plus, les cyanobactéries peuvent présenter une distribution parcellaire dans le milieu, en particulier pour les espèces capables de réguler leur position dans la colonne d'eau qui effectuent des migrations verticales (Salmaso et al., 2017; Qi et al., 2018). De plus, il a été montré que les migrations verticales et horizontales des cyanobactéries étaient influencées par les conditions météorologiques (Kanoshina et al., 2003; Deng et al., 2016). A cause de ces éléments, la distribution spatiale des cyanobactéries peut changer en quelques jours, voire en quelques heures (Salmaso et al., 2017), comme illustré ci-dessous (Figure 15):

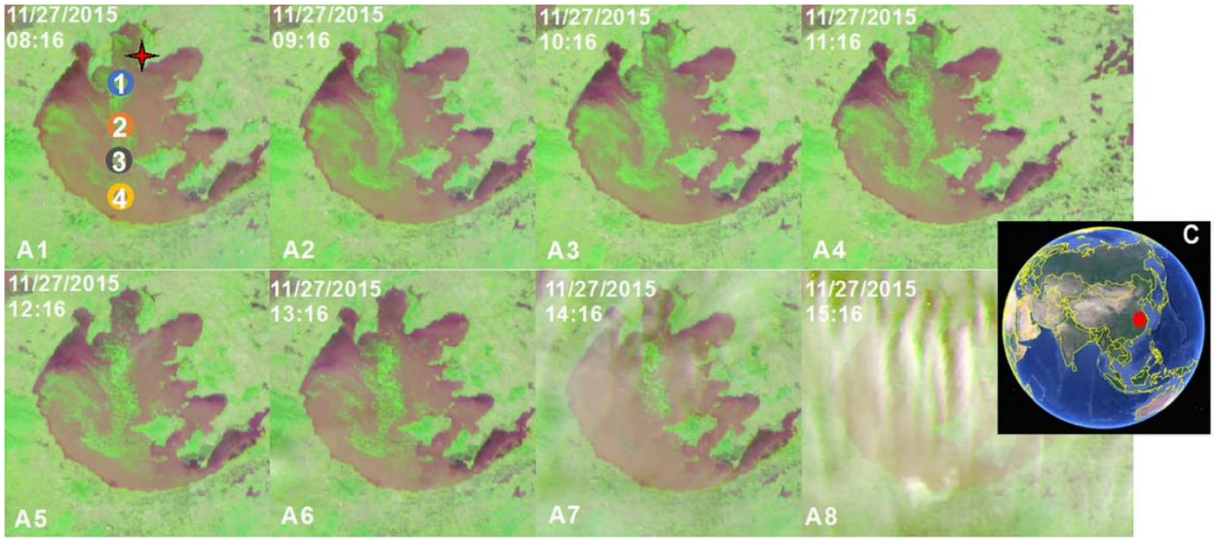

Figure 15 : Images satellites montrant la dynamique spatiotemporelle d'un bloom de cyanobactéries observé au niveau du Lac Taihu [30.88N à 31.68N, 119.88E à 120,88E, position annotée sur la carte Google Earth (C)] le 27 novembre 2015. Par temps clair (A1-A7) et lors de l'apparition d'une couverture nuageuse (A8). D'après Qi et al., 2018.

De plus, le développement de cyanobactéries peut varier temporellement en fonction des conditions abiotiques du milieu, avec des efflorescences importantes pouvant se former rapidement (quelques heures à quelques jours) grâce à une multiplication cellulaire rapide. Actuellement, la surveillance des cyanobactéries d'eau douce est basée sur un contrôle visuel des masses d'eau, associé à des prélèvements d'eau à partir desquels les espèces appartenant

au phytoplancton sont identifiées, énumérées et la concentration de MCs dans l'eau et dans la biomasse de phytoplancton est mesurée (Meriluoto et al., 2016). La fréquence d'échantillonnage recommandée est de deux prélèvements par mois, complétés par une inspection visuelle plus fréquente et une augmentation de la fréquence de prélèvement en cas de changement d'aspect de l'eau (Meriluoto et al., 2016). A cause des variations spatiotemporelles de la dynamique des cyanobactéries, décrites précédemment, cette stratégie de prélèvements ponctuels peut potentiellement induire une sous-estimation ou surestimation du risque lié à la présence de cyanobactéries et de cyanotoxines dans le milieu (Pobel et al., 2011). Ainsi, il a été estimé que des prélèvements hebdomadaires sur plusieurs sites d'un plan d'eau en période de bloom pourrait atténuer cette sous-estimation de la concentration de cyanobactéries. Or, une telle stratégie peut être chronophage pour les gestionnaires des plans d'eau. Des méthodes de télédétection en temps réel des cyanobactéries ont été développées, mais leur usage est limité lorsque les conditions météorologiques ne sont plus optimales (présence de nuages entre le site d'intérêt et le satellite) (Figure 15, A8) (Hunter et al., 2017; Qi et al., 2018). Le suivi du développement des cyanobactéries peut également s'effectuer à l'aide de sonde spectrofluorimétriques détectant la phycocyanine (Brient et al., 2008), pigment spécifique au cyanobactéries (Simis et al., 2005). Bien que ces méthodes informent sur la présence de cyanobactéries, elles ne fournissent pas d'informations sur le risque lié à la présence de cyanotoxines. En effet, toutes les cyanobactéries ne produisent pas de toxines, et les niveaux de production varient entre les espèces et entre les souches au sein d'une même espèce. De plus, la quantité de cyanotoxines produite par une souche productrice varie en fonction de la phase de croissance cellulaire et des conditions environnementales. La densité cellulaire ou la biomasse de cyanobactéries ne sont pas des indicateurs fiables de la présence de cyanotoxines, même en ne considérant que les cyanobactéries potentiellement toxinogènes. Ainsi, en vue d'établir un profil gobal de la contamination d'un plan d'eau par les cyanotoxines il est nécessaire de développer des outils intégrateurs de la présence de cyanotoxines dans le milieu. Des outils intégratifs ont été développés tel que les échantillonneurs passifs de type POCIS (Polar Organic Compound Integrative Samplers) avec des membranes en polycarbonates (Kohoutek et al., 2010) ou encore les SPATTs (Solid Phase Adsorption Toxin Tracking), avec des résines DIAION HP20 (Kudela, 2011). Cependant, l'usage de ces appareillages peut être limité par la composition du substrat. Par exemple, il a été montré que le colmatage des membranes pouvait influencer la cinétique d'accumulation de résidus médicamenteux par le biais d'une réduction de la durée de la phase linéaire (Bailly, 2013). De plus, ces membranes n'intègrent que les cyanotoxines

dissoutes dans le milieu et non les cyanotoxines intracellulaires, présentes dans les cyanobactéries. Or, il a été démontré que les MCs sont majoritairement intracellulaires lors d'une efflorescence, étant relarguées massivement sous forme dissoute dans le milieu lors de la mort des cyanobactéries (Watanabe et al., 1992). Ainsi, l'utilisation d'organismes bioindicateurs, intégrant temporellement la contamination du milieu par la toxine environnementale BMAA et par les cyanotoxines MCs, que ce soit par ingestion des cyanobactéries productrices ou par la filtration des MCs dissoutes, peut s'avérer utile dans ce contexte. A noter que des difficultés supplémentaires existent à propos du suivi de la BMAA dans le milieu. En effet, cette molécule est polaire, ce qui requiert l'utilisation d'outils très sélectifs et qui complique son dosage dans les matrices et particulièrement dans l'eau (Faassen, 2014). De plus, sa biodisponibilité dans le milieu sous forme dissoute ou intracellulaire est inconnue, et tous les organismes potentiellement producteurs de cette toxine ne sont pas identifiés.

III.3. Intérêt de l'utilisation d'espèces sentinelles pour la surveillance des milieux aquatiques

Les espèces bioindicatrices, ou sentinelles, sont des organismes ayant la capacité d'accumuler la fraction biodisponible des substances présentes dans l'environnement d'une telle manière que la concentration dans leurs tissus peut fournir une base pour estimer le niveau de contamination de l'environnement par ces substances (Phillips and Segar, 1986;Gadzała-Kopciuch et al., 2004). Un des avantages de l'utilisation de méthodes biologiques pour évaluer la qualité de l'eau est le fait que les organismes peuvent présenter une réponse intégrée vis-à-vis de leur environnement, prenant en compte les fluctuations temporelles pouvant apparaitre, elles-mêmes potentiellement ignorées par des analyses physico-chimiques ponctuelles (Mateo et al., 2015).

III.3.1. Bioindicateur : critères

Un des critères les plus important lors du choix de l'espèce sentinelle est le mode d'alimentation de l'organisme (Schöne and Krause, 2016). Par exemple, il est probable que l'ingestion et l'accumulation de substances par un organisme dépositivore soit corrélée avec la concentration de cette même substance dans le sédiment. De la même manière, les bivalves étant des espèces filtreuses, l'ingestion et l'accumulation de composés par ceux-ci devrait hypothétiquement être corrélée avec la concentration ambiante dans l'eau (Oehlmann and Schulte-Oehlmann, 2003).

D'autres critères existent pour qualifier une espèce de sentinelle (Oehlmann and Schulte-Oehlmann, 2003; Gadzała-Kopciuch et al., 2004; Li et al., 2010), ainsi l'espèce doit :

- être en contact direct avec les contaminants
- pouvoir intégrer les contaminants
- présenter une capacité limitée d'excrétion des contaminants
- pouvoir fournir un avertissement précoce de la contamination du milieu
- être répandue
- être facile à manipuler
- présenter une mobilité limitée
- avoir une durée de vie assez longue
- avoir une organisation interne et une écologie caractérisée
- pouvoir être utilisée sans être soumisses à des controverses éthiques

Car ils répondent à tous ces critères, les bivalves semblent être les modèles les plus appropriés pour la surveillance de composés dans les masses d'eau.

III.3.2. Utilisation des bivalves pour la surveillance des milieux naturels

Les bivalves d'eau douce ont déjà été proposés comme bioindicateurs de la présence de nombreuses substances présentes dans la colonne d'eau. Par exemple, des études utilisant une approche de biosurveillance passive ont montré que les bivalves sont capables d'accumuler des composés organochlorés et des mirco-plastiques dans leurs tissus (Baqar et al., 2018; Su et al., 2018). L'encagement d'individus sains, ou biosurveillance acitive, a permis de mettre en évidence la capacité des bivalves à accumuler des éléments traces métalliques et des parasites présents dans la colonne d'eau (Camusso et al., 1994; Kerambrun et al., 2016). De plus, de nombreuses études ont montré que les bivalves sont capables d'ingérer des cyanobactéries toxiques et d'accumuler des MCs en milieu naturel (Tableau 3).

Tableau 3 : Occurrence des MCs libres dans des bivalves d'eau douce

Espèce	Localisation	Technique analytique	Tissus analysés	Concentration	Référence
Anodonta anatina	Lac Babelitis (Lettonie)	ELISA	Individus entiers	0,16 - 2,42 µg/g DW	Barda et al., 2015
		LC-MS/MS	Individus entiers	0,1 - 2,5 µg/g DW	
	Lac de Burtnieki (Lettonie)	ELISA	Individus entiers	2,59 µg/g DW	
	Lac Kisezers (Lettonie)	ELISA	Individus entiers	0,55 µg/g DW	
		LC-MS/MS	Individus entiers	0,50 µg/g DW	
	Lac Lielais Baltezers (Lettonie)	ELISA	Individus entiers	0,13 - 1,68 µg/g DW	
		LC-MS/MS	Individus entiers	0,1 - 1,7 µg/g DW	
	Lac Mazais Baltezers (Lettonie)	ELISA	Individus entiers	0,08 - 1,4 µg/g DW	
		LC-MS/MS	Individus entiers	0,08 - 8,12 µg/g DW	
Anodonta sp.	Kastoria (Grèce)	Protéine phosphatase	Individus entiers	3,271 µg/g DW	Gkelis et al., 2006
Dreissena polymorpha	Lagune de Courlande (Lithuanie)	ELISA	Individus entiers	< L,D - 0,14 µg/g DW	Paldavičienė et al., 2015
		Protéine phosphatase	Individus entiers	< L,D - 0,28 µg/g DW	
Dreissena polymorpha	Lac de Burtnieki (Lettonie)	ELISA	Individus entiers	0,07 µg/g DW	Barda et al., 2015
	Lac Kisezers (Lettonie)	ELISA	Individus entiers	0,1 µg/g DW	
	Lac Lielais Baltezers (Lettonie)	ELISA	Individus entiers	0,036 - 0,04 µg/g DW	
	Lac Mazais Baltezers (Lettonie)	ELISA	Individus entiers	0,07 - 0,39 µg/g DW	
		LC-MS/MS	Individus entiers	< 0,09 µg/g DW	
Unio pictorum	Lac de Burtnieki (Lettonie)	ELISA	Individus entiers	2,97 µg/g DW	
	Lac Mazais Baltezers (Lettonie)	ELISA	Individus entiers	0,14 - 74,25 µg/g DW	
Unio tumidus	Lac Mazais Baltezers (Lettonie)	ELISA	Individus entiers	2,23 - 2,87 µg/g DW	

Concernant la BMAA, le manque de connaissances de ses producteurs et de ses formes environnementales (dissoutes ou intracellulaires) permet seulement de constater une accumulation importante chez les bivalves, sans en connaitre les voies principales d'intoxication (Tableau 4).

Tableau 4 : Occurrence de la BMAA dans des bivalves sous différentes fractions : totale, libre et associée à des polypeptides de faible poids moléculaire (PFPM)

Espèce	Localisation	Tissus analysés	Fraction	Concentration	Référence
Mytilus galloprovincialis	Etangs de Thau, France	Glandes digestives	Libre	ND - 1,2 µg/g DW	Réveillon et al., 2015
		Glandes digestives	Libre et associée aux PFPM	Moyenne : 4,0 µg/g DW	
Mytilus edulis	Côtes françaises	Glandes digestives	Libre et associée aux PFPM	0,44 - 6,7 µg/g DW	Réveillon et al., 2016b
Mytilus galloprovincialis					
Mytilus edulis	Suède	Entiers	Totale	0,08 - 0,9 µg/g WW	Jiang et al., 2014
Mytilus edulis	Amérique du Sud	Entiers	Libre	ND - 0,38 µg/g WW	Salomonsson et al., 2015
Mytilus edulis	Amérique du Sud	Entiers	Totale	1,69 - 2,28 µg/g WW	
Perna canaliculus	Australie	Entiers	Libre	ND - 0,15 µg/g WW	
Perna canaliculus	Australie	Entiers	Totale	0,55 - 1,14 µg/g WW	
Crassostrea gigas	Côtes françaises	Glandes digestives	Libre et associée aux PFPM	0,19 - 2,4 µg/g DW	Réveillon et al., 2016b
Ostrea edulis	Suède	Entiers	Totale	0,10 - 0,25 µg/g WW	Jiang et al., 2014b
Ostrea edulis	Grèce	Entiers	Totale	0,32 µg/g WW	
Crassostrea gigas	France	Entiers	Totale	0,66 µg/g WW	
Crassostrea virginica	Louisiane, U.S.A	Entiers	Totale	8,6 - 46,9 µg/g DW	Christensen et al., 2012
Crassostrea virginica	Mississippi, U.S.A	Entiers	Totale	6,8 - 9,9 µg/g DW	

Les bivalves peuvent représenter un outil intégrateur de la contamination du milieu par les cyanotoxines en raison de leur régime phytoplanctonophage, de leurs capacités de filtration et de leurs capacités d'accumulation. Ainsi, les bivalves vont potentiellement permettre de révéler la présence d'une substance dans le milieu, quand la mesure directe de sa concentration dans l'eau sera en dessous des seuils de détection (Gadzała-Kopciuch et al., 2004). Cependant, avant d'être utilisés en biosurveillance, il est important de connaitre la relation entre la concentration en toxines dans le bivalve et dans le milieu (formes dissoutes ou intracellulaires). Dans ce contexte, cette thèse vise à étudier la pertinence de l'utilisation des bivalves comme bioindicateurs de la contamination des eaux douces par les organismes producteurs de MCs et par la BMAA.

L'utilisation des bivalves dans un contexte de biosurveillance s'effectue selon deux approches : la biosurveillance passive, basée sur le prélèvement d'individus autochtones et la biosurveillance active, basée sur l'utilisations d'individus sains, provenant d'un site de référence, encagés dans la zone d'étude. L'approche passive est la plus ancienne (Besse et al., 2012). Elle est notamment développée aux Etats-Unis dans le cadre du programme « Mussel Watch », dans lequel des mollusques bivalves ont été prélevés dans le but de surveiller une série de polluants générés par les activités humaines (Schöne and Krause, 2016). Cependant, la transplantation d'individus sains possède plusieurs avantages (Phillips and Segar, 1986; Salazar and Salazar, 2006, 1996) : il est possible d'utiliser des organismes d'une même population et ayant un taille similaire, limitant la variabilité génétique et les variabilités physiologiques comme les capacités de filtrations ou de detoxification (Sylvester et al., 2005). L'encagement d'individus permet également de contrôler le temps d'exposition et l'historique de contamination car les bivalves peuvent accumuler des éléments dès leur stade larvaire (Damiens et al., 2006). Cette pratique a également pour avantage le fait de pouvoir, à posteriori, réaliser une comparaison des niveaux de contaminations de plusieurs sites. De plus, alors que l'utilisation d'espèces sédentaires est un critère souvent relevé dans un contexte de biosurveillance passive (Phillips and Segar, 1986; Gadzała-Kopciuch et al., 2004), afin de pouvoir cibler une zone d'étude, l'encagement d'individus permet de s'acquitter de cette contrainte.

Un des bivalves d'eau douce les plus utilisés en milieu continental est *Dreissena polymorpha*, une espèce connue pour ses capacités d'accumulation, qui est facile à encager (Oehlmann and Schulte-Oehlmann, 2003). Or, du fait de son caractère invasif, elle ne peut être déployée uniquement dans des zones dans lesquelles sa présence est avérée. D'où l'intérêt pour une seconde espèce, non invasive, telle qu'*Anodonta anatina*. De par leurs différences physiologiques et écologiques, ces deux espèces peuvent potentiellement se révéler complémentaires dans un contexte de biosurveillance des MCs et de la BMAA en eau douce.

IV. Les bivalves dulcicoles proposés comme espèces sentinelles

Les modèles d'étude appartiennent à l'embranchement des mollusques, regroupant les organismes non segmentés à symétrie bilatérale possédant un pied musculeux, un manteau sécrétant des formations calcaires et délimitant une cavité ouverte sur l'extérieur. Ils appartiennent également tous deux à la classe des bivalves, regroupant les mollusques aquatiques ayant une coquille composée de deux valves articulées disposées de part et d'autre du plan de symétrie.

IV.1. Anodonta anatina

L'anodonte *A. anatina* est un bivalve d'eau douce, appartenant à l'ordre des Unionidés. Les individus peuvent vivre jusqu'à 8 ans et atteindre une taille de 20 cm (Haag, 2012). Le taux de filtration de cette espèce peut varier de 628 à 1875 ml/individu/heure (Strayer, 2008). Même si à ce jour il n'y pas d'information disponible sur la gamme de taille des particules alimentaires privilégiée par cette espèce (Dionisio Pires et al., 2007), il a été montré que celle-ci est capable d'ingérer des parasites de 7,8 ± 1,6 µm (Słodkowicz-Kowalska et al., 2015) et des cyanobactéries filamenteuses de 830,8 ± 80,1 µm de long (Bontes et al., 2016). Cette espèce est largement répandue en Europe (Figure 16), des iles britanniques jusqu'à la Russie et de la Norvège jusqu'à l'Espagne (Lopes-Lima et al., 2017). L'anodonte *A. anatina* est actuellement classée en tant que préoccupation mineure par l'UICN (Lopes-Lima, 2014), bien que certaines populations soient en déclin (Lopes-Lima et al., 2017). Cette espèce peut être intéressante dans un contexte de biosurveillance car elle est généraliste, pouvant être présente aussi bien dans les cours d'eau que dans les eaux stagnantes (Lopes-Lima, 2014). Elles peuvent vivre sur un substrat composé de graviers ou fait de particules ayant un grain plus fin comme le sable (Jonsson et al., 2013).

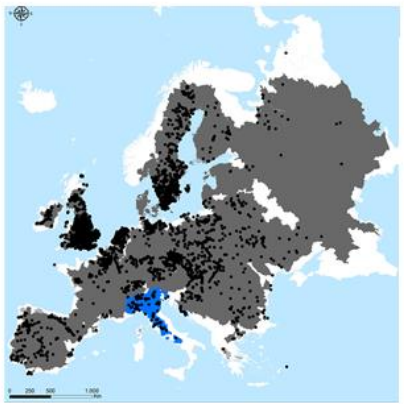

Figure 16 : Distribution de *A. anatina* (gris) et *Anodonta* sp. (bleu) en Europe. Les aires en gris représentent les aires historiques de distribution de l'espèce. Les points noirs représentent les populations connues après 1991. D'après Lopes-Lima et al (2017).

L'anodonte *A. anatina* complète son cycle reproductif (Figure 17) en une dizaine de mois. La production des gamètes culmine au début du printemps et la ponte a lieu entre avril et septembre. Chez les Unionidés, la fécondation est interne, et les œufs et les glochidies (larves) sont incubés d'octobre à mars dans les branchies des femelles jusqu'à leur libération dans la colonne d'eau en mars. Pour compléter leur cycle de développement et passer au stade juvénile, les larves doivent parasiter des poissons hôtes, jusqu'à la métamorphose en jeunes adultes (Hinzmann et al., 2013).

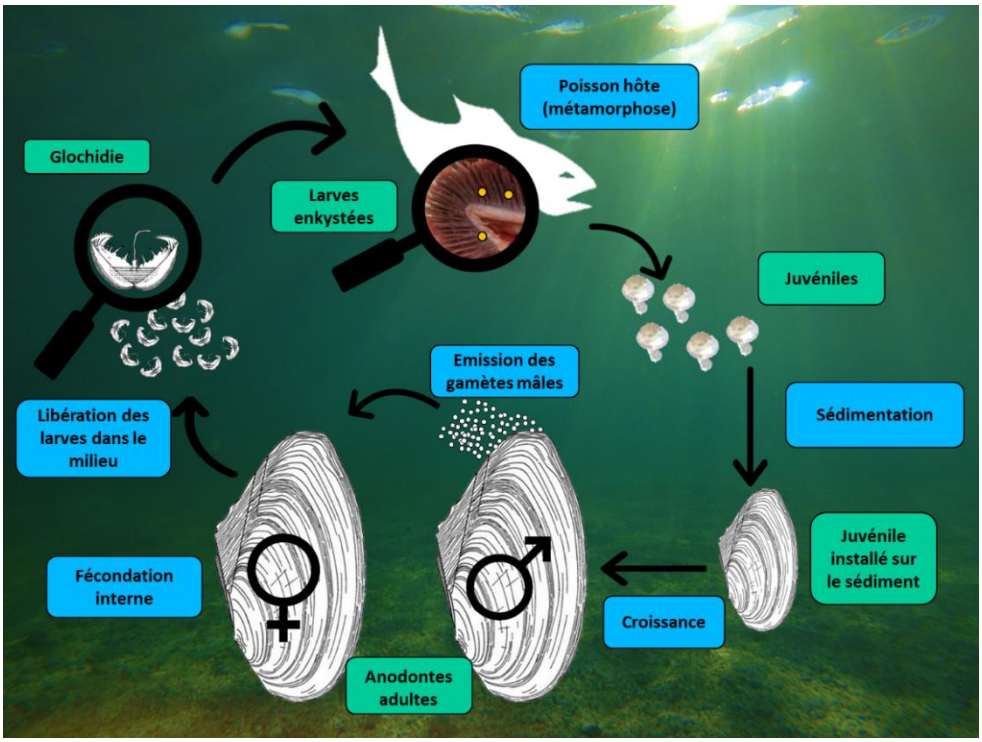

Figure 17 : Cycle biologique de *A. anatina*. Modifié d'après McIvor, 2004; Madill, 2005;Hinzmann et al., 2013; Mollusca of Belarus, 2018.

Grâce à leur pied, les anodontes sont capables de se déplacer à la surface du sédiment (Figure 18, A) (Swhalb and Pusch, 2007). Elles peuvent également s'enfouir dans le substrat (Figure 18, B), un comportement qui leur assure une certaine protection vis-à-vis des prédateurs et des parasites mais également un ancrage dans les eaux courantes, ce qui augmenterait leur survie en période de dessiccation (Jonsson et al., 2013). Cette mobilité, liée à la capacité des individus à pouvoir s'enfouir dans le substrat, peut potentiellement se révéler être un atout lors de l'encagement d'individus dans des zones riches en matière organique. En effet, il peut être envisagé que les individus se déplacent lors de l'entrée de sédiments fins ou de matière organique dans les cages, pouvant ainsi contrôler leur position afin d'optimiser l'accès aux ressources ou à l'oxygène dissous.

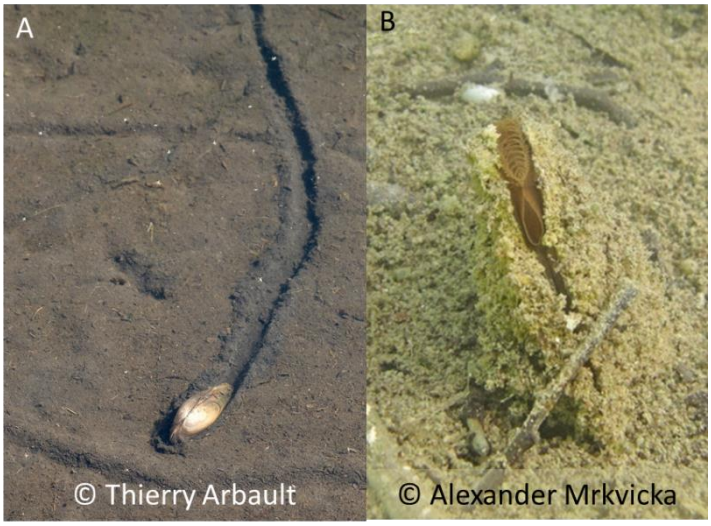

Figure 18 : Photographie d'*A. anatina* et du sillon laissé par le déplacement de l'individu sur le substrat (A) et d'un individu enfoui dans le substrat (B).

IV.2. Dreissena polymorpha

La dreissène (Figure 19) *D. polymorpha* appartient à sous-classe des hétérodontes, caractérisés par la présence de dents cardinales et latérales différenciées ou réduites. *D. polymorpha* est un bivalve de 20 à 40 mm. La capacité de filtration de cette espèce peut varier de 5 à 400 mL/individu/heure en fonction de la quantité de nourriture dans le milieu (Binelli et al., 2015). Ce taux de filtration varie également en fonction de facteurs abiotiques tel que la disponibilité en nutriments et la température de l'eau (Fanslow et al., 1995).

Figure 19 : Jeunes dreissènes (moins d'un an)

Cette espèce est originaire de la région Ponto-Caspienne (Figure 20) (Khalanski, 1997; Son, 2007), et a progressivement colonisé l'Europe de l'Ouest et l'Est de l'Amérique du Nord grâce aux développement des canaux au début de l'ère industrielle et aux eaux de ballasts des navires. Du fait de son caractère hautement invasif, *D. polymorpha* est considérée comme préoccupation mineure par l'IUCN (Van Damme, 2014a).

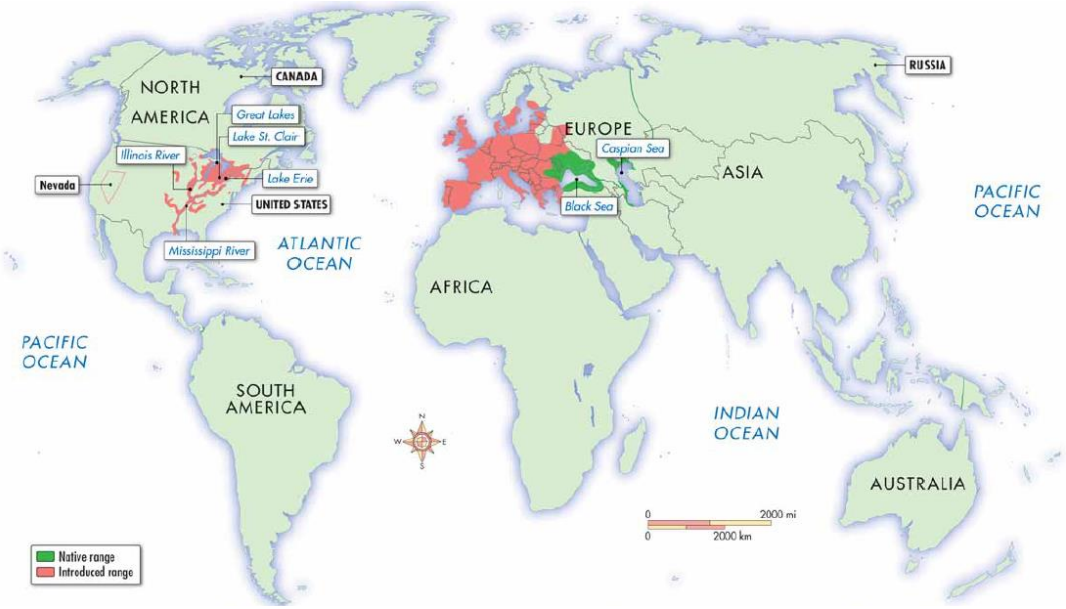

Figure 20 : Aire de répartition de *D. polymorpha* en 2008 (rouge), comprenant les zones natives (vert). D'après Gray, 2008.

Les dreissènes peuvent être présentes aussi bien dans les eaux douces que saumâtres, et occuper une large gamme d'habitats comme les rivières, les lacs et les estuaires (Van Damme, 2014a). *D. polymorpha* est une espèce sessile dont les substrats les plus favorables à son développement sont les roches, le gravier et les coquillages (Karatayev et al., 2015). Dans des

écosystèmes ayant un substrat fin, les dreissènes peuvent se développer sur des supports inorganiques (pierres) ou organiques (bois, plantes, coquilles d'autres mollusques) (Ludyanskiy et al., 1993). Le cycle de vie de *D. polymorpha* (

Figure **21**) comprend plusieurs stades larvaires libres après la fécondation externe (Ludyanskiy et al., 1993; Ackerman et al., 1994; Khalanski, 1997) : 1) une larve trochophore libre dans le milieu, 2) une larve véligère (possédant le vélum, organe impliqué dans l'alimentation et la locomotion) ,3) une larve D ou prodissoconque chez qui l'apparition des glandes coquillères permet de sécréter une coquille en forme de « D », 4) une larve véliconche possédant une seconde coquille larvaire, plus ornée et sécrétée par le manteau, et représentant le dernier stade de développement pouvant nager librement dans le milieu (

Figure **21**). Le pied se développe ensuite, formant le stade de larve pédivéligère. A ce stade, les individus sédimentent dans la colonne d'eau et vont pouvoir nager et ramper et s'établir sur un substrat adéquat sur lequel va débuter le mode de vie sédentaire. S'en suit le début de la métamorphose, transformant la larve en moule plantigrade. De profonds changements morphologiques et physiologiques vont s'opérer comme la perte du vélum, la formation des branchies et la perte de la forme ronde au profil

d'une forme générale plus triangulaire. La fin de ces modifications conduit à la transformation du plantigrade en juvénile. Les juvéniles vont croitre et, deviendront sexuellement matures au cours de leur deuxième année, devenant des adultes.

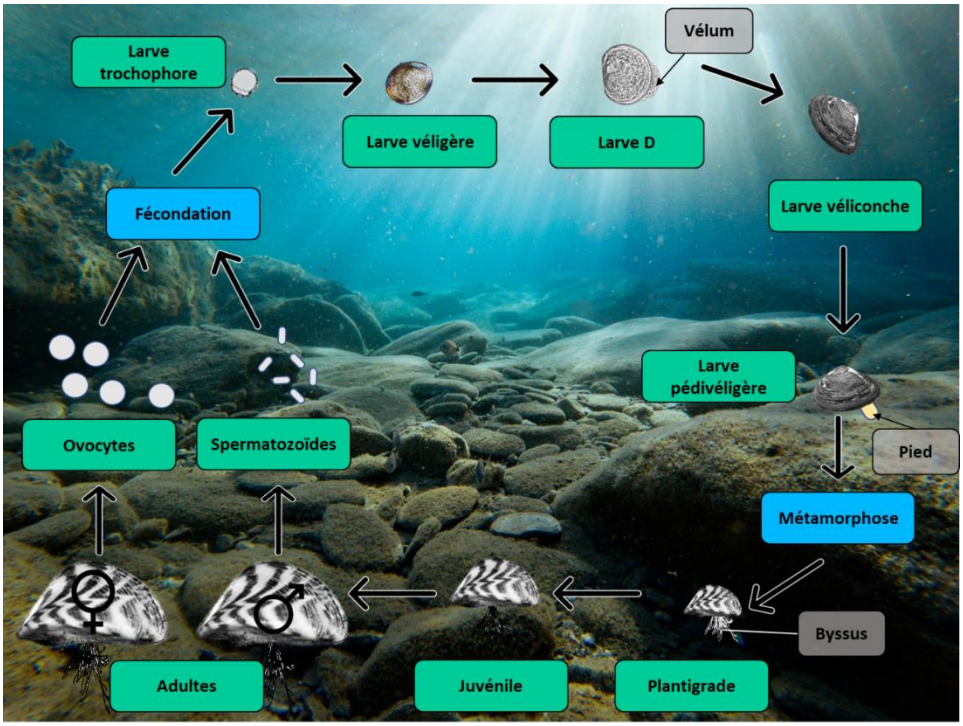

Figure 21 : Cycle biologique de *D. polymorpha*. Adapté d'après Ludyanskiy et al (1993) ;Ackerman et al. (1994); Khalanski (1997); Dionisio Pires et al (2003); U.S Geological Survey, (2017).

IV.3. Les différentes voies possibles d'intoxication des bivalves par les cyanotoxines

Les mécanismes impliqués dans l'ingestion, l'accumulation, le transport et l'élimination des contaminants par les bivalves furent particulièrement décrits lors d'études menées avec des métaux (George et al., 1976; Marigómez et al., 2002; Nugroho and Frank, 2011). Celles-ci ont permis de mettre en évidence deux voies d'entrée et de cheminement des contaminants au sein des bivalves : la voie branchiale et la voie digestive.

IV.3.1. Voie d'intoxication digestive

La première voie implique que les contaminants soient de taille suffisante afin d'être ingérés lors de la prise alimentaire, dans ce cas les particules vont suivre le cheminement emprunté par les particules alimentaires lors de la digestion (Figure 22). Cette voie va potentiellement concerner les cyanobactéries productrices de cyanotoxines.

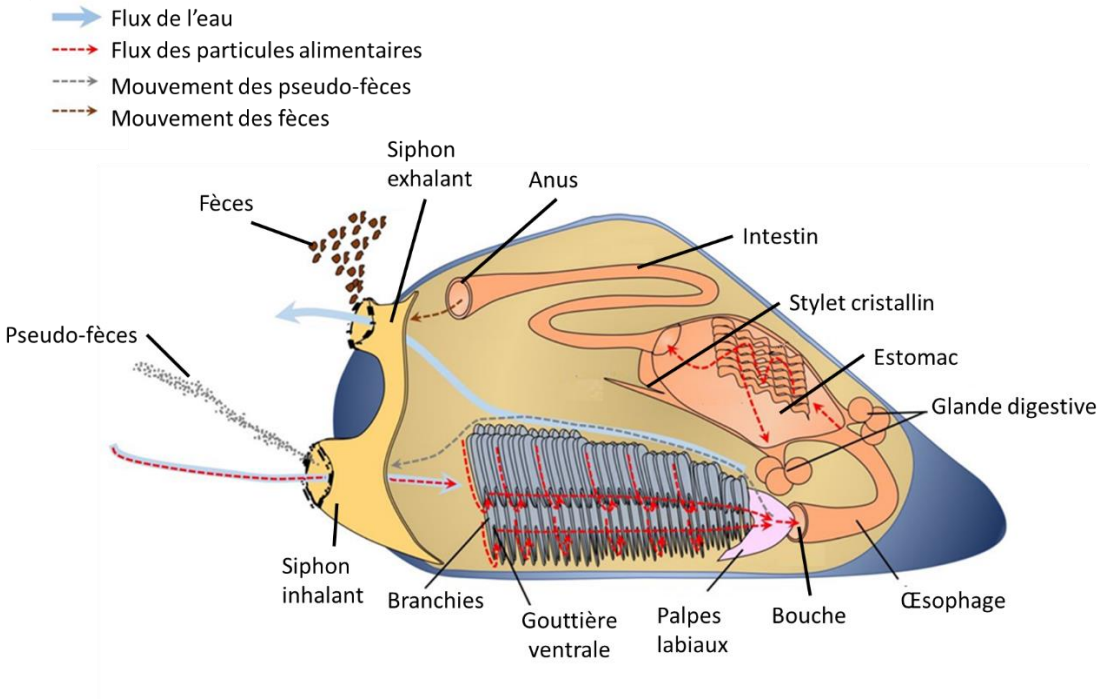

Figure 22 : Schématisation de la digestion chez les bivalves. D'après Willer and Aldridge, 2017.

Les différentes étapes et mécanismes de digestion chez les bivalves ont été décrits dans la littérature (Ward et al., 1993; Jørgensen, 1996; Baker et al., 2000; Arapov et al., 2010). Les particules entrent par le siphon inhalant et sont captées par les branchies pour être dirigées

vers la gouttière ventrale puis entrainées vers les palpes labiaux, entourant la bouche, qui vont faire un tri des particules. Les facteurs impliqués dans ce tri ne sont pas établis, certains auteurs pensent que ce tri est fait en fonction de la taille des particules, d'autres pensent que ce tri est fait en fonction de qualité de la nourriture ou encore de la composition chimique de la surface de ces particules (Arapov et al., 2010). Les particules rejetées à cette étape sont appelés pseudo-fèces et sont rejetées dans le milieu externe par le siphon inhalant. Les particules non-excrétées vont passer par la bouche, l'œsophage puis aller dans l'estomac dans lequel débute la digestion. Chez les bivalves, la digestion est biphasique : d'abord extracellulaire, au niveau de l'estomac, puis intracellulaire au niveau de la glande digestive. La digestion extracellulaire s'opère grâce au stylet cristallin, dont la rotation contre le bouclier gastrique assure le mélange du contenu stomacal, et, par ses mouvements de rotation, va fragmenter les particules les plus larges. De plus, le stylet cristallin se dissout peu à peu dans la lumière de l'estomac, libérant des enzymes digestives qui vont dégrader les particules ingérées. Les plus petites particules vont être dirigées vers la glande digestive, où la digestion intracellulaire aura lieu. La glande digestive est également un organe d'accumulation de substances, dont certaines peuvent être redistribuées vers les autres organes via l'hémolymphe (Marigómez et al., 2002).

La voie digestive semble être celle privilégiée pour cyanobactéries productiques de MCs, en raison de leur taille. Des auteurs ont démontré la prédominance de cette voie d'intoxication par rapport à l'intoxication par des MCs dissoutes dans l'eau chez des bivalves (Prepas et al., 1997; Yokoyama and Park, 2002). Cependant, l'observation de pseudo-feces a été observée lors de l'exposition de bivalves à des cyanobactéries productrices de MCs (Vasconcelos, 1995; Lisa Babcock-Jackson et al., 2002; Bykova et al., 2006; Guillaume Juhel et al., 2006; Bontes et al., 2016). Un stade plus avancé de rejet des particules indésirables, appelé pseudo-diarrhée, a été observé chez des dreissènes exposées à une souche de cyanobactéries *Microcystis aeruginosa* productrice de MCs (Juhel et al., 2006) : les particules sont éliminées par l'orifice par lequel le pied sort de la coquille. L'étude de la répartition des MCs dans les tissus des bivalves d'eau douce montre que cette toxine tend à s'accumuler dans la glande digestive, très probablement suite à l'ingestion de cyanobactéries productrices et à la libération des MCs lors du processus de digestion (Tableau 5). Les MCs libérées sont dirigées dans la glande digestive, comme démontré chez des mollusques gastéropodes (Lance et al., 2010a).

Tableau 5 : Concentration en MCs libres dans les différents tissus des bivalves d'eau douce

Espèce	Localisation	Technique analytique	Tissus analysés	Concentration	Référence
Anodonta cygnea	Lac Pamvotis (Grèce)	ELISA	Pied	0,8 ± 0,18 - 1,17 ± 0,11 µg/g FW	Papadimitriou et al., 2012
			Glande digestive	**0,88 ± 0,06 - 1,35 ± 0,16 µg/g FW**	
			Estomac	0,38 ± 0,09- 1,19 ± 0,06 µg/g FW	
			Manteau	0,67 ± 0,14- 1,15 ± 0,03 µg/g FW	
			Branchies	0,84 ± 0,08- 1,20 ± 0,05 µg/g FW	
Anodonta woodiana	Lac Taihu (Chine)	LC-MS	Intestin	0,42 - 7,88 µg/g DW	Chen and Xie, 2005
		LC-MS	**Glande digestive**	**0,15 - 5,96 µg/g DW**	
		LC-MS	Masse viscérale	0,007 - 0,31 µg/g DW	
		LC-MS	Branchies	0,034 - 0,12 µg/g DW	
		LC-MS	Foot	0,024 - 0,19 µg/g DW	
		LC-MS	Reste	0,035 - 0,11 µg/g DW	
Cristaria plicata	Lac Taihu (Chine)	LC-MS	Intestin	0,069 - 5,64 µg/g DW	
		LC-MS	**Glande digestive**	**0,16 - 38,48 µg/g DW**	
		LC-MS	Masse viscérale	0,017 - 0,71 µg/g DW	
		LC-MS	Branchies	0,035 - 0,22 µg/g DW	
		LC-MS	Foot	0,033 - 0,23 µg/g DW	
		LC-MS	Reste	0,037 - 0,22 µg/g DW	
Hyriopsis cumingii	Lac Taihu (Chine)	LC-MS	Intestin	0,035 - 20,65 µg/g DW	
		LC-MS	**Glande digestive**	**0,076 - 12,50 µg/g DW**	
		LC-MS	Masse viscérale	0,052 - 0,8 µg/g DW	
		LC-MS	Branchies	0,022 - 0,23 µg/g DW	
		LC-MS	Foot	0,015 - 0,58 µg/g DW	
		LC-MS	Reste	0,052 - 0,49 µg/g DW	
Lamprotula leai	Lac Taihu (Chine)	LC-MS	Intestin	0,18 - 2,53 µg/g DW	
		LC-MS	**Glande digestive**	**0,38 - 13,23 µg/g DW**	
		LC-MS	Masse viscérale	0,037 - 1,70 µg/g DW	
		LC-MS	Branchies	0,004 - 0,64 µg/g DW	
		LC-MS	Foot	0,021 - 0,52 µg/g DW	
		LC-MS	Reste	0,043 - 0,61 µg/g DW	

IV.3.2. Voie d'intoxication branchiale

Les substances dissoutes peuvent entrer dans l'organisme en traversant l'épithélium des branchies et arriver dans l'hémolymphe (Marigómez et al., 2002). Elles vont pouvoir ensuite diffuser dans l'ensemble des tissus. Ce schéma pourrait potentiellement s'appliquer aux MCs dissoutes dans l'eau et à la BMAA du fait de sa petite taille. Réveillon et al., (2015) ont reporté que 59 à 69% de la BMAA présente dans les bivalves était localisée dans des tissus autres que la glande digestive, ce qui appuierait une distribution hémo-lymphatique post filtration branchiale. Cependant, aucune donnée n'est disponible concernant la distribution et l'organotropisme de la BMAA dissoute chez les bivalves.

IV.3.3. Interactions entre *A. anatina* et les toxines MCs et BMAA

Peu de données sont disponibles à ce jour à propos de l'accumulation des MCs et de la BMAA par *A. anatina*. Cette espèce s'est révélée être capable de bioaccumuler des MCs libres lors d'une étude de terrain réalisée en Lettonie (Barda et al., 2015). Celle-ci a permis de mettre en évidence le fait que les anodontes pouvaient accumuler jusqu'à 88,4 ± 0,2 µg MCs/g DW, ce qui est plus élevé que pour les autres bivalves comme *U. pictorum* (accumulant jusqu'à 74,2 ± 0,5 µg MCs/g DW) et *D. polymorpha* (accumulant jusqu'à 0,39 ± 0,05 µg MCs/g DW).

Les autres études menées avec cette espèce n'ont pas eu pour but de mesurer la concentration en MCs dans les tissus, mais la mesure de son taux de clairance (étude de la disparition des particules en suspension dans l'eau). Ces études ont montré qu'*A. anatina* est capable d'ingérer les cyanobactéries *M. aeruginosa* et *P. agardhii* en laboratoire (souches productrices et non productrices de MCs), mais que cette ingestion pouvait être accompagnée de la production de pseudo-fèces (Dionisio Pires et al., 2007; Bontes et al., 2016). Les concentrations en MCs au sein d'anodontes d'une autre espèce (*A. cygnea*) ont été étudiées en Grèce chez des individus prélevés en milieu naturel (Papadimitriou et al., 2012). Parmi les différents tissus, les plus fortes concentrations en MCs libres sont mesurées au niveau de la glande digestive à raison de 1,35 ± 0,16 µg MC-LReq/g en août et 0,88 ± 0,06 µg MC-LReq/g en novembre. Des études menées avec des bivalves appartenant au même ordre ont montré que *Unio elongatulus* est capable d'accumuler des MCs libres après 24h d'exposition à 17600 +- 2600 cellules/ml de *M. aeruginosa* dont la production n'est pas indiquée (Lauceri et al., 2017). Le prélèvement de bivalves dans des zones sujettes à des proliférations de cyanobactéries a montré que *A. woodiana*, *Cristaria plicata* et *U. douglasiae* sont capables

d'accumuler jusqu'à 420 µg MCs libres/g DW dans leurs tissus, et que la glande digestive semble être l'organe cible des MCs (Watanabe et al., 1997; Yokoyama and Park, 2002).

Concernant la BMAA, aucune étude de la concentration de cette toxine dans les tissus d'*A. anatina* n'a été menée. Les données disponibles concernent des anodontes d'une autre espèce (*A. cygnea*), exposées à 100 µg/ L de BMAA pendant 24 et 48h dans le but de mesurer les activités des enzymes antioxydantes catalase (CAT), glutathion peroxydase (GPx), et glutathion réductase (GR), et d'une enzyme impliquée dans la biotransformation des composés hydrophobes, la glutathion S-transférase (GST). Les résultats montrent que les activités enzymatiques mesurées ne sont pas significativement différentes de celles observées chez les témoins (Contardo-Jara et al., 2014). Ainsi il se peut soit que la BMAA n'induise pas de stress oxydatif chez ce bivalve ou que cette défense nécessite plus de 48 h avant de se mettre en place.

IV.3.4. Interactions entre *D. polymorpha* et les toxines MCs et BMAA

Des études menées en laboratoire ont montré que *D. polymorpha* est capable d'ingérer des cyanobactéries coloniales (*M. aeruginosa*) et filamenteuses (*P. agardhii*) (G. Juhel et al., 2006; White and Sarnelle, 2014). Des études de terrain utilisant des dreissènes ont mis en évidence la capacité de ces bivalves à bioaccumuler des MCs (jusqu'à 284 ng/gDW de MCs libres). La concentration en MC bioaccumulées semble être corrélée avec la production de toxines par les cyanobactéries (Paldavičienė et al., 2015). De plus, les dreissènes pourraient protéger leurs cellules contre les stress oxydatifs lié à la présence de MCs grâce à l'activité de la SOD et de la GST (Burmester et al., 2012). Ainsi, cet organisme pourrait potentiellement se « protéger » à l'échelle cellulaire contre les MCs, ce qui pourrait participer à la survie des individus pendant les phénomènes de proliférations de cyanobactéries. D'autres mécanismes de protections semblent exister chez cette espèce lors de leur contamination par des MCs. Par exemple, la formation d'un complexe MC-LR / glutathione, dont la formation est catalysée par l'activité de la GST, a été démontré chez cette espèce, ce qui favoriserait la détoxication des MCs (S Pflugmacher et al., 1998). Aussi, les dreissènes auraient la capacité d'éliminer rapidement les MCs hors des cellules atteintes grâce à l'implication du mécanisme MXR (Multi Xenobiotic Resistance) (Contardo-Jara et al., 2008). Concernant la BMAA, une étude utilisant de la BMAA radiomarquée (5+BMAA) a mis en évidence que les dreissènes sont capables d'accumuler cette toxine dans leurs tissus (Downing et al., 2014). Des études préliminaires à ce travail de

thèse ont démontré une accumulation significative de BMAA (jusqu'à 200 µg BMAA/g de poids sec après 3 semaines d'exposition) chez *D. polymorpha* exposée à la BMAA dissoute (500 µg/L), ainsi qu'un transfert trophique de BMAA entre la dreissène et un poisson, le gardon *Rutilus rutilus* (Lance E., non publié).

V. Présentation du sujet de thèse et objectifs

La surveillance des cyanobactéries et des cyanotoxines dans les eaux de surface constitue un enjeu majeur pour les autorités sanitaires et pour les suivis écologiques. Ce sujet a pour objectif d'évaluer la pertinence des bivalves dulcicoles *D. polymorpha* et *A. anatina* comme outil de biosurveillance de la contamination des milieux aquatiques par les cyanotoxines de la famille des MCs et de la neurotoxine BMAA. Ceci afin de proposer un outil complémentaire aux méthodes actuelles de suivi des proliférations de cyanobactéries (dosages des toxines dans l'eau, identification des communautés phytoplanctoniques), permettant de mieux caractériser le niveau de contamination d'un site et ainsi d'établir des mesures préventives ciblées et pertinentes.

Les objectifs de cette thèse sont :

- **Connaitre les différentes formes d'accumulation de la BMAA, ainsi que leur distribution au sein des tissus de bivalve, afin de déterminer l'organe et la fraction d'intérêt dans le cadre d'une biosurveillance.**

L'organotropisme de la BMAA dans les tissus *D. polymorpha* a été étudié dans le cadre d'une exposition en laboratoire de trois semaines à de la BMAA dissoute, suivie d'une période de dépuration de 3 semaines en eau saine. En raison de l'absence d'identification d'organismes capables de synthétiser de la BMAA de manière stable en condition contrôlées, et de l'absence de données vis-à-vis des fractions disponibles dans le milieu (BMAA libre ou intracellulaire), il a été choisi d'exposer les bivalves à de la BMAA dissoute par balnéation. L'objectif était de déterminer s'il existe un organe cible de cette toxine chez le bivalve, qui pourra être prélevé et analysé pour révéler la contamination environnementale, mais aussi une fraction d'accumulation pertinente à quantifier. Ainsi, chacune des fractions d'accumulation (BMAA totale, libre, associée à des polypeptides de faible poids moléculaire ou de haut poids moléculaire) a été analysée dans chacun des tissus (hémolymphe, glande digestive, branchies, gonade, manteau, muscles et pied) prélevés au cours de l'exposition et de la dépuration. Cette

partie a fait l'objet d'une collaboration avec le Dr. E. Faassen (RIKILT et Aquatic Ecology and Water Quality Management Group, Wageningen University, Pays-Bas) et le Dr M. Lürling (Aquatic Ecology and Water Quality Management Group, Wageningen University, Pays-Bas), et d'un séjour de 2 mois à l'Aquatic Ecology and Water Quality Management Group de l'université de Wageningen (Pays-Bas) lors de la thèse.

- **Etudier les cinétiques d'accumulation et d'élimination de BMAA dans les individus entiers de *D. polymorpha* et les glandes digestives d' *A. anatina* exposés à différentes concentrations de BMAA dissoute.**

L'objectif est d'étudier plus précisément le lien entre la charge en BMAA dissoute dans le milieu et les cinétiques de bioaccumulation et de détoxification de la BMAA chez les organismes bioindicateurs. Les bivalves *A. anatina* et *D. polymorpha* ont été exposés à des concentrations environnementales (Al-Sammak et al., 2014; Roy-Lachapelle et al., 2015) de BMAA, soit 1, 10 et 50 µg BMAA dissoute/L, pendant 21 jours, suivis de 42 jours de dépuration dans l'eau claire. Suite aux résultats obtenus lors de l'analyse des différentes fractions de BMAA dans les tissus de *D. polymorpha*, la quantification de la BMAA totale a été privilégiée. Cette partie a également fait l'objet d'une collaboration avec le Dr. E. Faassen, le Dr. M. Lürling mais aussi avec le Dr. H. Zweers (Department of Microbial Ecology, Netherlands Institute of Ecology NIOO-KNAW, Wageningen, Pas-Bas). De le même manière, l'étude de l'organotropisme de la BMAA ayant déterminé que la neurotoxine se distribuait dans tous les tissus, sans organe cible particulier, nous avons décidé d'utiliser le corps entier de *D. polymorpha*, et uniquement la glande digestive d'*A. anatina* en raison de sa grande taille. Cet organe a été privilégié car il représente l'organe cible des MCs, donc pourrait être utilisé comme intégrateur des deux toxines dans le cadre d'une biosurveillance.

- **Etudier les cinétiques d'accumulation et d'élimination des MCs libres et totales dans les individus entiers de *D. polymorpha* et des glandes digestives de *A. anatina* exposés à différentes densités de cyanobactéries productrices de MCs.**

Les MCs libres peuvent être plus rapidement detoxifiées que les MCs liées, qui vont avoir un temps de résidence plus long dans les tissus (Lance et al., 2010b). Ainsi il est possible que l'analyse de la concentration des MCs libres dans les tissues de bivalves reflète plus précisément les variations à court terme de la contamination du milieu. Cependant, l'analyse de la fraction libre à elle seule peut potentiellement induire une sous-estimation du niveau de

contamination du bivalve, et indirectement de celui du milieu, d'où l'intérêt de la potentielle analyse des MCs totales. Une approche expérimentale a été mise en place afin de définir le lien entre la charge en MCs intracellulaires dans le milieu et les cinétiques de bioaccumulation et de détoxification de MCs sous formes libre et totale chez les organismes bioindicateurs. La synthèse bibliographique a permis de mettre en évidence que l'accumulation des MCs par les bivalves suite à l'ingestion de cyanobactérie du genre *Mirocystis*, unicellulaires en laboratoire mais souvent coloniales dans le milieu, est connue (Amorim and Vasconcelos, 1999; Dionisio Pires et al., 2004; Sabatini et al., 2011; Pham et al., 2015; Lauceri et al., 2017). Sachant que les bivalves peuvent être capables de trier les particules alimentaires avant leur ingestion (Baker et al., 2000; Winkel and Davids, 1982), de potentielles disparités peuvent exister entre l'ingestion de cyanobactéries coloniales et de cyanobactéries filamenteuses (Bontes et al., 2016). Peu de données sont disponibles sur l'accumulation de MCs par des bivalves exposés à des cyanobactéries filamenteuses. Deux études *in situ*, dans lesquelles des cyanobactéries filamenteuses étaient soit majoritaires, comme lors de la présence d'un bloom de *P. rubescens* (De Pace et al., 2014), ou observées parmi d'autres espèces de cyanobactéries (Larson et al., 2014; Paldavičienė et al., 2015), ont suggéré cette ingestion. Nous avons ainsi choisi d'exposer les deux bivalves à une souche productrice de MCs de l'espèce filamenteuse *Planktothrix agardhii*. Les bivalves *D. polymorpha* et *A. anatina* ont été exposéspar balnéation à différentes densités de *P. agardhii*, produisant un équivalent de 1, 10 et 100 µg MCs intracellulaires/L. L'évaluation de la quantité de MCs ingérées par les bivalves été réalisée par la mesure quotidienne de l'ingestion de filaments de cyanobactéries, associée à l'évaluation de la production de MCs par filament. Les cinétiques d'accumulation et d'élimination des deux fractions d'accumulation des MCs (libre et totale) chez les bivalves ont été déterminées, et confrontées aux données d'ingestion de MCs et de concentration dans le milieu, afin de déterminer quelle fraction représente le mieux les niveaux et variations de contamination environnementale.

- **Evaluer l'application des deux outils de biosurveillance des MCs et de la BMAA en milieu naturel**

Les deux modèles d'étude *D. polymorpha* et *A. anatina* ont été encagés dans plusieurs sites dans un lac peu profond (lac de l'Ailette, Aisne), soumis annuellement à des efflorescences de cyanobactéries. Une approche de biosurveillance active a été choisie afin de pouvoir maitriser l'historique de contamination des individus utilisés. Deux campagnes ont été effectuées : une

campagne de prélèvements mensuels de mai à novembre 2016, et une campagne de prélèvements hebdomadaires août 2017. Les concentrations de MCs libres et totales et de BMAA totale dans les individus entiers de *D. polymorpha* et les glandes digestives d'*A. anatina* ont été suivis, ainsi que les populations de cyanobactéries et les MCs intracellulaires dans l'eau. La pertinence de l'analyse de la BMAA totale dans les tissus de bivalves a également été investiguée mais les résultats ne sont pas encore disponibles.

Chapitre II : Distribution des différentes fractions d'accumulation de la BMAA dans les organes de *D. polymorpha*

I. Synthèse des travaux menés

L'étude de la bibliographie a mis en évidence le manque d'information concernant l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion de la BMAA par les organismes intoxiqués. Ce chapitre a pour but d'améliorer les connaissances sur la distribution de cette neurotoxine sous toutes ces formes d'accumulation (totale, libre, associée à des polypeptides de faible poids moléculaire et de haut poids moléculaire) chez *D. polymorpha*. Ceci, afin de pouvoir potentiellement proposer un organe et une fraction à privilégier lors de la biosurveillance de la BMAA avec une espèce sentinelle. Actuellement, des micro-organismes producteurs de BMAA ont été identifiés (cyanobactéries, diatomées), mais leur production n'est pas stable et constante en laboratoire (Lance et al., 2018). Ainsi, les individus *de D. polymorpha* ont été exposés à de la BMAA dissoute dans leur milieu.

D. polymorpha a été exposée en conditions semi-statiques à 7,5 µg BMAA dissoute/individu/3 jours pendant 21 jours, suivi par 21 jours de dépuration. Au jours 1, 3, 8, 14 et 21 d'exposition et de dépuration, des individus ont été prélevés et placés 24h dans des aquariums ne contenant que de l'eau claire. Cette étape a été réalisée afin de s'assurer que les concentrations de BMAA mesurées dans les tissus ne soient pas surestimées par la mesure de BMAA potentiellement contenue dans l'eau présente dans l'espace inter-valvaire. Pour chaque individu, l'hémolymphe a été ponctionnée au niveau du muscle adducteur postérieur puis les bivalves ont été sacrifiés et disséqués. Les tissus échantillonnés étaient les branchies, la glande digestive, la gonade, le manteau, les muscles et le pied (ces derniers étant regroupés ensemble). L'exposition des deux bivalves a été réalisée dans le laboratoire SEBIO, à Reims, les extractions et les analyses ont été faites dans le cadre d'un séjour et d'une collaboration avec Dr E. Faassen (RIKILT et Aquatic Ecology and Water Quality Management Group, Wageningen University, Pays-Bas), le Dr M. Lürling (Aquatic Ecology and Water Quality Management Group, Wageningen University, Pays-Bas), et Dr H. Zweers (Department of Microbial Ecology, Netherlands Institute of Ecology (NIOO-KNAW), Wageningen, Pas-Bas).

Les résultats ont montré que la BMAA totale était détectée dans tous les tissus du premier jour d'exposition jusqu'au dernier jour de dépuration. Pendant l'exposition, la concentration en BMAA totale dans l'hémolymphe était significativement (Mann-Whitney, $p < 0,01$) supérieure à celle observée dans les tissus mous (jusqu'à 1373,73 ± 131, 94 µg BMAA totale/g DW mesurés dans l'hémolymphe, contre un maximum de 134,99 ± 33,05 µg BMAA totale/g

DW, observé dans les muscles et le pied). Cependant, la concentration dans l'hémolymphe a diminué de 36.7% (208,2 µg BMAA totale/g DW) dès le premier jour de dépuration. Pendant la période de dépuration, bien que détectée, la concentration n'avait pu être déterminée, suggérant une dépendance du compartiment hémolymphatique aux concentrations du milieu. Cette diminution de BMAA totale dans l'hémolymphe est survenue en même temps qu'une augmentation des concentrations de BMAA totale dans les tissus mous, alors que les individus étaient placés dans l'eau claire. Ceci permet d'établir l'hypothèse d'un transfert de BMAA pendant la dépuration de l'hémolymphe vers les tissus mous.

Concernant les cinétiques d'accumulation et de dépuration de la BMAA totale dans les tissus mous, cette expérimentation a montré une accumulation rapide dans les tissus lors des trois premiers jours d'exposition (moyenne de 238,7 ± 65,1 % d'augmentation en 2 jours). Entre les jours 3 et 14 d'exposition, la concentration en BMAA totale dans les tissus diminue (moyenne de 22,4 ± 13,8 % de diminution entre les jours 3 et 14 d'exposition). Puis entre les jours 14 et 21 d'exposition, la concentration en BMAA totale augmente dans les tissus (moyenne de 116,8 ± 79,3 % d'augmentation entre les jours 14 et 21 d'exposition). Lors de la dépuration, la concentration en BMAA totale augmente de 59,2 ± 14,7% entre le dernier jour d'exposition et le troisième jour de dépuration dans les tissus mous. Enfin entre le troisième et le dernier jour de dépuration (21 jours), la concentration de BMAA totale diminue de 71,0 ± 9,3 % dans les tissus. Il est ainsi possible que les bivalves aient éliminé partiellement la BMAA via des phénomènes de métabolisation ou de détoxification, non connus à ce jour.

En plus de la BMAA totale, l'analyse des autres fractions d'accumulation de la BMAA (libre, associée à des polypeptides de faible et haut poids moléculaire) a été effectuée dans les tissus mous. Les résultats montrent que la BMAA était présente uniquement sous forme libre et associée à des polypeptides de faible poids moléculaire dans les branchies, la gonade, les muscles/pied et le manteau. La BMAA associée à des polypeptides de haut poids moléculaire n'ayant pas été détectée dans ces tissus (avec une incertitude pour les muscles et le pied analysés prochainement). Après 21 jours de dépuration, la BMAA étant majoritairement présente sous forme associée à des polypeptides de faible poids moléculaire dans tous les tissus mous, à l'exception des muscles et du pied, suggérant cette forme d'accumulation comme forme d'accumulation à long terme dans les tissus de bivalves.

Par conséquent, pour utiliser *D. polymorpha* en tant qu'indicateur biologique de la présence de BMAA et de ses producteurs dans l'environnement, la fraction totale de BMAA semble être la fraction la plus pertinente à étudier. De plus, si la taille de l'organisme le permet, des individus entiers devraient être échantillonnés et analysés afin d'informer sur la contamination de l'environnement. Pour des organismes de plus grande taille comme l'anodonte, la glande digestive peut être utilisée pour la biosurveillance de la BMAA, mais en ayant connaissance que la quantité de BMAA mesurée dans cet organe ne représentera qu'une fraction (environ 12,3 % des tissus mous) de l'accumulation totale chez le bivalve.

Organ distribution and accumulation fractions of the environmental neurotoxin β-Methylamino-L-alanine within the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*

Lepoutre A.[1], Faassen A.[2], Lurling M.[2], Geffard A.[1], Lance E.[1]

1. Université de Reims Champagne-Ardenne UMR-I 02 INERIS-URCA-ULH SEBIO Unité Stress Environnementaux et, BIOsurveillance des milieux aquatiques UFR Sciences Exactes et Naturelles, Campus du Moulin de la Housse, BP 1039 51687 Reims cedex, France

2. Aquatic Ecology and Water Quality Management Group, Wageningen University, roevendaalsesteeg 3a, 6708 PB, Wageningen, The Netherlands

II. Abstract

The environmental neurotoxin β-Methylamino-L-alanine is a potential threat to human health as it has been found to accumulate in organisms intended for human consumption, and particularly in bivalves. However, few data are available about the accumulation of BMAA in exposed organisms, in terms of kinetics of accumulation and detoxification, of organ distribution, and of the fractions in which BMAA is present in tissues (free, associated to polypeptides of low or high molecular weight). Here we exposed the bivalve mussel *Dreissena polymorpha* to 7.5 µg of dissolved BMAA/mussel/3 days for 21 days, followed by 21 days of depuration in clear water. At day 1, 3, 8, 14 and 21 days of exposure and depuration, the hemolymph was withdrawn and mussels were sacrificed to sample the digestive gland, the gills, the mantle, the gonad and muscles/foot. Total BMAA, free BMAA and BMAA associated to low and high molecular weight polypeptides (respectively LMWP and HMWP BMAA) were quantified by tandem mass spectrometry. The total BMAA was found in all tissues from the first day of exposure to the last day of depuration. BMAA appeared to spread throughout tissues, as no target organ was highlighted. BMAA associated to HMWP was not detected when analysed. BMAA mostly accumulated under free and associated to LMWP fractions, with variations occurring between the two fractions among tissues and over time.

III. Introduction

The environmental toxin BMAA (β-Methylamino-L-alanine) is a non-protein amino acid that has been pointed out to be potentially involved in the development of Amyotrophic Lateral Sclerosis-Parkinsonism-Dementia complex (ALS-PDC), a human neuro-degenerative pathology (Susan J. Murch et al., 2004). A recent review of the literature (Delcourt et al., 2017) showed that this environmental toxin is able to induce: (i) an excitotoxicity in presence of bicarbonate at physiological concentration, (ii) a dysregulation of the cellular protein homeostasis, and (iii) an inhibition of the cysteine/glutamate antiporter, leading to a potential oxidative stress

(Lobner, 2009). BMAA has been proposed to be misincorporated in human cells instead of the amino acid serine (Dunlop et al., 2013), which may lead to protein dysfunction, although this hypothesis has been criticized (Onselen et al., 2017). Moreover, BMAA interacts with neuromelanin into the central nervous system, which could lead to long-lasting neurotoxic activity (Delcourt et al., 2017).

Few data are available concerning the potent producers of BMAA, but existing data show that various phytoplankton species such as some cyanobacteria, diatoms and dinoflagellates may produce BMAA (Lage et al., 2014; Monteiro et al., 2016; Réveillon et al., 2016b, 2015a, 2014). Human intoxication may occure through a chronic exposure to the toxin while ingesting BMAA-containing food (Cox et al., 2003). BMAA may represent a potential health issue as it has been measured mainly in primary consumers (bivalves and crustaceans) in Europe, USA and Canada (Lance et al., 2018), and also in secondary consumers as sharks (Mondo et al., 2014). The neurotoxin BMAA may be biomagnified in marine (Jonasson et al., 2010) and continental food webs (Lage et al., 2015). As phytoplankton proliferation are increasing in a spatial and temporal extent worldwide (Hudnell, 2008), the threat of a human intoxication by BMAA is increasing. However, nowadays the BMAA occurrence and concentration when dissolved in the water is rarely assessed, in relation with an analytical challenge to concentrate and extract this small hydrophilic compound from water. Moreover, BMAA has seven isomers (Jiang et al., 2012), that may co-elute during mass spectrometry analysis. The identification and quantification of BMAA has been the subject of a strong analytical controversy, but only the use of LC-MS/MS, with or without previous derivatization, ensures a reliable identification of BMAA (Lance et al., 2018). Because the analysis of BMAA in environmental samples is a challenge, there is little reliable data available regarding the concentration of BMAA in fresh waters (Lance et al., 2018). Up to now, environmental BMAA has been analysed mostly in the phytoplankton biomass with concentrations reaching 42 µg/g DW (Faassen et al., 2009). The lack of data regarding the occurrence of BMAA in aquatic ecosystems may also be explained by the potential variability of organisms producing this toxin. Indeed, up to now no screening of a large quantity of cyanobacterial strains has been realized using a selective method of detection and quantification (Lance et al., 2018). Despite the ability to measure BMAA concentration in the phytoplankton, spatiotemporal variations of phytoplankton represent an issue. To overcome this challenge, it could be interesting to use integrator organisms.

Monitoring of substances in freshwater ecosystems can be facilitated with organisms used as bioindicators. There are several requirements for using a species in biomonitoring: the species

must be widespread, with a limited mobility, easy to handle and in direct contact with the substance in the medium (Oehlmann and Schulte-Oehlmann, 2003; Gadzała-Kopciuch et al., 2004; Li et al., 2010). That is why, through to their physiology, freshwater bivalves have been qualified as well suited as bioindicator or biomonitors (Oehlmann and Schulte-Oehlmann, 2003). *Dreissena polymorpha* is a filter-feeder bivalve with a high filtration rate, from 5 to 400 ml/mussel/hour, that may be in direct contact with environmental toxins present in the water column like BMAA, and its producers. Indeed, the study of *D. polymorpha* clearance rate and stomach contents showed that this species is able to ingest phytoplankton species like cyanobacteria and diatoms (Winkel and Davids, 1982; Vanderploeg et al., 2009). This species has been used as a sentinel organism of water quality in Great lakes from mid 1970s in the "Mussel watch" program (Kimbrough et al., 2008) to monitor levels of bioavailable pollutants (Schöne and Krause, 2016). Moreover, *D. polymorpha* is able to accumulate BMAA during a short time (up to 48h) exposure to radiolabelled BMAA (Downing et al., 2014). However, the only fractions analysed in this study were free BMMA and BMAA associated to polypeptides of high molecular weight. Indeed, BMAA may accumulate in free form ("free BMAA") in tissues, but this toxin may also be associated to polypeptides of a high ("HMWP BMAA") or low ("LMWP BMAA") molecular weights, each fraction requiring a different extraction procedure (Faassen et al., 2016). However, there is yet no data about the precursors of these fractions (Faassen et al., 2016), nor information about the nature of potential binding of BMAA to polypeptides, although some authors suggest that the binding requires biological processes to be done (Main et al., 2017).

The evaluation of BMAA occurrence in aquatic environment by using integrator organisms requires highly selective analytical methods (Faassen, 2014) as well as hindsight on the fraction that are analysed (Rosén et al., 2016b). Therefore, before investigating if *D. polymorpha* could be used as bioindicators of the presence of BMAA and its producers in fresh waters, information about its capacity of BMAA accumulation and elimination and about the BMAA distribution within this species is required. As no organism has been shown to produce steadily BMAA over time (Lance et al., 2018), we therefore used dissolved BMAA for this experiment. The present study aims to give a better understanding of BMAA accumulation and detoxification within a freshwater mussel, through the study in various organs of the total BMAA content as well as the concentrations of free BMAA and BMAA associated to LMWP and HMWP, during a discontinuous exposure to 7.5 µg of dissolved BMAA/mussel/3 day for 21 days, followed by 21 days of depuration in clear water.

III.1. Material and Methods

III.2. Mussels sampling and acclimation

Individuals of *D. polymorpha* were collected in March, at the Lac-du-Der-Chantecoq (48°36'07.7"N; 4°44'37.0"E) around 5m depth. Then mussels measuring 2 ± 0.3 cm were randomly dispatched in groups of 275 mussels in two 3L-aerated tanks containing half of water from the sampling site and half of Cristalline® source water (Saint Yorre, France). During the two-week acclimation, mussels were kept at 16±2°C with a 12h: 12h light: dark cycle and progressively maintained in 100% Cristalline®source water. Individuals of *D. polymorpha* were fed with 2 x 10^6 cells/mussel/day of a 50:50 mix of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* (Greensea, Mèze, France). Algal density was previously measured with an optic microscope (Primovert, Zeiss, Oberkochen, Germany) and KOVA® slides (Kova slide, VWR, Fontenay-sous-Bois, France). The water was renewed every three days.

III.3. Exposure

III.3.1. Experimental setting

Before the experiment, three control mussels per tanks were randomly collected and dissected to ensure the absence of BMAA within tissues. Then *D. polymorpha* were exposed 21 days to dissolved BMAA. The experiment was semi-static as the water was renewed every three days with a concentration of 7.5 µg dissolved BMAA/mussel/3 days (L-BMAA hydrochloride B-107, Sigma–Aldrich®, Saint-Louis, MO, USA). The study was carried on duplicates, with two 3L-tanks each containing 275 mussels. To maintain a constant concentration of exposure per mussel over time, the amount of BMAA added into tanks was adjusted to the number of mussels along the experiment. Mussels were fed as described during the acclimation (2 x 10^6 cells/mussel/day of a 50:50 mix of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*), one day before water changing, to prevent BMAA adsorption on food particles. After the 21-days exposure period, mussels were transferred in new tanks containing only clean water, for a 21-days depuration period.

III.3.2. Tissue sampling

Three mussels per tanks were randomly collected and put 24h in clear water before being sacrificed at days 0 (control), 1, 3, 8, 14 and 21 of exposure and during the depuration (days 22, 24, 29, 35 and 42). The 24h in clear water have been performed to ensure that the observed amount of BMAA in hemolymph and in tissues may not be overestimated by the BMAA content in intrapallial fluids. For each mussel, the hemolymph was withdrawn from the posterior adductor muscle using a 300 µL-Myjector® (Terumo, Tokyo, Japan) syringes, and transferred into Eppendorf® tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany). Then gills, the digestive gland, the gonad, the mantle and muscles/foot were separated, transferred into Eppendorf® tubes, and pooled to form three pools of two individuals per sampling time. Samples were put in liquid nitrogen then stored at -80°C. After being freeze-dried, tissues were grinded with a Mixer Mill MM400 (Retsch, Haan, Germany) using 4 beads and 4 min of beating at 30 Hz.

III.3.3. Extraction

Extraction of total, free, associated with polypeptides of low and high molecular weight BMAA has been performed as described in Faassen (2017) (Figure 23).

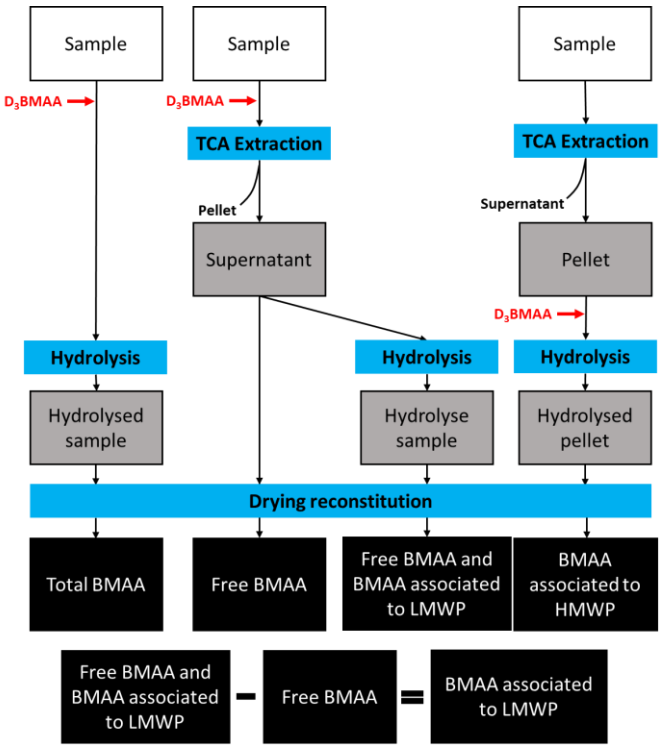

Figure 23 : Representation of the extraction procedures of various BMAA fractions (total, free, associated to low or high molecular weight polypeptides), adapted from Faassen (2017).

III.3.3.a. Total BMAA

Tissues were spiked with D_3BMAA, an internal standard, then dried under a vacuum. After the addition of 6 M HCl, tissues were hydrolysed at 0.7 mbar for 20 h at 105°C in an Eldex® hydrolysis workstation (Eldex, Napa, CA, USA). After being dried, they were resuspended twice in 67:33:0.1, ACN: water: formic acid mix and transferred into spin filter tubes (REF) and centrifuged before analysis.

III.3.3.b. Free BMAA and BMAA associated to LMWP

As described in Faassen (2017), freeze-dried tissues were spiked with D_3BMAA, dried under a vacuum and extracted with trichloroacetic acid (TCA). After centrifugation with spin filters, the sample was split into two fractions: one part of the supernatant is used for the extraction of free BMAA. The filtrate was dried with a Thermo Savant SPD121P Speed Vac (Thermo Scientific, Basingstoke, UK), and resuspended with 67:33:0.1, ACN: water: formic acid mix before analysis. The other part is used for the extraction of the total amount of BMAA that is soluble in TCA ("TCA-soluble BMAA") corresponding to free BMAA and to BMAA associated to LMWP. The filtrate was freeze-dried, hydrolysed with 6 M HCl and then resuspended with 67:33:0.1, ACN: water: formic acid mix before analysis. The concentration of BMAA associated to LMWP was calculated by subtracting the concentration of "free BMAA" to the concentration of "TCA-soluble BMAA".

III.3.3.c. BMAA associated to HMWP

According to Faassen (2017), TCA was added to freeze-dried tissues before centrifugation. The supernatant was discarded, and the pellet has been hydrolysed with 20 mM HCl. After the addition of D_3BMAA, samples were dried, hydrolysed with 6M HCl suspended twice in 67:33:0.1, ACN: water: formic acid mix and transferred into spin filter tubes and centrifuged.

III.3.4. UHPLC-MS/MS analysis

The UHPLC-MS/MS analysis has been performed as described in Rosén et al. (2016a) on the same equipment but using a 150 mm column instead of a 100 mm column with a 5 mm precolumn. BMAA was separated from DAB and AEG; the retention time of BMAA and D3BMAA was 9.4 min, the retention time of DAB was 10.8 min, and the retention time of AEG was 11.8 min. For BMAA, the ion ratios were as follows: m/z 102:88, 27%; m/z 102:76, 27%; m/z 102:73, 20%; and m/z 102:44, 52%. For D3BMAA, the ratios were m/z 105:88, 31%; and

m/z 105:76, 23%. A 20% relative deviation from these ratios was allowed in the samples. Retention times and ion ratios were comparable to those reported in Rosén et al. (2016a). BMAA concentrations were corrected for the signal intensity of the internal standard.

III.3.5. Statistics

Statistical analyses were performed with Statistica (Version 8.0.360.0, Statsoft, Tulsa, USA, 2007). Pearson correlation coefficient at significance level of $p < 0.05$ was used to determine the correlation between variables. The normality has been studied with a Shapiro-Wilk test, and the homogeneity of variances was studied with a Levene test. The comparison of multiple independent samples was done with Kruskal-Wallis tests and comparisons between two dataset were made with Mann-Whitney test.

IV. Results

Total BMAA has been found in all tissues from the first day of exposure, to the last day of depuration (Figure 24). Even if technical difficulties prevented the quantification of total BMAA in samples from day 3 of depuration in the hemolymph, BMAA has been detected in this tissue until day 42 (after 21 days in clear water). Because total BMAA and the fraction of BMAA associated to HMWP was not measured yet in muscles and foot, the dataset regarding this tissue is incomplete at the date of this PhD report. Therefore, only in this tissue, the amount of total BMAA was evaluated by adding free BMAA and BMAA associated to LMWP, under the assumption that BMAA associated to HMWP were negligible as observed in all other tissues. This will be corrected as soon as we get the results.

Regarding the BMAA distribution in tissues, during the exposure total BMAA concentration in the hemolymph was significantly higher compared to other tissues (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$). In soft tissues, no organ appeared to stand out from the others in terms of BMAA concentration during the exposure and the depuration, as no significant differences in total BMAA contents were observed between tissues during both periods (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$). The maximum concentration was observed at day 21 of the experiment (last day of exposure) in the hemolymph (1373.73 ± 131.94 µg BMAA/g DW), at day 22 (first day of depuration) in the mantle (117.51 ± 20.31 µg BMAA/g DW), and at day 24 (third day of depuration) in the gonad and in muscles and foot (from 83.59 ± 39.16 µg BMAA/g DW to

148.51 ± 20.43 µg BMAA/g DW). During the exposure there was a significant correlation Pearson's r = 0.8733, $p < 0.05$) between the mantle and the digestive gland, which in turn was correlated with muscles/foot and the gonad (Pearson's r, $p > 0.05$). The calculation of the percentage of total BMAA between day 21 of exposure and the last day of depuration showed that total BMAA tended to decrease in gills (-75.31%) and the gonad (-38.58%). This decrease was significant (Mann-Whitney test, $p < 0.05$) in the digestive gland (-49.84 %), the mantle (-41.63 %) and muscles/foot (-89.59%).

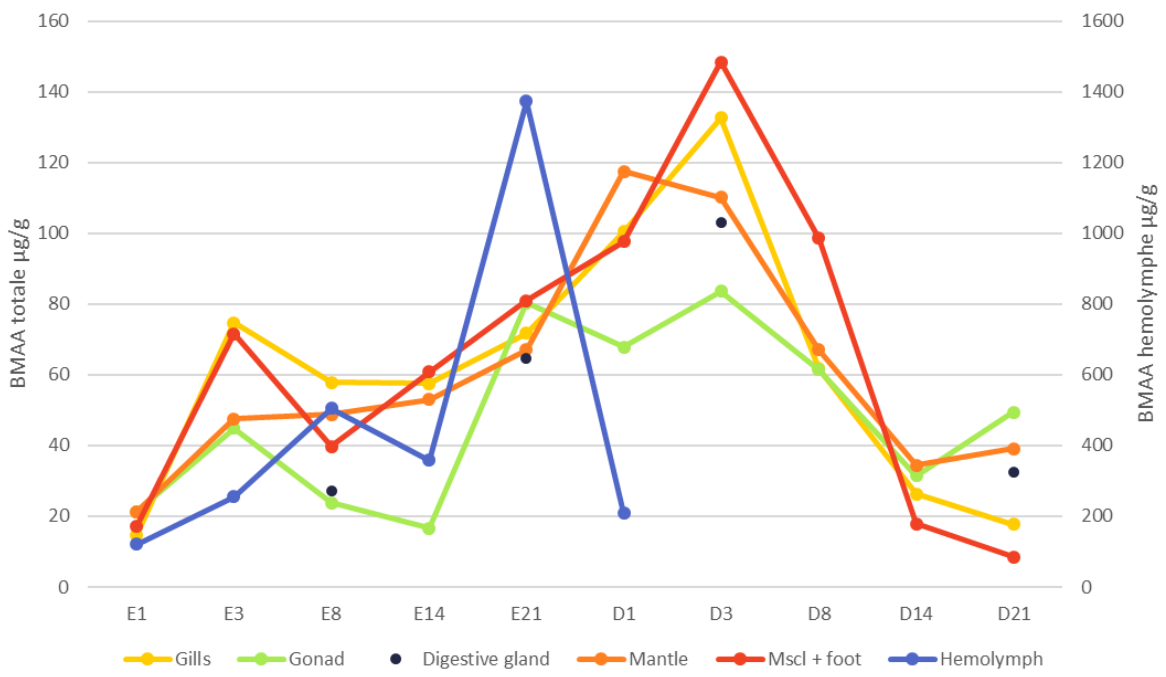

Figure 24 : Total BMAA concentrations in gills (yellow), gonad (green), digestive gland (blue dots), mantle (orange), muscles and foot (red) and hemolymph (blue, secondary axis) of *D. polymorpha* during the exposure (from day 1 to 21: blue area) and the depuration (from day 22 to 42: white area). Regarding the hemolymph, technical difficulties prevented the quantification of total BMAA in samples from day 25, although BMAA was detected at each sampling day of the experiment.

In addition to the total fraction, free BMAA as well as BMAA associated to LMWP and HMWP have been measured for each tissue at each sampling day (Figure 25). Because of a lack of materials to measure those fractions in the hemolymph, data available regarding free BMAA and BMAA associated to LMWP and HMWP concerned only soft tissues. In all soft tissues, when analysed, no BMAA has been found to be associated with HMWP. Except in the mantle during the exposure where free BMAA concentration was significantly higher compared to BMAA associated to LMWP (Mann-Whitney test, $p < 0.01$), representing overall 62.8 ± 0.2 %

of total BMAA in this tissue, there was no significant differences between those two fractions in other soft tissues (Mann-Whitney test, $p > 0.05$). In gills, gonad, muscles and foot, the main fraction measured varied among tissues and over time. Those fluctuations were more pronounced in muscles and foot for which from day 1 to 14 of exposure BMAA is mainly associated to LMWP and then free BMAA dominated, and even represented 86.6 % of total BMAA at day 21 of depuration in muscles/foot samples.

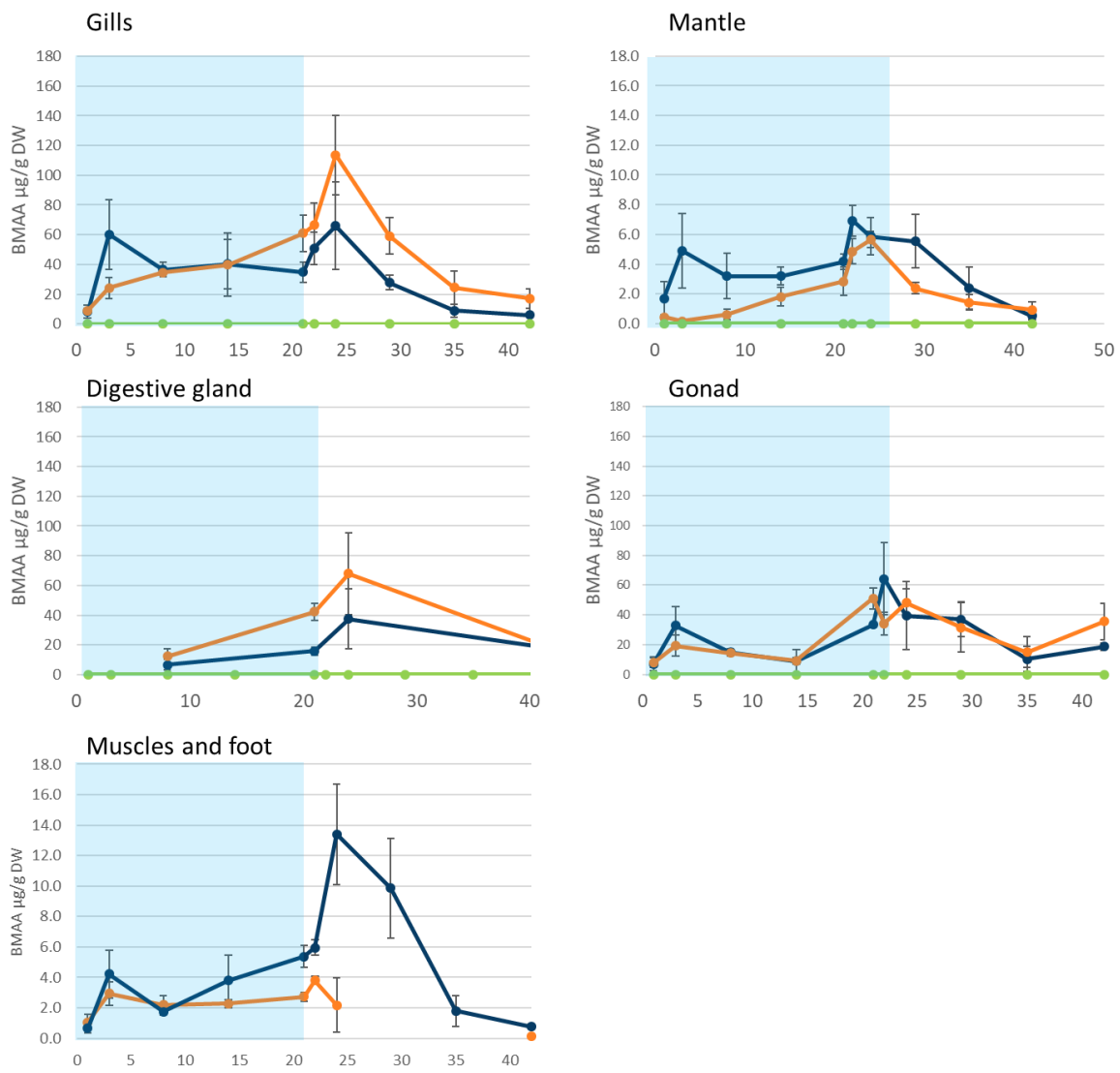

Figure 25: Mean ± SEM concentrations of BMAA associated to LMWP (orange lines), associated to HMWP (green lines) and free BMAA (dark blue lines) in soft tissues of *D. polymorpha*, during the exposure (from day 1 to 21: blue area) and the depuration (from day 22 to 42: white area).

V. Discussion

Here, *D. polymorpha* was exposed to dissolved BMAA day for 21 days, followed by 21 days of depuration. The objectives consisted in analysing the distribution of BMAA between the different organs of *D. polymorpha,* and the kinetics of the different BMAA fraction (total, free, associated to LMWP, associated to HMWP) in tissues and over time.

V.1. Organ distribution of BMAA in *D. polymorpha* over time of exposure and depuration

The dissolved BMAA to which *D. polymorpha* were exposed may have been taken-up through: i) the digestive tract, ii) gills by direct diffusion, and iii) to a lesser extent the mantle pathway. Because of the small size of this amino acid, its hydrophilic nature and because animals were fed one day before water changing to prevent BMAA adsorption on food particles, it is highly probable that BMAA may have follow the distribution of dissolved contaminants and amino acids through gills and mantle. As demonstrated with metals, dissolved particles can directly cross gills and reach the hemolymph and then be distributed to other tissues (Marigómez et al., 2002). This has also been described with amino acids in *Mytilus californianus*, and may occur through several mods of diffusion across gills that could ensure a supplement to animal nutrition or the maintenance of epidermal cellular free amino acid pools (Wright, 1985). The transport of amino acids from the medium to tissues through gills can be fast, as 63 % of aspartate and 84 % of serine were removed from the medium by one mussel during a single passage of water through the mantle cavity of mussels (Manahan et al., 1982). In *Crassostrea gigas*, glutamate, the analogue of BMAA adducts in presence of bicarbonate at physiological concentrations (Weiss and Choi, 1988), was found in gills, mantle, muscles and hemolymph after a two-hour exposure to 5.0 µM (Rice and Stephens, 1987). A minor entryway of BMAA within mussels may be the mantle. Indeed, the epithelium of this tissue is a unicellular layer, directly exposed to the surrounding medium, which can be crossed by dissolved elements present in the ambient water by active or passive transports mechanisms (Schöne and Krause, 2016). The transport of amino acids through the mantle has been hypothesized as, after a one-hour exposure to 1 µM of radioactive-labelled taurine, an organic compound that is not incorporated into peptides and that is slowly metabolised, 68 % of the activity was measured in gills, 15 % in the mantle and 17 % in remaining tissues (Jorgensen, 1983). The uptake of taurine per gills may even be similar to the one occurring through the mantle when comparing the uptake per unit of tissue area (Jorgensen, 1983). Because of the correlation between the

concentrations we observed in the mantle and the digestive gland, which in turn was correlated with muscles/foot and the gonad during the exposure, it can be hypothesized that gills and mantle, had a different role in BMAA accumulation kinetic and may represent the BMAA entry route within *D. polymorpha*. The toxin may then have been secondary distributed to muscles, gonad and digestive gland tissues through the hemolymph, potentially associated to dissolved hemoproteins. BMAA may have then diffused throughout mussels and accumulated in tissues, without any specific target organ. Our results show that once in the circulatory system, BMAA has been circulated within a few hours throughout mussels, and accumulated in all organs from the first day of exposure. These observations are consistent with the fact that the mixing of hemolymph with injected inulin has been shown to be usually complete within an hour (Jones, 1983). This may explain why BMAA was found in all tissues, with similar concentrations within 24h of exposure and not solely in gills and mantle.

The estimated concentration of BMAA in the hemolymph was higher compared to other tissues: the maximum BMAA concentration in the hemolymph was 1373.73 ± 131.94 µg/g DW compared to from 14.79 ± 2.51 µg/g DW (in gills at day one) to 134.99 ± 33.05 µg/g DW (in muscles/foot at day 24). This has also been observed when exposing the bivalve *Mercenaria mercenaria* to 100 ng/L of cadmium where, after 10 hours, less than 10 % of Cd has been found in hemocytes, around 35 % in soft tissues and roughly 60 % were found in the plasma (Robinson and Ryan, 1988). However, after 31 days, only 10 % of Cd was found in the plasma as the proportion of Cd in soft tissues increased (Robinson and Ryan, 1988). The transfer of BMAA to tissues through the circulatory system might explain the increasing concentration of total BMAA in tissues from the first to the third day of depuration that we observed. Indeed, total BMAA reached from 83.59 ± 39.16 µg BMAA/g DW (in the gonad) to 148.47 ± 20.43 µg BMAA/g DW (muscles/foot) three days after mussels were placed in clean water. It is therefore probable that BMAA penetrating in the hemolymph during the last days of exposure has been assimilated and further distributed to other tissues during the first days of depuration. After the third day of depuration, the total BMAA content decreased in all organs, demonstrating a detoxification, albeit partial as concentration of total BMAA at the 21sd day of depuration ranged from 8.43 ± 1.55 µg BMAA/g DW to 49.37 ± 1533 µg BMAA/g DW depending on tissues. As circulating hemocytes have been shown to transport metals to organs involved in their detoxification and elimination like nephrocytes (Marigómez et al., 2002), it can be hypothesized that BMAA transport from hemolymph to tissues was not one-way, and that small proportion of BMAA could be transported from tissues to the hemolymph

to be excreted by an unknown route. The following figure represent a hypothetical pathway of dissolved BMAA within *D. polymorpha* (Figure 26).

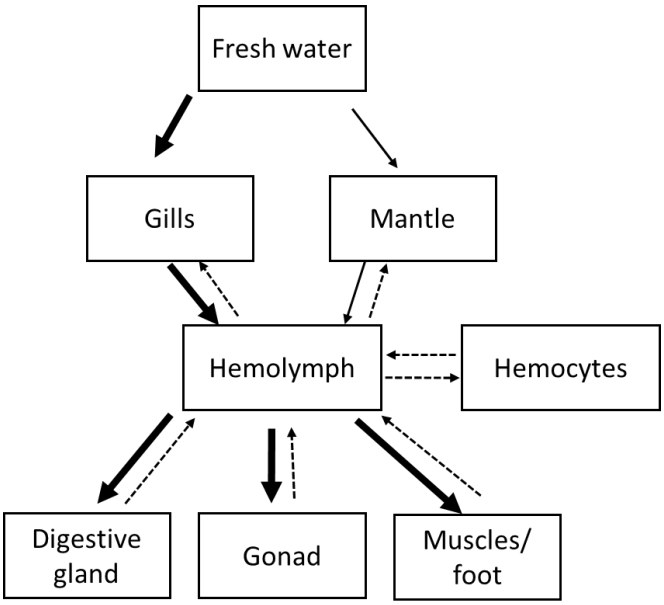

Figure 26 Diagram representation of hypothetical pathway of dissolved BMAA within *D. polymorpha*. Thick arrows indicate major pathways, whereas minor hypothetical transport is shown by thin arrows. Other hypothetical pathways are indicated in dotted lines. Figure adapted from Ricciardi et al. (2016).

V.2. BMAA accumulation fractions in tissues of *D. polymorpha*

The BMAA associated to LMWP and the free BMAA represented the main forms of accumulation in *D. polymorpha* as, when analysed, no BMAA was found in the fraction associated to HMWP. Previous exposure of *D. polymorpha* to $^{5+}$BMAA showed a BMAA accumulation under both free and BMAA associated to polypeptides of HMW fractions (Downing et al., 2014). Unfortunately, 5+BMAA associated to LMW polypeptides was not analysed, and discrepancies between the estimated total amount of BMAA removed from the medium by *D. polymorpha* and the total amount of BMAA detected in mussels were observed (Downing et al., 2014). It can therefore be hypothesized that BMAA associated to LMWP may represent, in a certain extent, to the “unaccounted BMAA” in the study of Downing et al. (2014). The nature of the association of BMAA to polypeptides, as well as the size of the polypeptide chains to which BMAA is associated are still unknown. It has been hypothesized that BMAA could be incorporated into polypeptides during the RNA translation by replacing the amino-acid serine (Dunlop et al., 2013). Although, this hypothesis has been criticized

(Onselen et al., 2017), and the association of BMAA to polypeptides may requires biological processing (Main et al., 2017). Because TCA was used to precipitate proteins, the absence of BMAA associated to HMWP could mean that BMAA was either free or associated to LMWP. In rat urine, the TCA-soluble fraction contained peptides of less than 14 kD, while higher fragments were all in the precipitate (Gudehithlu et al., 2004). However, because TCA has been shown to be less efficient to precipitate unfolded proteins compared to folded ones (Rajalingam et al., 2009), BMAA could also be associated to heavier but non-sedimented polypeptides. In the present study, after 21 days in clean water, BMAA was still found within all tissues and was mostly associated to LMWP except in muscles/foot. The analysis of BMAA in environmental samples (bivalves and crustaceans) has shown that BMAA associated to LMWP may account for a major part of accumulated BMAA (Lance et al., 2018). This fraction might therefore represent the long-term accumulation form of BMAA within mussels.

V.3. BMAA kinetics of accumulation and elimination within tissues

Some variations of total BMAA concentrations could be observed over time: for the first three days of exposure, BMAA concentration within each tissue increased rapidly. This was also observed during an exposure of *D. polymorpha* to 100 µg $^{5+}$BMAA/L for 24 and 48h, when the measure of BMAA concentration (free and associated to HMWP), showed no metabolization of BMAA during this time frame (Downing et al., 2014). Then, a stagnation (mantle) or decrease (others soft tissues) of BMAA concentration was observed from day 3 to 14, when BMAA was still present in the medium. This lower accumulation rate may have occurred because of a potent metabolization or a detoxification of BMAA. However, as BMAA is an hydrophilic compound, the biotransformation of this amino acid by the enzyme glutathione-S-transferase (GST) is not expected (Downing et al., 2014), despite the demonstrated impact of BMAA on the GST activity. Indeed, BMAA either promoted inactivation of GST activity, as demonstrated on purified proteins (van Onselen et al., 2018), or activated this enzyme, as observed in *D. polymorpha* exposed 24h to 500 µg BMAA/L (Contardo-Jara et al., 2014). As we quantified BMAA in the LMWP fraction, the potent complex BMAA-LMWP formed could be conjugated to glutathione by GST and eliminated. We can also hypothesize that free BMAA may be release during this biotransformation, favouring the presence of free BMAA in tissues. During the depuration, BMAA associated to LMWP and free BMAA represented the main forms of BMAA accumulation in soft tissues, and their elimination was partial. The metabolisation and potent detoxification pathways of BMAA remains to be investigated.

VI. Conclusion

The study of the organ distribution of BMAA within *D. polymorpha*, and the dynamics of the different fractions showed that BMAA was found in all tissues of *D. polymorpha* from the first day of exposure to the last day of depuration (after 21 days in clean water), without any specific target organ. Main entrance pathway may be through the mantle and gills, and then BMAA was transferred to other tissues by the hemolymph. However, the ingestion of BMAA adsorbed on particles or via water ingestion remained possible, but probably less significant. When analysed, no BMAA was found to be associated to HMWP. In soft tissues, BMAA was either free or associated to LMWP. However, fluctuations exist between these two fractions over time. Because the fraction of BMAA associated to LMWP, also called the "soluble-bound" fraction, was the main fraction in soft tissues during the 21-day depuration, except in the mantle and muscles/foot, this fraction may represent the long-term accumulation form of BMAA in bivalves. Therefore, to use *D. polymorpha* as a bioindicator of the presence of BMAA and its producers in the environment, the total BMAA fraction appeared to the most relevant fraction to study and, when possible, whole individuals should be sampled and analysed to inform about the environmental contamination. Moreover, further investigations are needed to understand the partial elimination of this hydrophilic compound from tissues of bivalves.

Acknowledgments

This work was financed by the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (2015/1/191), and by the Eole scholarship from the Réseau Franco-Néerlandais.

VII. References

Contardo-Jara, V., Otterstein, S.K.B., Downing, S., Downing, T.G., Pflugmacher, S., 2014. Response of antioxidant and biotransformation systems of selected freshwater mussels (Dreissena polymorpha , Anadonta cygnea , Unio tumidus , and Corbicula javanicus) to the cyanobacterial neurotoxin β-N-methylamino-L-alanine. Toxicological & Environmental Chemistry 96, 451–465. https://doi.org/10.1080/02772248.2014.945452

Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., 2003. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100, 13380–3. https://doi.org/10.1073/pnas.2235808100

Delcourt, N., Claudepierre, T., Maignien, T., Arnich, N., Mattei, C., 2017. Cellular and Molecular Aspects of the β-N-Methylamino-l-alanine (BMAA) Mode of Action within the Neurodegenerative Pathway: Facts and Controversy. Toxins 10, 6. https://doi.org/10.3390/toxins10010006

Downing, S., Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S., Downing, T.G., 2014. The fate of the cyanobacterial toxin β-N-methylamino-l-alanine in freshwater mussels. Ecotoxicology and Environmental Safety 101, 51–58. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.11.028

Dunlop, R.A., Cox, P.A., Banack, S.A., Rodgers, K.J., 2013. The Non-Protein Amino Acid BMAA Is Misincorporated into Human Proteins in Place of l-Serine Causing Protein Misfolding and Aggregation. PLoS ONE 8, e75376. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075376

Faassen, E., 2014. Presence of the Neurotoxin BMAA in Aquatic Ecosystems: What Do We Really Know? Toxins 6, 1109–1138. https://doi.org/10.3390/toxins6031109

Faassen, E., Antoniou, M., Beekman-Lukassen, W., Blahova, L., Chernova, E., Christophoridis, C., Combes, A., Edwards, C., Fastner, J., Harmsen, J., Hiskia, A., Ilag, L., Kaloudis, T., Lopicic, S., Lürling, M., Mazur-Marzec, H., Meriluoto, J., Porojan, C., Viner-Mozzini, Y., Zguna, N., 2016. A Collaborative Evaluation of LC-MS/MS Based Methods for BMAA Analysis: Soluble Bound BMAA Found to Be an Important Fraction. Marine Drugs 14, 45. https://doi.org/10.3390/md14030045

Faassen, E.J., 2017. Extraction and LC-MS/MS Analysis of Underivatised BMAA, in: Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 439–446. https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch55

Faassen, E.J., Gillissen, F., Zweers, H.A.J., Lürling, M., 2009. Determination of the neurotoxins BMAA (β- N-methylamino-L-alanine) and DAB (α-,γ-diaminobutyric acid) by LC-MSMS in Dutch urban waters with cyanobacterial blooms. Amyotrophic Lateral Sclerosis 10, 79–84. https://doi.org/10.3109/17482960903272967

Gadzała-Kopciuch, R., Berecka, B., Bartoszewicz, J., Buszewski, B., 2004. Some considerations about bioindicators in environmental monitoring. Polish Journal of Environmental Studies 13, 453–462. https://doi.org/10.1.1.470.4808

Gudehithlu, K.P., Pegoraro, A.A., Dunea, G., Arruda, J.A.L., Singh, A.K., 2004. Degradation of albumin by the renal proximal tubule-cells and the subsequent fate of its fragments. Kidney International 65, 2113–2122. https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00633.x

Hudnell, H.K., 2008. Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs. Proceedings of the Interagency, International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms (ISOC-HAB). Advances in experimental medicine and biology 619, 1–912.

Jiang, L., Aigret, B., De Borggraeve, W.M., Spacil, Z., Ilag, L.L., 2012. Selective LC-MS/MS method for the identification of BMAA from its isomers in biological samples. Analytical and Bioanalytical Chemistry 403, 1719–1730. https://doi.org/10.1007/s00216-012-5966-y

Jonasson, S., Eriksson, J., Berntzon, L., Spácil, Z., Ilag, L.L., Ronnevi, L.-O., Rasmussen, U., Bergman, B., 2010. Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 9252–9257. https://doi.org/10.1073/pnas.0914417107

Jones, H.D., 1983. The Circulatory Systems of Gastropods and Bivalves, in: Saleuddin, A., Wilbur, K. (Eds.), The Mollusca. Elsevier, pp. 189–238. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-751405-5.50012-9

Jorgensen, C.B., 1983. Patterns of uptake of dissolved amino acids in mussels (Mytilus edulis). Marine Biology 73, 177–182. https://doi.org/10.1007/BF00406886

Kimbrough, K.L., Johnson, W.E., Lauenstein, G.G., Christensen, J.D., Apeti, D.A., 2008. Mussel Watch Program: An Assessment of Two Decades of Contaminant Monitoring in the Nation's Coastal Zone. Silver Spring.

Lage, S., Annadotter, H., Rasmussen, U., Rydberg, S., 2015. Biotransfer of β-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in a eutrophicated freshwater lake. Marine Drugs 13, 1185–1201. https://doi.org/10.3390/md1303

Lage, S., Costa, P.R., Moita, T., Eriksson, J., Rasmussen, U., Rydberg, S.J., 2014. BMAA in shellfish from two Portuguese transitional water bodies suggests the marine dinoflagellate Gymnodinium catenatum as a potential BMAA source. Aquatic Toxicology 152, 131–138. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.03.029

Lance, E., Arnich, N., Maignien, T., Biré, R., 2018. Occurrence of β-N-methylamino-l-alanine (BMAA) and Isomers in Aquatic Environments and Aquatic Food Sources for Humans. Toxins 10, 83. https://doi.org/10.3390/toxins10020083

Li, L., Zheng, B., Liu, L., 2010. Biomonitoring and Bioindicators Used for River Ecosystems : Definitions , Approaches and Trends 2, 1510–1524. https://doi.org/10.1016/j.proenv.2010.10.164

Lobner, D., 2009. Mechanisms of beta-N-methylamino-L-alanine induced neurotoxicity. Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases 10 Suppl 2, 56–60. https://doi.org/10.3109/17482960903269062

Main, B.J., Italiano, C.J., Rodgers, K.J., 2017. Investigation of the interaction of β-methylamino-l-alanine with eukaryotic and prokaryotic proteins. Amino Acids. https://doi.org/10.1007/s00726-017-2525-z

Manahan, D.T., Wright, S.H., Stephens, G.C., Rice, M.A., 1982. Transport of Dissolved Amino Acids by the Mussel, Mytilus edulis: Demonstration of Net Uptake from Natural Seawater. Science 215, 1253–1255. https://doi.org/10.1126/science.215.4537.1253

Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Giamberini, L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. Microscopy Research and Technique 56, 358–392. https://doi.org/10.1002/jemt.10040

Mondo, K., Broc Glover, W., Murch, S.J., Liu, G., Cai, Y., Davis, D. a, Mash, D.C., 2014. Environmental Neurotoxins β-N-Methylamino-L-Alanine (BMAA) and Mercury in Shark Cartilage Dietary Supplements. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association 70, 26–32. https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.015

Monteiro, M., Costa, M., Moreira, C., Vasconcelos, V.M., Baptista, M.S., 2016. Screening of BMAA-producing cyanobacteria in cultured isolates and in in situ blooms. Journal of Applied Phycology. https://doi.org/10.1007/s10811-016-1003-4

Murch, S.J., Cox, P. a., Banack, S. a., Steele, J.C., Sacks, O.W., 2004. Occurrence of beta-methylamino-l-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. Acta Neurologica Scandinavica 110, 267–269. https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2004.00320.x

Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., 2003. Chapter 17 Molluscs as bioindicators. Trace Metals and other Contaminants in the Environment 6, 577–635. https://doi.org/10.1016/S0927-5215(03)80147-9

Onselen, R., Downing, S., Kemp, G., Downing, T., 2017. Investigating β-N-Methylamino-l-alanine Misincorporation in Human Cell Cultures: A Comparative Study with Known Amino Acid Analogues. Toxins 9, 400. https://doi.org/10.3390/toxins9120400

Rajalingam, D., Loftis, C., Xu, J.J., Kumar, T.K.S., 2009. Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate. Protein Science 18, 980–993. https://doi.org/10.1002/pro.108

Réveillon, D., Abadie, E., Séchet, V., Brient, L., Savar, V., Bardouil, M., Hess, P., Amzil, Z., 2014. Beta-N-methylamino-L-alanine: LC-MS/MS optimization, screening of cyanobacterial strains and occurrence in shellfish from Thau, a French Mediterranean lagoon. Marine drugs 12, 5441–67. https://doi.org/10.3390/md12115441

Réveillon, D., Abadie, E., Séchet, V., Masseret, E., Hess, P., Amzil, Z., 2015. β-N-methylamino-l-alanine (BMAA) and isomers: Distribution in different food web compartments of Thau lagoon, French Mediterranean Sea. Marine Environmental Research 110, 8–18. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.07.015

Réveillon, D., Séchet, V., Hess, P., Amzil, Z., 2016. Production of BMAA and DAB by diatoms (Phaeodactylum tricornutum , Chaetoceros sp ., Chaetoceros calcitrans and , Thalassiosira pseudonana) and bacteria isolated from a diatom culture 58, 45–50. https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.07.008

Ricciardi, K.L., Poynton, H.C., Duphily, B.J., Blalock, B.J., Robinson, W.E., 2016. Bioconcentration and depuration of14C-labeled 17α-ethinyl estradiol and 4-nonylphenol in individual organs of the marine bivalve Mytilus edulis L. Environmental Toxicology and

Chemistry 35, 863–873. https://doi.org/10.1002/etc.3137

Rice, M.A., Stephens, G.C., 1987. Uptake and internal distribution of exogenously supplied amino acids in the Pacific oyster, Crassostrea gigas (Thunberg). Aquaculture 66, 19–31. https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90280-8

Robinson, W.E., Ryan, D.K., 1988. Transport of cadmium and other metals in the blood of the bivalve mollusc Mercenaria mercenaria. Marine Biology 97, 101–109. https://doi.org/10.1007/BF00391250

Rosén, J., Westerberg, E., Hellenäs, K.E., Salomonsson, M.L., 2016a. A new method for analysis of underivatized free β-methylamino-alanine: Validation and method comparison. Toxicon 121, 105–108. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.08.021

Rosén, J., Westerberg, E., Schmiedt, S., Hellenäs, K.E., 2016b. BMAA detected as neither free nor protein bound amino acid in blue mussels. Toxicon 109, 45–50. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.11.008

Schöne, B.R., Krause, R.A., 2016. Retrospective environmental biomonitoring – Mussel Watch expanded. Global and Planetary Change 144, 228–251. https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2016.08.002

van Onselen, R., Venables, L., van de Venter, M., Downing, T.G., 2018. β-N-Methylamino-L-Alanine Toxicity in PC12: Excitotoxicity vs. Misincorporation. Neurotoxicity Research 33, 15–23. https://doi.org/10.1007/s12640-017-9743-8

Vanderploeg, H.A., Johengen, T.H., Liebig, J.R., 2009. Feedback between zebra mussel selective feeding and algal composition affects mussel condition : did the regime changer pay a price for its success ? 47–63. https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.02091.x

Weiss, J.H., Choi, D.W., 1988. Beta-N-methylamino-L-alanine neurotoxicity: requirement for bicarbonate as a cofactor. Science (New York, N.Y.) 241, 973–5. https://doi.org/10.1126/science.3136549

Winkel, E.H. TEN, Davids, C., 1982. Food selection by Dreissena polymorpha Pallas (Mollusca: Bivalvia). Freshwater Biology 12, 553–558. https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1982.tb00647.x

Wright, S.H., 1985. Multiple pathways for amino acid transport in Mytilus gill. Journal of Comparative Physiology B 156, 259–267. https://doi.org/10.1007/BF00695781

Chapitre III : Etude des cinétiques d'accumulation et d'élimination de la BMAA chez *D. polymorpha* et *A. anatina* exposés par balnéation à un gradient de concentrations environnementales de BMAA

I. Synthèse des travaux menés

En vue d'évaluer la pertinence des bivalves en tant que bioindicateurs de la présence de BMAA dans le milieu, les deux espèces *D. polymorpha* et *A. anatina* ont été exposées à un gradient de concentration de BMAA dissoute (1, 10 et 50 µg BMAA dissoute/L) pendant 21 jours suivi de 42 jours de dépuration par balnéation. Les concentrations utilisées ont été choisies en appui des valeurs de concentrations environnementales actuellement disponibles, comprises entre 0,3 µg/L (Roy-Lachapelle et al., 2015) et 36,9 µg/L (Al-Sammak et al., 2014), afin de déterminer s'il existe un seuil minimal de concentration environnementale engendrant une accumulation de BMAA chez les bivalves.

A la suite des résultats obtenus lors de l'étude présentée dans le chapitre II, nous avons choisi d'analyser la BMAA totale dans les tissus, regroupant toutes les fractions d'accumulation de BMAA (libre, associée à des polypeptides de faible poids moléculaire et associé à des polypeptides de haut poids moléculaire). De plus, cette exposition avait mis en évidence l'absence d'organe cible de la BMAA parmi les différents tissus de *D. polymorpha* (branchies, manteau, glande digestive, gonade, muscles et pied). Ainsi, l'analyse de la BMAA totale a été réalisée dans les tissus entiers de *D. polymorpha*. Le second bivalve *A. anatina* est de grande taille (jusqu'à 9,3 cm, Gopko et al., 2017). Etant donné que la masse de tissus lyophilisés nécessaire pour doser la BMAA totale (1 mg) représente moins de 1% de la masse totale des individus, lyophiliser un individu entier et prélever 1 mg après homogénéisation induit une faible probabilité que l'échantillonnage soit représentatif de la totalité de l'individu. Ce même problème existe pour le dosage des MCs. Cependant, au contraire de la BMAA, les MCs ont un organe cible qui est la glande digestive, privilégiée dans cette étude. Afin de limiter le nombre d'outils proposés dans cette thèse, nous avons étudié la concentration de BMAA totale dans les glandes digestives d'*A. anatina*, tout en sachant que ce choix induit une sous-estimation de l'intoxication réelle du bivalve, la quantité de BMAA dans la glande digestive représentant 12.3% de la quantité dans les tissus mous.

Les concentrations ont été évaluée aux jours 1, 7, 14 et 21 d'exposition et 1, 7, 14, 28 et 42 de dépuration. L'exposition des deux bivalves a été réalisée dans le laboratoire SEBIO, à Reims, les extractions et les analyses ont été faites dans le cadre d'un séjour et d'une collaboration avec Dr E. Faassen (Aquatic Ecology and Water Quality Management Group, Wageningen University, Pays-Bas), le Dr M. Lürling (Aquatic Ecology and Water Quality Management

Group, Wageningen University, Pays-Bas), et Dr H. Zweers (Department of Microbial Ecology, Netherlands Institute of Ecology (NIOO-KNAW), Wageningen, Pas-Bas).

Les analyses ont mis en évidence la présence de BMAA (3,3 ± 1,3 µg BMAA/g DW) dans deux des trois glandes digestives d'individus témoin non exposés chez *A. anatina*. L'abscence de BMAA dans les individus entiers de *D. polymorpha* non exposés tend à mettre en évidence une période de strabulation trop courte de *A. anatina* (2 semaines), empêchant une élimination complète de la BMAA par les individus de cette espèce. Il est possible que les individus aient accumulé de la BMAA au cours de leur élevage aquatique, probablement lors de l'ingestion d'organismes producteurs.

De faibles concentraitons de BMAA ont été détéctée *D. polymorpha* et *A. anatina* exposés à 1 µg BMAA/L, semblent mettre en évidence qu'à de faibles niveaux d'exposition environnementale (1 µg BMAA/L dans cette étude ou lors de l'élevage d'*A. anatina*), la BMAA soit retrouvée dans les tissus des bivalves en bruit de fond sans réelle cinétique d'accumulation

Chez *A. anatina*, des différences significatives (Mann-Whitney test, $p<0.05$) entre les individus exposés à 1 et 10 µg BMAA/ et ceux exposés à 50 µg BMAA/L sont mises en évidence. Ainsi, *A. anatina* accumule des quantités significatives de BMAA et peut révéler sa présence à partir d'une concentration environnementale de 50 µg BMAA/L. Pendant la dépuration, les teneurs en BMAA dans la glande digestive d'*A. anatina* préalablement exposée à 50 µg BMAA/L diminuent significativement mais ne disparaissent pas totalement (-94,5 % entre le dernier jour d'exposition et le dernier jour de dépuration).

La détection de BMAA dans les tissus *de D. polymorpha* exposés 24h à 10 µg BMAA/L laisse supposer que *D. polymorpha* peut révéler la présence de BMAA dans l'eau dès le premier jour d'exposition à 10 µg/L. L'augmentation significative (Kruskal-Wallis test, $p<0.01$) de la concentration en BMAA dans les individus exposés à 10 µg BMAA/L (en moyenne 16,0 ± 4,1 µg/g DW pendant l'exposition) et ceux exposés à 50 µg BMAA/L (en moyenne 112,1 ± 42,6 µg/g DW pendant l'exposition), fait que *D. polymorpha* semble accumuler la BMAA de manière concentration dépendante, et pourrait potentiellement refléter les niveaux de contamination en milieu naturel. Enfin, une élimination partielle (-67,8 % à 10 µg/L et -82,5 % à 50 µg/L) de la BMAA a été observée dans les tissus de *D. polymorpha* entre le dernier jour d'exposition et le dernier jour de dépuration. Cette élimination partielle en 42 jours de dépuration montre que *D. polymorpha* peut être utilisée pour révéler des niveaux de contamination et la présence

de BMAA dans le milieu, mais pas ses dynamiques à court terme (moins d'un mois). Un encagement actif de bivalves non contaminés, renouvelé régulièrement, serait plus approprié pour évaluation la contamination environnementale en BMAA dissoute.

Bioaccumulation of total BMAA by the freshwater bivalves *Dreissena polymorpha* and *Anodonta anatina* as tools to indicate a water contamination level by BMAA-producing phytoplankton

Lepoutre A.[1], Hervieux J. [1], Faassen E. [2], Zweers H. [3], Lurling M. [2], Geffard A. [1], Lance E. [1]

1. Université de Reims Champagne-Ardenne UMR-I 02 INERIS-URCA-ULH SEBIO Unité Stress Environnementaux et, BIOsurveillance des milieux aquatiques UFR Sciences Exactes et Naturelles, Campus du Moulin de la Housse, BP 1039 51687 Reims cedex, France

2. Aquatic Ecology and Water Quality Management Group, Wageningen University, roevendaalsesteeg 3a, 6708 PB, Wageningen, The Netherlands

3. Department of Microbial Ecology, Netherlands Institute of Ecology (NIOO-KNAW), Droevendaalsesteeg 10, 6708 PB, Wageningen, The Netherlands

II. Abstract

The environmental neurotoxin β-Methylamino-L-alanine (BMAA), produced by phytoplanktonic species, may represent a risk for human health. However, there is little data regarding the range of organisms able to synthetize this toxin. Therefore, the analysis of the phytoplanktonic composition is not pertinent to inform about the level of BMAA water contamination. Moreover, analytical challenges as well as the important spatiotemporal variability of phytoplankton communities make its quantification in watershazardous. Because of their filtering activity and accumulation capacities, bivalves have been shown to facilitate the monitoring of pollutant in freshwater ecosystems. Here we investigated if the freshwater bivalves *Dreissena polymorpha* and *Anodonta anatina* could be used as bioindicators of the presence of BMAA in waters. Both species were exposed to 1, 10 and 50 µg of dissolved BMAA/L for 21 days, followed by 42 days in clean water. At days at 0, 1, 7, 14, and 21 days of exposure and 1, 7, 14, 21 and 42 days of depuration, whole *D. polymorpha* and digestive glands of *A. anatina* were sampled and total BMAA concentration was measured. Both models were able to significantly accumulate BMAA when exposed to 10 and 50 µg dissolved BMAA/L. *D. polymorpha* accumulated BMAA earlier (from day 1 for all concentrations) and at higher tissue concentrations compared to *A. anatina* (which concentrations differed from controls from day 14 in mussels exposed to 10 µg BMAA/L and day 7 in mussels exposed to 50 µg BMAA/L). As BMAA accumulation by *D. polymorpha* was time and concentration dependent, this species might be able to reflect the level and the dynamics of water contamination by dissolved BMAA. Concerning *A. anatina*, the use of this species appeared to be restricted to

determine the presence of BMAA from a concentration of 10 µg BMAA/L in areas where *D. polymorpha*, an invasive species, is absent.

III. Introduction

Because of its potential involvement in the development of Amyotrophic Lateral Sclerosis-Parkinsonism-Dementia complex (ALS-PDC), a human neuro-degenerative pathology, the environmental toxin BMAA (β-Methylamino-L-alanine) is a growing concern (S. J. Murch et al., 2004b; Nunn, 2017). The onset of this pathology would occur following a long-term chronic exposure to this environmental toxin (Banack and Cox, 2003). Even if the etiological links has not been demonstrated so far, laboratory experiments have shown that this non-proteinogenic amino-acid that maybe able to induce (Delcourt et al., 2017): (i) an excitotoxicity in presence of bicarbonate at physiological concentration, (ii) a dysregulation of the cellular protein homeostasis and a potent interaction with neuromelanin, which could lead to long-lasting neurotoxic activity, and (iii) an inhibition of the cysteine/glutamate antiporter, leading to a potential oxidative stress (Lobner, 2009). First BMAA high sequencing in cyanobacteria has reported that BMAA may be produced by all cyanobacteria (Cox et al., 2005). However, analytical upgrades allowing the use of more selective methods, have demonstrated that BMAA may not be produced by all cyanobacterial species, and could also be produced by diatoms and dinoflagellates (Faassen et al., 2009; Monteiro et al., 2016; Réveillon et al., 2016b, 2015a). As phytoplankton proliferations in fresh waters often occurs in reservoirs used for recreational activities or drinking water, BMAA may represent a threat towards population using BMAA containing water supply or leaving nearby contaminated lakes, as suggested by Caller et al., (2009). It has been hypothesized that human contamination may occur through inhalation of aerosolized toxins, fish consumption, or ingestion of lake water (Caller et al., 2009). As phytoplankton proliferations might be enhanced by increasing eutrophication and global warming (Hudnell, 2008), there is a potential increasing risk of human contamination. Therefore, a follow-up of BMAA contamination of fresh waters might be useful to assess a potent human health risk of exposure.

However, the identification and numeration of phytoplankton species from a water sampling may not be useful to estimate the risk of water contamination by BMAA for several reasons: i) there is little knowledge regarding BMAA-producers, ii) BMAA production is not steady, and can vary over time and be influenced for some species by environmental parameters such as

nitrogen concentration in the medium (Scott et al., 2014), and iii) BMAA identification and quantification in water can be a challenge because of the hydrophilic nature of the compound and the potential co-existence of isomers (Jiang et al., 2012). The evaluation of BMAA occurrence in aquatic environment and organisms requires highly selective analytical methods (Faassen, 2014). Therefore, very few reliable data of BMAA concentration in water are available so far (Lance et al., 2018). BMAA concentrations in fresh waters are ranging from 0.3 µg/L, measured in a Canadian lake (Roy-Lachapelle et al., 2015), to 39.6 µg/L (Al-Sammak et al., 2014). However, most of BMAA concentrations in the water are expressed by phytoplankton biomass and varied from 2.3 ng/g (Jonasson et al., 2010) to 42 µg/g (Faassen et al., 2009).

Freshwater bivalves can be used as bioindicators to detect metals, microplastics, organochlorine contaminants and parasites (Camusso et al., 1994; Graczyk et al., 2003; Zuykov et al., 2013; Baqar et al., 2018; Su et al., 2018). They have been able to reveal the presence of microcystins (MCs) in their medium, when the sole analysis of water did not reveal it, in relation with the great spatio-temporal variability of the producers (Preece et al., 2015). BMAA has been systematically detected in marine bivalves along the French coasts (Réveillon et al., 2016a). Marine bivalves have even been qualified as the most BMAA contaminated food source for humans (Lance et al., 2018). BMAA occurrence in the environment is not solely restricted to marine environments as this toxins has been found in fish tissues in a Swedish Lake (Lage et al., 2015). However, there is yet no data regarding BMAA concentration in freshwater bivalves. Laboratory experiments have shown that freshwater mussels bioaccumulate BMAA. The neurotoxin has been found in tissues of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* after an exposure to 100 µG 5^{+}BMAA/L for 24 and 48 h (Downing et al., 2014). BMAA is also known to spread and accumulate throughout the tissues of *D. polymorpha* as the toxin was found in gills, mantle, digestive and genital glands, muscle and foot, from the first day of an exposure to 7.5 µg BMAA/mussels/3 days, and after 21 days in clean water (Lepoutre et al.,Chap. II). Therefore, freshwater bivalves could potentially be used as bioindicators of the presence of BMAA in fresh waters.

The two species *D. polymorpha* and *Anodonta anatina* have been selected for this purpose. *D. polymorpha* has been long used in biomonitoring studies and has been suggested to represent the freshwater counterpart of *Mytilus* in ecotoxicological studies (Binelli et al., 2015). This sessile bivalves lives mostly on hard substrates and is present in a wide range of habitats from

freshwater lakes, rivers to brackish estuaries (Van Damme, 2014b). However, the use of this species as a sentinel is restricted as *D. polymorpha* is an invasive species (Van Damme, 2014b). Those restrictions may not apply to *A. anatina*, a vagile bivalve living on soft substrates of flowing streams and standing waters (Lopes-Lima, 2014). There is yet no data regarding BMAA accumulation by *A. anatina*. However, another species of the same genus, *A. cygnea,* has been shown to accumulate BMAA within its tissues (Downing et al., 2014).

The objectives of this study were to evaluate if *D. polymorpha* and *A. anatina* may represent the levels and variations of BMAA contamination in water and may therefore be suitable as bioindicators of its occurrence in aquatic environments. Due to the lack of a known microorganism that could produce BMAA steadily in laboratory conditions, *A. anatina* and *D. polymorpha* were exposed to 1, 10 and 50 µg of dissolved BMAA/L for 21 days, followed by 42 days of depuration in clean water. At days at 0, 1, 2, 7, 14, and 21 days of exposure and at 1, 2, 7, 14, 21 and 42 days of the depuration, whole *D. polymorpha* and digestive glands of *A. anatina* were sampled for the quantification of total BMAA, encompassing all the fraction (free, associated to low or high molecular weight polypeptides) at which BMAA may accumulate in organisms (Faassen et al., 2016).

IV. Materials and methods

IV.1. Mussels acclimatation

IV.1.1. Anodonta anatina

Mussels, measuring 58.3 ± 5.6 mm, were provided by Univers aquatique (Sartrouville, France), and were acclimatised two weeks by groups of 50 in the dark at 14 ± 2°C in aerated 15-L tanks. During this phase, animals were fed twice a week with 3,7 x 10^7 cells of *Chlorella vulgaris*/individual/day (Greensea, Mèze, France). Algal density was measured with an optic microscope (Primovert, Zeiss, Oberkochen, Germany) and KOVA® slides (Kova slide, VWR, Fontenay-sous-Bois, France).

IV.1.2. Dreissena polymorpha

Mussels were collected in May at the Lac-du-Der-Chantecoq (48°36'07.7"N; 4°44'37.0"E). In the laboratory, mussels were gently cleaned, sorted according to size (25 ± 2 mm), and put in aerated tanks, containing Cristalline® (Saint Yorre, France) source water. *D. polymorpha* were gradually acclimatised up to seven weeks in the dark from lake temperature to 14 ± 2°C.

During this phase, zebra mussels were fed as described for *A. anatina*, with a ratio of 2 x 10^6 cells of *Chlorella vulgaris*/individual/day.

IV.2. Experimental design

The size of the two species being different, the density of mussels per litre was adjusted to allow an equivalence in BMAA available per milligram of fresh weight (FW) of tissues. Thus, ratios of one *A. anatina* /L and 12 *D. polymorpha*/L were used for the experiments. Both exposures occurred at the same period (June to August 2018). Before the addition of BMAA in tanks, negative controls consisted in the sampling of 5 digestive glands of *A. anatina* and 3 whole *D. polymorpha*. The exposures were conducted in duplicates (two tanks per concentration for each species). A total of 61 *A. anatina* and 192 *D. polymorpha* were used for each concentration. Three days before the experiment, mussels were unfed and randomly dispatched in aerated tanks using previously described ratios. Both species were exposed for 21 days to either 1, 10 or 50 µg of dissolved BMAA/L (L-BMAA hydrochloride B-107, Sigma–Aldrich®, Saint-Louis, MO, USA), daily added in tanks. Animals were fed as described during the acclimation, 12 h after BMAA addition in the medium. The water was renewed every three days. At the end of the exposure, mussels were transferred into new tanks containing only clear water to study the depuration. Mussels were randomly collected and sacrificed at 0, 1, 2, 7, 14, and 21 days of exposure and at 1, 2, 7, 14, 21 and 42 days of depuration. After each sampling, the water volume was adjusted to keep the same mussel:water ratio over time. Samplings consisted in four pools of three whole *D. polymorpha* and, because of their important size, only 5 digestive glands of *A. anatina* per concentration. Tissues were kept in Eppendorf® tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany), put in liquid nitrogen and stored at -80°C. After being freeze-dried, tissues were grind with a Mixer Mill MM400 (Retsch, Haan, Germany) using 4 beads, 4 min of beating at 30 Hz.

IV.3. Total BMAA extraction and analysis

Total BMAA was extracted as described in Faassen (2017). Briefly, tissues were weighed and spiked with an internal standard (D_3BMAA), then dried under a vacuum. After the addition of 6 M HCl, they were hydrolysed approximately at 0.7 mbar for 20 h at 105°C in an Eldex® hydrolysis workstation (Eldex, Napa, CA, USA). After being dried, they were resuspended twice in 67:33:0.1, ACN: water: formic acid mix and transferred into spin filter tubes and centrifuged.

The filtrate was then analysed by UHPLC-MS/MS as described in Lepoutre et al (2018), Annexe 1.

IV.4. Data treatment and statistics

A cumulated percentage of accumulation (cum %acc) was calculated for each sampling time, using the concentration of total BMAA in tissues (µg/g DW) converted in µg/g FW using pre-established values (Lepoutre et al., submited), the tissues weight, and the cumulative quantity of BMAA in water.

$$\text{cum \% acc} = \frac{\text{Total BMAA in tissues (µg/g) at day n} \times \text{tissue weight (g)}}{\text{Cumulative quantity of BMAA available per mussel in water between day 1 and n (µg)}} \times 100$$

Statistical analyses were performed with Statistica (Version 8.0.360.0, Statsoft, Tulsa, USA, 2007). Pearson correlation coefficient at significance level of $p < 0.05$ was used to determine the correlation between variables. The normality has been studied with a Shapiro-Wilk test, and the homogeneity of variances was studied with a Levene test. The comparison of multiple independent samples was done with Bonferroni-corrected Kruskal-Wallis tests. Two-by two comparisons of independent samples were done using Mann-Whitney tests.

V. Results

BMAA was found in four out of five unexposed digestive glands of *A. anatina* (Figure 27), at a mean concentration of 2.95 ± 0.96 µg BMAA/g DW. This concentration did not differ from *A. anatina* exposed to 1 µg BMAA/L (Mann-Whitney tests, $p > 0.05$). As no kinetics of BMAA accumulation and elimination was observed in *A. anatina* exposed to 1 µg BMAA/L during the exposure and the depuration, it may therefore be possible that a background noise related to a matrix effect or a pre-contamination of *A. anatina* without further accumulation was recorded. BMAA concentration in this matrix began to differ significantly from controls in mussels exposed to 10 µg BMAA/L after 14 days of exposure, and from day 7 in those exposed to 50 µg BMAA/L (Mann-Whitney test, $p<0.05$). *A. anatina* exposed to 50 µg/L accumulated nearly 4.2 times more BMAA than those exposed to 10 µg/L, a difference that was statistically significant (Mann-Whitney test, $p<0.01$). The maximum accumulation of BMAA by this species was observed at the last day of the 3-week exposure (7.65 ± 0.96 µg BMAA/g DW in mussels exposed to 10 µg/L and 49.64 ± 11.74 µg BMAA/g DW in mussels exposed to 50 µg/L). BMAA

accumulation was only time-dependent in mussels exposed to 50 µg BMAA/L with an increasing concentration from the beginning to the end of exposure (Pearson's r=0.74, p<0.01). During the depuration, BMAA elimination was partial as BMAA was still detected in tissues after 42 days in clean water (0.48 ± 0.48 µg BMAA/g DW in mussels exposed to 10 µg/L and 2.52 ± 0.27 µg BMAA/g DW in mussels exposed to 50 µg/L). The BMAA concentrations significantly decreased by 93.7 % in mussels exposed to 10 µg BMAA/L and by 94.9% in those exposed to 50 µg/L between the last day of exposure and the last day of depuration (Mann-Whitney test, p<0.05).

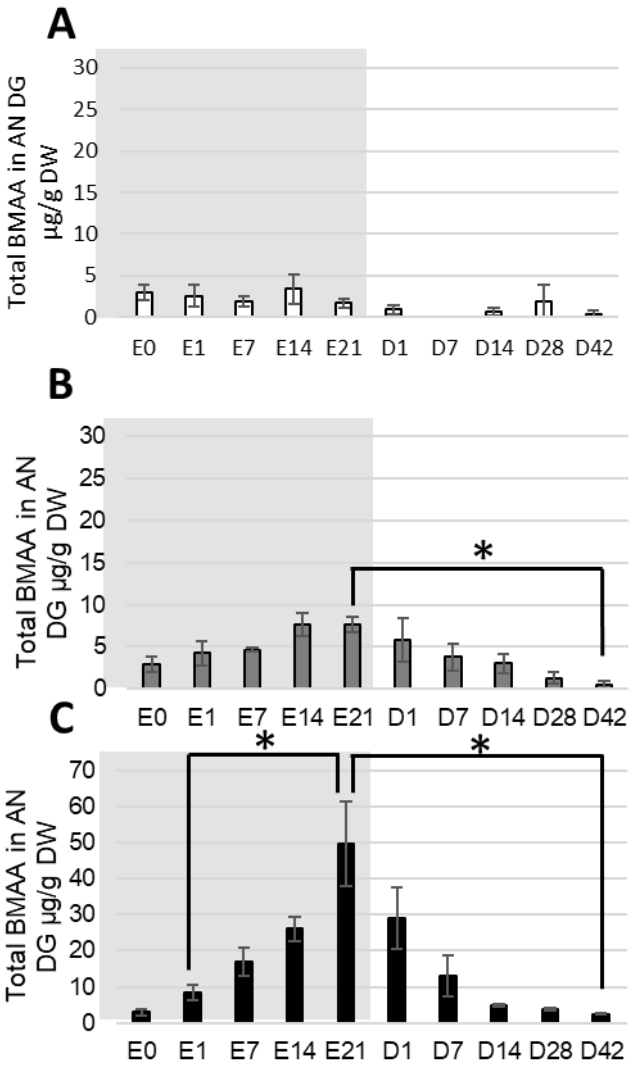

Figure 27 : Mean ± SEM total BMAA concentrations in digestive glands of *A. anatina* exposed to 1 (A), 10 (B) and 50 (C) µg/L of dissolved BMAA, and in controls (E0), during the exposure (E) and the depuration (D), n=3. * Indicates a significant difference in the BMAA concentrations in tissues between two dates (Mann-Whitney test, p < 0.05).

As opposed to digestive glands of *A. anatina*, no BMAA has been detected in unexposed *D. polymorpha* (Fig. 28). Mussels of this species exposed to 10 and 50 µg BMAA/L significantly accumulated BMAA within 24h. During the exposure, those exposed to 50 µg/L accumulated significantly more BMAA (7.9 times) than those exposed to 10 µg/L (Mann-Whitney test, $p<0.05$). The BMAA maximum concentrations in *D. polymorpha* exposed to 10 µg BMAA/L was observed at day 14 of exposure (22.6 ± 0.6 µg BMAA/g DW) and remained stable one week later, at the last day of exposure (21.5 ± 2.4 µg BMAA/g DW). In those exposed to 50 µg BMAA/L, the maximum BMAA accumulation was observed at the last day of exposure (236.9 ± 22.9 µg BMAA/g DW). During the depuration, BMAA was partially eliminated as the toxin was still found after 42 days in clean water in mussels exposed to 10 µg BMAA/L (5.2 ± 1.8 µg BMAA/g DW) and 50 µg BMAA/L (28.5 ± 10.4 µg BMAA/g DW). The elimination of BMAA was significant (Mann-Whitney test, $p<0.05$) as concentration decreased of respectively 76 and 88 % of the BMAA content in tissues were observed between the last day of exposure and the 42st day of depuration. As BMAA accumulation in mussels exposed to 10 and 50 µg BMAA/L was correlated with time (Pearson's $r >0.7$, $p<0.01$), BMAA accumulation was also time dependent. Similarly, the BMAA elimination was correlated with the time of depuration (Pearson's $r >0.7$, $p<0.01$), and was therefore time-dependant.

Overall, except when both species were exposed to 1 µg BMAA/L, whole *D. polymorpha* accumulated significantly more BMAA per g of dry weight compared to digestive glands of *A. anatina* (Mann-Whitney test, $p<0.01$).

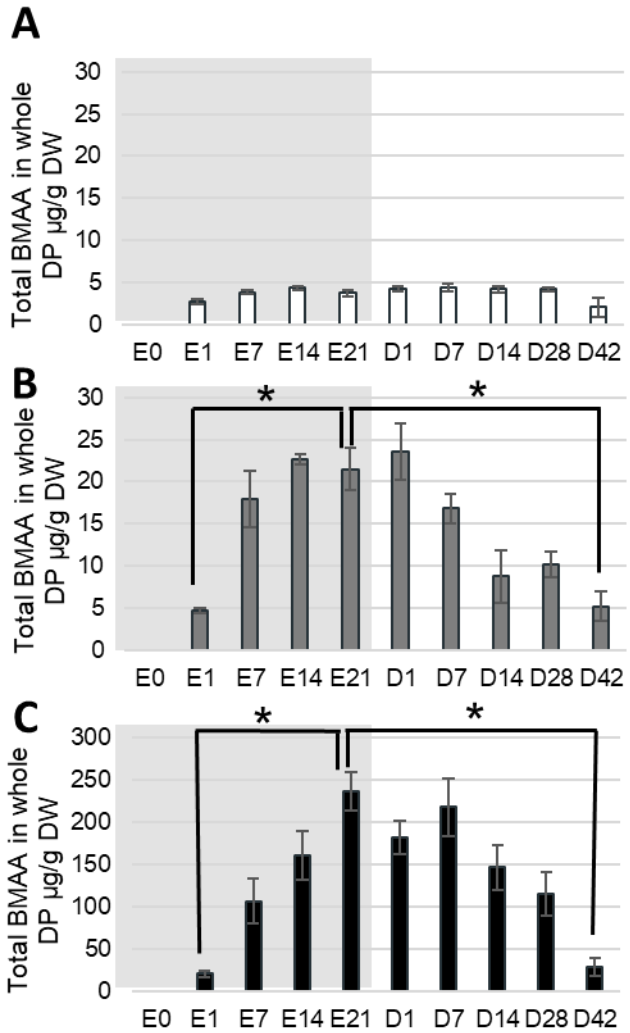

Figure 28 : Mean ± SEM total BMAA concentrations in whole *D. polymorpha* exposed to 1 (A), 10 (B) and 50 (C) µg/L of dissolved BMAA, during the exposure (E) and the depuration (D), n=3. * Indicates a significant difference in the BMAA concentrations in tissues be

The calculation of the cumulated percentage of BMAA accumulation (cum % acc, Tableau 6) in both models showed that whole *D. polymorpha* accumulated more available BMAA (mean of 4.4 ± 0.5 % for exposure concentrations of 10 and 6.2 ± 0.4 % for exposure concentrations of 50 µg BMAA/L) compared to digestive glands of *A. anatina* (mean of 0.4 ± 0.2 % for exposure concentrations of 50 µg BMAA/L). Moreover, when BMAA was detected in tissues (digestive glands of *A. anatina* exposed to 50 µg BMAA/L, from day 7 in whole *D. polymorpha* exposed to 10 µg BMAA/L, and from day 1 when exposed to 50 µg BMAA/L), the cum % acc was relatively stable, with slight variations over time.

Tableau 6 : Cumulated percentage of BMAA accumulation (cum % acc) in the digestive glands of *A. anatina* and in whole body of *D. polymorpha*.

		Cum % acc	
BMAA concentration in water	Days of exposure	*A.anatina* digestive gland	Whole *D. polymorpha*
1 µg BMAA/L	1	15,88 ± 8,2	52,67 ± 16,88
	7	1,82 ± 0,49	17,11 ± 3,49
	14	1,09 ± 0,51	7,95 ± 1,2
	21	0,42 ± 0,14	5,23 ± 0,97
10 µg BMAA/L	1	2,6 ± 0,93	8,81 ± 1,57
	7	0,32 ± 0,03	4,82 ± 0,75
	14	0,18 ± 0,04	5,17 ± 0,19
	21	0,19 ± 0,03	3,6 ± 0,42
50 µg BMAA/L	1	0,64 ± 0,17	7,89 ± 1,14
	7	0,23 ± 0,04	7,15 ± 2
	14	0,21 ± 0,02	6,74 ± 1,37
	21	0,19 ± 0,04	7,4 ± 0,8

VI. Discussion

Total BMAA concentrations in digestive glands of *A. anatina* and whole *D. polymorpha* were measured during a 21-day exposure to dissolved BMAA, followed by 42 days in clean water. The results showed that BMAA was detected (3.3 ± 1.6 µg BMAA/g DW) in two of the three digestive glands of *A. anatina*. It is possible that individuals accumulated BMAA during their aquatic farming, possibly during the ingestion of BMAA producing organisms. Despite the two-week acclimation period, all the BMAA content may not have been eliminated from tissues of *A. anatina*. Indeed, it is known that BMAA depuration can be long as BMAA was still found in *M. edulis* maintained two months in clean water (Reveillon, 2015). Moreover, after an exposure of *D. polymorpha* for 21 days to 7.5 µg BMAA/mussels/3 days, BMAA was still found in all soft tissues after 21 days in clean water (Lepoutre et al., Chap II). It is also possible that the molecule is constitutive componement of bivalves, as suggested when BMAA was systematically found in marine bivalves (Réveillon, com. pers.). However, the analysis of BMAA in tissues of *D. polymorpha,* using the same extraction technique and the same equipment, demonstrated the absence of BMAA in unexposed individuals of this species. Another hypothesis could be the presence of a matrix effect related to the method of analysis, but this hypothesis is not supported by the absence of BMAA in *D. polymorpha* controls. It is therefore

possible that at low levels of environmental exposure (1 µg BMAA / L in this study or during *A. anatina* farming), BMAA is found in bivalve tissues with no actual kinetics of accumulation.

BMAA has been detected within 24h in tissues of *D. polymorpha.* This rapid accumulation is also illustrated by the cumulated percentages of accumulation of both species that were higher during the first 24h compared to others sampling times. After the first 24h, the cumulated percentage of BMAA accumulation showed minor variations among time for both species exposed to 10 and 50 µg BMAA/L. This suggests that after a preliminary high accumulation rate, the accumulation was onwards regular and then that the BMAA content in tissues constantly increased along the exposure, as confirmed by the time-dependent BMAA accumulation in *A. anatina* exposed to 50 µg BMAA/L and *D. polymorpha* exposed to 10 and 50 µg BMAA/L. The variations in accumulation capacities observed between the early (1 or 7 days according to species and exposure concentration) and the remaining exposure time could be explained by several hypotheses. Regarding *A. anatina*, as BMAA was measured only in the digestive gland, it is possible that after a first accumulation in the digestive gland, BMAA was further distributed to other tissues through the hemolymph during the intoxication. Indeed, it is known that pollutants can be mobile once taken up within bivalves as they may form an association with hemocytes or with dissolved haemoproteins (Beyer et al., 2017; Marigómez et al., 2002). Another hypothesis, regarding both *A. anatina* and *D.polymorpha* could be the induction of detoxification pathway, that is still unknown. As BMAA is an hydrophilic compound, the biotransformation of the free fraction by the Glutathion-S-transferase enzyme (GST) is not expected (Downing et al., 2014), as demonstrated with an exposure of *A. cygnea* and *D. polymorpha* to 100 µg BMAA/L for 48h, where no variations of the activity of this enzyme was measured (Contardo-Jara et al., 2014). However, when associated to polypeptides, BMAA may be less hydrophilic, thus potentially biotransformed by GSTs. The mechanisms of BMAA detoxification, highlighted during the depuration periods, were probably induced after the first days of the exposure, decreasing the percentage of accumulation for the remaining days. The determination of accumulation kinetics together with the activities of detoxification enzymes at a fine temporal scale is required. Finally, both species health status might have been impaired by BMAA. Indeed, BMAA is known to be temporarily cytotoxic and genotoxic towards *D. polymorpha* hemocytes (Lepoutre et al., 2018). Moreover BMAA can form an analogue of glutamate when bicarbonate is present at physiological concentrations (Weiss and Choi, 1988). As glutamate is a potential neurotransmitter in bivalves (Bone and Howarth, 1980; Vitellaro-Zuccarello et al., 1990),

BMAA may have altered bivalve's physiology, but not enough to impair the survival of mussels as no mortalities were observed for both species during the experiment.

The higher BMAA concentration in whole *D. polymorpha* (up to 223.5 ± 48.5 µg BMAA/g DW in mussels exposed to 50 µg BMAA/L) compared to digestive glands of *A. anatina* (up to 38.3 ± 8.0 µg BMAA/g DW in mussels exposed to 50 µg BMAA/L) was expected. Indeed, a study of the organ distribution of BMAA in *D. polymorpha* showed that BMAA was diffused through all tissues, and that the digestive gland could represent 4.2 ± 1.2 % of the total amount of BMAA in whole body when considering the hemolymph and 12.3 ± 3.5 % when considering only soft tissues (Lepoutre et al., in preparation).

VI.1. Relevance of the use of both models as bioindicators of the presence of BMAA in fresh waters

The BMAA accumulation in tissues of *D. polymorpha* was significant earlier (from day 1 versus day 7) than in digestive glands of *A. anatina,* and BMAA concentrations in *D. polymorpha* were correlated with time and exposure concentrations. Therefore, whole *D. polymorpha* would be more suitable to potentially reflect BMAA water contamination levels. As BMAA has been found in fresh waters from 0.3 to 39.6 µg/L (Al-Sammak et al., 2014; Roy-Lachapelle et al., 2015), BMAA concentrations used here (1-10 and 100 µg/L) are environmental concentrations. The analysis of BMAA in whole *D. polymorpha* could be used as an early warning to detect the onset of fresh waters contamination by this neurotoxin. If used *in situ* as a bioindicator of the presence of BMAA in water, *D. polymorpha* may relate the contamination levels at the time of the sampling, or because of its slow elimination of BMAA (overall -94.5 % after 42 days), from few weeks ago. However, to establish a link between the BMAA content in this potent bioindicator species and the environmental contamination, the accumulation response of *D. polymorpha* has to be further investigated at finer concentration scales. Using the digestive glands of *A. anatina* may not be relevant to reveal a low contamination level of waters by BMAA, as very few BMAA present in the medium was accumulated in tissues (0.6 ± 0.3 %).

As BMAA elimination from tissues of both species is slow, an emphasis should be put regarding the monitoring strategy. Indeed, to analyse the presence of BMAA during a specific timeframe, an active monitoring, using cages with unexposed mussels, seems to be more appropriate than a passive monitoring, based on one-time grab samples. Also, still because of the slow

elimination of BMAA from mussels' tissues, to analyse the kinetics of BMAA apparition and elimination in the water during a small timeframe, a specific active monitoring should be applied. Thus, instead of putting all the cages at the same time followed by their sampling one by one, it could be pertinent to do a succession of caging.

VII. Conclusion

Because of its ability to reveal from 24h the presence of BMAA in water from a concentration of 10 µg/L and because BMAA concentrations in its tissues was correlated with BMAA concentrations in the water, whole *D. polymorpha* would be suitable as a bioindicator of BMAA presence in fresh waters, pending further investigations at finer temporal and concentrations scales. The important but incomplete elimination of BMAA from tissues of *D. polymorpha* and from the digestive glands of *A. anatina* after 42 days of depuration, shows that both models may not be suitable to rapidly reveal the end of a water contamination. Therefore, an active caging of uncontaminated bivalves, regularly renewed, is more suitable for a characterization of the current BMAA risk in water, whereas passive samplings may overestimate it if a previous contamination had occurred. However, as there is no information whether BMAA is dissolved in water or intracellular in producers, there is a need to gather information regarding BMAA occurrence and bioavailability in fresh waters. Indeed, the contamination of organisms through dissolved BMAA could represent a minor pathway of exposure compared to the ingestion of BMAA producers, as demonstrated in gastropods exposed to dissolved microcystins compared to microcystin-producing cyanobacteria (Lance et al., 2010). This would however imply that BMAA is mainly intracellular during the producer proliferations, which is not known to date. Unfortunately, no phytoplankton species producing BMAA steadily in culture conditions has been identified yet. But once one will be identified, it will be interesting to study the potent excretion of the neurotoxin in the medium during the cellular growth, as well as the relative accumulation in bivalves exposed to the two intoxication pathway (ingestion of BMAA producers or dissolved BMAA).

VIII. References

Al-Sammak, M.A., Hoagland, K.D., Cassada, D., Snow, D.D., 2014. Co-occurrence of the cyanotoxins BMAA, DABA and anatoxin-a in Nebraska reservoirs, fish, and aquatic plants. Toxins 6, 488–508. https://doi.org/10.3390/toxins6020488

Banack, S.A., Cox, P.A., 2003. Biomagnification of cycad neurotoxins in flying foxes: Implications for ALS-PDC in Guam. Neurology 61, 387–389. https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000078320.18564.9F

Baqar, M., Sadef, Y., Ahmad, S.R., Mahmood, A., Li, J., Zhang, G., 2018. Organochlorine contaminants in freshwater mussels; occurrence, bioaccumulation pattern, spatio-temporal distribution and human health risk assessment from the tributaries of River Ravi, Pakistan. Human and Ecological Risk Assessment 24, 1268–1290. https://doi.org/10.1080/10807039.2017.1411780

Beyer, J., Green, N.W., Brooks, S., Allan, I.J., Ruus, A., Gomes, T., Bråte, I.L.N., Schøyen, M., 2017. Blue mussels (Mytilus edulis spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: A review. Marine Environmental Research 130, 338–365. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.07.024

Binelli, A., Della Torre, C., Magni, S., Parolini, M., 2015. Does zebra mussel (Dreissena polymorpha) represent the freshwater counterpart of Mytilus in ecotoxicological studies? A critical review. Environmental Pollution 196, 386–403. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.10.023

Bone, Q., Howarth, J. V., 1980. The role of l-glutamate in neuromuscular transmission in some molluscs. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. https://doi.org/10.1017/S0025315400040303

Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Vincent-Hubert, F., Palais, F., Geffard, A., Biagianti-Risbourg, S., Pain-Devin, S., Tusseau-Vuillemin, M.-H., 2010. Lessons from a transplantation of zebra mussels into a small urban river: An integrated ecotoxicological assessment. Environmental Toxicology 25, 468–478. https://doi.org/10.1002/tox.20591

Caller, T.A., Doolin, J.W., Haney, J.F., Murby, A.J., West, K.G., Farrar, H.E., Ball, A., Harris, B.T., Stommel, E.W., 2009. A cluster of amyotrophic lateral sclerosis in New Hampshire: A possible role for toxic cyanobacteria blooms. Amyotrophic Lateral Sclerosis 10, 101–108. https://doi.org/10.3109/17482960903278485

Camusso, M., Balestrini, R., Muriano, F., Mariani, M., 1994. Use of freshwater mussel Dreissena polymorpha to assess trace metal pollution in the lower River Po (Italy). Chemosphere 29, 729–745. https://doi.org/10.1016/0045-6535(94)90042-6

Contardo-Jara, V., Otterstein, S.K.B., Downing, S., Downing, T.G., Pflugmacher, S., 2014. Response of antioxidant and biotransformation systems of selected freshwater mussels (Dreissena polymorpha , Anadonta cygnea , Unio tumidus , and Corbicula javanicus) to the cyanobacterial neurotoxin β-N-methylamino-L-alanine. Toxicological & Environmental Chemistry 96, 451–465. https://doi.org/10.1080/02772248.2014.945452

Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R.R., Metcalf, J.S.,

Morrison, L.F., Codd, G. a, Bergman, B., 2005. Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 5074–5078. https://doi.org/10.1073/pnas.0501526102

Delcourt, N., Claudepierre, T., Maignien, T., Arnich, N., Mattei, C., 2017. Cellular and Molecular Aspects of the β-N-Methylamino-l-alanine (BMAA) Mode of Action within the Neurodegenerative Pathway: Facts and Controversy. Toxins 10, 6. https://doi.org/10.3390/toxins10010006

Deng, J., Chen, F., Liu, X., Peng, J., Hu, W., 2016. Horizontal migration of algal patches associated with cyanobacterial blooms in an eutrophic shallow lake. Ecological Engineering 87, 185–193. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.12.017

Downing, S., Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S., Downing, T.G., 2014. The fate of the cyanobacterial toxin β-N-methylamino-l-alanine in freshwater mussels. Ecotoxicology and Environmental Safety 101, 51–58. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.11.028

Faassen, E., 2014. Presence of the Neurotoxin BMAA in Aquatic Ecosystems: What Do We Really Know? Toxins 6, 1109–1138. https://doi.org/10.3390/toxins6031109

Faassen, E., Antoniou, M., Beekman-Lukassen, W., Blahova, L., Chernova, E., Christophoridis, C., Combes, A., Edwards, C., Fastner, J., Harmsen, J., Hiskia, A., Ilag, L., Kaloudis, T., Lopicic, S., Lürling, M., Mazur-Marzec, H., Meriluoto, J., Porojan, C., Viner-Mozzini, Y., Zguna, N., 2016. A Collaborative Evaluation of LC-MS/MS Based Methods for BMAA Analysis: Soluble Bound BMAA Found to Be an Important Fraction. Marine Drugs 14, 45. https://doi.org/10.3390/md14030045

Faassen, E.J., 2017. Extraction and LC-MS/MS Analysis of Underivatised BMAA, in: Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 439–446. https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch55

Faassen, E.J., Gillissen, F., Zweers, H.A.J., Lürling, M., 2009. Determination of the neurotoxins BMAA (β- N-methylamino-L-alanine) and DAB (α-,γ-diaminobutyric acid) by LC-MSMS in Dutch urban waters with cyanobacterial blooms. Amyotrophic Lateral Sclerosis 10, 79–84. https://doi.org/10.3109/17482960903272967

Hudnell, H.K., 2008. Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs. Proceedings of the Interagency, International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms (ISOC-HAB). Advances in experimental medicine and biology 619, 1–912.

Jiang, L., Aigret, B., De Borggraeve, W.M., Spacil, Z., Ilag, L.L., 2012. Selective LC-MS/MS method for the identification of BMAA from its isomers in biological samples. Analytical and Bioanalytical Chemistry 403, 1719–1730. https://doi.org/10.1007/s00216-012-5966-y

Jonasson, S., Eriksson, J., Berntzon, L., Spácil, Z., Ilag, L.L., Ronnevi, L.-O., Rasmussen, U., Bergman, B., 2010. Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 9252–9257. https://doi.org/10.1073/pnas.0914417107

Lage, S., Annadotter, H., Rasmussen, U., Rydberg, S., 2015. Biotransfer of β-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in a eutrophicated freshwater lake. Marine Drugs 13, 1185–1201. https://doi.org/10.3390/md1303

Lance, E., Arnich, N., Maignien, T., Biré, R., 2018. Occurrence of β-N-methylamino-l-alanine (BMAA) and Isomers in Aquatic Environments and Aquatic Food Sources for Humans. Toxins 10, 83. https://doi.org/10.3390/toxins10020083

Lance, E., Neffling, M.R., Gérard, C., Meriluoto, J., Bormans, M., 2010. Accumulation of free and covalently bound microcystins in tissues of Lymnaea stagnalis (Gastropoda) following toxic cyanobacteria or dissolved microcystin-LR exposure. Environmental Pollution 158, 674–680. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.10.025

Lepoutre, A., Faassen, E.J., Lürling, M., Geffard, A., Lance, E., n.d. Organ distribution of the environmental neurotoxin β-Methylamino-L-alanine within the freshwater bivalve Dreissena polymorpha o Title.

Lepoutre, A., Grillot, T., Jean, S., Geffard, A., Lance, E., n.d. Kinetics of accumulation and detoxification of free and total microcystins in two bivalve species exposed to the microcystin-producing cyanobacteria Plantkothrix agardhii.

Lepoutre, A., Milliote, N., Bonnard, M., Palos-Ladeiro, M., Rioult, D., Bonnard, I., Bastien, F., Faassen, E., Geffard, A., Lance, E., 2018. Genotoxic and Cytotoxic Effects on the Immune Cells of the Freshwater Bivalve Dreissena polymorpha Exposed to the Environmental Neurotoxin BMAA. Toxins 10, 106. https://doi.org/10.3390/toxins10030106

Lobner, D., 2009. Mechanisms of beta-N-methylamino-L-alanine induced neurotoxicity. Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases 10 Suppl 2, 56–60. https://doi.org/10.3109/17482960903269062

Lopes-Lima, M., 2014. Anodonta anatina [WWW Document]. The IUCN Red List of Threatened Species. URL http://www.iucnredlist.org/details/155667/0 (accessed 2.12.16).

Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Giamberini, L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. Microscopy Research and Technique 56, 358–392. https://doi.org/10.1002/jemt.10040

Monteiro, M., Costa, M., Moreira, C., Vasconcelos, V.M., Baptista, M.S., 2016. Screening of BMAA-producing cyanobacteria in cultured isolates and in in situ blooms. Journal of Applied Phycology. https://doi.org/10.1007/s10811-016-1003-4

Murch, S.J., Cox, P.A., Banack, S.A., Steele, J.C., Sacks, O.W., 2004. Occurrence of β-methylamino-L-alanine (BMAA) in. ALS/PDC patients from Guam. Acta Neurologica Scandinavica 110, 267–269. https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2004.00320.x

Nunn, P.B., 2017. 50 Years of Research on A-Amino-B-Methylaminopropionic Acid (B-Methylaminoalanine). Phytochemistry 144, 271–281. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.10.002

Palos Ladeiro, M., Aubert, D., Villena, I., Geffard, A., Bigot, A., 2014. Bioaccumulation of human waterborne protozoa by zebra mussel (Dreissena polymorpha): Interest for water biomonitoring. Water Research 48, 148–155.

https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.017

Preece, E.P., Moore, B.C., Hardy, F.J., 2015. Ecotoxicology and Environmental Safety Transfer of microcystin from freshwater lakes to Puget Sound , WA and toxin accumulation in marine mussels (Mytilus trossulus). Ecotoxicology and Environmental Safety 122, 98–105. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.07.013

Qi, L., Hu, C., Visser, P.M., Ma, R., 2018. Diurnal changes of cyanobacteria blooms in Taihu Lake as derived from GOCI observations. Limnology and Oceanography 63, 1711–1726. https://doi.org/10.1002/lno.10802

Reveillon, D., 2015. BMAA et cyanotoxines : microalgues productrices et niveaux d'accumulation dans les organismes marins. Université de Nantes Angers Le Mans.

Réveillon, D., Abadie, E., Séchet, V., Masseret, E., Hess, P., Amzil, Z., 2015. β-N-methylamino-l-alanine (BMAA) and isomers: Distribution in different food web compartments of Thau lagoon, French Mediterranean Sea. Marine Environmental Research 110, 8–18. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.07.015

Réveillon, D., Séchet, V., Hess, P., Amzil, Z., 2016a. Production of BMAA and DAB by diatoms (Phaeodactylum tricornutum , Chaetoceros sp ., Chaetoceros calcitrans and , Thalassiosira pseudonana) and bacteria isolated from a diatom culture 58, 45–50. https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.07.008

Réveillon, D., Séchet, V., Hess, P., Amzil, Z., 2016b. Systematic detection of BMAA (β-N-methylamino-l-alanine) and DAB (2,4-diaminobutyric acid) in mollusks collected in shellfish production areas along the French coasts. Toxicon 110, 35–46. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.11.011

Roy-Lachapelle, A., Solliec, M., Sauvé, S., 2015. Determination of BMAA and three alkaloid cyanotoxins in lake water using dansyl chloride derivatization and high-resolution mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry 407, 5487–5501. https://doi.org/10.1007/s00216-015-8722-2

Salmaso, N., Bernard, C., Humbert, J.-F., Akçaalan, R., Albay, M., Ballot, A., Catherine, A., Fastner, J., Häggqvist, K., Horecká, M., Izydorczyk, K., Köker, L., Komárek, J., Maloufi, S., Mankiewicz-Boczek, J., Metcalf, J.S., Quesada, A., Quiblier, C., Yéprémian, C., 2017. Basic Guide to Detection and Monitoring of Potentially Toxic Cyanobacteria, in: Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 46–69. https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch6

Scott, L.L., Downing, S., Phelan, R.R., Downing, T.G., 2014. Environmental modulation of microcystin and β-N-methylamino-l-alanine as a function of nitrogen availability. Toxicon 87, 1–5. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.05.001

Su, L., Cai, H., Kolandhasamy, P., Wu, C., Rochman, C.M., Shi, H., 2018. Using the Asian clam as an indicator of microplastic pollution in freshwater ecosystems. Environmental Pollution 234, 347–355. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.075

Van Damme, D., 2014. Dreissena polymorpha. The IUCN Red List of Threatened Species [WWW Document]. URL https://www.iucnredlist.org/species/155495/42428801

Vitellaro-Zuccarello, L., De Biasi, S., Amadeo, A., 1990. Immunocytochemical demonstration

of neurotransmitters in the nerve plexuses of the foot and the anterior byssus retractor muscle of the mussel, Mytilus galloprovincialis. Cell and Tissue Research. https://doi.org/10.1007/BF00313525

Weiss, J.H., Choi, D.W., 1988. Beta-N-methylamino-L-alanine neurotoxicity: requirement for bicarbonate as a cofactor. Science (New York, N.Y.) 241, 973–5. https://doi.org/10.1126/science.3136549

Zuykov, M., Pelletier, E., Harper, D.A.T., 2013. Bivalve mollusks in metal pollution studies: From bioaccumulation to biomonitoring. Chemosphere 93, 201–208. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.001

Chapitre IV : Etude des cinétiques d'accumulation et d'élimination des MCs libres et totales chez *D. polymorpha* et *A. anatina* exposés à différentes densités de cyanobactéries productrices de MCs.

I. Synthèse des travaux menés

Afin d'étudier la pertinence des bivalves *A. anatina* et *D. polymorpha* en tant que bioindicateurs de la présence de cyanobactéries productrices de MCs, les deux espèces ont été exposées par balnéation à différentes densités de *P. agardhii* produisant un équivalent de 1, 10 et 100 µg MCs/L pendant 21 jours, suivi de 21 jours de dépuration. Aux jours 1, 3, 7, 14 et 21 d'exposition et de dépuration, des dreissènes entières et des glandes digestives d'anodontes ont été prélevées afin de quantifier les concentrations en MCs libres et totales. Les anodontes étant de grande taille, la glande digestive, organe cible des MCs dans les tissus de bivalves (Chen and Xie, 2005b; Papadimitriou et al., 2009), a été privilégiée pour suivre l'accumulation. Afin d'étudier l'ingestion des cyanobactéries productrices de MCs par les deux espèces, le nombre de filaments ingérés a été mesuré quotidiennement via des numérations, et la production moyenne de MCs par filament de cyanobactéries (relation quantité de MCs produites/densité de filaments dans la culture) a été évaluée. Ont été calculés, pour les deux espèces de bivalves et tout au long de l'exposition, le taux d'ingestion (nombre de filaments ingérés/individu/jour), le pourcentage cumulé d'accumulation (pourcentage de la quantité cumulée de MCs ingérées à la date x retrouvé dans les tissus des bivalves à la même date) et le pourcentage d'accumulation temporaire (pourcentage de la quantité de MCs ingérées entre deux dates retrouvées dans les tissus des bivalves dans le même pas de temps). Ces mesures n'ont pu être effectuées pour les individus exposés à une densité de filaments produisant un équivalent de 1 µg MCs/L, car des essais préliminaires ont montré que la quantification des filaments dans les aquariums à cette faible densité était imprécise. L'état de santé global des bivalves a été évalué via la mesure de l'indice de condition des deux espèces.

Les individus d'*A. anatina* ont ingéré 1,9 ± 0,3 fois plus de filaments de *P. agardhii* lors de leur exposition à 100 µg MCs/L vis-à-vis de ceux exposés à 10 µg MCs/L, mais avec de nombreuses variations temporelles. Les MCs libres et totales ont été détectées dans les glandes digestives d'*A. anatina* dès le premier jour d'exposition pour toutes les concentrations d'exposition, et ce jusqu'au dernier jour de dépuration. Des variations de concentration des deux fractions de MCs accumulées chez *A. anatina* en fonction de la concentration d'exposition ont été observées à certains pas de temps (i.e. aux jour 1 et 14 d'exposition). A ces dates, de plus fortes concentrations de MCs totales ont été observées dans les bivalves exposés à 10 µg MCs/L comparé à ceux exposés à 100 µg MCs/L (en moyenne 1,6 ± 0,5 fois plus de MCs dans les individus exposés à 10 µg/L comparés à ceux exposés à 100 µg/L). Quatre hypothèses ont

été avancées pour expliquer ces différences : i) une diminution ou un arrêt de l'ingestion des filaments par le bivalve à la plus forte concentration d'exposition, hypothèse non supportée par les données acquises, ii) une activation, au-delà de la concentration d'exposition de 10 µg/L, des mécanismes de détoxification comme l'enzyme de biotransformation Glutathion-S-Transférase ou le système MXR (Multi xenobiotic resistance) (Pflugmacher et al., 1998; Contardo-Jara et al., 2008). Cette hypothèse semble être supportée par les pourcentages d'accumulation temporaire, dont les variations ne sont pas liées à une diminution d'ingestion de filaments. Enfin, les bivalves étant capables de trier les particules alimentaires avant leur ingestion, pour les relarguer dans le milieu sous forme de pseudo-fèces, il est possible qu'une fraction des filaments filtrés ait été rejetée avant leur ingestion. Or, le dispositif expérimental utilisé assurait la remise en suspension des filaments présents dans les pseudo-fèces, faisant que les numérations réalisées ne concernaient que la fraction ingérée par les bivalves. En ce qui concerne *D. polymorpha*, les individus ont ingéré continuellement des filaments de *P. agardhii* pendant les 3 semaines d'exposition. Les individus exposés à 10 µg MCs/L ayant ingéré en moyenne 3,7 ± 0,5 fois plus de filaments que ceux exposés à 100 µg MCs/L. Les MCs libres ont été accumulées à partir du troisième jour d'exposition à toutes les concentrations, et ont été éliminées de manière asynchrone pendant la dépuration : dès le troisième et le septième jour de dépuration pour les bivalves exposés respectivement à 1 et 10 µg MCs/L, alors qu'elles étaient toujours détectées après 21 jours dans les tissus des individus exposés à 100 µg MCs/L. Les MCs totales ont été détectées dans les tissus dès le premier jour d'exposition pour les individus exposés à une densité de *P. agardhii* produisant un équivalent de 10 et 100 µg MCs/L, et seulement dès le troisième jour pour les individus exposés à une densité de filament équivalente à 1 µg MCs/L. Des différences significatives d'accumulation de MCs entre les concentrations d'exposition de 10 et 100 µg de MCs/L suggèrent que l'accumulation des MCs chez *D. polymorpha* est concentration dépendante. Ainsi, ce bivalve semblerait approprié pour étudier la dynamique et les niveaux de contamination des milieux par les cyanobactéries productrices de MCs, au-delà d'une concentration environnementale de 1 µg MCs intracellulaire/L. La glande digestive d'*A. anatina* accumule globalement 42,6 ± 13,0 plus de MCs totales, et 17,3 ± 7,0 fois plus de MCs libres, que les individus entiers *D. polymorpha*, et dès le premier jour d'exposition. Cependant, la cinétique des teneurs en MCs dans la glande digestive d'*A. anatina* reflète moins efficacement la concentration environnementale, et semble donc être à privilégier pour étudier uniquement la présence de MCs dans les milieux faiblement contaminés (1 µg MCs intracellulaire/L), et non la dynamique ou les niveaux de contamination.

Bioaccumulation of free and total MCs by the freshwater bivalves *Dreissena polymorpha* and *Anodonta anatina* as indicator of water contamination by microcystin-producing cyanobacteria?

Lepoutre A.[1], Grillot T. [1], Jean S. [1], Geffard A.[1], Lance E.[1]

1. Université de Reims Champagne-Ardenne UMR-I 02 INERIS-URCA-ULH SEBIO Unité Stress Environnementaux et, BIOsurveillance des milieux aquatiques UFR Sciences Exactes et Naturelles, Campus du Moulin de la Housse, BP 1039 51687 Reims cedex, France

II. Abstract

The hepatotoxins microcystins (MCs), produced by cyanobacteria, represent a threat to ecosystems and human health. Their monitoring is mostly based on visual observations coupled with water sampling. However, a cyanobacterial bloom may occur between two sampling dates and therefore may be missed. Filter-feeding bivalves have already been proposed as integrators and bioindicators of the presence of diverse compounds in fresh waters. Here, we study the use of freshwater bivalves *Anodonta anatina* and *Dreissena polymorpha* as bioindicators of the presence of microcystin-producing cyanobacteria in fresh waters. Previous studies have shown that bivalves ingest cyanobacteria and bioaccumulate MCs in laboratory and in natural environment. As MCs can bind covalently to protein phosphatases, two forms of accumulation can be studied: the 'free fraction', consisting of unbound MCs, and the 'total fraction' representing free and protein-bound MCs. The purpose of this study was to evaluate if both mussel species and both MC fraction (free or total) in tissues may represent the level and dynamic of water contamination by MC-producing cyanobacteria. For this, both mussels were exposed to three densities of *Planktothrix agardhii* producing an equivalent of 1, 10 and 100 µg MCs/L for 3 weeks, followed by 3 weeks of depuration. The daily intake of MCs by mussels was evaluated through the estimation of cyanobacterial cell ingestion via a numeration of cyanobacterial cells in controls and in exposed tanks, coupled with the evaluation of MC production by cells. At days 1, 3, 7, 14 and 21 of exposure and depuration periods, free and total MC contents in mussel tissues were quantified. We compared, for all exposure concentrations: i) the kinetics of free MCs to the kinetics of total MCs in tissues of both species, ii) both species for their abilities to reflect the amount of MCs to which they have been exposed to through the evaluation of bioaccumulation factors. Results showed that MC content in the digestive glands of *A. anatina* may highlight the presence of MC-producing cyanobacteria at environmental concentrations

from 1 µg MCs/L, and from the first day of exposure. At higher densities of MC-producing cyanobacteria, whole *D. polymorpha* were more appropriate to discriminate the water contamination levels. Because *D. polymorpha* were able to eliminate free MCs in a time and concentration dependent way, as opposed to *A. anatina* and to the total MCs still detected after 21 days of depuration, the quantification of free MCs in *D. polymorpha* would be also suitable to follow the MC-producing cyanobacteria dynamic in fresh waters.

III. Introduction

Because some species are able to synthetize harmful endotoxins, cyanobacterial blooms represent a significant risk to ecosystems and human health (Paerl and Otten, 2013; Weirich and Miller, 2014; Meriluoto et al., 2016). Additionally, they often occur in reservoirs used either as sources of drinking water or for recreational activites. It has been shown that eutrophication (Paerl and Otten, 2013) and global warming may intensify blooms frequencies and duration (Manning and Nobles, 2017). In freshwater ecosystems, microcystins (MCs) are the toxins most frequently produced by cyanobacteria (Humbert and Fastner, 2017). The general structure of those cyclic heptapeptides is including two amino acids that can vary and, up to now, 246 variants of MCs have been identified (Spoof and Arnaud, 2017). MCs are hepatotoxins known to have a tropism towards organs containing organic-anion-transporting polypeptides (OATPs), which are expressed in the gastrointestinal tract, liver, kidney and in the blood-brain barrier (Fischer et al., 2005; Kim, 2003). In cells, MCs are known to interact with protein phosphatases (PPases), and sometimes to bind covalently to those proteins (MacKintosh et al., 1995), inactivating them (MacKintosh et al., 1995; Craig et al., 1996; Pereira et al., 2011). The Ppase inactivation leads to an increase of cytoskeletal protein phosphorylation, impairment of the cytoskeleton structure, loss of shape of affected cells and haemorrhaging (van Apeldoorn et al., 2007; Campos and Vasconcelos, 2010).

To estimate the risk of water contamination, traditional survey of cyanobacteria and of cyanotoxins are based on visual monitoring coupled with water sampling (Pobel et al., 2011; Meriluoto et al., 2016). The recommended sampling frequency is twice a month, increased when the appearance or turbidity of water is changing (Meriluoto et al., 2016). However, the evaluation of MC-producing cell densities requires well-trained staff, and may not be accurate (Gaget et al., 2017). Moreover, a twice-monthly sampling may not be representative of water contamination by MC-producing cyanobacteria, as it is possible to miss either an entire bloom

(Pobel et al., 2011) or one at its early stages. There is also a risk to make a sampling that is not representative of the water column due to spatio-temporal variations in the localisation of cyanobacterial populations. Cyanobacteria (*e.g. Planktothrix* sp.) are able to display daily vertical migratory cycle (Hašler and Poulíčková, 2003). To palliate this, integrative samplers are being developed as Polar Organic Compound Integrative Samplers (POCIS) with polycarbonates membranes (Kohoutek et al., 2010) or Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT) with DIAION HP20 resin (Kudela, 2011). But a strong influence of clogging has been shown on accumulation kinetics with a reduction in the duration of the linear phase (Bailly, 2013). Passive samplers can difficulty be deployed during the entire potential period of development of cyanobacteria : they either need to be rinsed regularly or be deployed during a short time-lapse (e.g. no more than 5 days) (Bailly, 2013).

Freshwater bivalves, being filter-feeders of limited mobility, have been proposed as sentinel species (Oehlmann and Schulte-Oehlmann, 2003). Bivalves have already been used to detect the presence of metals (Camusso et al., 1994; Zuykov et al., 2013), microplastics (Su et al., 2018), organochlorine contaminants (Baqar et al., 2018), parasites (Graczyk et al., 2003) and MC-producing cyanobacteria (Lauceri et al., 2017). The zebra mussel *Dreissena polymorpha* is a sessile bivalve able to filter particles from 0.4 µm (White and Sarnelle, 2014) to 200 µm (Aldridge et al., 2006) with filtering capacities ranging from 5 to 400 mL/mussel/hour (Binelli et al., 2015). However, this species originated from the Ponto-Caspian region is nowadays widespread in the northern hemisphere and therefore qualified as invasive (Ludyanskiy et al., 1993), which is limiting its potential use in sites in which its presence has not already been proven. On the opposite, the freshwater mussel *Anodonta anatina* is a vagile bivalve (Swhalb and Pusch, 2007) present throughout Europe (Lopes-Lima et al., 2017) and classified as least concern by the IUCN (Lopes-Lima, 2014), although some population are declining (Lopes-Lima et al., 2017). Even if up to date, there is no data about *A. anatina* favoured size range of ingested particles (Dionisio Pires et al., 2007), it has been shown that this species is able to accumulate heavy metals (Manly and George, 1977), parasites of 7.8 ± 1.6 µm (Słodkowicz-Kowalska et al., 2015) and to ingest the filamentous cyanobacteria *Planktothrix agardhii* (Bontes et al., 2016). *A. anatina* filtering capacities are ranging from 625 to 1875 mL/mussel/hour (Strayer, 2008). It has already been shown that *D. polymorpha* is able to ingest MC-producing cyanobacteria such as the colonial *Microcystis aeruginosa* and the filamentous *P. agardhii* (G. Juhel et al., 2006; White and Sarnelle, 2014). Regarding *A. anatina*, it has been shown that this species could ingest both colonial (*M. aeruginosa)* and filamentous

(*P. agardhii)* cyanobacteria (Dionisio Pires et al., 2007; Bontes et al., 2016). Whereas the ingestion of *M. aeruginosa* by *D. polymorpha* and subsequent MC accumulation has been proven (Dionisio Pires et al., 2004), kinetics of MC accumulation and detoxification by *D. polymorpha* and *A. anatina* exposed to a filamentous MC-producing cyanobacteria remained to be studied. As one of the most occurring and abundant filamentous cyanobacteria in temperate zones of the northern hemisphere is *P. agardhii* (D'Alelio and Salmaso, 2011), a MC-producing strain of this species has been chosen in this study.

After cyanobacterial cell ingestion, MCs rapidly bind to PPases through a reversible hydrophobic bound, and then form covalent adducts after several hours (Craig et al., 1996; Hastie et al., 2005; Maynes et al., 2006; Campos and Vasconcelos, 2010). Therefore, two forms of MC accumulation can be studied: i) 'free MCs' representing the cell fraction of unbound MCs, and ii) 'total MCs' including free and protein-bound MCs in tissues. *D. polymorpha* is known to accumulate free MCs while exposed to MC-producing cyanobacteria in field (Barda et al., 2015; Paldavičienė et al., 2015). Moreover, in the laboratory *D. polymorpha* accumulated both free and bound MCs from the first of a three-week exposure to the MC-producing cyanobacteria *M. aeruginosa* (Dionisio Pires et al., 2004). *A. anatina* also accumulated free MCs *in situ* (Barda et al., 2015). Different methods have been described in the literature to analyse the free MC fraction in freshwater bivalves: high pressure liquid chromatography (HPLC) alone (Yokoyama and Park, 2002; Ibelings et al., 2005), with single (LC–MS) or tandem (LC-MS/MS) mass spectrometry (Dionisio Pires et al., 2004; Wood et al., 2006). However, those methods are expensive and restricted to the analysis of MC variants for which standards are available. The use of matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has also been proposed (Lauceri et al., 2017), but its performance can be limited in complex mixtures (Welker et al., 2002). However, because it does not require expensive equipment like LC-MS, the method that is increasingly applied is the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Meriluoto et al., 2016). It has also been used on freshwater bivalves matrix (Wood et al., 2006; Paldavičienė et al., 2015; Preece et al., 2015; M. Woller-Skar, 2009; Lauceri et al., 2017), and represents a rapid and sensitive method (Metcalf et al., 2000), easy to use and interpret (Gaget et al., 2017). However, it can generate false-positive results (Meriluoto et al., 2016), which was not confirmed for some mollusc matrix (Lance et al., 2010c). The total amount of MCs (*i.e.* free MCs and protein-bound MCs) can be extracted from a sample using Lemieux oxidation (Sano et al., 1992) or ozonolysis (Harada et al., 1996), which release a compound called 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric

acid (MMPB) analysed by GC-MS or LC-MS/MS (Meriluoto et al., 2016). Because MMPB is not occurring naturally, it has been described as a unique marker for the presence of MCs in the environment (Suchy and Berry, 2012). The MMPB method allows a quantification of all MCs variants and fractions (free and bound) in a sample, but is time-consuming and expensive. As free MCs could represent only a small proportion of total MCs in bivalve's tissues, this fraction may not be fully representative of bivalve's contamination. On the opposite, quantification of total MCs in bivalve tissues might not reflect short-term variations of environmental MC contamination, as the protein-bound MCs are known to remain longer in tissues than free MCs after the end of exposure (Lance et al., 2010c). Thus, there may be differences in the potential use of each fraction for bioindication of environmental contaminations.

This study aimed to evaluate: (i) if *D. polymorpha* and *A. anatina* may represent the levels of intracellular MC concentrations in waters, and may therefore be suitable as a bioindicator, and (ii) which fraction (total or free MCs) in bivalve tissues best represents the dynamic of MC-producing cyanobacteria in the medium. To achieve this, both bivalves were exposed to different densities of the MC-producing cyanobacteria *P. agardhii*, producing an equivalent of 1, 10 and 100 µg MCs/L, during a 3-week exposure period, followed a 3-week depuration period. During both exposure and depuration periods, whole *D. polymorpha* and digestive glands of *A. anatina* were sampled at days 1, 3, 7, 14 and 21 to quantify free (ELISA) and total (Lemieux oxidation and LC-MS/MS) MCs. Whole individuals of *D. polymorpha* were sampled and, because of their more important size, only digestive glands of *A. anatina* were kept because it represents MC target organ in various bivalves (Vasconcelos, 1995; Chen and Xie, 2005b). The ingestion rate of cyanobacteria and of MCs were measured daily to calculate a cumulative and a temporal accumulation factor. We analysed kinetics of free and total MC accumulation and elimination for each species and discussed their pertinence as potential bioindicators of the presence and dynamic of MC-producing cyanobacteria in water.

IV. Materials and methods

IV.1. Biological materials

IV.1.1. Anodonta anatina

Mussels, provided by Univers aquatique (Univers aquatique, Sartrouville, France) were placed by groups of 75 at 18 ± 2°C in aerated tanks containing 25 L of of Cristalline® source water (Saint Yorre, France) with a cycle of 12 h of light and 12 h of darkness. To ensure a

homogenization of the medium, each tank had a pipe pierced all along its immersed length, connected to an air pump (Zolux, Clisson, France), creating a homogeneous constant bubbling over the entire surface of tanks. During the acclimatisation, animals were fed twice a week with 3,7 x 10^7 cells of *Chlorella vulgaris*/individual/day (Greensea, Mèze, France). Algal density was measured with an optic microscope (Primovert, Zeiss, Oberkochen, Germany) and KOVA® slides (Kova slide, VWR, Fontenay-sous-Bois, France).

IV.1.2. Dreissena polymorpha

Mussels were collected in March at the Lac-du-Der-Chantecoq (48°36'07.7"N; 4°44'37.0"E), and acclimated as described in Lepoutre et al. (2018) (Annexe 1) with minor changes : 180 *D. polymorpha* were placed in 15 L, the aerating system was the same as described for *A. anatina* and, after being put in 100% source water, the temperature was increased daily of 1°C until reaching 18 ± 2°C.

IV.1.3. Cyanobacteria

The filamentous cyanobacterium *P. agardhii* (PMC 75-02) was isolated and provided by the National Museum of Natural History (Paris, France). Cells culture were grown in 5 L Erlenmeyer with BG 11 medium, at 20 ± 3°C under constant light (Sylvania Grolux T8, Budapest, Hungary) and aerated by an air pump (Zolux, Clisson, France). Cultures were replenished with a new medium weekly to ensure that the cyanobacteria remained in the exponential growth phase.

IV.1.4. Experimental design

Exposures of both bivalves occurred before the spawning season. Three days before experiments, mussels were unfed to prevent a potential impact of the presence of food within guts on the ingestion and assimilation rates. During the exposure, the water was entirely renewed weekly. The food material consisted in the MC-producing cyanobacteria *P. agardhii* provided at various frequencies depending on the MC concentration of exposure. Mussels of both species were exposed to three densities of *P. agardhii*, producing an equivalent to 1, 10 and 100 µg MCs/L. Preliminary experiments on the kinetics of cyanobacteria filtration by *A. anatina* and *D. polymorpha*, taking into account the cyanobacterial growth in tanks, were done to determine the frequency of the addition of cyanobacteria necessary to maintain a constant intracellular MC concentrations of exposure. Also, to ensure a constant MC concentration available in the medium per milligram of whole soft tissues (FW) of bivalves, the ratio of

mussels/L was maintained by adjusting the volume of water after each mussel sampling. At days 0, 1, 3, 7, 14, 21 of exposure and depuration, mussels were randomly collected and put 24 h in clear water before the quantification of free and total MC contents in their tissues. The one-day starvation in clear water was perform to ensure that MC contents in tissues only reflect the fraction assimilated by mussels and not cyanobacterial filaments in guts. To prevent an effect of the addition of food particles on MCs detoxification (Lance et al., 2008, 2006), animals were unfed during the depuration. The number of sampled mussels consisted in three pools of six *D. polymorpha* and three pools of three of *A. anatina* per concentration. Mussels were sacrificed, removed from their shells, dissected, and stored at -80°C until being freeze-dried. Samples were further grind 8 min at 30 Hz with a Mixer Mill MM400 (Retsch, Haan, Germany) using 4 beads and stored at 4°C.

Control tanks, exempt of mussels but containing similar densities of cyanobacteria, were used to evaluate the cell ingestion by bivalves during the exposure through a daily numeration of filaments (see part 3). However, the numeration of filaments in tanks containing the lowest density of filaments producing an equivalent of 1 µg MCs/L was tenuous and did not reflect the ingestion by mussels. Therefore, no control tank containing the density of cyanobacteria producing an equivalent of 1 µg MCs/L was used. The study was conducted in duplicate for each concentration and both conditions (with and without mussels).

IV.2. Measurement of the ingestion of cyanobacteria filaments and MCs by bivalves

The ingestion of *P. agardhii* filaments was measured daily for mussels exposed to 10 and 100 µg/L of MCs, taking into account the growth of the cyanobacterial population. Cyanobacteria densities were measured in controls and mussel-containing tanks with an optic microscope (Primovert, Zeiss, Oberkochen, Germany) and KOVA® slides (Kova slide, VWR, Fontenay-sous-Bois, France). The daily ingestion rate was calculated by subtracting the number of cells present in tanks containing mussels from the number of cells present in control tanks, under the assumption of a similar daily growth rates in both conditions. The MC production by cyanobacteria in culture was determined along with the density of cyanobacterial filaments. This enabled to determine the MC content produced by a cyanobacterial cell, which was associated with the number of cells ingested per mussel and per day, in order to establish an estimation of the ingestion of MCs per individual mussel.

IV.3. Quantification of free MCs by ELISA

IV.3.1. Quantification of free MCs in cyanobacteria

MC production by cyanobacteria was evaluated using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Abraxis LLC, Warminister, PA, USA). In this matrix, MCs measured by ELISA can account up to 99% of total MCs measured by an analysis of MMPB, the incomplete recovery was attributed to differences in methods precision and an incomplete cellular lysis when using freeze-thaw (Foss and Aubel, 2015). After homogenization of cultures, 20 ml were sampled and filtered (1 µm Cyclopore track etched membrane, Whatman, Maidstone, United Kingdom). Free MCs were extracted with 80 % MeOH, and samples were first placed in an ultrasound water bath for 15 min at 35 kHz (Bioblock scientific, Strasbourg, France) and then subjected to three cycles of centrifugation-probe sonication (Hielscher Ultrasonics GmbH, Germany). ELISA tests were performed according to the manufacturer's protocols. Analysis were performed in duplicate for each samples and supernatants were diluted to ensure the presence of less than 10% methanol in wells. Fluorescence was measured at 450 nm using an absorbance microplate reader (Tecan, Männedorf, Switerland).

IV.3.2. Quantification of free MCs in bivalve tissues

Free MCs were extracted from 10 mg of bivalve tissue with 1 ml of 80% methanol. Samples were placed in an ultrasound water bath for 15 min at 35 kHz (Bioblock scientific, Strasbourg, France), and then subjected to three cycles of centrifugation-probe sonication. Then the pellet was discarded, and the supernatant was kept at 4°C. Another millilitre of 80% methanol was added to the pellet and the extraction was repeated as described before. Then both supernatants were pooled together and stored at -80°C until analysis. To determine the recovery rate of MCs in digestive glands and whole individuals of each species, unexposed mussels were sacrificed and removed from their shell. After being stored at -80°C, they were freeze dried, grind and spiked with 1, 10 and 100 µg of MC-LR standard, and analysed as described previously. The mean percentages of extraction and recovery of free MC in mussels by ELISA was 56.4 ± 14.08 % for the digestive glands of *A. anatina* and 58.86 ± 4.61 % for whole *D. polymorpha*. The values obtained were then expressed in µg MCs/g of dry weight (DW) and corrected by the estimation of the recovery rate. To prevent the use of false-positive data, non-exposed tissues of each matrix were extracted and analysed, the values obtained served

as a threshold below which the values were considered as null in all samples. This threshold was of 0.04 ng MCs/g DW for both species.

IV.4. Determination of total MCs content in bivalve tissues by LC-MS/MS

IV.4.3. Extraction of total MCs

The determination of total MC content was performed according to Neffling et al., (2010) but with some changes. Briefly, freeze-dried tissues were put in glass tubes containing Sörensen's phosphate buffer (pH 7.5) and were hydrolysed two hours with a 1 X tryspin-EDTA mix at 37°C on a stirring tray. Solutions were then oxidised 3 h at 37°C on stirring tray with 0.025 M $KMNO_4$ /$INAO_4$ solution (pH = 9). The reaction was quenched with the addition of sodium bisulfite until the liquid became fully transparent. Then pH was checked and sulfuric acid (10% w/w) was added if the values were above 3. Extraction was performed with 3 cc (60 mg) SPE cartridges (Waters, Milford, MA, USA), previously washed with 5 ml of MQ water then 5 ml of 100% methanol. Cartridges were further washed with first water then 15 % methanol and dried. The elution was done with 80 % methanol, and the eluent was dried under azote at 35 °C as recommended (Sanan, 2016). Then samples were redissolved in 35 % methanol and put in inserts, centrifuged and stored at 4°C.

IV.4.4. LC-MS/MS analysis

The LC-MS/MS analysis of the released MMPB from tissue extraction was performed according to Neffling et al., (2010). The system consisted of a Waters Synapt mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA) coupled with Alliance e2695 separation module (Waters, Milford, MA, USA) and MassLynx software (vs. 4.1, Micromass, Manchester, UK). An agilent ZORBAX SB-C18 5 µm 3.0 x 250 mm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) column was used and kept at 30°C. The mobile phase consisted of solvent A: 0.1 % formic acid in water and B: methanol. The gradient programme for MC detection was from 25 % to 90 % B over 12 min, held at 90% B for 2 min, flow rate 0.3 mL min^{-1}. The injection volume was 10 µl. The analysis was conducted in positive electrospray ionisation. The MS ion source parameters were: desolvation gas flow 800 L/min^{-1}, capillary voltage 4 kV, sampling cone voltage 5 V in MRM mode, and transition followed m/z 209.2 to m/z 131,1 and 91.

The standard curve has been performed in the matrix for each tissue: unexposed tissues were extracted as described above and, after being redissolved in 35 % methanol, samples were

spiked with 2, 4, 8, 10, 12, 50, 150, 300 and 800 ng of MMPB. To determine the percentage of recovery of total MCs in digestive glands or whole individuals of each species, we evaluated the efficiency of the oxidation of total MC in MMPB and the efficiency of extraction and quantification of MMPB. For this, non-exposed tissues were spiked with 5 and 50 ng of MCs before the oxidation. The overall recovery rates of total MCs were of 58.8 ± 16.12 % in digestive gland of *A. anatina* and 67 ± 14.94 % in whole *D. polymorpha.* Values obtained in tissues during this experiment were then expressed in µg/g DW and corrected by the recovery rate. The quantity of bound MCs has been evaluated per pool of mussels, by subtracting the amount of free MCs measured by ELISA to the amount of total MCs measured after oxidation and analysis by LC-MS/MS.

IV.5. Calculation of MC exposure, of percentage of accumulation and of condition index

To evaluate the MC exposure of each species, we calculated the cumulated mean quantity of MCs that was available in the medium per mg of whole soft tissues (FW). This calculation showed that *D. polymorpha* were exposed to a mean of 4.3 ± 0.8 times more MCs per mg of soft tissue than *A. anatina* for all densities of filaments.

The ingestion of cyanobacteria and of MCs were also quantified, in order to evaluate percentages of accumulation. As free MCs only represent a fraction of the total amount of MCs measured in tissues, we used total MCs values to calculate two accumulations ratios.
The cumulated percentage of accumulation (cum % acc) was calculated for each sampling time, using the total MC content in tissues (µg/g DW) converted in µg/g FW using pre-established value (Tableau 7) the tissues weight (g) and the cumulative quantity of ingested MCs (µg):

$$\text{cum \% acc} = \frac{\text{MCs in tissues (µg/g) at day n} \times \text{tissue weight (g)}}{\text{cumulative quantity of ingested MCs between day 1 and n (µg)}} \times 100$$

However, this ratio comparing the cumulated accumulation to the cumulated ingestion at each date does not reflect the potent dynamics of MC accumulation and detoxification within tissues during the exposure. To better represent those variations, we calculated the temporary percentage of accumulation (temp % acc), using means of accumulated total MCs and of ingested MCs for several considered periods during the intoxication (between day 0 - 1, 1-3, 3-7, 7-14, 14-21):

$$\text{temp \% acc} = \frac{(\text{Mean MCs in tissue at day n} + 1) - (\text{Mean MCs in tissue at day n})}{\text{Mean ingested MCs between n and n} + 1} \times 100$$

Tableau 7 : Fresh weight / dry weight ratios per tissue (unpublished studies by the authors)

Tissue	FW/DW ratio	n	Pearson's R	p value
A. anatina digestive gland	6.36	90	0.9655	$p < 0.05$
D. polymorpha whole	14.15	182	0.7882	$p < 0.05$

To assess a potential impact of the exposure to cyanobacteria on their overall mussel health condition, the condition index (CI) was measured using the total weight (non-dissected mussel with dried shell) and soft tissues weight as follows:

$$\text{CI} = \frac{\text{whole soft tissues wet weight (mg)}}{\text{whole body weight with shell (mg)}}$$

IV.6. Statistics

Statistical analyses were performed with Statistica (Version 8.0.360.0, Statsoft, Tulsa, USA, 2007). The normality of data has been evaluated with a Shapiro-Wilk test, and the homogeneity of variances was studied with a Levene test. The comparison of two independent samples was done with Bonferroni-corrected Mann-Whitney tests and the comparison of multiple independent samples was done with Kruskal-Wallis tests. For parametric data, one-way ANOVA – Tuckey test were used.

V. Results

V.1. Condition indexes and mortality

Neither *A. anatina* nor *D. polymorpha* condition indexes (CI) differed between densities of exposure during the experiment (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$ for each species). Regarding *A. anatina,* when considering all sampling times, the mean CI were 0.38 ± 0.01, 0.44 ± 0.04 and 0.43 ± 0.01 in mussels exposed to a density of filaments producing an equivalent of 1 µg MCs/L, 10 µg MCs/L and 100 µg MCs/L respectively. In *D. polymorpha,* when considering all

sampling times, the mean CI were similar (0.12 ± 0.01) whatever the concentration of exposure. For each species and concentration of exposure, no significant mussel death was observed during the experiment (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$, data not shown).

V.2. Ingestion of MC-producing cyanobacteria *P. agardhii* by the bivalves

The quantification of the number of filaments ingested by *A. anatina* per day during the exposure (**Figure 29**, A) showed that mussels have been able to ingest the MC-producing cyanobacteria *P. agardhii* for 21 days. The quantity of filaments ingested by *A. anatina* exposed to a density producing an equivalent of 100 µg MCs/L was significantly higher compared to those exposed to 10 µg MCs/L (ANOVA, $p < 0.01$). Temporal variations in the ingestion were observed for both densities, although there was no significant variation in the number of ingested filaments per *A. anatina* between the different weeks (ANOVA, $p > 0.05$). During the exposure to a density of filaments producing an equivalent of 10 µg MCs/L, the minimum of ingested filaments per day was observed at day 5 (5.14E+07 ± 4.44E+07 filaments) and the maximum was observed day 11 (2.68E+08 ± 2.34E+07 filaments). In mussels exposed to a density of cyanobacteria producing an equivalent to 100 µg/L of MCs, the minimum number of ingested filaments per day was observed on day 3 (3.08E+07 ± 3.49E+06 filaments), and the maximum on day 9 (5.19E+08 ± 1.75E+07 filaments).

D. polymorpha also ingested the filamentous MC-producing *P. agardhii* continuously for 21 days when exposed to densities producing an equivalent to 10 and 100 µg MCs/L of MCs (**Figure 29**, B). The number of ingested filaments by mussel per day was related to the amount available as it was significantly more important in individuals exposed to a density of filaments producing an equivalent of 100 µg MCs/L compared to 10 µg MCs/L (ANOVA, $p < 0.01$). In *D. polymorpha* exposed to a density equivalent to 10 µg MCs/L, the number of ingested filaments per day increased weekly, from the first to the last day before water renewal but this increase was not significant (ANOVA, $p > 0.01$). The minimum number of ingested filaments per day was observed at the first day of exposure (9.03E+04 ± 6.94E+03 filaments) and the maximum was observed at day 14 (2.39E+06 ± 5.56E+04 filaments). Moreover, the same pattern seemed to emerge for those exposed to 100 µg/L: the number of ingested filaments increased from the first day of each week to day before water renewal, but without significance difference (ANOVA, $p > 0.01$). However, *D. polymorpha* increased its consumption of MC-producing filament during the experiment, as the number of ingested filaments was significantly lower

(ANOVA, < 0.05) during the first week (mean number of ingested filaments: 4,97E+05 ± 1,38E+05) compared to the second (mean number of ingested filaments: 1,27E+06 ± 3,83E+05) and the third (mean number of ingested filaments: 06E+06 ± 2,20E+05) weeks. Overall, when comparing the mean number of ingested filaments per mussel of both species during the exposure, *A. anatina* ingested 350 ± 90 times more filaments than *D. polymorpha* at a density of filaments producing an equivalent of 10 µg MCs/L, and 162 ± 48 times more at a density producing an equivalent of 100 µg MCs/L.

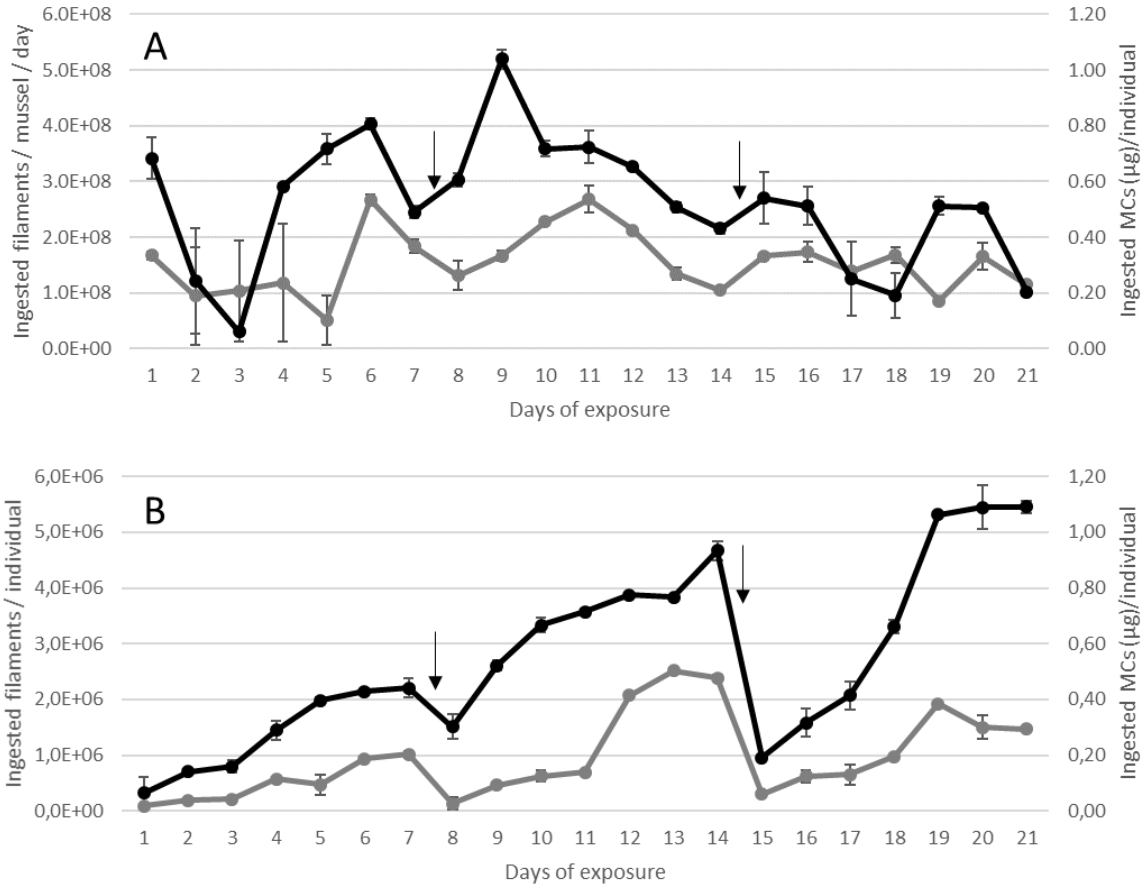

Figure 29. Mean ± S.E.M number of filaments of *P. agardhii* ingested per day by (A) *A. anatina* and (B) *D. polymorpha*, during exposure to a density of filaments producing an equivalent of 10 µg (grey lines) and 100 µg (black lines) MCs/L, n = 2 aquariums. Days in which the water was completely renewed are indicated with an arrow.

V.3. Accumulation and elimination of free and total MCs in digestive glands of *A. anatina*

Free MCs were rapidly accumulated by *A. anatina* as they were detected in tissues from the first day of exposure (Figure 30,A). During the exposure, there was no significant differences in MC concentration in *A. anatina* tissues between the exposures to various densities of cyanobacteria (Kruskal-Wallis, $p > 0.05$). Toxin contents in *A. anatina* exposed to densities of filaments producing an equivalent of 1, 10 and 100 µg MCs/L increased from day 1 (respectively 0.10 ± 0.10; 1.44 ± 0.55 and 0.66 ± 0.33 µg MCs/g DW) to a maximum at day 14 of exposure for mussels exposed to 10 and 100 µg MCs/L (respectively 9.93 ± 0.53 and 14.05 ± 4.27 µg MCs/g DW) and at day 21 for those exposed to 1 µg MCs/L (12.01 ± 4.99 µg MCs /g DW). During the depuration, the MC contents in tissues decreased more rapidly in mussels exposed to a density of filaments producing an equivalent of 1 and 100 µg MCs/L, compared to those exposed to an equivalent of 10 µg MCs/L. At the last day of depuration, free MC were detected in at least two pools of mussels out of three for each concentration of exposure.
Total MCs (Figure 30,) were detected in digestive glands of *A. anatina* from the first day of exposure to the last day of depuration whatever the exposure concentration. Overall, total MC contents were higher than free MC content, and the mean percentage of bound MCs in *A. anatina* was 70 ± 7 % during the accumulation and 74 ± 4 % during the depuration. During the exposure, MC contents in *A. anatina* exposed to a density of filaments producing an equivalent 100 µg/L were significantly higher than in mussels exposed to 1 µg MCs/L (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$). However, there were no significant differences in the MC contents in mussels exposed to a density producing an equivalent to 10 µg MCs/L compared to the two other densities (Kruskal-Wallis, $p > 0.05$).

The maximum total MC accumulation in mussels exposed to a density of filaments producing an equivalent of 1 µg MCs/L was observed at day 21 of exposure (23.38 ± 8.03 µg MCs/g DW). Regarding mussels exposed to a density of cyanobacteria producing an equivalent to 10 and 100 µg MCs/L, the maximum concentration of total MCs in tissues was observed at day 14 of exposure (respectively: 116.18 ± 36.47 µg MCs/g DW and 99.11 ± 22.10 µg MCs /g DW) (Fig. 2B). During the depuration, the total MC contents in mussel tissues remained stable for each concentration of exposure (Fig. 2B). However, MC concentrations in mussels exposed to an equivalent of 10 µg MCs/L were significantly higher compared to the two other exposure

concentrations (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$), and no differences were observed between those exposed to 100 and 1 µg MCs/L (Kruskal-Wallis, $p > 0.05$).

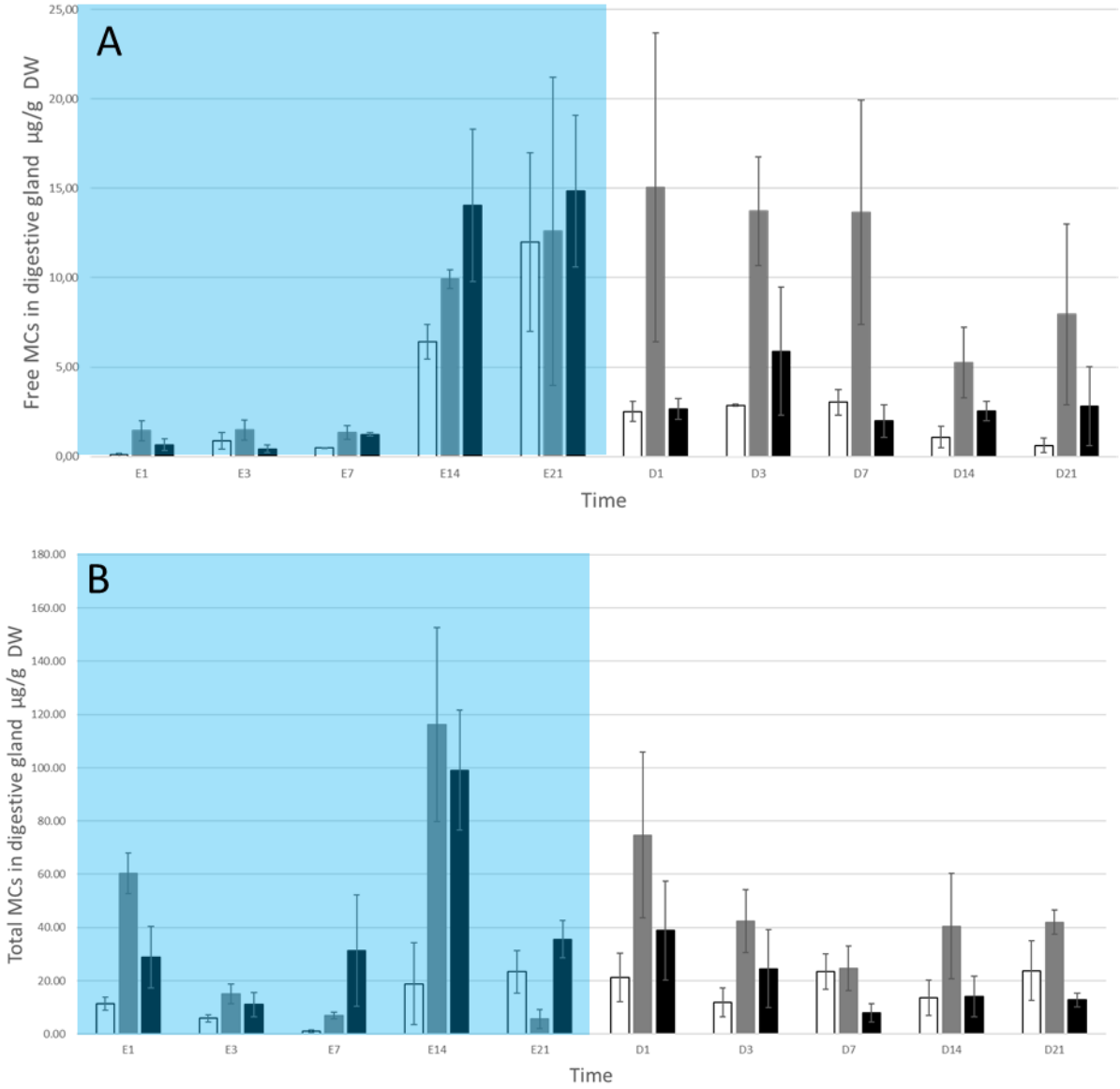

Figure 30. Mean ± S.E.M concentrations (µg/g DW) of free (A) and total (B) MCs accumulated in digestive glands of A. anatina exposed to *P. agardhii* producing an equivalent of 1 (white), 10 (grey) and 100 (black) µg MCs/L, during the exposure (E, blue background) and the depuration (D, white background), n = 3 pools of 6 individuals. No significant difference between concentrations of the same sampling time (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$).

V.4. Accumulation and elimination of free and total MCs in whole *D. polymorpha*

Free MCs were detected in *D. polymorpha* tissues only from the third day of exposure whatever the exposure concentration. During the experiment, the maximum concentrations

of MCs in whole *D. polymorpha* have been observed either at day 14 of exposure for mussels exposed to a density of filaments producing an equivalent of 1 µg MCs/L (0.27 ± 0.14 µg MCs/g DW) and 100 µg MCs/L (6.40 ± 3.02 µg MCs/g DW), or at the first day of depuration for mussels exposed to a density of filaments producing an equivalent of 10 µg MCs/L (5.16 ± 3.77 µg MCs/g DW). From day 7 to 14 of exposure, MC concentrations in tissues of *D. polymorpha* tended to be correlated with the intracellular MCs concentrations in the medium. At day 14 of exposure there were significantly more MCs in tissues of whole mussels exposed to a density of filaments producing an equivalent of 100 µg MCs/L compared to those exposed to a density of filaments producing an equivalent of 1 µg MCs/L (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$). However, during the entire exposure, the MC contents in mussels exposed to those concentrations (1 and 100 µg MCs/L) were not statistically different from the MC content in mussel exposed to 10 µg MCs/L. During the depuration, MCs ceased to be detected in tissues asynchronously: in mussels exposed to a density of filaments equivalent to 1 µg MCs/L, only one sample out of three was positive at the first day of depuration and contained 0.10 µg MCs/g DW. Then, MCs ceased to be detected in tissues of mussels exposed to 1 µg MCs/L from day 3 of depuration. In mussels exposed to a density of filaments producing an equivalent of 10 µg MCs/L, MCs were detected in all pools at the first day of depuration. Apart one pool at day 21 of depuration in which 0.06 µg MCs/g DW was measured, no MCs were detected from day 7 to 21 of depuration. MCs were still detected in all pools of *D. polymorpha* exposed to a density of filaments producing an equivalent of 100 µg MCs/L after 21 days of depuration (0.38 ± 0.07 µg MCs /g DW). When comparing data from the entire depuration, the concentration of MCs measured in animals exposed to a density of *P. agardhii* producing an equivalent of 100 µg MCs/L was significantly more important compared to mussels exposed to a density of filaments producing an equivalent of 1 and 10 µg MCs/L (Kruskal-Wallis, $p < 0.01$).

During the exposure, the mean percentage of bound MCs in *D. polymorpha* was of 50 ± 9 % during the accumulation and 75 ± 8 % during the depuration. As shown in Figure 31, total MCs were detected from the first day of exposure in whole *D. polymorpha* exposed to densities of *P. agardhii* producing an equivalent of 10 and 100 µg/L MCs (0.18 ± 0.18 µg MCs/g DW for each concentration). Regarding mussels exposed to a density of filaments producing an equivalent of 1 µg MCs/L, total MCs were detected from day 3 (0.26 µg MCs/g DW) but only in one sample. During the exposure, the total MC contents in tissues were significantly more important in *D. polymorpha* exposed to a density of filaments producing an equivalent of 100 µg MCs/L, compared to those exposed to 1 µg MCs/L (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$). No significant

difference was observed between mussels exposed to a density of filaments producing an equivalent of 10 µg MCs/L and the two other densities (Kruskal-Wallis, $p > 0.05$). The highest total MC contents in *D. polymorpha* were observed at different times of the intoxication depending on the exposure concentrations: at day 21 for the densities producing an equivalent of 1 µg MCs/L (1.26 ± 0.05 µg MCs/g DW) and 100 µg MCs/L (8.91 ± 5.65 µg MCs/g DW), and at day 1 of depuration for 10 µg MCs/L (4.75 ± 2.60 µg MCs/g DW).

During the depuration, the total MC concentrations in *D. polymorpha* tissues were significantly more important in mussels exposed to a density of filaments producing an equivalent of 100 µg MCs/L, compared to those exposed to a density of filaments producing an equivalent of 1 µg MCs/L (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$). No significant difference was observed between mussels exposed to a density of filaments producing an equivalent of 10 µg MCs/L and the two other densities (Kruskal-Wallis, $p > 0.05$). Total MCs were still detected in tissues of *D. polymorpha* exposed to the three densities of filaments after 21 days of depuration. Regarding mussels exposed to a density of filaments producing an equivalent of 1 µg MCs/L, MCs were found in one pool (0.18 µg MCs/g DW). In mussels exposed to a density of filaments producing an equivalent of 10 and 100 µg MCs/L, MCs were found in two pools out of three with concentrations of 0.73 ± 0.38 µg MCs/g DW and 1.22 ± 0.61 µg MCs/g DW respectively.

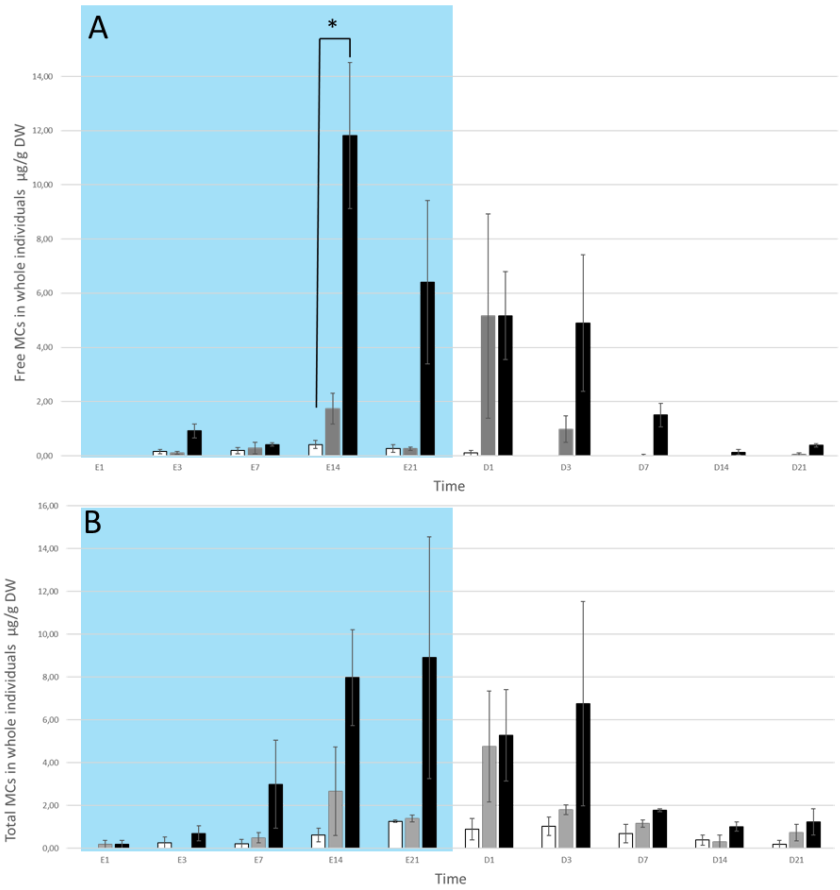

Figure 31. Mean ± S.E.M concentrations (µg/g DW) of free (A) and total (B) MCs accumulated in whole *D. polymorpha* exposed *P. agardhii* producing an equivalent of 1 (white), 10 (grey) and 100 (black) µg MCs/L, measured by ELISA, during the exposure (E, blue background) and the depuration (D, white background), n = 3 pools of 6 individuals. * Indicates a significant difference between concentrations at the same time (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$).

V.5. Accumulation factors

The cumulated percentages of accumulation (cum % acc) of *A. anatina*, representing the ratio between the amount of total MCs in the digestive gland at a defined day and the cumulated amount of ingested MCs at the same day is presented in Tableau 8. In mussels exposed to a density of cyanobacteria equivalent to 10 µg MCs/L, the cum % acc decreased significantly from day 3 (38.76 ± 16.50 %) to day 21 (1.36 ± 0.46 %) (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$). The same decrease was observed for mussels exposed to an equivalent of 100 µg MCs/L, although not significant (Mann-Whitney, $p > 0.05$). Overall, mussels exposed to a density of filaments producing an equivalent of 100 µg MC/L accumulated a higher proportion of the ingested MCs (Mann-Whitney, $p < 0.05$) compared to those exposed to 10 µg MCs/L.

Tableau 8 : Cumulated percentage of MC accumulation (cum %acc), amount of ingested MCs (ng)/ mussel between two sampling times, difference in the amount of MCs accumulated (ng) between the same sampling times, and temporary percentage of MC accumulation (temp % acc) of the same time range.

Species	Exposure concentration	Day	Cum % acc	Time	Amount of ingested MCs (ng) / mussel between two sampling times	Amount of MCs accumulated (ng) between the same sampling times	Temp % acc
A. anatina	10 µg/L	E1	N/A	E1-E0	N/A	N/A	N/A
		E3	38.76 ± 16.5	E3-E1	1952.32	-5944.45	-304.48
		E7	7.27 ± 1.33	E7-E3	5525.63	-742.42	-13.44
		E14	21.2 ± 6.03	E14-E7	13602.32	4158.55	30.57
		E21	1.36 ± 0.46	E21-E14	6375.39	-4427.69	-69.45
	100 µg/L	E1	61.61 ± 25.35	E1-E0	11110.68	6845.42	61.61
		E3	13.37 ± 4.76	E3-E1	4620.31	-4741.96	-102.63
		E7	10.63 ± 7.27	E7-E3	37604.71	3567.46	9.49
		E14	12.37 ± 2.33	E14-E7	28854.05	4499.93	15.60
		E21	3.29 ± 0.28	E21-E14	53921.54	-1222.26	-0.64
D. polymorpha	10 µg/L	E1	0.21 ± 0.21	E1-E0	745.84	1.60	0.21
		E3	N/A	E3-E1	3327.58	-1.60	-0.05
		E7	0.06 ± 0.03	E7-E3	24669.98	16.83	0.07
		E14	0.05 ± 0.03	E14-E7	14366.25	3.32	0.02
		E21	0.22 ± 0.05	E21-E14	18644.35	72.84	0.63
	100 µg/L	E1	0.08 ± 0.08	E1-E0	2639.11	2.11	0.08
		E3	0.05 ± 0.02	E3-E1	12449.73	4.78	0.04
		E7	0.04 ± 0.03	E7-E3	64256.68	27.56	0.04
		E14	0.08 ± 0.03	E14-E7	49661.94	63.00	0.13
		E21	0.06 ± 0.04	E21-E14	50245.35	10.77	0.02

The cumulated percentage of accumulation of *D. polymorpha*, calculated from the amount of total MCs in whole body, showed a great variability between replicates for both concentrations, particularly at day 1, reflecting the fact that MCs were detected only in one pool among three for each concentration. The cum % acc of *D. polymorpha* appeared stable over exposure concentrations and time. Indeed, no variation appeared between different sampling times of each concentration (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$), nor between both concentrations at the same sampling day (Mann-Whitney, $p > 0.05$) except at day 21, in which mussels exposed to a density of filaments producing an equivalent of 10 µg MCs/L accumulated more of ingested MCs compared to those exposed to a density producing an equivalent of 100 µg MCs/L (Mann-Whitney, $p < 0.05$).

The temporary percentage of MC accumulation (temp %acc) of *A. anatina* displayed numerous variations over time for each concentration, that did not appear to be attributed to a potential decreased of the ingestion, rather than pointing out that the MC contents in tissues decreased within the analysed time ranges. However, few variations of the temp % acc were observed in *D. polymorpha*, as the only negative value is noticed between day 1 and 3 at 10 µg/L and is only of -0.05 %.

VI. Discussion

The freshwater mussels *A. anatina* and *D. polymorpha* were exposed 3 weeks to 3 densities of the MC-producing cyanobacteria *P. agardhii* equivalent to 1, 10 and 100 µg MCs/L followed by 3 weeks of depuration. The ingestion of filaments per mussel per day was measured daily, and the kinetics of free and total MCs in mussel tissues were evaluated during the intoxication and depuration periods. Two percentages of accumulation were calculated in order to compare MC accumulation capacities of those bivalves: i) the cumulated percentage of accumulation (cum % acc), which represents the ratio between total MC contents in tissues compared to the cumulated amount of ingested MCs at the same sampling time, and ii) the temporary percentage of accumulation (temp % acc), which represents the ratio between the difference of total MCs accumulated (ng) between two sampling times and the difference of ingested MCs during this time frame.

VI.1. Free and total MC kinetics and accumulation capacities of *A. anatina*

The filaments of MC-producing *P. agardhii* were ingested by *A. anatina* during the 21 days of exposure to densities producing an equivalent of 10 and 100 µg MCs/L, with a consumption level related to the density available. However, the ingestion was not stable during the exposure and variations in the number of filaments ingested per mussel and per day were observed, but not related to the water renewal. However, *A. anatina* did not particularly increase or decrease it consumption of MC-producing cyanobacterial cells during the 3 weeks, demonstrating no change in its feeding behaviour with the toxic cyanobacteria. Free MCs were detected in *A. anatina* tissues from the first day of exposure to the density of filaments producing an equivalent of 1 µg MCs/L, and were still detected in samples of each density of exposure after 21 days of depuration. Total MCs were also detected in digestive gland tissues of *A. anatina* from the first day of exposure to all cyanobacterial densities, and were still present after 21 days of depuration. Overall, during this study, bound MCs accounted for 98.2 ± 0.5 % of total MCs in *A. anatina* at the first day of exposure, meaning that the binding may have occurred in less than 24h hours. Several studies have reported that the MCs binding to PPases starts several hours after the exposure (Craig et al., 1996; Hastie et al., 2005; Maynes et al., 2006; Campos and Vasconcelos, 2010). The kinetics of total MC accumulation in *A. anatina* revealed that at some days (i.e., day 1 and 14) during the exposure, mussels exposed to a density of filaments producing an equivalent of 10 µg MCs/L accumulated more total MCs

than mussels exposed to ten times more filaments, despite an overall lower percentage of accumulation during the entire exposure. Moreover, variations in the concentrations of total MCs in tissues of *A. anatina* were observed over time. Several mechanisms could explain these observations: i) a decrease or stoppage of the ingestion of filaments of *P. agardhii,* ii) a triggering of detoxification, iii) the elimination of cyanobacteria as pseudofeces and iv) the distribution of MCs within other tissues than the digestive gland. The hypothesis of a potential decrease or stoppage of the ingestion of filaments to explain the highest concentration of MCs in tissues of mussels exposed to a density of *P. agardhii* producing an equivalent of 10 µg MCs/L compared to 100 µg MCs/L for two dates is not supported by the data from this exposure. Indeed, mussels exposed to an equivalent of 100 µg MCs/L ingested significantly more filaments compared to those exposed to 10 µg MCs/L. However, punctual changes of the filtration rates may be part of the variations of MCs concentrations in tissues over time. Indeed, it is known that the filtration is not a constant phenomenon and inter-individual variations are high (Hartmann et al., 2016). The second hypothesis of an induction of detoxification pathways may be supported by previous studies. The most described pathway of MC detoxification by bivalves involves the glutathione S-transferase (GST) and glutatione (GSH). MCs can be conjugated to GSH (Kondo et al., 1992), reducing MC toxicity and potentially enhancing its excretion (Hudnell, 2008). This conjugation is catalysed by GSTs, a multigene family of enzymes responsible for phase II biotransformation processes, and representing a defence mechanism against xenobiotics (Hayes et al., 2005). GST has been shown to catalyse the conjugation of MCs to glutathione in bivalves (S Pflugmacher et al., 1998). Another mechanism involves the multi-xenobiotic-resistance (MXR) phenomenon, based on the overexpression of transmembrane P-glycoproteins that prevent the cellular accumulation of various substances by actively pumping them out of cells (Bard, 2000). MXR has been suggested as a possible explanation for the insensitivity of some bivalves towards MCs, as seen on *D. polymorpha* (Contardo-Jara et al., 2008). Here, it is possible that the detoxification started while mussels were exposed to 10 µg/L of intracellular MCs, as reflected by the variations of the cumulated accumulation factor over the exposure period (a significant decrease from day 3 to day 21 of exposure). This hypothesis is also supported by the negative temporal accumulation ratio observed between some days during the exposure, whereas the difference in the number of ingested cells was positive for this time range. This means that mussels may not have decreased their ingestion rate during this period but have far less accumulated MCs. Therefore, *A. anatina* mussels may have metabolized and detoxified MCs when still exposed to *P. agardhii*. It can be hypothesized that the detoxification was dynamic

over time, the mechanisms involved being alternately activated and exhausted. This potential exhaustion may explain positive temporal accumulation rates of mussels. Moreover, the activation of the detoxification seemed to be asynchronous, and depending on the exposure densities. Indeed, the cumulative accumulation factor being overall higher during exposure to 100 µg/L of intracellular MCs compared to 10 µg/L might be explained by an exhaustion of detoxification processes at the highest concentration of exposure. The third hypothesis can be the production of pseudofeces (PF) containing the MC-producing cyanobacteria. PF are materials that have been filtered by mussels, sorted then embedded in mucous and rejected before the ingestion can take place (Winkel and Davids, 1982). This phenomenon has been described during a one-hour exposure of *A. anatina* to various densities of *P. agardhii* (from 0.5 to 10 mg chlorophyll /L), were it was observed that mussels had high clearance rate and high rate of PF production (Bontes et al., 2016). A more advanced state of elimination of PF is the so-called "pseudodiarrhea", where mussels produce a large amount of unwanted food particles embedded in a large amount of mucous that is not expelled through siphons but from the pedal gape (Juhel et al., 2006). Those mechanisms might be energy-consuming for mussels and may be cyclic. Thus, a cyclic PF emission might have temporary decreased the assimilation of MCs by bivalves and the consecutive accumulation. However, the PF emission could not explain the difference in accumulation factors between the 10 µg/L of intracellular MCs and the 100 µg/L of intracellular MCs concentrations of exposure. Finally, because MCs concentrations were only studied in digestive glands of *A. anatina*, and not in whole individuals, it can be hypothesized that some variations of the concentration of MCs in this tissue may occurred because of the distribution of MCs in whole individuals. Indeed, as shown with gastropods exposed to dissolved MCs and MC-producing *P. agardhii*, a fraction of the toxin may accumulate in other tissues than the digestive gland, such as the genital glands (Lance et al., 2010b). The variations of MC concentrations in tissues of *A. anatina*, as well of its dynamic of accumulation highlighted by the accumulation factors, might be the result of a joint action of the mentioned mechanisms. The free and total MC accumulation by the bivalve *A. anatina* was not related to the concentrations of exposure during all the experiment.

VI.2. Free and total MCs kinetics and accumulation capacities of *D. polymorpha*

During this exposure, *D. polymorpha* were able to ingest filaments of *P. agardhii* continuously for 21 days, leading to an accumulation of free and bound MCs in whole individuals. Here, total MCs were detected at the first day of exposure in tissues when exposed to an equivalent of 10 and 100 µg MCs/L. For all concentrations, total MCs were still detected within tissues

after 21 days of depuration in clear water. Free MCs were detected for all concentrations from day 3 but disappeared from day 3 of depuration in mussels exposed to an equivalent of 1 µg MCs/L, from day 14 of depuration in those exposed to an equivalent of 10 µg MCs/L and were still present after 21 days of depuration in those exposed to an equivalent of 100 µg MCs/L. Regarding total and free MCs dynamics during the exposure and the depuration, a certain proportionality between the amount of toxins present in the medium and the MC concentrations in tissues seems to exist from day 3 to the end of exposure and depuration periods, with some variations over time. It is unlikely that those variations of MC concentration in tissues of *D. polymoprha* may be attributed to a decrease or a stoppage of the ingestion of filaments because: i) the number of ingested filaments per day by *D. polymorpha* increased from the first to the second and third weeks of exposure, and ii) the temporal accumulation percentage was always positive, except for one date at one exposure concentration (between day 3 and 1, at 10 µg MCs/L). Temporal variations in MC accumulation capacities of *D. polymorpha* were lower than those observed for *Anodonta anatina*. Moreover, unlike *A. anatina*, no variation in the percentage of accumulation appeared between different sampling times of each concentration nor between both concentrations at the same sampling day. This could be explained by a more stable detoxification process of MCs, temporally and over the range of exposure concentrations, in *D. polymorpha* compared to *A. anatina*. The existence of a MC-LR-glutathione conjugate in bivalves has been demonstrated with this bivalve species (Pflugmacher et al., 1998). *D. polymorpha* showed elevated sGST levels after 24h exposure to 10 or 50 µg MCs/L of a cyanobacterial crude extract, an increase still visible but not significant after 7 days of exposure (Burmester et al., 2012). Regarding the MXR phenomenon, the increase of P- glycoprotein expression in the first hour of an exposure of *D. polymorpha* to 100 µg MCs/L, and its increased activity with exposure time, support the implication of this phenomenon in the excretion of MCs (Burmester et al., 2012). The combined effect of both elevated GST activity and the implication of MXR phenomenon have lead *D. polymorpha* to be qualified as having a strong biotransformation capacity for MCs compared to other bivalves species as *Unio tumidus* (Burmester et al., 2012). This could explain why the cumulative percentage of accumulation of *D. polymorpha* was on average 126.33 times and 343.15 times inferior to the one of *A. anatina* when exposed to respectively 10 and 100 µg /L of intracellular MCs. These results suggest that *D. polymorpha* accumulated a small fraction of ingested MCs compared to *A. anatina* potentially because of its greater MC detoxification capacities, which could have been induced earlier, at a lower threshold, and more steadily than for *A. anatina*.

The increased of total and free MC concentrations measured during the depuration may represent MC detoxification by mussels. Indeed, it may be possible that previously bound MCs are metabolized and became free MCs, excreted in the medium and taken up by other mussels. An increase of the MC concentration in tissues of *M. galloprovincialis* during the depuration has also been observed by Vasconcelos, (1995), and interpreted as some MCs previously bound that have been liberated and released by mussels. Overall, bound MCs accounted for 40.6 ± 8.9 % of total MCs during the exposure and 75.2 ± 8 % during the depuration. In the gastropod *Lymnea stagnalis* exposed to *P. agardhii*, the percentage of bound MCs was also more important during the depuration (min: 89.30 ± 4.17 %; max: 91.30 ± 7.58 %) compared to the end of the exposure (min: 41.20 ± 5.58 %; max: 66.70 ± 7.38 %) (Lance et al., 2010c). This increase has been attributed to a high elimination of free MCs during the depuration, associated to a lower elimination of bound MCs that, because of their covalent binding, may occur via the renewal of Ppases or the elimination of damages cells (Lance et al., 2010c). As zebra mussels metabolize rapidly free MCs (Contardo-Jara et al., 2008), it can be hypothesized that a large proportion of free MCs is eliminated before having time to bind to PPases, thus explaining that bound MCs are less present in this species during the exposure (40.6 ±8.9 %), compared to *A. anatina* (69.9 ± 6.9 %). This can also explain why, while comparing a same tissue, *D. polymorpha* accumulates less MCs compared to *A. anatina* and why both accumulation ratios were lower compared to *A. anatina*.

VI.3. Potential use of the two bivalves as bioindicators of the presence of MC-producing cyanobacteria in fresh waters

Through the analysis of free MC content in their tissues, the bivalves *Mytilus trossulus* have been able to reveal a MC-contamination of water, when the sole analysis of water did not reveal any presence of MCs, as observed in Chambers Bay (USA) (Preece et al., 2015). The ability of bivalves to highlight the contamination of their surrounding medium indicates that they could be potentially used as bioindicators of the presence of MC-producing cyanobacteria in water. Several authors have listed the requirements that a species must fulfil to be qualified as a bioindicator (Andersen, 1999; Oehlmann and Schulte-Oehlmann, 2003; Gadzała-Kopciuch et al., 2004; Li et al., 2010; Holt and Miller, 2011). The most frequently cited criteria are that : a broad distribution, its identification and handling must be easy, the species must be in direct contact with the medium and its ecology must be known (Andersen, 1999; Gadzała-Kopciuch et al., 2004; Holt and Miller, 2011; Li et al., 2010; Oehlmann and Schulte-

Oehlmann, 2003), which are criteria shared by *A. anatina* and *D. polymorpha*. Here, one of the most important criterion is that the species should be able to respond in proportion to the degree of contamination (Holt and Miller, 2011), which means that MCs concentration within the tissues of the bivalve may reflect MC variation in the medium. This also means that the bivalve must rapidly accumulate MCs, even at low concentration in the water, and that the ingestion and accumulation must not saturate at high MCs concentrations. Thus, a sentinel species will potentially be able to reveal the presence of MCs in the water, even if the bloom is not perceptible or if MCs concentration in the water are below detection limits. Both species were able to reveal a low contamination over time: MCs were detected in digestive glands of *A. anatina* from the first day of exposure, when exposed to approximately 150 filaments/ml (density of filaments producing an equivalent of 1 µg MCs/L). This density is lower than the one used for a 24h exposure of *Unio elongatulus* to *M. aeruginosa* (2000 ± 450 cells/ml) where five out of six mussel samples contained MCs (Lauceri et al., 2017). *D. polymorpha* was able to reveal MCs presence when exposed to approximately 210 filaments/ml from the third day of exposure. However, *A. anatina* accumulated more ingested MCs compared to *D. polymorpha*, even if *D. polymorpha* were exposed to nearly four times more MCs than *A. anatina* (per milligram of soft tissue). *A. anatina* has already been pointed out to accumulate more MCs compared to *D. polymorpha* (Barda et al., 2015), the difference in accumulation has been attributed to *D. polymorpha* selective feeding and its strong MC biotransformation capacities (Barda et al., 2015). At low density of MC-producing cyanobacteria (< 1 µg MCs/L), MCs can be early detected in tissues of *A. anatina* (1 day) but, because of its early triggering of detoxification, no free MCs are detected in *D. polymorpha*. However, despite its high sensibility, MC content in digestive glands of *A. anatina* did not seem to reflect the MC concentration levels in the medium when the intracellular MC concentration exceed 1 µg MCs/L. Moreover, numerous variations of the accumulation ratios were observed over time, as opposed to *D. polymorpha*. Maybe because its strong biotransformation and excretion capacities, *D. polymorpha* accumulated later (day 3) at lower concentration of exposure, but was further able to accumulate both total and free MCs more steadily and proportionally to the concentration present in the medium during most of the exposure time. Thus, both species are complementary and their use as a bioindicator should be done according to the problematic. Indeed, *A. anatina* could potentially be used to detect rapidly low densities of MC-producing cyanobacteria. And, because of potential limited detoxification abilities, this species could also be used to detect a potential risk that occurred in the past. However, regarding *D. polymorpha*, because of its few variations of accumulation ratios and its potential

ability to reflect MCs concentration in the medium, this species could be more appropriate to estimate MC concentrations in water when the concentration is higher than 1 µg MCs/L. Moreover, because of its detoxification abilities, this model would be accurate when studying the dynamics of a MC risk in water, and reveal the end of a water contamination.

VI.4. Which MC fraction, free or total, in mussel tissues, best reveals the contamination levels and dynamic of MC-producing cyanobacteria in fresh waters?

Here we compared the concentrations of free MCs, measured by ELISA, and total MCs, measured by LC-MS/MS, after and oxidation of samples. Overall, total MCs in samples was considerably greater than free MCs, which is consistent with previous studies (Dionisio Pires et al., 2004; Lance et al., 2010c; Pham et al., 2015; Suchy and Berry, 2012; Williams et al., 1997). Thus, the analysis of total MCs allows to have a more detailed information about the MC content of a biological matrix. However, this method is time-consuming and requires a heavy equipment (LC-MS/MS) and qualified personnel. Moreover, for both species, total MCs are still present in tissues 21 days after the removal of MC-producing cyanobacteria from water. Therefore, this fraction does not represent short-term MC variations in the medium, and could potentially induce a risk overestimation if the measurement occurs until 3 weeks after the end of a cyanobacterial bloom. Regarding *A. anatina*, as free MCs are detected from the first day of exposure to 1 µg MCs/L, the ELISA analysis of *A. anatina* tissues may be suitable to early detect MCs during a biomonitoring of low cyanobacterial density. With *D. polymorpha*, the quantification of free MCs appeared to be reliable to represent the dynamic of MC-producing cyanobacteria in the medium, as a rapid and time-dependant elimination of free MCs occurred after the end of exposure. The main advantages of ELISA analyses are that the extraction is faster than the one used for total MCs, equipment are less expensive, easier to handle and based on the use of standardized kits. The main critic about ELISA is its potent ability to generate false-positive results (Gaget et al., 2017; Meriluoto et al., 2016; van Apeldoorn et al., 2007). Here, to minimise this risk we worked with duplicates of analysis and used the concentration detected in non-exposed samples as a threshold for which similar or lower values were considered null. Although, in gastropods, no overestimation of the concentration of free MCs measured by ELISA was observed compared to the measure of total MCs (Lance et al., 2010c).

VII. Conclusion

This study has showed that both *A. anatina* and *D. polymorpha* are able to accumulate free and bound MCs when exposed to densities of *P. agardhii* producing an equivalent of 1, 10 and 100 µg MCs/L. Thanks to their filtration capacities, both species can potentially be used as an integrating tool of the presence of MC–producing cyanobacteria in fresh waters. Thus, they may be more informative about the level of contamination of a waterbody than a punctual sampling of a few litres of water. The comparison of MC accumulation capacities of both species points out that *A. anatina* and *D. polymorpha* may be complementary, and that the choice of the species to use should be done according to the knowledge of the presence or absence of *D. polymorpha* in the studied area, and according to the problematic. Indeed, *A. anatina* could potentially be used to detect rapidly low densities of MC-producing cyanobacteria and to detect a potential risk that occurred in the past. *D. polymorpha* could be more appropriate to estimate MC concentration in water when the concentration is higher than 1 µg MCs/L, and would be accurate when studying the dynamics of a MC risk in water, also revealing the end of a water contamination. The evaluation of the two accumulation fractions (free or total MCs) revealed that free MCs reflected more rapidly and efficiently the environmental MC dynamics. As those experiments were carried out in controlled environments, it is necessary to go further in studying *in situ* the potent use of both bivalves as bioindicators of the presence of MC-producing cyanobacteria in waters, via a follow-up of free and total MCs in their tissues with a concurrent monitoring of MCs concentration in the phytoplanktonic biomass.

Acknowledgments

This study was supported jointly by the French EC2CO program and the PIREN-Seine funding.

VIII. References

Aldridge, D. C., P. Elliott, and G. D. Moggridge. 2006. "Microencapsulated Biobulletse for the Control of Biofouling Zebra Mussels." Environmental Science and Technology 40(3):975–79.

Andersen, a N. 1999. "My Bioindicator or Yours? Making the Selection." Journal of Insect Conservation 3(2):61–64.

van Apeldoorn, Marian E., Hans P. van Egmond, Gerrit J. A. Speijers, and Guido J. I. Bakker. 2007. "Toxins of Cyanobacteria." Molecular Nutrition & Food Research 51(1):7–60. Retrieved (http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.200600185).

Bailly, Emilie. 2013. "Étude de l'applicabilité Des POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) Au Dosage Des Résidus de Médicaments Dans Les Effluents Hospitaliers." 264.

Baqar, Mujtaba et al. 2018. "Organochlorine Contaminants in Freshwater Mussels; Occurrence, Bioaccumulation Pattern, Spatio-Temporal Distribution and Human Health Risk Assessment from the Tributaries of River Ravi, Pakistan." Human and Ecological Risk Assessment 24(5):1268–90. Retrieved (https://doi.org/10.1080/10807039.2017.1411780).

Bard, Shannon Mala. 2000. "Multixenobiotic Resistance as a Cellular Defense Mechanism in Aquatic Organisms." Aquatic Toxicology 48(4):357–89.

Barda, Ieva et al. 2015. "Bioaccumulation of Hepatotoxins – A Considerable Risk in the Latvian Environment." Environmental Pollution 196:313–20. Retrieved (http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749114004473).

Binelli, A., C. Della Torre, S. Magni, and M. Parolini. 2015. "Does Zebra Mussel (Dreissena Polymorpha) Represent the Freshwater Counterpart of Mytilus in Ecotoxicological Studies? A Critical Review." Environmental Pollution 196:386–403. Retrieved (http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749114004461).

Bontes, Babette, Antoine Verschoor, Miguel Dionisio Pires, E. Van Donk, and B. W. Ibelings. 2016. "Functional Response of Anodonta Anatina Feeding on a Green Alga and Four Strains of Cyanobacteria , Differing in Shape , Size and Toxicity Functional Response of Anodonta Anatina Feeding on a Green Alga and Four Strains of Cyanobacteria , Differing in Sha." (January).

Burmester, Vanessa, Jorge Nimptsch, and Claudia Wiegand. 2012. "Adaptation of Freshwater Mussels to Cyanobacterial Toxins: Response of the Biotransformation and Antioxidant Enzymes." Ecotoxicology and Environmental Safety 78:296–309. Retrieved (http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.11.037).

Campos, Alexandre and Vitor Vasconcelos. 2010. "Molecular Mechanisms of Microcystin Toxicity in Animal Cells." International Journal of Molecular Sciences 11(1):268–87. Retrieved (http://www.mdpi.com/1422-0067/11/1/268/).

Camusso, M., R. Balestrini, F. Muriano, and M. Mariani. 1994. "Use of Freshwater Mussel Dreissena Polymorpha to Assess Trace Metal Pollution in the Lower River Po (Italy)." Chemosphere 29(4):729–45. Retrieved

(http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0045653594900426).

Chen, Jun and Ping Xie. 2005. “Seasonal Dynamics of the Hepatotoxic Microcystins in Various Organs of Four Freshwater Bivalves from the Large Eutrophic Lake Taihu of Subtropical China and the Risk to Human Consumption.” Environmental Toxicology 20(6):572–84.

Contardo-Jara, Valeska, Stephan Pflugmacher, and Claudia Wiegand. 2008. “Multi-Xenobiotic-Resistance a Possible Explanation for the Insensitivity of Bivalves towards Cyanobacterial Toxins.” Toxicon 52(8):936–43. Retrieved September 25, 2015 (http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010108005254).

Craig, M. et al. 1996. “Molecular Mechanisms Underlying the Interaction of Motuporin and Microycystins with Type-1 and Type-2A Protein Phosphatases.” Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire 74(4):569–78.

D’Alelio, Domenico and Nico Salmaso. 2011. “Occurrence of an Uncommon Planktothrix (Cyanoprokaryota, Oscillatoriales) in a Deep Lake South of the Alps.” Phycologia 50(4):379–83. Retrieved (http://www.phycologia.org/doi/abs/10.2216/10-73.1).

Dionisio Pires, L. M. et al. 2004. “Assimilation and Depuration of Microcystin–LR by the Zebra Mussel, Dreissena Polymorpha.” Aquatic Toxicology 69(4):385–96. Retrieved (http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X04001948).

Dionisio Pires, L. Miguel et al. 2007. “Grazing on Microcystin-Producing and Microcystin-Free Phytoplankters by Different Filter-Feeders: Implications for Lake Restoration.” Aquatic Sciences 69(4):534–43. Retrieved (http://link.springer.com/10.1007/s00027-007-0916-z).

Fischer, W. J. et al. 2005. “Organic Anion Transporting Polypeptides Expressed in Liver and Brain Mediate Uptake of Microcystin.” Toxicology and Applied Pharmacology 203(3):257–63. Retrieved (http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X04004065).

Foss, Amanda J. and Mark T. Aubel. 2015. “Using the MMPB Technique to Confirm Microcystin Concentrations in Water Measured by ELISA and HPLC (UV, MS, MS/MS).” Toxicon 104:91–101. Retrieved (http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.07.332).

Gadzała-Kopciuch, R., B. Berecka, J. Bartoszewicz, and B. Buszewski. 2004. “Some Considerations about Bioindicators in Environmental Monitoring.” Polish Journal of Environmental Studies 13(5):453–62.

Gaget, Virginie, Melody Lau, Barbara Sendall, Suzanne Froscio, and Andrew R. Humpage. 2017. “Cyanotoxins: Which Detection Technique for an Optimum Risk Assessment?” Water Research 118:227–38. Retrieved (http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.025).

Graczyk, T. K., D. B. Conn, D. J. Marcogliese, H. Graczyk, and Y. De Lafontaine. 2003. “Accumulation of Human Waterborne Parasites by Zebra Mussels (Dreissena Polymorpha) and Asian Freshwater Clams (Corbicula Fluminea).” Parasitology Research 89(2):107–12.

Harada, Ken Ichi, Hideaki Murata, Zhang Qiang, Makoto Suzuki, and Fumio Kondo. 1996. “Mass Spectrometric Screening Method for Microcystins in Cyanobacteria.” Toxicon 34(6):701–10.

Hartmann, Jason T., Sebastian Beggel, Karl Auerswald, Bernhard C. Stoeckle, and Juergen Geist. 2016. “Establishing Mussel Behavior as a Biomarker in Ecotoxicology.” Aquatic Toxicology 170:279–88.

Hašler, P. and A. Poulíčková. 2003. “Diurnal Changes in Vertical Distribution and Morphology of a Natural Population of Planktothrix Agardhii (Gom.) Anagnostidis et Komárek (Cyanobacteria).” Hydrobiologia 506–509:195–201.

Hastie, C., E. Borthwick, L. Morrison, G. Codd, and P. Cohen. 2005. “Inhibition of Several Protein Phosphatases by a Non-Covalently Interacting Microcystin and a Novel Cyanobacterial Peptide, Nostocyclin.” Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1726(2):187–93. Retrieved (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16343532).

Hayes, John D., Jack U. Flanagan, and Ian R. Jowsey. 2005. “Glutathione Transferases.” Annual Review of Pharmacology and Toxicology 45(1):51–88. Retrieved (http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857).

Holt, E. a. and S. W. Miller. 2011. “How Do We Assess the Impacts of Human Activities on Natural Ecosystems ? What Can the Biota Tell Us about the Environment and Its Response to Natural Stress ? Introduction What Is a Bioindicator ?” Nature Education Knowledge 2(8):1–10.

Hudnell, H. Kenneth. 2008. “Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. Proceedings of the Interagency, International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms (ISOC-HAB).” Advances in Experimental Medicine and Biology 619(Cdc):1–912. Retrieved (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18561363).

Humbert, Jean-François and Jutta Fastner. 2017. “Ecology of Cyanobacteria.” Pp. 9–18 in Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. Retrieved (http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-3855-3).

Ibelings, B. W. et al. 2005. “Distribution of Microcystins in a Lake Foodweb: No Evidence for Biomagnification.” Microbial Ecology 49(1):487–500.

Juhel, G. et al. 2006. “Impacts of Microcystins on the Feeding Behaviour and Energy Balance of Zebra Mussels, Dreissena Polymorpha: A Bioenergetics Approach.” Aquatic Toxicology 79(4):391–400. Retrieved (http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X06002955).

Juhel, Guillaume et al. 2006. “Pseudodiarrhoea in Zebra Mussels Dreissena Polymorpha (Pallas) Exposed to Microcystins.” The Journal of Experimental Biology 209(Pt 5):810–16. Retrieved (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16481570).

Kim, R. B. 2003. “Organic Anion-Transporting Polypeptide (OATP) Transporter Family and Drug Disposition.” European Journal of Clinical Investigation 33(s2):1–5. Retrieved (http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2362.33.s2.5.x).

Kohoutek, Jiří, Blahoslav Maršálek, and Luděk Bláha. 2010. “Evaluation of the Novel Passive Sampler for Cyanobacterial Toxins Microcystins under Various Conditions Including Field Sampling.” Analytical and Bioanalytical Chemistry 397(2):823–28.

Kondo, Fumio et al. 1992. “Formation, Characterization, and Toxicity of the Glutathione and

Cysteine Conjugates of Toxic Heptapeptide Microcystins." Chemical Research in Toxicology 5(5):591–96.

Kudela, Raphael M. 2011. "Characterization and Deployment of Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT) Resin for Monitoring of Microcystins in Fresh and Saltwater." Harmful Algae 11:117–25. Retrieved (http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2011.08.006).

Lance, Emilie, Celine Josso, et al. 2010. "Histopathology and Microcystin Distribution in Lymnaea Stagnalis (Gastropoda) Following Toxic Cyanobacterial or Dissolved Microcystin-LR Exposure." Aquatic Toxicology 98:211–20.

Lance, Emilie, Luc Brient, Myriam Bormans, and Claudia Gérard. 2006. "Interactions between Cyanobacteria and Gastropods." Aquatic Toxicology 79(2):140–48. Retrieved (http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X06002438).

Lance, Emilie, Emilie Bugajny, Myriam Bormans, and Claudia Ge. 2008. "Consumption of Toxic Cyanobacteria by Potamopyrgus Antipodarum (Gastropoda , Prosobranchia) and Consequences on Life Traits and Microcystin Accumulation." 7:464–72.

Lance, Emilie, Milla Riina Neffling, Claudia Gérard, Jussi Meriluoto, and Myriam Bormans. 2010. "Accumulation of Free and Covalently Bound Microcystins in Tissues of Lymnaea Stagnalis (Gastropoda) Following Toxic Cyanobacteria or Dissolved Microcystin-LR Exposure." Environmental Pollution 158(3):674–80.

Lauceri, Rosaria et al. 2017. "Coupling a Bio-Accumulator Organism and MALDI-TOF MS: An Early Warning Detection System for Microcystins in Water Bodies." Journal of Applied Phycology 29(6):2979–88.

Lepoutre, Alexandra et al. 2018. "Genotoxic and Cytotoxic Effects on the Immune Cells of the Freshwater Bivalve Dreissena Polymorpha Exposed to the Environmental Neurotoxin BMAA." Toxins 10(3):106. Retrieved (http://www.mdpi.com/2072-6651/10/3/106).

Li, Li, Binghui Zheng, and Lusan Liu. 2010. "Biomonitoring and Bioindicators Used for River Ecosystems : Definitions , Approaches and Trends." 2:1510–24.

Lopes-Lima, M. 2014. "Anodonta Anatina." The IUCN Red List of Threatened Species. Retrieved February 12, 2016 (http://www.iucnredlist.org/details/155667/0).

Lopes-Lima, Manuel et al. 2017. "Conservation Status of Freshwater Mussels in Europe: State of the Art and Future Challenges." Biological Reviews 92(1):572–607. Retrieved (http://doi.wiley.com/10.1111/brv.12244).

Ludyanskiy, Michael L., Derek McDonald, and David MacNeill. 1993. "Impact of the Zebra Mussel, a Bivalve Invader." BioScience 43(8):533–44. Retrieved (https://academic.oup.com/bioscience/article-lookup/doi/10.2307/1311948).

MacKintosh, Robert W. et al. 1995. "The Cyanobacterial Toxin Microcystin Binds Covalently to Cysteine-273 on Protein Phosphatase 1." FEBS Letters 371(3):236–40.

Manly, Ralph and William Owen George. 1977. "The Occurrence of Some Heavy Metals in Populations of the Freshwater Mussel Anodonta Anatina (L.) from the River Thames." Environmental Pollution (1970) 14(2):139–54.

Manning, Schonna R. and David R. Nobles. 2017. "Impact of Global Warming on Water

Toxicity: Cyanotoxins." Current Opinion in Food Science 18:14–20. Retrieved (http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2017.09.013).

Maynes, Jason T. et al. 2006. "Crystal Structures of Protein Phosphatase-1 Bound to Motuporin and Dihydromicrocystin-LA: Elucidation of the Mechanism of Enzyme Inhibition by Cyanobacterial Toxins." Journal of Molecular Biology 356(1):111–20. Retrieved (http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283605014051).

Meriluoto, Jussi, Lisa Spoof, and G. A. (Geoffrey A. .. Codd. 2016. Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. edited by J. Meriluoto, L. Spoof, and G. A. Codd. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. Retrieved (http://doi.wiley.com/10.1002/9781119068761).

Metcalf, J. S., P. Hyenstrand, K. A. Beattie, and G. A. Codd. 2000. "Effects of Physicochemical Variables and Cyanobacterial Extracts on the Immunoassay of Microcystin-LR by Two ELISA Kits." Journal of Applied Microbiology 89(3):532–38.

Neffling, Milla-Riina, Emilie Lance, and Jussi Meriluoto. 2010. "Detection of Free and Covalently Bound Microcystins in Animal Tissues by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry." Environmental Pollution 158(3):948–52. Retrieved (http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2009.10.023).

Oehlmann, Jörg and Ulrike Schulte-Oehlmann. 2003. "Chapter 17 Molluscs as Bioindicators." Trace Metals and Other Contaminants in the Environment 6(C):577–635.

Paerl, Hans W. and Timothy G. Otten. 2013. "Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls." Microbial Ecology 65(4):995–1010. Retrieved (http://link.springer.com/10.1007/s00248-012-0159-y).

Paldavičienė, Aistė, Anastasija Zaiko, Hanna Mazur-Marzec, and Artūras Razinkovas-Baziukas. 2015. "Bioaccumulation of Microcystins in Invasive Bivalves: A Case Study from the Boreal Lagoon Ecosystem." Oceanologia 57(1):93–101. Retrieved (http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0078323414000104).

Pereira, Susana R., Vítor M. Vasconcelos, and Agostinho Antunes. 2011. "The Phosphoprotein Phosphatase Family of Ser/Thr Phosphatases as Principal Targets of Naturally Occurring Toxins." Critical Reviews in Toxicology 41(2):83–110. Retrieved (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21288162).

Pflugmacher, S. et al. 1998. "Identification of an Enzymatically Formed Glutathione Conjugate of the Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin-LR: The First Step of Detoxication." Biochimica et Biophysica Acta 1425(3):527–33. Retrieved (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9838216).

Pham, Thanh Luu, Kazuya Shimizu, Thanh Son Dao, Lan Chi Hong-Do, and Motoo Utsumi. 2015. "Microcystin Uptake and Biochemical Responses in the Freshwater Clam Corbicula Leana P. Exposed to Toxic and Non-Toxic Microcystis Aeruginosa: Evidence of Tolerance to Cyanotoxins." Toxicology Reports 2:88–98.

Pobel, David, Joël Robin, and Jean François Humbert. 2011. "Influence of Sampling Strategies on the Monitoring of Cyanobacteria in Shallow Lakes: Lessons from a Case Study in France." Water Research 45(3):1005–14.

Preece, E. P., Barry C. Moore, and F. Joan Hardy. 2015. “Ecotoxicology and Environmental Safety Transfer of Microcystin from Freshwater Lakes to Puget Sound , WA and Toxin Accumulation in Marine Mussels (Mytilus Trossulus).” Ecotoxicology and Environmental Safety 122:98–105. Retrieved (http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.07.013).

Sanan, Toby T. 2016. “Measurement of " Total " Microcystins Using the MMPB Method , and Application to HAB Impacted Surface Waters.” edited by O. A. Conference. Cincinnati. Retrieved (https://cdn.ymaws.com/oawwa.org/resource/collection/8CF5E9CB-9CEA-4B30-A02F-D2A811CA3C0B/LC-MS-MS with MMPB.pdf).

Sano, T., K. Nohara, F. Shiraishi, and K. Kaya. 1992. “A Method for Micro-Determination of Total Microcystin Content in Waterblooms of Cyanobacteria (Blue-Green Algae).” International Journal of Environmental Analytical Chemistry 49(3):163–70.

Słodkowicz-Kowalska, Anna, Anna C. Majewska, Piotr Rzymski, Łukasz Skrzypczak, and Anna Werner. 2015. “Human Waterborne Protozoan Parasites in Freshwater Bivalves (Anodonta Anatina and Unio Tumidus) as Potential Indicators of Fecal Pollution in Urban Reservoir” edited by R. D. Gulati, E. Lammens, N. De Pauw, and E. Van Donk. Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters 51:32–36. Retrieved (http://dx.doi.org/10.1016/j.limno.2014.12.001).

Spoof, Lisa and Catherine Arnaud. 2017. “Appendix 3: Tables of Microcystins and Nodularins.” Pp. 526–37 in Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis.

Strayer, David L. 2008. Freshwater Mussel Ecology. Retrieved (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003161%5Cnhttp://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/cid/cir991%5Cnhttp://www.scielo.cl/pdf/udecada/v15n26/art06.pdf%5Cnhttp://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84861150233&partnerID=tZOtx3y1).

Su, Lei et al. 2018. “Using the Asian Clam as an Indicator of Microplastic Pollution in Freshwater Ecosystems.” Environmental Pollution 234:347–55. Retrieved (https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.075).

Suchy, Patricia and John Berry. 2012. “Detection of Total Microcystin in Fish Tissues Based on Lemieux Oxidation and Recovery of 2-Methyl-3-Methoxy-4-Phenylbutanoic Acid (MMPB) by Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography-Mass Spectrometry (SPME-GC/MS).” International Journal of Environmental Analytical Chemistry 92(12):1443–56.

Swhalb, Astrid and Martin Pusch. 2007. “Horizontal and Vertical Movements of Unionid Mussels in a Lowland River.” Journal of the North American Benthological Society 26(2):261–72. Retrieved (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/684).

Vasconcelos, Vitor M. 1995. “Uptake and Depuration of the Heptapeptide Toxin Microcystin-LR in Mytilus Galloprovincialis.” Aquatic Toxicology 32(2–3):227–37.

Weirich, Chelsea A. and Todd R. Miller. 2014. “Freshwater Harmful Algal Blooms: Toxins and Children’s Health.” Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care 44(1):2–24. Retrieved (http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1538544213001211).

Welker, Martin, Jutta Fastner, Marcel Erhard, and Hans Von Döhren. 2002. “Applications of MALDI-TOF MS Analysis in Cyanotoxin Research.” Environmental Toxicology.

White, Jeffrey D. and Orlando Sarnelle. 2014. “Size-Structured Vulnerability of the Colonial Cyanobacterium, Microcystis Aeruginosa, to Grazing by Zebra Mussels (Dreissena Polymorpha).” Freshwater Biology 59(3):514–25.

Williams, David E. et al. 1997. “Bioaccumulation and Clearance of Microcystins from Salt Water Mussels, Mytilus Edulis, and in Vivo Evidence for Covalently Bound Microcystins in Mussel Tissues.” Toxicon 35(11):1617–25.

Winkel, E. H. TEN and C. Davids. 1982. “Food Selection by Dreissena Polymorpha Pallas (Mollusca: Bivalvia).” Freshwater Biology 12(6):553–58. Retrieved (biosis:PREV198375080877).

Woller-Skar, Megan. 2009. “Low-Nutrient Lakes and the Subsequent Production and Fate Of.” College of Bowling Green State University.

Wood, S. A. et al. 2006. “Changes in Concentrations of Microcystins in Rainbow Trout, Freshwater Mussels, and Cyanobacteria in Lakes Rotoiti and Rotoehu.” Environmental Toxicology 21(3):205–22. Retrieved (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18767141).

Yokoyama, Atsushi and Ho Dong Park. 2002. “Mechanism and Prediction for Contamination of Freshwater Bivalves (Unionidae) with the Cyanobacterial Toxin Microcystin in Hypereutrophic Lake Suwa, Japan.” Environmental Toxicology 17(5):424–33.

Zuykov, Michael, Emilien Pelletier, and David A. T. Harper. 2013. “Bivalve Mollusks in Metal Pollution Studies: From Bioaccumulation to Biomonitoring.” Chemosphere 93(2):201–8. Retrieved (http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.001).

Chapitre V : Evaluation in situ de la pertinence de *D. polymorpha* et *A. anatina* comme outils de biosurveillance des MCs et de la BMAA en eau douce

I. Synthèse des travaux menés

Afin de confronter les résultats acquis en laboratoire aux conditions environnementales, les deux bivalves ont été encagés après une période de stabulation en laboratoire, dans trois stations du lac de l'Ailette (Aisne), contaminé annuellement par les cyanobactéries en période estivale. La contamination en cyanobactéries peut avoir un impact économique et sanitaire, car ce lac abrite des activités touristiques (baignade, diverses activités nautiques et pêche). Ce lac a connu en mai 2014 des efflorescences de cyanobactéries ayant entrainé une interdiction de toute activité nautique et une restriction de la pêche. En 2015, plusieurs proliférations de cyanobactéries ont eu lieu, dont une ayant engendré une forte mortalité de poisson (500 kg de poissons morts en 8 à 10 jours). La présence de *D. polymorpha* (espèce invasive) sur les sites est avérée. L'étude a été menée lors de deux étés consécutifs, sur une période de cinq mois lors de la première campagne (prélèvements mensuels de juillet à novembre) et sur une période d'un mois lors de la seconde (prélèvements hebdomadaires en août). Lors de cette étude, les concentrations en MCs libres et totales ainsi que la BMAA totale ont été mesurées dans les glandes digestives d'*A. anatina* et dans les individus entiers de *D. polymorpha*. Chaque prélèvement de bivalves était accompagné d'un prélèvement d'eau afin de pouvoir comparer les niveaux d'accumulation des MCs par les deux modèles et la concentration en MCs intracellulaires mesurée dans la biomasse phytoplanctonique filtrée. En parallèle de ces mesures, une étude de la composition des communautés phytoplanctoniques a été menée (collaboration L. Brient, UMR ECOBIO, Université de Rennes 1) afin de caractériser la présence des genres de cyanobactéries potentiellement producteurs de MCs, et de confronter les résultats des niveaux d'accumulation des MCs par les bivalves avec ces relevés phytoplanctoniques.

La présence de cyanobactéries productrices de MCs a été observée lors des deux campagnes à l'exception du site Bièvre en 2017 pour lequel seul des cyanobactéries non-productrices de MCs ont été observées. En raison de la présence de nombreuses espèces de pico-cyanobactéries telles qu'*Aphanocpasa* sp. et *Merismopedia* sp., l'estimation des densités de cyanobactéries n'est que faiblement corréllée au nieau de contamination de l'eau. En effet, même si les espèces de petite taille sont nombreuses dans un échantillon d'eau, elles peuivent ne contribuer qu'à une fraction mineure de la biomasse totale, d'où la pertinence du calcul du biovolume.

L'analyse des concentrations de MCs intracellulaires dans les échantillons de phytoplancton à mis en évidence une faible contamination du milieu, entre 0 et 1,07 ± 0,06 µg MCs/L, pendant les deux campagnes. Cependant, même en présence d'une faible contamination environnementale, les deux bivalves ont pu révéler la présence de cyanobactéries produisant des MC dans l'eau, par une accumulation de MCs dans leurs tissus. De plus, ils ont intégré temporellement la présence de cyanobactéries productrices de MCs dans la colonne d'eau, lorsque des échantillons d'eau ponctuels n'ont pas révélé de contamination. En effet, en août sur le site de la Bièvre, aucune cyanobactérie productrice de MCs ni de MCs intracellulaire n'ont été détectées dans l'eau. Cependant, les MCs libres et totales ont été mesurées dans les deux modèles bioindicateurs. Ce phénomène peut s'expliquer par l'apparition possible d'une prolifération de cyanobactéries entre deux dates de prélèvements d'eau intégrée par les bivalves. De plus, les concentrations de MCs libres et totales mesurées dans les individus encagés (de 0 à 0,29 µg MCs libres/g DW et de 0 à 0,7 µg MCs totales/g chez *D. polymorpha*; de 0 à 1,78 µg MCs libres/g DW et de 0 à 7,88 µg total MCs/g dans les glandes digestives d'*A. anatina*) sont similaires à celles mesurées chez les deux bivalves exposés en laboratoire à une densité de cyanobactéries produisant un équivalent de 1 µg de MCs/L (de 0 à 0,27 µg MCs libres/g DW et de 0 à 1,26 µg MCs totales/g chez *D. polymorpha ;* de 0,10 à 12,01 µg MCs libres/g DW et de 0,98 à 23,38 µg MCs totales/g chez *A. anatina*). Ces observations sont en accord avec les concentrations de MCs intracellulaires observées dans les trois sites étudiés, ne dépassant pas 1 µg de MCs/L.

Comme observé au laboratoire, quels que soient les sites et les années, *A. anatina* a accumulé plus de MC libres et totales que *D. polymorpha*. De plus, à certaines dates, des MC libres ont été détectées dans les glandes digestives d'*A. Anatina*, et non dans le corps entier de *D. polymorpha*. Ainsi, il semble qu'*A. Anatina* pourrait être plus sensible que *D. polymorpha* pour détecter les MCs lorsque la densité des producteurs et la concentration dans l'eau sont faibles (<1 µg /L).

Dans l'ensemble, les concentrations en MCs totales dans les tissus de bivalves étaient nettement supérieures à celles des MC libres. Cette différence pourrait être attribuée au taux d'élimination des MC libres qui serait plus élevé que pour les MCs liées à des protéines. En effet, les MC libres peuvent être éliminés par l'activation de l'enzyme de biotransformation glutathion-S-transférase (GST) (Pflugmacher et al., 1998). Par conséquent, les MCs libres peuvent être éliminées plus rapidement que les MCs liées, dont élimination est probablement

liée à la vitesse de renouvellement des protéines auxquelles elles sont liées de manière covalente. L'analyse des MC totales dans les tissus de bivalves peut sembler plus appropriée pour analyser la présence de très faibles densités de cyanobactéries produisant des MCs dans l'eau. Mais comme leur élimination des tissus est plus lente que celle des MCs libres, l'analyse des MCs totales peut ne pas être appropriée afin d'estimer la dynamique, en termes de présence et de disparition, des cyanobactéries productrices de MC dans l'eau. L'analyse des MCs totales peut convenir en écotoxicologie pour évaluer la contamination subie par les bivalves mais elle repose sur l'utilisation d'équipements coûteux (LC-MS/MS), nécessite du personnel qualifié et l'étape d'extraction est assez longue. Comme ces inconvénients ne s'appliquent pas aux tests ELISA, cette méthode est de plus en plus appliquée. La principale critique concernant les tests ELISA est leur capacité à induire des résultats faussement positifs, et potentiellement une surestimation de la concentration en MCs dans des échantillons (Meriluoto et al., 2016), ce qui n'a pas été observé dans des tissus de gastéropode par comparaison de résultats obtenus pas Elisa et par LC-MS/MS sur les mêmes échantillons (Lance et al., 2010). La détermination d'un seuil de détection à partir duquel le signal mesuré est considéré comme correspondant à une réelle accumulation a été réalisé avec des matrices de bivalves non contaminés, permettant de réduire le risque de sur-estimation. Lors de cette étude, aucune MC libre n'a été trouvée dans les échantillons lorsque les MC totales n'étaient pas détectées, ce qui démontre l'absence de faux positifs avec le dosage des MCs libres par test Elisa.

Cette étude a montré qu'*A. Anatina* et *D. polymorpha* accumulaient des MC libres et totales *in situ* lorsque les concentrations de MCs- intracellulaires étaient inférieures à 1 µg de MCs/L dans l'eau. Les résultats suggèrent que les deux espèces de bivalves sont complémentaires pour une démarche de biosurveillance. En effet, la mesure des MCs totlaes dans les glandes digestives d' *A. anatina* peut convenir pour évaluer la présence de cyanobactéries produisant des MCs à de très faibles densités (moins de 1 µg / L de MC intracellulaires). Du fait que *D. polymorpha* possède probablement un système de détoxication des MCs plus efficace, la quantification des MCs libres dans la totalité des individus peut être utile pour révéler la dynamique de la contamination environnementale par les cyanobactéries productrices de MCs, en termes de prolifération et de fin des proliférations.

Can freshwater bivalves *Anodonta anatina* and *Dreissena polymorpha* be used as bioindicators of the presence of microcystin-producing cyanobacteria in fresh waters? A case-study in a French Lake

Lepoutre A.[1], Errard B. [1], Grillot T. [1], Keiffer M. [1], Bastien F. [1], Mineaud E. [2], Brient L. [2], Geffard A. and Lance E. [1]

1. Université de Reims Champagne-Ardenne UMR-I 02 INERIS-URCA-ULH SEBIO Unité Stress Environnementaux et, BIOsurveillance des milieux aquatiques UFR Sciences Exactes et Naturelles, Campus du Moulin de la Housse, BP 1039 51687 Reims cedex, France

2. UMR ECOBIO, Université de Rennes 1, 35042 Rennes cedex, France

II. Abstract

The hepatotoxins microcystins (MCs) produced by cyanobacteria are a potential threat to aquatic ecosystems and human health. However, because of spatio-temporal variations of their proliferations, the estimation of the level of water contamination by MC-producing cyanobacteria can be challenging. We previously performed laboratory experiments to assess the pertinence of integrative tools such as freshwater bivalves as bioindicators of the levels and dynamics of water contamination by MC-producers. As MCs in tissues of bivalves may either be free or bound to proteins, two MC-fraction can be extracted and analysed: free (unbound MCs) and total MCs (free and bound MCs). The quantification of each fraction in bivalve tissues may bring different information in a biomonitoring context: free MCs, eliminated faster than bound MCs, may inform about the level and dynamic of MCs in fresh waters. However, the sole analysis of free MCs may underestimate the concentration of MCs in samples, which can be assessed through the measurement of total MCs. Our previous laboratory studies on whole *Dreissena polymorpha* and digestive glands of *Anodonta anatina* confirmed that the measurement of free MCs in bivalve tissues was more appropriate than the one of total MCs to represent the dynamic of a water contamination by MC-producing cyanobacteria. Here, we confirmed those results *in situ* via a two-season transplantation of mussels into a lake yearly undergoing cyanobacterial blooms. The analysis of phytoplankton communities was combined with the measurement of intracellular MC concentrations in phytoplanktonic sampling and in bivalves. Results showed that the measurement of total MCs in digestive glands of *A. anatina* was suitable to assess the presence of intracellular MCs when environmental concentrations were below 1 µg MCs/L. However, for environmental

concentrations exceeding 1 µg MCs/L, the measurement of free MCs in *D. polymorpha* could inform about the dynamics, in terms of presence and disappearance, of MC-producing cyanobacteria in fresh waters.

III. Introduction

Because their proliferations lead to ecological, economical disturbances, and creates a potential risk to human health, freshwater cyanobacteria are a source of growing concern (Chorus and Bartram, 1999; Hans W. Paerl et al., 2001). Part of this threat lies in their ability to produce cyanotoxins. The most frequent cyanotoxins found in the environment are the hepatotoxins microcystins (MCs) (Meriluoto et al., 2016), mostly produced by genera *Anabaena*, *Dolichospermum*, *Leptolyngbya*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Phormidium*, *Planktothrix* and *Synechococcus* (Meriluoto et al., 2016). MCs are mostly intracellular during cyanobacterial proliferations, but may be released and dissolved or adsorbed on particles in the medium during the cyanobacterial senescence (Watanabe et al., 1992). Up to date, 246 variants of this heptapeptide are known, differing by two of the seven aminoacids (Spoof and Arnaud, 2017). Freshwater organisms, especially molluscs, are known to accumulate MC mainly after the ingestion of MC-producing cyanobacteria, and to a lesser extent through the ingestion or the filtration of dissolved toxins (Gkelis et al., 2006; Ibelings and Chorus, 2007; Lance et al., 2010c, 2008; Ferrão-Filho and Kozlowsky-Suzuki, 2011; Woller-Skar et al., 2015). Once ingested, MC distribution in tissues is dependent on the presence of organic-anion-transporting polypeptide (OATPS), that transport MCs into cells. OATP are commonly expressed in the gastrointestinal tract, liver, kidney and in the blood-brain barrier (Eriksson et al., 1990; ; Kim, 2003Fischer et al., 2005). In cells, MCs interact with proteins phosphatases (PPases) during a two-step mechanism (Campos and Vasconcelos, 2010): first through a reversible binding and, after few hours, through of a covalent binding (Hastie et al., 2005; Maynes et al., 2006; Campos and Vasconcelos, 2010), both inactivating PPases (MacKintosh et al., 1995; Craig et al., 1996; Pereira et al., 2011). Two fractions of MC accumulation can therefore be quantified in organisms: i) 'free MCs', unbound in tissues, and ii) 'total MCs', encompassing free and protein-bound MCs. The MCs are known to increase the phosphorylation of cytoskeletal proteins, impairing the structure of cytoskeleton, which induce the loss of affected cells 'shape and can lead to haemorrhaging and death (van Apeldoorn et al., 2007; Campos and Vasconcelos, 2010).

Traditional survey of cyanobacteria and cyanotoxins are based on visual monitoring coupled with water sampling, cell count and sometimes the quantification of intracellular MCs (*i.e*., in the phytoplankton biomass). The recommended sampling frequency is twice-monthly, and weekly in case of a cyanobacterial bloom (Pobel et al., 2011; Meriluoto et al., 2016). However, an intracellular MC quantification in a punctual sampling of phytoplankton biomass may not be representative of the spatial and temporal patterns in water contamination. Indeed, cyanobacteria are not homogenously distributed in water, and cyanobacterial blooms have been described as temporally (e.g., rapid proliferations and decays) and spatially (i.e., vertical and horizontal migrations) 'patchy' (Kanoshina et al., 2003; Deng et al., 2016). Therefore, there is a need to develop integrative samplers to monitor MCs and the presence of its producers. For instance, passive integrators like Polar Organic Compound Integrative Samplers (POCIS) with polycarbonates membranes (Kohoutek et al., 2010) or Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT) with DIAION HP20 resin (Kudela, 2011) have been developed to follow-up dissolved MCs in freshwater. However, rapid clogging and saturation phenomenon have been shown to influence the accumulation kinetics of these passive integrators (Bailly, 2013). Moreover, POCIS and SPATT only integrate dissolved compounds and are not be suitable to highlight the presence of intracellular MCs. Cyanobacterial densities can also be estimated with spectrofluorometric probes (Simis et al., 2005; Brient et al., 2008), that measures phycocyanin fluorescence, a pigment synthetized solely by cyanobacteria (Simis et al., 2005). However, the measurement of phycocyanin does not provides information about the cyanotoxins produced (Brient et al., 2008).

As filter-feeders with high filtration rates and accumulation capacities, bivalves have been used as integrators of various pollutants (*e.g.,* metals, microplastics, organochlorine contaminants and parasites) in biomonitoring studies (Camusso et al., 1994; Graczyk et al., 2003; Zuykov et al., 2013; Su et al., 2018; Baqar et al., 2018;). Bivalves are known to accumulate free and total MCs (Amorim and Vasconcelos, 1999; Dionisio Pires et al., 2004 ; Miller et al., 2010; Lauceri et al., 2017), and have been able to reveal the presence of intracellular MCs in their medium, when the sole analysis of water did not reveal the presence of MC-producing cyanobacteria (Preece et al., 2015). The freshwater bivalves *Anodonta anatina*, *Dreissena polymorpha* and *Unio elongatulus* have been proposed to detect the presence of MC-producing cyanobacteria in water (Lauceri et al., 2017; Lepoutre et al., Chap IV.; Paldavičienė et al., 2015). *D. polymorpha* is a sessile bivalve, able to filter particles from 0.4 µm (White and Sarnelle, 2014) to 200 µm (Aldridge et al., 2006) or even 750 µm after 16

h of starvation (Winkel and Davids, 1982). Its filtering capacities are ranging from 5 to 400 mL/mussel/hour (Binelli et al., 2015). *D. polymorpha* was able to ingest colonial (*Microcystis aeruginosa*) and filamentous (*Planktothrix agardhii*) MC-producing cyanobacteria (G. Juhel et al., 2006; White and Sarnelle, 2014), and subsequently accumulated MCs. However, *D. polymorpha* is an invasive species, native from the Ponto-Caspian region and nowadays widespread in the northern hemisphere (Ludyanskiy et al., 1993), and cannot be used in non-colonized waters. This restriction does not apply to *Anodonta anatina*, present throughout Europe (Lopes-Lima et al., 2017), and classified as least concern by the IUCN (Lopes-Lima, 2014), although some populations are declining (Lopes-Lima et al., 2017). *A. anatina* is vagile (Swhalb and Pusch, 2007) with filtering capacities ranging from 625 to 1875 mL/mussel/hour (Strayer, 2008). There is currently no data about *A. anatina* favoured size range of ingested particles (Dionisio Pires et al., 2007), but this species has been shown to ingest the filamentous cyanobacteria *P. agardhii*, with filaments measuring up to 830.8 ± 80.1 µm (Bontes et al., 2016).

We recently laboratory investigated the potent use of *A. anatina* and *D. polymorpha* as bioindicators of the presence of MC–producing cyanobacteria in fresh waters, through a 21-day exposure to various densities of a MC-producing strain of *P. agardhii*, followed by 21 days of depuration. The ingestion rate of cyanobacteria by bivalves and the free and total MCs in their tissues were quantified along the exposure and depuration periods (Lepoutre et al., chap 4). *A. anatina* accumulated free and total MCs in the digestive gland, from the first day and from 1 µg/L of intracellular MCs in the medium, but its accumulation was not proportional to exposure concentrations, and MC elimination was slow after the end of exposure. The free MC content in whole *D. polymorpha* was quantified later, after 3 days of exposure to 1 µg/L of intracellular MCs, but was further correlated to exposure concentrations (10 and 100 µg/L of intracellular MCs), and rapidly eliminated during the depuration. Therefore, both species could potentially be used as bioindicators: i) *A. anatina* in order to detect rapidly low densities of MC-producing cyanobacteria and to highlight a previous occurrence, and ii) *D. polymorpha* to estimate an intracellular MC concentration level in water and to study its dynamics (proliferation, and end of proliferation).

The choice of the accumulation fraction (free or total MCs) to follow in a biosurvey is dependent on its dynamic in bivalve tissues, and on the facility and reliability of its analysis. At very low environmental contamination level (1 µg/L), free MCs in *D. polymorpha* tissues

were detected only after 3 days, whereas total MCs were detected at the first day of exposure. However, free MCs further reflected more rapidly and efficiently the environmental MC dynamics for both species, in relation with their rapid elimination from tissues after the exposure. Free MCs are commonly analysed with the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA test) (Meriluoto et al., 2016), which is sensitive (Metcalf et al., 2000), easy to use and to interpret (Gaget et al., 2017). It main disadvantage is the false positives it may generate at low contamination levels (Meriluoto et al., 2016), although not found in gastropods (Lance et al., 2010). The total MC fraction is indirectly measured through a quantification by LC-MS/MS of a portion of the MC heptapeptide, non-involved in the binding to proteins, called MMPB (2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid), and released either by ozonolysis (Harada et al., 1996) or Lemieux oxidation (Meriluoto et al., 2016; Neffling et al., 2010; Sano et al., 1992). The quantification of total MCs in biological matrix includes all MCs variants and all accumulation fractions (free and bound), but is time consuming and relies on expensive equipment. The total MC fraction encompasses the protein-bound fraction that may be predominant, but is slowly eliminated from tissues (Lance et al., 2010), including 21 days after the end of our previous exposure (Lepoutre et al., Chap 4). Therefore, the quantification of total MC in bivalve tissues may be a more sensitive tool to detect MC-producing cyanobacteria in waters, but may less faithfully represent the dynamic of cyanobacteria in the medium.
To compare the laboratory results we obtained to environmental conditions, both *A. anatina* and *D. polymorpha* were caged in the Ailette lake (France), an artificial reservoir built in the 1980s for recreational activities that is undergoing yearly cyanobacteria proliferations. Three stations presenting different hydrology and cyanobacteria proliferations intensities were investigated monthly in 2016 (from July to November) and weekly in August 2017. Along with mussel sampling, the intracellular MC concentration (in the phytoplankton biomass) was measured, and the structure of the phytoplankton community was analysed bi-weekly.

IV. Materials and methods

IV.1. Biological materials

IV.1.1. Anodonta anatina

Mussels of 6.5 ± 1 cm, provided by Univers aquatique (Univers aquatique, Sartrouville, France), were placed by groups of 50 at 14 ± 2°C in aerated tanks containing 15 L of Cristalline® source water (Saint Yorre, France), with a cycle of 12 h of light and 12 h of darkness. During the acclimation, animals were fed twice a week with approximately 3,7 x 10^7 cells of *Chlorella*

vulgaris / individual / day (Greensea, Mèze, France). Algal density was measured with an optic microscope (Primovert, Zeiss, Oberkochen, Germany) and KOVA® slides (Kova slide, VWR, Fontenay-sous-Bois, France).

IV.1.2. Dreissena polymorpha

Mussels were collected at the Lac-du-Der-Chantecoq (48°36'07.7"N; 4°44'37.0"E). Their acclimation was done as describe in Lepoutre et al. (2018), Annexe 1. As size is known to have an impact on filtration rate (Lei et al., 1996), mussels were sorted according to their size (2 ± 0.3 cm).

IV.2. Sites characterization and caging

The lake Ailette (Figure 32) is a large (132 Ha) and shallow (mean depth of 2 m) artificial reservoir located in France. It possesses two upstream branches: the Ailette (24,3 Ha, mean depth of 2 m) and Bièvre (87,4 Ha, mean depth of 1 m), each fed by a river possessing the same name. The evacuation of water is done through a dam leading to the river Aisne. Up to now, during the dry season both branches are hydrologically isolated from the main part of the lake, promoting water stagnation. Both branches are undergoing important fishing activities, a practise known to enhance eutrophication (Arlinghaus and Mehner, 2003; Arlinghaus and Niesar, 2005). Fishing is prohibited in the main lake. An important cyanobacterial bloom associated to a major fish mortality (500 kg of fishes) has taken place in 2015 in the Ailette branch.

D. polymorpha and *A. anatina* were distributed in 3 mm mesh polyethylene cages (7 x 18 cm) per groups of 16 and 5 mussels respectively. The presence of *D. polymorpha* in the sites has been verified prior to this study. To assess the use of bivalves as bioindicators of the presence of MC-producing cyanobacteria, caging sites were chosen to study different levels of cyanobacterial contamination. To compare MC accumulation capacities of both species, all cages were immersed at a similar depth of 1 meter. Both sampling campaigns included the summer period, corresponding to cyanobacteria development in fresh waters. In 2016, mussels were transplanted in May on three locations: the Ailette branch (AI) (49°27'39.6"N 3°41'56.5"E), the Bièvre branch (BI) (49°28'29.5"N 3°40'45.8"E), and in the main lake ("lake center", LC) where cages were placed on a buoy. For reasons of site accessibility, sampling

occurred in July, August and September in AI and LC, and from August to November in BI. In 2017, mussels were transplanted on July-31st on BI (the same location as 2016) and AI (49°27'41.5"N 3°41'48.6"E), and sampling occurred weekly in August. Both years, simultaneously to mussels, water was sampled at cages 'depth to determine intracellular-MC concentrations in the phytoplankton biomass and to analyse the structure of the phytoplankton community.

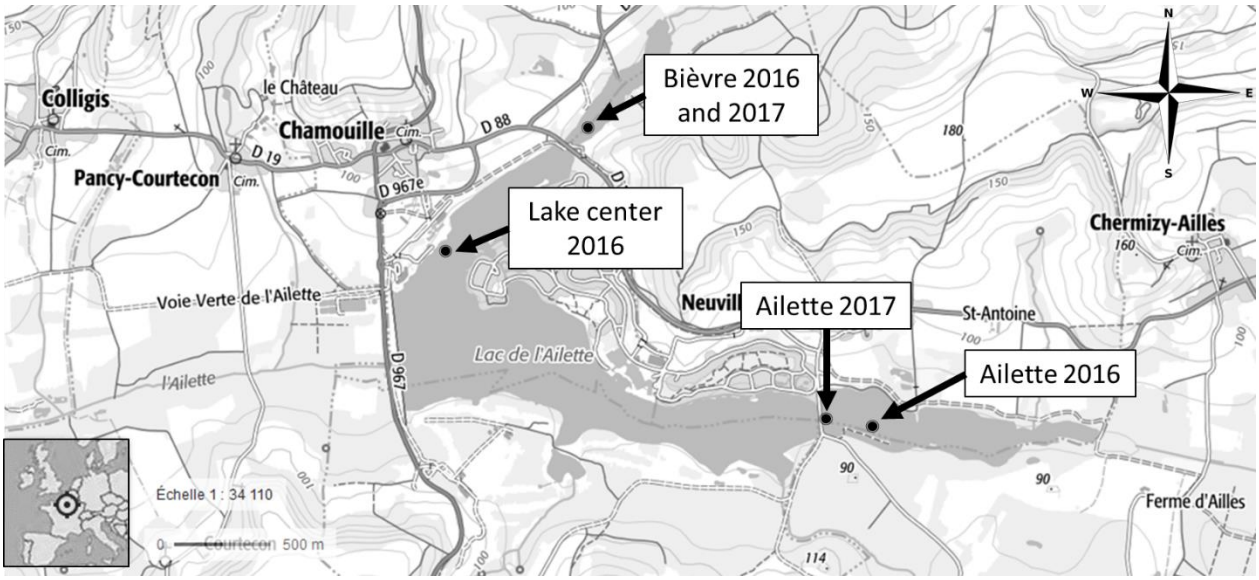

Figure 32: Location of the sampling sites during the two-year investigation period

IV.3. Physiological status of bivalves

The condition index (CI) was measured using the total weight (non-dissected mussel with dried shell) and soft tissues weight as follows:

$$\mathrm{CI} = \frac{\text{whole soft tissue wet weight (mg)}}{\text{whole body weights with shell (mg)}}$$

IV.4. Free and total MC contents in phytoplankton biomass and bivalves

Free and total MC concentrations in tissues of bivalves was measured in three pools of three *D. polymorpha* and in five digestive glands of *A. anatina* (individual scale) in 2016. In 2017, both fractions were measured in 4 pools of 6 *D. polymorpha* and 4 digestive glands of *A. anatina*, analysed individually. After being sampled, bivalve tissues were freeze-dried and grind. Water samplings were filtered (1 µm cyclopore track etched membrane, Whatman, Maidstone, United Kingdom). Free MC concentrations in water and in mussels were measured

using ELISA tests (Abraxis LLC, Warminister, PA, USA). The extraction procedure is described in Lepoutre et al., Chap 4. Total MC contents in bivalve tissues were analysed through the measurement of the product of MC oxidation: 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid (MMPB). The extraction procedure is described in Lepoutre et al., Chap 4. When the weight of dry tissues was not enough to perform both extractions on the same sample, the analysis of otal MCs was prioritised. Due to a technical issue, data regarding MC concentrations in the water during the first two weeks of 2017 are not available.

IV.5. Identification and quantification of cyanobacteria

The identification of cyanobacterial genus and species, as well as the evaluation of their densities, were performed twice-monthly. Water was sampled on the first meter with a bailer and transferred into 500 ml untreated plastic bottles. Cyanobacteria species were identified and counted (density in cells per mL^{-1}) in a 50 µL-Nageotte chamber (Brient et al., 2008). The frequency of occurrence (FO) was calculated as the percentage of samplings in which each cyanobacteria species was present. Because of the presence of pico-cyanobacteria species like *Aphanocpasa* sp and *Merismopedia* sp., the sole analysis of the proportion of MC-producing based on cell counts may not be accurate to estimate the water contamination level by cyanobacteria. Indeed, even if small-sized species are numerous in a water sample, they might contribute only to a minor fraction of the biomass (Hillebrand et al., 1999). Thus, biovolumes of cyanobacteria were measured using the database made by the Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (2012).

IV.6. Statistics

Statistical analyses were performed with Statistica (Version 8.0.360.0, Statsoft, Tulsa, USA, 2007). The normality has been studied with a Shapiro-Wilk test, and the homogeneity of variances was studied with a Levene test. The comparison of two independent samples was done with Mann-Whitney tests and the comparison of multiple independent samples was done with Kruskal-Wallis tests.

V. Results

V.1. Phytoplankton

In 2016, cyanobacteria were present from May to August in all sites (Figure 33), except in the Bièvre site (BI), the 31st of May, and were predominant from July to early August in BI and Lake Center site (LC), representing overall 83.06 % of the phytoplankton community. In Ailette site (AI), cyanobacteria were predominant from early June to late August, with a brief decrease in favour of Chlorophyceae mid-August. Others main phytoplankton present were first Diatomophyceae, then Chrysophyceae and Chlorophyceae.

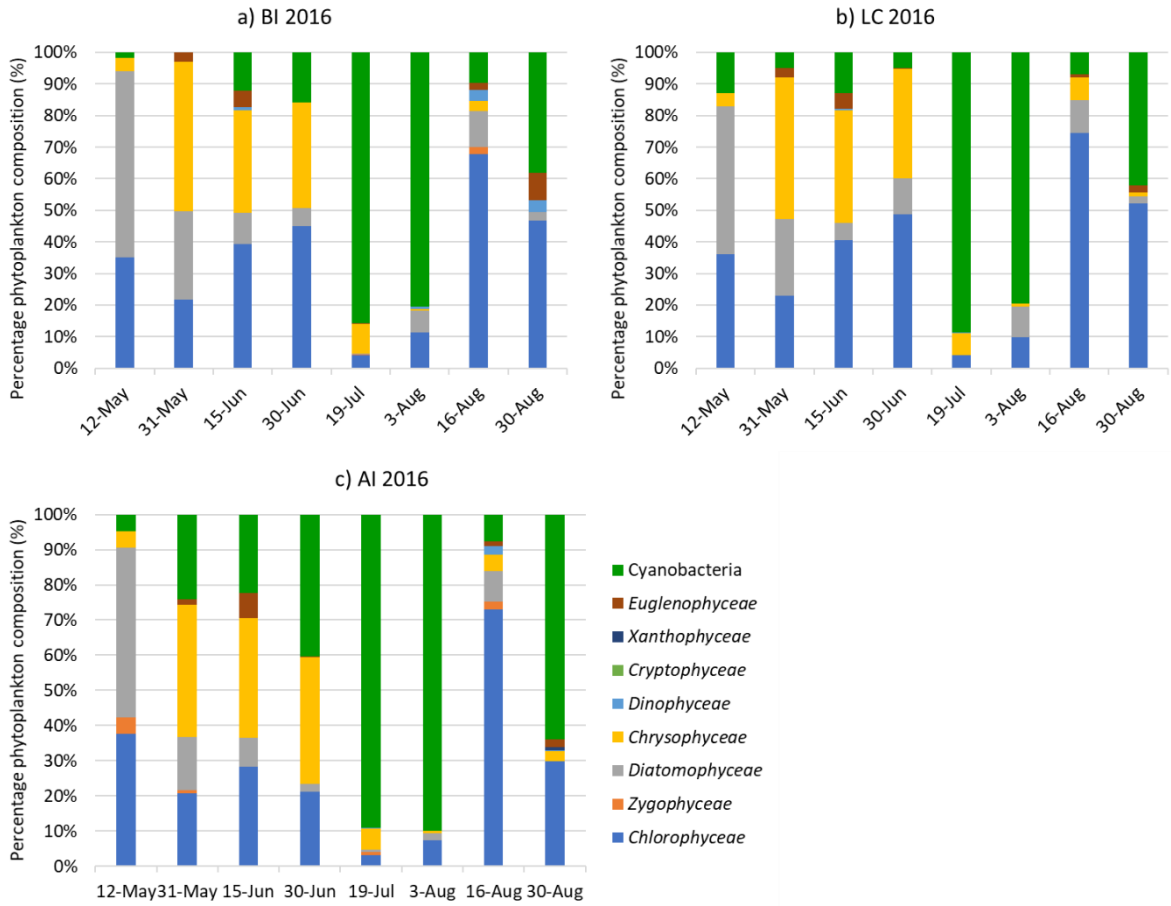

Figure 33 : Proportional abundance of phytoplankton taxonomical classes in the Bièvre site BI (a), Lake Center LC (b) and Ailette site AI (c) of the Ailette Lake, between May and August 2016.

Among the 19 species of 2016, eleven are known cyanobacteria recorded in to be able to produce MCs (Figure 34). The species with the highest frequency of occurrence (FO, percentage of samplings in which the species was present) during the 2016 investigation period in the BI site was the MC-producing *M. aeruginosa* (50,0%). In LC site, three species were the most frequent: *M. aeruginosa*, *Chroococcus* sp. and *Oscillatoria* sp. were identified in 37.5% of the

samples. In the AI site, two species were the most frequent: *M. aeruginosa* and *Oscillatoria* sp. with a frequency of occurrence of 50 % for both species.

Figure 34: Proportional abundance of cyanobacteria species in BI (green), LC (orange) and AI (blue) in 2016. The number in circles indicates percentages occupied by each species in terms of number of cyanobacterial cells, this information is also related to sizes of circles. Species in orange are known to be able to produce MCs.

In 2016, the densities of cyanobacteria in all sites on July-19 and Aug-3 were over the alert level 1 of WHO water quality guidelines (20 000 cells/ml), density as which a quantification of cyanotoxins is recommended (Chorus and Bartram, 1999). However, because the main cyanobacteria species present in those sampling times are small picocyanobacteria, the biovolume they represent is below the threshold of the alert level 1 of 0.2 mm^3/L of the same agency (Chorus and Bartram, 1999). Thus in 2016, the level of contamination of water was overall low. In June 2016 in the site Bièvre, even if the density of MC-producing cyanobacteria was important and represented 65,5 % of the density of all cyanobacteria, the biovolume of

MC-producing cyanobacteria represented less that 5 % of the total biomass. On the opposite, in the second part of August, the MC-producing cyanobacteria species were less abundant but had a larger size compared to other cyanobacteria (colonial species such as *Microcystis aeruginosa* and *M. botrys*), and thus dominated the overall cyanobacterial biomass. The MC-producing cyanobacteria therefore dominated the cyanobacterial biomass (Figure 35) in all sites (from 99 to 100 %) at the end of August 2016, and sporadically during the rest of the campaign (May in LC and AI and June in AI).

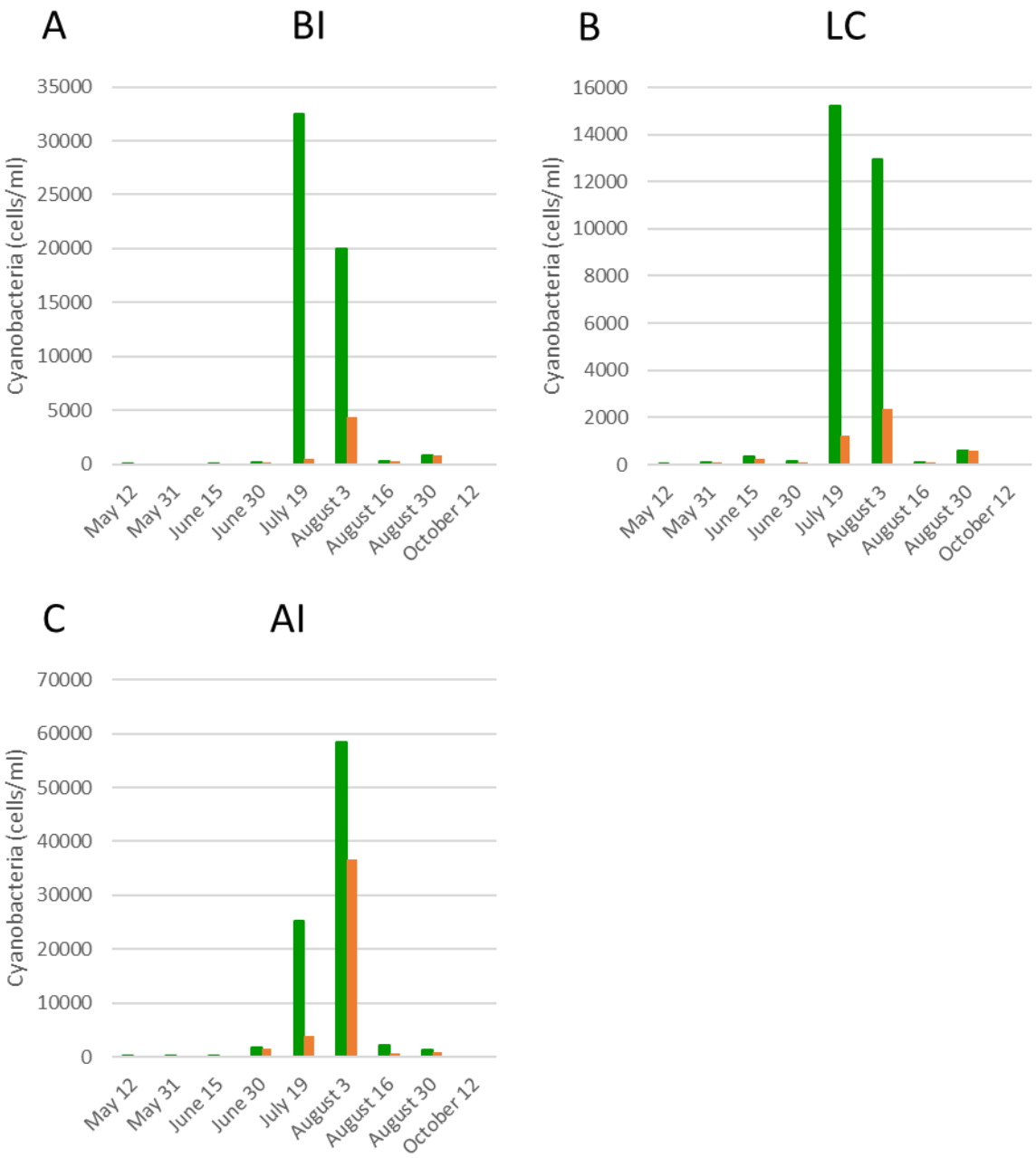

Figure 35 : Densities of cyanobacteria cells (green) and MC-producing cyanobacteria (orange) in BI (A), LC (B) and AI (C) sites of the Ailette Lake in 2016

Tableau 9 : Percentage of MC-producing cyanobacteria, in density and biovolume, among the entire cyanobacterial community in BI, LC and AI sites of the Ailette Lake from May to August 2016.

		May 12	May 31	June 15	June 30	July 19	August 3	August 16	August 30
BI	Density of MC-producing cyanobacteria (%)	0,0	0,0	62,5	71,4	4,3	17,2	77,1	100,0
	Biovolume of MC-producing cyanobacteria (%)	0,0	0,0	3,3	4,9	8,6	61,6	95,9	100,0
LC	Density of MC-producing cyanobacteria (%)	0,0	100,0	71,4	0,0	8,2	18,1	70,4	100,0
	Biovolume of MC-producing cyanobacteria (%)	0,0	100,0	4,9	0,0	7,3	88,3	96,7	100,0
AI	Density of MC-producing cyanobacteria (%)	0,0	83,8	100,0	89,9	6,8	19,0	53,8	97,7
	Biovolume of MC-producing Cyanobacteria (%)	0,0	70,6	100,0	63,3	11,4	62,8	95,0	99,8

In August 2017, cyanobacteria dominated the phytoplankton community in both BI and AI, representing a mean of 91.1 ± 1.1 and 91.1 ± 6.5 % of the phytoplankton respectively in terms of cell density (Figure 36).

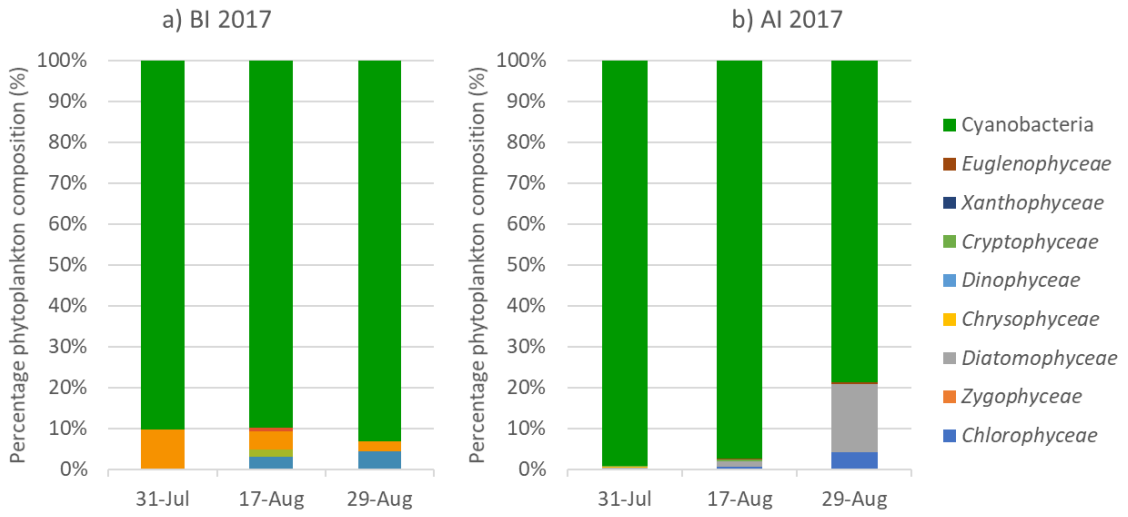

Figure 36 : Proportional abundance of phytoplankton taxonomical classes in the two investigated sites Bièvre (BI, a) and Ailette (AI, b) of the Ailette Lake in August 2017.

Among the eleven cyanobacteria species recorded in August 2017, none were able to produce MCs in BI and seven are able to produce MCs in AI (Figure 37). In BI, only *Cyanogranis* sp. was detected at all sampling times. In AI, species with the highest occurrence frequency were *Aphanizomenon gracile*, *Cyanogranis* sp. and *Merismopedia tenuissima*, that were detected at all sampling times.

Figure 37: Proportional abundance of cyanobacteria species in BI (green) and AI (blue) in August 2017. The number in circles indicates percentages occupied by each species in terms of number of cyanobacterial cells, this information is also related to sizes of circles. Species in orange are known to be able to produce MCs.

In 2017, the number of cyanobacterial cells was over the threshold of 100 000 cell/ml, representing a potential cyanobacterial hazard to human health (Chorus and Bartram, 1999). The threshold of level 1 in terms of biovolume of all cyanobacteria species (0.2 mm^3/L) was also exceeded during the study for the two sites. However, no MC-producing cyanobacteria were detected in BI. In AI, the density of MC-producing cyanobacteria was lower than the one of non-producing species, but they dominated the overall cyanobacterial biomass in terms of biovolume (Figure 38,Tableau 9). The level 2 threshold of 10 mm^3/L of cyanobacteria was

exceeded in Aug-17 in AI. Thus, the level of water contamination by MCs was different between the sites.

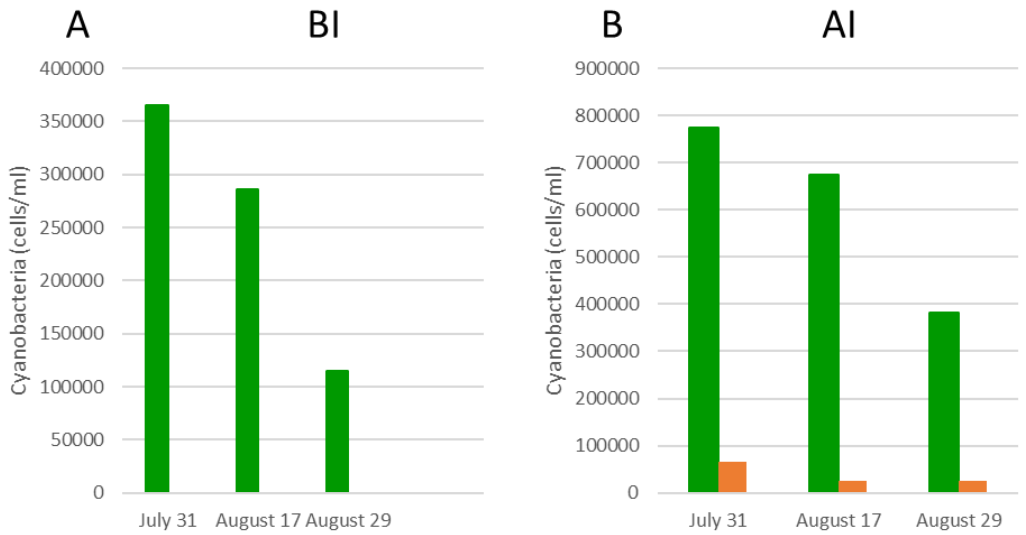

Figure 38 : Densities of cyanobacteria (green) and MC-producing cyanobacteria (orange) in the two investigated sites BI (A) and AI (B) of the Ailette Lake in 2017

Tableau 10 : Percentage of MC-producing cyanobacteria, in density and biovolume, among the entire cyanobacterial community in the two investigated sites BI and AI of the Ailette Lake in August 2017.

		July 31	August 17	August 29
BI	Density of MC-producing cyanobacteria (%)	0,0	0,0	0,0
	Biovolume of MC-producing Cyanobacteria (%)	0,0	0,0	0,0
AI	Density of MC-producing cyanobacteria (%)	8,4	2,4	5,1
	Biovolume of MC-producing Cyanobacteria (%)	83,3	92,6	55,1

V.2. MCs in phytoplankton samples and accumulation of free and total MCs by *A. anatina* and *D. polymorpha*

In 2016, intracellular MC concentrations in the water were low for all sites: from 0.015 ± 0.009 in November in BI to 1.07 ± 0.06 µg MCs/L in July on LC (Figure 39). Overall, both free and total MC concentrations in *A. anatina* were significantly higher compared to the respective fractions in *D. polymorpha* (Mann-Whitney Test, $p < 0.01$). In BI on November, MCs were detected within digestive glands of *A. anatina* but not in whole *D. polymorpha*. When comparing the concentrations of both fractions in bivalves, total MCs were detected at significantly higher concentrations than free MCs (from 0 to 2.10 ± 0.07 µg total MCs/g versus

from 0 to 0.29 ± 0.11 µg free MCs/g DW in *D. polymorpha,* and from 0 to 7.88 ± 2.40 µg total MCs/g versus from 0 to 1.78 ± 0.05 µg free MCs/g DW in *A. anatina*) (Mann-Whitney Test, $p < 0.01$). The comparison of the occurrence of both fractions in each model showed that free MCs were detected in 41.2 % of whole *D. polymorpha* samples and 24.2 % of digestive glands of *A.anatina*, and total MCs were respectively found in 62.5 and 86.2 % of samples, during August 2017.

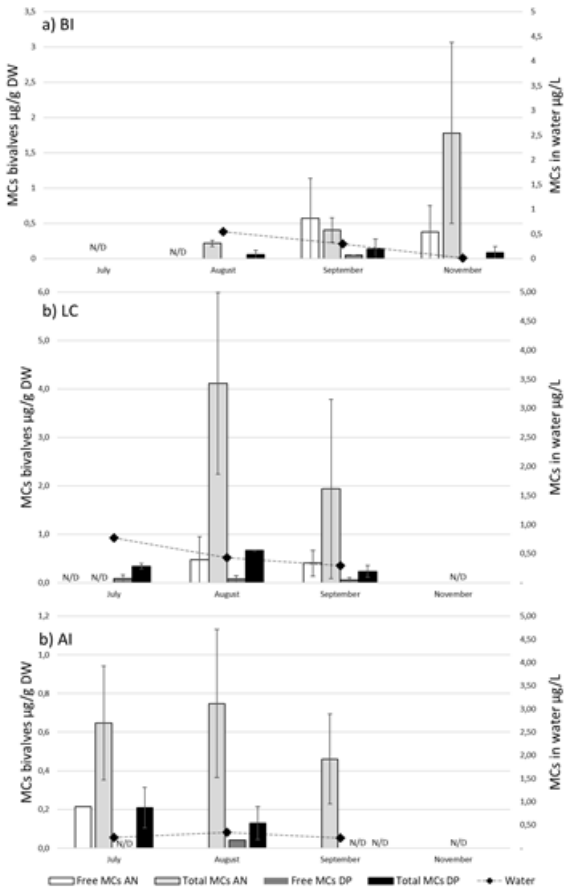

Figure 39 : Accumulation (µg/g DW) of free MC (white columns) and total MCs (light grey columns) in *A. anatina* (AN), and of free MCs (dark grey columns) and total MCs (black columns) *D. polymorpha* (DP), caged from May to November 2016 in BI (a), LC (b) and AI (c). Intracellular MC concentrations in water are represented by black pastilles. N/D indicates that the analysis was not performed.

In Aug 2017 (Figure 40), intracellular MC concentrations in water were low, below 1 µg MCs/L for both sites with maximums of 0.06 ± 0.01 µg MCs/L in 28-Aug at the Bièvre site, and 0.7 ± 0.04 µg MCs/L at the same day in the Ailette site. As in 2016, free and total MC concentrations in *A. anatina* were significantly higher compared to the same fraction in *D. polymorpha* (Mann-Whitney Test, $p < 0.01$). The comparison of both fractions showed that total MC concentrations were significantly higher in both models compared to free MCs (Mann-Whitney Test, $p < 0.01$). The comparison of the occurrence of both fractions in each model

showed that free MCs were detected in 43.8 % of whole *D. polymorpha* samples and 89.5 % of digestive glands of *A.anatina*, total MCs were respectively found in 56.2 and 87.5 % of samples, during August 2017.

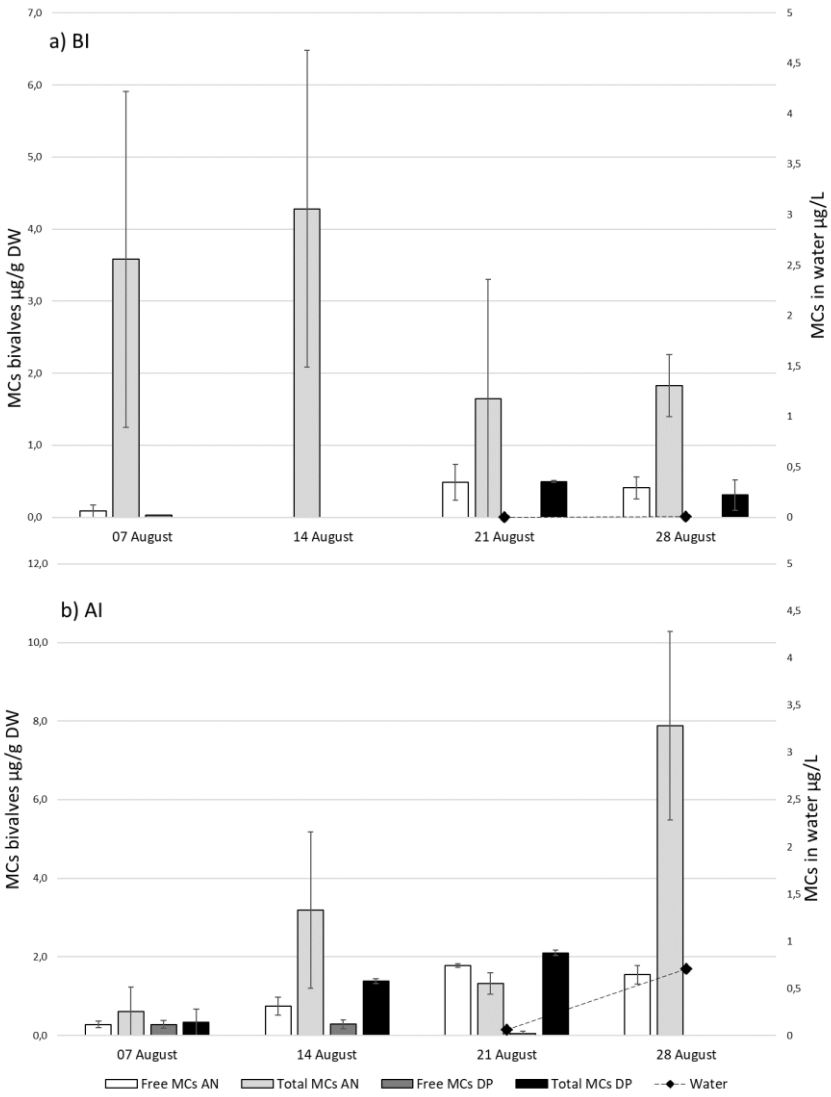

Figure 40: Accumulation (µg/g DW) of free MC (white columns) and total MCs (light grey columns) in *A. anatina* (AN), and of free MCs (dark grey columns) and total MCs (black columns) *D. polymorpha* (DP), caged in August 2017 in BI (a) and AI (b). Intracellular MC concentrations in water are represented by black pastilles. N/D indicates that the analysis was not performed.

V.3. Condition index

Overall in 2016, the condition index CI of *A. anatina* (mean of 0.35 ± 0.01) and *D. polymorpha* (mean of 0.15 ± 0.004) did not vary during the experiment. In 2017, no variations of the condition index were observed between the first two weeks of caging in BI for both species, nor for *D. polymorpha* in AI. A slight but significant increase (Mann-Whitney test, $p < 0.05$) of *A. anatina* condition index was observed between week 1 (0.22 ± 0.02) and week 2 (0.31 ± 0.01) in AI.

VI. Discussion

The development of cyanobacterial blooms may show important spatiotemporal variations, explained by numerous phenomena such as the ecology of the species, hydrological parameters, weather and climate conditions (Salmaso et al., 2017). Therefore, it can be difficult to monitor the densities of MC-producing cyanobacteria or MC concentration in water (Tillmanns et al., 2007). Here we investigated *in situ* the potential use of the freshwater mussels *A. anatina* and *D. polymorpha* as integrative tools to biomonitor the presence of MC-producing cyanobacteria in fresh waters. The caging of bivalves to biomonitor pollutants in water is known to have advantages over wild populations : its allows to control the age, size (Phillips and Segar, 1986) and life history as well as history of contamination of animals. The drawbacks are the potential loss of systems and the risk to introduce a new species in an environment (Phillips and Segar, 1986). Here, because *D. polymorpha* is an invasive species, its presence has been checked before species transplantation. Both *A. anatina* and *D. polymorpha* are known to ingest and accumulate MCs: *D. polymorpha* is able to ingest MC-producing cyanobacteria such as the colonial *M. aeruginosa* and the filamentous *P. agardhii* (G. Juhel et al., 2006; White and Sarnelle, 2014). *A. anatina* has been shown to ingest *M. aeruginosa* and *P. agardhii* (Dionisio Pires et al., 2007; Bontes et al., 2016). Both species have been proposed as bioindicators of the presence of MC-producing cyanobacteria through a laboratory experiment in which they were exposed to a gradient of a MC-producing strain of the filamentous cyanobacteria *P. agardhii* (Lepoutre et al., Chap. IV). The results have shown that *A. anatina* could potentially be used to detect rapidly low densities of MC-producing cyanobacteria, and *D. polymorpha* could be more appropriate to estimate levels of contamination of water when intracellular MC concentration in water is higher than 1 µg MCs/L. Because of the efficient detoxification capacities of *D. polymorpha*, the analysis of free

MCs in its tissues could also rapidly indicate the end of a water contamination. The quantification of free MCs in *D. polymorpha* tissues however appeared to be less sensitive than the quantification of total MCs (free and protein-bound) for early detection (1 day) of a very low environmental contamination level (< 1 µg/L), but reflected more rapidly and efficiently the environmental MC dynamics for both species. Here *A. anatina* and *D. polymorpha* were exposed *in-situ* in the same sites and at the same depth, for three months in 2016 and one month in 2017, in different locations of a lake undergoing yearly moderate cyanobacterial blooms. We analysed free and total MC contents in both bivalves, as well as intracellular MCs (in phytoplankton samplings) and species diversity of phytoplankton communities, to assess *in situ* the bivalve capacities to integrate an environmental MC contamination.

The intracellular MC concentrations in phytoplankton samples were quite low during the two-year investigation. The maximum concentrations were of 1.07 ± 0.06 and 0.7 ± 0.06 µg MCs/L respectively in July 2016 in the site Lake Center and in late August 2017 in the Ailette site. However, even at low environmental contamination, both models were able to reveal the presence of MC-producing cyanobacteria in water. Moreover, mussels temporally integrated the presence of MC-producing cyanobacteria in the water column, when punctual water samples did not reveal it. Indeed, in August in the Bièvre site, no MC-producing cyanobacteria nor intracellular MCs were detected in the water. However, free and total MCs were measured within both mussels. Bivalves have already been able to reveal a MC-contamination of water, when the sole analysis of water did not reveal it, as observed in Chambers Bay (USA): free MCs were found in *Mytilus trossulus* when water concentration were below detection limits (Preece et al., 2015). This phenomenon may be explained by the potential occurrence of a cyanobacterial proliferation between two water sampling dates, that have been integrated by mussels.

The variations of free and total MCs concentrations during both campaigns in the two species could be explained by some variations of MC-producing cyanobacteria densities, as well as by extrinsic or intrinsic parameters. Indeed, temperature has been shown to have an impact on the depuration kinetics of free MCs by *Unio douglasiae* (Yokoyama and Park, 2002). An increase of the activity of the detoxification enzyme GST (glutathione s-transferase) was observed in mid-summer, during a one-year transplant study of *D. polymorpha* (Palais et al., 2012). This increase of activity has been attributed to temperature and the increase filtration

rate that it entails (Palais et al., 2012). The concentration ranges of free and total MCs in caged mussels of both species (from 0 to 0.29 µg free MCs/g DW and from 0 to 0.7 µg total MCs/g in *D. polymorpha,* and from 0 to 1.78 µg free MCs/g DW and 0 to 7.88 µg total MCs/g in *A. anatina*) were within the concentration ranges quantified in mussels laboratory exposed to a density of cyanobacteria producing an equivalent of 1 µg MCs/L (from 0 to 0.27 µg free MCs/g DW and 0 to 1.26 µg total MCs/g in *D. polymorpha,* and from 0.10 to 12.01 µg free MCs/g DW and 0.98 to 23.38 µg total MCs/g in *A. anatina*) (Lepoutre et al., chap IV). This is consistent with the MC concentrations we observed in water of the three investigated sites, that did not exceed 1 µg MCs/L. However, in the laboratory, mussels were submitted to a continuous exposure followed by a depuration, without any fluctuation of the MC-producing cyanobacteria density. Mussels *in situ* probably experienced several cyanobacterial proliferations and varying MC-producing cyanobacteria densities, with or without periods of depuration during which no MC-producing cyanobacteria may have proliferate.

As in the laboratory experiment, regardless of sites and years, *A. anatina* accumulated significantly more free and total MCs than *D. polymorpha*. Moreover, free MCs have been detected in tissues of *A. anatina*, when none were found in tissues of *D. polymorpha,* on several occasions (in the Bièvre site in 2016, in the last two weeks of August 2017, and in the Ailette site in the last week of August). Thus, it appears that *A. anatina* could be more sensitive than *D. polymorpha* to detect MCs when the density of producers and the concentration in the water and low (< 1 µg/L). This observation has also been made during a field study using passive sampling of both species in lakes undergoing cyanobacterial blooms, although no measurement of MCs concentration in the water has been made (Barda et al., 2015). The differences in MC concentrations in tissues of *A. anatina* and *D. polymorpha* have been attributed to *D. polymorpha* selective feeding, its strong MC biotransformation capacities, and the potential ingestion of MC-contaminated sediments by *A. anatina* (Barda et al., 2015). However, the follow-up of the ingestion of cyanobacteria and the absence of sediments in the laboratory exposure (Lepoutre et al., chap IV), suggests that the most likely factor would be *D. polymorpha* effective detoxification of MCs, compared to *A. anatina*.

To assess the physiological status of both models we measured the condition index. Regarding *D. polymorpha* this index did not vary during the study and the values were similar to those measured by Kerambrun et al. (2016). In 2016, whatever the site, *A. anatina* condition index did not vary, but increased in the Ailette site in 2017, which probably means that mussels had

enough food materials in water, supported by the higher cyanobacterial densities and biomass recorded. Therefore, it is possible that cyanobacteria, even MC producing ones, constitute a nutritious food source for bivalves despite the concomitant intoxication that they undergo. Potentially because of their inability to move, all *D. polymorpha* of the Ailette site have been found dead in September 2016 when a large amount of sediment was found in cages of both species. A factor that did not seemed to disturbed *A. anatina*, as all individuals of this species survived, maybe because of their ability to move and burrow (Lurman et al., 2014; Swhalb and Pusch, 2007). The nature of the substrate and the potential risk of clogging by sediment during a drop of water level should therefore be considered when choosing a species as a bioindicator.

Care must also be taken when selecting the fraction of MC accumulation in the tissues of bioindicator species. Differences in the concentrations of free MCs, measured by ELISA, and total MCs, measured by LC-MS/MS, have been observed during this study. Overall, when comparing both fraction for each species, total MC concentrations in bivalve tissues were significantly superior to free MCs ones, which is consistent with previous studies on bivalves and gastropods (Dionisio Pires et al., 2004; Lance et al., 2010; Pham et al., 2015). This difference could be attributed to the higher rate of elimination of free MCs by organisms compared to protein-bound ones. Indeed, free MCs can be eliminated through an activation of the detoxification enzyme glutathion-S-transferase (GST) (Pflugmacher et al., 1998). As a result, free MCs can be eliminated faster than bound MCs, which elimination is probably related to the turnover of proteins phosphatases to which MCs are covalently bound. In the laboratory, free MCs in *D. polymorpha* 21-day exposed to a density of *P. agardhii* producing an equivalent of 1 µg MCs/L were completely eliminated from tissues after 3 days in clean water (Lepoutre et al., chap. IV). However, potentially because of *A. anatina* less efficient detoxification system compared to *D. polymorpha*, free MCs in digestive glands of *A. anatina* were still detected within tissues after 21 days in clean water, as for as total MCs in both models. As free MCs in *D. polymorpha* were eliminated within few days after an exposure to a low concentration of intracellular MCs in the medium (around 1 µg MCs/L), free MCs may have rapidly reflected the intracellular MC dynamics in the three sites of this study. On the contrary, as total MCs in both models remained longer within tissues during a depuration period, their presence in bivalve tissues caged in the field may both represent an actual or a past water contamination by MC-producing cyanobacteria. In order to prevent this

overestimation of an actual risk, the quantification of total MCs can be done in new individuals regularly renewed in cages during periodical monitorings.

Nevertheless, the measurement of total MCs, which integrate a greater part of the accumulation fraction in tissues, might also have highlighted the presence of MC-producing cyanobacteria in samples when no free MCs were detected. This has been observed during two weeks out of four in August 2017 in *D. polymorpha* caged in the Bièvre site. Hence, the analysis of total MCs in tissues of bivalves may appear more appropriate to analyse the presence of very low densities of MC-producing cyanobacteria in the water. But because their elimination from tissues are slower than free MCs, it may not be suitable to estimate the dynamics, in terms of presence and disappearance, of MC-producing cyanobacteria in water. The analysis of total MCs may also be suitable in ecotoxicology, to assess the contamination undergone by bivalves. However, the analysis of total MCs concentration in tissues of bivalves relies on the use of expensive equipment, needs qualified staff and is time consuming. As those disadvantages do not apply to ELISA tests, this method is increasingly applied (Meriluoto et al., 2016). The main critic regarding ELISA tests is their ability to induce false-positive results and an overestimation of MC concentrations in samples (Meriluoto et al., 2016). However, this issues was not observed when comparing free and total MCs in gastropods (Lance et al., 2010c). Moreover, working with duplicates and determining a threshold of detection with the corresponding non-exposed matrix may allow to reduce this risk and may give hindsight when analysing data. When applying this methodology, no free MCs were found in samples when no total MCs were detected, demonstrating that no false positive occurred during our experiment.

VII. Conclusion

This study showed that both *A. anatina* and *D. polymorpha* accumulated free and total MCs *in situ* when the concentrations of intracellular MCs was below 1 µg MCs/L in the water. Results suggest that both species are complementary. Indeed, the measurement of total MCs in the digestive glands of *A. anatina* may be suitable to assess the presence of MC-producing cyanobacteria at very low densities (less than 1 µg/L of intracellular MCs). However, the drawbacks of the measurement of total MCs is the potential overestimation of a present risk if bivalves still contain MCs in their tissues from a previous cyanobacterial bloom. But periodical caging of new individuals regularly renewed may prevent this issue. Because *D. polymorpha* probably have a more efficient MC-detoxification system, the quantification of

free MCs in whole *D. polymorpha* may be suitable to reveal the dynamic of environmental contamination by MC-producing cyanobacteria, in terms of proliferation and end of a proliferation contamination. As the accumulation kinetics of MCs by *A. anatina* and *D. polymorpha* have been showed to differ when exposed to densities of MC-producing cyanobacteria producing 10 or 100 µg MCs/L, it would be interesting to transplant both species during an intense cyanobacterial bloom with higher concentrations of MCs in water.

Acknowledgment

This work was funded by an EC2CO (CNRS) grant and supported by the Région Champagne-Ardenne.

The authors would like to thank Le Syndicat mixte de l'Ailette for their invaluable technical help and thank V. Maes and A. Le Guernic for their assistance during fieldworks campaigns.

VIII. References

Aldridge, D.C., Elliott, P., Moggridge, G.D., 2006. Microencapsulated biobulletse for the control of biofouling zebra mussels. Environmental Science and Technology 40, 975–979. https://doi.org/10.1021/es050614

Amorim, A., Vasconcelos, V., 1999. Dynamics of microcystins in the mussel Mytilus galloprovincialis. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 37, 1041–52.

Arlinghaus, R., Mehner, T., 2003. Socio-economic characterisation of specialised common carp (Cyprinus carpio L.) anglers in Germany, and implications for inland fisheries management and eutrophication control. Fisheries Research 61, 19–33. https://doi.org/10.1016/S0165-7836(02)00243-6

Arlinghaus, R., Niesar, N., 2005. Nutrient digestibility of angling baits for carp, Cyprinus carpio, with implications for groundbait formulation and eutrophication control. Fisheries Management and Ecology 12, 91–97. https://doi.org/10.1111/j.1365-2400.2004.00425.x

Baqar, M., Sadef, Y., Ahmad, S.R., Mahmood, A., Li, J., Zhang, G., 2018. Organochlorine contaminants in freshwater mussels; occurrence, bioaccumulation pattern, spatio-temporal distribution and human health risk assessment from the tributaries of River Ravi, Pakistan. Human and Ecological Risk Assessment 24, 1268–1290. https://doi.org/10.1080/10807039.2017.1411780

Barda, I., Kankaanpää, H., Purina, I., Balode, M., Sjövall, O., Meriluoto, J., 2015. Bioaccumulation of hepatotoxins – A considerable risk in the Latvian environment. Environmental Pollution 196, 313–320. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.10.024

Binelli, A., Della Torre, C., Magni, S., Parolini, M., 2015. Does zebra mussel (Dreissena polymorpha) represent the freshwater counterpart of Mytilus in ecotoxicological studies? A critical review. Environmental Pollution 196, 386–403. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.10.023

Bontes, B., Verschoor, A., Pires, M.D., Van Donk, E., Ibelings, B.W., 2016. Functional response of Anodonta anatina feeding on a green alga and four strains of cyanobacteria , differing in shape , size and toxicity Functional response of Anodonta anatina feeding on a green alga and four strains of cyanobacteria , differing in sha. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6399-2

Brient, L., Lengronne, M., Bertrand, E., Rolland, D., Sipel, A., Steinmann, D., Baudin, I., Legeas, M., Le Rouzic, B., Bormans, M., 2008. A phycocyanin probe as a tool for monitoring cyanobacteria in freshwater bodies. J. Environ. Monit. 10, 248–255. https://doi.org/10.1039/B714238B

Campos, A., Vasconcelos, V., 2010. Molecular Mechanisms of Microcystin Toxicity in Animal Cells. International Journal of Molecular Sciences 11, 268–287. https://doi.org/10.3390/ijms11010268

Camusso, M., Balestrini, R., Muriano, F., Mariani, M., 1994. Use of freshwater mussel Dreissena polymorpha to assess trace metal pollution in the lower River Po (Italy). Chemosphere 29, 729–745. https://doi.org/10.1016/0045-6535(94)90042-6

Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2012. Identification, dénombrement et estimation du biovolume des cyanobactéries et des algues, MA. 800 – Cya.alg 1.0. Québec.

Chorus, I., Bartram, J., 1999. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2003.01107.x

Craig, M., Luu, H.A., McCready, T.L., Williams, D., Andersen, R.J., Holmes, C.F.B., 1996. Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporin and microycystins with type-1 and type-2A protein phosphatases. Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire 74, 569–578.

Dionisio Pires, L.M., Bontes, B.M., Samchyshyna, L., Jong, J., Van Donk, E., Ibelings, B.W., 2007. Grazing on microcystin-producing and microcystin-free phytoplankters by different filter-feeders: implications for lake restoration. Aquatic Sciences 69, 534–543. https://doi.org/10.1007/s00027-007-0916-z

Dionisio Pires, L.M., Karlsson, K.M., Meriluoto, J. a. O., Kardinaal, E., Visser, P.M., Siewertsen, K., Donk, E. Van, Ibelings, B.W., 2004. Assimilation and depuration of microcystin–LR by the zebra mussel, Dreissena polymorpha. Aquatic Toxicology 69, 385–396. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.06.004

Eriksson, J.E., Grönberg, L., Nygård, S., Slotte, J.P., Meriluoto, J. a, 1990. Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. Biochimica et biophysica acta 1025, 60–66. https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90190-Y

Ferrão-Filho, A., Kozlowsky-Suzuki, B., 2011. Cyanotoxins: Bioaccumulation and Effects on Aquatic Animals. Marine Drugs 9, 2729–2772. https://doi.org/10.3390/md9122729

Fischer, W.J., Altheimer, S., Cattori, V., Meier, P.J., Dietrich, D.R., Hagenbuch, B., 2005. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. Toxicology and Applied Pharmacology 203, 257–263. https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.08.012

Gaget, V., Lau, M., Sendall, B., Froscio, S., Humpage, A.R., 2017. Cyanotoxins: Which detection technique for an optimum risk assessment? Water Research 118, 227–238. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.025

Gkelis, S., Lanaras, T., Sivonen, K., 2006. The presence of microcystins and other cyanobacterial bioactive peptides in aquatic fauna collected from Greek freshwaters. Aquatic Toxicology 78, 32–41. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.02.001

Graczyk, T.K., Conn, D.B., Marcogliese, D.J., Graczyk, H., De Lafontaine, Y., 2003. Accumulation of human waterborne parasites by zebra mussels (Dreissena polymorpha) and Asian freshwater clams (Corbicula fluminea). Parasitology Research 89, 107–112. https://doi.org/10.1007/s00436-002-0729-x

Harada, K.I., Murata, H., Qiang, Z., Suzuki, M., Kondo, F., 1996. Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria. Toxicon 34, 701–710. https://doi.org/10.1016/0041-0101(95)00163-8

Hastie, C., Borthwick, E., Morrison, L., Codd, G., Cohen, P., 2005. Inhibition of several protein

phosphatases by a non-covalently interacting microcystin and a novel cyanobacterial peptide, nostocyclin. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1726, 187–193. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.06.005

Hillebrand, H., Dürselen, C.D., Kirschtel, D., Pollingher, U., Zohary, T., 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. Journal of Phycology 35, 403–424. https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x

Ibelings, B.W., Chorus, I., 2007. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater "seafood" and its consequences for public health: A review. Environmental Pollution 150, 177–192. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.04.012

Juhel, G., Davenport, J., O'Halloran, J., Culloty, S.C., O'Riordan, R.M., James, K.F., Furey, A., Allis, O., 2006. Impacts of microcystins on the feeding behaviour and energy balance of zebra mussels, Dreissena polymorpha: A bioenergetics approach. Aquatic Toxicology 79, 391–400. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.07.007

Kanoshina, I., Lips, U., Leppänen, J.M., 2003. The influence of weather conditions (temperature and wind) on cyanobacterial bloom development in the Gulf of Finland (Baltic Sea). Harmful Algae 2, 29–41. https://doi.org/10.1016/S1568-9883(02)00085-9

Kerambrun, E., Palos Ladeiro, M., Bigot-Clivot, A., Dedourge-Geffard, O., Dupuis, E., Villena, I., Aubert, D., Geffard, A., 2016. Zebra mussel as a new tool to show evidence of freshwater contamination by waterborne Toxoplasma gondii. Journal of Applied Microbiology 120, 498–508. https://doi.org/10.1111/jam.12999

Kim, R.B., 2003. Organic anion-transporting polypeptide (OATP) transporter family and drug disposition. European Journal of Clinical Investigation 33, 1–5. https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.33.s2.5.x

Lance, E., Bugajny, E., Bormans, M., Ge, C., 2008. Consumption of toxic cyanobacteria by Potamopyrgus antipodarum (Gastropoda , Prosobranchia) and consequences on life traits and microcystin accumulation 7, 464–472. https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.10.004

Lance, E., Neffling, M.R., Gérard, C., Meriluoto, J., Bormans, M., 2010. Accumulation of free and covalently bound microcystins in tissues of Lymnaea stagnalis (Gastropoda) following toxic cyanobacteria or dissolved microcystin-LR exposure. Environmental Pollution 158, 674–680. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.10.025

Lauceri, R., Austoni, M., Caviglia, F., Kamburska, L., Lami, A., Morabito, G., Pflueger, V., Benavides, A.M.S., Tonolla, M., Torzillo, G., Riccardi, N., 2017. Coupling a bio-accumulator organism and MALDI-TOF MS: an early warning detection system for microcystins in water bodies. Journal of Applied Phycology 29, 2979–2988. https://doi.org/10.1007/s10811-017-1193-4

Lei, J., Payne, B.S., Wang, S.Y., 1996. Filtration dynamics of the zebra mussel, Dreissena polymorpha. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 53, 29–37. https://doi.org/10.1139/f95-164

Lepoutre, A., Grillot, T., Jean, S., Geffard, A., Lance, E., n.d. Kinetics of accumulation and detoxification of free and total microcystins in two bivalve species exposed to the

microcystin-producing cyanobacteria Plantkothrix agardhii.

Lepoutre, A., Milliote, N., Bonnard, M., Palos-Ladeiro, M., Rioult, D., Bonnard, I., Bastien, F., Faassen, E., Geffard, A., Lance, E., 2018. Genotoxic and Cytotoxic Effects on the Immune Cells of the Freshwater Bivalve Dreissena polymorpha Exposed to the Environmental Neurotoxin BMAA. Toxins 10, 106. https://doi.org/10.3390/toxins10030106

Lopes-Lima, M., 2014. Anodonta anatina [WWW Document]. The IUCN Red List of Threatened Species. URL http://www.iucnredlist.org/details/155667/0 (accessed 2.12.16).

Lopes-Lima, M., Sousa, R., Geist, J., Aldridge, D.C., Araujo, R., Bergengren, J., Bespalaya, Y., Bódis, E., Burlakova, L., Van Damme, D., Douda, K., Froufe, E., Georgiev, D., Gumpinger, C., Karatayev, A., Kebapçi, Ü., Killeen, I., Lajtner, J., Larsen, B.M., Lauceri, R., Legakis, A., Lois, S., Lundberg, S., Moorkens, E., Motte, G., Nagel, K.-O., Ondina, P., Outeiro, A., Paunovic, M., Prié, V., von Proschwitz, T., Riccardi, N., Rudzīte, M., Rudzītis, M., Scheder, C., Seddon, M., Şereflişan, H., Simić, V., Sokolova, S., Stoeckl, K., Taskinen, J., Teixeira, A., Thielen, F., Trichkova, T., Varandas, S., Vicentini, H., Zajac, K., Zajac, T., Zogaris, S., 2017. Conservation status of freshwater mussels in Europe: state of the art and future challenges. Biological Reviews 92, 572–607. https://doi.org/10.1111/brv.12244

Ludyanskiy, M.L., McDonald, D., MacNeill, D., 1993. Impact of the Zebra Mussel, a Bivalve Invader. BioScience 43, 533–544. https://doi.org/10.2307/1311948

Lurman, G., Walter, J., Hoppeler, H.H., 2014. Seasonal changes in the behaviour and respiration physiology of the freshwater duck mussel, anodonta anatina. Clinical Cancer Research 217, 235–243. https://doi.org/10.1242/jeb.093450

MacKintosh, R.W., Dalby, K.N., Campbell, D.G., Cohen, P.T.W., Cohen, P., MacKintosh, C., 1995. The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. FEBS Letters 371, 236–240. https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00888-G

Maynes, J.T., Luu, H.A., Cherney, M.M., Andersen, R.J., Williams, D., Holmes, C.F.B., James, M.N.G., 2006. Crystal Structures of Protein Phosphatase-1 Bound to Motuporin and Dihydromicrocystin-LA: Elucidation of the Mechanism of Enzyme Inhibition by Cyanobacterial Toxins. Journal of Molecular Biology 356, 111–120. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.019

Meriluoto, J., Spoof, L., Codd, G.A. (Geoffrey A.., 2016. Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. https://doi.org/10.1002/9781119068761

Metcalf, J.S., Hyenstrand, P., Beattie, K.A., Codd, G.A., 2000. Effects of physicochemical variables and cyanobacterial extracts on the immunoassay of microcystin-LR by two ELISA kits. Journal of Applied Microbiology 89, 532–538. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01141.x

Miller, M. a., Kudela, R.M., Mekebri, A., Crane, D., Oates, S.C., Tinker, M.T., Staedler, M., Miller, W. a., Toy-Choutka, S., Dominik, C., Hardin, D., Langlois, G., Murray, M., Ward, K., Jessup, D. a., 2010. Evidence for a Novel Marine Harmful Algal Bloom: Cyanotoxin (Microcystin) Transfer from Land to Sea Otters. PLoS ONE 5, e12576. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012576

Neffling, M.-R., Lance, E., Meriluoto, J., 2010. Detection of free and covalently bound microcystins in animal tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Environmental pollution 158, 948–952. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.10.023

Paerl, H.W., Fulton, R.S., Moisander, P.H., Dyble, J., 2001. Harmful Freshwater Algal Blooms, With an Emphasis on Cyanobacteria. The Scientific World JOURNAL 1, 76–113. https://doi.org/10.1100/tsw.2001.16

Palais, F., Dedourge-Geffard, O., Beaudon, A., Pain-Devin, S., Trapp, J., Geffard, O., Noury, P., Gourlay-Francé, C., Uher, E., Mouneyrac, C., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, A., 2012. One-year monitoring of core biomarker and digestive enzyme responses in transplanted zebra mussels (Dreissena polymorpha). Ecotoxicology 21, 888–905. https://doi.org/10.1007/s10646-012-0851-1

Paldavičienė, A., Zaiko, A., Mazur-Marzec, H., Razinkovas-Baziukas, A., 2015. Bioaccumulation of microcystins in invasive bivalves: A case study from the boreal lagoon ecosystem. Oceanologia 57, 93–101. https://doi.org/10.1016/j.oceano.2014.10.001

Pereira, S.R., Vasconcelos, V.M., Antunes, A., 2011. The phosphoprotein phosphatase family of Ser/Thr phosphatases as principal targets of naturally occurring toxins. Critical reviews in toxicology 41, 83–110. https://doi.org/10.3109/10408444.2010.515564

Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K.A., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C.E.W., 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: The first step of detoxication. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects 1425, 527–533. https://doi.org/10.1016/S0304-4165(98)00107-X

Pham, T.L., Shimizu, K., Dao, T.S., Hong-Do, L.C., Utsumi, M., 2015. Microcystin uptake and biochemical responses in the freshwater clam Corbicula leana P. Exposed to toxic and non-toxic Microcystis aeruginosa: Evidence of tolerance to cyanotoxins. Toxicology Reports 2, 88–98. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.01.012

Phillips, D.J.H., Segar, D.A., 1986. Use of bio-indicators in monitoring conservative contaminants: Programme design imperatives. Marine Pollution Bulletin 17, 10–17. https://doi.org/10.1016/0025-326X(86)90797-6

Pobel, D., Robin, J., Humbert, J.F., 2011. Influence of sampling strategies on the monitoring of cyanobacteria in shallow lakes: Lessons from a case study in France. Water Research 45, 1005–1014. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.011

Preece, E.P., Moore, B.C., Hardy, F.J., 2015. Ecotoxicology and Environmental Safety Transfer of microcystin from freshwater lakes to Puget Sound , WA and toxin accumulation in marine mussels (Mytilus trossulus). Ecotoxicology and Environmental Safety 122, 98–105. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.07.013

Salmaso, N., Bernard, C., Humbert, J.-F., Akçaalan, R., Albay, M., Ballot, A., Catherine, A., Fastner, J., Häggqvist, K., Horecká, M., Izydorczyk, K., Köker, L., Komárek, J., Maloufi, S., Mankiewicz-Boczek, J., Metcalf, J.S., Quesada, A., Quiblier, C., Yéprémian, C., 2017. Basic Guide to Detection and Monitoring of Potentially Toxic Cyanobacteria, in: Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 46–69. https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch6

Sano, T., Nohara, K., Shiraishi, F., Kaya, K., 1992. A method for micro-determination of total microcystin content in waterblooms of cyanobacteria (blue-green algae). International Journal of Environmental Analytical Chemistry 49, 163–170. https://doi.org/10.1080/03067319208027567

Simis, S.G.H., Peters, S.W.M., Gons, H.J., 2005. Remote sensing of the cyanobacterial pigment phycocyanin in turbid inland water. Limnology and Oceanography 50, 237–245. https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.1.0237

Spoof, L., Arnaud, C., 2017. Appendix 3: Tables of Microcystins and Nodularins, in: Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. pp. 526–537. https://doi.org/10.1002/9781119068761.app3

Strayer, D.L., 2008. Freshwater Mussel Ecology. https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2

Su, L., Cai, H., Kolandhasamy, P., Wu, C., Rochman, C.M., Shi, H., 2018. Using the Asian clam as an indicator of microplastic pollution in freshwater ecosystems. Environmental Pollution 234, 347–355. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.075

Swhalb, A., Pusch, M., 2007. Horizontal and vertical movements of unionid mussels in a lowland river. Journal of the North American Benthological Society 26, 261–272. https://doi.org/10.1899/0887-3593(2007)26[261:HAVMOU]2.0.CO;2

Tillmanns, A.R., Pick, F.R., Aranda-Rodriguez, R., 2007. Sampling and analysis of microcystins: Implications for the development of standardized methods. Environmental Toxicology 22, 132–143. https://doi.org/10.1002/tox.20250

van Apeldoorn, M.E., van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A., Bakker, G.J.I., 2007. Toxins of cyanobacteria. Molecular Nutrition & Food Research 51, 7–60. https://doi.org/10.1002/mnfr.200600185

Watanabe, M.F., Tsuji, K., Watanabe, Y., Harada, K., Suzuki, M., 1992. Release of heptapeptide toxin (microcystin) during the decomposition process of Microcystis aeruginosa. Natural Toxins 1, 48–53.

White, J.D., Sarnelle, O., 2014. Size-structured vulnerability of the colonial cyanobacterium, Microcystis aeruginosa, to grazing by zebra mussels (Dreissena polymorpha). Freshwater Biology 59, 514–525. https://doi.org/10.1111/fwb.12282

Winkel, E.H. TEN, Davids, C., 1982. Food selection by Dreissena polymorpha Pallas (Mollusca: Bivalvia). Freshwater Biology 12, 553–558. https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1982.tb00647.x

Woller-Skar, M.M., Jones, D.N., Luttenton, M.R., Russell, A.L., 2015. Microcystin Detected in Little Brown Bats (Myotis lucifugus). The American Midland Naturalist 174, 331–334. https://doi.org/10.1674/0003-0031-174.2.331

Yokoyama, A., Park, H.D., 2002. Mechanism and prediction for contamination of freshwater bivalves (Unionidae) with the cyanobacterial toxin microcystin in hypereutrophic Lake Suwa, Japan. Environmental Toxicology 17, 424–433. https://doi.org/10.1002/tox.10075

Zuykov, M., Pelletier, E., Harper, D.A.T., 2013. Bivalve mollusks in metal pollution studies: From bioaccumulation to biomonitoring. Chemosphere 93, 201–208. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.001

Chapitre VI : Discussion générale

Avec l'augmentation de la fréquence et de la sévérité des proliférations de cyanobactéries (Hudnell, 2008), le besoin de détecter celles-ci et leurs toxines, afin d'établir un suivi et des mesures préventives de gestion des masses d'eau, est grandissant. Cette situation conduit au développement de différents outils permettant d'évaluer la qualité de l'eau. La synthèse bibliographique a permis de citer les principales méthodologies utilisées dans cet optique ainsi que l'identification de leurs principales limites. Il apparait ainsi qu'une simple analyse visuelle des proliférations ou une identification des espèces phytoplanctoniques présentes dans la colonne d'eau ne suffit pas à déterminer le niveau de contamination par les cyanobactéries productrices de MCs (Pobel et al., 2011). En effet, la production de cyanotoxines est variable selon les espèces, selon les souches chez les espèces productrices, et selon les conditions environnementales chez les souches productrices. Le dosage des MCs intracellulaires (dans la biomasse phytoplanctonique) reste donc indispensable pour une évaluation de la contamination environnementale. Cependant, la détermination des dynamiques de présence de cyanobactéries productrices de MCs dans l'eau, via des dosages ponctuels, reste insuffisante en lien avec les variations spatiales (distribution parcellaire, mouvements verticaux dans la colonne d'eau par la présence de vésicules gazeuses, et horizontaux par effets des vents) et temporelles (brusques apparition et disparition des efflorescences) dans le développement des cyanobactéries (Salmaso et al., 2017; Qi et al., 2018). Des prélèvements de phytoplancton et dosages ponctuels des cyanotoxines peuvent ainsi ne pas représenter l'historique global de contamination entre deux dates de suivi (Pobel et al., 2011).

De plus, alors que les organismes capables de produire des MCs sont connus, peu de données existent concernant les producteurs de la neurotoxine BMAA. Les seules données existant à ce jour ont mis en évidence la production de BMAA en laboratoire par quelques espèces de cyanobactéries comme *Leptolyngbya* sp. ou *Nostoc* sp. (Spáčil et al., 2010; Berntzon et al., 2013; Jiang et al., 2013), et par certains diatomées et dinoflagellés (Lage et al., 2014; Réveillon et al., 2016a, 2015). La biodisponibilité de cette molécule, aussi bien sous forme dissoute qu'intracellulaire, en milieu naturel est également inconnue. Cette absence d'informations est liée à la difficulté d'analyser la BMAA en milieu naturel. En effet, comme le reporte la synthèse bibliographique, la BMAA est un acide aminé hydrophile possédant sept isomères qui peuvent interférer dans son identification (Jiang et al., 2012). Ainsi, afin d'éviter d'obtenir de faux positifs, l'analyse de la BMAA dans l'environnement requiert l'utilisation de méthodes très sélectives comme la LC-MS/MS (Faassen, 2014). Pour ces raisons, peu de données sont disponibles concernant l'occurrence et la biodisponibilité de la BMAA en milieu naturel.

Dans un tel contexte, l'utilisation d'espèces bioindicatrices, déjà reconnues comme outils intégrateurs de la présence de différents contaminants (e.g., composés organochlorés, microplastiques, éléments trace métalliques) (Camusso et al., 1994; Baqar et al., 2018; Su et al., 2018), pourrait être pertinente afin de détecter la présence de cyanobactéries productrices de MCs et de BMAA dissoutes dans les eaux douces. Ceci en vue d'établir un diagnostic global des niveaux de contamination des sites, en complément des méthodes utilisées actuellement. Cet outil intégrateur simple permettrait de mieux connaitre la dynamique des développements de cyanobactéries toxiques d'un site en vue d'établir par la suite des actions ciblées visant à réduire ces proliférations ou à maitriser les risques associés. Cependant, l'analyse de ces deux toxines dans les tissus de bivalves représente également un challenge. Un bilan des principales méthodes d'analyse des MCs et de la BMAA dans les matrices environnementales et de leurs limites a été présenté dans la synthèse bibliographique. Il apparait ainsi que les MCs et la BMAA existent sous différentes formes dans les tissus d'organismes contaminés, certaines reflétant potentiellement les variations temporelles d'occurrence et de biodisponibilité de ces toxines dans le milieu. Ainsi, il est possible d'analyser les MCs libres ou les MCs totales (libres et liées à des protéines) dans les tissus. Les différentes formes sous lesquelles la BMAA s'accumule sont : libre, associée à des polypeptides de faible poids moléculaire ou associée à des polypeptides de haut poids moléculaire, la BMAA totale représentant la somme de toutes les fractions. Enfin, alors qu'il est connu que l'organe d'accumulation principal des MCs chez les invertébrés est la glande digestive (Watanabe et al., 1997; Yokoyama and Park, 2002; Neffling et al., 2010), l'organotropisme de la BMAA est inconnu. Or, l'identification de l'organe cible d'une toxine au sein d'un organisme bioindicateur est important car cela permet de pouvoir cibler un seul tissu si les organismes sont de grande taille comme le bivalve *A. anatina*, dont la longueur peut atteindre jusqu'à 9,3 cm (Gopko et al., 2017).

Dans ce contexte, ce travail de doctorat avait pour objectif d'évaluer la pertinence des bivalves dulcicoles *D. polymorpha* (organisme entier) et *A. anatina* (utilisation de la glande digestive) comme outil de biosurveillance de la contamination des milieux aquatiques par les cyanotoxines MCs et par la toxine environnementale BMAA. L'objectif de était également de déterminer la fraction d'accumulation de chacune de ces toxines dans les tissus des bivalves, la plus pertinente à analyser dans un contexte de biosurveillance. En raison de la plus grande taille d'*A. anatina* par rapport à *D. polymorpha* (respectivement 6,5 ± 0,05 cm et 2 ± 0.3

cm chez les individus étudiés lors de cette thèse), seul un organe a été sélectionné pour analyser les toxines chez *A. anatina*. En effet, le dosage de la BMAA totale s'effectue avec 1 mg de tissus lyophilisé, ce qui représente moins de 1 % de la masse de tissus sec d'une anodonte entière. Comme il est peu probable que la masse de tissus prélevée chez l'anodonte soit représentative de la totalité de l'organisme, il est préférable de ne prélever qu'un seul tissu afin de limiter la variabilité inter échantillon. La glande digestive a été sélectionnée à cet effet, car elle est l'organe cible des MCs chez les bivalves, et l'objectif était de proposer un même outil pour la biosurveillance de la BMAA et des MCs. Concernant *D. polymorpha*, le corps entier a été conservé en raison de sa petite taille rendant plus délicate la dissection de la glande digestive. De plus, la masse de cet organe est faible, et pour obtenir les 10 mg de tissus lyophilisés nécessaires aux dosages de MCs, il faudrait entre 6 et 10 individus. Considérant la nécessité de faire des réplicats de quantification, cela peut engendrer l'utilisation d'un trop grand nombre d'individus pour une biosurveillance à grande échelle. Ainsi, les deux outils d'étude sont les glandes digestives de *A. anatina* et les individus entiers de *D. polymorpha*.

Pour répondre à ces objectifs, les principales étapes de ces travaux de thèse ont été :

- 1) connaitre la distribution de la BMAA sous ses différentes fractions d'accumulation dans les différents organes des bivalves,
- 2) étudier les cinétiques d'accumulation et d'élimination de la BMAA totale par les deux bivalves *D. polymorpha* et *A. anatina*, exposés par balnéation à un gradient de concentrations environnementales de BMAA dissoute,
- 3) étudier l'ingestion de cyanobactéries et les cinétiques d'accumulation et d'élimination des MCs libres et totales par les deux bivalves exposés par balnéation à un gradient de concentrations environnementales de cyanobactéries productrices de MCs,
- 4) confronter l'usage de ces deux bivalves sur le terrain, via leur encagement dans un lac sujet à des proliférations de cyanobactéries, en comparant leurs capacités d'accumulation de MCs avec la concentration en MCs intracellulaires présentes dans le milieu et avec la composition des communautés phytoplanctoniques. L'analyse de la BMAA totale dans les bivalves a également été effectuée.

Les paragraphes qui suivent présentent un récapitulatif des réponses apportées par les travaux effectués, ainsi que les perspectives de recherche et d'applications qu'ils ouvrent vis-à-vis de l'intérêt de l'utilisation de ces deux modèles pour la biosurveillance des cyanobactéries productrices de MCs et de la BMAA dans les eaux douces.

I. Détermination des organes cibles et des fractions d'accumulation de la BMAA chez un bivalve d'eau douce.

Peu de données sont disponibles sur la distribution de la BMAA dans les tissus de bivalves. De plus, il existe une grande hétérogénéité des fractions analysées dans les échantillons de bivalves : BMAA libre, associée aux polypeptides de faible et haut poids moléculaire et BMAA totale, regroupant l'ensemble de ces fractions (Faassen, 2017). C'est pourquoi nous avons étudié l'accumulation et l'élimination de ces différentes fractions dans les tissus d'un des deux modèles, *D. polymorpha*. Comme à ce jour aucun micro-organisme phytoplanctonique capable de synthétiser de la BMAA de manière constante en laboratoire n'a été identifié, le modèle d'étude a été exposé à de la BMAA dissoute par balnéation.

L'exposition de *D. polymorpha* à 7.5 µg BMAA/individu/3 jours a montré une accumulation de BMAA dans tous les tissus et dans l'hémolymphe, du premier jour d'exposition jusqu'au dernier jour de dépuration (après 21 jours dans l'eau claire). La concentration de BMAA mesurée dans l'hémolymphe était en moyenne 10.8 fois supérieure à celles mesurées dans tous les autres organes pendant la période d'exposition. Bien que non invasif, le prélèvement d'hémolymphe n'apparait pas comme étant pertinent à utiliser dans un contexte de biosurveillance car il s'effectue par ponction au niveau du muscle adducteur postérieur, ce qui nécessite une connaissance accrue de l'anatomie du bivalve, au risque de prélever de l'eau présente dans l'espace intervalvaire ou des cellules provenant d'un autre tissu comme la gonade. Les résultats de cette exposition ayant mis en évidence l'absence d'organe cible de la BMAA chez *D. polymorpha*, le prélèvement de la totalité des tissus mous est à privilégier pour étudier l'accumulation de BMAA chez cette espèce. Dans le cas d'*A. anatina*, la glande digestive peut être utilisée pour la biosurveillance de la BMAA, mais en ayant connaissance que la quantité de BMAA mesurée dans cet organe ne représentera qu'une fraction (environ 12,3 % des tissus mous) de l'accumulation totale chez le bivalve.

Concernant les différentes formes d'accumulation dans les tissus, la BMAA est retrouvée sous forme libre et associée aux polypeptides de faible poids moléculaire dans tous les organes et tissus analysés (glande digestive, gonade, branchies, manteau, muscles et pieds). Aucune BMAA associée aux polypeptides de haut poids moléculaire n'a été retrouvée dans l'ensemble des tissus (avec une interrogation concernant les muscles pour lesquels les résultats ne sont pas encore disponibles à ce jour). A la fin de la période de dépuration, la BMAA était

majoritairement sous forme associée à des polypeptides de faible poids moléculaire dans les tissus mous, mis à part dans le pied et les muscles dans lequel la BMAA était majoritairement libre. Ces résultats sont en accord avec la littérature montrant que la forme associée à des polypeptides de faible poids moléculaire est majoritaire quand l'ensemble des fractions ont été quantifiées. C'est par exemple le cas chez *Mytilus edulis* (Rosén et al., 2016b). A contrario, de la BMAA libre et dans la fraction associée à des polypeptides de haut poids moléculaire a été retrouvée dans des tissus de *D. polymorpha* exposée à environ 100 µg de BMAA radiomarquée/L (Downing et al., 2014). Or, dans cette étude, la BMAA associée à des polypeptides de faible poids moléculaire n'a pas été quantifiée. De la même manière, uniquement de la BMAA associée à des polypeptides de fort poids moléculaire a été quantifiée dans les tissus du bivalve *Cerastoderma edule* prélevé au Portugal (Lage et al., 2014). L'omission de la mesure de la BMAA associée à des polypeptides de faible poids moléculaire est reconnue pour potentiellement induire une sous-estimation de la concentration en BMAA totale dans l'échantillon. Par contre, la seule quantification de cette fraction, majoritaire, ne conduirait pas à une sous-estimation trop importante de la concentration totale de BMAA dans l'échantillon (Faassen et al., 2016; Lance et al., 2018). Afin d'obtenir une quantification réaliste de l'accumulation chez des organismes, l'analyse de la BMAA totale, intégrant toutes les fractions d'accumulation, dans les matrices biologiques apparait plus pertinente. De plus, nos résultats montrent que sa dynamique d'accumulation et d'élimination dans les tissus des bivalves ne diffère pas des autres formes d'accumulation, ce qui indique qu'elle peut avoir la même pertinence pour révéler les variations des niveaux de contamination environnementales que l'analyse simultanée de toutes les fractions.

Les résultats de cette étude suggèrent que les branchies et le manteau sont une voie d'entrée de la BMAA dissoute dans les tissus de *D. polymorpha*. La BMAA serait ensuite transportée par l'hémolymphe vers les autres organes (glande digestive, gonade, muscles et pied), qui accumulent rapidement (dès 24h d'exposition) cette toxine sous forme libre et sous forme associée à des polypeptides de faible poids moléculaire. Au niveau des muscles et du pied, l'augmentation de la concentration en BMAA libre pendant la période de dépuration, associée à une diminution de la concentration de la fraction associée à des polypeptides de faible poids moléculaire, suggère une potentielle métabolisation ou biotransformation des complexes BMAA/polypeptides induisant un relargage de BMAA libre. La nature de l'association de la BMAA avec les polypeptides cellulaires, ainsi que les processus de métabolisation et de détoxification potentielle de cette fraction d'accumulation, sont à étudier. De plus, afin

d'approfondir la connaissance sur la cinétique de distribution de la BMAA dans les tissus, il serait intéressant d'analyser les concentrations de BMAA libre et de BMAA associée aux polypeptides de faible et haut poids moléculaire dans l'hémolymphe. Nous n'avons pas pu réaliser cette analyse par manque de matériel biologique.

II. Pertinence des deux modèles pour la biosurveillance de la BMAA dans les eaux douces

L'objectif était d'évaluer la pertinence des bivalves en tant que bioindicateurs de la présence de BMAA dans le milieu, et de déterminer s'il existe un seuil minimal de concentration environnementale engendrant une accumulation chez les bivalves. Les deux organismes ont été exposés 21 jours à un gradient de concentrations de BMAA (1, 10 et 50 µg BMAA dissoute/L), comprenant les valeurs de concentrations environnementales actuellement disponibles, comprises entre 0,3 µg/L (Roy-Lachapelle et al., 2015) et 36,9 µg/L (Al-Sammak et al., 2014). L'exposition a été suivie de 42 jours de dépuration dans l'eau claire.

Les résultats ont montré que la BMAA a été détectée dans deux des trois glandes digestives de témoins d'*A. anatina* analysées. Il est possible que les individus aient accumulé de la BMAA au cours de leur élevage aquatique, probablement lors de l'ingestion d'organismes producteurs de BMAA. Il est également possible que la molécule soit constitutive des bivalves, comme suggéré lorsque la BMAA avait été systématiquement retrouvée dans des bivalves marins (Réveillon et al., 2016a). Cependant, l'analyse de la BMAA dans les tissus de *D. polymorpha* avec la même technique d'extraction et les mêmes équipements a mis en évidence l'absence de BMAA chez des individus non exposés de cette espèce lors de cette étude et lors de précédentes investigations (Reveillon, 2015; Lance, com. pers). *D. polymorpha* ayant subi une période de stabulation plus longue qu'*A. anatina* avant l'exposition a potentiellement pu éliminer la BMAA La présence de BMAA chez les témoins d'*A. anatina* mais pas chez ceux de *D. polymorpha*, ainsi que les quantités faibles et constantes de BMAA retrouvées chez les deux bivalves exposés à 1 µg BMAA/L, ne peuvent donc pas être expliquées par le fait que la molécule soit constitutive des tissus. Une autre hypothèse pourrait être la présence d'un effet matrice lié à la méthode d'analyse, mais elle n'est pas appuyée par nos résultats chez les témoins *D. polymorpha*. Il est donc possible qu'à de faibles niveaux d'exposition environnementale (1 µg BMAA/L dans cette étude ou lors de l'élevage d'*A. anatina*), la BMAA soit retrouvée dans les tissus des bivalves en bruit de fond sans réelle cinétique d'accumulation. Chez *A. anatina*, la concentration de BMAA dans les individus

témoins (3,3 ± 1,3 µg BMMA/g DW) n'était pas différente de celles mesurées dans les individus de la même espèce exposés à 1 µg BMAA/L (4,4 ± 1,0 µg BMMA/g DW), ni dans ceux exposés à 10 µg BMAA/L (5,5 ± 0,8 µg BMMA/g DW). Par contre, une accumulation significative de BMAA est observée à partir du premier jour d'exposition à 50 µg BMAA/L. Une bioaccumulation significative de BMAA chez *A. anatina* a donc lieu dans une fourchette de concentration environnementale comprise entre 10 et 50 µg BMAA/L, limitant son utilisation en bioindication à des sites plus contaminés en BMAA dissoute.

Concernant *D. polymorpha*, les individus entiers accumulent de la BMAA à partir d'une concentration environnementale de 10 µg BMAA/L. Cette accumulation augmente significativement tout au long de l'exposition, et est significativement plus importante à la concentration d'exposition de 50 µg BMAA/L qu'à 10 µg BMAA/L (maximum de 223,5 versus 22,7 µg BMAA/g DW respectivement). Pour chacune de ces conditions d'exposition, les résultats montrent un pourcentage constant (5,4 ± 1,43 %) de BMAA accumulée par rapport à la quantité disponible dans le milieu chez D. polymorpha. Cette étude a également mis en évidence une plus faible accumulation (environ dix fois moins) de BMAA dans les glandes digestives d'*A. anatina* comparé aux individus entiers de *D. polymorpha*. Ceci peut être attribué au fait que la BMAA ne possède pas d'organe d'accumulation cible, la BMAA contenue dans la glande digestive ne représentant qu'une fraction de la totalité de la BMAA présente dans les individus entiers. En raison de la différence dans les valeurs seuil d'accumulation (10 versus 50 µg BMAA/L), et de la proportionnalité entre l'accumulation dans les tissus et les doses d'exposition, les individus entiers *D. polymorpha* semblent plus pertinents dans un contexte de biosurveillance de la BMAA que les glandes digestives d'*A. anatina*. Les glandes digestives d'*A. anatina* peuvent être utilisées pour révéler la présence de BMAA à des concentrations environnementales supérieures à 50 µg BMAA/L alors que *D. polymorpha* peut être utilisée dès 10 µg BMAA/L. Des cinétiques d'accumulation à des concentrations d'exposition supérieures pourraient être réalisées pour compléter ces résultats.

Cette expérimentation a également montré une élimination lente de la BMAA chez les deux bivalves. En effet, la BMAA est toujours détectée dans les tissus de *D. polymorpha* exposée à 10 et 50 µg BMAA/L ou dans les glandes digestives d'*A. anatina* exposées à 50 µg BMAA/L après 42 jours dans l'eau claire. L'élimination seulement partielle de la BMAA des tissus des bivalves après 42 jours (-49,6 % et -94,5 % chez *D. polymorpha* et *A. anatina* respectivement) induit un potentiel risque de surestimation de la contamination actuelle d'un milieu dans le

cadre d'une stratégie de biosurveillance passive, via le prélèvement d'individus autochtones. De plus, si une surveillance de la dynamique de cette toxine dans l'eau est souhaitée, en termes de présence et d'absence, alors il pourrait être envisagé d'effectuer une biosurveillance active avec des successions régulières d'encagements d'individus sains.

III. Détermination du bivalve et de la fraction d'accumulation de MCs les plus pertinents pour la biosurveillance des organismes producteurs de MCs dans les milieux.

La dreissène *D. polymorpha* est connue pour effectuer un tri des particules alimentaires, ingérant préférentiellement les micro-algues unicellulaires par rapport à des micro-algues coloniales de même taille (Winkel and Davids, 1982). Ainsi, nous pouvons supposer qu'une disparité d'ingestion pourrait exister de la même manière pour les cyanobactéries, avec une disparité d'ingestion entre les espèces filamenteuses et les cyanobactéries coloniales, dont les cellules sont regroupées et entourées d'une gangue de mucus. Les études menées en conditions contrôlées sur l'accumulation de MCs par les bivalves d'eau douce à la suite de l'ingestion de cyanobactéries concernent le genre de cyanobactéries *Microcystis* (Amorim and Vasconcelos, 1999; Dionisio Pires et al., 2004; Lauceri et al., 2017; Pham et al., 2015; Sabatini et al., 2011). Peu de données sont disponibles sur l'accumulation de MCs par des bivalves suite à l'ingestion de cyanobactéries filamenteuses en laboratoire, bien que cette ingestion ait été suggérée *in situ* (De Pace et al., 2014; Larson et al., 2014; Paldavičienė et al., 2015). Par ailleurs, le genre *Planktothrix* étant très commun dans l'hémisphère Nord (Chorus and Bartram, 1999; Kurmayer and Gumpenberger, 2006), nous avons choisi d'exposer les deux bivalves à une souche productrice de MCs de l'espèce filamenteuse *Planktothrix agardhii*. L'exposition des deux bivalves à des filaments de *P. agardhii* a montré qu'ils étaient capables d'ingérer les filaments de cyanobactéries, conduisant à l'accumulation de MCs dans leurs tissus.

Les MCs s'accumulent sous forme libre ou liée à des protéines, notamment des protéines phosphatases, dans les tissus des organismes. Des études menées chez des gastéropodes et des bivalves (*D. polymorpha*) ont montré que la forme liée pouvait être la forme principale d'accumulation de MCs (Dionisio Pires et al., 2004; Lance et al., 2010c), représentant jusqu'à 70% des MCs totales dans les tissus pendant une exposition à des cyanobactéries productrices de MCs. Cette différence pourrait être attribuée à une différence des cinétiques de détoxification des deux formes d'accumulation des MCs dans les matrices biologiques. La voie de détoxification des MCs la plus décrite implique l'enzyme de détoxication Glutathion-S-Transférase (GST), catalysant la formation d'un complexe MCs-GSH (Kondo et al., 1992),

favorisant ainsi l'excrétion des MCs (Hudnell, 2008). La formation d'un complexe MC-LR-GSH a été mis en évidence chez différents organismes aquatiques comme des plantes (*Ceratophyllum demersum*), des invertébrés (dont *D. polymorpha*) et des poissons (Pflugmacher et al., 1998). Un autre mécanisme favorisant l'élimination des MCs implique le système de résistance multixénobiotique (MXR), basé sur la surexpression de glycoprotéines-P transmembranaires, qui vont pomper activement diverses substances, dont potentiellement les MCs, hors des cellules, empêchant leur accumulation dans les tissus (Bard, 2000; Contardo-Jara et al., 2008). Chez des mollusques gastéropodes, l'élimination des MCs liées est plus longue que celle des MCs libres, et potentiellement associée au turnover des protéines auxquelles elles sont liées (Lance et al., 2010b). L'exposition des deux bivalves à *P. agardhii* a montré que les MCs totales étaient toujours présentes après 21 jours de dépuration dans les tissus des deux modèles. Or, les MCs libres sont entièrement éliminées dès le troisième jour de dépuration des individus entiers de *D. polymorpha* exposés à un équivalent de 1 µg MCs/L, et à partir du septième jour de dépuration dans ceux exposés à un équivalent de 10 µg MCs/L. Cependant, chez *D. polymorpha* exposée à 100 µg MCs/L, des MCs libres sont encore présentes dans les tissus après 21 jours de dépuration, de même que dans les glandes digestives d'*A. anatina* quel que soit la concentration d'exposition. Les MCs libres étant éliminées plus rapidement des tissus, il est possible que l'analyse de cette fraction permette de refléter les variations de concentrations environnementales. Ceci pourrait expliquer pourquoi les MCs étaient détectées sous formes libres dans 30,4 % des échantillons provenant du lac de l'Ailette, toute espèce confondue, alors que les MCs totales étaient détectées dans 75,5 % des échantillons. Les résultats acquis ont confirmé l'hypothèse selon laquelle les MCs libres reflètent les variations de la concentration de MCs intracellulaires dans le milieu, alors que l'analyse des MCs totales fournit une information quantitative plus précise de la contamination des bivalves par les MCs pendant une intoxication.

En plus des différences observées dans les taux d'élimination entre les formes d'accumulation des MCs, il existe également des différences inter-spécifiques de capacités d'accumulation et de détoxification des MCs libres et des MCs totales. L'exposition a montré que les glandes digestives d'anodontes accumulaient 42,6 ± 13,0 fois plus de MCs totales et 17,3 ± 7,0 fois plus de MCs libres que *D. polymorpha*. De plus, les pourcentages d'élimination moyens des MCs pendant la dépuration sont plus élevés chez les dreissènes entières (-96,6 ± 1,8 % pour les MCs libres et -85,6 ± 0,5 % pour les MCs totales), que dans les glandes digestives d'anodontes (-74,3 ± 14,2 % pour les MCs libres et -35,5 ± 19,4 % pour les MCs totales). Ces

différences pourraient s'expliquer par une différence d'organes étudiés, de taux de filtration et de tri des particules alimentaires, et/ou de capacités d'élimination des MCs.
En effet, nous avons comparé les concentrations en MCs libres et totales entre un organe cible (glande digestive d'*A. anatina*) et l'ensemble des tissus mous (*D. polymorpha*). Afin de comparer les capacités d'accumulation de MCs par les deux espèces sur les mêmes tissus, à certaines dates (jours 7 et 21 d'exposition et troisième jour de dépuration) de l'exposition, l'analyse des MCs totales a aussi été menée sur l'ensemble des tissus mous d'*A. anatina* et spécifiquement dans les glandes digestives de *D. polymorpha*. Les résultats ont montré que les concentrations en MCs totales étaient plus élevées dans les glandes digestives d'anodontes que dans le même organe chez *D. polymorpha* (concentrations maximales respectivement de 23,38 versus 1,46 µg/g MCs DW à 1 µg MCs/L ; 116,18 versus 3,37 µg/g MCs DW à 10 µg MCs/L, et 99,11 versus 14,15 µg/g MCs DW à 100 µg MCs/L). De plus, la comparaison de l'accumulation dans les corps entiers des deux espèces démontre aussi une plus forte accumulation chez *A. anatina* versus *D. polymorpha*. Ainsi, des différences de capacités d'accumulation de MCs entre les deux modèles existent, et ne sont pas liées à la différence d'organe utilisé pour la quantification des MCs.

Les différences d'accumulation des MCs libres et totales entre les deux modèles pourraient s'expliquer par des différences de taux de filtration et de tri des particules alimentaires. Le taux de filtration de *D. polymorpha* est compris entre 5 à 400 mL/individu par heure (Binelli et al., 2015) et entre 620 et 1900 mL/individu/heure chez *A. anatina* (Strayer, 2008). Les mesures du nombre de filaments de cyanobactéries ingérés/individu/jour rapportés au poids total des individus ont mis en évidence que les anodontes exposées à une densité de *P. agardhii* produisant un équivalent de 10 et 100 µg MCs/L avaient ingéré 5,5 ± 1,1 fois plus de filaments que les dreissènes exposées aux mêmes densités. Il est également possible que les deux espèces aient trié des filaments de *P. agardhii*, les rejetant sous forme de pseudo-fèces. La production d'une grande quantité de pseudo-fèces peut aboutir à l'évacuation de celles-ci non par le siphon inhalant, mais par la fente ventrale de la coquille par laquelle le pied peut passer (Guillaume Juhel et al., 2006). Or, le dispositif expérimental utilisé lors de l'exposition des modèles à *P. agardhii*, basé sur un système dont l'air provenait par le bas des aquariums, ne permettait pas d'observer ni de quantifier la création de pseudo-fèces par les deux espèces. En effet, ceux-ci auraient été remis en suspension, repositionnant les cyanobactéries dans l'eau. Ainsi, les comptages cellulaires n'ont potentiellement renseigné que sur le nombre de

filaments ingérés par les deux espèces, et n'ont pas comptabilisé comme ingérés les filaments rejetés dans les pseudo-fèces.

Enfin, une des raisons pour lesquelles les concentrations de MCs libres et totales étaient plus importantes dans les glandes digestives d'*A. anatina* comparé aux individus entiers de *D. polymorpha* pourrait s'expliquer par une inégale efficacité des systèmes de détoxification des MCs par les deux modèles. Il est possible que les mécanismes de détoxification des MCs se soient activés dès le premier jour d'exposition pour toutes les concentrations chez *D. polymorpha*, se traduisant par une détection plus tardive de MCs que dans les glandes digestives d'*A. anatina*. De plus, une induction précoce et constante des mécanismes de détoxification chez *D. polymorpha*, dès la concentration d'exposition de 1 µg/L, pourrait expliquer les cinétiques d'accumulation des MCs concentration dépendante, avec des taux d'accumulation stables, observés chez cette espèce. *D. polymorpha* étant reconnue pour avoir une détoxication efficace des MCs (Burmester et al., 2012), il est possible que les différents systèmes impliqués dans l'élimination de cette toxine aient été déclenchés similairement pour toutes les densités d'exposition. Ceci expliquerait la constance de la relation entre les concentrations de MCs dans les individus entiers de *D. polymorpha* et dans le milieu. En revanche chez *A. anatina*, nous pouvons supposer que la détoxification des MCs soit activée plus tardivement et à une concentration d'exposition plus importante (> 10 µg/L). Nous avons en effet observé chez *cette espèce* que l'accumulation à la concentration d'exposition de 10 µg/L était, pour certaines dates, supérieure à celle à la concentration d'exposition de 100 µg/L, suggérant ainsi l'induction des mécanismes de détoxification au-delà du seuil de 10 µg/L. Ceci pourrait expliquer les cinétiques d'accumulation indépendantes des concentrations d'exposition, ainsi que les variations temporelles des taux d'accumulation observées. De plus, de fortes variations du pourcentage temporaire d'accumulation des MCs ont été observées dans les glandes digestives d'*A. anatina* et non chez *D. polymorpha*. De manière générale, dans cette étude, *D. polymorpha* accumule de plus faibles proportions des MCs ingérées qu'*A. anatina,* mais ces proportions sont plus constantes dans le temps et entre les concentrations d'exposition.

En parallèle des plus fortes teneurs en MCs chez *A. anatina* comparé à *D. polymorpha*, l'accumulation des MCs est également plus rapide chez *A. anatina*. Les MCs libres et totales sont détectées dans les glandes digestives d'*A. anatina* dès le premier jour d'exposition à une densité de cyanobactéries produisant un équivalent de 1 µg MCs/L, alors que pour une même

concentration d'exposition ces deux fractions ont été détectées dans les tissus de *D. polymorpha* qu'à partir du troisième jour d'exposition. Ces observations ont permis d'avancer l'hypothèse selon laquelle les glandes digestives d'*A. anatina* pourraient potentiellement rapidement (1 jour) refléter un faible niveau de contamination de l'eau par des cyanobactéries productrices de MCs (dès 1 µg MCs/L). Cette hypothèse semble avoir été confirmée grâce à l'étude menée sur le lac de l'Ailette, sujet à des proliférations annuelles de cyanobactéries. Lors des deux campagnes d'encagement actif des bivalves, la concentration en MCs intracellulaires était faible (inférieure à 1 µg MCs/L), et pourtant des MCs ont été détectées dans les glandes digestives d'*A. anatina* (55,2 % des échantillons). Ainsi, la mesure d'accumulation de MCs dans des glandes digestives d'*A. anatina* semble pertinente pour détecter rapidement (dès 1 jour) une faible densité de cyanobactéries productrices de MCs (dès 1 µg/L de MCs intracellulaires), et évaluer un risque potentiel lié à leur présence actuelle ou passée (environ 20 jours avant le dosage), en lien avec sa faible capacité d'élimination.

Le choix de privilégier l'organe cible des MCs chez cette espèce de grande taille (6,5 ± 0,05 cm), et non le corps entier, a été confirmé lors de cette étude. La mesure conjointe des MCs dans le corps entier d'*A. anatina* et dans les glandes digestives a montré une grande variabilité des concentrations de MCs dans les individus entiers. Ceci pourrait s'expliquer par la faible quantité (10 mg) de tissus utilisé pour les dosages au regard de la taille des individus (en moyenne 1,67 % de la masse des individus utilisée). Il est donc possible que ces 10 mg ne soient pas représentatifs de la concentration moyenne d'un individu entier malgré l'homogénéisation de l'ensemble des tissus lyophilisés avant le prélèvement. Ainsi, l'analyse des MCs dans la glande digestive est à privilégier.

L'analyse des MCs libres chez *D. polymorpha* semble être pertinente pour : (i) évaluer le niveau de contamination du milieu, en raison de ses capacités d'accumulation concentration dépendantes et stables dans le temps, et (ii) refléter la dynamique des organismes producteurs de MCs dans le milieu, en termes de développement et de disparition d'une efflorescence, en raison de ses capacités de détoxification et de l'élimination rapide des MCs libres après arrêt de l'exposition. Lors de l'exposition de ce modèle à une souche de *P. agardhii* produisant des MCs, l'élimination séquentielle des MCs *par D. polymorpha* a été observée pendant la dépuration (élimination dès le troisième jour de dépuration des individus entiers de *D. polymorpha* exposés à un équivalent de 1 µg MCs/L et à partir du septième jour de dépuration dans celles exposées à un équivalent de 10 µg MCs/L). Ces résultats, partiellement

confirmés lors de notre étude *in situ* avec un faible niveau de contamination environnementale (< 1 µg/L de MCs intracellulaires), nécessiteraient d'être approfondis et confirmés avec des encagements dans des zones où la concentration en MCs intracellulaires serait supérieure à 1 µg MCs/L.

IV. Applicabilité et transposition à grande échelle de l'utilisation des bivalves *A. anatina* et *D. polymorpha* pour la biosurveillance des cyanotoxines dans les masses d'eau douces

Comme vu précédemment, l'étude du niveau des niveaux de contamination des plans d'eau par les toxines environnementales MCs et BMAA peut être amélioé grâce à l'utilisation d'outils capables d'intégrer temporellement les variations de densités des organismes producteurs. Du fait du grand nombre de composés présents dans les masses d'eau, ces outils doivent être sélectifs et assez sensibles afin de donner l'information la plus pertinente possible. Les différentes études menées au cours de cette thèse ont confirmé le caractère intégrateur de cyanotoxines MCs et de BMAA des bivalves, et leur utilisation potentielle en biosurveillance. L'analyse des MCs libres et totales au sein des tissus de *D. polymorpha* et des glandes digestives d'*A. anatina* sont assez sensibles pour déterminer la présence de MCs intracellulaires à de faibles concentrations (<1 µg/L) dans le milieu. *In situ*, ces outils ont permis d'intégrer et de révéler une contamination ayant eu lieu entre deux dates de prélèvements de phytoplancton, qui n'était pas quantifiée dans les échantillons d'eau ponctuels. Ces résultats ont également été mis en évidence via l'encagement de *M. trossulus* et le prélèvement de bivalves autochtones aux Etats-Unis (Hathaway, 2001; Preece et al., 2015). Concernant la BMAA, les travaux menés ici ont permis de proposer l'utilisation des tissus entiers de *D. polymorpha* associé à un dosage de la BMAA totale pour surveiller la présence de cette toxine sous forme dissoute en milieu naturel.

Cependant, le choix du bivalve et de la fraction d'accumulation de MCs et de BMAA à étudier pourra varier en fonction de l'objectif de biosurveillance visé et de la fréquence de prélèvements envisagée. Le choix du modèle doit prendre compte la présence ou non de *D. polymorpha*, espèce invasive, reconnue pour avoir un impact négatif sur les activités humaines et les écosystèmes. En effet, par sa capacité à se fixer à de nombreux substrats immergés, la dreissène peut obstruer des prises d'eau d'installations publiques ou gêner au bon fonctionnement d'installations comme les centrales thermiques (Khalanski, 1997). Elle peut

également se fixer sur les coquilles d'Unionidés, les empêchant ainsi de s'enfouir, et altère leur respiration et leur prise alimentaire (Mackie, 1991). Ainsi, l'expansion de *D. polymorpha* se fait au détriment des espèces natives comme les Unionidés (Ricciardi et al., 1998). De plus, de nombreuses études ont avancé le fait que l'installation de *D. polymorpha* pourrait favoriser le développement de cyanobactéries productrices de MCs (Baker et al., 1998; Vanderploeg et al., 2001; Dionisio Pires and Van Donk, 2002; Raikow et al., 2004; Sarnelle et al., 2005; Woller-Skar, 2009; Huisman et al., 2018). Dans certains écosystèmes dulcicoles, l'invasion par *D. polymorpha* peut coïncider avec l'augmentation des proliférations de cyanobactéries toxiques de grandes tailles (Vanderploeg et al., 2001; Huisman et al., 2018). Ainsi, soit *D. polymorpha* ne filtrerait que de petites cellules et de petites colonies, au dépend de cellules ou colonies plus grandes (Huisman et al., 2018), ou ce phénomène serait lié au tri des particules par *D. polymorpha*, qui rejetterait préférentiellement sous forme de pseudo-fèces les souches très toxiques par rapport à des souches peu toxines comme observé avec *M. aeruginosa* (Guillaume Juhel et al., 2006). De plus, l'émission de pseudo-fèces contenant des cyanobactéries dans le milieu constitue une voie de contamination des réseaux trophiques via la biodéposition, ayant un impact négatif sur les organismes détritivores tel que les amphipodes (Babcock-Jackson et al., 2002).

Par ailleurs, le modèle de bivalve doit être choisi en fonction de l'hydrologie du site. Ce facteur n'est pas négligeable dans le choix de l'espèce à encager car, comme démontré sur le lac de l'Ailette, lorsque le niveau d'eau diminue et que la densité en matière organique en suspension est localement élevée, une fraction peut entrer dans les cages et conduire à une augmentation de la mortalité de *D. polymorpha*, sessile, alors que *A. anatina*, espèce vagile et fouisseuse (Jonsson et al., 2013; Lurman et al., 2014) peut se déplacer et se repositionner dans la cage afin de pouvoir continuer à filtrer de l'eau. Ainsi, *A. anatina* sera à privilégier dans des zones ou le niveau d'eau est susceptible de baisser et/ou de la matière organique peut entrer de manière importante dans les cages.

Le choix de l'outil doit être également fait selon le niveau de contamination du milieu par les cyanobactéries productrices de MCs. Si les densités atteintes lors des proliférations sont faibles ou modérées (< 20 000 cell/mL) ou si les cyanobactéries ne se développent pas assez intensément pour être visibles dans le site, la concentration en MCs intracellulaires sera probablement faible. Dans ce cas, l'encagement de l'espèce *A. anatina*, accumulant à des concentrations environnementales inférieures à 1 µg/L, est à favoriser. Le couple glande

digestive d'*A. anatina*-MCs libres peut être utilisé lors de prélèvements mensuels d'individus, en lien avec les capacités d'éliminations des MCs moins efficaces. Cependant, si l'objectif visé est de refléter globalement un niveau de contamination, ainsi que la dynamique de contamination par les cyanobactéries productrices de MCs, *D. polymorpha* sera à favoriser. L'utilisation de *D. polymorpha* associée à la mesure des MCs libres pourrait être pertinente lors de campagnes avec des prélèvements hebdomadaires, en lien avec les fortes capacités d'élimination des MCs libres de ce modèle.

Concernant la BMAA, son suivi dans le milieu pourrait être réalisé avec des individus entiers et en dosant la BMAA totale, chez *D. polymorpha*. Ce bivalve semble mieux refléter les niveaux de contamination de l'eau par la BMAA, et permet de mettre en évidence la présence de cette neurotoxine dès 10 µg BMAA dissoute/L. Or, si les dreissènes ne peuvent être utilisées dans un site, alors la glande digestive de *A. anatina* peut être utilisée en sachant que celles-ci ne permettent de mettre en évidence la présence de BMAA qu'à partir d'une concentration d'environ 50 µg BMAA dissoute/L.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont conduit à la création d'un arbre de décision facilitant la sélection des espèces à utiliser dans la biosurveillance des cyanobactéries productrices de MCs (Figure 41) et de la BMAA dissoute (Figure 42).

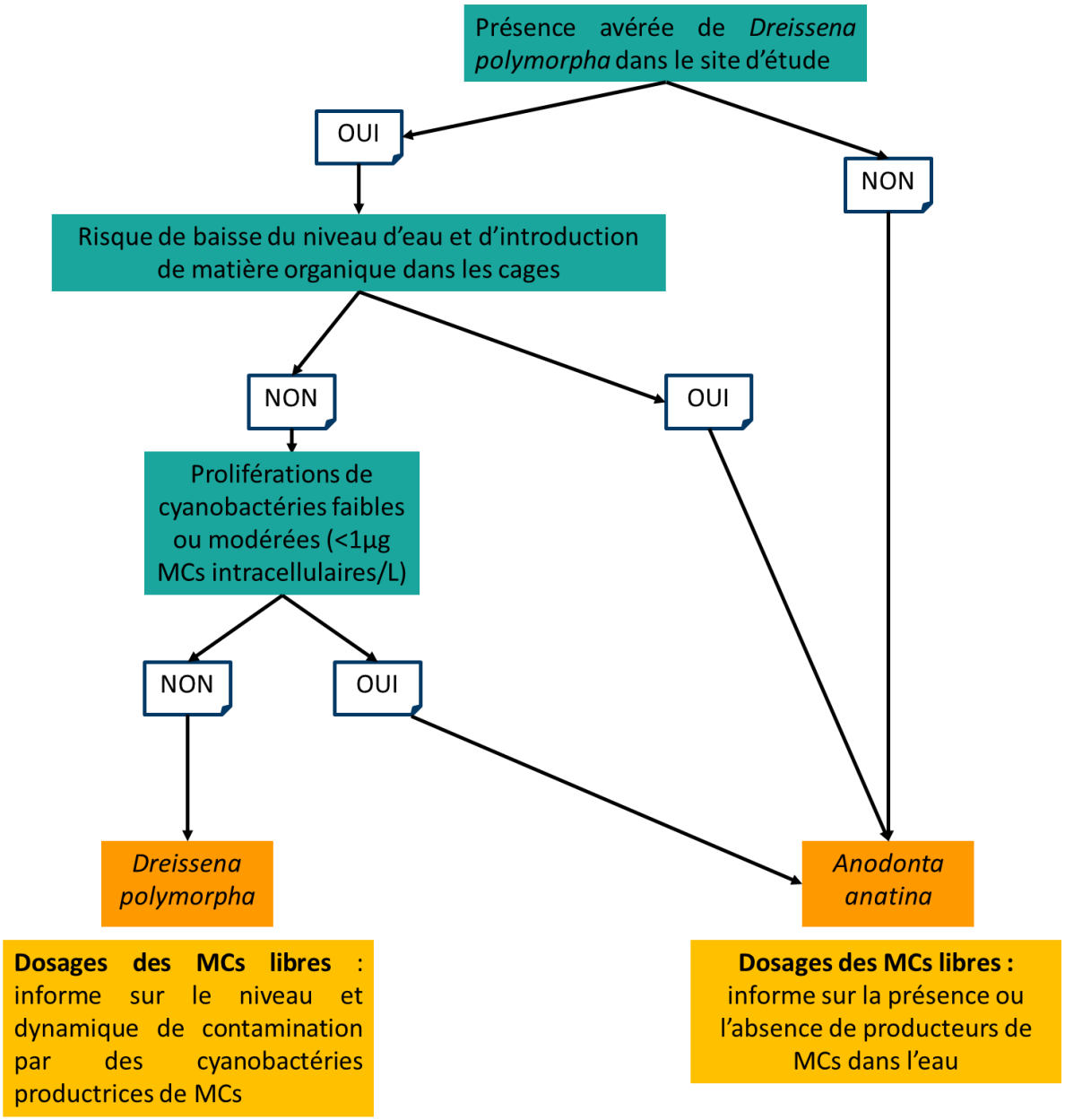

Figure 41 : Arbre de décision pour choisir l'outil de biosurveillance pouvant être utilisé afin d'étudier la présence de cyanobactéries productrices de MCs

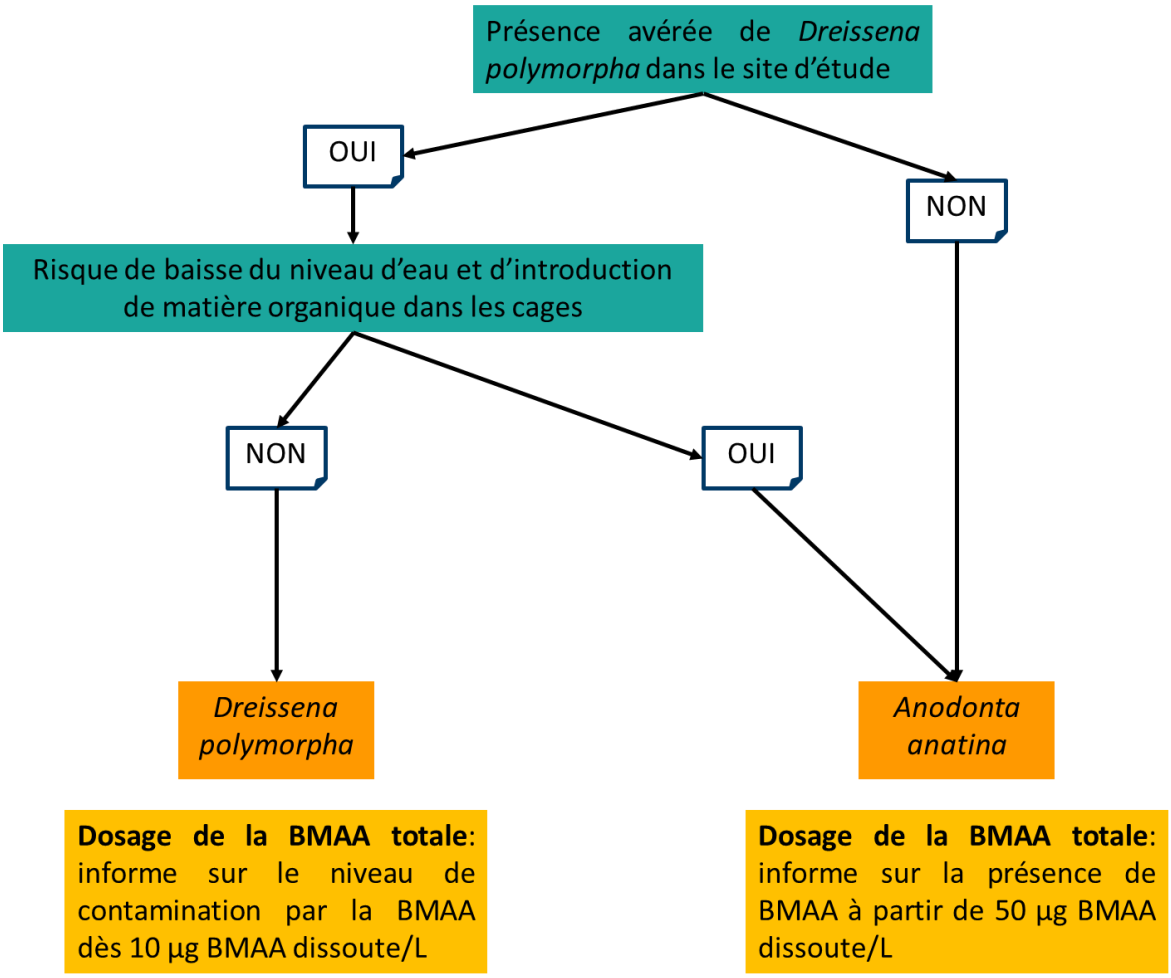

Figure 42 : Arbre de décision pour choisir l'outil de biosurveillance pouvant être utilisé afin d'étudier la présence de BMAA dissoute

Cependant, les cinétiques obtenues avec de la BMAA dissoutes ne permettent pas encore de supposer une application *in situ*, car elles sont incomplètes et ne représentent peut-être pas la biodisponilibité de la BMAA en milieu naturel. Des études ont montré que la voie alimentaire était la principale voie d'accumulation des MCs chez les bivalves, l'absorption des MCs dissoutes représentant une voie minoritaire (Prepas et al., 1997; Yokoyama and Park, 2002). Ceci peut en partie s'expliquer par la prédominance de la forme intracellulaire, dans les cyanobactéries, des MCs en milieu naturel. Concernant la BMAA, aucune donnée n'est disponible sur les proportions de BMAA intracellulaires (dans les producteurs) et dissoutes dans le milieu. Il serait intéressant : 1) de déterminer la biodisponibilité de la BMAA en milieu naturel, et 2) d'étudier les cinétiques d'accumulation et de détoxification de la BMAA lors d'expositions de bivalves à des organismes producteurs, afin d'évaluer la voie trophique d'intoxication et de la comparer à la voie branchiale.

Afin de limiter toute surestimation du risque de contamination de l'eau par ces toxines, l'utilisation d'un biomonitoring actif semble plus pertinent que le prélèvement d'individus sur les sites d'études. Ceci permet de s'assurer que les individus soient exempts de toxines avant leur déploiement sur site. La méthode d'encagement permet également de maitriser la fréquence de renouvellement des individus et ainsi le temps désiré d'intégration de la contamination du milieu, en fonction du type d'investigation souhaitée (présence de cyanotoxine, dynamique d'apparition et de disparition des producteurs, niveaux approximatifs de contamination).

Ainsi, *D. polymorpha* et les glandes digestives d' *A. anatina* sont potentiellement utilisables à grande échelle mais leur utilisation pourrait être implémentée : 1) du point de vue analytique, et 2) du point de vue de leur efficacité pour estimer des concentrations environnementales.

1) Concernant le volet analytique, la comparaison des concentrations en MCs libres et totales dans un même échantillon a permis de révéler que l'utilisation de tests ELISA pour la quantification des MCs libres, couplé à la détermination d'un seuil de détection obtenu via le dosage d'échantillons dépourvu de MCs, était assez sélective pour limiter la présence de faux-positifs. L'analyse de la concentration de MCs totales peut être difficile à appliquer pour envisager des suivis sanitaires et écologiques à grande échelle car elle est chronophage, requiert du matériel onéreux (LC-MS/MS) et du personnel qualifié. Il s'avère donc crucial d'améliorer cette méthode. Nous avons tenté de simplifier la procédure d'extraction. L'extraction en phase solide (SPE) a été comparée à une extraction à l'aide d'acétate d'éthyle (extraction dite « liquide-liquide ») sur des échantillons contenant une quantité déterminée de MCs et MMPB, ainsi que sur des échantillons de dreissènes exposées (à des densités de *P. agardhii* produisant un équivalent de 1-10 et 100 µg MCs/L). Les résultats ont montré que la méthode SPE était préférable car, même si la méthode liquide-liquide permettait d'obtenir de meilleurs rendements d'extraction (72,03 % contre 67,0 % avec SPE), l'extraction avec des cartouches SPE permet une meilleure purification de l'échantillon et d'améliorer la sensibilité de la méthode. D'autres techniques pour rompre les liaisons entre les MCs et les protéines existent tel que l'ozonolyse (Harada, 1996), mais cette méthode n'a pas été testée sur des matrices biologiques complexes (Cadel-Six et al., 2014). De même, le recours à l'utilisation d'enzymes ou encore la déconjugaison à pH basique (Miles et al., 2016) pourraient être une alternative à l'oxydation de Lemieux pour l'analyse des formes libre et liée. Des travaux sont nécessaires pour faciliter la quantification des MCs totales dans les compartiments biotiques,

dans un but de gestion écologique et de gestion des risques sanitaires. Concernant l'analyse de la BMAA dans les matrices biologiques, des tests ELISA sont disponibles sur le marché mais l'usage de ceux-ci est controversé (Faassen et al., 2013). Des améliorations du test ont été effectuées (Clausi et al., 2016), le rendant potentiellement utilisable. Il serait intéressant de comparer l'analyse de la BMAA totale par test Elisa ou par LC-MS/MS, afin de savoir si cet outil, plus accessible pour les gestionnaires est plus rapide que l'extraction et l'analyse via LC-MS/MS, pourrait être utilisé à grande échelle.

2) Pour aller plus loin dans l'estimation du niveau de contamination de l'eau par les MCs et la BMAA à l'aide des valeurs de bioaccumulation chez les bivalves, il pourrait être envisagé d'utiliser des outils de modélisation. L'élaboration d'un modèle d'accumulation nécessitera la réalisation d'expositions supplémentaires afin de mieux caractériser les cinétiques des MCs et de la BMAA chez *A. anatina* et *D. polymorpha,* en intégrant également l'influence potentielle des facteurs environnementaux (e.g., disponibilité des ressources, température) sur le taux de filtration des bivalves et sur l'accumulation et la détoxification (Reeders and Bij de Vaate, 1990; Englund and Heino, 1996; Tuchman et al., 2004; Sylvester et al., 2005). Enfin, des données issues de biosurveillances actives de ces toxines dans des zones ayant des niveaux de contamination contrastés pourront également compléter cette approche de corrélation entre les concentrations dans les organismes indicateurs et les concentrations environnementales. À la suite des résultats obtenus pendant cette thèse, des anodontes ont été déployées à grande échelle dans des zones sujettes à des proliférations de cyanobactéries d'intensités variables (10 sites dans le département de la Marne, 5 sites dans l'Aude). Ce modèle avait été choisi car la dreissène était absente des systèmes aquatiques étudiés. Les MCs libres et totales ont été suivies mensuellement dans les tissus du bivalve pendant deux ans. Les niveaux d'accumulation chez les mollusques se sont révélés corrélés aux niveaux de contamination des différents sites par les MCs intracellulaires. De plus, les bivalves ont à plusieurs reprises permis de démontrer la présence de cyanobactéries productrices de MCs sur une période d'intégration de 30 jours, alors que les prélèvements mensuels d'eau ne l'ont pas révélé. Les résultats ont permis de mieux connaitre le niveau de contamination des différents sites par les cyanobactéries productrices de MCs, en vue d'établir une gestion préventive des plans d'eau et des bassins versants (Lance E., pers. com). Le modèle *A. anatina* a également été encagé pendant deux années dans un site contaminé par les cyanobactéries toxiques dans le département du Morbihan. Les prélèvements mensuels ont mis en évidence une accumulation constante de MCs libres chez les bivalves (100% d'échantillons positifs) entre

les mois d'avril et novembre 2016 et 2017, période de prolifération de cyanobactéries. La fréquence d'occurrence des MCs dans les tissus des bivalves est supérieure à celle des MCs dosées dans le phytoplancton, démontrant le caractère intégrateur du bivalve entre deux dates de prélèvement d'eau. Quand les cyanobactéries productrices de MCs étaient détectées, leur biomasse était corrélée aux niveaux d'accumulation de MCs par *A. anatina* (Lance E. pers. com. et Lepoutre A., Chap IV). Ces résultats acquis *in situ* confirment les résultats acquis lors de cette thèse, et l'intérêt du bivalve dans le cadre d'une biosurveillance de la présence de cyanobactéries productrices de MCs.

Enfin, l'utilisation des deux outils de biosurveillance proposés dans cette thèse (dreissènes entières et glandes digestives d'anodontes) ne semble pas être limité à un déploiement dans des zones d'eau stagnantes, car des MCs ont été détectées dans des dreissènes encagées dans la Seine en 2016 et en 2018 (Lance E., pers. com). Même si les cyanobactéries ne se développent qu'en eaux faiblement courantes, le déploiement d'organismes intégrateurs dans les milieux lotiques est particulièrement pertinent, en raison de la difficulté de mettre en évidence un développement ponctuel de cyanobactéries benthiques ou pélagiques par des prélèvements d'eau de fréquence mensuelle ou hebdomadaire.

Conclusion générale et perspectives

Par son approche mêlant des expérimentations en conditions contrôlées et des encagements d'individus *in situ*, ce travail de thèse a permis de proposer l'analyse des MCs libres chez *D. polymorpha* en tant qu'outil complémentaire aux méthodes actuellement utilisées pour étudier le niveau de contamination et la dynamique des cyanobactéries productrices de MCs d'une masse d'eau. L'utilisation des glandes digestives d'*A. anatina*, ayant de fortes capacités d'accumulation de MCs (dès 1 µg MCs intracellulaires/L), serait à privilégier pour étudier la présence/absence de contamination, sans évaluation de son intensité ni de sa temporalité. L'outil le plus pertinent pour analyser la présence et le niveau de contamination du milieu par la neurotoxine BMAA (dès 10 µg BMMA dissoute/L), semble être l'analyse de la BMAA totale dans le corps entier de *D. polymorpha*. Les temps de résidence, après arrêt de l'exposition, des MCs totales dans les tissus des deux modèles, des MCs libres chez *A. anatina*, ainsi que celui de la BMAA dans les tissus de *D. polymorpha* peuvent être long, entre 21 jours (MCs) et 42 jours (BMAA totale). Ainsi, la pratique d'une biosurveillance active, basée sur l'encagement régulier d'individus sains est à privilégier afin d'éviter toute surestimation d'une contamination actuelle du milieu par les MCs intracellulaires et la BMAA dissoute.

Lors des expérimentations en conditions contrôlées, les deux modèles d'étude ont été exposés séparément à une cyanobactérie productrice de MCs et à de la BMAA dissoute. Or, ces deux molécules peuvent coexister dans le milieu et dans les tissus d'organismes, comme démontré chez des poissons (Scott et al., 2014; 2018). Ainsi, il serait intéressant d'exposer concomitamment *A. anatina* et *D. polymorpha* à une cyanobactérie productrice de MCs et à de la BMAA dissoute, et d'étudier leur accumulation, afin de voir si la coexistence de ces deux toxines peut avoir un impact sur leur distribution et leurs niveaux d'accumulation respectifs. De plus, d'autres cyanotoxines comme les anatoxines ou la cylindrospermopsine peuvent être présentes dans les eaux douces lors des périodes de proliférations de cyanobactéries (Cadel-Six et al., 2007; Brient et al., 2009). Les anatoxines ont été responsables de 14 intoxications de chiens dans la Loire en aout 2017, dont 8 ont été mortelles (Boisseleau et al., 2018). Les anatoxines sont majoritairement dissoutes en milieu naturel. Les bivalves pourraient potentiellement mettre en évidence leur présence via l'ingestion des organismes producteurs (*Anabaena*, *Aphanizomenon* entre autres), comme démontré chez *M. galloprovincialis* (Osswald et al., 2008), et via la filtration d'eau contaminée. Il pourrait être ainsi envisagé d'établir un réseau de surveillance des masses d'eau douces permettant d'évaluer la présence des cyanobactéries et de leurs toxines en milieu continental.

Des investigations complémentaires sont nécessaires, mais l'ensemble des travaux menés dans le cadre de cette thèse a permis de proposer des outils biologiques intégrateurs, susceptibles de contribuer à l'amélioration de la connaissance des niveaux de contaminations de masses d'eau douces par les MCs et la BMAA, en vue d'établir des mesures préventives ou de gestion ciblées.

Références bibliographiques

Ackerman, J.D., Sim, B., Nichols, S.J., Claudi, R., 1994. A review of the early life history of zebra mussels (Dreissena polymorpha): comparisons with marine bivalves. Canadian Journal of Zoology 72, 1169–1179. https://doi.org/10.1139/z94-157

Al-Sammak, M.A., Hoagland, K.D., Cassada, D., Snow, D.D., 2014. Co-occurrence of the cyanotoxins BMAA, DABA and anatoxin-a in Nebraska reservoirs, fish, and aquatic plants. Toxins 6, 488–508. https://doi.org/10.3390/toxins6020488

Albertano, P., 2012. Cyanobacterial Biofilms in Monuments and Caves, in: Ecology of Cyanobacteria II. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 317–343. https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3_11

Amado, L.L., Monserrat, J.M., 2010. Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: Why and how. Environment International 36, 226–235. https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.10.010

Amorim, A., Vasconcelos, V., 1999. Dynamics of microcystins in the mussel Mytilus galloprovincialis. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology 37, 1041–52.

Anses, 2017. AVIS et RAPPORT de l"Anses relatif à la toxicité aiguë et chronique de la BMAA (beta-méthylamino-L-alanine).

Arapov, J., Ezgeta-Balic, D., Peharda, M., Gladan, Z.N., 2010. Bivalve feeding — How and what they eat ? Ribarstvo 68, 105–116.

Azevedo, S.M.F.O., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru - Brazil. Toxicology 181–182, 441–446. https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00491-2

Babcock-Jackson, L., Carmichael, W.W., Culver, D.A., 2002. Dreissenid mussels increase exposure of benthic and pelagic organisms to toxic microcystins. International Association of Theoretical and Applied Limnology, Vol 28, Pt 2, Proceedings 28, 1082–1085. https://doi.org/10.1080/03680770.2001.11901884

Backer, L.C., Landsberg, J.H., Miller, M., Keel, K., Taylor, T.K., 2013. Canine cyanotoxin poisonings in the United States (1920s-2012): Review of suspected and confirmed cases from three data sources. Toxins 5, 1597–1628. https://doi.org/10.3390/toxins5091597

Bailly, E., 2013. Étude de l'applicabilité des POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) au dosage des résidus de médicaments dans les effluents hospitaliers 264.

Baker, S.M., Levinton, J.S., Kurdziel, J.P., Shumway, S.E., 1998. Selective feeding and biodeposition by zebra mussels and their relation to changes in phytoplankton composition and seston load. Journal of Shellfish Research 17, 1207–1213.

Baker, S.M., Levinton, J.S., Ward, J.E., 2000. Particle transport in the zebra mussel, Dreissena polymorpha (Pallas). Biological Bulletin 199, 116–125. https://doi.org/10.2307/1542871

Banack, S.A., Cox, P.A., 2003. Distribution of the neurotoxic nonprotein amino acid BMAA in Cycas micronesica. Botanical Journal of the Linnean Society 143, 165–168. https://doi.org/10.1046/j.1095-8339.2003.00217.x

Baqar, M., Sadef, Y., Ahmad, S.R., Mahmood, A., Li, J., Zhang, G., 2018. Organochlorine contaminants in freshwater mussels; occurrence, bioaccumulation pattern, spatio-temporal distribution and human health risk assessment from the tributaries of River Ravi, Pakistan. Human and Ecological Risk Assessment 24, 1268–1290. https://doi.org/10.1080/10807039.2017.1411780

Barberousse, H., Tell, G., Yéprémian, C., Couté, A., 2006. Diversity of algae and cyanobacteria growing on building façades in France. Algological Studies 120, 81–105. https://doi.org/10.1127/1864-1318/2006/0120-0081

Bard, S.M., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. Aquatic Toxicology 48, 357–389. https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00088-6

Barda, I., Kankaanpää, H., Purina, I., Balode, M., Sjövall, O., Meriluoto, J., 2015. Bioaccumulation of hepatotoxins – A considerable risk in the Latvian environment. Environmental Pollution 196, 313–320. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.10.024

Baulina, O.I., 2012. Ultrastructural Plasticity of Cyanobacteria. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-32781-0

Bearer, C.F., 1995. Health Environmental Hazards: How Children Are Different from Adults. Princetown University 5, 11–26.

Berntzon, L., Erasmie, S., Celepli, N., Eriksson, J., Rasmussen, U., Bergman, B., 2013. BMAA inhibits nitrogen fixation in the cyanobacterium nostoc sp. PCC 7120. Marine Drugs 11, 3091–3108. https://doi.org/10.3390/md11083091

Besse, J.P., Geffard, O., Coquery, M., 2012. Relevance and applicability of active biomonitoring in continental waters under the Water Framework Directive. TrAC - Trends in Analytical Chemistry 36, 113–127. https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.04.004

Binelli, A., Della Torre, C., Magni, S., Parolini, M., 2015. Does zebra mussel (Dreissena polymorpha) represent the freshwater counterpart of Mytilus in ecotoxicological studies? A critical review. Environmental Pollution 196, 386–403. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.10.023

Boisseleau, D., Peigner, P., Polato, T., Boisseleau, D., Peigner, P., Polato, T., 2018. Cas groupés d ’ intoxications de chiens par des cyanobactéries dans la Loire To cite this version : Cas groupés d ’ intoxications de chiens par, Bulletin épidémiologique: santé animale, alimentation.

Bontes, B., Verschoor, A., Pires, M.D., Van Donk, E., Ibelings, B.W., 2016. Functional response of Anodonta anatina feeding on a green alga and four strains of cyanobacteria , differing in shape , size and toxicity Functional response of Anodonta anatina feeding on a green alga and four strains of cyanobacteria , differing in sha. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6399-2

Brient, L., Lengronne, M., Bertrand, E., Rolland, D., Sipel, A., Steinmann, D., Baudin, I., Legeas, M., Le Rouzic, B., Bormans, M., 2008. A phycocyanin probe as a tool for monitoring cyanobacteria in freshwater bodies. J. Environ. Monit. 10, 248–255. https://doi.org/10.1039/B714238B

Brient, L., Lengronne, M., Bormans, M., Fastner, J., 2009. First occurrence of cylindrospermopsin in freshwater in France. Environmental Toxicology 24, 415–420. https://doi.org/10.1002/tox.20439

Burmester, V., Nimptsch, J., Wiegand, C., 2012. Adaptation of freshwater mussels to cyanobacterial toxins: Response of the biotransformation and antioxidant enzymes. Ecotoxicology and Environmental Safety 78, 296–309. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.11.037

Bykova, O., Laursen, A., Bostan, V., Bautista, J., McCarthy, L., 2006. Do zebra mussels (Dreissena polymorpha) alter lake water chemistry in a way that favours Microcystis growth? Science of the Total Environment 371, 362–372. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.08.022

Cadel-Six, S., Peyraud-Thomas, C., Brient, L., De Marsac, N.T., Rippka, R., Méjean, A., 2007. Different genotypes of anatoxin-producing cyanobacteria coexist in the Tarn River, France. Applied and Environmental Microbiology 73, 7605–7614. https://doi.org/10.1128/AEM.01225-07

Caller, T.A., Doolin, J.W., Haney, J.F., Murby, A.J., West, K.G., Farrar, H.E., Ball, A., Harris, B.T., Stommel, E.W., 2009. A cluster of amyotrophic lateral sclerosis in New Hampshire: A possible role for toxic cyanobacteria blooms. Amyotrophic Lateral Sclerosis 10, 101–108. https://doi.org/10.3109/17482960903278485

Campos, A., Vasconcelos, V., 2010. Molecular Mechanisms of Microcystin Toxicity in Animal Cells. International Journal of Molecular Sciences 11, 268–287. https://doi.org/10.3390/ijms11010268

Camusso, M., Balestrini, R., Muriano, F., Mariani, M., 1994. Use of freshwater mussel Dreissena polymorpha to assess trace metal pollution in the lower River Po (Italy). Chemosphere 29, 729–745. https://doi.org/10.1016/0045-6535(94)90042-6

Carmichael, W.W., 1992. Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. Journal of Applied Bacteriology 72, 445–459. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb01858.x

Chen, J., Xie, P., 2005a. Seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins in various organs of four freshwater bivalves from the large eutrophic Lake Taihu of subtropical China and the risk to human consumption. Environmental Toxicology 20, 572–584. https://doi.org/10.1002/tox.20146

Chen, J., Xie, P., 2005b. Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in two freshwater shrimps, Palaemon modestus and Macrobrachium nipponensis, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. Toxicon 45, 615–625. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.01.003

Chen, J., Zhang, D., Xie, P., Wang, Q., Ma, Z., 2009. Science of the Total Environment Simultaneous determination of microcystin contaminations in various vertebrates (fi sh , turtle , duck and water bird) from a large eutrophic Chinese lake , Lake Taihu , with toxic Microcystis blooms. Science of the Total Environment, The 407, 3317–3322. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.02.005

Chernoff, N., Hill, D.J., Diggs, D.L., Faison, B.D., Francis, B.M., Lang, J.R., Larue, M.M., Le, T.-T., Loftin, K.A., Lugo, J.N., Schmid, J.E., Winnik, W.M., 2017. A critical review of the postulated role of the non-essential amino acid, β- N -methylamino-L-alanine, in neurodegenerative disease in humans. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B 20, 183–229. https://doi.org/10.1080/10937404.2017.1297592

Chorus, I., Bartram, J., 1999. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2003.01107.x

Christensen, S.J., Hemscheidt, T.K., Trapido-Rosenthal, H., Laws, E.A., Bidigare, R.R., 2012. Detection and quantification of β-methylamino-L-alanine in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography: Methods 10, 891–898. https://doi.org/10.4319/lom.2012.10.891

Christoffersen, K., Lyck, S., Winding, A., 2002. Microbial activity and bacterial community structure during degradation of microcystins. Aquatic Microbial Ecology 27, 125–136. https://doi.org/10.3354/ame027125

Clausi, M.T., Vita, V., Bruno, M., Franchino, C., Trifirò, G., Palumbo, M.P., Floridi, F., De Pace, R., 2016. Validation of ELISA methods for search and quantification of β-n-methylamino-l-alanine in water and fish tissue. International Journal of Environmental Analytical Chemistry 96, 1290–1299. https://doi.org/10.1080/03067319.2016.1249480

Contardo-Jara, V., Otterstein, S.K.B., Downing, S., Downing, T.G., Pflugmacher, S., 2014. Response of antioxidant and biotransformation systems of selected freshwater mussels (Dreissena polymorpha , Anadonta cygnea , Unio tumidus , and Corbicula javanicus) to the cyanobacterial neurotoxin β-N-methylamino-L-alanine. Toxicological & Environmental Chemistry 96, 451–465. https://doi.org/10.1080/02772248.2014.945452

Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S., Wiegand, C., 2008. Multi-xenobiotic-resistance a possible explanation for the insensitivity of bivalves towards cyanobacterial toxins. Toxicon 52, 936–943. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.09.005

Corbel, S., Mougin, C., Bouaïcha, N., 2014. Cyanobacterial toxins: Modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. Chemosphere 96, 1–15. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.056

Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R.R., Metcalf, J.S., Morrison, L.F., Codd, G. a, Bergman, B., 2005. Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 5074–5078. https://doi.org/10.1073/pnas.0501526102

Craig, M., Luu, H.A., McCready, T.L., Williams, D., Andersen, R.J., Holmes, C.F.B., 1996. Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporin and microycystins with type-1 and type-2A protein phosphatases. Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire 74, 569–578.

Damiens, G., Mouneyrac, C., Quiniou, F., His, E., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., 2006. Metal bioaccumulation and metallothionein concentrations in larvae of Crassostrea gigas. Environmental Pollution 140, 492–499. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.08.006

De Pace, R., Vita, V., Bucci, M.S., Gallo, P., Milena, B., 2014. Microcystin Contamination in Sea Mussel Farms from the Italian Southern Adriatic Coast following Cyanobacterial Blooms in an Artificial Reservoir. Journal of Ecosystems 2014, 1–11. https://doi.org/10.1155/2014/374027

Delcourt, N., Claudepierre, T., Maignien, T., Arnich, N., Mattei, C., 2017. Cellular and Molecular Aspects of the β-N-Methylamino-l-alanine (BMAA) Mode of Action within the Neurodegenerative Pathway: Facts and Controversy. Toxins 10, 6. https://doi.org/10.3390/toxins10010006

Deng, J., Chen, F., Liu, X., Peng, J., Hu, W., 2016. Horizontal migration of algal patches associated with cyanobacterial blooms in an eutrophic shallow lake. Ecological Engineering 87, 185–193. https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.12.017

Dionisio Pires, L.M., Bontes, B.M., Samchyshyna, L., Jong, J., Van Donk, E., Ibelings, B.W., 2007. Grazing on microcystin-producing and microcystin-free phytoplankters by different filter-feeders: implications for lake restoration. Aquatic Sciences 69, 534–543. https://doi.org/10.1007/s00027-007-0916-z

Dionisio Pires, L.M., Karlsson, K.M., Meriluoto, J. a. O., Kardinaal, E., Visser, P.M., Siewertsen, K., Donk, E. Van, Ibelings, B.W., 2004. Assimilation and depuration of microcystin–LR by the zebra mussel, Dreissena polymorpha. Aquatic Toxicology 69, 385–396. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.06.004

Dionisio Pires, L.M., Kusserow, R., Van Donk, E., 2003. Influence of toxic and non-toxic phytoplankton on feeding and survival of Dreissena polymorpha (Pallas) larvae. Hydrobiologia 491, 193–200. https://doi.org/10.1023/A:1024467708880

Dionisio Pires, L.M., Van Donk, E., 2002. Comparing grazing by Dreissena polymorpha on phytoplankton in the presence of toxic and non-toxic cyanobacteria. Water 47, 1855–1865. https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2002.00933.x

Downing, S., Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S., Downing, T.G., 2014. The fate of the cyanobacterial toxin β-N-methylamino-l-alanine in freshwater mussels. Ecotoxicology and Environmental Safety 101, 51–58. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.11.028

Dunlop, R.A., Cox, P.A., Banack, S.A., Rodgers, K.J., 2013. The Non-Protein Amino Acid BMAA Is Misincorporated into Human Proteins in Place of l-Serine Causing Protein Misfolding and Aggregation. PLoS ONE 8, e75376. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075376

Dvořák, P., Poulíčková, A., Hašler, P., Belli, M., Casamatta, D.A., Papini, A., 2015. Species concepts and speciation factors in cyanobacteria, with connection to the problems of diversity and classification. Biodiversity and Conservation 24, 739–757. https://doi.org/10.1007/s10531-015-0888-6

Elsaied, H., Naganuma, T., 2001. Phylogenetic Diversity of Ribulose-1 , 5-Bisphosphate Carboxylase / Oxygenase Large-Subunit Genes from Deep-Sea Microorganisms. Society 67, 1751–1765. https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1751

Eriksson, J.E., Grönberg, L., Nygård, S., Slotte, J.P., Meriluoto, J. a, 1990. Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. Biochimica et biophysica acta 1025, 60–66. https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90190-Y

Ettoumi, A., El khalloufi, F., El Ghazali, I., Oudra, B., Amrani, A., Nasri, H., Bouaïcha, N., 2011. Bioaccumulation of cyanobacterial toxins in aquatic organisms and its consequences for public health. Zooplankton and Phytoplankton 1–33.

Faassen, E., 2014. Presence of the Neurotoxin BMAA in Aquatic Ecosystems: What Do We Really Know? Toxins 6, 1109–1138. https://doi.org/10.3390/toxins6031109

Faassen, E., Antoniou, M., Beekman-Lukassen, W., Blahova, L., Chernova, E., Christophoridis, C., Combes, A., Edwards, C., Fastner, J., Harmsen, J., Hiskia, A., Ilag, L., Kaloudis, T., Lopicic, S., Lürling, M., Mazur-Marzec, H., Meriluoto, J., Porojan, C., Viner-Mozzini, Y., Zguna, N., 2016. A Collaborative Evaluation of LC-MS/MS Based Methods for BMAA Analysis: Soluble Bound BMAA Found to Be an Important Fraction. Marine Drugs 14, 45. https://doi.org/10.3390/md14030045

Faassen, E.J., 2017. Extraction and LC-MS/MS Analysis of Underivatised BMAA, in: Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 439–446. https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch55

Faassen, E.J., 2016. The neurotoxin BMAA in aquatic systems. Wageningen University. https://doi.org/10.18174/378695

Faassen, E.J., Beekman, W., Lürling, M., 2013. Evaluation of a Commercial Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Determination of the Neurotoxin BMAA in Surface Waters. PLoS ONE 8, e65260. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065260

Fanslow, D.L., Nalepa, T.F., Lang, G.A., 1995. Filtration rates of the zebra mussel (Dreissena polymorpha) on natural seston from Sginaw bay, lake Huron. Journal of Great Lakes Research 21, 489–500.

Fastner, J., Neumann, U., Wirsing, B., Weckesser, J., Wiedner, C., Nixdorf, B., Chorus, I., 1999. Microcystins (hepatotoxic heptapeptides) in German fresh water bodies. Environmental Toxicology 14, 13–22. https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-7278(199902)14:1<13::AID-TOX4>3.0.CO;2-D

Ferrão-Filho, A. da S., Kozlowsky-Suzuki, B., Azevedo, S.M.F.O., 2002. Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community. Aquatic Toxicology 59, 201–208. https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00253-3

Fischer, W.J., Altheimer, S., Cattori, V., Meier, P.J., Dietrich, D.R., Hagenbuch, B., 2005. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. Toxicology and Applied Pharmacology 203, 257–263. https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.08.012

Flores, N.M., Miller, T.R., Stockwell, J.D., 2018. A Global Analysis of the Relationship between Concentrations of Microcystins in Water and Fish. Frontiers in Marine Science 5, 1–14. https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00030

Foss, A.J., Chernoff, N., Aubel, M.T., 2018. The analysis of underivatized β-Methylamino-L-alanine (BMAA), BAMA, AEG & 2,4-DAB in Pteropus mariannus mariannus specimens using HILIC-LC-MS/MS. Toxicon 152, 150–159. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.07.028

Francis, G., 1878. Poisonous Australian Lake. Nature 18, 11–12. https://doi.org/10.1038/018011d0

Freitas de Magalhães, V., Moraes Soares, R., Azevedo, S.M.F.O., 2001. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. Toxicon 39, 1077–1085. https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00251-8

Gadzała-Kopciuch, R., Berecka, B., Bartoszewicz, J., Buszewski, B., 2004. Some considerations about bioindicators in environmental monitoring. Polish Journal of Environmental Studies 13, 453–462. https://doi.org/10.1.1.470.4808

Gaget, V., Lau, M., Sendall, B., Froscio, S., Humpage, A.R., 2017. Cyanotoxins: Which detection technique for an optimum risk assessment? Water Research 118, 227–238. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.025

Ganf, G.G., Oliver, R.L., 1982. Vertical Separation of Light and Available Nutrients as a Factor Causing Replacement of Green Algae by Blue-Green Algae in the Plankton of a Stratified Lake. The Journal of Ecology 70, 829. https://doi.org/10.2307/2260107

Garthwaite, I.A.N., Miles, C.O., Ross, K.M., Aggen, J.B., Chamberlin, A.R., Towers, N.R., 2008. Congener-Independent Immunoassay for Microcystins and Nodularins 35, 4849–4856.

George, S.G., Pirie, B.J.S., Coombs, T.L., 1976. The kinetics of accumulation and excretion of ferric hydroxide in Mytilus edulis (I.) and its distribution in the tissues. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 23, 71–84. https://doi.org/10.1016/0022-0981(76)90086-1

Gkelis, S., Lanaras, T., Sivonen, K., 2006. The presence of microcystins and other cyanobacterial bioactive peptides in aquatic fauna collected from Greek freshwaters. Aquatic Toxicology 78, 32–41. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.02.001

Gopko, M., Mironova, E., Pasternak, A., Mikheev, V., Taskinen, J., 2017. Freshwater mussels (Anodonta anatina) reduce transmission of a common fish trematode (eye fluke, Diplostomum pseudospathaceum). Parasitology 144, 1971–1979. https://doi.org/10.1017/S0031182017001421

Gray, S.H., 2008. Animal Invaders : Zebra Mussel. Cherry Lake Publishing, Ann Arbor.

Haag, W.R., 2012. North American Freshwater Mussels: Natural History, Ecology, and Conservation.

Hamilton, D.P., Wood, S.A., Dietrich, D.R., Puddick, J., 2013. Costs of harmful blooms of freshwater cyanobacteria. Cyanobacteria: An Economic Perspective 245–256. https://doi.org/10.1002/9781118402238.ch15

Harada, K.I., Murata, H., Qiang, Z., Suzuki, M., Kondo, F., 1996. Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria. Toxicon 34, 701–710. https://doi.org/10.1016/0041-0101(95)00163-8

Hašler, P., Poulíčková, A., 2003. Diurnal changes in vertical distribution and morphology of a natural population of Planktothrix agardhii (Gom.) Anagnostidis et Komárek (Cyanobacteria). Hydrobiologia 506–509, 195–201. https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000008566.17473.88

Hastie, C., Borthwick, E., Morrison, L., Codd, G., Cohen, P., 2005. Inhibition of several protein phosphatases by a non-covalently interacting microcystin and a novel cyanobacterial peptide, nostocyclin. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1726, 187–193. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.06.005

Hathaway, R., 2001. Mussels as biomonitors of lake water microcystin: A final report for the summer 2000 microcystin monitoring study. Durham.

Hense, I., 2010. Approaches to model the life cycle of harmful algae. Journal of Marine Systems 83, 108–114. https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2010.02.014

Hense, I., Beckmann, A., 2010. The representation of cyanobacteria life cycle processes in aquatic ecosystem models. Ecological Modelling 221, 2330–2338. https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2010.06.014

Hinzmann, M., Lopes-Lima, M., Teixeira, A., Varandas, S., Sousa, R., Lopes, A., Froufe, E., Machado, J., 2013. Reproductive Cycle and Strategy of Anodonta anatina (L., 1758): Notes on Hermaphroditism. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology 319, 378–390. https://doi.org/10.1002/jez.1801

Holtcamp, W., 2012. The Emerging Science of BMAA: Do Cyanobacteria Contribute to Neurodegenerative Disease? Environmental Health Perspectives 120, a110–a116. https://doi.org/10.1289/ehp.120-a110

Honkanen, R.E., Zwiller, J., Moore, R.E., Daily, S.L., Khatra, B.S., Dukelow, M., Boynton, a L., 1990. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. The Journal of biological chemistry 265, 19401–19404.

Hu, C., Gao, K., Whitton, B.A., 2012. Semi-arid Regions and Deserts, in: Ecology of Cyanobacteria II. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 345–369. https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3_12

Hudnell, H.K., 2008. Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs. Proceedings of the Interagency, International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms (ISOC-HAB). Advances in experimental medicine and biology 619, 1–912.

Huisman, J., Codd, G.A., Paerl, H.W., Ibelings, B.W., Verspagen, J.M.H., Visser, P.M., 2018. Cyanobacterial blooms. Nature Reviews Microbiology 16, 471–483. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1

Huisman, J., Zonneveld, C., Weissing, F., Jonke, R.R., 1999. Competition for light between phytoplankton species: Experimental tests of mechanistic theory. Ecology 80, 211–222. https://doi.org/10.1890/0012-9658(1999)080[0211:CFLBPS]2.0.CO;2

Humbert, J.-F., Fastner, J., 2017. Ecology of Cyanobacteria, in: Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 9–18. https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch2

Hunter, P.D., Matthews, M.W., Kutser, T., Tyler, A.N., 2017. Remote Sensing of Cyanobacterial Blooms in Inland, Coastal, and Ocean Waters, in: Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 89–99. https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch9

Ibelings, B.W., Bruning, K., De Jonge, J., Wolfstein, K., Dionisio Pires, L.M., Postma, J., Burger, T., 2005. Distribution of microcystins in a lake foodweb: No evidence for biomagnification. Microbial Ecology 49, 487–500. https://doi.org/10.1007/s00248-004-0014-x

Ibelings, B.W., Mur, L.R., Walsby, A.E., 1991. Diurnal changes in buoyancy and vertical distribution in populations of Microcystisin two shallow lakes. Journal of Plankton Research 13, 419–436. https://doi.org/10.1093/plankt/13.2.419

Izaguirre, G., Taylor, W.D., 2004. A guide to geosmin- and MIB-producing cyanobacteria in the United States. Water Science and Technology 49, 19–24. https://doi.org/10.2166/wst.2004.0524

Jia, J., Chen, Q., Lauridsen, T.L., 2016. A systematic investigation into the environmental fate of microcystins and the potential risk: Study in Lake Taihu. Toxins 8. https://doi.org/10.3390/toxins8060170

Jiang, L., Aigret, B., De Borggraeve, W.M., Spacil, Z., Ilag, L.L., 2012. Selective LC-MS/MS method for the identification of BMAA from its isomers in biological samples. Analytical and Bioanalytical Chemistry 403, 1719–1730. https://doi.org/10.1007/s00216-012-5966-y

Jiang, L., Johnston, E., Åberg, K.M., Nilsson, U., Ilag, L.L., 2013. Strategy for quantifying trace levels of BMAA in cyanobacteria by LC/MS/MS. Analytical and Bioanalytical Chemistry 405, 1283–1292. https://doi.org/10.1007/s00216-012-6550-1

Jiang, L., Kiselova, N., Rosén, J., Ilag, L.L., 2014. Quantification of neurotoxin BMAA (β-N-methylamino-L-alanine) in seafood from Swedish markets. Scientific Reports 4, 1–7. https://doi.org/10.1038/srep06931

Jonasson, S., Eriksson, J., Berntzon, L., Spácil, Z., Ilag, L.L., Ronnevi, L.-O., Rasmussen, U., Bergman, B., 2010. Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 9252–9257. https://doi.org/10.1073/pnas.0914417107

Jonsson, A., Bertilsson, A., Rydgård, M., 2013. Spatial distribution and age structure of the freshwater unionid mussels Anodonta anatina and Unio tumidus: implications for environmental monitoring. Hydrobiologia 711, 61–70. https://doi.org/10.1007/s10750-013-1455-3

Jørgensen, C.B., 1996. Bivalve filter feeding revisited. Marine Ecology Progress Series 142, 287–302. https://doi.org/10.3354/meps142287

Juhel, G., Davenport, J., O'Halloran, J., Culloty, S., Ramsay, R., James, K., Furey, A., Allis, O., 2006. Pseudodiarrhoea in zebra mussels Dreissena polymorpha (Pallas) exposed to microcystins. The Journal of experimental biology 209, 810–6. https://doi.org/10.1242/jeb.02081

Juhel, G., Davenport, J., O'Halloran, J., Culloty, S.C., O'Riordan, R.M., James, K.F., Furey, A., Allis, O., 2006. Impacts of microcystins on the feeding behaviour and energy balance of zebra mussels, Dreissena polymorpha: A bioenergetics approach. Aquatic Toxicology 79, 391–400. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.07.007

Kaebernick, M., Neilan, B.A., Borner, T., Dittmann, E., 2000. Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. Applied and Environmental Microbiology 66, 3387–3392. https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3387-3392.2000

Kanoshina, I., Lips, U., Leppänen, J.M., 2003. The influence of weather conditions (temperature and wind) on cyanobacterial bloom development in the Gulf of Finland (Baltic Sea). Harmful Algae 2, 29–41. https://doi.org/10.1016/S1568-9883(02)00085-9

Karatayev, A.Y., Boltovskoy, D., Burlakova, L.E., Padilla, D.K., 2015. Parallels and Contrasts Between Limnoperna fortunei and Species of Dreissena, in: Boltovskoy, D. (Ed.), Limnoperna Fortunei. Springer International Publishing, Cham, pp. 261–297. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13494-9_15

Kasting, J.F., Siefert, J.L., 2002. Life and the evolution of Earth's atmosphere. Science 296, 1066–1068. https://doi.org/10.1126/science.1071184

Kerambrun, E., Palos Ladeiro, M., Bigot-Clivot, A., Dedourge-Geffard, O., Dupuis, E., Villena, I., Aubert, D., Geffard, A., 2016. Zebra mussel as a new tool to show evidence of freshwater contamination by waterborne Toxoplasma gondii. Journal of Applied Microbiology 120, 498–508. https://doi.org/10.1111/jam.12999

Khalanski, M., 1997. Conséquences industrielles et écologiques de l'introduction de nouvelles espèces dans les hydrosystèmes continentaux : la moule zébrée et autres espèces invasives. Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture 385–404. https://doi.org/10.1051/kmae:1997037

Kim, R.B., 2003. Organic anion-transporting polypeptide (OATP) transporter family and drug disposition. European Journal of Clinical Investigation 33, 1–5. https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.33.s2.5.x

Kohoutek, J., Maršálek, B., Bláha, L., 2010. Evaluation of the novel passive sampler for cyanobacterial toxins microcystins under various conditions including field sampling. Analytical and Bioanalytical Chemistry 397, 823–828. https://doi.org/10.1007/s00216-010-3578-y

Kolmakov, V.I., 2014. Role of Microcystis aeruginosa passing through the digestive tracts of filter-feeding animals in eutrophic water reservoirs (review). Contemporary Problems of Ecology 7, 455–464. https://doi.org/10.1134/S1995425514040052

Kotak, B.G., Zurawell, R.W., 2007. Cyanobacterial toxins in Canadian freshwaters: A review. Lake and Reservoir Management 23, 109–122. https://doi.org/10.1080/07438140709353915

Kudela, R.M., 2011. Characterization and deployment of Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT) resin for monitoring of microcystins in fresh and saltwater. Harmful Algae 11, 117–125. https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.08.006

Kumar, K., Mella-Herrera, R.A., Golden, J.W., 2010. Cyanobacterial Heterocysts. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2, a000315–a000315. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000315

Kurmayer, R., Christiansen, G., Fastner, J., Börner, T., 2004. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium Planktothrix spp. Environmental Microbiology 6, 831–841. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00626.x

Kurmayer, R., Gumpenberger, M., 2006. Diversity of microcystin genotypes among populations of the filamentous cyanobacteria Planktothrix rubescens and Planktothrix agardhii. Molecular Ecology 15, 3849–3861. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03044.x

Lage, S., Annadotter, H., Rasmussen, U., Rydberg, S., 2015. Biotransfer of β-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in a eutrophicated freshwater lake. Marine Drugs 13, 1185–1201. https://doi.org/10.3390/md1303

Lage, S., Costa, P.R., Moita, T., Eriksson, J., Rasmussen, U., Rydberg, S.J., 2014. BMAA in shellfish from two Portuguese transitional water bodies suggests the marine dinoflagellate Gymnodinium catenatum as a potential BMAA source. Aquatic Toxicology 152, 131–138. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.03.029

Lance, E., Arnich, N., Maignien, T., Biré, R., 2018. Occurrence of β-N-methylamino-l-alanine (BMAA) and Isomers in Aquatic Environments and Aquatic Food Sources for Humans. Toxins 10, 83. https://doi.org/10.3390/toxins10020083

Lance, E., Brient, L., Carpentier, A., Acou, A., Marion, L., Bormans, M., Gérard, C., 2010a. Impact of toxic cyanobacteria on gastropods and microcystin accumulation in a eutrophic lake (Grand-Lieu, France) with special reference to Physa (= Physella) acuta. Science of the Total Environment 408, 3560–3568. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.04.050

Lance, E., Josso, C., Dietrich, D., Ernst, B., Paty, C., Senger, F., Bormans, M., Gérard, C., 2010b. Histopathology and microcystin distribution in Lymnaea stagnalis (Gastropoda) following toxic cyanobacterial or dissolved microcystin-LR exposure. Aquatic Toxicology 98, 211–220. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.02.014

Lance, E., Neffling, M.R., Gérard, C., Meriluoto, J., Bormans, M., 2010c. Accumulation of free and covalently bound microcystins in tissues of Lymnaea stagnalis (Gastropoda) following toxic cyanobacteria or dissolved microcystin-LR exposure. Environmental Pollution 158, 674–680. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.10.025

Lance, E., Petit, A., Sanchez, W., Paty, C., Gérard, C., Bormans, M., 2014. Evidence of trophic transfer of microcystins from the gastropod Lymnaea stagnalis to the fish Gasterosteus aculeatus. Harmful Algae 31, 9–17. https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.09.006

Larson, D., Ahlgren, G., Willén, E., 2014. Bioaccumulation of microcystins in the food web: A field study of four Swedish lakes. Inland Waters 4, 91–104. https://doi.org/10.5268/IW-4.1.627

Lauceri, R., Austoni, M., Caviglia, F., Kamburska, L., Lami, A., Morabito, G., Pflueger, V., Benavides, A.M.S., Tonolla, M., Torzillo, G., Riccardi, N., 2017. Coupling a bio-accumulator organism and MALDI-TOF MS: an early warning detection system for microcystins in water bodies. Journal of Applied Phycology 29, 2979–2988. https://doi.org/10.1007/s10811-017-1193-4

Ledreux, A., Thomazeau, S., Catherine, A., Duval, C., Yéprémian, C., Marie, A., Bernard, C., 2010. Evidence for saxitoxins production by the cyanobacterium Aphanizomenon gracile in a French recreational water body. Harmful Algae 10, 88–97. https://doi.org/10.1016/j.hal.2010.07.004

Li, L., Zheng, B., Liu, L., 2010. Biomonitoring and Bioindicators Used for River Ecosystems : Definitions , Approaches and Trends 2, 1510–1524. https://doi.org/10.1016/j.proenv.2010.10.164

Li, Y., Chen, J., Zhao, Q., Pu, C., Qiu, Z., Zhang, R., Shu, W., 2011. Research | Children ' s Health A Cross-Sectional Investigation of Chronic Exposure to Microcystin in Relationship to Childhood Liver Damage in the Three Gorges Reservoir 119, 1483–1488.

Lobner, D., 2009. Mechanisms of beta-N-methylamino-L-alanine induced neurotoxicity. Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases 10 Suppl 2, 56–60. https://doi.org/10.3109/17482960903269062

Lopes-Lima, M., 2014. Anodonta anatina [WWW Document]. The IUCN Red List of Threatened Species. URL http://www.iucnredlist.org/details/155667/0 (accessed 2.12.16).

Lopes-Lima, M., Sousa, R., Geist, J., Aldridge, D.C., Araujo, R., Bergengren, J., Bespalaya, Y., Bódis, E., Burlakova, L., Van Damme, D., Douda, K., Froufe, E., Georgiev, D., Gumpinger, C., Karatayev, A., Kebapçi, Ü., Killeen, I., Lajtner, J., Larsen, B.M., Lauceri, R., Legakis, A., Lois, S., Lundberg, S., Moorkens, E., Motte, G., Nagel, K.-O., Ondina, P., Outeiro, A., Paunovic, M., Prié, V., von Proschwitz, T., Riccardi, N., Rudzīte, M., Rudzītis, M., Scheder, C., Seddon, M., Şereflişan, H., Simić, V., Sokolova, S., Stoeckl, K., Taskinen, J., Teixeira, A., Thielen, F., Trichkova, T., Varandas, S., Vicentini, H., Zajac, K., Zajac, T., Zogaris, S., 2017. Conservation status of freshwater mussels in Europe: state of the art and future challenges. Biological Reviews 92, 572–607. https://doi.org/10.1111/brv.12244

Ludyanskiy, M.L., McDonald, D., MacNeill, D., 1993. Impact of the Zebra Mussel, a Bivalve Invader. BioScience 43, 533–544. https://doi.org/10.2307/1311948

Lurman, G., Walter, J., Hoppeler, H.H., 2014. Seasonal changes in the behaviour and respiration physiology of the freshwater duck mussel, anodonta anatina. Clinical Cancer Research 217, 235–243. https://doi.org/10.1242/jeb.093450

Mackie, G.L., 1991. Biology of the exotic zebra mussel, Dreissena polymorpha, in relation to native bivalves and its potential impact in Lake St. Clair. Hydrobiologia 219, 251–268. https://doi.org/10.1007/BF00024759

Madill, J., 2005. Cycle de vie de Pyganodon grandis [WWW Document]. Projet sur la biodiversité de la rivière Frenchman. URL https://nature.ca/en/photo/1515 (accessed 10.19.18).

Main, B.J., Italiano, C.J., Rodgers, K.J., 2017. Investigation of the interaction of β-methylamino-l-alanine with eukaryotic and prokaryotic proteins. Amino Acids. https://doi.org/10.1007/s00726-017-2525-z

Malbrouck, C., Kestemont, P., 2006. Effects of microcystins on fish. Environmental Toxicology and Chemistry 25, 72–86. https://doi.org/10.1897/05-029R.1

Manning, S.R., Nobles, D.R., 2017. Impact of global warming on water toxicity: cyanotoxins. Current Opinion in Food Science 18, 14–20. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.09.013

Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Giamberini, L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. Microscopy Research and Technique 56, 358–392. https://doi.org/10.1002/jemt.10040

Martins, J.C., Vasconcelos, V.M., 2009. Microcystin Dynamics in Aquatic Organisms. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B 12, 65–82. https://doi.org/10.1080/10937400802545151

Mateo, P., Leganés, F., Perona, E., Loza, V., Fernández-Piñas, F., 2015. Cyanobacteria as bioindicators and bioreporters of environmental analysis in aquatic ecosystems. Biodiversity and Conservation 24, 909–948. https://doi.org/10.1007/s10531-015-0903-y

Maynes, J.T., Luu, H.A., Cherney, M.M., Andersen, R.J., Williams, D., Holmes, C.F.B., James, M.N.G., 2006. Crystal Structures of Protein Phosphatase-1 Bound to Motuporin and Dihydromicrocystin-LA: Elucidation of the Mechanism of Enzyme Inhibition by Cyanobacterial Toxins. Journal of Molecular Biology 356, 111–120. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.019

Mazard, S., Penesyan, A., Ostrowski, M., Paulsen, I., Egan, S., 2016. Tiny Microbes with a Big Impact: The Role of Cyanobacteria and Their Metabolites in Shaping Our Future. Marine Drugs 14, 97. https://doi.org/10.3390/md14050097

McConnell, J.L., Wadzinski, B.E., 2009. Targeting Protein Serine / Threonine Phosphatases for Drug Development. Mol Pharm 75, 1249–1261. https://doi.org/10.1124/mol.108.053140.of

McCord, J., Lang, J.R., Hill, D., Strynar, M., Chernoff, N., 2018. pH dependent octanol–water partitioning coefficients of microcystin congeners. Journal of Water and Health wh2018257. https://doi.org/10.2166/wh.2018.257

McIvor, A., 2004. Freshwater Mussels As Biofilters [WWW Document]. The malacological society of London. URL http://malacsoc.org.uk/the_Malacologist/BULL45/freshwatermussels.htm (accessed 10.19.18).

Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E., Thomas, O., 2013. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. Environment International 59, 303–327. https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.013

Meriluoto, J., Spoof, L., Codd, G.A. (Geoffrey A.., 2016. Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. https://doi.org/10.1002/9781119068761

Metcalf, J.S., Hyenstrand, P., Beattie, K.A., Codd, G.A., 2000. Effects of physicochemical variables and cyanobacterial extracts on the immunoassay of microcystin-LR by two ELISA kits. Journal of Applied Microbiology 89, 532–538. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01141.x

Mez, K., Hanselmann, K., Beattie, K., Codd, G., Hauser, B., Naegeli, H., Preisig, H., 1997. Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in switzerland. European Journal of Phycology 32, 111–117. https://doi.org/10.1080/09670269710001737029

Mitsoura, A., Kagalou, I., Papaioannou, N., Berillis, P., Mente, E., Papadimitriou, T., 2013. The presence of microcystins in fish Cyprinus carpio tissues: a histopathological study. International Aquatic Research 5, 8. https://doi.org/10.1186/2008-6970-5-8

Mohamed, Z.A., Hussein, A.A., 2006. Depuration of microcystins in tilapia fish exposed to natural populations of toxic cyanobacteria: A laboratory study. Ecotoxicology and Environmental Safety 63, 424–429. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.02.006

Mollusca of Belarus, 2018. Anodonta anatina [WWW Document]. URL https://mollusca-g2n.weebly.com/anodonta-anatina.html (accessed 10.19.18).

Mondo, K., Broc Glover, W., Murch, S.J., Liu, G., Cai, Y., Davis, D. a, Mash, D.C., 2014. Environmental Neurotoxins β-N-Methylamino-L-Alanine (BMAA) and Mercury in Shark Cartilage Dietary Supplements. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association 70, 26–32. https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.015

Mooij, W.M., Hülsmann, S., De Senerpont Domis, L.N., Nolet, B.A., Bodelier, P.L.E., Boers, P.C.M., Pires, L.M.D., Gons, H.J., Ibelings, B.W., Noordhuis, R., Portielje, R., Wolfstein, K., Lammens, E.H.R.R., 2005. The impact of climate change on lakes in the Netherlands: a review. Aquatic Ecology 39, 381–400. https://doi.org/10.1007/s10452-005-9008-0

Moy, N.J., Dodson, J., Tassone, S.J., Bukaveckas, P.A., Bulluck, L.P., 2016. Biotransport of Algal Toxins to Riparian Food Webs. Environmental Science and Technology 50, 10007–10014. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02760

Murch, S.J., Cox, P.A., Banack, S.A., 2004a. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. Proceedings of the National Academy of Sciences 101, 12228–12231. https://doi.org/10.1073/pnas.0404926101

Murch, S.J., Cox, P.A., Banack, S.A., Steele, J.C., Sacks, O.W., 2004b. Occurrence of β-methylamino-L-alanine (BMAA) in. ALS/PDC patients from Guam. Acta Neurologica Scandinavica 110, 267–269. https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2004.00320.x

Neffling, M.-R., Lance, E., Meriluoto, J., 2010. Detection of free and covalently bound microcystins in animal tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Environmental pollution 158, 948–952. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.10.023

Nugroho, A.P., Frank, H., 2011. Uptake, distribution, and bioaccumulation of copper in the freshwater mussel Anodonta anatina. Toxicological and Environmental Chemistry 93, 1838–1850. https://doi.org/10.1080/02772248.2011.582989

Nunn, P.B., Ponnusamy, M., 2009. β-N-Methylaminoalanine (BMAA): Metabolism and metabolic effects in model systems and in neural and other tissues of the rat in vitro. Toxicon 54, 85–94. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.03.008

Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., 2003. Chapter 17 Molluscs as bioindicators. Trace Metals and other Contaminants in the Environment 6, 577–635. https://doi.org/10.1016/S0927-5215(03)80147-9

Oliver, R.L., Ganf, G.G., 2000. Freshwater Blooms, in: The Ecology of Cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 149–194. https://doi.org/10.1007/0-306-46855-7_6

Onselen, R., Downing, S., Kemp, G., Downing, T., 2017. Investigating β-N-Methylamino-l-alanine Misincorporation in Human Cell Cultures: A Comparative Study with Known Amino Acid Analogues. Toxins 9, 400. https://doi.org/10.3390/toxins9120400

Oren, A., 2012. Salts and Brines, in: Ecology of Cyanobacteria II. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 401–426. https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3_15

Oren, A., Ventura, S., 2017. The current status of cyanobacterial nomenclature under the "prokaryotic" and the "botanical" code. Antonie van Leeuwenhoek 110, 1257–1269. https://doi.org/10.1007/s10482-017-0848-0

Osswald, J., Rellán, S., Gago, A., Vasconcelos, V., 2008. Uptake and depuration of anatoxin-a by the mussel Mytilus galloprovincialis (Lamarck, 1819) under laboratory conditions. Chemosphere 72, 1235–1241. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.05.012

Ott, J.L., Carmichael, W.W., 2006. LC/ESI/MS method development for the analysis of hepatotoxic cyclic peptide microcystins in animal tissues. Toxicon 47, 734–741. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.01.025

Paerl, H.W., Fulton, R.S., Moisander, P.H., Dyble, J., 2001. Harmful Freshwater Algal Blooms, With an Emphasis on Cyanobacteria. The Scientific World JOURNAL 1, 76–113. https://doi.org/10.1100/tsw.2001.16

Paerl, H.W., Huisman, J., 2009. Climate change: A catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. Environmental Microbiology Reports 1, 27–37. https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2008.00004.x

Paerl, H.W., Otten, T.G., 2013. Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. Microbial Ecology 65, 995–1010. https://doi.org/10.1007/s00248-012-0159-y

Paldavičienė, A., Zaiko, A., Mazur-Marzec, H., Razinkovas-Baziukas, A., 2015. Bioaccumulation of microcystins in invasive bivalves: A case study from the boreal lagoon ecosystem. Oceanologia 57, 93–101. https://doi.org/10.1016/j.oceano.2014.10.001

Papadimitriou, T., Kagalou, I., Stalikas, C., Pilidis, G., Leonardos, I.D., 2012. Assessment of microcystin distribution and biomagnification in tissues of aquatic food web compartments from a shallow lake and evaluation of potential risks to public health. Ecotoxicology 21, 1155–1166. https://doi.org/10.1007/s10646-012-0870-y

Peñuelas, J., Poulter, B., Sardans, J., Ciais, P., Van Der Velde, M., Bopp, L., Boucher, O., Godderis, Y., Hinsinger, P., Llusia, J., Nardin, E., Vicca, S., Obersteiner, M., Janssens, I.A., 2013. Human-induced nitrogen-phosphorus imbalances alter natural and managed ecosystems across the globe. Nature Communications 4. https://doi.org/10.1038/ncomms3934

Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K.A., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C.E.W., 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: The first step of detoxication. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects 1425, 527–533. https://doi.org/10.1016/S0304-4165(98)00107-X

Pham, T.L., Shimizu, K., Dao, T.S., Hong-Do, L.C., Utsumi, M., 2015. Microcystin uptake and biochemical responses in the freshwater clam Corbicula leana P. Exposed to toxic and non-toxic Microcystis aeruginosa: Evidence of tolerance to cyanotoxins. Toxicology Reports 2, 88–98. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.01.012

Pham, T.L., Utsumi, M., 2018. An overview of the accumulation of microcystins in aquatic ecosystems. Journal of Environmental Management 213, 520–529. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.01.077

Phillips, D.J.H., Segar, D.A., 1986. Use of bio-indicators in monitoring conservative contaminants: Programme design imperatives. Marine Pollution Bulletin 17, 10–17. https://doi.org/10.1016/0025-326X(86)90797-6

Ploux, O., Combes, A., Eriksson, J., Metcalf, J.S., 2017. β- N -Methylamino- l -Alanine and (S)-2,4-Diaminobutyric Acid, in: Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 160–164. https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch16

Pobel, D., Robin, J., Humbert, J.F., 2011. Influence of sampling strategies on the monitoring of cyanobacteria in shallow lakes: Lessons from a case study in France. Water Research 45, 1005–1014. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.011

Preece, E.P., Moore, B.C., Hardy, F.J., 2015. Ecotoxicology and Environmental Safety Transfer of microcystin from freshwater lakes to Puget Sound , WA and toxin accumulation in marine mussels (Mytilus trossulus). Ecotoxicology and Environmental Safety 122, 98–105. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.07.013

Prepas, E.E., Kotak, B.G., Campbell, L.M., Evans, J.C., Hrudey, S.E., Holmes, C.F.B., 1997. Accumulation and elimination of cyanobacterial hepatoto×ins by the freshwater clam <I>Anodonta grandis</I> <I>simpsoniana</I>. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 54, 41–46. https://doi.org/10.1139/cjfas-54-1-41

Qi, L., Hu, C., Visser, P.M., Ma, R., 2018. Diurnal changes of cyanobacteria blooms in Taihu Lake as derived from GOCI observations. Limnology and Oceanography 63, 1711–1726. https://doi.org/10.1002/lno.10802

Quesada, A., Vincent, W.F., 2012. Cyanobacteria in the Cryosphere: Snow, Ice and Extreme Cold, in: Ecology of Cyanobacteria II. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 387–399. https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3_14

Raikow, D.F., Sarnelle, O., Wilson, A.E., Hamilton, S.K., 2004. Dominance of the noxious cyanobacterium Microcystis aeruginosa in low-nutrient lakes is associated with exotic zebra mussels. Limnology and Oceanography 49, 482–487. https://doi.org/10.4319/lo.2004.49.2.0482

Rasconi, S., Winter, K., Kainz, M.J., 2017. Temperature increase and fluctuation induce phytoplankton biodiversity loss – Evidence from a multi-seasonal mesocosm experiment. Ecology and Evolution 7, 2936–2946. https://doi.org/10.1002/ece3.2889

Rastogi, R.P., Sinha, R.P., Incharoensakdi, A., 2014. The cyanotoxin-microcystins: current overview. Reviews in Environmental Science and Biotechnology 1–35. https://doi.org/10.1007/s11157-014-9334-6

Reveillon, D., 2015. BMAA et cyanotoxines : microalgues productrices et niveaux d'accumulation dans les organismes marins. Université de Nantes Angers Le Mans.

Réveillon, D., Abadie, E., Séchet, V., Masseret, E., Hess, P., Amzil, Z., 2015. β-N-methylamino-l-alanine (BMAA) and isomers: Distribution in different food web compartments of Thau lagoon, French Mediterranean Sea. Marine Environmental Research 110, 8–18. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.07.015

Réveillon, D., Séchet, V., Hess, P., Amzil, Z., 2016a. Production of BMAA and DAB by diatoms (Phaeodactylum tricornutum , Chaetoceros sp ., Chaetoceros calcitrans and , Thalassiosira pseudonana) and bacteria isolated from a diatom culture 58, 45–50. https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.07.008

Réveillon, D., Séchet, V., Hess, P., Amzil, Z., 2016b. Systematic detection of BMAA (β-N-methylamino-l-alanine) and DAB (2,4-diaminobutyric acid) in mollusks collected in shellfish production areas along the French coasts. Toxicon 110, 35–46. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.11.011

Ricciardi, A., Neves, R.J., Rasmussen, J.B., 1998. Impending extinctions of North American freshwater mussels (Unionoida) following the zebra mussel (Dreissena polymorpha) invasion. Journal of Animal Ecology 67, 613–619. https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.1998.00220.x

Rosén, J., Westerberg, E., Schmiedt, S., Hellenäs, K.E., 2016. BMAA detected as neither free nor protein bound amino acid in blue mussels. Toxicon 109, 45–50. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.11.008

Roy-Lachapelle, A., Solliec, M., Sauvé, S., 2015. Determination of BMAA and three alkaloid cyanotoxins in lake water using dansyl chloride derivatization and high-resolution mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry 407, 5487–5501. https://doi.org/10.1007/s00216-015-8722-2

Runnegar, M.T., Falconer, I.R., Silver, J., 1981. Deformation of isolated rat hepatocytes by a peptide hepatotoxin from the blue-green alga Microcystis aeruginosa. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 317, 268–272. https://doi.org/10.1007/BF00503829

Rzymski, P., Poniedziałek, B., 2012. Dermatotoxins synthesized by blue-green algae (Cyanobacteria). Postepy Dermatologii i Alergologii 29, 47–50.

Sabatini, S.E., Brena, B.M., Luquet, C.M., San Julián, M., Pirez, M., Carmen Ríos de Molina, M. del, 2011. Microcystin accumulation and antioxidant responses in the freshwater clam Diplodon chilensis patagonicus upon subchronic exposure to toxic Microcystis aeruginosa. Ecotoxicology and Environmental Safety 74, 1188–1194. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.03.012

Salazar, M.H., Salazar, S.M., 1996. Mussels as bioindicators: effects of TBT on survival, bioaccumulation, and growth under natural conditions. Organotin: Environmental Fate and Effects 20, 305–330.

Salmaso, N., Bernard, C., Humbert, J.-F., Akçaalan, R., Albay, M., Ballot, A., Catherine, A., Fastner, J., Häggqvist, K., Horecká, M., Izydorczyk, K., Köker, L., Komárek, J., Maloufi, S., Mankiewicz-Boczek, J., Metcalf, J.S., Quesada, A., Quiblier, C., Yéprémian, C., 2017. Basic Guide to Detection and Monitoring of Potentially Toxic Cyanobacteria, in: Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 46–69. https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch6

Salomonsson, M.L., Fredriksson, E., Alfjorden, A., Hedeland, M., Bondesson, U., 2015. Seafood sold in Sweden contains BMAA: A study of free and total concentrations with UHPLC-MS/MS and dansyl chloride derivatization. Toxicology Reports 2, 1473–1481. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.11.002

Sano, T., Nohara, K., Shiraishi, F., Kaya, K., 1992. A method for micro-determination of total microcystin content in waterblooms of cyanobacteria (blue-green algae). International Journal of Environmental Analytical Chemistry 49, 163–170. https://doi.org/10.1080/03067319208027567

Sanseverino, I., Conduto, D., Pozzoli, L., Dobricic, S., Lettieri, T., 2016. Algal bloom and its economic impact. European Union EUR, Luxembourg. https://doi.org/10.2788/660478

Sarnelle, O., Wilson, A.E., Hamilton, S.K., Knoll, L.B., Raikow, D.F., 2005. Complex interactions between the zebra mussel , Dreissena polymorpha , and the harmful phytoplankter , Microcystis aeruginosa 50, 896–904.

Scheffer, M., Rinaldi, S., Gragnani, A., Mur, L.R., Van, E.H., Ecology, S., 2008. On the Dominance of Filamentous Cyanobacteria in Shallow , Turbid Lakes Published by : Ecological Society of America ON THE DOMINANCE OF FILAMENTOUS CYANOBACTERIA IN SHALLOW , TURBID LAKES 78, 272–282.

Schmidt, J.R., Wilhelm, S.W., Boyer, G.L., 2014. The fate of microcystins in the environment and challenges for monitoring. Toxins 6, 3354–3387. https://doi.org/10.3390/toxins6123354

Schöne, B.R., Krause, R.A., 2016. Retrospective environmental biomonitoring – Mussel Watch expanded. Global and Planetary Change 144, 228–251. https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2016.08.002

Schopf, J.W., 2000. The Fossil Record: Tracing the Roots of the Cyanobacterial Lineage, in: The Ecology of Cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 13–35. https://doi.org/10.1007/0-306-46855-7_2

Scott, L.L., Downing, S., Phelan, R.R., Downing, T.G., 2014. Environmental modulation of microcystin and β-N-methylamino-l-alanine as a function of nitrogen availability. Toxicon 87, 1–5. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.05.001

Sellner, K.G., Doucette, G.J., Kirkpatrick, G.J., 2003. Harmful algal blooms: causes, impacts and detection. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 30, 383–406. https://doi.org/10.1007/s10295-003-0074-9

Simis, S.G.H., Peters, S.W.M., Gons, H.J., 2005. Remote sensing of the cyanobacterial pigment phycocyanin in turbid inland water. Limnology and Oceanography 50, 237–245. https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.1.0237

Sipia, V.O., Kankaanpaa, H.T., Flinkman, J., Lahti, K., Meriluoto, J.A.O., 2001. Time-Dependent Accumulation of Cyanobacterial Hepatotoxins in Flounders (Platichthys flesus) and Mussels (Mytilus edulis) from the Northern Baltic Sea 330–336.

Słodkowicz-Kowalska, A., Majewska, A.C., Rzymski, P., Skrzypczak, Ł., Werner, A., 2015. Human waterborne protozoan parasites in freshwater bivalves (Anodonta anatina and Unio tumidus) as potential indicators of fecal pollution in urban reservoir. Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters 51, 32–36. https://doi.org/10.1016/j.limno.2014.12.001

Smith, J.L., Haney, J.F., 2006. Foodweb transfer, accumulation, and depuration of microcystins, a cyanobacterial toxin, in pumpkinseed sunfish (Lepomis gibbosus). Toxicon 48, 580–589. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.07.009

Smith, V., 2003. Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems a global problem. Environmental Science and Pollution Research 10, 126–139. https://doi.org/10.1065/espr2002.12.142

Son, M., 2007. Native range of the zebra mussel and quagga mussel and new data on their invasions within the Ponto-Caspian Region. Aquatic Invasions 2, 174–184. https://doi.org/10.3391/ai.2007.2.3.4

Sotton, B., Guillard, J., Anneville, O., Maréchal, M., Savichtcheva, O., Domaizon, I., 2014. Trophic transfer of microcystins through the lake pelagic food web: Evidence for the role of zooplankton as a vector in fish contamination. Science of the Total Environment 466–467, 152–163. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.020

Spáčil, Z., Eriksson, J., Jonasson, S., Rasmussen, U., Ilag, L.L., Bergman, B., 2010. Analytical protocol for identification of BMAA and DAB in biological samples. The Analyst 135, 127–132. https://doi.org/10.1039/B921048B

Spoof, L., Arnaud, C., 2017. Appendix 3: Tables of Microcystins and Nodularins, in: Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. pp. 526–537. https://doi.org/10.1002/9781119068761.app3

Steffensen, D.A., 2008. Economic cost of cyanobacterial blooms, in: Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. Springer New York, New York, NY, pp. 855–865. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75865-7_37

Stewart, I., Seawright, A.A., Shaw, G.R., 2008. Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds – an overview, in: Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. Springer New York, New York, NY, pp. 613–637. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75865-7_28

Strayer, D.L., 2008. Freshwater Mussel Ecology. https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2

Su, L., Cai, H., Kolandhasamy, P., Wu, C., Rochman, C.M., Shi, H., 2018. Using the Asian clam as an indicator of microplastic pollution in freshwater ecosystems. Environmental Pollution 234, 347–355. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.075

Suchy, P., Berry, J., 2012. Detection of total microcystin in fish tissues based on lemieux oxidation and recovery of 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutanoic acid (MMPB) by solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry (SPME-GC/MS). International Journal of Environmental Analytical Chemistry 92, 1443–1456. https://doi.org/10.1080/03067319.2011.620703

Survey, U.. G., 2017. Zebra Mussel Monitoring Program for Texas [WWW Document]. URL https://txpub.usgs.gov/zmmp/index.html

Swhalb, A., Pusch, M., 2007. Horizontal and vertical movements of unionid mussels in a lowland river. Journal of the North American Benthological Society 26, 261–272. https://doi.org/10.1899/0887-3593(2007)26[261:HAVMOU]2.0.CO;2

Sylvester, F., Dorado, J., Boltovskoy, D., Juárez, Á., Cataldo, D., 2005. Filtration rates of the invasive pest bivalve Limnoperna fortunei as a function of Size and Temperature. Hydrobiologia 534, 71–80. https://doi.org/10.1007/s10750-004-1322-3

Thomas, R.H., Walsby, a. E., 1985. Buoyancy Regulation in a Strain of Microcystis. Microbiology 131, 799–809. https://doi.org/10.1099/00221287-131-4-799

Torres, J., Iriarte, L.L., Kurland, L.T., 1957. Amyotrophic Lateral Sclerosis Among Guamanians in California. Calif. Med. 86, 385–388.

Tricarico, E., Bertocchi, S., Brusconi, S., Casalone, E., Gherardi, F., Giorgi, G., Mastromei, G., Parisi, G., 2008. Depuration of microcystin-LR from the red swamp crayfish Procambarus clarkii with assessment of its food quality. Aquaculture 285, 90–95. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.003

van Apeldoorn, M.E., van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A., Bakker, G.J.I., 2007. Toxins of cyanobacteria. Molecular Nutrition & Food Research 51, 7–60. https://doi.org/10.1002/mnfr.200600185

Van Damme, D., 2014. Dreissena polymorpha. The IUCN Red List of Threatened Species [WWW Document].

Vanderploeg, H. a., Liebig, J.R., Carmichael, W.W., Agy, M. a., Johengen, T.H., Fahnenstiel, G.L., Nalepa, T.F., 2001. Zebra mussel (Dreissena polymorpha) selective filtration promoted toxic Microcystis blooms in Saginaw Bay (Lake Huron) and Lake Erie. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 58, 1208–1221. https://doi.org/10.1139/cjfas-58-6-1208

Vasconcelos, V.M., 1995. Uptake and depuration of the heptapeptide toxin microcystin-LR in Mytilus galloprovincialis. Aquatic Toxicology 32, 227–237. https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)00085-5

Vermaas, W.F., 2001. Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria. Encyclopedia of Life Sciences. https://doi.org/10.1038/npg.els.0001670

Vincent, W.F., 2000. Cyanobacterial Dominance in the Polar Regions, in: The Ecology of Cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 321–340. https://doi.org/10.1007/0-306-46855-7_12

Walsby, A.E., 1975. Gas Vesicles. Annual Review of Plant Physiology 26, 427–439. https://doi.org/10.1146/annurev.pp.26.060175.002235

Walsby, A.E., Hayes, P.K., Boje, R., Stal, L.J., 1997. The selective advantage of buoyancy provided by gas vesicles for planktonic cyanobacteria in the Baltic Sea. New Phytologist 136, 407–417. https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00754.x

Ward, D.M., Castenholz, R.W., 2000. Cyanobacteria in Geothermal Habitats, in: The Ecology of Cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 37–59. https://doi.org/10.1007/0-306-46855-7_3

Ward, J.E., MacDonald, B.A., Thompson, R.J., Beninger, P.G., 1993. Mechanisms of suspension feeding in bivalves: Resolution of current controversies by means of endoscopy. Limnology and Oceanography 38, 265–272. https://doi.org/10.4319/lo.1993.38.2.0265

Watanabe, M.F., Park, H.D., Kondo, F., Harada, K., Hayashi, H., Okino, T., 1997. Identification and estimation of microcystins in freshwater mussels. Natural toxins 5, 31–5. https://doi.org/10.1002/(SICI)(1997)5:1<31::AID-NT5>3.0.CO;2-X

Watanabe, M.F., Tsuji, K., Watanabe, Y., Harada, K., Suzuki, M., 1992. Release of heptapeptide toxin (microcystin) during the decomposition process of Microcystis aeruginosa. Natural Toxins 1, 48–53.

Weirich, C.A., Miller, T.R., 2014. Freshwater Harmful Algal Blooms: Toxins and Children's Health. Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care 44, 2–24. https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2013.10.007

Weiss, J.H., Choi, D.W., 1988. Beta-N-methylamino-L-alanine neurotoxicity: requirement for bicarbonate as a cofactor. Science (New York, N.Y.) 241, 973–5. https://doi.org/10.1126/science.3136549

Welker, M., Fastner, J., Erhard, M., Von Döhren, H., 2002. Applications of MALDI-TOF MS analysis in cyanotoxin research. Environmental Toxicology. https://doi.org/10.1002/tox.10073

White, J.D., Sarnelle, O., 2014. Size-structured vulnerability of the colonial cyanobacterium, Microcystis aeruginosa, to grazing by zebra mussels (Dreissena polymorpha). Freshwater Biology 59, 514–525. https://doi.org/10.1111/fwb.12282

Whitton, B., Potts, M., 2000. The Ecology of Cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/0-306-46855-7

WHO, 2017. Guidelines for drinking-water quality, 4th edition, incorporating the 1st addendum.

Wiegand, C., Pflugmacher, S., 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review 203, 201–218. https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.11.002

Willer, D., Aldridge, D.C., 2017. Microencapsulated diets to improve bivalve shellfish aquaculture. Royal Society Open Science 4, 171142. https://doi.org/10.1098/rsos.171142

Williams, D.E., Dawe, S.C., Kent, M.L., Andersen, R.J., Craig, M., Holmes, C.F.B., 1997. Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, mytilus edulis, and in vivo evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues. Toxicon 35, 1617–1625. https://doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00039-1

Winkel, E.H. TEN, Davids, C., 1982. Food selection by Dreissena polymorpha Pallas (Mollusca: Bivalvia). Freshwater Biology 12, 553–558. https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1982.tb00647.x

Wituszynski, D.M., Hu, C., Zhang, F., Chaffin, J.D., Lee, J., Ludsin, S.A., Martin, J.F., 2017. Microcystin in Lake Erie fish: Risk to human health and relationship to cyanobacterial blooms. Journal of Great Lakes Research 43, 1084–1090. https://doi.org/10.1016/j.jglr.2017.08.006

Woller-Skar, M., 2009. Low-Nutrient Lakes and the Subsequent Production and Fate of. College of Bowling Green State University.

Woller-Skar, M.M., 2009. Zebra Mussel (Dreissena polymorpha) Promotion of Cyanobacteria in Low-Nutrient Lakes and the Subsequent Production and Fate of Microcystin.

Woller-Skar, M.M., Jones, D.N., Luttenton, M.R., Russell, A.L., 2015. Microcystin Detected in Little Brown Bats (Myotis lucifugus). The American Midland Naturalist 174, 331–334. https://doi.org/10.1674/0003-0031-174.2.331

Wood, R., 2016. Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure — A review of the literature. Environment International 91, 276–282. https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.02.026

Wood, S.A., Briggs, L.R., Sprosen, J., Ruck, J.G., Wear, R.G., Holland, P.T., Bloxham, M., 2006. Changes in concentrations of microcystins in rainbow trout, freshwater mussels, and cyanobacteria in Lakes Rotoiti and Rotoehu. Environmental Toxicology 21, 205–222. https://doi.org/10.1002/tox.20174

Yokoyama, A., Park, H.D., 2002. Mechanism and prediction for contamination of freshwater bivalves (Unionidae) with the cyanobacterial toxin microcystin in hypereutrophic Lake Suwa, Japan. Environmental Toxicology 17, 424–433. https://doi.org/10.1002/tox.10075

Žegura, B., Lah, T.T., Filipič, M., 2004. The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. Toxicology 200, 59–68. https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.03.006

Zhang, D., Xie, P., Liu, Y., Qiu, T., 2009. Transfer, distribution and bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in Lake Taihu, China, with potential risks to human health. Science of the Total Environment 407, 2191–2199. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.12.039

Zurawell, R.W., Kotak, B.G., Prepas, E.E., 1999. Influence of lake trophic status on the occurrence of microcystin-LR in the tissue of pulmonate snails. Freshwater Biology 42, 707–718. https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1999.00499.x

Annexes

toxins

MDPI

Article

Genotoxic and Cytotoxic Effects on the Immune Cells of the Freshwater Bivalve *Dreissena polymorpha* Exposed to the Environmental Neurotoxin BMAA

Alexandra Lepoutre [1], Nadia Milliote [1], Marc Bonnard [1], Mélissa Palos-Ladeiro [1], Damien Rioult [1], Isabelle Bonnard [1], Fanny Bastien [1], Elisabeth Faassen [2,3], Alain Geffard [1] and Emilie Lance [1,*]

[1] Université de Reims Champagne-Ardenne UMR-I 02 INERIS-URCA-ULH SEBIO Unité Stress Environnementaux et, BIOsurveillance des milieux aquatiques UFR Sciences Exactes et Naturelles, Campus du Moulin de la Housse, BP 1039 51687 Reims cedex, France; alexandra.lepoutre@univ-reims.fr (A.L.); nmilliot@edu.mnhn.fr (N.M.); marc.bonnard@univ-reims.fr (M.B.); melissa.palos@univ-reims.fr (M. P-L.); damien.rioult@univ-reims.fr (D.R.); isabelle.bonnard@univ-reims.fr (I.B.); fanny.donaz@univ-reims.fr (F.B.); alain.geffard@univ-reims.fr (A.G.); emilie.lance@univ-reims.fr (E.L.)

[2] RIKILT, Wageningen Research, Akkermaalsbos 2, 6708 WB, WAGENINGEN, The Netherlands; els.faassen@wur.nl

[3] Aquatic Ecology and Water Quality Management Group, Wageningen University, Droevendaalsesteeg 3a, 6708 PB, Wageningen, The Netherlands

* Correspondence: emilie.lance@univ-reims.fr; Tel.: +33-326-913-369

Received: 22 December 2017; Accepted: 23 February 2018; Published: 27 February 2018

Abstract: The environmental neurotoxin β-N-Methylamino-L-alanine (BMAA) has been pointed out to be involved in human neurodegenerative diseases. This molecule is known to be bioaccumulated by bivalves. However, little data about its toxic effects on freshwater mussels is available, particularly on the hemolymphatic compartment and its hemocyte cells involved in various physiological processes such as immune defenses, digestion and excretion, tissue repair, and shell production. Here we exposed *Dreissena polymorpha* to dissolved BMAA, at the environmental concentration of 7.5 µg of /mussel/3 days, during 21 days followed by 14 days of depuration in clear water, with the objective of assessing the BMAA presence in the hemolymphatic compartment, as well as the impact of the hemocyte cells in terms of potential cytotoxicity, immunotoxicity, and genotoxiciy. Data showed that hemocytes were in contact with BMAA. The presence of BMAA in hemolymph did not induce significant effect on hemocytes phagocytosis activity. However, significant DNA damage on hemocytes occurred during the first week (days 3 and 8) of BMAA exposure, followed by an increase of hemocyte mortality after 2 weeks of exposure. Those effects might be an indirect consequence of the BMAA-induced oxidative stress in cells. However, DNA strand breaks and mortality did not persist during the entire exposure, despite the BMAA persistence in the hemolymph, suggesting potential induction of some DNA-repair mechanisms.

Keywords: BMAA; hemocytes; genotoxicity; cytotoxicity; immunotoxicity; freshwater bivalves

Key Contribution: Through a 21-day *in vivo* exposure of the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* to dissolved β-N-Methylamino-L-alanine (BMAA), followed by 14 days of depuration, this study reveals the presence of BMAA in the hemolymphatic compartment, as well as DNA stand breaks and cytotoxicity on the immune cells.

1. Introduction

Harmful algal blooms (HAB) are increased by human activities [1] and, because of their ability to produce secondary metabolites that can be harmful to other species, they are known to have an impact on ecosystems and human health [2]. Among those toxins, the neurotoxin β-N-Methylamino-L-alanine (BMAA), a hydrophilic non-protein amino acid, is a subject of growing concern. Indeed, BMAA could be potentially involved in the development of human neuro-degenerative pathologies such as the Amyotrophic Lateral Sclerosis-Parkinsonism-Dementia complex (ALS-PDC) [3]. Historically, the etiological link between BMAA and ALS has been pointed out in a study conducted in Guam in the 50 s, where the incidence of ALS was 50 to 100 times higher than in the rest of the world [3]. As BMAA has been reported in human brains of people who suffer from ALS-PDC [4], it has been alleged that the contamination came from chronic exposure through a biomagnification process. Indeed, the endosymbiotic cyanobacteria of the genera *Nostoc*, present in cycads roots, has been shown to produce BMAA [3,5]. The cycads seeds are then ingested by fruits bats *Pteropus mariannus* while foraging. As bats were traditional food items on Guam, human contamination is thought to have occurred during the consumption of whole individuals [3,5]. However, this hypothesis is subject to controversy [6]. The BMAA toxic mechanism has not been fully determined, but current research shows that the neurotoxin may (i) form carbamate adducts when conjugated with bicarbonate ions at physiological concentrations, inducing a motoneuron excitotoxicity via the L-glutamate receptors [7–9], which can lead to an oxidative stress an cell death [8,9]; (ii) inhibit the synthesis and/or the stimulation of glutamine degradation [10]; (iii) inhibit cells cysteine/glutamate antiporter, leading to a depletion of glutathione (GSH) which increases oxidative stress [8]; and (iv) bind to or incorporate into proteins during their synthesis [11], although this hypothesis has been criticized [12]. Little data about animal toxicology or *in situ* occurrence are available for this emerging environmental neurotoxin, which is associated with controversies in relation to analytical challenges for its detection and quantification in various matrices [13].

BMAA was historically thought to be produced ubiquitously by cyanobacteria; recent upgrading of analytical methods has narrowed the list of cyanobacterial BMAA producers and shown that it is also produced by some diatoms and dinoflagellate species [14–18]. The neurotoxin has also been detected in food webs outside of Guam, in animals destined for human consumption (fish, mussel, and oyster) in China, United States, and Europe [15,16,19–24]. Moreover, a possible cluster of ALS has been pointed out in the Thau Lagoon (France) that could be potentially linked with the consumption of BMAA-contaminated seafood [25].

Up to now, BMAA bioaccumulation following laboratory exposure of invertebrates to dissolved BMAA or to BMAA-producers has been demonstrated in gammarids [26–28] and bivalves [29,30], including the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* [29] investigated in the present study. The freshwater sessile bivalve *D. polymorpha*, is native from the Ponto-Caspian region and is now a widespread species [31]. Bivalves are commonly used as bioindicators and biomonitors in relation to their direct contact with medium, their abundance, broad distribution, limited mobility, lifespan, and ease of handling [32]. This mussel can filter particles from 0.4 µm [33] to 200 µm [34] or even 750 µm after 16 h of starvation [35], including phytoplankton species, and is also known to uptake efficiently amino acid from its environment [36]. This wide food size range combined with filtering capacities ranging from 5 to 400 mL/mussel/hour [37] allows zebra mussels to be potentially intoxicated by BMAA through three main pathways: (i) the gill absorption of dissolved BMAA, (ii) the ingestion of food particles in which BMAA may be adsorbed, and (iii) the ingestion of BMAA-producers. Those contamination pathways, and more particularly the gill diffusion, may induce a BMAA distribution in the hemolymphatic compartment.

Bivalves have an open circulatory system composed of a heart and vessels in which the hemolymph circulates. Hemolymph is compossed of cells named hemocytes and dissolved proteins. Those cells are primarily in charge of the immune defense and pathogens elimination [38], but also take part in various physiological processes including digestion, tissue repair, shell production, and excretion [38–40]. Because of their involvement in mussels defense and homeostasy, hemocytes

have a key role in bivalves physiology. The aim of this study was to assess the impact of the BMAA on hemocytes of *D. polymorpha*, in terms of cell mortality, phagocytosis, and DNA integrity, through a 3-week discontinuous exposure of *D. polymorpha* to dissolved BMAA, followed by 2 weeks of depuration. Due to the lack of a known organism that could produce BMAA steadily, zebra mussels were exposed to dissolved BMAA to a concentration 7.5 µg of dissolved BMAA/mussel/3 days. Few data of environmental BMAA concentrations acquired with a reliable analytical method and reported per liter of water are available to date [41]. One study reports BMAA concentrations from 0.01 to 0.3 µg/L in lake samples (Canada) [42]. Based on the filtering capacity of *D. polymorpha*, ranging from 0.12 to 9.6 L/mussel/day according to food concentrations [43], one zebra mussel could theoretically filtrate from 1.2 ng BMAA/day to 9.6 µg BMAA/day. This broad range of BMAA environmental concentrations in water includes the one used in this study. As the BMAA pathway into mussels is still unknown, the hemolymphatic concentration of BMAA was followed throughout the study to assess hemocytes exposure. We discuss the BMAA presence in the hemolymph and its impacts on hemocytes, in terms of potent cell penetration and alteration of DNA integrity, as well as subsequent potent DNA reparation.

2. Results

In this study, freshwater mussels *D.polymorpha* have been exposed to 7.5 µg BMAA/3 days for 21 days, followed by 21 days of depuration in clear water.

2.1. BMAA Accumulation in Hemolymph

The total BMAA fraction was evaluated here, comprising the free BMAA, soluble in sample supernatant, and the BMAA associated/bound to proteins or peptides of low molecular weight that requires tissue hydrolysis to be extracted [44]. Total BMAA was detected in all hemolymph samples. However, a strong suppression of the internal standard (D_3BMAA) signal was observed in some samples (2 samples from day 8 of exposure, 2 from day 1 of depuration, and all other depuration samples), which made it impossible to accurately estimate the BMAA concentration in these samples. Therefore, only the data that are quantified based on the internal standard response are shown. After 24 h of exposure, total BMAA has been found in all hemolymph samples with a mean of 0.438 ± 0.117 µg/mL (Figure 1). Then, the concentration in samples remained constant until day 21 of exposure, in which the concentration increased ($p > 0.01$) and reached 4.984 ± 0.829 µg/mL. The day after, representing the first day of depuration, BMAA could only be quantified in one sample among three at a concentration of 0.755 µg/mL.

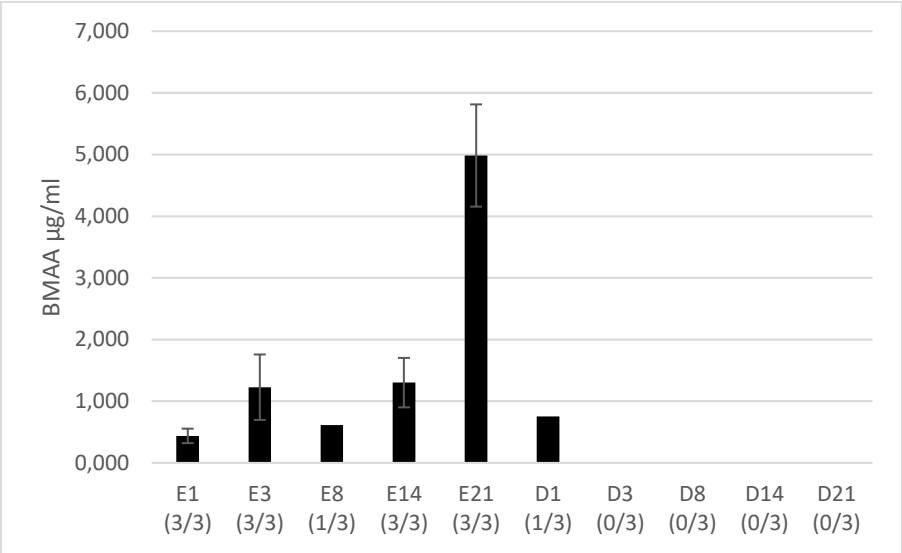

Figure 1. Concentration of BMAA (µg/mL) in hemolymph samples during the exposure (E) and depuration (D) periods; numbers in brackets represent the number of samples in which BMAA quantification has been performed compared to the three samples analyzed. Technical difficulties prevented BMAA quantification in the other samples, although BMAA was detected. No significant difference between samples appeared with a Mann-Whitney test, $p < 0.01$.

2.2. Hemocytes Mortality

The percentage of dead hemocytes has been measured throughout time (Figure 2).

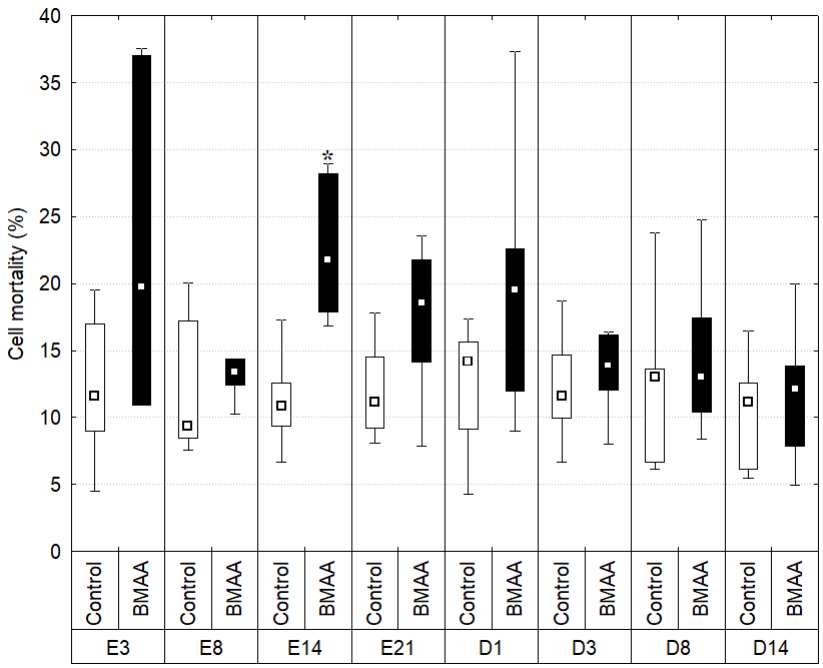

Figure 2. Hemocyte mortality (%) measured during the exposure (E) and depuration (D) period. Boxplots indicate first and third quartile of the observations, whiskers indicate minimum and maximum values, and the median is indicated by a square. Dark bars indicate the BMAA treatment (7.5 µg of dissolved BMAA/mussel/3 days) and the white bars the controls. * Indicates a significant difference between the exposed individual and the control of the same sampling date with a Mann-Whitney test, $p < 0.01$, n between 6 and 10. Due to a technical issue, data from E1 are not shown.

The percentage of mortality in controls remained stable during the experiment: a minimum of 11.513% ± 1.118 of dead cells observed on day 14 of the exposure period, and a maximum of 12.702% ± 1.806 on day 8 of the depuration period (Kruskal-Wallis test: $p > 0.01$). The percentage of mortality from individuals exposed to BMAA did vary during the experiment. On day 3 and 8 of exposure the mortality remained stable (22.672% ± 12.719 on day 3 and 13.540% ± 2.600 on day 8) and did not vary significantly from controls ($p > 0.01$; U values respectively 11 and 9). Then, the percentage of dead hemocytes on day 14 of exposure is significantly higher than the one observed in controls ($p = 0.002$, $U = 1$) and reached 22.582% ± 5.464. Data also shows greater inter-individual variations in individuals exposed to BMAA compared to controls at all sampling times, except at day 8 of exposure.

2.3. Hemocytes Phagocytosis

During the exposure, the phagocytosis efficiency was evaluated through the measure of the percentage of hemocytes that had engulfed 3 beads ore more (Figure 3). The data did not show significant differences or trends between controls and mussels exposed to BMAA during the exposure and the depuration periods (Kruskal-Wallis test: $p < 0.01$).

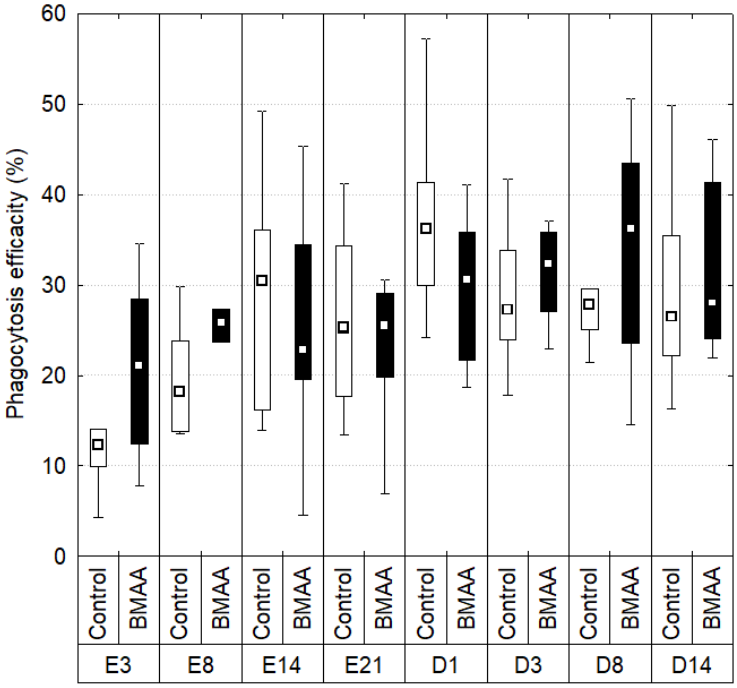

Figure 3. Phagocytosis efficiency measured during the exposure (E) and depuration (D) periods. Boxplots indicate first and third quartile of the observations, whiskers indicate minimum and maximum values, and the median is indicated by a square. Dark bars indicate the BMAA treatment (7.5 µg of dissolved BMAA/mussel/3 days) and the white bars the controls. No difference between exposed individual and controls of the same time with a Mann-Whitney test, $p < 0.01$, n between 6 and 10.

The mean number of beads engulfed per cell, representing the avidity index (Figure 4), was also measured. As for the phagocytosis efficiency, no significant differences appeared between controls and individuals exposed to BMAA during the exposure and depuration periods (Kruskal-Wallis test: $p > 0.01$).

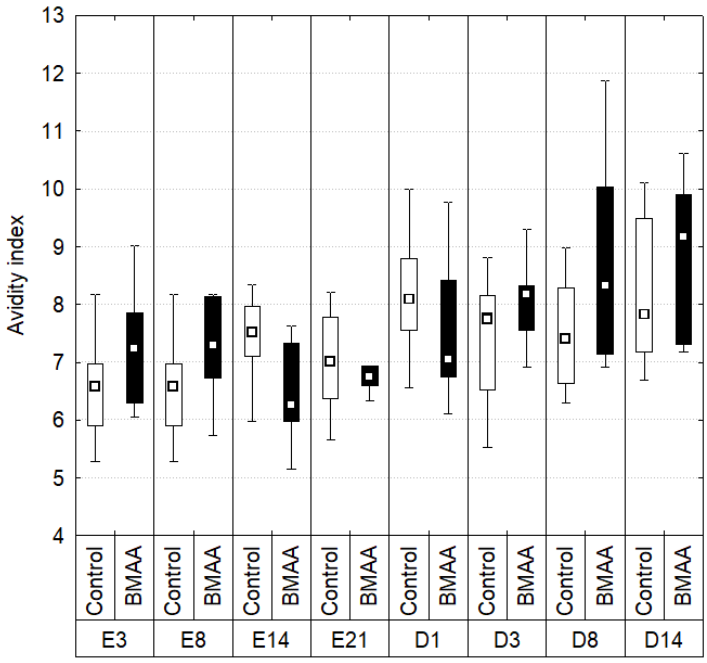

Figure 4. Avidity index measured during the experiment. (%) measured during the exposure (E) and depuration (D) periods. Boxplots indicate first and third quartile of the observations, whiskers indicate minimum and maximum values, and the median is indicated by a square. Dark bars indicate the BMAA treatment (7.5 µg of dissolved BMAA/mussel/3 days) and the white bars the controls. No difference between exposed individual and controls of the same time with a Mann-Whitney test, $p < 0.01$, n between 6 and 10.

2.4. DNA Integrity

The percentage of DNA present in the tail of comets (Tail DNA), reflecting the degradation of DNA, has been studied throughout this experiment (Figure 5).

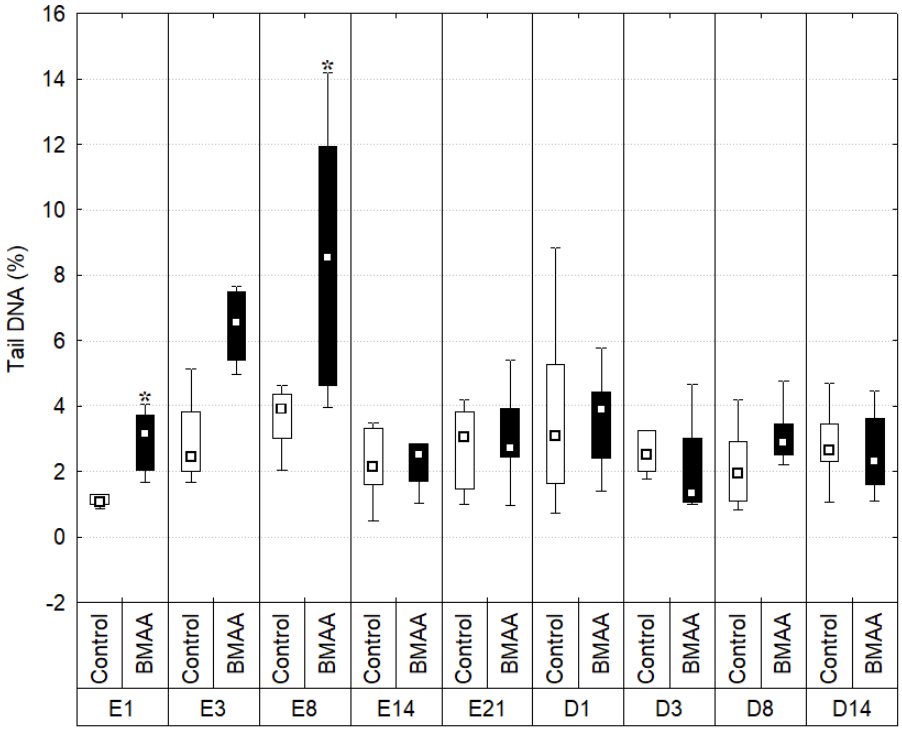

Figure 5. Mean tail DNA (%) measured during the exposure (E) and depuration (D) periods. Boxplots indicate first and third quartile of the observations, whiskers indicate minimum and maximum values, and the median is indicated by a square. Dark bars indicate the BMAA treatment (7.5 µg of dissolved BMAA/mussel/3 days) and the white bars the controls. * Indicates a significant difference between the exposed individuals and the controls of the same sampling date with a Mann-Whitney test, $p < 0.01$, $n = 8$.

DNA strand breaks in controls remained stable over the experiment (Kruskal-Wallis test: $p > 0.01$) with a minimum of 1.212 ± 0.379% of tail DNA at the first day of exposure and a maximum of 4.018% ± 4.369 after 21 days of exposure. On the other hand, greater variations have been observed in individuals exposed to BMAA. At the first day of exposure, the percentage of tail DNA (%tDNA) in individuals exposed to BMAA reached 2.942% ± 0.927 and was significantly higher than the one of controls ($p = 0.003$, $U = 1$). However, it should be notice than the %tDNA in controls tended to be lower on the first day of the experiment compared to other sampling dates, although the difference was not significant ($p > 0.01$). This low control value on day 1 revealed significant DNA damage in BMAA-exposed individuals, while their %tDNA values were comparable to those of controls at following times. Therefore, we do not put emphasis about the significant DNA damages observed at this first day of exposure. Then, DNA integrity of exposed individuals decreased throughout time, reaching a maximum of DNA strand breaks at the eighth day of exposure, with significantly higher damages, 9.748% ± 6.617, than in controls ($p = 0.0087$, $U= 7$). It should be noticed that, even if not significant ($p = 0.012$, $U = 8$), a trend of DNA damages in exposed organism has been observed at the third day of exposure in a higher level (7.290% ± 3.034) compared to controls (3.801% ± 3.554).

From day 14 of exposure, the level of DNA strand breaks in hemocytes of exposed mussels remained low and similar to controls during the rest of the exposure period, as well as during the depuration period (Kruskal-Wallis test: $p > 0.01$).

3. Discussion

Through a 3-week discontinuous exposure of the freshwater bivalve *D. polymorpha* to 7.5 µg BMAA/individual/3 days, the objectives of the experiment consisted of analyzing the presence of BMAA (total fraction) in the hemolymphatic compartment and studying potent subsequent impact on hemocytes in terms of (i) cytotoxicity, (ii) immunotoxiciy, and (iii) genotoxicity. As no steady laboratory BMAA-producer has been identified to date, zebra mussels were exposed to dissolved purified BMAA.

The potent immunotoxicity of BMAA has never been studied so far. It is interesting here to notice that BMAA was detected in the hemolymph from the first day of exposure until the last day of depuration, confirming the BMAA penetration in this compartment during *in-vivo* exposure. Another point is the chronology of the impact of BMAA on the hemocytes of *D. polymorpha*. Indeed, on the third and eight days of exposure, BMAA induced significant DNA damages, while cell mortality remained similar to controls, suggesting the genotoxicity of this molecule on hemocytes. Then, on the fourteenth day of exposure, significant hemocyte mortality was observed in BMAA-exposed cells, compared to controls, while no difference in the BMAA content in hemolymph was noticed compared to previous times of exposure, and no significant individual mortality was observed. This observed hemocyte mortality could potentially be a result of previous DNA damages. At the last day of exposure, BMAA concentration in hemolymph seemed to increase compared to previous days, but no genotoxicity or cytotoxicity were observed anymore.

Mussels have already been shown to accumulate BMAA during laboratory exposures to dissolved BMAA, but the transfer of BMAA from the medium to the hemolymphatic compartment remains unknown. To date, only the presence of BMAA in the entire mussel body has been demonstrated during an exposure of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to dissolved BMAA (1, 2.5 and 5 mg/L) for 24 and 48 h and to two BMAA-producing cyanobacterial strains (*Synechocysti salina* and *Microcoleus chthonoplastes)* [30]. Moreover, an exposure of *D. polymorpha* to approximately 100 µg/L of isotopically labeled BMAA for 48 h followed by 24 h of depuration has

shown that BMAA was taken up by zebra mussels, and that nearly all of the exogenous-labelled BMAA available has been removed from the medium [29]. In the present study, BMAA dissolved in the medium was later quantified in the hemolymphatic compartment, suggesting two entrance pathways: (i) a gill diffusion directly from the medium to the hemolymph, or (ii) an ingestion through a BMAA adsorption on food particles (*Chlorella sp* and *Scenedesmus sp*). However, because mussels feeding and BMAA addition in the medium has been done at different days, this hypothesis seems unlikely. Under such hypotheses, hemocytes may have been in contact with BMAA during the digestion and/or nutrient transport, through the digestive system. However, no information is available concerning either BMAA bioaccessibility (i.e., the BMAA fraction extracted from food after digestion that is available for absorption by the hemolymphatic compartment) or its biodisponibility (i.e., the BMAA fraction that indeed reaches the hemolymphatic compartment). This study, however, confirmed the BMAA transfer from the medium to the hemolymph of mussels. The hemolymph sampled in the posterior adductor muscle represents one fraction of the whole hemolymphatic compartment (the rest being in contact with organs), and the data provided from this analysis only allows the assessment of the presence of total BMAA in this tissue and the subsequent exposure of immune cells contained in it. As the BMAA content in hemolymph remained stable and did not increase in a time-dependent manner from the first day of exposure to day 14, we may hypothesize that hemolymph only transports BMAA into mussel's organs and therefore does not accumulate this toxin, which remains to be investigated. The increase of the total BMAA content (free or bound to peptides or to proteins) in the hemolymph on day 21 of exposure also required further investigations. The total BMAA content measured on day 21 might have been metabolized and emitted by some other organs as a degradation product or conjugated molecule for elimination. DNA damages and hemocytes mortality observed in this study suggest that the hydrophilic molecule BMAA may cross the cytoplasmic membrane. As amino-acids diffusion into cells is a minor pathway at physiological concentrations [45], it could be hypothesized that some transporters may allow this toxin to cross membranes. So far, as described in vertebrates' nervous system, pathways that could potentially explain BMAA entrance into cells are (i) the cerebrovascular large neutral amino acid carrier, which allows BMAA to cross the blood-brain barrier in rats [46]; and (ii) the cystine/glutamate antiporter (system xc-), which allows BMAA to cross cells in rats cortical cells cultures [47]. Hemocytes membranes might therefore also have amino-acid transporters that are able to get BMAA into the cell. So far, except for one study carried out on bacteria [48], toxicological studies about the impact of BMAA have been carried out on vertebrates, and the extrapolation of potential mechanisms of action on invertebrates remains tenuous. As BMAA is an emerging environmental neurotoxin, little evidence of animal toxicology is available to date, and its metabolites are also unknown; therefore, it may be difficult to assess if the observed damages where caused by this molecule or its metabolites. DNA damages by BMAA could have been induced either indirectly on the genome or directly by crossing the nuclear membrane. An Ames test on five *Salmonella typhimurium* strains with five BMAA concentrations ranging from 11 to 900 µg/plate has shown that BMAA did not induce any mutation and was neither cytotoxic nor genotoxic for bacteria [48]. A study carried out on human neuroblastoma cell line SH-SY5Y [49] showed, through a plasmid assay, that BMAA is able to induce DNA strand breaks from 309.2 mg/L, potentially linked with the nitrosation of BMAA, which generates an alkylating form that is also able to induce more DNA strand breaks than BMAA itself. DNA damages and cell mortality observed here could also be explained by the ability of BMAA to induce an oxidative stress in cells and/or its potential insertion in or binding to proteins. The induction of an oxidative stress by BMAA has been shown in murine cortical cell cultures; in presence of bicarbonate at physiological concentration, BMAA could form a carbamate adduct that is a glutamate analogue [7]. Under this form, this molecule may thus be able to activate glutamate receptors in motoneurons of the central nervous system, provoking a cascade of reaction leading to excitotoxicity, oxidative stress, and cell death [8,9]. Through the inhibition of cystine/glutamate antiporter in cortical cultures, BMAA could also inhibit the cystine uptake leading to a depletion of glutathione (GSH), thus increasing cellular oxidative stress [8]. Glial cells exposed to 0.5-1-3 mM BMAA [50], with and without bicarbonate,

showed a relative generation of reactive oxygen species (ROS) compared to untreated samples. At the individual level, the exposure of *D.polymorpha* to 10-100 and 500 µg/L BMAA during a maximum period of 48 h showed no significant alteration in activities of antioxidant enzymes catalase (CAT), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx), or of the biotransformation glutathione S-transferases (GST) [29]. However, variations of activities of antioxidants enzymes might have been observed in *D. polymorpha* if the study covered a longer period of time. Nevertheless, in the same study, BMAA induced an oxidative stress (i.e., increase of CAT and GR activities) on other freshwater bivalves (*Unio tumidus* and *Corbicula javanicus)* after 24 h and 48 h of exposure, respectively [51]. Oxidative stress has been shown to induce DNA damages that can lead to apoptosis in eukaryotes [52] and could also stress mitochondria, which could lead to DNA damage and even cell death [50]. This oxidative stress might be the first possible pathway of the genotoxicity observed in this study. The mechanism of DNA damages induced by BMAA would deserve to be elucidated by further investigations. In order to study if an oxidative stress is involved in the DNA damages during a BMAA exposure, it could be interesting to use oxidative probes such as DHR-123 [53] or to analyze markers such as 8-hydroxyguanosine, which is used to measure the rate of oxidative damage to nucleic acids and lipids [54]. Also, it could be interesting to use different versions (standard alkaline, modified-) of the comet assay to highlight DNA strand breaks or oxidative DNA lesions.

Another mechanism that could explain the observed DNA damages is the potential insertion of BMAA into proteins. Indeed, a BMAA insertion into proteins would lead to their misfolding and a subsequent change of their properties, directly or indirectly inducing stress. Exposure of human cell lines MCR-5 and SH-SY5Y to 31 nM of ^{3}H-BMAA and 200–1000 µM of BMAA showed that BMAA was associated with the protein fraction, and this association was positively correlated with protein synthesis. Moreover, the addition of serine in the medium leads to a decrease in the detection of BMAA in the protein fraction [11]. The authors hypothesized that BMAA was misincorporated in human cells in place of the amino acid serine, a phenomenon that could lead to protein misfolding and therefore to a potential cell dysfunction [11]. However, this hypothesis is still a matter of debate and there is yet no evidence that BMAA could be integrated into proteins rather than chemically associated with them [12]. Moreover, this integration into proteins or adhesion might be limited in time: BMAA was found in neonatal rats of 9 to 10 days, 24 h after 2 days of subcutaneous injection of a dose corresponding from 50 to 600 mg/kg BMAA HCl, but no BMAA was detected at 28 weeks of age [55]. BMAA misincorporation could elicit a stress of the endoplasmic reticulum which, when the accumulation of misfolded protein is excessive, could lead to organelle dysfunction and trigger cell death [56]. If proteins containing proteomimetic amino acids are efficiently degraded or generate truncated proteins, they can give rise to peptides that can induce autoimmune symptoms due to the recognition as non-self-antigens [57].

In this study, the phagocytosis avidity (mean number of beads phagocyted per hemocytes) and efficiency (mean number of hemocytes that have phagocyted three beads and more) did not differ in mussels exposed to BMAA compared to controls. This could suggest that the immune system of bivalves was not activated by BMAA, because it did not recognize this molecule or its metabolites, which is expected for an amino acid. Indeed, hemocytes commonly take charge of particles of the size range of bacteria [58]. On the other hand, it would suggest that the toxin did not interfere with bead phagocytosis by hemocytes, despite the induced genotoxicity on days three and eight of exposure and subsequent cell mortality observed on day 14 of exposure. The absence of impact on both phagocytosis indexes, despite an increase of cell mortality, could be explained by the fact that analyses of phagocytosis have been performed only on cells that were alive. Indeed, those measurements were done with the use of FITC-labelled beads, without the use of a dye that quantifies dead cells, and were performed on events that had the same size and complexity as hemocytes. Because dead cells become smaller and less complex, their signal might be out of our acquisition area. Also, cell mortality has been measured through the use of propidium iodide (PI), a stain excluded by intact membranes. This dye does not rapidly cross intact cells membranes and, if it manages to penetrate them, the molecule is likely to be pumped outside [59]. When membrane integrity is compromised, PI can bind itself non-selectively to nucleic acids [59]. While propidium

iodide is used to distinguish living cells from dead ones [60], this dye, in fact, assesses membranes integrity, which reflects cell mortality. Thus, using this probe is only informative of the percentage of cells that are dead. It has been observed that *Saccharomyces cerevisiae* cells can take up PI while undergoing a stress, but membranes of a subpopulation of cells could be later repaired [61]. Thus, it is possible that the increase of PI fluorescence on day 14 of exposure reflects the mortality of most cells but a reversible transient permeability for others, caused by a BMAA-induced stress.

The absence of genotoxic or cytotoxic effects on day 21 of exposure, while zebra mussels are still exposed to BMAA, could potentially be explained by the establishment of mechanisms that allows hemocytes to remain viable, and functioning, while undergoing a contamination, and/or a BMAA detoxification/metabolization. A mechanism that could explain DNA reparation in this context could be the base excision repair (BER) pathway [52,62]. First, the abnormal base is detected and excised by DNA glycosylases. Then, the remaining sugar is cut, and an undamaged nucleotide is inserted, correcting the site. The BER pathway exists in bivalves and is known to act fast. Indeed, it has been shown that an *in vivo* exposure of the freshwater mussels *Limnoperna fortunei* to pentachlorophenol (PCP) leads to DNA damages that were repaired after 2h in clean water [63]. If measured genotoxicity and cell death are triggered by protein misfolding, cells could potentially activate the unfolded protein response (UPR) pathways. UPR is a collection of signaling pathways that leads at first to a transient attenuation in the rate of protein synthesis, then an upregulation of genes encoding proteins involved in protein folding, and lastly to the degradation of endoplasmic reticulum-localized proteins [56].

Moreover, as discussed above, the total BMAA measured in the hemolymph on day 21 could have been metabolized or be a degradation product emitted by other organs, and therefore could have lost its toxicity, explaining the absence of effect. This has to be investigated.

Finally, the high dispersion of boxplots showing results of DNA damages and hemocytes mortality in individuals exposed to BMAA can be explained by inter-individual differences in the ability to (i) uptake BMAA from the medium. Indeed, valves movement of mussels is asynchronous and filtration rate may considerably vary between individuals (0.1 to 0.4 L/mussel/h) [43]; (ii) accumulate, metabolize, and eventually detoxify BMAA; and (iii) cope with potent oxidative stress and DNA damages induced by the neurotoxin.

4. Conclusions

Through an *in vivo* exposure of a freshwater mussel, this study constitutes the first evidence that BMAA is present in the hemolympatic compartment of mussels, and induces transient DNA damages on hemocytes, which may lead to a short time cellular death. However, whether this hydrophilic amino acid has directly induced DNA strand breaks and cell cytotoxicity, or indirectly via pathways such as oxidative stress or protein misfolding, remained to be investigated. Also, the kinetics of BMAA accumulation and elimination in zebra mussels remains to be deeply investigated via a follow-up of the BMAA content in several organs.

5. Materials and Methods

5.1. Mussels Sampling and Acclimation

Zebra mussels were collected at the same spot, at about 5 m depth in March at the Lac-du-Der-Chantecoq (48°36'07.7"N; 4°44'37.0"E). In the laboratory, mussels were kept 1 day at 4 °C and in the dark in tanks aerated by an air pump (Zolux, Clisson, France) containing 50% of lake water and 50% of Cristalline® (Saint Yorre, France) source water. Mussels measuring 2 ± 0.3 cm were kept acclimating in the dark only in aerated Cristalline® water at 16 ± 2 °C. They were fed with 2×10^6 cells/individual/day of a 50:50 mix of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* (Greensea, Mèze, France). Algal density was measured with an optic microscope (Primovert, Zeiss, Oberkochen, Germany) and KOVA® slides (Kova slide, VWR, Fontenay-sous-Bois, France)

During the 2 week long acclimation, mussels were randomly divided in two groups in duplicate tanks of 275 individuals that contained 3 L of water and aerated with an air pump. Tanks were put at 16 ± 2 °C with a cycle of 12 h of light and 12 h of darkness. The water was changed every 3 days in order to have the same rhythm as during the exposure.

5.2. Exposure

Mussels were exposed for 21 days to dissolved BMAA (L-BMAA hydrochloride B-107, Sigma–Aldrich®,Saint-Louis, MO, USA) at a concentration equivalent to 7.5 µg BMAA/mussel/3 days in two tanks aerated by an air pump (Zolux, Clisson, France) and containing 275 individuals at the beginning of the experiment. Two 3 L control tanks that contained the same number of mussels put in clear water were added. The water was renewed at 3 days of interval in control and exposure treatments, and mussels were fed similarly to during the acclimation period (with 50:50 mix of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*). BMAA spiking was performed at each water change, at 3 days of interval, but mussels were fed two days after it (i.e., one day before water changing) in order to avoid adsorption of BMAA to the algal food. Mussels were randomly collected and sacrificed at 0, 1, 3, 8, 14, and 21 days of the exposure period and at 1, 3, 8, 14, and 21 days of the depuration period to perform flow cytometry tests (n = 10), COMET assay (n = 8) and measurement of the BMAA content in hemolymph (n = 3 pools of 2 individuals). During the exposure period, the total amount of BMAA spiked at each water change was adjusted for the number of remaining individuals in order to maintain the exposure concentration of 7.5 µg BMAA/mussel/3 days.

5.3. BMAA in Hemolymph

Mussels used for the determination of the BMAA content in hemolymph were placed 24 h in clear water before sampling. This has been done to ensure an evaluation of the BMAA fraction remaining in the hemolymph and not the fraction that would have been early metabolized by individuals or possibly released into the environment. The hemolymph was withdrawn from the posterior adductor muscle using 300 µL-Myjector® (Terumo, Tokyo, Japan) syringes, transferred into Eppendorf® tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany), and then put in liquid nitrogen and stored at -80 °C. After being freeze-dried, tissues of 2 individuals were pooled. Total BMAA extraction was done according to previous studies [44]. Briefly, after the addition of D_3BMAA as an internal standard, samples were dried under vacuum then hydrolyzed for 20 h at 105 °C after the addition of 6 M HCl. After a drying step, samples were resuspended in 67% ACN / 33% water / 0.1% formic acid and analyzed by UHPLC-MS/MS. UHPLC-MS/MS analysis was performed as described in [64] on the same type of equipment but using a 150 mm column instead of a 100 mm column with a 5 mm precolumn. BMAA was well separated from DAB and AEG; the retention time of BMAA and D3BMAA was 9.4 min, the retention time of DAB was 10.8 min, and the retention time of AEG was 11.8 min. For BMAA, the ion ratios were as follows: m/z 102:88, 27%; m/z 102:76, 27%; m/z 102:73, 20%; and m/z 102:44, 52%. For D3BMAA, the ratios were m/z 105:88, 31%; and m/z 105:76, 23%. A 20% relative deviation from these ratios was allowed in the samples. Chromatograms of an analytical standards mixture (Figure S1) and a hemolymph sample (Figure S2) are provided as supplementary information.

Retention times and ion ratios were comparable to those reported in [64]. BMAA concentrations were corrected for the signal intensity of the internal standard. The concentration of BMAA in the hemolymph (in µg/µL fresh tissue) was calculated from the concentration in freeze-dried tissue using a previously established relation between hemolymph fresh weight and weight after freeze-drying. As gradation indicated by syringe is not considered precise enough for an exact quantification of the volume sampled, the weight of the hemolymph sample was evaluated. For this, an evaluation of the FW/DW ratio of the hemolymph was performed beforehand. This was done while taking hemolymph from 5 individuals and weighing it. The FW/DW ratio is 275.63 ± 21.93.

5.4. Preparation of Samples for Flow Cytometry and COMET Assay Analysis

Hemolymph was withdrawn as described previously, but syringes were coated with L15-15% medium. The medium was prepared as described in [65].

Samples were kept individually in DNase RNase Eppendorf® tubes that were resting on ice to prevent the formation of aggregates. Cell numeration was performed with an optic microscope (Primovert, Zeiss, Oberkochen, Germany) and KOVA® slides (Kova slide, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) using 10µL of hemolymph. During this step, samples were sorted to discard samples that contained other cellular types than hemocytes. Then, each hemolymph sample was divided in two in order to perform the COMET assay and the flow cytometry analysis on the same individual.

5.4.1. Flow Cytometry

Analyses were performed with a BD Accuri® C6 (Biosciences, Le Pont de Claix, France). A volume corresponding to 5×10^4 hemocytes was used to study the phagocytosis, and an aliquot of the same volume was used to study the mortality. Hemolymph samples were put individually into a 96 well plate. To each sample was added L15-15% medium. Then, the plate was incubated 4 h at 16 °C. 15 min before the end of the incubation, cells were detached with a 1 × trypsin/EDTA mix and incubated 1 min in the dark at room temperature.

- Mortality assay

To study the cell mortality, 1% of propidium iodide (IP, Sigma-Aldrich®, Saint-Louis, MO, USA) was added. Propidium iodide is excluded by live cells but enters permeabilized cells and binds DNA by intercalating between the bases; it produces fluorescence that was measured at 670 nm.

- Phagocytosis efficacity and avidity index

Cells samples were put individually into a 96 well plate. To each sample was added L15-15% medium, and FITC-labelled beads of 2 µm diameter were added to have a ratio of 50 beads per hemocyte. The plate was then incubated for 4 h in the dark at 16 °C. Fifteen minutes before the end of the incubation, cells were detached with a trypsin solution as described before. The fluorescence was measured at 530 nm. The phagocytosis efficacity is represented by the percentage of cells that have phagocytosed 3 beads or more; the avidity index is represented by the number of beads phagocyted on average per individual.

5.4.2. DNA Integrity Measurements

Due to technical constraint, the measure of DNA strand breaks has been performed on 8 of the 10 sampled individuals. Thus, those containing gametes have been set aside.

DNA strand breaks were quantified by the alkaline version (pH > 13) of the comet assay, as described [66] with minor modifications. All steps described below were performed under an inactinic light and at 4 °C to prevent any additional DNA damage. The experimental controlconsisted of a THP-1 cell line, provided by ATCC® (Manassas, VA, USA), maintained in lab, and exposed or not to UV rays (λ = 254 nm) for 1 min. Results show us that DNA damages were 19.05 ± 9.59% for negative controls and 42.35 ± 9.43 for positive controls. An ANOVA test showed that DNA damages of negative controls were significantly significant compared to positive controls ($p < 0.01$).

The optimal concentration of hemocytes for the comet assay was between 600,000/mL and 1,000,000 cells/mL to avoid overlapping comets and ensure the fast scoring of results. First, 100 µL of cell suspension was mixed with an equal volume of 1% (*w/v*) Low Melting Point (LMP, type VII) agarose in PBS Ca^{2+} and Mg^{2+} free (10 mM, pH 7.4, 37 °C). Two 30 µL-drops (gel replicates) of the previous mixture were deposited on a superfrosted microscopic slide, previously precoated with 0.8% (*w/v*) Normal Melting Point (NMP, Type I) agarose, which were then covered with a coverslip. Slides were cooled for 10 min until the agarose layer harden. After agarose solidification, the coverslip was removed and microscopic slides were placed in a Coplin jar filled with a cold lysing

solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na2EDTA, 10 mM Tris, pH 10, with 1% Triton X100 and 10% DMSO added immediately before use) for at least 1h at 4 °C in the dark. After cell lysis, slides were rinsed with chilled buffer and then were gently placed in a horizontal electrophoresis chamber (24 cm × 27 cm × 7 cm; W:L:H) filled with a freshly prepared chilled buffer (i.e. 300 mM NaOH, 1 mM Na_2EDTA, pH > 13). Electrophoresis was performed at 0.83 V/cm for 24 min to unwind DNA. After electrophoresis, slides were washed for 20 min in a neutralization buffer (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) before being dehydrated in absolute ethanol (5 min). Each slide was then stained by adding a 30 µL-drop on each gel with a 1X SYBR Green I dye solution according to manufacturer's recommendation and then observed under an epifluorescence microscope (Laborlux S, Leica®, Wetzlar, Germany) equipped with the appropriate dichroic filter. For each slide, a minimum of 50-100 comets was blindly and randomly scored on the central part of the gel. The Tail intensity parameter given by the Comet assay IV software (Perceptive Instruments®, Bury Saint Edmunds, UK), corresponding to the percentage of DNA in the tail of the comet (%tDNA), was chosen for expressing DNA damage. According to the non-normal distribution of comet assay data (% tailDNA), we have considered the median value for each replicate or gel for a mussel. Finally, the mean of the two medians for a mussel (2 replicates or gels by mussel) has been considered in the statistical analysis.

5.5. Statistics

Statistical analysis was performed with Statistica (Version 8.0.360.0, Statsoft, Tulsa, USA, 2007). The normality has been studied with a Shapiro-Wilk test, and the homogeneity of variances was studied with a Levene test. To compare controls and exposed individuals of a same sampling time, a Kruskall-Wallis test has been done. Then, when the p value obtained was significant ($p < 0.01$), a Mann-Whitney test was done. To compare multiples independent conditions, a Kruskall-Wallis test was performed. Here, only data with $p < 0.01$ were considered as significant.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/link, Figure S1: UHPLC-MS/MS Chromatogram of analytical standards, Figure S2: UHPLC-MS/MS Chromatogram of hemolymph samples exposed to 7.5 µg of dissolved BMAA/mussel/3 days.

Acknowledgments: This work was financed by the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of Anses (2015/1/191) and the Eole scholarship. We thank Wendy Beekman-Lukassen for the technical support.

Author Contributions: A.L. and E.L. conceived and designed the experiments; A.L., I.B., F.B, and N.M. performed the experiments; A.L. analyzed the data; A.L. wrote the paper and E.L., E.F., M.B., D.R., M.P-L., and A.G. contributed to the analysis and revised the paper critically.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Heisler, J.; Glibert, P.M.; Burkholder, J.M.; Anderson, D.M.; Cochlan, W.; Dennison, W.C.; Dortch, Q.; Gobler, C.J.; Heil, C.A.; Humphries, E.; et al. Eutrophication and Harmful Algal Blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae* **2008**, *8*, 3–13, doi:10.1016/j.hal.2008.08.006.
2. Paerl, H.W.; Otten, T.G. Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microb. Ecol.* **2013**, *65*, 995–1010, doi:10.1007/s00248-012-0159-y.
3. Cox, P.A.; Banack, S.A.; Murch, S.J. Biomagnification of Cyanobacterial Neurotoxins and Neurodegenerative Disease among the Chamorro People of Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 13380–13383, doi:10.1073/pnas.2235808100.
4. Murch, S.J.; Cox, P.A.; Banack, S.A.; Steele, J.C.; Sacks, O.W. Occurrence of β-N-methylamino-l-alanine (BMAA) in ALS/PDC Patients from Guam. *Acta Neurol. Scand.* **2004**, *110*, 267–269, doi:10.1111/j.1600-0404.2004.00320.x.
5. Murch, S.J.; Cox, P.A.; Banack, S.A. A Mechanism for Slow Release of Biomagnified Cyanobacterial Neurotoxins and Neurodegenerative Disease in Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 12228–12231, doi:10.1073/pnas.0404926101.
6. Chernoff, N.; Hill, D.J.; Diggs, D.L.; Faison, B.D.; Francis, B.M.; Lang, J.R.; Larue, M.M.; Le, T.-T.; Loftin, K.A.; Lugo, J.N.; et al. A Critical Review of the Postulated Role of the Non-essential Amino Acid, β-N-

methylamino-L-alanine, in Neurodegenerative Disease in Humans. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part B* **2017**, *20*, 183–229, doi:10.1080/10937404.2017.1297592.

7. Weiss, J.H.; Choi, D.W. Beta-N-methylamino-L-alanine Neurotoxicity: Requirement for Bicarbonate as a Cofactor. *Science* **1988**, *241*, 973–975, doi:10.1126/science.3136549.
8. Lobner, D. Mechanisms of beta-N-methylamino-L-alanine Induced Neurotoxicity. *Amyotroph. Lateral Scler.* **2009**, *10 Suppl 2*, 56–60, doi:10.3109/17482960903269062.
9. Popova, A.A.; Koksharova, O.A. Neurotoxic Non-proteinogenic Amino Acid β N Methylamino L alanine and Its Role in Biological Systems. **2016**, *81*, 794–805.
10. Nunn, P.B.; Ponnusamy, M. β-N-Methylaminoalanine (BMAA): Metabolism and Metabolic Effects in Model Systems and in Neural and Other Tissues of the Rat in vitro. *Toxicon* **2009**, *54*, 85–94, doi:10.1016/j.toxicon.2009.03.008.
11. Dunlop, R.A.; Cox, P.A.; Banack, S.A.; Rodgers, K.J. The Non-protein Amino Acid BMAA is Misincorporated into Human Proteins in Place of l-Serine Causing Protein Misfolding and Aggregation. *PLoS One* **2013**, *8*, e75376, doi:10.1371/journal.pone.0075376.
12. Onselen, R.; Downing, S.; Kemp, G.; Downing, T. Investigating β-N-Methylamino-l-alanine Misincorporation in Human Cell Cultures: A Comparative Study with Known Amino Acid Analogues. *Toxins (Basel).* **2017**, *9*, 400, doi:10.3390/toxins9120400.
13. Faassen, E. Presence of the Neurotoxin BMAA in Aquatic Ecosystems: What Do We Really Know? *Toxins (Basel).* **2014**, *6*, 1109–1138, doi:10.3390/toxins6031109.
14. Monteiro, M.; Costa, M.; Moreira, C.; Vasconcelos, V.M.; Baptista, M.S. Screening of BMAA-producing cyanobacteria in cultured isolates and in in situ blooms. *J. Appl. Phycol.* **2016**, doi:10.1007/s10811-016-1003-4.
15. Réveillon, D.; Abadie, E.; Séchet, V.; Brient, L.; Savar, V.; Bardouil, M.; Hess, P.; Amzil, Z. Beta-N-methylamino-L-alanine: LC-MS/MS Optimization, Screening of Cyanobacterial Strains and Occurrence in Shellfish from Thau, a French Mediterranean Lagoon. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 5441–5467, doi:10.3390/md12115441.
16. Réveillon, D.; Abadie, E.; Séchet, V.; Masseret, E.; Hess, P.; Amzil, Z. β-N-methylamino-l-alanine (BMAA) and Isomers: Distribution in Different Food Web Compartments of Thau Lagoon, French Mediterranean Sea. *Mar. Environ. Res.* **2015**, *110*, 8–18, doi:10.1016/j.marenvres.2015.07.015.
17. Réveillon, D.; Séchet, V.; Hess, P.; Amzil, Z. Production of BMAA and DAB by Diatoms (Phaeodactylum tricornutum, Chaetoceros sp., Chaetoceros calcitrans and , Thalassiosira pseudonana) and Bacteria Isolated from a Diatom Culture. *Harmful algae* **2016**, *58*, 45–50, doi:10.1016/j.hal.2016.07.008.
18. Lage, S.; Costa, P.R.; Moita, T.; Eriksson, J.; Rasmussen, U.; Rydberg, S.J. BMAA in Shellfish from Two Portuguese Transitional Water Bodies Suggests the Marine Dinoflagellate Gymnodinium Catenatum As a Potential BMAA Source. *Aquat. Toxicol.* **2014**, *152*, 131–138, doi:10.1016/j.aquatox.2014.03.029.
19. Mondo, K.; Broc Glover, W.; Murch, S.J.; Liu, G.; Cai, Y.; Davis, D.A; Mash, D.C. Environmental Neurotoxins β-N-Methylamino-L-Alanine (BMAA) and Mercury in Shark Cartilage Dietary Supplements. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *70*, 26–32, doi:10.1016/j.fct.2014.04.015.
20. Salomonsson, M.L.; Hansson, A.; Bondesson, U. Development and in-house Validation of a Method for Quantification of BMAA in Mussels Using Dansyl Chloride Derivatization and Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Methods* **2013**, *5*, 4865, doi:10.1039/c3ay40657a.
21. Salomonsson, M.L.; Fredriksson, E.; Alfjorden, A.; Hedeland, M.; Bondesson, U. Seafood sold in Sweden contains BMAA: A Study of Free and Total Concentrations with UHPLC-MS/MS and Dansyl Chloride Derivatization. *Toxicol. Reports* **2015**, *2*, 1473–1481, doi:10.1016/j.toxrep.2015.11.002.
22. Jiang, L.; Kiselova, N.; Rosén, J.; Ilag, L.L. Quantification of Neurotoxin BMAA (β-N-methylamino-L-alanine) in Seafood from Swedish Markets. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 6931, doi:10.1038/srep06931.
23. Christensen, S.J.; Hemscheidt, T.K.; Trapido-Rosenthal, H.; Laws, E.A.; Bidigare, R.R. Detection and Quantification of β-methylamino-L-alanine in Aquatic Invertebrates. *Limnol. Oceanogr. Methods* **2012**, *10*, 891–898, doi:10.4319/lom.2012.10.891.
24. Réveillon, D.; Séchet, V.; Hess, P.; Amzil, Z. Systematic Detection of BMAA (β-N-methylamino-l-alanine) and DAB (2,4-diaminobutyric acid) in Mollusks Collected in Shellfish Production Areas along the French Coasts. *Toxicon* **2016**, *110*, 35–46, doi:10.1016/j.toxicon.2015.11.011.
25. Masseret, E.; Banack, S.; Boumédiène, F.; Abadie, E.; Brient, L.; Pernet, F.; Juntas-Morales, R.; Pageot, N.; Metcalf, J.; Cox, P.; et al. Dietary BMAA exposure in an amyotrophic lateral sclerosis cluster from southern France. *PLoS One* **2013**, *8*, 1–9, doi:10.1371/journal.pone.0083406.

26. Esterhuizen-Londt, M.; Wiegand, C.; Downing, T.G. β-N-methylamino-l-alanine (BMAA) Uptake by the Animal Model, Daphnia Magna and Subsequent Oxidative Stress. *Toxicon* **2015**, *100*, 20–26, doi:10.1016/j.toxicon.2015.03.021.
27. Lürling, M.; Faassen, E.J.; Van Eenennaam, J.S. Effects of the Cyanobacterial Neurotoxin β-N-methylamino-L-alanine (BMAA) on the Survival, Mobility and Reproduction of Daphnia magna. *J. Plankton Res.* **2011**, *33*, 333–342, doi:10.1093/plankt/fbq130.
28. Faassen, E.J.; García-Altares, M.; Mendes e Mello, M.; Lürling, M. Trans Generational Effects of the Neurotoxin BMAA on the Aquatic Grazer Daphnia Magna. *Aquat. Toxicol.* **2015**, *168*, 98–107, doi:10.1016/j.aquatox.2015.09.018.
29. Downing, S.; Contardo-Jara, V.; Pflugmacher, S.; Downing, T.G. The Fate of the Cyanobacterial Toxin β-N-methylamino-l-alanine in Freshwater Mussels. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2014**, *101*, 51–58, doi:10.1016/j.ecoenv.2013.11.028.
30. Baptista, M.S.; Vasconcelos, R.G.W.; Ferreira, P.C.; Almeida, C.M.R.; Vasconcelos, V.M. Assessment of the Non-protein Amino Acid BMAA in Mediterranean mussel Mytilus Galloprovincialis after Feeding with Estuarine Cyanobacteria. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 12501–12510, doi:10.1007/s11356-015-4516-5.
31. Son, M. Native Range of the Zebra Mussel and Quagga Mussel and New Data on Their Invasions within the Ponto-Caspian Region. *Aquat. Invasions* **2007**, *2*, 174–184, doi:10.3391/ai.2007.2.3.4.
32. Oehlmann, J.; Schulte-Oehlmann, U. Molluscs as bioindicators. *Trace Met. other Contam. Environ.* **2003**, *6*, 577–635, doi:10.1016/S0927-5215(03)80147-9.
33. White, J.D.; Sarnelle, O. Size-structured Vulnerability of the Colonial Cyanobacterium, Microcystis Aeruginosa, to Grazing by Zebra Mussels (*Dreissena polymorpha*). *Freshw. Biol.* **2014**, *59*, 514–525, doi:10.1111/fwb.12282.
34. Aldridge, D.C.; Elliott, P.; Moggridge, G.D. Microencapsulated Biobulletse for the Control of Biofouling Zebra Mussels. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 975–979, doi:10.1021/es050614.
35. Winkel, E.H.T.; Davids, C. Food selection by *Dreissena polymorpha* Pallas (Mollusca: Bivalvia). *Freshw. Biol.* **1982**, *12*, 553–558, doi:10.1111/j.1365-2427.1982.tb00647.x.
36. Baines, S.B.; Fisher, N.S.; Cole, J.J. Uptake of Dissolved Organic Matter (DOM) and its Importance to Metabolic Requirements of the Zebra Mussel , *Dreissena polymorpha*. **1995**, *50*, 36–47.
37. Binelli, A.; Della Torre, C.; Magni, S.; Parolini, M. Does Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*) Represent the Freshwater Counterpart of Mytilus in Ecotoxicological Studies? A Critical Review. *Environ. Pollut.* **2015**, *196*, 386–403, doi:10.1016/j.envpol.2014.10.023.
38. Cheng, T.C. Bivalves, R. In *Invertebrate blood cells*; Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Eds.; Academic Press Inc.: New York, NY, USA, 1981; pp. 233-300. 368 ISBN 0-12-582101-8.
39. Mydlarz, L.D.; Jones, L.E.; Harvell, C.D. Innate Immunity, Environmental and Disease Ecology of Marine and Freshwater Invertebrates. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **2006**, *37*, 251–288, doi:10.2307/annurev.ecolsys.37.091305.30000011.
40. Donaghy, L.; Lambert, C.; Choi, K.-S.; Soudant, P. Hemocytes of the Carpet Shell Clam (Ruditapes decussatus) and the Manila Clam (Ruditapes philippinarum): Current Knowledge and Future Prospects. *Aquaculture* **2009**, *297*, 10–24, doi:10.1016/j.aquaculture.2009.09.003.
41. Lance, E.; Arnich, N.; Maignien, T.; BMAA-WG; Biré, R. Occurrence of β-N-methylamino-L-alanine (BMAA) and Isomers in Aquatic Environments and Aquatic Food Sources for Humans. *Toxins,* **2018**, *10:* 83.
42. Roy-Lachapelle, A.; Solliec, M.; Sauvé, S. Determination of BMAA and Three Alkaloid Cyanotoxins in Lake Water Using Dansyl Chloride Derivatization and High-resolution Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 5487–5501, doi:10.1007/s00216-015-8722-2.
43. Baldwin, B.S.; Mayer, M.S.; Dayton, J.; Pau, N.; Mendilla, J.; Sullivan, M.; Moore, A.; Ma, A.; Mills, E.L. Comparative Growth and Feeding in Zebra and Quagga Mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): Implications for North American Lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **2002**, *59*, 680–694, doi:10.1139/f02-043.
44. Faassen, E.J. Extraction and LC - MS / MS Analysis of Underivatised BMAA. Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis, **2017**: 439-446.
45. Souba, W.W.; Pacitti, A.J. Review: How Amino Acids Get Into Cells: Mechanisms, Models, Menus, and Mediators. *J. Parenter. Enter. Nutr.* **1992**, *16*, 569–578, doi:10.1177/0148607192016006569.
46. Smith, Q.R.; Nagura, H.; Takada, Y.; Duncan, M.W. Facilitated Transport of the Neurotoxin, Beta-N-

methylamino-L-alanine, Across the Blood-brain Barrier. *J. Neurochem.* **1992**, *58*, 1330–1337, doi:10.1111/j.1471-4159.1992.tb11346.x.
47. Albano, R.; Lobner, D. Transport of BMAA into Neurons and Astrocytes by System x c. *Neurotox. Res.* **2017**, 1–5, doi:10.1007/s12640-017-9739-4.
48. Novak, M.; Hercog, K.; Žegura, B. Assessment of the Mutagenic and Genotoxic Activity of Cyanobacterial Toxin Beta-N-methyl-amino-L-alanine in *Salmonella typhimurium*. *Toxicon* **2016**, *118*, 134–140, doi:10.1016/j.toxicon.2016.04.047.
49. Potjewyd, G.; Day, P.J.; Shangula, S.; Margison, G.P.; Povey, A.C. L-β-N-methylamino-L-alanine (BMAA) Nitrosation Generates a Cytotoxic DNA Damaging Alkylating Agent: An Unexplored Mechanism for Neurodegenerative Disease. *Neurotoxicology* **2017**, *59*, 105–109, doi:10.1016/j.neuro.2017.01.007.
50. Chiu, A.S.; Gehringer, M.M.; Braidy, N.; Guillemin, G.J.; Welch, J.H.; Neilan, B.A. Gliotoxicity of the Cyanotoxin, β-methyl-amino-L-alanine (BMAA). *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1482, doi:10.1038/srep01482.
51. Contardo-Jara, V.; Otterstein, S.K.B.; Downing, S.; Downing, T.G.; Pflugmacher, S. Response of Antioxidant and Biotransformation Systems of Selected Freshwater Mussels (*Dreissena polymorpha*, Anadonta cygnea, Unio tumidus, and Corbicula javanicus) to the Cyanobacterial Neurotoxin β-N-methylamino-L-alanine. *Toxicol. Environ. Chem.* **2014**, *96*, 451–465, doi:10.1080/02772248.2014.945452.
52. Barzilai, A.; Yamamoto, K.I. DNA Damage Responses to Oxidative Stress. *DNA Repair (Amst).* **2004**, *3*, 1109–1115.
53. Smith, J.A.; Weidemann, M.J. Further Characterization of the Neutrophil Oxidative Burst by Flow Cytometry. *J. Immunol. Methods* **1993**, *162*, 261–268, doi:10.1016/0022-1759(93)90391-J.
54. Shigenaga, M.K.; Ames, B.N. Assays for 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine: A Biomarker of in vivo Oxidative DNA Damage. *Free Radic. Biol. Med.* **1991**, *10*, 211–216, doi:10.1016/0891-5849(91)90078-H.
55. Karlsson, O.; Jiang, L.; Andersson, M.; Ilag, L.L.; Brittebo, E.B. Protein Association of the Neurotoxin and Non-protein Amino Acid BMAA (β-N-methylamino-l-alanine) in the Liver and Brain Following Neonatal Administration in Rats. *Toxicol. Lett.* **2014**, *226*, 1–5, doi:10.1016/j.toxlet.2014.01.027.
56. Rao, R.V; Bredesen, D.E. Misfolded Proteins, Endoplasmic Reticulum Stress and Neurodegeneration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2004**, *16*, 653–662, doi:10.1016/j.ceb.2004.09.012.Misfolded.
57. Rodgers, K.J. Non-protein Amino Acids and Neurodegeneration: The Enemy within. *Exp. Neurol.* **2014**, *253*, 192–196, doi:10.1016/j.expneurol.2013.12.010.
58. Wootton, E.C.; Dyrynda, E.A.; Ratcliffe, N.A. Bivalve immunity: Comparisons between the Marine Mussel (Mytilus edulis), the Edible Cockle (Cerastoderma edule) and the Razor-shell (Ensis siliqua). *Fish Shellfish Immunol.* **2003**, *15*, 195–210, doi:10.1016/S1050-4648(02)00161-4.
59. Shapiro, H.M. Parameters and Probes. *Practical flow cytometry* **1988**; 273-410, ISBN 9780471722731.
60. Johnson, I.; Spence, M.T. Assays for Cell Viability, Their Amine-Reactive Proliferation and Function. *A Guid. to Fluoresc. Probes Labeling Technol.* **2011**, 650–738.
61. Davey, H.M.; Hexley, P. Red but not dead? Membranes of Stressed Saccharomyces Cerevisiae are Permeable to Propidium Iodide. *Environ. Microbiol.* **2011**, *13*, 163–171, doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02317.x.
62. David, S.S.; O'Shea, V.L.; Kundu, S. Base-excision Repair of Oxidative DNA Damage. *Nature* **2007**, *447*, 941–950, doi:10.1038/nature05978.
63. Villela, I.V.; de Oliveira, I.M.; da Silva, J.; Henriques, J.A.P. DNA Damage and Repair in Haemolymph Cells of Golden Mussel (Limnoperna fortunei) Exposed to Environmental Contaminants. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2006**, *605*, 78–86, doi:10.1016/j.mrgentox.2006.02.006.
64. Rosén, J.; Westerberg, E.; Hellenäs, K.E.; Salomonsson, M.L. A new method for analysis of underivatized free β-methylamino-alanine: Validation and method comparison. *Toxicon* **2016**, *121*, 105–108, doi:10.1016/j.toxicon.2016.08.021.
65. Evariste, L.; Auffret, M.; Audonnet, S.; Alain, G.; David, E.; Brousseau, P.; Fournier, M.; Betoulle, S. Functional features of hemocyte subpopulations of the invasive mollusk species *Dreissena polymorpha*. *Fish Shellfish Immunol.* **2016**, *56*, 144–154, doi:10.1016/j.fsi.2016.06.054.
66. Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Exp. Cell Res.* **1988**, *175*, 184–191, doi:10.1016/0014-4827(88)90265-0.

© 2018 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Supplementary Materials: Genotoxic and Cytotoxic Effects on the Immune Cells of the Freshwater Bivalve *Dreissena polymorpha* Exposed to the Environmental Neurotoxin BMAA

Alexandra Lepoutre, Nadia Milliote, Marc Bonnard, Mélissa Palos-Ladeiro, Damien Rioult, Isabelle Bonnard, Fanny Bastien, Elisabeth Faassen, Alain Geffard and Emilie Lance

Alexandra Lepoutre [1], Nadia Milliote [1], Marc Bonnard, Mélissa Palos-Ladeiro [1], Damien Rioult[1], Isabelle Bonnard [1], Fanny Bastien [1], Elisabeth Faassen [2,3], Alain Geffard [1], Emilie Lance [1] *

[1] Université de Reims Champagne-Ardenne UMR-I 02 INERIS-URCA-ULH SEBIO Unité Stress Environnementaux et, BIOsurveillance des milieux aquatiques UFR Sciences Exactes et Naturelles, Campus du Moulin de la Housse, BP 1039 51687 Reims cedex, France ; alexandra.lepoutre@univ-reims.fr (A.L.), nmilliot@edu.mnhn.fr (N.M.), marc.bonnard@univ-reims.fr (M.B.), melissa.palos@univ-reims.fr (M. P-L.), damien.rioult@univ-reims.fr (D.R.), isabelle.bonnard@univ-reims.fr (I.B.), fanny.donaz@univ-reims.fr (F.B.), alain.geffard@univ-reims.fr (A.G.), emilie.lance@univ-reims.fr (E.L.)

[2] RIKILT, Wageningen Research, Akkermaalsbos 2, 6708 WB, WAGENINGEN, The Netherlands; els.faassen@wur.nl (E.F.)

[3] Aquatic Ecology and Water Quality Management Group, Wageningen University, Droevendaalsesteeg 3a, 6708 PB, Wageningen, The Netherlands; els.faassen@wur.nl (E.F.)

* Correspondence: emilie.lance@univ-reims.fr; Tel.: +33 326 913 369

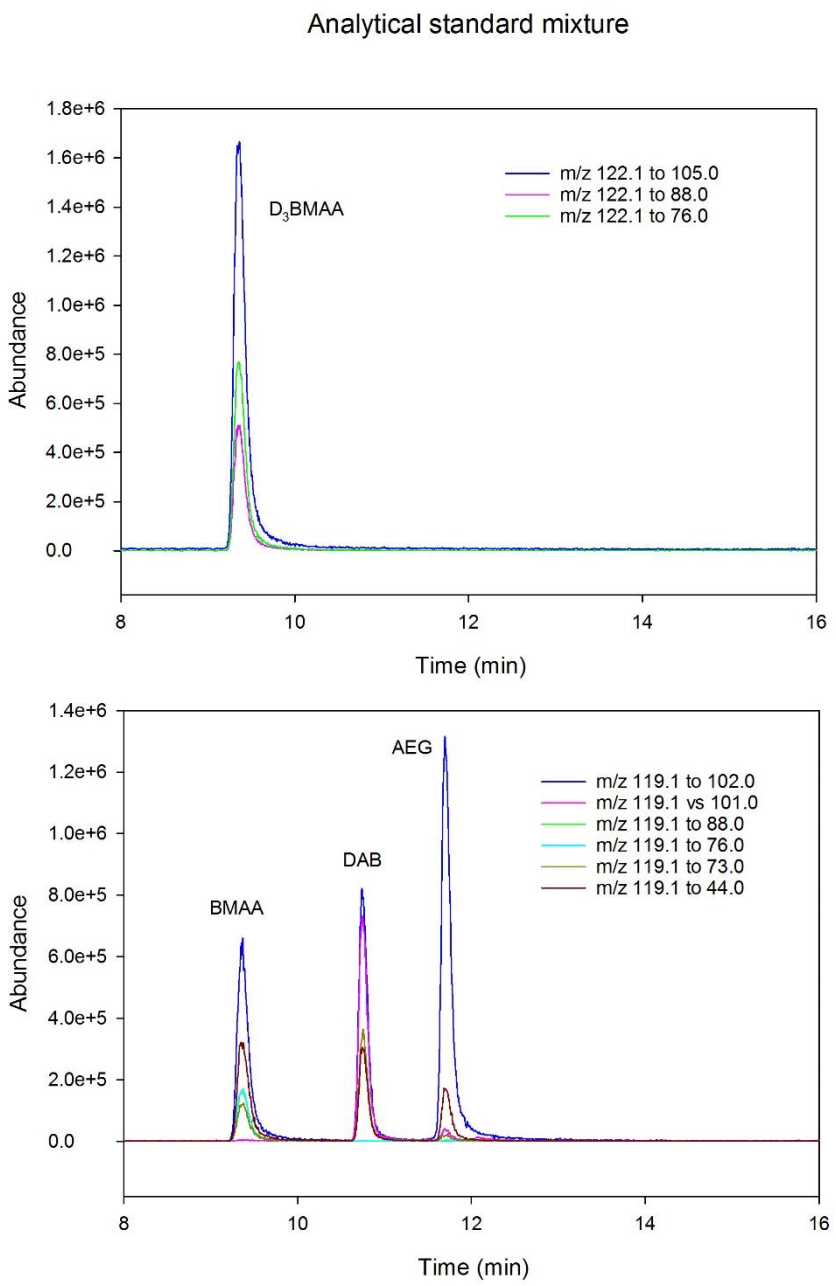

Figure S1. UHPLC-MS/MS Chromatogram of analytical standards.

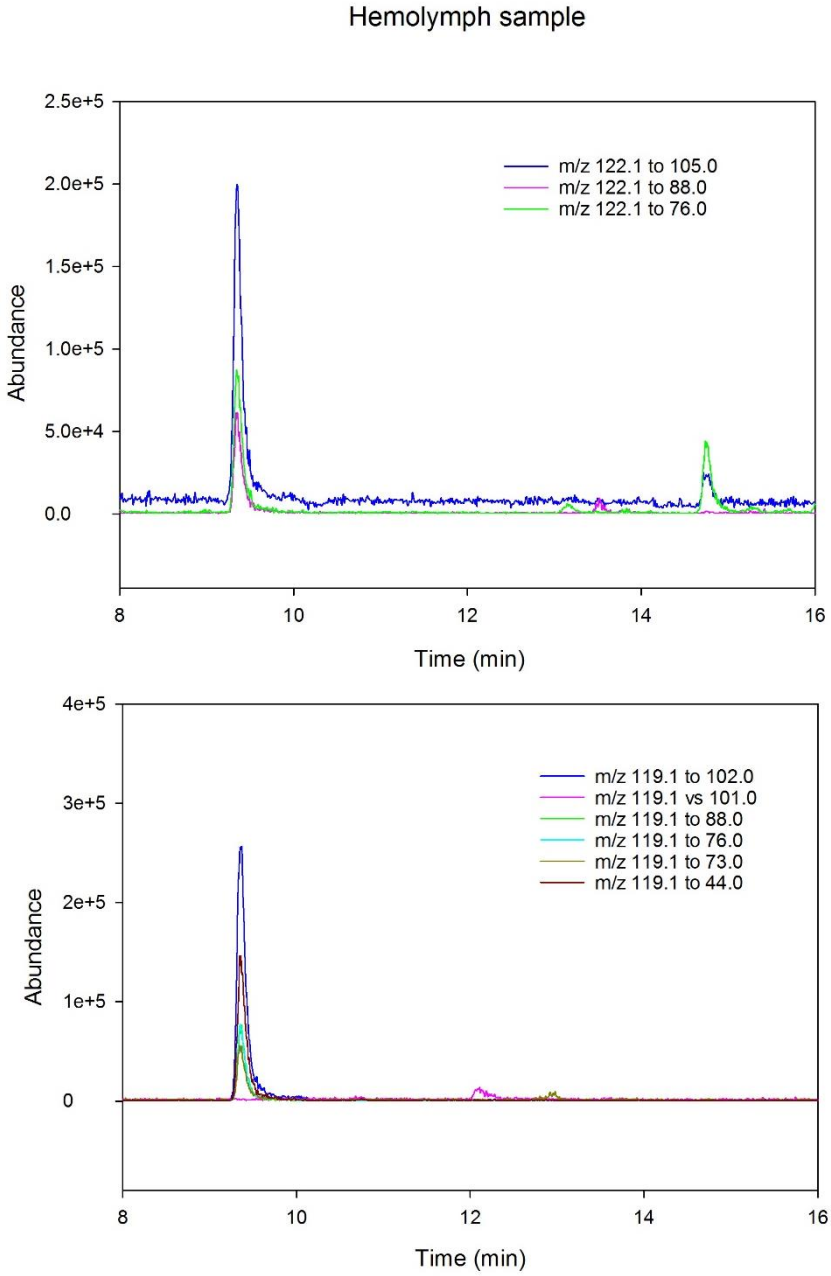

Figure S2. UHPLC-MS/MS Chromatogram of hemolymph samples exposed to 7.5 µg of dissolved BMAA/mussel/3 days.

Mollusques bivalves : bioindicateurs de contamination des eaux douces par les cyanotoxines microcystines et la toxine environnementale β-N-méthylamino-L-alanine (BMAA) ?

La fréquence et l'intensité des proliférations de cyanobactéries toxiques dans les eaux douces augmentent depuis plusieurs années, y compris dans celles utilisées pour l'adduction d'eau potable ou les activités récréatives. Parmi les cyanotoxines, les hépatotoxines microcystines (MCs) sont les plus fréquemment synthétisées et les plus étudiées, alors que peu de données sont disponibles sur l'occurrence de la neurotoxine β-méthylamino-L-alanine (BMAA), également produite par des diatomées. En raison des fortes variations spatio-temporelles des efflorescences de cyanobactéries, les prélèvements ponctuels d'eau comme outils de diagnostic ou de surveillance de la présence de cyanotoxines semblent peu adaptés et sont susceptibles de sous-estimer le risque. En revanche, l'utilisation d'outils intégrateurs telles des espèces bioaccumulatrices, comme les bivalves, peut s'avérer pertinent. La glande digestive des invertébrés est connue pour être l'organe cible majoritaire de l'accumulation des MCs, à la fois sous une forme libre rapidement éliminée, et sous une forme liée à des protéines ayant un temps de résidence plus long dans les tissus. Cependant, peu de données sont disponibles concernant l'organotropisme et les différentes fractions d'accumulation de la BMAA. Cette thèse a contribué à (i) évaluer la pertinence des bivalves *Dreissena polymorpha* et *Anodonta anatina* comme outils de biosurveillance de la présence de BMAA et d'organismes producteurs de MCs dans les eaux douces, et (ii) identifier les fractions d'accumulation des toxines les plus pertinentes pour caractériser le niveau et la dynamique de contamination environnementale. Les résultats montrent que la BMAA est accumulée par les bivalves à la fois sous forme libre et associée aux polypeptides de faible poids moléculaire, sans organe cible particulier, soulignant l'utilisation possible de l'analyse de la fraction totale (libre et liée) comme proxy de contamination. L'analyse de la BMAA dans le corps entier de *D. polymorpha* permet d'évaluer le niveau de contamination du milieu aux concentrations environnementales de BMAA dissoute testées (10 à 50 µg/L) ; les glandes digestives d'*A. anatina* permettant de révéler la présence de la BMAA dans le milieu à partir de 50 µg /L. Concernant la présence de cyanobactéries productrices de MCs dans l'eau, ingérées par les deux espèces, les MCs libres quantifiées chez les bivalves reflètent plus fidèlement les variations temporelles de contamination du milieu que les MCs totales, particulièrement chez *D. polymorpha,* en raison de ses capacités de détoxification. L'accumulation de MCs libres chez *D. polymorpha* permet également de discriminer différents niveaux de contamination environnementale (10 *vs.* 100 µg/L MCs intracellulaires). Chez *A. anatina*, les fortes capacités d'accumulation de MCs, dès 1 µg/L MCs intracellulaires dans le milieu, associée à une élimination tardive, restreignent son usage à l'indication d'une présence/absence de contamination, sans évaluation fine de son intensité ni de sa temporalité.

Mots-clés : Cyanobactéries, Bivalves, Bioaccumulation, Microcystines, β-N-méthylamino-L-alanine, Bioindicateurs

Bivalve molluscs: bioindicators of freshwater contamination by the cyanotoxins microcystins and the environmental toxin β-N-methylamino-L-alanine (BMAA)?

The frequency and intensity of toxic cyanobacterial blooms in fresh waters used for drinking water supply or recreational activities have increased for several years. Among the cyanotoxins, the hepatotoxins microcystin (MCs) are the most frequently produced by cyanobacteria and the most studied, whereas few data are available on the occurrence of the neurotoxin β-methylamino-L-alanine (BMAA), also produced by diatoms. Due to spatio-temporal variations in cyanobacterial bloom location, monitoring the cyanotoxins by punctual water sampling, as tools for diagnosing or monitoring the presence of cyanotoxins, may underestimate the risk. By contrast, the use of integrative tools, such as sentinel bivalve species, may be relevant. MCs accumulate mainly in the digestive gland of invertebrates in two forms: free in the cells, rapidly eliminated, and covalently bound to proteins, having a longer residence time in tissues. However, few data are available on the organotropism and the different accumulation fraction of BMAA. This thesis contributed (i) to evaluate the relevance of the bivalves *Dreissena polymorpha* and *Anodonta anatina* as tools for biomonitoring of BMAA and MC-producers in fresh waters, and (ii) to identify the most appropriate fraction of each toxin that should be analysed in bivalve tissues in order to characterize the level and dynamic of environmental contaminations. Results reveal that BMAA is accumulated by bivalves both in free fraction and associated to low molecular weight polypeptides, without target organ, underling the interest to analyse the total BMAA (free and bound) in bivalves to biomonitor this toxin in water. The analysis of BMAA in *D. polymorpha* whole body allows the evaluation of the water contamination level at environmental concentrations of dissolved BMAA tested (10 to 50 µg /L); *A. anatina* digestive glands allowing to reveal the presence of BMAA from 50 µg/L. Regarding the presence of MC producers in the water, ingested by both species, the quantification of free MCs in bivalves reflects more accurately the temporal variations of the environmental contamination than total MCs, particularly in *D. polymorpha*, because of its high detoxification capacities. The quantification of free MCs in *D. polymorpha* also allows discriminating environmental contamination levels (10 *vs*. 100 µg/L intracellular MCs). The high capacity of MC accumulation by *A. anatina*, from 1 µg /L intracellular MCs in the medium, associated with a slow elimination, seemed to restrict its use to the indication of the presence/absence of MC producers in waters, without any detailed assessment of the intensity nor the temporal dynamics of the contamination.

Keywords : Cyanobacteria, Bivalves, Bioaccumulation, Microcystins, β-N-methylamino-L-alanine, Bioindicators

Discipline : PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS - INTERACTIONS

Spécialité : Ecotoxicologie

Université de Reims Champagne-Ardenne
SEBIO – UMR-I02
UFR Sciences Exactes et Naturelles,
Campus Moulin de la Housse
BP 1039 51687 Reims Cedex 2
France