



Ecole doctorale ABIES

UFR

Université de Reims Champagne-Ardenne

Thèse présentée par :

Elodie Géba

soutenue le 28 novembre 2019

en vue de l'obtention du grade de **Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne**

Discipline : Physiologie, Biologie des organismes, populations, interactions

<p>La dreissène comme outil épurateur des protozoaires en effluent de STEP</p>

Composition du jury

Rapporteurs :

<i>Mme Laure Giambérini</i>	<i>Professeur des Universités</i>	<i>Université de Lorraine</i>
<i>Mme Soizick Le Guyader</i>	<i>Directeur de Recherche</i>	<i>Ifremer Nantes</i>

Examineurs :

<i>Mme Marie-Laure Dardé</i>	<i>Professeur des Universités- Praticien Hospitalier</i>	<i>Université de Limoges</i>
------------------------------	--	------------------------------

Directeurs :

<i>Mr Stéphane Betoulle</i>	<i>Professeur des Universités</i>	<i>Université de Reims Champagne Ardenne</i>
<i>Mr Dominique Aubert</i>	<i>Maitre de Conférences- Praticien Hospitalier</i>	<i>Université de Reims Champagne Ardenne</i>

Encadrante :

<i>Mme Aurélie Bigot-Clivot</i>	<i>Maitre de Conférences</i>	<i>Université de Reims Champagne Ardenne</i>
---------------------------------	------------------------------	--

« N'oublie jamais, celui qui croit savoir n'apprend plus. »

Pierre Bottero,
Le Pacte des Marchombres (Tome 1)

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier Mr le Professeur Alain Geffard et Mr le Professeur Stéphane Betoulle (directeurs de l'UMR-I-02 SEBIO Reims) ainsi que Mme le Professeur Isabelle Villena (directrice de l'EA 7510 ESCAPE) pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire.

Et plus généralement, je remercie tous les collègues qui m'ont aidée et conseillée lors de ces trois années de thèse.

Je remercie Mme le Professeur Laure Giambérini et Mme le Docteur Soizick Le Guyader pour avoir accepté d'apporter leur jugement à ce travail.

Je remercie également Mme le Professeur Marie-Laure Dardé pour avoir accepté d'examiner ces travaux.

Votre participation à mon jury de thèse donnera lieu, je l'espère, à de nombreux échanges et permettra de faire évoluer ce manuscrit.

Je remercie mes directeurs de thèse, Mr le Professeur Stéphane Betoulle et Mr le Docteur Dominique Aubert, pour nos nombreuses discussions scientifiques et pour le partage de leur expérience. Encore merci Stéphane, vous avez été le premier enseignant à me parler d'écotoxicologie lors de mon arrivée à la fac.

Je remercie également Mme le Docteur Isabelle Arzul pour ses précieux conseils lors de mon comité de pilotage ainsi que pour son aide lors des mises au point histologiques.

Merci au Dr Stéphanie La Carbona et au Dr Sandie Escotte pour leurs nombreux conseils et leur soutien technique et méthodologique tout au long de ce travail.

Un énorme merci au Dr Aurélie Bigot-Clivot, mon encadrante, sans qui ce projet n'aurait pas vu le jour et sans qui ces trois années de thèse n'auraient pas eu la même saveur. Merci pour ton accompagnement, merci d'avoir répondu à toutes mes questions (même les plus débiles), merci de m'avoir rassurée lorsque j'ai (un peu) paniqué, merci pour ta bonne humeur quotidienne... Je vais m'arrêter là car la liste serait trop longue !

Merci à vous tous les “ intermittents du spectacle ” - Antoine, Fanny, Maxime, Angélique, Clément, Alexandra, Iris - pour votre soutien, votre aide, votre bonne humeur et nos bières partagées.

Merci à ma famille, à mon “ petit ” frère ainsi qu’à mon père qui m’entendent répéter que « je veux devenir océanologue » depuis mes 11 ans, même si le projet a un peu évolué depuis, merci de m’avoir soutenue jusqu’ici.

Un merci particulier à ma Maman et à ma Mamie pour avoir relu et corrigé les “ fôtes ” d’orthographe et de syntaxe de ce manuscrit.

Merci à tous mes amis qui m’ont permis de souffler et de prendre du recul : Fyf’, Puce, Jaafar, Jérôme, BenAmin, Boobs, Perruche, Andrei, Tony, Paul, Raph’, Max, Benben, Phanie, Lise, Cyrille, Amélie, Benjamin, Nouze, Jo et à tous ceux que j’ai oubliés !

Et enfin merci à Théo, toi-même tu sais !



PS : Merci au Donjon de Naheulbeuk, à Reflet d’Acide et à Kaamelott pour avoir rythmé mes longues journées de rédaction !

Résumé :

Les effluents de station d'épuration (STEP) sont le siège de nombreuses contaminations chimiques et biologiques avec des traitements mis en place inefficaces pour certaines d'entre elles. Parmi les contaminants biologiques, certains font l'objet de nouvelles recherches, comme c'est le cas pour trois parasites protozoaires pathogènes de l'espèce humaine : *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* et *Giardia duodenalis*. En effet, ces protozoaires sont clairement identifiés comme des priorités de santé publique puisqu'ils correspondent aux trois principaux parasites responsables d'épidémies hydriques. Ce travail de thèse a pour but d'étudier l'utilisation de *Dreissena polymorpha*, un mollusque bivalve d'eau douce (moule zébrée), en tant qu'outil de bioremédiation des protozoaires en effluent de STEP. Pour cela, la cinétique d'accumulation et de dépuration des dreissènes vis-à-vis de ces trois protozoaires d'intérêt a été caractérisée sur 21 jours, afin d'évaluer leur capacité de bioextraction. La survie et le maintien des moules zébrées en effluent de STEP ont également été évalués *in situ*. Ces expérimentations ont permis de montrer que la dreissène survit en effluent de STEP, mais est également capable d'extraire et d'intégrer sur le long terme les protozoaires présents dans le milieu. Des expériences complémentaires ont été réalisées afin de mieux comprendre le devenir des parasites bioaccumulés par la dreissène en termes de viabilité et d'infectiosité. Ce travail souligne l'intérêt de *Dreissena polymorpha* en tant qu'outil de bioremédiation des protozoaires, en particulier en effluent de station d'épuration.

Mots-clés : *Dreissena polymorpha*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis*, bioremédiation, eaux usées, stations d'épuration

Abstract :

Wastewater treatment plant (WWTP) effluents are the source of many chemical and biological contaminations, and the treatments used are inefficient for some of them. Among biological contaminants, some are the focus for new research, such as three human pathogenic protozoan parasites: *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis*. Indeed, these protozoa are clearly identified as public health priorities since they correspond to the three main parasites responsible for waterborne outbreaks. The aim of this doctoral work is to investigate the use of *Dreissena polymorpha*, a freshwater bivalve mollusc (zebra mussel), as a tool for bioremediation of protozoa in WWTP effluent. For this, the kinetics of protozoa accumulation and depuration by zebra mussel were characterized over 21 days, in order to evaluate the bioextraction capacity of this bivalve. The survival and health status of zebra mussels in WWTP effluent were also assessed *in situ*. These experiments showed that mussels survived in WWTP effluent and were also capable of extracting and integrating the protozoa present in the environment. Additional experiments were carried out to better understand the fate of parasites bioaccumulated by *D. polymorpha* as regards viability and infectivity. This work highlights the interest of *Dreissena polymorpha* as a tool for bioremediation of protozoa, particularly in wastewater treatment plant effluent.

Keywords : *Dreissena polymorpha*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis*, bioremediation, sewage, wastewater treatment plant

Table des matières

<u>Avant-propos</u>	<u>1</u>
<u>Introduction générale</u>	<u>5</u>
<u>Chapitre I : Etat de l'art</u>	<u>15</u>
I. Les protozoaires.....	17
1. <i>Toxoplasma gondii</i>	17
2. <i>Cryptosporidium</i> spp.	22
3. <i>Giardia duodenalis</i>	26
4. Transmission environnementale des protozoaires	29
5. Présence des protozoaires dans le milieu aquatique	32
6. Réglementations en vigueur	35
II. Les stations d'épuration (STEPs).....	38
1. Source de contamination biologique.....	38
2. Structure des stations d'épuration	41
3. Efficacité d'épuration des protozoaires.....	44
4. Réglementations en vigueur	48
III. La bioremédiation.....	49
1. Généralités	49
2. Epuration des eaux	51
3. Intérêt des bivalves	52
IV. <i>Dreissena polymorpha</i> (Pallas, 1771).....	58
1. Biologie et écologie	58
2. Capacité de bioaccumulation des contaminants.....	63
3. La dreissène : un outil d'épuration prometteur	67

Chapitre II : Matériels et méthodes69

I. Matériels utilisés	71
1. Provenance des organismes	71
2. La station d'épuration	73
II. Détection des protozoaires	75
1. Dans les tissus des dreissènes et dans l'eau	75
2. Dans l'hémolymphe des dreissènes.....	77
3. PCR quantitative de type TaqMan	78
4. Gammes	80
5. Limite de détection et de quantification	83
III. Viabilité et infectiosité des parasites accumulés par la dreissène.....	85
1. Préparation des échantillons	85
2. Culture cellulaire couplée à la qPCR (CC-qPCR).....	86
3. Essais <i>in vivo</i>	88
IV. Evaluation de l'état physiologique des dreissènes en effluent de sortie de station d'épuration	91
1. Taux de clairance	91
2. Etat physiologique des hémocytes	93
3. Réserves énergétiques.....	95
4. Défenses antioxydantes et métabolisme cellulaire.....	98
V. Analyses statistiques et graphiques.....	105

Chapitre III : Etude des cinétiques d'accumulation et de dépuraton des protozoaires par la dreissène107

I. Synthèse.....	109
Article : Use of the bivalve <i>Dreissena polymorpha</i> as a biomonitoring tool to reflect the protozoan load in freshwater bodies.	114
1. Introduction	117
2. Materials and methods.....	117

3. Results.....	124
4. Discussion.....	131
5. Conclusion.....	137
II. Recherche des parasites dans l'eau	145
III. Conclusion générale.....	149
<u>Chapitre IV : Survie et maintien des dreissènes en effluent de STEP.....</u>	<u>151</u>
I. En conditions expérimentales	153
1. Design expérimental	153
2. Résultats et discussion	154
II. Evaluation <i>in situ</i>	158
Synthèse.....	158
Article : Resilience of <i>Dreissena polymorpha</i> in wastewater effluent: use as a bioremediation tool?.....	162
1. Introduction	165
2. Materials and methods.....	168
3. Results.....	175
4. Discussion.....	181
5. Conclusion.....	187
III. Conclusion générale.....	197
<u>Chapitre V : Devenir des protozoaires accumulés par la dreissène</u>	<u>199</u>
I. Synthèse.....	201
Article : Survival and infectivity of <i>Toxoplasma gondii</i> and <i>Cryptosporidium parvum</i> oocysts bioaccumulated by <i>Dreissena polymorpha</i>.	205
1. Introduction	208
2. Material and method	210
3. Results.....	217
4. Discussion.....	222
5. Conclusion.....	227

II. <i>Giardia duodenalis</i>	236
III. Conclusion générale.....	238
<u>Chapitre VI : Discussion et perspectives</u>	<u>239</u>
I. Stratégie abordée lors du projet de thèse.....	241
II. Interactions bivalves/protozoaires	246
1. Bioaccumulation des protozoaires	246
2. Dégradation des protozoaires	250
III. Vers un prototype utilisant la dreissène comme outil de bioremédiation ?	254
1. Maintien de la dreissène en effluent de STEP	254
2. Efficacité de l’outil de bioremédiation.....	257
3. Optimisation d’un prototype : quelles questions subsistent ?.....	259
<u>Conclusion générale</u>	<u>263</u>
<u>Références bibliographiques</u>	<u>267</u>
<u>Annexes</u>	<u>301</u>
Valorisation des travaux de recherche	303

Liste des figures

Figure 1 : Cycle parasitaire de <i>Toxoplasma gondii</i> . Source : Centers for Disease Control and Prevention.....	19
Figure 2 : Cycle parasitaire de <i>Cryptosporidium spp.</i> Source : Centers for Disease Control and Prevention.....	24
Figure 3 : Cycle parasitaire de <i>G. duodenalis</i> . Source Centers for Disease Control and Prevention.....	27
Figure 4 : Schémas illustrant le protocole préconisé par la norme ISO 15553:2006	37
Figure 5 : Structure d'une station d'épuration (modifiée d'après http://www.depuradores.ad)	41
Figure 6 : Photographie de <i>Dreissena polymorpha</i> (Photo © Biopix: N Sloth).....	58
Figure 7 : Aire de répartition de <i>D. polymorpha</i> en 2008 selon Gray (2008). En rouge les zones d'invasion et en vert les zones natives	59
Figure 8 : Aire de répartition de <i>D. polymorpha</i> en France selon l'INPN (Inventaire National du Patrimoine Naturel)	59
Figure 9 : Cycle biologique de <i>D. polymorpha</i> (schéma de Lepoutre, 2019).....	61
Figure 10 : Schématisation de la digestion chez les bivalves d'après Willer & Aldridge (2017)	64
Figure 11 : Structure de la STEP de Charleville-Mézières	74
Figure 12 : Principe de la PCR quantitative de type TaqMan.	78
Figure 13 : Gammes d'étalonnage sur des tissus de dreissène pour la détection de <i>T. gondii</i> (A), <i>G. duodenalis</i> (B) et <i>C. parvum</i> (C) après extraction via le kit FastDNA™ for soil.	81
Figure 14 : Gammes d'étalonnage sur une suspension de parasites pour la détection de <i>T. gondii</i> (A), <i>G. duodenalis</i> (B) et <i>C. parvum</i> (C) après extraction via le kit InstaGene®	81
Figure 15 : Gammes d'étalonnage sur des (pseudo)fèces de dreissène pour la détection de <i>T. gondii</i> (A), <i>G. duodenalis</i> (B) et <i>C. parvum</i> (C) après extraction via le kit FastDNA™ for soil.	82
Figure 16 : Dispositif utilisé pour la mesure du taux de filtration.	92
Figure 17 : Région P1 utilisée pour quantifier les chlorelles présentes dans l'échantillon.	93
Figure 18 : Détails des analyses graphiques réalisées en cytométrie en flux.....	95
Figure 19 : Principe de la PCR quantitative en temps réel	104
Figure 20 : Percentage of positive samples (n=10) to <i>T. gondii</i> oocysts per condition in bivalve haemolymph (A) and tissues (B).....	126

Figure 21 : Percentage of positive samples (n=10) to <i>G. duodenalis</i> cysts per condition in bivalve haemolymph (A) and tissues (B).	127
Figure 22 : Percentage of positive samples (n=10) to <i>C. parvum</i> oocysts per condition in bivalve haemolymph (A) and tissues (B).....	128
Figure 23 : Number of <i>T. gondii</i> oocysts in mussel tissues (scatterplot or boxplot with median, quartiles and outliers) after exposure to 1,000 oocysts/day/mussel (A) or 10,000 oocysts/day/mussel (B).	129
Figure 24 : Number of <i>G. duodenalis</i> cysts in mussel haemolymph (boxplot with median, quartiles and outliers) after exposure to 10,000 cysts/day/mussel. Groups with no common letters are statistically different from each other (Kruskal-Wallis, post-hoc Nemenyi, $\alpha \leq 0.05$)	130
Figure 25 : Number of <i>G. duodenalis</i> cysts in mussel tissues (scatterplot or boxplot with median and quartiles) after exposure to 1,000 cysts/day/mussel (A) or 10,000 cysts/day/mussel (B). Groups with no common letters are statistically different from each other (Kruskal-Wallis, post-hoc Nemenyi, $\alpha \leq 0.05$).....	131
Figure 26 : Taux de clairance (n= 12) observé durant l'exposition en conditions témoins, à 50 % d'effluent et à 100 % d'effluent.....	154
Figure 27 : Statut physiologique des hémocytes (n=12) : capacité de phagocytose (A), efficacité de phagocytose (B) et mortalité des hémocytes (C). Les groupes statistiques (Kruskal-Wallis, post hoc Nemenyi, $\alpha < 0,5\%$) sont représentés par des lettres, les boîtes à moustache n'ayant aucune lettre en commun sont significativement différentes entre elles au sein d'une même condition d'exposition.	157
Figure 28 : Canal de sortie de STEP de Charleville-Mézières, le lieu d'encagement des dreissènes est indiqué par une flèche.....	159
Figure 29 : Condition index variation (n=24; median and quartile) at each sampling time. Statistical groups are indicated above boxplot; groups with no common letters are statistically different from each other (Kruskal-Wallis, Nemenyi, $p \leq 0.05$).	175
Figure 30 : Clearance rate in percentage of filtered algae during 90min (n=20; median and quartile) at each sampling time (0, 2, 7, 14, 21 and 28 days) and after 5 days of depuration in clear water (33 days). Statistical groups are indicated above boxplot; groups with no common letters are statistically different from each other (Kruskal-Wallis, Nemenyi, $p \leq 0.05$).....	176
Figure 31 : Energy reserves levels in mg.g of wet weight-1 (n= 12; median and quartile) at each sampling time (0, 2, 7, 14, 21 28 days) : lipid level (A) and glycogen level (B). Statistical groups are indicated above boxplot; no common letter indicate significant difference (Kruskal-Wallis, Nemenyi, $p \leq 0.05$).	177
Figure 32 : Enzymatic activities in enzyme unit per g of total protein (median and quartile) for digestive glands (n= 12) and gills (n= 12) at each sampling time 0, 2, 7, 14, 21 28 days) : SOD activity (A), CAT activity (B) and GST activity (C). Statistical group are indicated above boxplot; * indicates significant difference (Kruskal-Wallis, Nemenyi, $p \leq 0.05$).	178

Figure 33 : Relative expression of sod, cat, gst, gpx, atp and cox genes (median and quartile) in digestive gland (n=12) at each sampling time (0, 2, 7, 14, 21 28 days). Statistical groups (Kruskal-Wallis, Nemenyi, $p \leq 0.05$) are indicated above boxplot; no common letter indicate significant difference.	179
Figure 34 : Relative expression of sod, cat, gst, gpx, atp and cox genes (median and quartile) in gills (n=12) at each sampling time (0, 2, 7, 14, 21 28 days). Statistical groups (Kruskal-Wallis, Nemenyi, $p \leq 0.05$) are indicated above boxplot; * or no common letter indicate significant difference.	180
Figure 35 : Infectivity of <i>T. gondii</i> and <i>C. parvum</i> oocysts in <i>D. polymorpha</i> by CC-qPCR (n= 3). Barplot represents the ΔCq mean (for <i>T. gondii</i> $\Delta Cq = Cq\ CC0 - Cq\ CC3$; for <i>C. parvum</i> $\Delta Cq = Cq\ CC0 - Cq\ CC2$) for each time (D7 : 7 days of exposure; D14 : 7 days of depuration), for each dose (1,000 and 10,000 oocysts/day/mussel).	219
Figure 36 : Evaluation of <i>C. parvum</i> oocysts infectivity in <i>D. polymorpha</i> tissues by neonatal mice bioassay. Scatterplot represents number of infectious oocysts per mussel and barplot represents the infectious oocysts mean for each time (D7: 7 days of exposure; D14 : 7 days of depuration), for each dose (1,000 and 10,000 oocysts/day/mussel) (n=3).	222
Figure 37 : Carte heuristique représentant la stratégie abordée au cours de la thèse. En rouge les questions concernant les interactions bivalves/protozoaires et en bleu les expériences se rapportant au comportement des dreissènes dans les effluents.	246
Figure 38 : Bac d'exposition de dreissènes de la station pilote de Milan-Nosedo (Italie), la ligne jaune représente la circulation de l'effluent (Binelli et al., 2014).....	256
Figure 39 : Schéma du prototype proposé par le brevet n° US5628904A, vue latérale de la structure (modifié d'après Bean, 1997).....	260

Liste des tableaux

Tableau 1 : Présence des protozoaires — <i>T. gondii</i> , <i>C. parvum</i> et <i>G. duodenalis</i> — dans les eaux.....	34
Tableau 2 : Présence des protozoaires — <i>T. gondii</i> , <i>C. parvum</i> et <i>G. duodenalis</i> — dans les stations d'épuration	40
Tableau 3 : Efficacité d'épuration des protozoaires par les différents traitements retrouvés en STEP.....	46
Tableau 4 : Performances minimales de traitement attendues pour les paramètres DBO5, DCO et MES. La valeur de la concentration maximale à respecter ou le rendement minimum appliqué sont issus de l'annexe III de l'arrêté du 21 juillet 2015 modifié par l'arrêté du 24 septembre 2017.	48
Tableau 5 : Contamination des bivalves par <i>T. gondii</i> , <i>C. parvum</i> et <i>G. duodenalis</i> en conditions environnementales.....	55
Tableau 6 : Amorces et sondes utilisées pour la détection des protozoaires dans les tissus de <i>D. polymorpha</i> avec la technique de qPCR Taqman en temps réel.	79
Tableau 7 : Valeurs de LOD et LOQ obtenues pour les protocoles de détection des protozoaires dans les différentes matrices.....	83
Tableau 8 : Gamme de dilution standardisée par inoculation d'une suspension d'oocystes chez des souris.	89
Tableau 9 : Gamme réalisée par gavage des souriceaux avec une suspension d'oocystes	90
Tableau 10 : Amorces utilisées pour la PCR quantitative en temps réel.....	103
Table 11 : Primers and probes used for protozoan detection in water samples and in tissues and haemolymph of <i>D. polymorpha</i> by TaqMan real time qPCR.....	123
Table 12 : Summary of LOD95 and LOQ of <i>T. gondii</i> , <i>G. duodenalis</i> and <i>C. parvum</i> in <i>D. polymorpha</i> haemolymph and tissues. LOD ₉₅ and LOQ are expressed in (oo)cyst number per bivalve.....	125
Table 13 : Number of quantifiable haemolymph and tissue samples for each exposure condition.....	129
Tableau 14 : Nombre de protozoaires ajoutés dans les aquariums chaque semaine par rapport au nombre de protozoaires retrouvés à chaque changement d'eau (à 7, 14 et 21 jours d'exposition)	146
Table 15 : Physico-chemical parameters measured in outlet channel for each sampling time.	170
Table 16 : Physico-chemical parameters measured in outlet channel for each week provided by the WWTP managers (mean ±sd). SPM: Suspended Particulate Matter; COD: Chemical Oxygen Demand and BOD: Biochemical Oxygen Demand.	170

Table 17 : Summary of primer pairs used for PCR. Abbreviation, sequences of the designed primers, NCBI accession numbers of the original sequences of the studied genes, PCR efficiencies and primer concentrations in PCR are presented.....	173
Table 18 : Detection of <i>T. gondii</i> , <i>G. duodenalis</i> and <i>C. parvum</i> in zebra mussel tissues (n=12) at 0, 2, 7, 14, 21 and 28 days; and in wastewater sampling (20 L, + for positive sample, – for negative sample) at 0 and 28 days.	181
Table 19 : Number of <i>Toxoplasma gondii</i> and <i>Cryptosporidium parvum</i> oocysts in water sample (n=6) and bivalve tissues (n=3) at 3 and 7 days of depuration.....	218
Table 20 : Number of positive bivalves (n=3) and number of <i>Toxoplasma gondii</i> oocysts in bivalves tissues at 7 days of exposure (D7) and 7 days of depuration (D14).....	219
Table 21 : Number of mice seroconversion observed with MAT and number of mice dead before 60 days post-inoculation with <i>Dreissena polymorpha</i> samples. The samples were collected after seven days of exposition to <i>T. gondii</i> oocysts (D7) and seven days of depuration (D14) (n=3). Two exposition doses were tested (1000 and 10000 oocysts/day/mussel). Serial dilutions of sample were inoculated to estimate the number of infective <i>T. gondii</i> oocysts in each condition.....	221

Avant-propos

Avant-propos

Le projet de thèse présenté dans ce manuscrit est né d'une collaboration entre deux laboratoires de l'Université de Reims Champagne-Ardenne : l'UMR I-02 SEBIO (Stress Environnementaux et BIOsurveillance des milieux aquatiques, Directeur : Pr Stéphane Betoulle) et l'EA 7510 ESCAPE (EpidémioSurveillance et CirculAtion des Parasites dans les Environnements, Directrice : Pr Isabelle Villena). Ces recherches ont bénéficié du soutien du projet MOBIDIC (Mollusc bivalves as indicators of contamination of water bodies by protozoan), porté par le Pr Alain Geffard et mené en collaboration avec l'UMR I-02 SEBIO, l'EA 7510 ESCAPE, Bio-Rad et le centre technique et d'expertise agroalimentaire ACTALIA ; ainsi que du soutien du projet DROPPE (la Dreissène comme Outil éPurateur des Protozoaires en Effluent de STEP), porté par Aurélie Bigot-Clivot de l'UMR I-02 SEBIO.

Le projet DROPPE est cofinancé par la région Grand Est (ESSAIMAGE) et le FEDER (Fonds Européen de Développement Régional). Ce projet a pour objectif de tester la capacité d'épuration d'un mollusque bivalve dulcicole, *Dreissena polymorpha*, vis-à-vis de trois parasites protozoaires – *Cryptosporidium spp*, *Giardia duodenalis* et *Toxoplasma gondii* – en effluent de station d'épuration (STEP). Pour cela trois objectifs ont été identifiés : (1) Déterminer la capacité de maintien des dreissènes en effluent, (2) Déterminer la capacité de bioaccumulation des protozoaires par les dreissènes en effluent et (3) Caractériser la capacité d'épuration des dreissènes *in situ*.



Le projet MOBIDIC, financé par l'ANR (Agence Nationale de la Recherche) a pour but de développer une technique, sensible et rapide, de détection des protozoaires – *Cryptosporidium spp*, *Giardia duodenalis* et *Toxoplasma gondii* – dans les eaux. Pour cela, l'ANR MOBIDIC s'intéresse à la bioaccumulation de ces trois parasites par des espèces mollusques bivalves : *Dreissena polymorpha*, une espèce dulcicole, et *Mytilus edulis*, une espèce marine. L'utilisation de ces bivalves pourrait permettre l'intégration de la contamination à long terme et ainsi la mise en place d'une biosurveillance efficace sur le continuum eaux douces / eaux marines. C'est pourquoi plusieurs axes ont été mis en place : (1) Développement d'une technique de détection rapide et sensible des trois protozoaires dans les tissus des bivalves, (2) Caractérisation de la cinétique d'accumulation et de dépuration de ces protozoaires dans les bivalves étudiés et (3) Interactions entre les protozoaires et la physiologie des bivalves. C'est essentiellement dans le deuxième axe que ce projet de thèse a pris place.



Introduction générale

L'eau est une ressource importante de notre planète, puisqu'elle recouvre 72 % de sa surface. Cependant, les eaux douces ne représentent que 2,8 % des 1 400 millions de km³ d'eau estimés sur Terre avec 2,1 % d'eau douce sous forme solide (neige et glace) et seulement 0,7 % sous forme liquide. Selon le BRGM (Bureau de recherches géologiques et minières), l'Homme ne pourrait accéder qu'à 1 % des eaux douces (cours d'eau, réservoirs naturels ou artificiels...) soit 0,028 % de l'hydrosphère totale. Ces écosystèmes d'eau douce fournissent de nombreux services écosystémiques vitaux tels que l'approvisionnement en eau potable et en eau d'irrigation. Ils représentent également une forte valeur économique à travers les zones de loisirs aquatiques : 150 millions d'euros en ce qui concerne les sports aquatiques et 500 millions d'euros pour le tourisme fluvial en France métropolitaine par an (EFESE, 2018). Ces milieux sont également l'habitat de nombreuses espèces animales ou végétales, ils peuvent donc constituer une ressource alimentaire dans le cadre, par exemple, de la pêche ou de l'aquaculture. En France, selon un rapport du Ministère de la Transition écologique et solidaire (EFESE, 2018), la valeur annuelle des biens prélevés (principalement des poissons) dans les milieux aquatiques continentaux s'élèverait à 240 millions d'euros. Ces milieux ont également un rôle de régulation de la qualité des eaux de par, entre autres, leur capacité de rétention de l'azote, du phosphore ou encore de certains micropolluants organiques. Selon le rapport de l'EFESE (2018), la valeur de l'activité de rétention de l'azote dépasse les 2 milliards d'euros en France, grâce à l'allègement des traitements d'épuration occasionné. Cependant, ces écosystèmes sont menacés par de nombreuses pressions anthropiques. En 2013, des pesticides ont été retrouvés sur 92 % des points de surveillance (n= 2 950) et seuls 10 % des habitats d'eau douce en France sont dans un état de conservation jugé « Favorable ».

La contamination de ces milieux entraîne de nombreux risques pour la santé humaine par la consommation d'eau ou de ressources alimentaires (coquillages, poissons...) contaminées.

Selon un rapport conjoint de l’OMS et de l’UNICEF (OMS & UNICEF, 2017), 4,4 milliards de personnes dans le monde n’auraient pas accès à une eau possédant un système d’assainissement « géré en toute sécurité », soit 60 % de la population mondiale. Chaque année, environ 4 milliards de cas de diarrhée sont déclarés dans le monde¹ : on estime que 1,1 million de décès et 61,1 millions de DALYs² (Disability Adjusted Life Years) auraient pour cause une consommation d’eau souillée (Forouzanfar *et al.*, 2016). Entre janvier 2011 et décembre 2016, 381 épidémies hydriques dues à la présence de protozoaires ont été identifiées, 63 % seraient causées par *Cryptosporidium* et 37 % à *Giardia* (Efstratiou *et al.*, 2017). Entre 2004 et 2010, 2 % des épidémies hydriques (n= 325) étaient causées par *Toxoplasma gondii* (Baldursson & Karanis, 2011). Chaque année à l’échelle mondiale, 1,9 million de nouveaux cas de toxoplasmose congénitale sont répertoriés, entraînant la perte d’environ 1,2 million de DALY (Torgerson & Mastroiacovo, 2013). Ces trois protozoaires ont été ciblés comme étant des priorités de santé publique par l’OMS (WHO, 2012). En effet, un classement des pathogènes ayant une transmission hydrique établi en quatre rangs, selon l’importance de leur transmission hydrique, leur infectiosité, leur résistance aux traitements hydriques, leur épidémiologie ou encore l’importance des symptômes engendrés voire de leur létalité le cas échéant. A ce titre, *Cryptosporidium parvum* et *Giardia duodenalis* ont été classés dans le premier rang, les plaçant en tête des priorités sanitaires pour l’OMS. *Toxoplasma gondii*, quant à lui, est classé au troisième rang car ses épidémies ont une dimension plus régionale que les deux autres. La résistance des pathogènes aux traitements physico-chimiques est l’un des critères de priorisation avancé par l’OMS. En effet, les formes

¹ https://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/diarrhoea/fr/

² Disability Adjusted Life Years ou espérance de vie corrigée de l’incapacité est un mode d’évaluation du coût des maladies qui mesure l’espérance de vie en bonne santé après soustraction du nombre d’années « perdues » à cause de la maladie, du handicap ou d’une mort précoce.

environnementales des protozoaires qui nous intéressent, oocystes et kystes, résistent à de nombreux traitements mis en place dans les stations d'épuration et dans les usines de potabilité, ce qui entraîne un fort risque épidémique. En Europe, seuls *Toxoplasma* et *Cryptosporidium* sont mentionnés dans l'annexe I de la directive 2003/99/CE comme étant des « agents zoonotiques à surveiller en fonction de la situation épidémiologique ».

En effet, ces parasites sont excrétés dans les fèces des animaux contaminés concentrant ainsi cette pollution dans les eaux usées, qu'elles soient d'origine domestique, hospitalière ou agricole. La réutilisation des eaux usées est considérée comme étant un enjeu majeur du développement durable, or, cette réutilisation ne peut avoir lieu de manière hygiénique sans un traitement adéquat des eaux usées. Par exemple, il existe un important risque de giardiose et de cryptosporidiose alimentaires ayant pour origine une eau d'irrigation contaminée (Amorós *et al.*, 2010, Chaidez *et al.*, 2005, Lonigro *et al.*, 2006). En effet, des oocystes de *Cryptosporidium* ainsi que des kystes de *Giardia* ont été retrouvés dans respectivement 36 % et 60 % des eaux d'irrigation testées en Amérique centrale et aux Etats-Unis (Thurston-Enriquez *et al.*, 2002). La présence des protozoaires dans les eaux de surface peut également entraîner un risque d'ingestion accidentelle des kystes et oocystes au cours de la pratique de loisirs aquatiques, celui-ci est estimé autour de 1.10^{-4} personne infectée pour *Cryptosporidium* et *Giardia* (Coupe *et al.*, 2006, Ryu *et al.*, 2007). Cependant, ce risque peut être variable en fonction des sites et des activités pratiquées. Par exemple, l'ingestion accidentelle d'eau dans les canaux d'Amsterdam par des plongeurs professionnels engendrerait un risque par plongée allant de 0,0002 à 0,007 % et de 0,04 à 0,2 % pour respectivement *Cryptosporidium* et *Giardia* (Schets *et al.*, 2008). De même, la baignade en piscine engendrerait un risque d'infection compris entre 1.10^{-3} et 2.10^{-3} pour *Cryptosporidium* et 1.10^{-5} et 3.10^{-5} pour *Giardia* par personne et par baignade (Schets *et al.*, 2011). Dans les lacs destinés aux loisirs, le risque serait

de 1.10^{-4} à 5.10^{-4} et de 4.10^{-6} à 1.10^{-4} personne infectée par baignade respectivement pour *Cryptosporidium* et *Giardia* (Schets *et al.*, 2011). Les enfants sont particulièrement touchés par ce risque de par la fréquence plus élevée d'ingestion accidentelle d'eau lors des baignades. Aujourd'hui la plupart des stations d'épuration sont incapables de faire face à cette contamination des eaux par les protozoaires. Certains traitements tertiaires récemment mis en place ne sont pas assez efficaces, voire, totalement inefficaces (chloration, ozone, lagune tertiaire...). De nombreuses études ont montré d'importantes concentrations en protozoaires dans les effluents de STEP, par exemple 1 200 oocystes de *C. parvum* ou encore 330 kystes de *G. duodenalis* par litre d'effluent ont été retrouvés en Espagne (Ramo *et al.*, 2017).

De plus en plus d'études se tournent vers la bioremédiation pour faire face à ces problématiques de contamination des milieux. Par exemple, la phytoremédiation a beaucoup été utilisée pour la réhabilitation des sols miniers extrêmement pollués en métaux lourds (Lone *et al.*, 2008). Dans les milieux aquatiques, les mollusques bivalves, en tant qu'organismes filtreurs, sont des outils de bioremédiation très prometteurs. Leur efficacité a pu être mise en évidence à de multiples occasions aux Etats-Unis. En effet, l'introduction des différentes espèces de bivalve - *Corbicula fluminea* (Phelps 1994), *Dreissena polymorpha* (Arnott & Vanni 1996) ou *Crassostrea virginica* (Kirby & Miller, 2005) – a permis de lutter efficacement contre l'eutrophisation des milieux aquatiques, pour le retour d'une meilleure qualité de l'eau et de la biodiversité. Un grand nombre d'études montre que diverses espèces de bivalves sont capables de bioaccumuler les protozoaires *C. parvum*, *G. duodenalis* et *T. gondii* et donc d'extraire cette contamination biologique des eaux ; c'est le cas par exemple pour *Mytilus galloprovincialis* (Aksoy *et al.*, 2014, Gómez-Couso *et al.*, 2006, Gómez-Couso, *et al.*, 2005a, Marangi *et al.*, 2015, Mladineo *et al.*, 2009), *Mytilus edulis* (Lévesque *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2006, Tedde *et al.*, 2019, Tei *et al.*, 2016) ou encore pour *Crassostrea spp* (Fayer *et al.*,

1999, 2002, Monteiro *et al.*, 2019, Putignani *et al.*, 2011, Schets *et al.*, 2007, Tei *et al.*, 2016) pour les espèces marines. De nombreuses études s'intéressent aux bivalves marins car ceux-ci représentent une ressource alimentaire importante, cependant les espèces vivant en eau douce peuvent être un outil important de biosurveillance des contaminations des milieux aquatiques continentaux.

Parmi les espèces de bivalves d'eau douce, la moule zébrée, ou *Dreissena polymorpha*, nous intéresse tout particulièrement. La dreissène a une très grande tolérance aux variations physico-chimiques du milieu ainsi qu'à la pollution chimique, on la retrouve ainsi dans de nombreux milieux, allant des eaux douces aux eaux saumâtres. Quelques études ont montré que la dreissène est capable de bioaccumuler en conditions environnementales des oocystes de *C. parvum* (Graczyk *et al.*, 2001, Lucy *et al.*, 2008), des kystes de *G. duodenalis* (Lucy *et al.*, 2008) ainsi que des oocystes de *T. gondii* (Kerambrun *et al.*, 2016a). En laboratoire, une accumulation dose-dépendante (Palos Ladeiro *et al.*, 2014) et temps-dépendante (Graczyk *et al.*, 2003, Palos Ladeiro *et al.*, 2015) de ces parasites a pu être observée, de plus, ces études montrent que la dreissène intègre cette contamination dans ses chairs durant au moins 14 jours de dépuración. Ce caractère intégrateur de la contamination en protozoaires, associé à une éventuelle dégradation de ceux-ci (Le Guernic *et al.*, 2018, Palos Ladeiro *et al.*, 2018), pourrait être mis à profit afin de développer un outil épurateur de l'eau, en particulier des effluents de STEPs.

Cependant, avant de pouvoir utiliser la dreissène comme outil épurateur des milieux aquatiques en protozoaires, il est nécessaire de répondre à certaines interrogations laissées en suspens. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse. Le premier objectif a été d'améliorer les connaissances sur la cinétique d'accumulation et de dépuración des

protozoaires par la dreissène (ANR MOBIDIC). Après s'être assuré de l'efficacité de la bioaccumulation, il a été nécessaire d'évaluer la capacité des dreissènes à se maintenir dans de bonnes conditions physiologiques en effluent de STEP. De plus, aucune donnée n'étant disponible sur le devenir des protozoaires accumulés par la moule zébrée, il nous a semblé primordial d'essayer de mieux comprendre le comportement de la dreissène vis-à-vis de ces parasites non spécifiques ; afin de mieux appréhender les échanges d'oocystes et de kystes entre l'eau et les bivalves ainsi que l'impact de la physiologie de la dreissène sur l'infectiosité des protozoaires.

Ce manuscrit est structuré en six chapitres :

Le chapitre I – intitulé «Chapitre I : Etat de l'art» – est consacré à une synthèse bibliographique portant sur les protozoaires et les problématiques liées à leur présence dans les milieux aquatiques. Puis, l'importance des stations d'épuration en tant que vecteur de contamination sera abordée, pour cela les procédés utilisés et la réglementation en vigueur seront détaillés. Ensuite, le principe de bioremédiation et son utilisation au sein des milieux aquatiques seront évoqués, suivi d'un focus sur l'importance de l'utilisation de mollusques bivalves. Enfin, seront présentés l'écologie et l'intérêt de l'utilisation de *Dreissena polymorpha* en bioremédiation.

Le chapitre II – intitulé « Chapitre II : Matériels et méthodes » – détaille les organismes et le site d'étude utilisés ainsi que les techniques et les protocoles mis en œuvre.

Le chapitre III – intitulé « Chapitre III : Etude des cinétiques d'accumulation et de dépuración des protozoaires par la dreissène» – a pour but d'améliorer les connaissances sur la dynamique d'accumulation et de dépuración de ces protozoaires par la moule zébrée, afin d'évaluer le potentiel de la dreissène en tant qu'outil de bioremédiation en conditions

contrôlées. Pour cela, *D. polymorpha* a été exposée en conditions semi-statiques à des oocystes de *T. gondii* ou de *C. parvum* ou à des kystes de *G. duodenalis*, à raison de 100 ; 1 000 ; 10 000 protozoaires par jour par moule. La cinétique d'accumulation est évaluée sur 21 jours suivis de 21 jours de dépuración en eau claire durant lesquels les moules zébrées sont prélevées à 24h, 48h, 72h, 7j, 14j et 21j. Cette expérimentation s'est déroulée dans le cadre de l'axe 3 du projet ANR MOBIDIC.

Le chapitre IV – intitulé « Chapitre IV : Survie et maintien des dreissènes en effluent de STEP » — vise à améliorer les connaissances sur les conditions physiologiques des dreissènes exposées durant 28 jours à l'effluent de STEP à travers une exposition en laboratoire et une étude *in situ*. *D. polymorpha* a été exposée durant 28 jours à l'effluent pur ou dilué à 50%, le taux de clairance des dreissènes ainsi que l'état physiologique des hémocytes (cellules impliquées dans l'immunité des bivalves) ont été évalués. Les moules zébrées ont également été directement encagées dans le canal de sortie de la STEP de Charleville-Mézières (Ardennes, France), le taux de clairance ainsi que des réponses liées au stress oxydant et au métabolisme cellulaire ont été évalués.

Le chapitre V – intitulé « Chapitre V : Devenir des protozoaires accumulés par la dreissène » – a pour but d'améliorer la compréhension du devenir des parasites bioaccumulés et de leur interaction avec la dreissène. D'abord, afin d'évaluer le rejet des protozoaires par la dreissène dans les eaux, une expérimentation a été réalisée *in tubo* permettant la quantification des parasites accumulés ou rejetés dans les eaux durant 7 jours de dépuración. Puis, pour mettre en évidence la capacité de dégradation des parasites par la dreissène, l'infectiosité des protozoaires bioaccumulés a été mesurée grâce à deux techniques : par bioessais (méthode de référence) et par culture cellulaire associée à une qPCR (méthode

alternative aux modèles animaux). Ce chapitre a bénéficié de la collaboration d'Angélique Rousseaux (Thèse CIFRE, ACTALIA).

Le chapitre VI – intitulé « Chapitre VI : Discussion et perspectives » – présente une discussion générale des résultats ainsi que les perspectives apportées par ce projet de thèse, orientées sur l'application de la dreissène en tant qu'outil de bioremédiation.

Enfin, ces chapitres sont suivis d'une Conclusion générale apportant le point final à ce manuscrit.

Chapitre I : Etat de l'art

I. Les protozoaires

1. *Toxoplasma gondii*

a. Classification

Toxoplasma gondii est un parasite ubiquitaire retrouvé dans le monde entier. Il appartient à la famille des *Sarcocystidae*, à l'ordre des *Eimeriida*, au phylum des *Apicomplexa* et à la classe des *Coccidia*. *T. gondii* est la seule espèce du genre. Trois génotypes différents ont été identifiés (type I, II et III) et tous peuvent infecter l'Homme. La diversité de ces génotypes varie en fonction de leur distribution géographique. Cependant, en France le type II est retrouvé dans 90 % des cas de toxoplasmose congénitale, ainsi que dans des isolats d'origine animale (Dardé, 2008).

b. Cycle parasitaire

T. gondii se développe chez deux types d'hôtes (Tenter, 2009) :

- L'hôte définitif est représenté par un membre de la famille des *Felidea*, le plus souvent le chat domestique.
- Les hôtes intermédiaires peuvent être représentés par des animaux à sang chaud, mammifères – dont l'Homme – ou oiseaux.

La multiplication sexuée du parasite (Figure 1) se déroule dans les intestins de l'hôte définitif, les oocystes non sporulés ① (non-infectieux, 10 - 12 μm) ainsi produits sont excrétés dans l'environnement via les fèces du félin. Ces oocystes sporulent dans l'environnement en 1 à 5 jours après leur excrétion. Après la sporulation, l'oocyste contient 2 sporocystes comprenant chacun 4 sporozoïtes, devenant ainsi infectieux (Dubey, 2004). Les hôtes,

intermédiaires ou définitifs, se contaminent, entre autres, par ingestion des oocystes contenus dans l'eau ou présents sur les aliments ^{2 5 7}. Les oocystes ingérés libèrent les sporozoïtes dans les hôtes, rapidement, ceux-ci se différencient en tachyzoïtes. Le tachyzoïte est la forme infectante, sa multiplication se fait de manière asexuée dans les cellules des hôtes jusqu'à rupture de celles-ci. Chez les félins, les tachyzoïtes conduisent à une multiplication sexuée ³. Chez l'homme, c'est le tachyzoïte qui est responsable de l'infection par transfusion sanguine (Nelson *et al.*, 1989) ⁸ ou de l'infection transplacentaire ⁹ conduisant à une toxoplasmose congénitale (Bénard *et al.*, 2008). Chez les hôtes intermédiaires, les tachyzoïtes se logent préférentiellement dans le système nerveux central, les yeux, les muscles squelettiques et cardiaques puis forment des kystes ¹⁰. Dans ces kystes, les tachyzoïtes se différencient en bradyzoïtes ³, ceux-ci ont une multiplication asexuée plus lente. L'ingestion de viande crue ou insuffisamment cuite contenant des kystes conduit à une infection par les bradyzoïtes (Condoleo *et al.*, 2018, Weiss *et al.*, 1995) ^{4 6}.

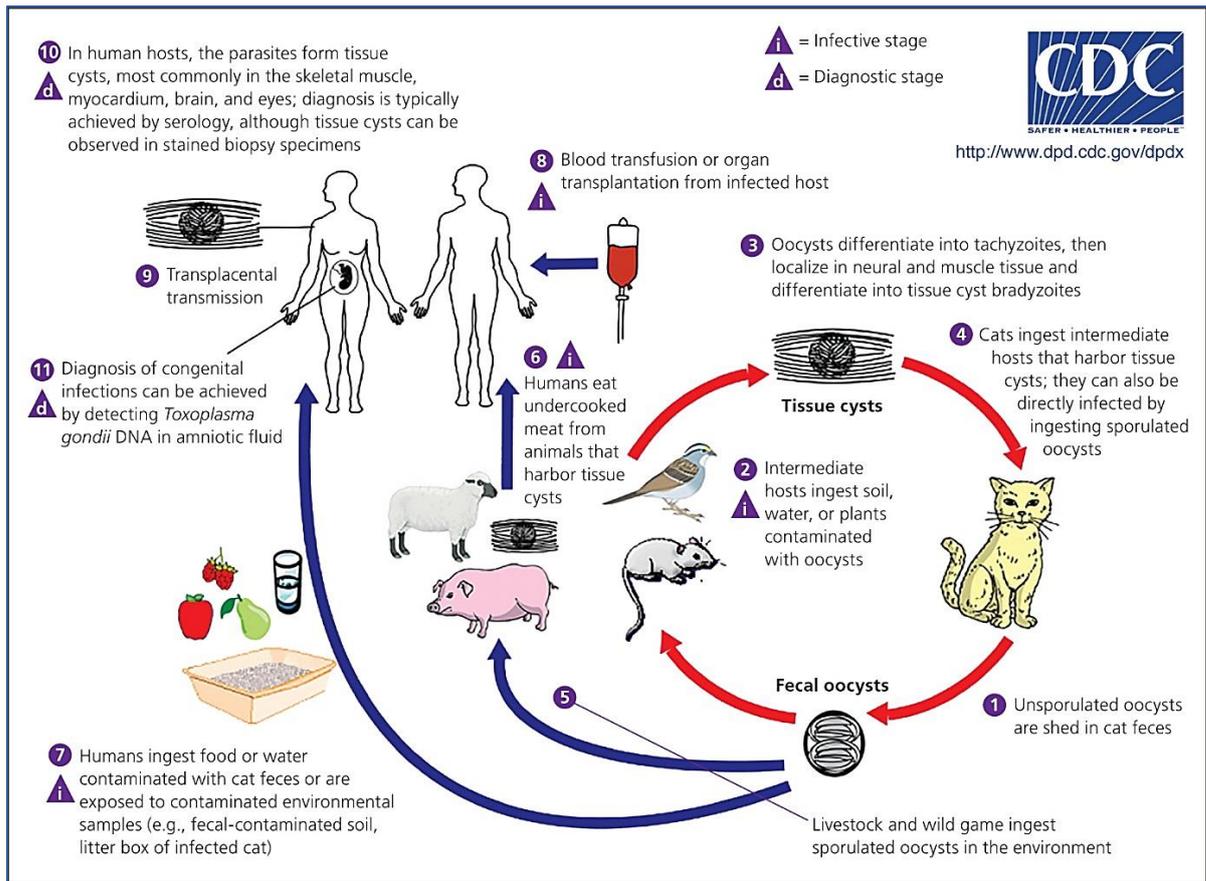


Figure 1 : Cycle parasitaire de *Toxoplasma gondii*. Source : Centers for Disease Control and Prevention

c. Toxoplasmose

La toxoplasmose est la maladie résultant de l'infection par *Toxoplasma gondii*. La contamination de l'organisme peut se faire par différentes voies :

- Par la consommation de nourriture ou d'eau contaminées par les oocystes.
- Par la consommation de viande crue ou insuffisamment cuite contenant des kystes (Condoleo *et al.*, 2018, Weiss *et al.*, 1995).
- Par la consommation de lait non pasteurisé (Ossani *et al.*, 2017)
- Par la greffe d'organe (McGregor *et al.*, 1984) ou par la transfusion de sang (Nelson *et al.*, 1989) provenant de donneurs en phase de multiplication active de *T. gondii*.

Chez les personnes immunodéprimées, notamment les patients souffrants du SIDA, les atteintes sont souvent très graves avec des lésions neuronales, cérébrales ou encore oculaires qui peuvent conduire à la mort. Selon Tenter *et al.* (2000), la toxoplasmose provoquait, à l'époque, une encéphalite sévère chez 40 % des patients atteints du SIDA, 10 à 30 % d'entre eux succombaient à la maladie.

Chez un patient immunocompétent, la maladie est généralement asymptomatique. Cependant une personne porteuse le reste à vie et développe des anticorps anti-toxoplasmose. Dans de rares cas, certains symptômes peuvent être remarqués comme des lymphadénopathies ou encore plus rarement des encéphalites, des myocardites ou des hépatites (Tenter *et al.*, 2000).

Au cours d'une grossesse, si l'infection primaire survient dans les 4 à 6 mois avant la fécondation, ou durant la gestation, les protections immunitaires de la mère peuvent ne pas encore être efficaces. Le fœtus est alors exposé à une transmission transplacentaire de *T. gondii*. La toxoplasmose congénitale peut provoquer un avortement ou une mort fœtale *in utero* si elle intervient lors du 1^{er} trimestre. Si l'infection est plus tardive, le fœtus s'expose à diverses malformations (oculaires, crâniennes...) ou encore à un retard de croissance.

En France, la séroprévalence à *T. gondii* chez les femmes enceintes a diminué ces dernières années. Elle était de 55 % en 1995 (Ancelle *et al.*, 1996), elle est passée à 43,8 % en 2003 (Berger *et al.*, 2009) et à 36,7 % en 2010 (Tourdjman *et al.*, 2015). Elle est cependant très variable en fonction des zones géographiques et des conditions d'hygiène (Wilking *et al.*, 2016). Depuis 2007, le Centre National de Référence sur la Toxoplasmose a permis de recenser le nombre de toxoplasmoses congénitales sur le territoire français, grâce à son réseau baptisé

TOXOSURV³. Ainsi, entre 2007 et 2017, 179 à 272 cas par an de toxoplasmoses congénitales ont pu être recensés. Dans un rapport de l'Afssa (2005), le nombre annuel de nouvelles infections à *T. gondii* en France a été estimé par modélisation entre 200 000 et 300 000 cas, dont environ 30 000 à 45 000 seraient symptomatiques.

d. Résistance et survie de l'oocyste

L'oocyste est la forme de résistance sous laquelle le parasite est retrouvé dans l'environnement. Celui-ci est extrêmement résistant à de multiples traitements. Il résiste par exemple à de nombreux désinfectants comme l'ammoniaque ou encore à certains traitements acides (Dubey, 2004). Un traitement UV ($> 20 \text{ mJ.cm}^{-2}$) altère la viabilité des oocystes (Dumètre *et al.*, 2008), cependant certains oocystes restent infectieux même à des doses $> 500 \text{ mJ.cm}^{-2}$ (Dumètre *et al.*, 2008, Wainwright *et al.*, 2007) qui sont bien supérieures aux doses recommandées pour les traitements des eaux potables (20 à 40 mJ.cm^{-2}). Ils résistent également à une exposition à 100 mg.L^{-1} de chlore pendant 24 h ainsi qu'à une exposition à 6 mg.L^{-1} d'ozone pendant 12 min à 20 °C (Wainwright *et al.*, 2010), pour des doses de traitement recommandées de 0,5 mg.L^{-1} de chlore pendant 30 min et 0,4 mg.L^{-1} d'ozone pendant 4 min. La viabilité des oocystes de *T. gondii* est impactée par les fortes températures. En effet, ils restent infectieux en conditions expérimentales (suspension en eau) pendant 200 jours au moins à des températures comprises entre 10 °C et 25 °C, 107 jours à 30 °C, 1 jour à 45 °C, 1 h à 50 °C et 1 min à 60 °C (Dubey, 1998). Le froid n'impacte que très peu leur viabilité, ils restent infectieux après 54 mois passés à 4 °C et 13 mois à -10 °C (Dubey, 1998). La déshydratation, quant à elle, les inactive dès 24 h en conditions anhydres (Dubey *et al.*, 1970).

³ http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr/?page_id=246

Les oocystes peuvent survivre au moins 100 jours dans les sols secs ou humides, avec respectivement 7,4 % et 43,7 % de viabilité (Lélu *et al.*, 2012). En conditions environnementales, des oocystes sont restés viables durant au moins 18 mois dans des sols du Kansas (Etats-Unis) sous un climat chaud et relativement humide (Frenkel *et al.*, 1975).

Les oocystes sont capables de sporuler en eau de mer (Lindsay *et al.*, 2003) et y rester infectieux pendant 1 an et demi à température ambiante et au moins 2 ans à 4 °C (Lindsay & Dubey, 2009). De même, l'oocyste peut survivre pendant plus d'un an en eau douce à des températures comprises entre -20 °C et 37,5 °C (Dubey, 2004).

2. *Cryptosporidium* spp.

a. Classification

Le genre *Cryptosporidium* appartient à la famille des *Cryptosporidiidae*, à l'ordre des *Eucoccidiorida*, au phylum des *Apicomplexa* et à la classe des *Coccidia*. Vingt-six espèces (Ryan *et al.*, 2014) sont décrites, à ce jour, comme appartenant au genre *Cryptosporidium*. Celles-ci sont capables d'infecter un large panel de taxons : poissons, amphibiens, reptiles, oiseaux ou encore mammifères. Deux espèces sont principalement responsables des infections chez l'Homme : 43 - 56 % avec *C. parvum* et 31 - 45 % avec *C. hominis* (Derouin, 2009). Cependant, d'autres espèces du genre peuvent infecter des patients immunodéprimés. C'est le cas pour *C. baileyi*, *C. canis*, *C. felis*, *C. meleagridis* et *C. muris* qui ont respectivement pour hôte habituel la poule, le chien, le chat, la dinde et la souris (Derouin, 2009 ; Fayer, 2004).

b. Cycle parasitaire

Le cycle parasitaire de *Cryptosporidium* ne se déroule que chez un seul hôte (Figure 2). Il est excrété par l'hôte dans l'environnement sous sa forme de résistance : l'oocyste (4 - 5 μm ; Fayer *et al.*, 2000) ¹. L'hôte s'infecte en ingérant des aliments ou de l'eau contaminés par des oocystes ² ³. Les conditions (température, pH, enzymes...) présentes dans son système digestif permettent le dékystement de l'oocyste ^a qui libère alors 4 sporozoïtes ^b, forme infectante du parasite. Les sporozoïtes se différencient en trophozoïtes et pénètrent dans les cellules du tractus gastro-intestinal ^c ou, plus rarement, dans les cellules des voies respiratoires. C'est dans ces cellules que le parasite accomplit sa multiplication asexuée ^d ^e. Au cours de cette multiplication, le parasite se différencie en mérozoïte, c'est cette forme qui réalise la multiplication sexuée ^f ^g ^h ⁱ amenant à la production d'oocystes sporulés. Deux types d'oocystes sont alors produits (Smithet *al.*, 2005) :

- Les oocystes à paroi épaisse ^j qui seront excrétés dans les fèces, ils représentent 80 % des oocystes produits.
- Les oocystes à paroi fine ^k qui contribuent à l'auto-infection de l'hôte, ils représentent 20 % de la production.

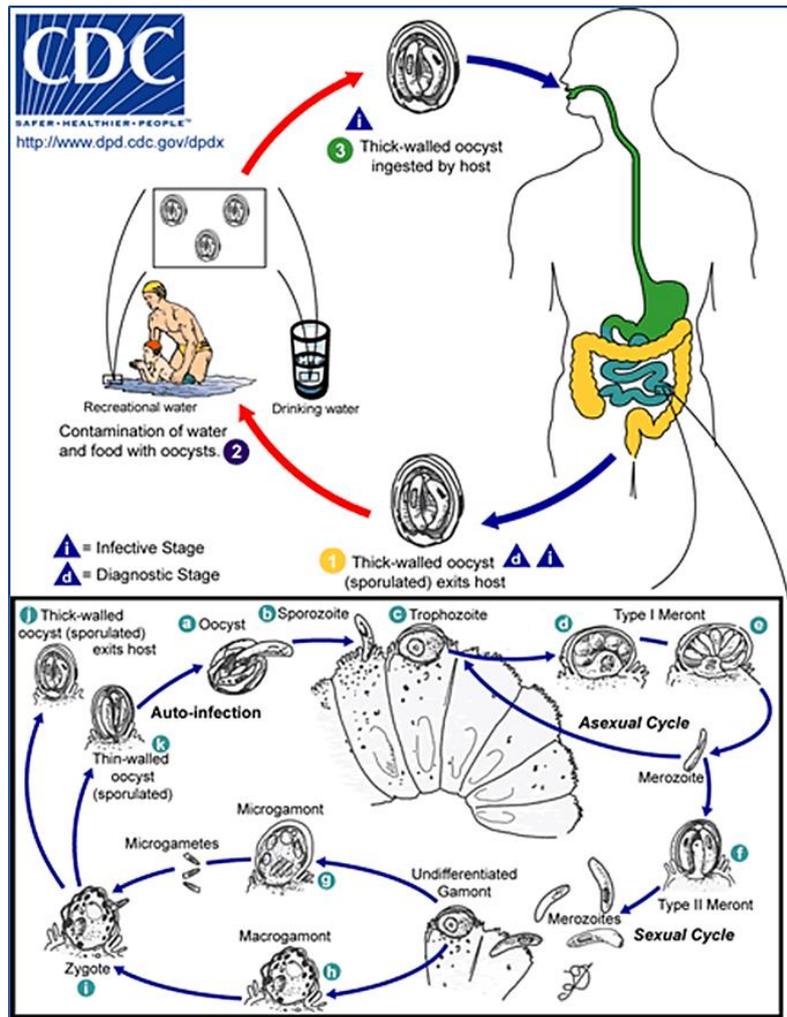


Figure 2 : Cycle parasitaire de *Cryptosporidium* spp. Source : Centers for Disease Control and Prevention

c. Cryptosporidiose

La cryptosporidiose est l'infection causée par les parasites du genre *Cryptosporidium*, elle est la 2^{ème} cause mondiale de mortalité par diarrhée. Elle a été signalée dans 106 pays situés en Afrique, dans le Pacifique, en Europe, au Moyen-Orient, en Asie, aux Caraïbes, en Amérique du Nord, Centrale et du Sud à l'exception de l'Antarctique (Fayer & Xiao, 2007). Selon l'ANSES (*Caractéristiques et sources de *Cryptosporidium* spp*, 2011), l'infection peut être asymptomatique chez certains patients immunocompétents. Les symptômes généralement observés sont : des diarrhées (98 % dont 81 % de diarrhées aqueuses), des douleurs abdominales (60 - 96 %), une perte de poids (50 - 75 %), des nausées (35 %), des vomissements

(49 - 65 %) ainsi que de la fièvre (36 - 59 %). Chez une personne immunocompétente, ces symptômes disparaissent dans les 11 à 13 jours qui suivent la première manifestation de l'infection. Les jeunes enfants, 0 à 4 ans, semblent particulièrement infectés par le parasite (ECDC, 2018). Ces jeunes patients peuvent s'exposer à des retards de croissance et à des pertes de poids suite à l'infection (Khalil *et al.*, 2018).

Chez les patients immunodéprimés, les symptômes sont aggravés, les diarrhées sont sévères et prolongées avec des atteintes biliaires dans près de 30 % des cas. Le taux de mortalité est élevé chez les patients sidéens (Hoxie *et al.*, 1997) et chez les enfants malnutris (Amadi *et al.*, 2001).

Dans son rapport annuel de 2015, l'ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) notait un nombre de cryptosporidioses croissant depuis 2011 (ECDC, 2018). Selon l'ANSES (*Caractéristiques et sources de Cryptosporidium spp*, 2011), la prévalence de la cryptosporidiose dans les pays industrialisés varie de 0,6 à 2 %, celle-ci est plus élevée dans les pays en développement avec une prévalence de 4 % à 32 %.

d. Résistance et survie de l'oocyste

La survie des oocystes est essentiellement affectée par le taux d'humidité présent dans son environnement. En effet, ceux-ci sont extrêmement sensibles à la dessiccation, il faut 2 h à température ambiante pour tuer 97 % des oocystes testés (Robertson *et al.*, 1992). Leur survie est impactée par les hautes températures, 5 secondes à 72 °C suffisent à inactiver totalement les oocystes (Harp *et al.*, 1996), alors que certains oocystes conservent leur infectiosité après 5 min passées à 60 °C (Fayer, 1994). En revanche, 21 % des oocystes restent viables après 114 h de congélation à -22 °C et 2 % après 775 h (Robertson *et al.*, 1992).

De nombreux désinfectants utilisés couramment sont inefficaces contre ce parasite. C'est le cas, par exemple, de la chlorine utilisée dans les piscines (Carpenter *et al.*, 1999), 80 mg.L⁻¹ de chlorine ou de monochloramine pendant 90min sont nécessaires pour inactiver 90 % des oocystes (Korich *et al.*, 1990), rendant l'eau impropre à la consommation. De même, 1,11 mg.L⁻¹ d'ozone pendant 6 min sont nécessaires pour inactiver une solution à 10⁴ oocystes.mL⁻¹ (Peeters *et al.*, 1989), pour une dose recommandée à 0,5 mg.L⁻¹ pendant 4 min.

Les oocystes peuvent survivre 12 semaines dans l'eau et le sol à une température comprise entre -4 °C ou 4 °C, cependant leur dégradation est accélérée à 25 °C (Olson *et al.*, 1999). En conditions environnementales, ils peuvent rester viables 4 à 12 mois dans l'eau ou dans un sol humide. Ils sont également capables de survivre et de rester infectieux en eau de mer : au moins 40 jours à 18 °C à 35 % de salinité (Freire-Santos *et al.*, 1999), 12 semaines à 20 °C à 10 % de salinité et 4 semaines à 10 °C à 20 % de salinité ou 2 semaines à 10 °C à 30 % de salinité (Fayer *et al.*, 1998).

3. *Giardia duodenalis*

a. Classification

Giardia est un protozoaire unicellulaire et flagellé retrouvé dans le monde entier. Ce genre appartient à la famille des *Hexamitidae*, à l'ordre des *Diplomonadida* et à la classe des *Zoomastigophorea*. Parmi les 6 espèces du genre décrites, seule *G. duodenalis* (syn. *G. lamblia* ou *G. intestinalis*) est connue pour infecter l'Homme (Adam, 2001). L'espèce se divise en 8 génotypes différents, nommés de A à H, seuls les types A et B sont pathogènes pour l'Homme (Thompson, 2004).

b. Cycle parasitaire

G. duodenalis a un cycle de vie assez simple qu'il réalise chez un seul hôte (Figure 3). Le parasite se retrouve dans l'environnement sous sa forme de résistance : le kyste (12 - 15 μm) ①. L'hôte se contamine en ingérant des aliments ou de l'eau contaminés par ces kystes ②. Le parasite se dékyste dans l'intestin grêle de l'hôte, où il libère 2 trophozoïtes ③. Ces trophozoïtes se multiplient par division asexuée ④ jusqu'à leur enkystement dans le colon de l'hôte ⑤. Les deux formes, trophozoïte et kyste, sont retrouvées dans les selles de l'hôte, cependant seuls les kystes sont capables de survivre dans l'environnement ① (Adam, 2001).

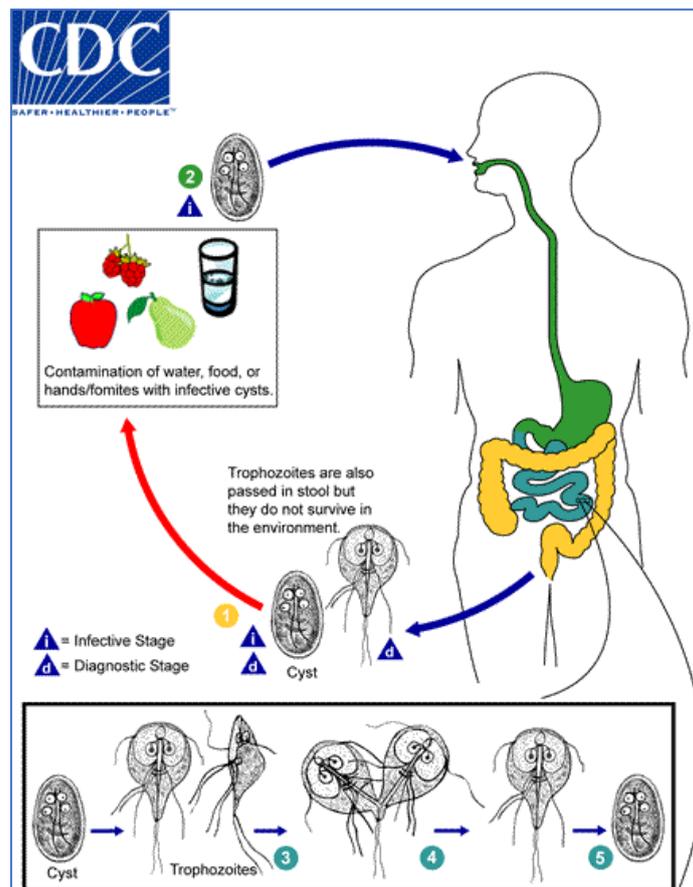


Figure 3 : Cycle parasitaire de *G. duodenalis*. Source Centers for Disease Control and Prevention

c. Giardiose

La giardiose, ou giardiase, est l'infection causée par *G. duodenalis*. Cette infection est le plus souvent asymptomatique (90 % de porteurs sains), cependant des symptômes peuvent apparaître dans les 3 à 20 jours après l'inoculation (Magne *et al.*, 1996). Le patient s'expose à des diarrhées, des nausées ou encore à des douleurs abdominales (*Caractéristiques et sources de Giardia duodenalis*, 2011, Magne *et al.*, 1996). En cas de giardiose chronique, un syndrome de malabsorption intestinale peut survenir, en particulier chez l'enfant (90 % des cas). La perte de poids occasionnée peut alors s'élever de 10 % à 20 % du poids habituel (Sun *et al.*, 2004). Chez les enfants, l'infection peut provoquer des retards de croissance (Farthing *et al.*, 1986) et des retards cognitifs (Berkman *et al.*, 2002). Les symptômes sont présents pendant 2 à 4 semaines chez les patients immunocompétents (Sun *et al.*, 2004), mais persistent pendant plus de 6 mois chez les immunodéprimés dans 60 % des cas (*Caractéristiques et sources de Giardia duodenalis*, 2011).

Selon le rapport de l'ANSES (*Caractéristiques et sources de Giardia duodenalis*, 2011), la prévalence est de 2 % chez les adultes et de 6 à 8 % chez les enfants dans les pays développés. Celle-ci est plus élevée dans les pays en développement avec une occurrence de 20 à 60 %, en particulier chez les enfants.

d. Résistance et survie du kyste

Les kystes de *Giardia* sont inactivés par une dose d'UV de 60 mJ.cm² (Belosevic *et al.*, 2001), l'inactivation est de 99 % pour les doses recommandées pour le traitement des eaux potables comprises entre 20 et 40 mJ.cm² (Campbell & Wallis, 2002). Ils semblent être

beaucoup moins résistants aux désinfectants, 30 fois moins résistants à l'ozone et 14 fois moins au chlore, que les oocystes de *C. parvum* (Korich *et al.*, 1990).

Les kystes de *G. duodenalis* peuvent survivre en eau douce jusqu'à 77 jours à 8 °C, 24 jours à 21 °C et 4 jours à 37 °C (Bingham *et al.*, 1979). En conditions naturelles, des kystes de *G. muris* restent viables durant 28 jours en rivière à 3 mètres de profondeur et 14 jours dans l'eau du robinet (DeRegnier *et al.*, 1989). Ils restent infectieux après 26 jours passés en eau de mer à 10 °C ou 20 °C (Fontaine *et al.*, 1984).

4. Transmission environnementale des protozoaires

Les oocystes et kystes contenus dans les fèces – de chat pour *T. gondii* et dans celles d'animaux domestiques ou d'élevage pour *C. parvum* et *G. duodenalis* – ruissellent avec les eaux de pluie et peuvent ainsi contaminer les milieux aquatiques. Leur détection dans les eaux est positivement corrélée avec les précipitations (Wilkes *et al.*, 2009). Ils peuvent être transportés dans différents types de sol grâce au ruissellement de l'eau, au mouvement du sol ou encore par les arthropodes ou les vers colonisant ces sols (Balderrama-Carmona *et al.*, 2014, Dumètre & Dardé, 2003, Fayer *et al.*, 2000). Leur abondance décroît avec la profondeur jusqu'à 30 cm, avec une densité optimale sur les 2 cm supérieurs. Les parasites peuvent interagir avec les particules du sol ou les fèces, changeant ainsi leur modalité de transport dans l'environnement. Par exemple, la vitesse de sédimentation d'un oocyste de *Cryptosporidium* libre dans l'eau est en moyenne de 0,35 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ contre 1,3 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ sous forme liée (Dumètre *et al.*, 2012). Plusieurs études ont montré que les zones rurales sont particulièrement exposées à ces trois parasites, ceci est certainement provoqué par la présence d'élevages (Sroka *et al.*, 2006 ; Mons *et al.*, 2009 ; Ma *et al.*, 2014). Au Canada,

Cryptosporidium a été détecté dans 93% des eaux de surface entourant des fermes (Buduo-Amoako *et al.*, 2012). De même, les conditions d'hygiène des fermes semblent également influencer le degré de contamination. En effet, un échantillon d'eau seulement sur 14 provenant de fermes ayant de bonnes conditions d'hygiène contient des oocystes de *T. gondii* contre 28/73 pour des fermes ayant de mauvaises conditions hygiéniques (Sroka *et al.*, 2006). Les animaux marins sont également exposés à la contamination par ces protozoaires (Miller *et al.*, 2008), ce qui montre une transmission des formes environnementales jusque dans le milieu marin. Des études de séroprévalence ont montré une contamination importante des mammifères marins à *Toxoplasma* : 42 % (n= 116) des loutres de mer, 45,6 % (n= 228) des ours polaires, 18,7 % (n= 262) des phoques annelés et 66,7 % (n= 80) des phoques barbus (Jensen *et al.*, 2010, Miller *et al.*, 2002). De même, 22,6 % et 64,5 % (n= 31) des phoques annelés, 24,5 % et 71,4 % (n= 49) des baleines noires de l'Atlantique Nord et 5,1 % et 33,3 % (n= 39) des baleines boréales ont été testés positifs respectivement à *Cryptosporidium spp* et *Giardia spp* (Hughes-Hanks *et al.*, 2005). Il semble que ces carnivores s'infectent en consommant des proies contaminées comme des mollusques bivalves (Miller *et al.*, 2008). En effet, de nombreuses espèces de bivalves marins accumulent ces protozoaires dans leur chair (cf. Chapitre I. IV. 3 : Intérêt des bivalves) c'est le cas, par exemple, de *Mytilus galloprovincialis* dont 13,3 % (n= 53) ont été testés positifs à *T. gondii* en Turquie (Marangi *et al.*, 2015), 31,1 % (n= 222) à *C. parvum* en Espagne (Gómez-Couso *et al.*, 2006) et 41,5 % (n= 200) à *G. duodenalis* en Espagne (Gómez-Couso, *et al.*, 2005a). Il semble que la contamination des bivalves marins soit corrélée avec la proximité de lieux de ruissellement d'eau douce et avec la pluviométrie (Shapiro *et al.*, 2015, Tedde *et al.*, 2019). Par exemple, en Californie 5,8 % (n= 120) des *Mytilus californianus* ont été testés positifs à *T. gondii* sur la côte de Cambria uniquement sur un site à proximité d'un estuaire et durant la période humide. Sur les côtes californiennes, 2,5 %

(n= 480) des moules californiennes sont positives à *T. gondii* durant la saison humide contre 0,2 % en saison sèche (n= 479 ; Shapiro *et al.*, 2015). En Normandie, la contamination de *Mytilus edulis* en oocystes de *C. parvum* est plus faible au printemps et en été, soit 140 oocystes.kg⁻¹ de moules en moyenne, par contre en automne et en hiver, où les pluies sont plus intenses, on dénombre 190 oocystes.kg⁻¹ de moules en moyenne (Li *et al.*, 2006).

Les eaux destinées à l'irrigation des champs sont le plus souvent prélevées des eaux de surface (rivières, réservoirs, lacs...) présentes à proximité, celles-ci peuvent être contaminées. La présence de protozoaires dans ces eaux d'irrigation peut induire une contamination des végétaux cultivés (Armon *et al.*, 2002). Si ceux-ci sont consommés crus ou mal cuits, les consommateurs s'exposent à un risque d'infection. Or, ces parasites sont infectieux à très faible dose : entre 1 (Guerrant, 1997) et 5 (Gilles, 1999) oocystes pour *C. parvum* et moins de 10 kystes pour *G. duodenalis* (Rendtorff, 1954). Chez l'Homme, aucune donnée d'infectiosité n'a été publiée à propos des oocystes de *T. gondii*.

Il semble que dans certains cas, les oocystes et/ou kystes pourraient être transmis via l'air — à travers la dispersion de petites particules du sol sur lesquelles les parasites sont adsorbés — et provoquer certains symptômes pulmonaires (Balderrama-Carmona *et al.*, 2014, Fayer *et al.*, 2000, Lass *et al.*, 2017a). En effet, 3 % des échantillons prélevés en Pologne ont été testés positifs à *T. gondii* (Lass *et al.*, 2017a) et 60 % et 80 % d'échantillons d'air au Mexique ont été testés positifs à respectivement *C. parvum* et *G. duodenalis* (Balderrama-Carmona *et al.*, 2014).

5. Présence des protozoaires dans le milieu aquatique

De nombreuses études ont montré l'importance de l'eau comme vecteur de contamination qu'elle soit chimique (Barron, 1990), bactériologique (Czachor, 1992, Daniels *et al.*, 2000) ou encore virologique (Alum & Abbaszadegan, 2016, Gibson, 2014). Parmi ces contaminants biologiques, les protozoaires représentent un enjeu important pour la santé humaine. *Cryptosporidium* et *Giardia* sont parmi les protozoaires les plus responsables d'épidémies de diarrhée à travers le monde. D'après l'OMS, au moins 2 milliards de personnes, à l'échelle mondiale, utilisent encore une source d'eau potable contaminée par des fèces, causant, chaque année, 502 000 décès provoqués par des diarrhées. De nombreuses cryptosporidioses d'origine hydrique ont été identifiées : à Kitchener-Waterloo (Ontario, Canada) en 1993 (Craun *et al.*, 1998), à Londres en 2005 (Royaume-Uni, Nichols *et al.*, 2006), à New-York en 2005 (USA, *Seneca Lake State Park Spraypark Recreational Water 2005*, 2005), et la plus célèbre, l'épidémie du Milwaukee (Wisconsin, USA) en 1993 (Hoxie *et al.*, 1997). De même, de nombreuses épidémies hydriques de giardiose ont été recensées : en Norvège en 2004 (Nygård *et al.*, 2006), en Nouvelle-Zélande en 2009 (ESR, 2010), ou encore en Corée du Sud en 2010 (Cheun *et al.*, 2013). Entre 1972 et 2011, sur 242 épidémies de giardiose recensées, 74,6 % ont été identifiées comme étant d'origine hydrique (Adam *et al.*, 2016). De même, sur les 70 épidémies de cryptosporidiose décrites entre 2000 et 2010, 56,4 % seraient d'origine hydrique (Putignani & Menichella, 2010). *Cryptosporidium spp* était responsable de 60,3 % des épidémies hydriques mondiales recensées entre 2004 et 2010, contre 35,2 % pour *G. duodenalis* et 2 % pour *T. gondii* (Baldursson & Karanis, 2011). L'importance de la contamination des milieux aquatiques par les oocystes de *T. gondii* n'est étudiée que récemment, peu d'informations existent donc à ce sujet dans la littérature. Baldursson & Karanis (2011) ne recensent que 4 épidémies hydriques de toxoplasmose entre 2004 et 2010.

Ces épidémies ont pour origine différentes sources de contamination de l'eau potable jusqu'aux eaux de surface qui peuvent être utilisées comme espace de loisirs, dont quelques exemples sont recensés dans le Tableau 1. Le risque d'infection par ingestion accidentelle d'oocystes de *C. parvum* ou de kystes de *G. duodenalis* lors d'une baignade est estimé à plus de 1/10 000 personnes immunocompétentes (Coupe *et al.*, 2006).

Tableau 1 : Présence des protozoaires — *T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis* — dans les eaux.

Protozoaires	Type de réservoir	Pays	Nombre d'échantillons	Pourcentage d'échantillons positifs	Référence
<i>G. duodenalis</i>	Eaux d'irrigation	Amérique centrale et sud	70	60 %	Thurston-Enriquez <i>et al.</i> , 2002
	Eaux du robinet et de surface	Russie et Bulgarie	166	9,6 %	Karanis <i>et al.</i> , 2006
	Eaux de surface	France	162	93,8 %	Mons <i>et al.</i> , 2009
	Eaux souterraines	France	263	10,3 %	Aubert & Villena, 2009
	Eaux de surface		100	68 %	
	Eaux potables		119	5 %	
	Eaux récréatives	Espagne	28	60,7 %	Castro-Hermida <i>et al.</i> , 2010
	Eaux du robinet		52	36,5 %	
	Eaux du robinet	Portugal	167	8,4 %	Alves de Almeida <i>et al.</i> , 2010
	Eaux du robinet	Luxembourg	64	95,3 %	Helmi <i>et al.</i> , 2011
	Eaux de surface		32	96,9 %	
	Eaux de surface	France	9	22 %	Khaldi <i>et al.</i> , 2011
	Eaux souterraines		27	8 %	
Eaux de surface	Pologne	36	42 %	Lass <i>et al.</i> , 2017b	
Eaux de surface	Pérou	60	93,3 %	Bautista <i>et al.</i> , 2018	
Eaux de surface	Iran	45	40 %	Saeedi <i>et al.</i> , 2018	
Eaux de surface	Tianjin (Chine)	52	98,7 %	Xiao <i>et al.</i> , 2018	

Tableau 1 (suite) : Présence des protozoaires — *T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis* — dans les eaux.

Protozoaires	Type de réservoir	Pays	Nombre d'échantillons	Pourcentage d'échantillons positifs	Référence
<i>T. gondii</i>	Eaux de surface	France	125	8 %	Villena <i>et al.</i> , 2004
	Eaux potables	Pologne	114	27,2 %	Sroka <i>et al.</i> , 2006
	Eaux souterraines	France	263	14,8 %	Aubert & Villena, 2009
	Eaux de surface		100	5 %	
	Eaux potables		119	4,2 %	
	Eaux de surface	Ecosse	1411	8,7 %	Wells <i>et al.</i> , 2015
	Eaux potables	Colombie	46	58,6 %	Triviño-Valencia <i>et al.</i> , 2016
Eaux de surface	Brésil	39	7,7 %	Galvani <i>et al.</i> , 2019	
<i>C. parvum</i>	Eaux d'irrigation	Amérique centrale et sud	70	36,3 %	Thurston-Enriquez <i>et al.</i> , 2002
	Eaux du robinet et de surface	Russie et Bulgarie	166	18,1 %	Karanis <i>et al.</i> , 2006
	Eaux de surface	New-York (USA)	143	75,8 %	Xiao <i>et al.</i> , 2006
	Eaux de surface	France	162	45,7 %	Mons <i>et al.</i> , 2009
	Eaux souterraines	France	263	11,8 %	Aubert & Villena, 2009
	Eaux de surface		100	58 %	
	Eaux potables		119	2,5 %	
	Eaux récréatives	Espagne	28	57,1%	Castro-Hermida <i>et al.</i> , 2010
	Eaux du robinet		52	32,7 %	
	Eaux du robinet	Portugal	167	10,2 %	Alves de Almeida <i>et al.</i> , 2010
	Eaux du robinet	Luxembourg	64	95,3 %	Helmi <i>et al.</i> , 2011
	Eaux de surface		32	96,9 %	
	Eaux de surface	France	9	78 %	Khaldi <i>et al.</i> , 2011
	Eaux souterraines		27	78 %	
Eaux de surface	Australie	962	23 %	Swaffer <i>et al.</i> , 2018	
Eaux de surface	Tainjin (Chine)	52	82,7 %	Xiao <i>et al.</i> , 2018	
Eaux de surface	Pérou	60	15 %	Bautista <i>et al.</i> , 2018	

6. Réglementations en vigueur

En Europe, bien qu'aucune législation n'existe à ce propos, des indicateurs de contamination biologique peuvent être suivis dans les eaux. Ceux-ci sont essentiellement des indicateurs microbiens reflétant une forte pollution d'origine fécale qui n'induit pas forcément un risque sanitaire. Ainsi, les gestionnaires cherchent essentiellement la présence de coliformes (totaux ou fécaux), de la bactérie *Escherichia coli* et d'entérocoques. Ces données sont exprimées en UFC.mL⁻¹, c'est-à-dire, en unités formatrices de colonies contenues dans un millilitre d'eau. La directive européenne 2006/7/EEC, qui concerne les eaux de baignade, propose la mesure d'*E. coli* et d'entérocoques intestinaux comme indicateurs bactériens. En Europe, la qualité des eaux destinées à la consommation humaine, quant à elle, est régie par la directive 98/83/CE. Cette directive définit une eau comme étant propre si elle ne contient pas « un nombre ou une concentration de micro-organismes, de parasites ou de toutes autres substances constituant un danger potentiel pour la santé des personnes ». Or, les indicateurs microbiens concernés par cette réglementation sont les concentrations en *E. coli*, en entérocoques, en *Pseudomonas aeruginosa*, en bactéries coliformes et en *Clostridium perfringens*. Si la présence de *C. perfringens* est détectée dans l'eau potable, la directive préconise de rechercher la présence de *Cryptosporidium spp.* Cependant, plusieurs auteurs ont montré que la corrélation entre ces différents indicateurs et le nombre ou la présence d'oocystes de *C. parvum* ou de kystes de *G. duodenalis* est relativement faible, voire inexistante (Bonadonna *et al.*, 2002, Ottoson *et al.*, 2006, Sroka *et al.*, 2013, Wilkes *et al.*, 2009). En effet, les indicateurs bactériens, comme les coliformes dont *E. coli*, sont plus facilement détruits par les traitements d'épuration que les virus, que les spores de *C. perfringens* ou encore que les formes de résistance des protozoaires (Ottoson *et al.*, 2006).

Plusieurs cas de figures sont rencontrés, les indicateurs microbiens peuvent être présents en l'absence de protozoaires dans les eaux ou inversement (Helmi *et al.*, 2011). Au Luxembourg, 12 % des effluents prélevés négatifs pour les indicateurs bactériens (coliformes totaux et *E. coli*) sont positifs à *C. parvum* et *G. duodenalis*, alors que 9 % des effluents positifs aux indicateurs bactériens sont positifs à ces deux protozoaires (Helmi *et al.*, 2011). Dans ce contexte, ces indices ne peuvent être utilisés à des fins de prédiction de la présence de protozoaires dans les eaux.

La Directive Cadre sur l'Eau (DCE 2000/60) du 23 octobre 2000 définit l'eau comme un patrimoine qu'il faut protéger, défendre et traiter. Cette directive impose aux pays membres de mettre en place des programmes de mesure visant à maintenir le bon état des masses d'eau, la non-dégradation des ressources et des milieux aquatiques et la réduction des pollutions liées aux substances. Les protozoaires ne sont pas spécifiquement listés dans cette directive, mais ils s'inscrivent dans cette optique de préservation des ressources en eau et de réduction des pollutions.

Aux Etats-Unis, l'US EPA (US Environmental Protection Agency) préconise que toute usine de traitement de l'eau potable dont l'approvisionnement est sous l'influence directe de l'eau de surface doit pouvoir éliminer au moins 99 % des oocystes ou kystes (U.S. Environmental Protection Agency, 2001, U.S. Environmental Protection Agency, 2002). Selon l'agence, leur présence dans les eaux est considérée comme étant inacceptable sans pour autant obliger les gestionnaires à les rechercher. Le Canada (Health Canada, 2004) utilise les mêmes recommandations que celles préconisées par l'US EPA.

A ce jour, le Royaume-Uni est le seul pays à avoir fixé une limite légale pour la présence d'oocystes de *Cryptosporidium parvum* dans les eaux de boisson : 10 oocystes pour 100 L. Au-delà de ce seuil, les eaux sont considérées comme impropres à la consommation.

La recherche de *Cryptosporidium* et de *Giardia* dans les eaux est régie par la norme ISO 15553:2006 intitulée : « Qualité de l'eau — Isolement et identification des oocystes de *Cryptosporidium* et des kystes de *Giardia* ». En France, on la retrouve dans la norme AFNOR NF T90-455 (2015, modifiée par NF T90-455/A1 en 2017), et aux Etats-Unis c'est l'USEPA Method 1623 (2012) qui a cours. Le protocole (Figure 4) consiste à filtrer de grands volumes d'eau ①, à éluer le filtre afin de récupérer les parasites, à réaliser une séparation immuno-magnétique des kystes et oocystes grâce à des billes marquées avec leur anticorps respectif ② puis à les dénombrer au microscope par immunofluorescence ③. Cependant, c'est une technique longue et coûteuse qui entraîne de nombreux biais d'échantillonnage (Gallas-Lindemann *et al.*, 2013b, Karanis *et al.*, 2006) et qui fournit une information ponctuelle sur une éventuelle contamination à un instant donné.

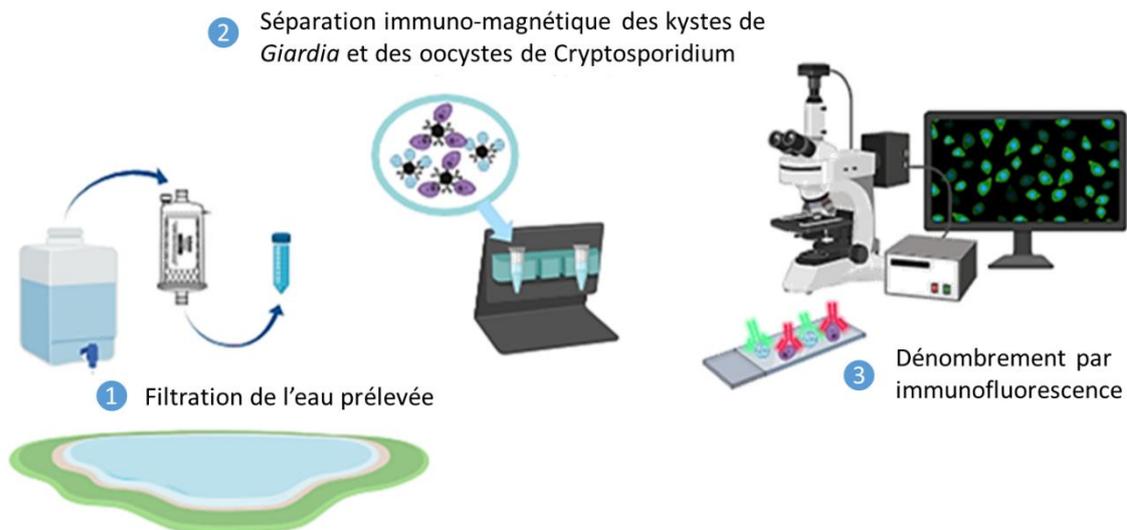


Figure 4 : Schémas illustrant le protocole préconisé par la norme ISO 15553:2006

II. Les stations d'épuration (STEPs)

Les stations d'épuration sont la source de nombreux rejets de contaminants dans les milieux aquatiques, tels que de nombreux contaminants chimiques d'origine pharmaceutique (Bottoni *et al.*, 2010, Fairbairn *et al.*, 2016, Munz *et al.*, 2017), phytosanitaire (Fairbairn *et al.*, 2016, Munz *et al.*, 2017), domestique (Eriksson *et al.*, 2003, Munz *et al.*, 2017) ou encore industrielle (Owlad *et al.*, 2009, Srivastava & Majumder, 2008). Mais on trouve également dans les effluents de nombreux pathogènes entériques tels que des virus (Okoh *et al.*, 2010, Sobsey *et al.*, 1986) ou encore des bactéries (Keawvichit *et al.*, 2001).

1. Source de contamination biologique

De nombreuses études ont montré que les stations d'épuration sont fortement impliquées dans la contamination des milieux aquatiques. On voit apparaître un effet de concentration des contaminants, notamment des protozoaires, dans les eaux usées (Tableau 2). Les eaux usées entrantes dans la STEP (influent) concentrent les parasites d'origine domestique ou hospitalière, excrétés par l'homme, ainsi que les parasites excrétés par les animaux domestiques ou d'élevage. Les concentrations retrouvées peuvent être assez élevées, allant de 1 000 (Ramo *et al.*, 2017) à 3 600 (Domenech *et al.*, 2018) oocystes de *C. parvum* et 2 110 (Domenech *et al.*, 2018) à 18 000 (Ramo *et al.*, 2017) kystes de *G. duodenalis* par litre d'influent en Espagne. En France, Bertrand & Schwartzbrod (2007) ont mis en évidence une forte contamination des influents par *G. duodenalis* avec une moyenne de $2\,410 \pm 1\,110$ kystes.L⁻¹ à Nancy et $4\,520 \pm 2\,900$ kystes.L⁻¹ à Metz. Or, les process utilisés dans les STEP s'avèrent inefficaces pour épurer totalement les parasites protozoaires. En effet, les concentrations de parasites retrouvées dans les effluents restent assez élevées. Par

exemple, on observe encore jusqu'à 1200 oocystes de *C. parvum* par litre (Ramo *et al.*, 2017), pour des concentrations de *G. duodenalis* plus faibles allant de 6 kystes.L⁻¹ (Domenech *et al.*, 2018) à 330 kystes.L⁻¹ (Ramo *et al.*, 2017) en Espagne.

Les boues d'épuration ne sont pas épargnées par cette contamination. En effet, Ramo *et al.* (2017) ont retrouvé des oocystes de *C. parvum* ainsi que des kystes de *G. duodenalis* dans respectivement 48,9 % (jusqu'à 80 oocystes.g⁻¹ de boue) et 100 % (jusqu'à plus de 15 000 kystes.g⁻¹ de boue) des boues testées (N= 92).

Tableau 2 : Présence des protozoaires — *T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis* — dans les stations d'épuration

Protozoaires	Compartiment de la STEP	Pays	Nombre d'échantillons	Pourcentage d'échantillons positifs	Référence
<i>T. gondii</i>	Influent	Allemagne	45	8,6 %	Gallas-Lindemann <i>et al.</i> , 2013a
	Effluent		38	10,5 %	
<i>C. parvum</i>	Influent	Milwaukee (USA)	179	27,9 %	Zhou <i>et al.</i> , 2003
	Effluent	Italie	NA	1 à 11%	Gianguaspero <i>et al.</i> , 2007
	Influent	Chine	90	70 %	Feng <i>et al.</i> , 2009
	Effluent	Espagne	50	58 %	Castro-Hermida <i>et al.</i> , 2010
	Influent Effluent	Allemagne	51	100 % 80 %	Ajonina <i>et al.</i> , 2012
	Effluent		206	31,1 %	Gallas-Lindemann <i>et al.</i> , 2013b
	Effluent	Pologne	13	61,5 %	Sroka <i>et al.</i> , 2013
	Influent Effluent	Suède	21	61,9 %	Widerström <i>et al.</i> , 2014
	Effluent		15	93,3 %	
	Effluent	Italie	119	15,1 %	Marangi <i>et al.</i> , 2015
	Influent Effluent Boues	Espagne	92	92,4 %	Ramo <i>et al.</i> , 2017
	Effluent		92	84,8 %	
	Boues		92	48,9 %	
Influent Effluent	Espagne	108	66,7 %	Domenech <i>et al.</i> , 2018	
Effluent		108	70,4 %		
<i>G. duodenalis</i>	Effluent	Italie	NA	2 à 16 %	Gianguaspero <i>et al.</i> , 2007
	Influent	France	24	100 %	Bertrand & Schwartzbrod, 2007
	Effluent	Espagne	50	98 %	Castro-Hermida <i>et al.</i> , 2010
	Influent	Israël	30	76,6 %	Nasser <i>et al.</i> , 2012
	Effluent	Allemagne	206	65 %	Gallas-Lindemann <i>et al.</i> , 2013b
	Effluent	Pologne	13	84,6 %	Sroka <i>et al.</i> , 2013
	Effluent	Italie	119	8,4 %	Marangi <i>et al.</i> , 2015
	Influent Effluent Boues	Espagne	92	100 %	Ramo <i>et al.</i> , 2017
	Effluent		92	100 %	
	Boues		92	100 %	
	Influent Effluent	Suède	63	44 % 14 %	Berglund <i>et al.</i> , 2017
	Effluent		63	14 %	
Influent Effluent	Espagne	108	84,6 %	Domenech <i>et al.</i> , 2018	
Effluent		108	63 %		

2. Structure des stations d'épuration

Lorsque les eaux usées arrivent dans la STEP, celles-ci vont subir différents traitements. Ces traitements sont divisés en quatre catégories (Figure 5) : les pré-traitements et les traitements primaires, secondaires et tertiaires.

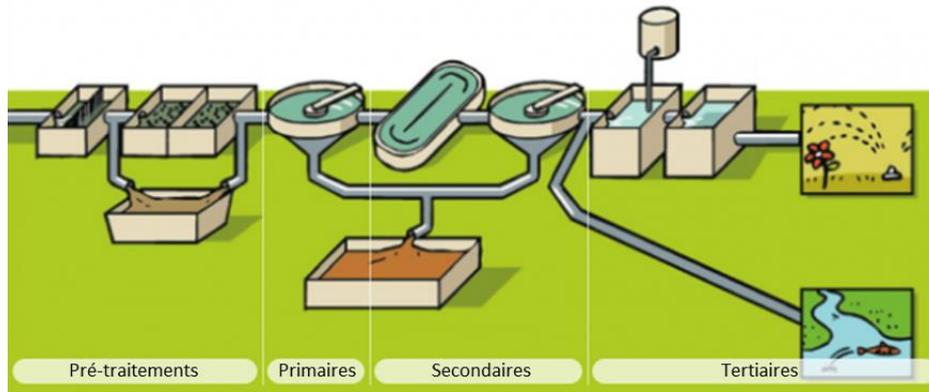


Figure 5 : Structure d'une station d'épuration (modifiée d'après <http://www.depuradores.ad>)

Quelle que soit la STEP, l'eau usée va d'abord passer à travers les pré-traitements. Ceux-ci ont pour objectif l'élimination des gros déchets, on retrouve :

- Le dégrillage qui, comme son nom l'indique, permet d'éliminer les gros déchets (sacs plastiques, papiers, canettes...) grâce à une grille.
- Le dessablage, qui permet d'éliminer les grosses particules (sable et terre) des eaux. Celles-ci peuvent entraver le bon fonctionnement de la STEP et obstruer certains conduits.
- Le dégraissage, qui permet la flottaison des huiles grâce à l'injection de bulles d'air dans les eaux usées. Le dépôt graisseux est éliminé par un système de raclage de surface.

Ensuite, le traitement primaire permet l'élimination de la matière en suspension par décantation. Les boues obtenues sont récupérées par un système de raclage au fond du bassin.

L'eau passe ensuite par le traitement secondaire qui a pour but d'éliminer les matières en solution. Ce sont des traitements biologiques, cependant leur mise en œuvre peut varier en fonction des STEPs :

- Les boues activées, ce processus comprend un traitement biologique consistant à alterner des phases d'aérobie et d'anoxie dans le bassin. Les bactéries vont dégrader les pollutions carbonées, azotées et phosphorées durant ces différentes phases. Au cours de ce processus les micro-organismes vont avoir tendance à s'agglomérer et à former des flocs. Ces flocs sont composés de matières polluantes et de micro-organismes agglomérés qui vont sédimenter et former des boues dans le clarificateur. Le processus d'épuration à boues activées est le procédé le plus utilisé en France (Canler *et al.*, 2005).
- La filtration biologique consiste à filtrer l'eau grâce à un filtre contenant des bactéries fixées sur des billes d'argile. Ces bactéries permettent l'élimination de la pollution carbonée et azotée, tandis que le filtre retient la matière en suspension.
- L'épuration biologique par cultures fixées en lit fluidisé consiste à disposer différents supports mobiles immergés dans le bassin. Les micro-organismes sont fixés sur ces supports permettant une dégradation des pollutions carbonées et azotées, et ce, même en conditions difficiles. Ce bassin est ensuite suivi d'un clarificateur afin de sédimenter les matières en suspension.

- Le lagunage consiste à faire circuler lentement l'eau dans un écosystème lagunaire reconstitué. Les sédiments vont se déposer tandis que des zones d'anoxie et d'aérobie vont se former permettant aux bactéries et aux végétaux de dégrader les pollutions carbonée et azotée. Le temps de séjour de l'eau dans ces écosystèmes est long, il est recommandé de laisser l'effluent dans le système entre 20 et 30 jours minimum.
- Le bassin de stabilisation, est peu profond et s'étend sur plusieurs hectares. Les conditions sont essentiellement anaérobies en profondeur et aérobies en surface.
- Les lits bactériens sont des réacteurs biologiques contenant des biofilms microbiens fixés à des supports inertes. L'eau ruisselle sur ces biofilms par gravité, l'alternance de zones d'anoxie et d'aérobie permet la dégradation des pollutions carbonée et azotée.

Dans la plupart des STEPs, l'eau traitée, ou effluent de STEP, est ensuite directement rejetée dans le milieu naturel.

Cependant dans une optique de réutilisation des eaux, à des fins agricoles ou industrielles par exemple, un traitement tertiaire est nécessaire. Tous les traitements tertiaires ne produisent pas les mêmes résultats, il faut donc choisir le dispositif à mettre en place en fonction des réutilisations envisagées des eaux et de la qualité de l'effluent. Les procédés les plus souvent utilisés pour l'élimination des matières en suspension et des matières organiques sont : les différents types de filtration (micro, ultra et nanofiltration), l'osmose inverse, la coagulation-floculation et la filtration sur milieu granulaire (sur sable le plus souvent). Afin d'éliminer les pathogènes, il est préconisé d'utiliser : la chloration, l'ozonation, les émissions

d'UV et le lagunage tertiaire (faible en profondeur, il permet d'optimiser les effets des UV naturels).

Les boues issues des différents traitements, quant à elles, sont séchées par diverses techniques : filtre à bande, centrifugeuse, filtre presse, séchage solaire ou séchage thermique. Ces boues vont subir plusieurs contrôles (éléments-traces métalliques, indicateurs biologiques...) à l'issue desquels elles peuvent être épandues sur les champs à des fins de fertilisation.

Les différents paramètres des traitements (type de micro-organismes, temps de séjour...) sont calibrés par rapport au type d'influent (matière en suspension, matière carbonée...). Il existe donc autant de STEPs différentes qu'il y a d'influents.

3. Efficacité d'épuration des protozoaires

Les STEPs conventionnelles (pré-traitement, traitements primaire et secondaire) sont inefficaces pour l'épuration des protozoaires (Tableau 3). Toutefois, les procédés utilisant les boues activées peuvent être modifiés. En effet, un long temps de rétention ainsi qu'une grande concentration de floccs permettent un meilleur taux d'abattement des kystes de *G. duodenalis* et d'oocystes de *C. parvum* (Fu *et al.*, 2010). Cependant, ces parasites sont alors retrouvés dans les boues destinées à l'épandage agricole (Ramo *et al.*, 2017) n'éloignant donc pas le risque sanitaire.

Afin d'épurer les pathogènes des eaux usées, les pouvoirs publics recommandent l'utilisation de désinfectant. Or, le procédé de chloration est inefficace face aux kystes de *G. duodenalis* et aux oocystes de *C. parvum*. En effet, aucune réduction de leur viabilité et/ou

de leur infectiosité n'est observée aux temps et aux doses d'exposition utilisés en STEP, soit 2 à 10 mg.L⁻¹ pendant 30 min (Korich *et al.*, 1990; Carpenter *et al.*, 1999; Betancourt & Rose, 2004). La désinfection UV, quant à elle, diminue significativement l'infectiosité des oocystes de *C. parvum*, avec 2 log₁₀ d'inactivation après 7 min d'exposition à une dose d'UV de 1 mJ.cm⁻² (King *et al.*, 2017, Morita *et al.*, 2002), et des kystes de *G. duodenalis*, avec plus de 4 log₁₀ d'inactivation après exposition à 1 mJ.cm⁻² (Linden *et al.*, 2002). Aucune réparation de l'ADN endommagé n'a été observée au sein des oocystes de *C. parvum* (Morita *et al.*, 2002) et des kystes de *G. duodenalis*, (Linden *et al.*, 2002) après ces inactivations par UV. L'efficacité des bassins de stabilisation et du lagunage est d'ailleurs essentiellement due à l'exposition aux UV à l'intérieur de ceux-ci (Reinoso & Bécares, 2008; Reinoso *et al.*, 2008). Selon Falabi *et al.*, (2002) le temps de rétention minimal pour épurer *C. parvum* et *G. duodenalis* dans les bassins ou les lagunages serait de 37 jours. Or, il est recommandé aux gestionnaires de garder un temps de rétention de l'effluent dans les lagunes compris entre 20 et 30 jours minimum, ce qui peut ne pas être suffisant. Aucune donnée sur la présence d'oocystes de *T. gondii* en sortie de STEP n'a été retrouvée dans la littérature.

Tableau 3 : Efficacité d'épuration des protozoaires par les différents traitements retrouvés en STEP.

Protozoaires	Traitements de STEP	Nombre d'échantillons	Abattement des parasites en log	Pourcentage d'effluents positifs après traitement	Référence
<i>C. parvum</i>	<i>Pré-traitements</i>				
	<i>Traitement primaires</i>	22	0,12	100 %	Fu <i>et al.</i> , 2010
	<i>Traitements secondaires</i>				
		28	1,72	97,5 %	Fu <i>et al.</i> , 2010
	Boues activées conventionnelles	208	0,77	69,2 %	Ramo <i>et al.</i> , 2017
		10	0,71	83 %	Kitajima <i>et al.</i> , 2014
	Boues activées modifiées	5	2,17	100 %	Fu <i>et al.</i> , 2010
	Bassin de stabilisation	12	2,8	100 %	Reinoso <i>et al.</i> , 2008
	Lagunage secondaire	12	3,3	100 %	Reinoso <i>et al.</i> , 2008
	<i>Traitements tertiaires</i>				
	Coagulation-flocculation	22	0,77	91 %	Fu <i>et al.</i> , 2010
	Lagunage tertiaire	12	2,2	100 %	Reinoso <i>et al.</i> , 2008
	Chloration	32	1,51	100 %	Ramo <i>et al.</i> , 2017
	Désinfection UV	6	1,48 à 2,77	17 %	King <i>et al.</i> , 2017
	Microfiltration	80	0,86	85 %	Ramo <i>et al.</i> , 2017
	Ultrafiltration	6	>1,84	0 %	Fu <i>et al.</i> , 2010
	Filtration biologique	8	0,81	83 %	Kitajima <i>et al.</i> , 2014
Filtration sur sable	22	0,92	41 %	Fu <i>et al.</i> , 2010	

Tableau 3 (suite) : Efficacité d'épuration des protozoaires par les différents traitements retrouvés en STEP.

Protozoaires	Traitements de STEP	Nombre d'échantillons	Abattement des parasites en log	Pourcentage d'effluents positifs après traitement	Référence
<i>G. duodenalis</i>	<i>Pré-traitements</i>				
	<i>Traitements primaires</i>	22	0,18	100 %	Fu <i>et al.</i> , 2010
	<i>Traitements secondaires</i>				
	Boues activées conventionnelles	28	1,95	100 %	Fu <i>et al.</i> , 2010
		208	1,81	100 %	Ramo <i>et al.</i> , 2017
		11	2,08	95,6 %	Kitajima <i>et al.</i> , 2014
	Boues activées modifiées	5	2,6	100 %	Fu <i>et al.</i> , 2010
	Bassin de stabilisation	12	3,6	100 %	Reinoso <i>et al.</i> , 2008
	Lagunage secondaire	12	3,9	100 %	Reinoso <i>et al.</i> , 2008
	<i>Traitements tertiaires</i>				
	Coagulation-flocculation	22	0,73	100 %	Fu <i>et al.</i> , 2010
	Chloration	32	1,92	100 %	Ramo <i>et al.</i> , 2017
	Désinfection UV	38	2	94,7 %	Neto <i>et al.</i> , 2006
	Lagunage tertiaire	12	2,5	100 %	Reinoso <i>et al.</i> , 2008
	Microfiltration	80	1,49	100 %	Ramo <i>et al.</i> , 2017
	Ultrafiltration	6	>2,4	0 %	Fu <i>et al.</i> , 2010
Filtration biologique	12	1,52	95,6 %	Kitajima <i>et al.</i> , 2014	
Filtration sur sable	22	0,92	82 %	Fu <i>et al.</i> , 2010	

4. Réglementations en vigueur

En France, la qualité de l'effluent rejeté par les STEP s est régie par l'arrêté du 21 juillet 2015 relatif aux systèmes d'assainissement collectif et aux installations d'assainissement non collectif, modifié par l'arrêté du 24 septembre 2017. Cet arrêté impose des valeurs maximales de DBO5 (demande biochimique en oxygène sur cinq jours), de DCO (demande chimique en oxygène) et de MES (matières en suspension) à ne pas dépasser en fonction de la charge brute de l'influent (poids d'oxygène correspondant à la DBO5) (Tableau 4). De même, le texte stipule que les eaux usées rejetées doivent avoir un pH compris entre 6 et 8,5.

Tableau 4 : Performances minimales de traitement attendues pour les paramètres DBO5, DCO et MES. La valeur de la concentration maximale à respecter ou le rendement minimum appliqué sont issus de l'annexe III de l'arrêté du 21 juillet 2015 modifié par l'arrêté du 24 septembre 2017.

PARAMÈTRE	CHARGE BRUTE de pollution organique produite par l'agglomération d'assainissement en kg.j^{-1} de DBO5	CONCENTRATION maximale à respecter, moyenne journalière	RENDEMENT MINIMUM à atteindre, moyenne journalière	CONCENTRATION rédhibitoire, moyenne journalière
DBO5	< 120	35 mg (O2).L ⁻¹	60 %	70 mg (O2).L ⁻¹
	≥ 120	25 mg (O2).L ⁻¹	80 %	50 mg (O2).L ⁻¹
DCO	< 120	200 mg (O2).L ⁻¹	60 %	400 mg (O2).L ⁻¹
	≥ 120	125 mg (O2).L ⁻¹	75 %	250 mg (O2).L ⁻¹
MES	< 120	/	50 %	85 mg.L ⁻¹
	≥ 120	35 mg.L ⁻¹	90 %	85 mg.L ⁻¹

La qualité des boues, quant à elle, est contrôlée par l'arrêté du 8 janvier 1998 fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles (JO n° 26 du 31 janvier 1998, modifié par l'arrêté du 3 juin 1998, JO du 30 juin 1998). Il décrit les teneurs en éléments-traces métalliques et autres composés-traces à ne pas dépasser dans les boues d'épuration. En France, l'hygiénisation des boues à destination de l'épandage n'est pas

obligatoire. Une boue est dite hygiénisée quand elle a subi un traitement qui a réduit « à un niveau non détectable les agents pathogènes ». Ces boues font l'objet d'une surveillance accrue et ne doivent donc pas dépasser les quantités en contaminants biologiques suivantes pour 10 g de matière sèche : 8 NPP (Nombre le Plus Probable) de *Salmonella*, 3 NPPUC (Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathiques) d'entérovirus et 3 œufs d'helminthes pathogènes viables. C'est pourquoi, ce procédé est de plus en plus conseillé lors d'une utilisation des boues à des fins de valorisation d'un écosystème (épandage ou revégétalisation par exemple).

III. La bioremédiation

1. Généralités

La bioremédiation est une branche de la biotechnologie qui utilise des mécanismes biologiques afin de réduire la concentration d'un polluant dans l'environnement à un niveau indétectable ou non toxique. Ces mécanismes peuvent être très variés, allant de l'utilisation d'anticorps à celle d'un organisme (bactéries, champignons, animaux, ou encore végétaux). Cette technique permet la décontamination de milieux à des coûts bien inférieurs à celui des techniques plus traditionnelles (mécaniques ou physico-chimiques) et de manière respectueuse de l'environnement (Vavasseur, 2014). Elle peut être utilisée de manière passive afin de pallier à une pollution continue, de prévenir de l'arrivée de contaminants dans le milieu ou de réhabiliter un milieu contaminé. Cependant, cette technique est difficilement applicable dans l'urgence car la durée des traitements s'étendent sur plusieurs années voire décennies en fonction de l'importance de la pollution. C'est une méthode qui peut être appliquée à tout type de milieux : au sol, à l'air ou encore à l'eau. Son principe consiste à piéger ou à réduire la

mobilité des contaminants non biodégradables et à dégrader ou à transformer les substances biodégradables (essentiellement organiques).

Historiquement, la bioremédiation était associée à l'utilisation de microorganismes en vue de dégrader un polluant. En effet, l'utilisation des bactéries dans un contexte de restauration des écosystèmes est étudiée depuis les années 1990 (Sheehan & Colleran, 2003). Aujourd'hui, le terme de bioremédiation s'est étendu à l'utilisation d'autres taxons, bien que les bactéries restent le groupe le plus communément utilisé. Elles peuvent être utilisées sous forme de biofilm ou disséminées dans les pores du sol afin de dégrader, métaboliser, biotransformer ou biominéraliser les polluants. Les champignons filamenteux, quant à eux, sont particulièrement intéressants par la grande diversité de composés qu'ils sont capables d'oxyder et par leur tolérance élevée aux polluants (Gouma *et al.*, 2014). La phytoremédiation consiste à utiliser les processus physiologiques naturels de la plante afin de dépolluer le milieu (Schwitzguébel *et al.*, 2011, Vavasseur, 2014).

Des considérations éthiques et la consommation de certaines espèces animales entraînent une faible utilisation des animaux en tant qu'outil de bioremédiation. La loi européenne (Directive 2010/63/UE) autorise l'utilisation d'animaux dans un but de « protection de l'environnement naturel dans l'intérêt de la santé ou du bien-être de l'Homme ou de l'animal ». Les organismes filtreurs peuvent être de bons épurateurs des milieux aquatiques grâce à l'accumulation, la dégradation ou la stabilisation de contaminants. Certains auteurs proposent d'utiliser les termes de zooremédiation, zooextraction, zoostabilisation, zootransformation ou zoodégradation à l'image de ce qui a été fait dans le cadre de la phytoremédiation (Gifford *et al.*, 2007, 2009, Gudimov, 2002).

2. Epuration des eaux

Historiquement, les bactéries ont été les premières à être utilisées à des fins d'épuration des milieux aquatiques, en particulier dans un contexte d'eaux usées. En effet, en 1895 en Angleterre W.J. Dibdin développe les lits de contact bactérien qui consistent à mettre en contact des eaux usées avec des biofilms afin de biodégrader la pollution carbonée (El Oifi & Védry, 2014). Puis en 1914, la technique d'épuration par les « boues activées » (cf. Chapitre I : II. 2. Structure des stations d'épuration) est mise au point (Arden & Lockett, 1914) ; elle est appliquée au sein des STEPs dès 1925 et a depuis été optimisée (El Oifi & Védry, 2014). De nos jours, les traitements secondaires des STEPs utilisent (cf. Chapitre I : II. 2. Structure des stations d'épuration) toujours les bactéries comme outil d'épuration de la pollution carbonée, azotée ou phosphorée. En outre, certaines bactéries sont connues pour dégrader partiellement le Bisphénol A (Zhang *et al.*, 2013), ou les HAPs (Behera *et al.*, 2018, Liu *et al.*, 2015). Les bactéries peuvent également être utilisées en synergie avec des microalgues (Abinandan *et al.*, 2018) ou des champignons (Chaturvedi *et al.*, 2015, Folwell *et al.*, 2016, Shah *et al.*, 2008) afin de bioséquestrer ou de biotransformer certains métaux lourds, polymères de plastique ou encore HAPS.

L'utilisation de micro-algues, aussi appelée phycoremédiation, permet la séquestration de certains métaux lourds et métabolise certains gaz à effet de serre (CO_2 , NO_x , SO_x) ainsi que les pollutions carbonée, azotée ou phosphorée permettant de lutter contre l'eutrophisation (Uma Devi *et al.*, 2014). Une trentaine d'espèces de micro-algues serait capable de séquestrer ou de minéraliser les métaux lourds (Zn, Pb, Ni, Fe, Cu, Cr, Co, Cd) montrant un grand potentiel en tant qu'outil épurateur (Suresh Kumar *et al.*, 2015).

Dans la littérature, certains organismes filtreurs sont proposés en tant qu'outil de bioremédiation. C'est le cas des éponges qui sont proposées comme nettoyeur dans les zones d'aquaculture, car ces élevages peuvent entraîner d'importantes contaminations fécales. Par exemple, l'éponge *Chondrilla nucula* est capable de filtrer 7.10^{10} *Escherichia coli* par heure (Milanese *et al.*, 2003). *Hymeniacidon perlevis*, quant à elle, est capable d'épurer 37,8 à 81,6 % des coliformes fécaux, 60,0 à 90,2 % des *Vibrio* pathogènes (Zhang *et al.*, 2010) dans $1,5\text{m}^3$ d'eau et 96 % d'*E. coli* (Fu *et al.*, 2006). L'éponge *Spongia officinalis* pourrait métaboliser certains PCB (Perez *et al.*, 2003) et dégrader des surfactants (sulfonates d'alkylbenzène linéaires) grâce à la communauté bactérienne symbiotique qui est présente au sein de l'organisme (Perez *et al.*, 2002). La piste de l'utilisation des polychètes est également étudiée, par exemple, *Sabella spallanzanii* et *Branchiomma luctuosum* sont capables de filtrer respectivement 70 % et 98 % de *Vibrio alginolyticus* en 30 min dans 1 L (Licciano *et al.*, 2005).

3. Intérêt des bivalves

Les bivalves sont connus pour être de grands filtreurs d'eau et, à ce titre, sont souvent des espèces ingénieuses de l'écosystème, c'est-à-dire qu'ils vont modifier le milieu dans lequel ils vivent de par leur activité naturelle. Les mollusques bivalves sont les plus étudiés en zooremédiation. Au début des années 1980, l'introduction de *Corbicula fluminea* dans l'estuaire du fleuve Potomac (Washington DC, USA) a permis l'amélioration de la qualité de l'eau et donc une plus grande biodiversité (Phelps, 1994). De même, l'introduction de la moule zébrée dans le lac Erié a montré que celle-ci jouait un rôle important dans le recyclage de l'azote et du phosphore (Arnott & Vanni, 1996). Suite aux différentes pressions anthropiques, la baie de Chesapeake (USA) a subi une très forte eutrophisation et de nombreuses

détériorations environnementales. La réintroduction des huitres *Crassostrea virginica* dans la baie a participé à la diminution de l'eutrophisation du milieu (Kirby & Miller, 2005). Dans la même idée, le projet « Billion Oyster Project »⁴ vise à réintroduire *C. virginica* dans le port de New-York (404 000 m² de récifs d'ici 2035) afin de lutter contre la pollution azotée qui y sévit.

Certaines espèces de bivalves peuvent être considérées comme étant des « hyper-accumulateurs » de métaux (Gifford *et al.*, 2007) : *Crassostrea virginica* (jusqu'à 2 013 mg Cu.kg⁻¹), *Mytilus edulis* (506 mg Pb.kg⁻¹), *Pinctada albina albina* (108 mg Cd.kg⁻¹) et *Crassostrea rhizophorae* (2 240 mg Al.kg⁻¹). L'huitre perlière, *Pinctada imbricata*, pourrait permettre l'extraction de 3 kg de métaux lourds, 0,24 kg de polluants organiques et 19 kg d'azote par an et par tonne d'huitres selon un modèle extrapolé de la littérature (Gifford *et al.*, 2004). De même, la présence de *M. edulis* entraîne une dégradation du pétrole 10 à 20 fois plus rapide. Les bivalves d'eau douce du genre *Corbicula spp* peuvent, par exemple, bioaccumuler le virus de la grippe aviaire et réduire son infectiosité (Faust *et al.*, 2009), ou encore celui de l'hépatite E (Li *et al.*, 2007).

La littérature a montré que de nombreuses espèces bivalves sont capables de bioaccumuler des protozoaires en conditions environnementales. Par exemple, des oocystes de *Cyclospora cayetanensis* ont été retrouvés dans les tissus de *Mytilus galloprovincialis* (39,6 %, n= 53 en Turquie, Aksoy *et al.*, 2014) et de *Ruditapes decussatus* (6,9 %, n= 1 020 en Tunisie, Ghazzi *et al.*, 2017). Les oocystes de *T. gondii* et *C. parvum* ainsi que les kystes de *G. duodenalis* sont également bioaccumulés, et donc extraits du milieu aquatique, par plusieurs espèces de bivalves (Tableau 5). Graczyk *et al.* (1998) ont montré que la corbicule asiatique (*Corbicula fluminea*) exposée artificiellement à des oocystes de *C. parvum* durant

⁴ <https://billionoysterproject.org/>

24 h intègre cette contamination jusqu'à 14 jours de dépuración. Une partie de ces oocystes est internalisée et rejetée *via* les fèces, permettant l'extraction des oocystes grâce à la récupération des fèces ou à leur stabilisation dans le milieu ; tandis qu'une autre est internalisée dans les hémocytes rendant possible une éventuelle phagocytose des oocystes par ceux-ci (Graczyk *et al.*, 1997), et donc, une dégradation du contaminant. De même, des moules méditerranéennes (*Mytilus galloprovincialis*) exposées durant 6 h à des oocystes de *T. gondii* ont conservé ces protozoaires dans leur chair durant 21 jours, de plus ceux-ci ont perdu leur infectiosité après 7 jours d'accumulation (Arkush *et al.*, 2003). Freire-Santos *et al.* (2002) ont montré que chez *Ostrea edulis* et *Tapes decussatus* la viabilité des oocystes de *C. parvum* bioaccumulés chute de 70 % dans les 4 jours post-exposition.

Les bivalves permettent l'extraction, la stabilisation voire la dégradation de nombreux types de contaminants qu'ils soient d'origine chimique ou biologique ce qui fait d'eux un outil très prometteur en bioremédiation.

Tableau 5 : Contamination des bivalves par *T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis* en conditions environnementales

Protozoaires	Pays	Espèces testées	Nombre d'échantillons	Pourcentage de bivalves positifs	Référence
<i>T. gondii</i>	Brésil	<i>Crassostrea rhizophorae</i>	300	3,3 %	Esmerini <i>et al.</i> , 2010
	Italie	<i>Crassostrea gigas</i>	109	16,7 %	Putignani <i>et al.</i> , 2011
		<i>Tapes decussatus</i>	804	3,6 %	
	Turquie	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	53	9,4 %	Aksoy <i>et al.</i> , 2014
		<i>Mytilus galloprovincialis</i>	53	13,3 %	Marangi <i>et al.</i> , 2015
	Brésil	<i>Crassostrea rhizophorae</i>	624	8,1 %	Ribeiro <i>et al.</i> , 2015
	États-Unis	<i>Mytilus californianus</i>	240	1,4 %	Shapiro <i>et al.</i> , 2015
	États-Unis	<i>Mytilus spp</i>	NA	43,5 %	Staggs <i>et al.</i> , 2015
	Tunisie	<i>Ruditapes decussatus</i>	1020	6,6 %	Ghozzi <i>et al.</i> , 2017
	Nouvelle-Zélande	<i>Perna canaliculus</i>	104	16,4 %	Coupe <i>et al.</i> , 2018
	Italie	<i>Mytilus edulis</i>	180	6,7 %	Tedde <i>et al.</i> , 2019
<i>Mytilus galloprovincialis</i>		1440	7,5 %		
États-Unis	<i>Crassostrea virginica</i>	1 440	31 %	Marquis <i>et al.</i> , 2019	
Brésil	<i>Crassostrea spp</i>	400	5,8 %	Monteiro <i>et al.</i> , 2019	
<i>C. parvum</i>	Irlande	<i>Mytilus edulis</i>	30	9 %	Chalmers <i>et al.</i> , 1997
	États-Unis	<i>Crassostrea virginica</i>	30	21,2 %	Fayer <i>et al.</i> , 1998
	États-Unis	<i>Ischadium recurvum</i>	102	87,5 %	Graczyk <i>et al.</i> , 1999
	États-Unis	<i>Crassostrea virginica</i>	53	81,0 %	Fayer <i>et al.</i> , 2002
	Espagne	Divers moules, huîtres, palourdes	49	56%	Gómez-Couso <i>et al.</i> , 2004

Tableau 5 (suite) : Contamination des bivalves par *T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis* en conditions environnementales

Protozoaires	Pays	Espèces testées	Nombre d'échantillons	Pourcentage de bivalves positifs	Référence
<i>C. parvum</i>	Italie	<i>Chamelea gallina</i>	32 pool	71,8 %	Gianguaspero et al., 2005
	États-Unis	<i>Corbicula fluminea</i>	NA	38 %	Miller et al., 2005
	France	<i>Mytilus edulis</i>	11 pools	100 %	Li et al., 2006
	Espagne	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	222	31,1 %	Gómez-Couso et al., 2006
	Italie	<i>Ruditapes philippinarum</i>	36 pools	19,7 %	Molini et al., 2007
	États-Unis	<i>Crassostrea virginica</i>	265	88,7 %	Graczyk et al., 2007
	Pays-Bas	<i>Crassostrea gigas</i>	179	5,0 %	Schets et al., 2007
	Brésil	<i>Crassostrea rhizophorae</i> <i>Tivela mactroides</i>	120 60	10,0 % 50,0 %	Guiguet Leal et al., 2008
	Croatie	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	184	16,8 %	Mladineo et al., 2009
	Thaïlande	<i>Perna viridis</i>	54	12,5%	Srisuphanunt et al., 2009
	Canada	<i>Mytilus edulis</i>	NA	73,0 %	Lévesque et al., 2010
	Pologne	<i>Anodonta anatina</i>	114	15,4 %	Śłodkiewicz-Kowalska et al., 2015
	États-Unis	<i>Mytilus spp</i>	NA	26,9 %	Staggs et al., 2015
	Italie	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	60	43,3 %	Marangi et al., 2015
	Brésil	<i>Perna perna</i>	179	18,4 %	Santos et al., 2018
	États-Unis	<i>Mya arenaria</i> <i>Geukensia demissa</i> <i>Mytilus edulis</i>	8 44 97	50 % 11 % 1 %	Tei et al., 2016
	Italie	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	1440	17,5 %	Tedde et al., 2019
	États-Unis	<i>Crassostrea virginica</i>	1 440	31 %	Marquis et al., 2019

Tableau 5 (suite) : Contamination des bivalves par *T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis* en conditions environnementales

Protozoaires	Pays	Espèces testées	Nombre d'échantillons	Pourcentage de bivalves positifs	Référence	
<i>G. duodenalis</i>	Espagne	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	200	41,5 %	Gómez-Couso <i>et al.</i> , 2005a	
	Pays-Bas	<i>Crassostrea gigas</i>	179	2,2 %	Schets <i>et al.</i> , 2007	
	Canada	<i>Mytilus edulis</i>	NA	18,0 %	Lévesque <i>et al.</i> , 2010	
	Italie	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	60	10,0 %	Marangi <i>et al.</i> , 2015	
	États-Unis		<i>Mya arenaria</i>	8	37,5 %	Tei <i>et al.</i> , 2016
			<i>Geukensia demissa</i>	44	4,5 %	
			<i>Crassostrea virginica</i>	10	60,0 %	
			<i>Mytilus edulis</i>	97	20,6 %	
Tunisie	<i>Ruditapes decussatus</i>	1020	1,6 %	Ghozzi <i>et al.</i> , 2017		
Nouvelle-Zélande	<i>Perna canaliculus</i>	104	1 %	Coupe <i>et al.</i> , 2018		
Italie	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	1440	4,2 %	Tedde <i>et al.</i> , 2019		

Presque toutes les études présentées ici s'intéressent à des espèces marines qui constituent une ressource alimentaire, leur contamination soulève donc des problématiques économiques et sanitaires très importantes. Peu d'auteurs se sont intéressés aux espèces continentales, cependant, ces bivalves constituent d'importants outils de biosurveillance de par leur proximité avec certaines sources de pollution anthropique : rejet de station d'épuration, lessivage de sols pollués, rejet direct de certaines eaux polluées... Certaines espèces continentales comme *Corbicula fluminea* ou encore *Dreissena polymorpha* (Binelli *et al.*, 2015a, Gomes *et al.*, 2018) sont de plus en plus mises en avant en tant qu'outil de surveillance des milieux aquatiques, et ce, concernant la contamination en protozoaires également (Graczyk *et al.*, 1998, 2004, Kerambrun *et al.*, 2016a, Palos Ladeiro *et al.*, 2018).

IV. *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771)

1. Biologie et écologie

a. Ecologie



Figure 6 : Photographie de *Dreissena polymorpha* (Photo © Biopix: N Sloth)

La moule zébrée (Figure 6), ou dreissène, est un mollusque bivalve de la sous-classe des hétérodontes et appartenant à la famille des *Dreissenidae*. *Dreissena polymorpha* atteint à l'âge adulte une taille moyenne de 20 à 30 mm (Mackie, 1991). C'est une espèce que l'on retrouve dans de nombreux types d'habitat (rivières, lacs ou encore estuaires), en eau douce comme en eau saumâtre, du fait de sa grande tolérance aux variations physico-chimiques ainsi qu'à la contamination chimique du milieu. Elle survit, par exemple, à des températures élevées (jusqu'à 28 °C), à de fortes salinités (6 à 10 %) et à une large gamme de pH (de 6,5 à 9,3) (Bowman & Bailey, 1998, McMahon, 1996). Sa résistance face aux différentes variations du milieu fait d'elle une espèce au caractère hautement invasif, elle est donc classée comme étant une priorité mineure sur la liste rouge de l'IUCN. En effet, la moule zébrée est originaire de la mer Noire et de la mer Caspienne, elle a ensuite colonisé les eaux européennes, russes et nord-américaines durant le XIX^{ème} siècle (Figure 7 ; Khalanski, 1997). En France, elle a été aperçue pour la première fois en 1838, aujourd'hui elle est présente dans la plupart des grands bassins hydrographiques, rivières et étangs de l'Est et du Nord-Est (Figure 8).

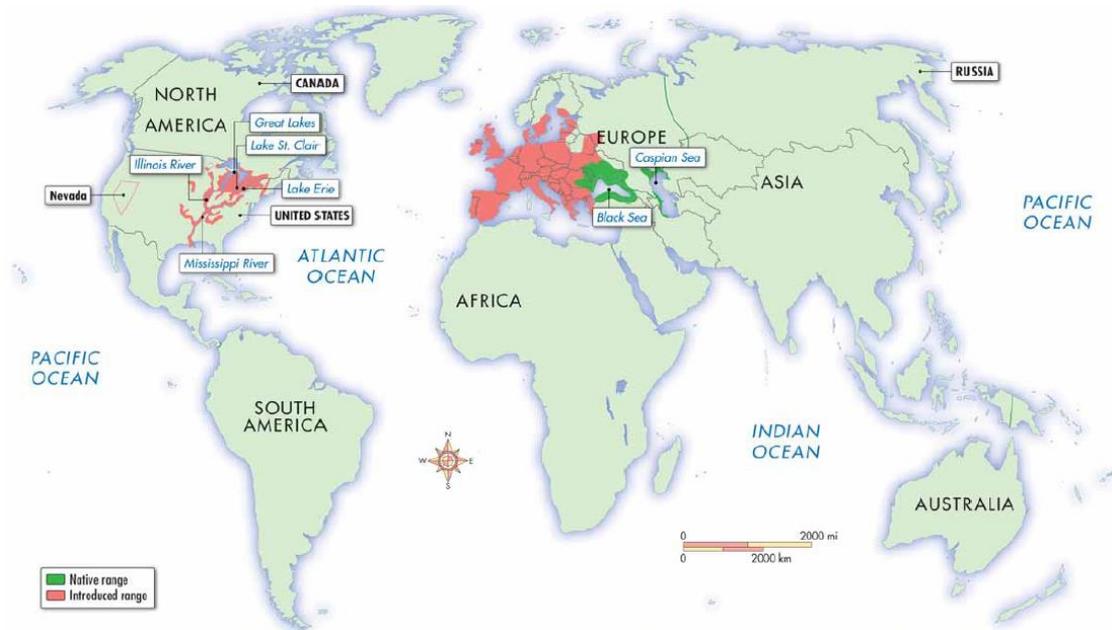


Figure 7 : Aire de répartition de *D. polymorpha* en 2008 selon Gray (2008). En rouge les zones d'invasion et en vert les zones natives

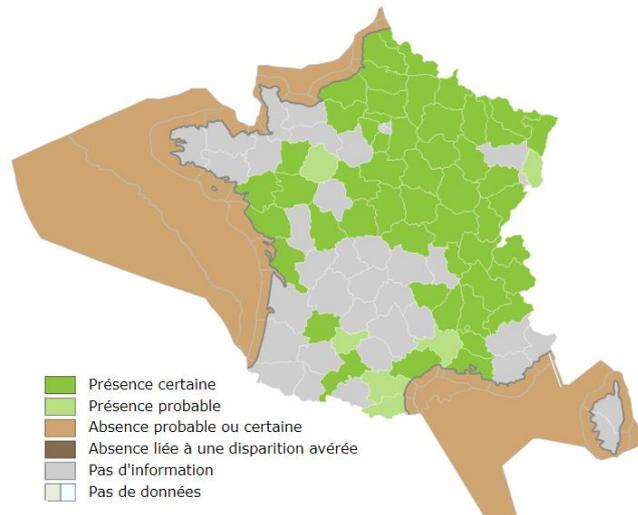


Figure 8 : Aire de répartition de *D. polymorpha* en France selon l'INPN (Inventaire National du Patrimoine Naturel)

La dreissène est une espèce sessile à l'âge adulte, elle se fixe préférentiellement sur des substrats durs tels que des roches, des graviers ou encore des coquillages. Dans des milieux aux substrats fins, les colonies se développent sur du bois, des plantes ou tous supports durs (Karatayev *et al.*, 2015). Dans des milieux fortement anthropisés, les individus colonisent

préférentiellement les surfaces texturées tels que le PVC ou d'autres types de plastique (Marsden & Lansky, 2000) ; elle colonise ainsi l'intérieur des tuyaux d'évacuation, en particulier aux Etats-Unis.

b. Cycle de vie et de reproduction

Son cycle de vie est constitué de deux phases : une phase pélagique et une phase benthique (Ackerman *et al.*, 1994, Khalanski, 1997). En effet, après la fécondation externe des ovocytes par les spermatozoïdes une larve trochophore, libre dans la colonne d'eau, se développe (Figure 9). Celle-ci se transforme en une larve véligère — le vélum étant l'organe impliqué dans l'alimentation et dans la locomotion — puis en larve D chez qui une coquille en forme de « D » se développe grâce aux glandes coquillères. Enfin, le dernier stade larvaire libre est la larve vélichonche qui possède une nouvelle coquille plus ornementée sécrétée par son manteau. Au stade de larve pédivéligère, le pied se forme puis les larves sédimentent et se déplacent afin de trouver un substrat adéquat. Au cours de la métamorphose, la larve se transforme en moule plantigrade : le vélum disparaît, les branchies se forment et la moule prend une forme triangulaire (Figure 9). A la fin de ces transformations, le plantigrade devient un juvénile qui va croître jusqu'à devenir mature lorsque sa taille atteint 5 à 12 mm (Jantz & Neumann, 1998, Nichols, 1996).

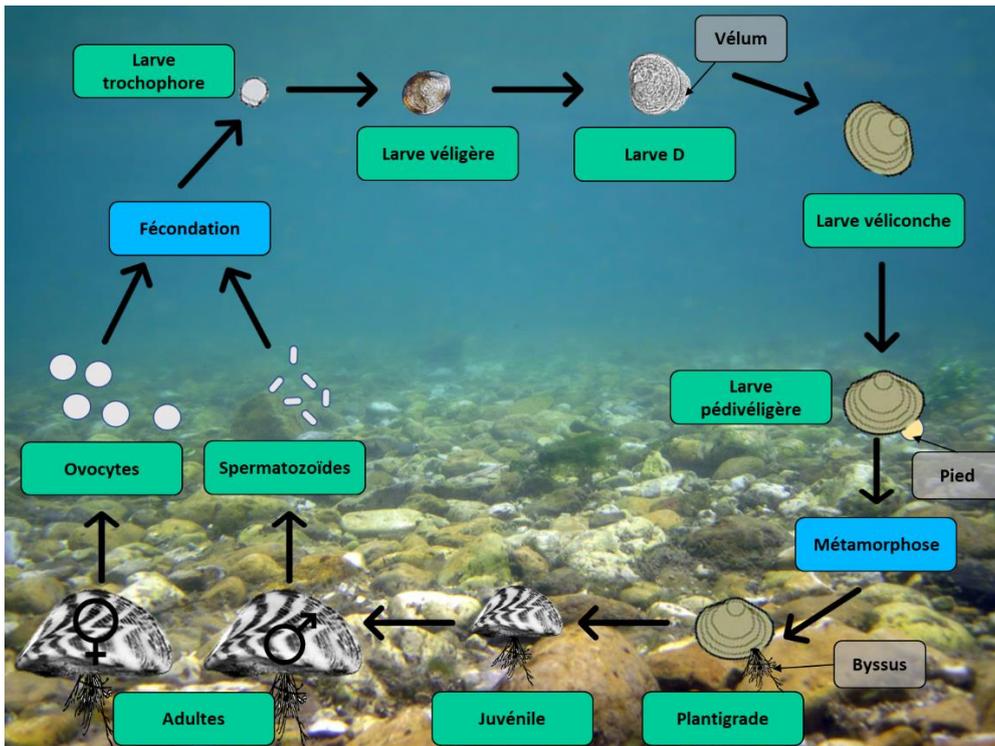


Figure 9 : Cycle biologique de *D. polymorpha* (schéma de Lepoutre, 2019).

La moule zébrée est une espèce gonochorique, c'est-à-dire que les sexes mâle et femelle sont distincts et qu'il n'y a pas de changement de sexe au cours de la vie de l'individu. Son cycle de reproduction est divisé en trois grandes phases (Borcherding, 1991) :

- Le repos sexuel a lieu durant l'hiver de septembre à mi-décembre. Il permet la reconstitution des réserves énergétiques des individus.
- La gamétogénèse se déroule de mi-décembre à début/mi-juin. C'est durant cette étape que se forment et se développent jusqu'à maturité les gamètes, mâles et femelles.
- La libération des gamètes dans le milieu a lieu, quant à elle, de mi-juin à septembre. Elle se produit lorsque la température de l'eau dépasse 12°C, ce qui permet une synchronisation de la ponte entre mâles et femelles dans une population (Borcherding,

1991, Jantz & Neumann, 1998, Nichols, 1996). Chaque femelle pond environ 1,5 million d'œufs par an, qui seront relâchés dans la colonne d'eau pour être ainsi fécondés par les gamètes mâles (Nichols, 1996). Les oocytes des femelles deviennent matures successivement (Borcherding, 1991), la ponte se fait donc de manière séquentielle. Dans la majorité des populations européennes, russes et nord-américaines, la ponte s'échelonne sur 6 à 8 semaines, durant lesquelles, on distingue deux pics de ponte plus importants (Nichols, 1996).

c. Capacité de filtration

C'est une espèce microphage qui se nourrit par filtration, grâce à ses deux siphons (inhalant et exhalant), de fines particules de détritus, de bactéries (Cotner *et al.*, 1995), mais surtout de phytoplancton qui constitue la majeure partie de son régime alimentaire (Makarewicz *et al.*, 1999). La moule zébrée est connue pour avoir une forte capacité de filtration, celle-ci est estimée entre 0,2 et 660 mL.ind⁻¹.h⁻¹ (Costa *et al.*, 2008). Le taux de clairance effectif quant à lui est légèrement plus faible 5 à 402 mL.ind⁻¹.h⁻¹ (Ackerman, 1999, Baldwin *et al.*, 2002, Yu & Culver, 1999). Les particules ayant un diamètre compris entre 0,7 (Sprung & Rose, 1988) et 1 200 µm (Horgan & Mills, 1997) sont filtrées, avec une filtration optimale pour les particules comprises entre 5 et 35 µm (Horgan & Mills, 1997, Sprung & Rose, 1988). Les particules ayant un diamètre supérieur à 40 µm sont directement rejetées avec les pseudo-fèces, elles ne passent donc pas par le système digestif (Ten Winkel & Davids, 1982). Le taux de clairance peut varier en fonction de la température (optimale autour de 20°C ; Lei *et al.*, 1996) et de la vitesse de l'eau (optimale autour 0,1 m.s⁻¹ ; Ackerman, 1999) par exemple. De même, certains paramètres biologiques influent aussi sur le taux de filtration comme la

taille des individus (celui-ci augmente avec la taille ; Horgan & Mills, 2011, Morton, 1971) et le rythme nyctéméral des organismes (6 à 9 % plus élevé la nuit ; Baldwin *et al.*, 2003).

2. Capacité de bioaccumulation des contaminants

De nombreuses études décrivent l'accumulation par les dreissènes de nombreux contaminants chimiques comme les métaux (Camusso *et al.*, 1994, Chevreuili *et al.*, 1996, Pilote *et al.*, 2018), les composés pharmaceutiques (Contardo-Jara *et al.*, 2011a, b), les PolyChloroBiphényles (Binelli *et al.*, 2006, Chevreuili *et al.*, 1996) ou encore les produits phytosanitaires (Binelli *et al.*, 2006, Chevreuili *et al.*, 1996). D'autres études ont également montré une bioaccumulation de contaminants biologiques comme les virus (Stumpf *et al.*, 2010) ou les protozoaires (Lavrentyev *et al.*, 1995, Lucy *et al.*, 2008).

a. Voies de contamination

Plusieurs voies de contamination intervenant dans la bioaccumulation ont été décrites chez les bivalves (Marigómez *et al.*, 2002) : la voie digestive, la voie branchiale et la voie cutanée (*via* le manteau).

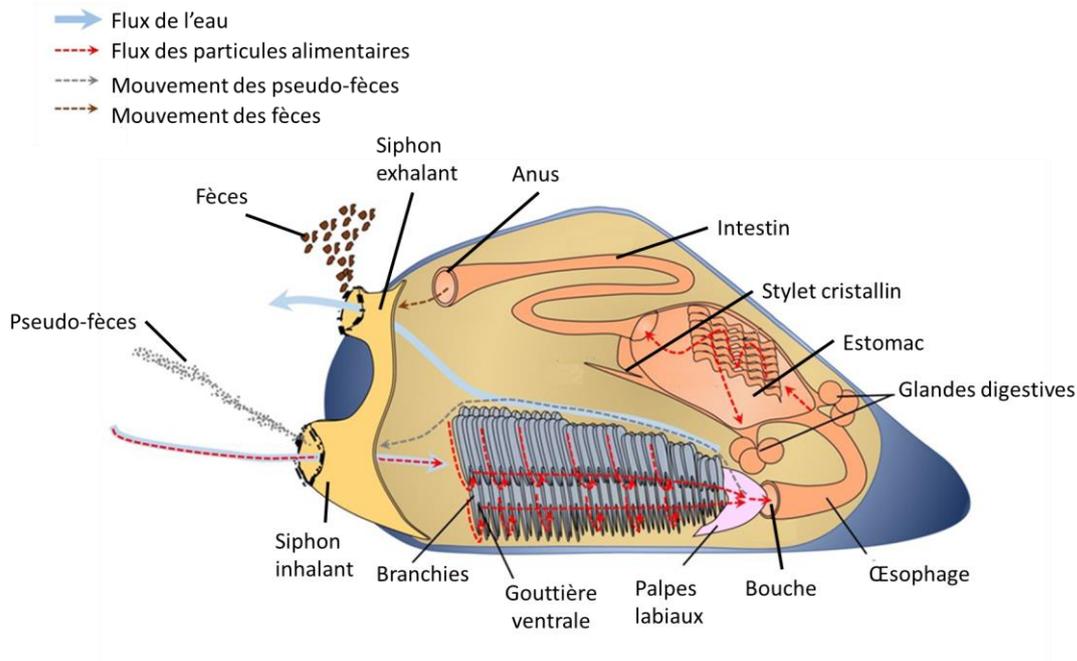


Figure 10 : Schématisation de la digestion chez les bivalves d'après Willer & Aldridge (2017)

Les particules entrent par le siphon inhalant et sont captées par les branchies (Figure 10). Les cellules de l'épithélium branchiale sont capables de pinocytose et ainsi de jouer un rôle alimentaire grâce à l'internalisation d'eau contenant différents macromolécules ou solutés. Ce processus d'endocytose rend la bioaccumulation de certains contaminants possible, comme les métaux (Marigómez *et al.*, 2002) par exemple : c'est la voie branchiale. Les particules sont ensuite dirigées vers la gouttière ventrale puis prises en charge par les palpes labiaux entourant la bouche, où elles seront triées. Les mécanismes de tri ne sont pas tous décrits. La taille des particules semble jouer un rôle important, en effet les particules comprises entre 0,7 et 40 μM de diamètre (Sprung & Rose, 1988, Ten Winkel & Davids, 1982) sont essentiellement dirigées vers la bouche. Cependant d'autres facteurs entrent en jeu, comme la qualité nutritive des particules (Arapov *et al.*, 2010, Gossiaux *et al.*, 1998). En effet, Pales Espinosa *et al.*, (2016) ont montré que le mucus entourant les palpes labiaux est riche en lectine, chez *Crassostrea virginica* et *Mytilus edulis*, permettant une sélection chimique

préférentielle des algues ayant une surface riche en résidus de glucose et mannose. Les particules rejetées par les palpes labiaux sont appelées pseudo-fèces, celles-ci ressortent de l'organisme par le siphon inhalant. Les autres rentrent dans le tractus digestif par la bouche, sont dirigées vers l'œsophage puis vers l'estomac. Ces particules subiront ensuite deux phases de digestion (Auffret *et al.*, 2003). La première est une digestion extracellulaire, qui, grâce à la rotation du stylet cristallin contre le bouclier gastrique, assure les digestions mécanique et chimique des particules. Celles-ci sont ensuite entraînées par le tractus ciliaire tapissant l'estomac et triées en fonction de leur taille. Les plus petites et les plus légères sont dirigées vers les diverticules formant la glande digestive, les autres repartent vers le sac du stylet ou sont éliminées par l'intestin et rejetées sous forme de fèces. La glande digestive est le siège de processus endolysosomals impliqués dans la digestion intracellulaire, les particules arrivant dans les tubules la composant, sont absorbées par les cellules digestives et digérées à l'intérieur de vacuoles (Marigómez *et al.*, 2002, Palais *et al.*, 2011) : c'est la voie digestive. Les contaminants adsorbés sur des particules peuvent également être bioaccumulés, d'autant plus s'ils sont adsorbés sur une particule alimentaire (Gossiaux *et al.*, 1998)

La voie cutanée, via le manteau par exemple, joue un rôle moins important dans la bioaccumulation (Marigómez *et al.*, 2002). En effet, celui-ci est directement exposé aux contaminants présents dans le liquide intervalvaire, qui peuvent être internalisés grâce au processus d'endocytose des cellules épithéliales.

Les voies de bioaccumulation des oocystes de *T. gondii* et de *C. parvum* et des kystes de *G. duodenalis* n'ont jamais été décrites. Au vu de leur taille, qui est respectivement de 10 à 12 μm , 4 à 5 μm et de 12 à 15 μm , la voie privilégiée serait la voie digestive.

b. Bioaccumulation des protozoaires d'intérêt

La moule zébrée est connue pour bioaccumuler de nombreux contaminants grâce, entre autres, à sa capacité de filtration, ce qui en fait un bon outil de biosurveillance. Certaines études ont mis en évidence la présence de protozoaires dans les milieux aquatiques grâce à la concentration de ceux-ci dans la chair des dreissènes. C'est le cas par exemple de Lucy *et al.*, (2008) qui ont montré que des oocystes de *C. parvum* et des kystes de *G. duodenalis* étaient respectivement présents sur 70 % et 90 % des sites testés dans les rivières irlandaises. Des oocystes de *C. parvum* ont également été retrouvés dans des dreissènes natives du St Laurent (Québec, Canada) à raison de 67 oocysts.mL⁻¹ d'hémolymphe et 129 oocystes.g⁻¹ de tissus (Graczyk *et al.*, 2001). Kerambrun *et al.*, (2016a) ont montré pour la première fois une accumulation des oocystes de *T. gondii* par la dreissène en conditions environnementales, avec 3,1 % des bivalves positifs (n= 96).

En laboratoire, Palos Ladeiro *et al.*, (2015) ont mis en évidence une accumulation croissante au cours du temps des oocystes de *T. gondii* durant 21 jours d'exposition à 1 000 oocystes par jour par moule. Cette expérimentation a été suivie par 14 jours de dépuración en eau claire montrant une dépuración lente des oocystes accumulés ; une dépuración similaire a également été observée par Graczyk *et al.* (2003) après une exposition de 5 semaines à des doses relativement faibles de *C. parvum* et de *G. duodenalis* (104 oocystes et 304 kystes par jour pour 230 dreissènes). L'étude de l'organotropisme des oocystes de *T. gondii* a montré que ceux-ci semblaient plus accumulés dans le manteau et l'hémolymphe de la dreissène que dans les muscles, les branchies ou la glande digestive (Palos Ladeiro *et al.*, 2015).

3. La dreissène : un outil d'épuration prometteur

De par sa capacité de filtration, sa tolérance aux contaminants et sa capacité de bioaccumulation des contaminants, la dreissène peut être un outil d'épuration prometteur (Gomes *et al.*, 2018). Elle est également résistante aux coagulants et aux flocculants utilisés dans les STEP s et les usines de potabilité. En effet, des moules exposées en laboratoire à du chlorure de potassium, se sont maintenues en bonnes conditions physiologiques (taux de filtration et indice de condition ; Costa *et al.* 2011). Des auteurs ont montré que la moule zébrée était capable d'épurer certains contaminants dans les effluents de STEP s. Pour cela, une station pilote a été mise en place à la station d'épuration de Milano-Nosedo (Italie), elle permet de disposer les moules dans un réservoir de 1 000 L dans lequel l'effluent (après passage par le bassin de sédimentation) circule en continu ($3\ 500\ \text{L}\cdot\text{h}^{-1}$) en circuit fermé. Ce dispositif a permis de mettre en évidence un abattement total du chrome en un jour (Magni *et al.*, 2015), d'*E. coli* en 48 h (Mezzanotte *et al.*, 2016), une réduction des concentrations en pharmaceutiques (Binelli *et al.*, 2014) ainsi que l'inactivation des poliovirus et rotavirus (Mezzanotte *et al.*, 2016). Elliott *et al.* (2008) ont montré qu'en effluent industriel, le taux de clairance des dreissènes (calibrées à 19 – 20mm) est de $574 \pm 20\ \text{mL}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ avec une vitesse de l'eau de $4\ \text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$. Utiliser ce bivalve comme outil épurateur peut être une solution originale, durable et économique de gestion de cette espèce invasive (Elliott *et al.*, 2008, Gomes *et al.*, 2018). Cependant, dans ces études les dreissènes ne sont pas mises directement dans les canaux de sortie des stations d'épuration, l'influence des variations de débit au cours de la journée n'a pas pu être testée par exemple.

La bioaccumulation par la dreissène des formes environnementales des protozoaires a été décrite par plusieurs études (Graczyk *et al.*, 2001, 2004, Kerambrun, *et al.*, 2016a, Lucy *et al.*,

2008, Palos Ladeiro *et al.*, 2015). Ainsi, les parasites accumulés par la moule sont retirés des écosystèmes aquatiques, réduisant le risque sanitaire. Cependant, très peu d'études se sont intéressées à l'épuration des protozoaires par la dreissène en terme d'infectiosité. Graczyk *et al.* (2004) ont estimé, par hybridation in situ fluorescente (FISH), que 80 % des oocystes de *C. parvum* et des kystes de *G. duodenalis* accumulés par la dreissène en conditions environnementales étaient viables. Des expérimentations *in vitro* ont montré que les oocystes de *C. parvum* peuvent être internalisés par les hémocytes des dreissènes (Palos Ladeiro *et al.*, 2018), suggérant une dégradation possible grâce à la phagocytose, alors que les oocystes de *T. gondii* et les kystes de *G. duodenalis* seraient plutôt encapsulés par ceux-ci (Le Guernic *et al.*, 2018). La dreissène pourrait donc potentiellement dégrader les oocystes et les kystes.

Chapitre II : Matériels et méthodes

I. Matériels utilisés

1. Provenance des organismes

a. *Cryptosporidium parvum*

Les oocystes de *C. parvum* sont fournis par Waterborne® Inc. (Nouvelle-Orléans, Etats-Unis ; réf. #P102C). Les oocystes sont de la souche Iowa et proviennent de selles de veaux expérimentalement inoculés. Les échantillons ont été purifiés par gradient de sucrose et gradient de Percoll après extraction des fèces au diéthyléther par le fournisseur. Les oocystes ont ensuite été triés et numérés par un cytomètre-trieur puis les oocystes sont conservés dans du PBS à 4 °C jusqu'à leur utilisation dans les 3 mois qui suivent la réception. Avant utilisation, chaque suspension parasitaire reçue est à nouveau numérée sur lame Kova (Kova® Slide 10) en PBS 1X par microscopie au laboratoire.

b. *Giardia duodenalis*

Les kystes de *G. duodenalis* sont également fournis par Waterborne® Inc. (Nouvelle-Orléans, Etats-Unis ; réf. #P101). Ils sont obtenus à partir de gerbilles expérimentalement inoculées. Ils proviennent de l'assemblage B (isolat H3), infectieux pour l'Homme. Les échantillons ont été purifiés par gradient de sucrose et gradient de Percoll puis triés et numérés au cytomètre-trieur. Les kystes sont conservés dans du PBS à 4 °C jusqu'à leur utilisation dans les 2 mois qui suivent la réception. Avant utilisation, chaque suspension parasitaire reçue est à nouveau numérée sur lame Kova (Kova® Slide 10) en PBS 1X par microscopie au laboratoire.

c. *Toxoplasma gondii*

Les oocystes de *T. gondii* ont été généreusement fournis par le Professeur J.P. Dubey (USDA, Beltsville, USA). Ils ont été obtenus à partir de fèces de chat expérimentalement contaminées puis purifiées par gradient de sucrose. Les oocystes proviennent de la souche ME49 de génotype II. Les oocystes sont conservés dans une solution aqueuse contenant 2 % d'H₂SO₄ à 4 °C jusqu'à leur utilisation dans l'année qui suit la réception. Avant utilisation, chaque suspension parasitaire reçue est numérotée sur lame Kova (Kova® Slide 10) en PBS 1X par microscopie au laboratoire.

d. *Dreissena polymorpha*

Les dreissènes utilisées pour les expositions proviennent du lac du Der (Marne — France). Les dreissènes sont échantillonnées et calibrées entre 20 et 30 mm (ce qui correspond à un âge de 2 à 3 ans) en fonction des expérimentations.

Après la pêche, les dreissènes sont lavées et mises en stabulation dans des aquariums en verre de 5 L dans un mélange d'eau du site de prélèvement et d'eau Cristaline® (source Aurèle, France) préalablement ajustée en température ($\pm 0,5$ °C) pour atteindre celle du milieu au moment de l'échantillonnage. Elles sont conservées au minimum 10 jours en phase d'acclimatation avant les expérimentations. Durant cette phase, l'eau est renouvelée 2 fois par semaine et les individus sont nourris avec un mélange d'algues fraîches *Chlorella pyrenoidosa* et *Scenedesmus obliquus* à raison de 20 000 cellules algales par jour par dreissène. Les composés azotés (*i.e.* nitrites, nitrates, ammonium) sont contrôlés durant la phase de stabulation.

2. La station d'épuration

La station d'épuration de Charleville-Mézières (Ardennes, France) a été utilisée comme STEP de référence dans ce projet de thèse. Elle a été mise en service en 1996 dans sa configuration actuelle c'est-à-dire avec un traitement « Boues activées – traitement azote et phosphore », configuration la plus répandue en France (Canler *et al.*, 2005). L'effluent est rejeté dans le fleuve la Meuse (4°43'45.1103" E ; 49°45'57.9935" N) avec un volume journalier moyen de 19 296 m³. Sa capacité règlementaire est de 117 000 EH (Equivalent Habitant), soit 7 020 kg de DBO5 par jour, et son débit de référence est de 19 200 m³ par jour.

Elle reçoit des eaux usées de diverses origines :

- Domestique car plusieurs communes de milieux urbain et rural y sont raccordées (Charleville-Mézières, Prix-les-Mézières, La Francheville, Villers-Semeuse, Les Ayvelles, Aiglemont, Dom-le-Mesnil, Damouzy, Chalandry-Elaine, Flize, Warcq, Montcy-Notre-Dame, Saint-Laurent et Lumes).
- Hospitalière du centre hospitalier de Charleville-Mézières et du centre hospitalier spécialisé (santé mentale et addictologie) de Bélair, du centre de réadaptation fonctionnelle pour adultes de Warcq.
- Industrielle avec des industries de l'automobile (PSA Automobiles SA), de fabrication (AMADA Europe, HANON Systems Charleville, Isotip Joncoux) et de production agro-alimentaire (Mondelez France Biscuits Production, SOC Carolomacérien exploitation abattoir).

Les eaux usées (Figure 11) subissent un prétraitement ① (dégrillage, dessablage et dégraissage) puis un traitement par boues activées alternant des phases d'anoxie ② et d'aérobie ③. Puis les eaux sont réparties ④ vers les 4 bassins de clarification ⑤ qui séparent les boues des eaux par décantation. Une grande proportion des boues est pompée ⑥ et redistribuée dans les bassins de traitement biologique ②③ afin de stabiliser les concentrations en microorganismes. Les eaux issues des bassins de clarification sont rejetées par le canal de sortie ⑦, celui-ci sert de point d'analyse (débit de rejet et caractéristiques de l'effluent). Tous les jours une petite proportion des boues issues des bassins de clarification est extraite ⑧ et dirigée vers la déshydratation ⑨. Avant la déshydratation, les boues sont épaissies et mélangées à de la chaux afin de limiter les odeurs. Elles sont ensuite déshydratées grâce à deux filtres-presses, on obtient ainsi des boues contenant en moyenne 33 % de matières sèches. Certaines de ces boues peuvent être utilisées pour l'épandage agricole.



Figure 11 : Structure de la STEP de Charleville-Mézières

II. Détection des protozoaires

Le projet ANR (Agence Nationale de la Recherche) MOBIDIC (Mollusc bivalves as indicators of contamination of water bodies by protozoan parasites) a permis de mettre en place un protocole sensible et rapide pour la détection des oocystes de *C. parvum* et *T. gondii* et des kystes de *G. duodenalis* dans les tissus et l'hémolymphe de bivalves (*Dreissena polymorpha* et *Mytilus edulis*) et ainsi de lever ces verrous techniques.

1. Dans les tissus des dreissènes et dans l'eau

a. Pré-extraction des protozoaires

i. Broyage des tissus des dreissènes

Après la dissection, le tissu entier des dreissènes est prélevé, avec ou sans l'hémolymphe. Les échantillons sont ensuite broyés manuellement à l'aide d'un Potter et d'un piston en verre puis digérés avec 1,5 mL de trypsine 1X pendant 1 h 30 à 37°C sous agitation (90 rpm). L'homogénat est centrifugé à 5 000 g pendant 5 min et les culots sont congelés à -20 °C en attendant la suite du protocole.

ii. Concentration des protozoaires depuis les eaux

Les échantillons d'eau (effluent ou eaux des aquariums) sont filtrés grâce à des filtres Envirocheck® (diamètre des pores : 1 µm ; Pall Life Sciences). Les particules retenues par le filtre sont éluées avec 200 mL de tampon d'éluion (tampon Tris-EDTA 0,01 M / 0,001 M avec 1 g.L⁻¹ de SDS). L'éluat est centrifugé à 1 500 g pendant 10 min sans frein, puis le culot est congelé à -20 °C.

b. Lyse des parois et extraction de l'ADN

La lyse de la paroi des protozoaires ainsi que l'extraction de l'ADN sont réalisées grâce au kit FastDNA® Spin Kit for Soil (MP Biomedicals™) en suivant les instructions du constructeur.

Après décongélation des échantillons, 800 à 900 µL de PBS (Sodium Phosphate Buffer) et 120 µL de MT Buffer sont ajoutés afin de solubiliser les protéines membranaires. L'homogénat est ensuite transféré dans des tubes « Lysing Matrix E », tubes préconisés pour extraire l'ADN des sols, des fèces, des eaux usées ou environnementales, des boues, des tissus infectés par des micro-organismes et du pollen. Chaque tube contient des billes en céramique (Ø 1,4 mm), des billes en silicate de (Ø 0,1 mm) et une bille en verre (Ø 4 mm). Les tubes sont placés dans le broyeur FastPrep-24™ 5G (MP Biomedicals™) à 70 Hz durant 40s répétés deux fois, cela permet la rupture mécanique des parois cellulaires et la libération des acides nucléiques. Une centrifugation à 14 000 g pendant 10 min permet de séparer l'homogénat des billes de broyage. Du PPS Buffer (250 mL) est ajouté à l'homogénat avant centrifugation à 14 000 g pendant 5 min afin de faire précipiter les protéines. Le surnageant est ensuite mélangé à 1 mL de Binding matrix, permettant la liaison des acides nucléiques avec cette matrice de silice. L'échantillon mêlé à la matrice est filtré sur le SPIN Filter par centrifugation (1 min à 14 000 g) permettant de le purifier. Après filtration, la matrice de silice liée aux acides nucléiques est nettoyée grâce à une solution SEW-M complétée en éthanol qui solubilise les protéines et les sels restants. Ces composés sont éliminés par centrifugation : 1 min puis 2 min à 14 000 g. La Binding matrix est re-suspendue avec 100 µL d'eau DNase / Pyrogen-free (DES) et incubée 5 min à 55 °C au bain-marie afin de décrocher l'ADN de la matrice. L'ADN est récupéré dans les 100 µL d'eau DNase / Pyrogen-free après centrifugation à 14 000 g pendant 1 min et conservé à -20 °C.

2. Dans l'hémolymphe des dreissènes

a. Lyse des protozoaires

Les échantillons d'hémolymphe sont centrifugés à 5 000 g pendant 5 min afin de culotter les protozoaires. Le culot est conservé avec 100µL de surnageant et subit 6 cycles de congélation à -80 °C pendant 5 min suivi d'une décongélation à 95 °C pendant 4 min. Afin de compléter la destruction des parois des oocystes et des kystes un traitement à ultrason est réalisé pendant 1 min (pour *C. parvum* et *G. duodenalis*) ou 10 min (pour *T. gondii*) à une fréquence de 37 Hz (Ultrasonics 88155).

b. Extraction de l'ADN

L'ADN est extrait grâce au kit InstaGene™ Matrix (Bio-rad™) en suivant les instructions du constructeur. L'InstaGene™ est composé d'un tampon de lyse et de billes magnétiques (ajout de 100 µL par échantillon) capables de fixer les inhibiteurs de PCR contenus dans l'échantillon. Afin d'optimiser l'action du tampon InstaGene™, une incubation de 35 min à 56 °C au bain-marie est réalisée. Les échantillons sont ensuite vortexés pendant 10s et subissent une phase de lyse à 99 °C pendant 8 min. Une dernière centrifugation à 11 093 g pendant 3 min permet de culotter les billes et les débris de l'échantillon. L'ADN contenu dans le surnageant est transféré dans un nouveau tube puis conservé à -20 °C. Le volume exact de l'échantillon est mesuré et sera utilisé lors du calcul du nombre de protozoaires par échantillon.

3. PCR quantitative de type TaqMan

La détection et la quantification de l'ADN des protozoaires ont été réalisées grâce à la technique de PCR quantitative en temps réel de type TaqMan. Cette technique utilise une sonde interne fluorescente spécifique du produit amplifié (Figure 12). Les amorces et les sondes utilisées pour la qPCR sont détaillées dans le Tableau 6. Les amplifications par qPCR sont réalisées selon le protocole décrit par Palos Ladeiro *et al.* (2014) : 20 μL de mix, composés de 2X d'IQ supermix (Bio-Rad), 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSA, 400 nM de chaque amorce et 200 nM de sonde, sont ajoutés au 5 μL d'ADN de l'échantillon. Deux témoins négatifs sans ADN (5 μL eau DNase free) sont ajoutés sur chaque plaque de qPCR (AB-0700, ThermoFisher Scientific™) pour contrôler l'absence de contamination extérieure qui pourrait induire une fluorescence non spécifique. Les échantillons sont transférés dans un thermocycleur CFX96 Touch (Bio-Rad). Une phase de 3 min à 95 °C est réalisée, permettant d'activer l'ADN polymérase puis 45 cycles de 15s à 95 °C suivis de 1 min à 60 °C sont réalisés.

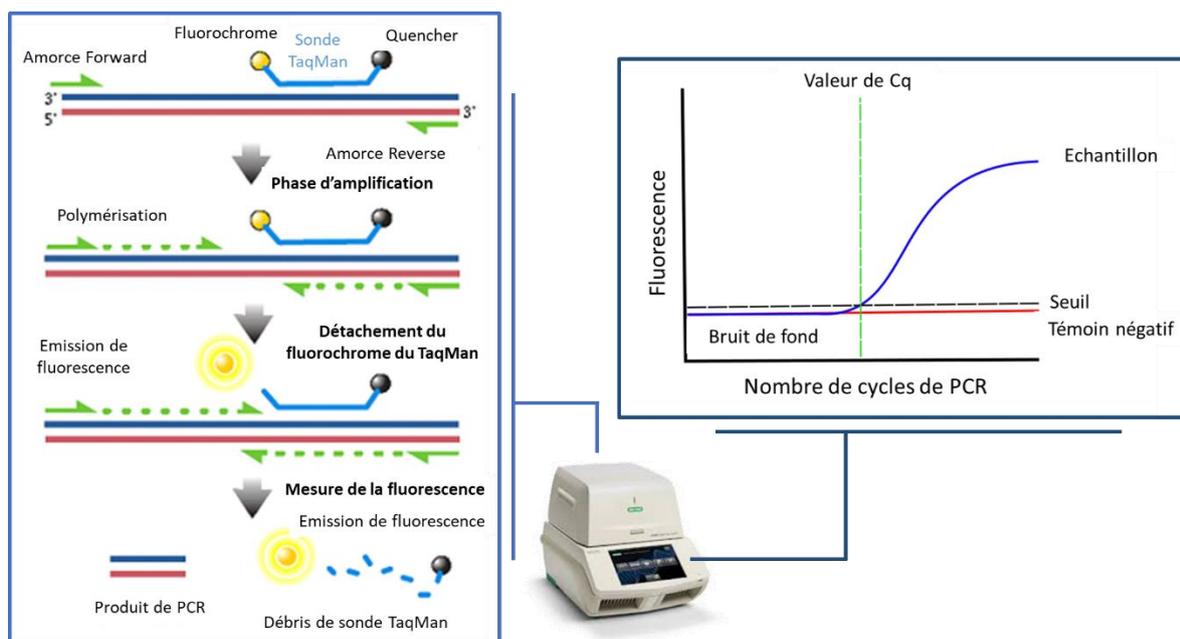


Figure 12 : Principe de la PCR quantitative de type TaqMan.

Les résultats sont présentés en cycles de quantification ou Cq (Figure 12). Le Cq correspond au cycle au cours duquel le signal d'émission de fluorescence devient significativement plus important que le bruit de fond de l'échantillon. Il est directement lié à la quantité d'ADN cible présent au début de la PCR : plus la quantité de matrice à amplifier est importante, plus le nombre de cycles requis pour dépasser le bruit de fond (Cq) sera faible. Afin de limiter l'action de certains inhibiteurs, les échantillons d'ADN issus des tissus de dreissène ont été analysés purs et dilués au 1/10^e. Les Cq obtenus sont comparés, pour un facteur de dilution de 10 l'efficacité optimale de PCR devrait être égale à 2 log(10) et donc Cq (1/10^e) – Cq (pure) = 3,3. Si cette formule se vérifie, on conserve le Cq de l'échantillon pur sinon on garde le Cq de l'échantillon dilué pour lequel la qPCR a été efficace grâce à la dilution des inhibiteurs.

Pour exprimer les résultats en nombre d'oocystes ou de kystes par échantillon, les Cq sont comparés à des gammes.

Tableau 6 : Amorces et sondes utilisées pour la détection des protozoaires dans les tissus de *D. polymorpha* avec la technique de qPCR Taqman en temps réel.

Organismes	Région ciblée	Séquence des amorces	Séquence des sondes	Références
<i>C. parvum/hominis</i>	Séquence spécifique 452-bp (AF188110)	5'-CGCTTCTCTAGCCTTTTCATGA-3' 5'-CTTCACGTGTGTTTGCCAAT-3'	6FAM- CCAATCACAGAATCAT CAGAATCGACT-BHQ1	Fontaine & Guillot, 2002
<i>G. duodenalis</i>	Petite sous-unité ribosomale (M54878)	5'-GACGGCTCAGGACAACGGTT-3' 5'-TTGCCAGCGGTGTCCG-3'	TxRd- CCCGCGGCGGTCCCTG CTAG-BHQ2	Verweij et al., 2003
<i>T. gondii</i>	Région répétée RH (AF487550.1)	5'-AGAGACACCGGAATGCGATCT-3' 5'-CCCTCTTCTCCACTCTTCAATTCT-3'	Cy3- ACGCTTTCCTCGTGGT GATGGCG-BHQ2	Lélu et al., 2011

4. Gammes

a. Tissus

Des tissus de dreissènes ont été artificiellement dopés avec différentes quantités de chaque protozoaire : 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1 000, 5 000, 10 000 et 50 000 parasites/moule. Un n= 5 a été réalisé pour les concentrations de 1 à 100 parasites/moule et un n= 3 a été fait pour les concentrations de 500 à 50 000 parasites/moule.

Les tissus sont broyés au Potter avec 1,5 mL de PBS et centrifugés pendant 5 min à 12 000 g. Le culot est dopé avec la quantité adéquate en protozoaires (dans environ 10 µL) et stocké une nuit à 4°C. Ensuite le protocole cité ci-dessus est repris : incubation avec de la trypsine, extraction d'ADN grâce au kit FastDNA® Spin Kit for Soil (MP Biomedicals™) et détection des protozoaires par la réalisation d'une qPCR TaqMan. Chaque qPCR a été réalisée en duplicat.

La gamme d'étalonnage est tracée avec le \log_{10} du nombre de parasites ajoutés au tissu lors du dopage en fonction du Cq obtenu après la qPCR (Figure 13). La droite d'étalonnage obtenue est définie par une équation de type : $y = ax + b$. Les Cq obtenus sur les échantillons et préalablement validés sont convertis en quantité d'oocystes ou de kystes : Q (dans les 5 µL d'échantillon testé), grâce à la formule suivante : $Q = 10^{\frac{Cq-b}{a}}$. Cette valeur est ensuite ajustée en fonction du facteur de dilution afin d'obtenir la quantité d'oocystes ou de kystes dans l'échantillon entier.

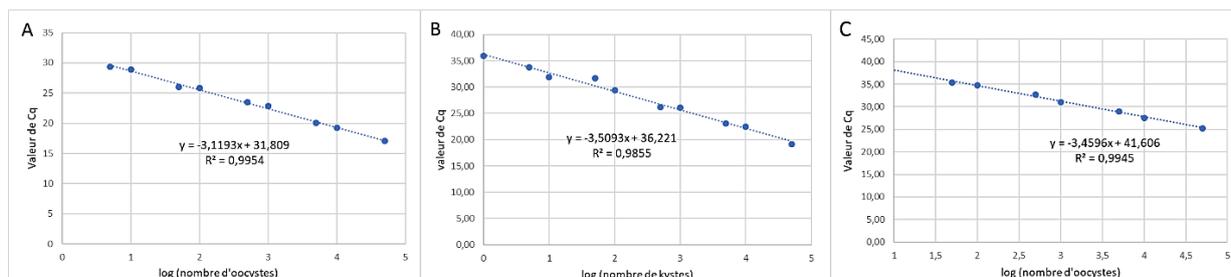


Figure 13 : Gammes d'étalonnage sur des tissus de dreissène pour la détection de *T. gondii* (A), *G. duodenalis* (B) et *C. parvum* (C) après extraction via le kit FastDNA™ for soil.

b. Hémolymphhe

Afin de réaliser une gamme de quantification dans l'hémolymphhe, pour chaque parasite, une suspension contenant $5 \cdot 10^5$ parasites est diluée en cascade afin d'obtenir les quantités suivantes (n= 3) : $5 \cdot 10^5$, $5 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^3$, $5 \cdot 10^2$, 50 et 5 parasites. L'ADN de ces suspensions est extrait grâce au kit InstaGene™ Matrix (Bio-rad™) comme expliqué ci-dessus (Chapitre II : II.2.) et repris dans un volume de 80 μ L. L'ADN présent dans chaque puits de qPCR (5 μ L d'échantillon) correspond donc à : 31 250 ; 3 125 ; 312,5 ; 31,25 ; 3,125 et 0,3125 oocystes ou kystes. Grâce aux valeurs de Cq relevées, le même principe de gamme d'étalonnage et les mêmes calculs qu'expliqués ci-dessus (cf. Chapitre II : II. 4. a.) sont réalisés afin de permettre l'expression des résultats en oocystes ou kystes par échantillon d'hémolymphhe (Figure 14).

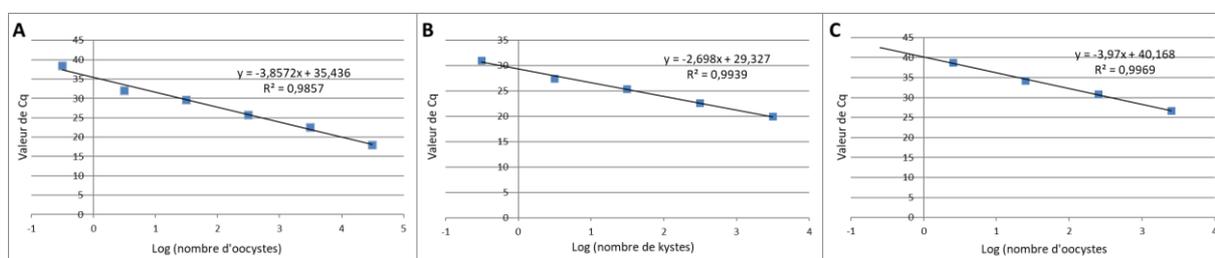


Figure 14 : Gammes d'étalonnage sur une suspension de parasites pour la détection de *T. gondii* (A), *G. duodenalis* (B) et *C. parvum* (C) après extraction via le kit InstaGene®.

c. Eau chargée en pseudo-fèces et en fèces

Des fèces et pseudo-fèces sont « récoltées » dans un Falcon® de 50 mL pendant 2 semaines. Pour cela, une dreissène est positionnée dans chaque Falcon®, les bouchons de ceux-ci ont préalablement été percés afin de permettre le passage d'un tube silicone (diamètre 4-6 mm) servant au bullage, ainsi l'oxygène se maintient à 100 %. Les moules zébrées sont nourries à raison de 20 000 cellules algales fraîches de *Chlorella pyrenoidosa* par jour durant 2 semaines dans de l'eau Cristaline (source Aurèle, France). Puis les dreissènes sont enlevées du tube Falcon® et les échantillons d'eau sont dopés avec 10, 100, 1 000, 5 000 ou 10 000 parasites (n= 3). Le surnageant obtenu suite à une centrifugation de 10 min à 3 000 g est éliminé. Le Falcon® est rincé deux fois grâce à une solution de SDS à 0,5 % afin de décrocher le maximum de fèces et de parasites. Le dernier culot obtenu (centrifugation de 10 min à 3 000 g) est congelé avant d'être extrait grâce au kit FastDNA™ for soil et d'être analysé en qPCR TaqMan. La qPCR a été réalisée en duplicat avec des échantillons purs à chaque fois.

Afin de permettre l'expression des résultats en quantité de parasites, le même principe de gamme d'étalonnage et les mêmes calculs qu'expliqués ci-dessus (Chapitre II : II. 4. a.) sont réalisés (Figure 15).

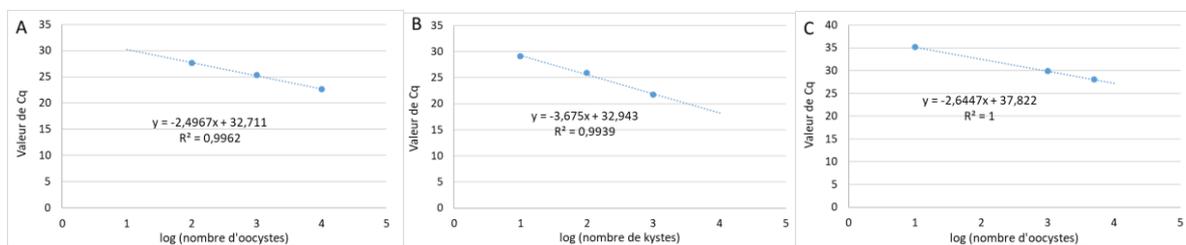


Figure 15 : Gamme d'étalonnage sur des (pseudo)fèces de dreissène pour la détection de *T. gondii* (A), *G. duodenalis* (B) et *C. parvum* (C) après extraction via le kit FastDNA™ for soil.

5. Limite de détection et de quantification

La limite de détection (LOD) correspond à la dernière quantité de protozoaires pour laquelle la détection a lieu dans encore 95 % des puits de qPCR. La limite de quantification (LOQ), quant à elle, correspond à la quantité de protozoaires la plus faible pour laquelle le coefficient de corrélation R^2 reste supérieur ou égal à 0,98. Les limites de l'extraction des protozoaires dans les tissus ont été obtenues grâce aux gammes présentées ci-dessus (cf. Chapitre II : II. 4.). Elles sont détaillées dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Valeurs de LOD et LOQ obtenues pour les protocoles de détection des protozoaires dans les différentes matrices.

		Hémolymphe	Tissus
<i>T. gondii</i>	LOD	10-50	1-5
	LOQ	100	5
<i>G. duodenalis</i>	LOD	5-10	<1
	LOQ	10	1
<i>C. parvum</i>	LOD	50-100	50-100
	LOQ	100	100

a. Tissus

Pour *T. gondii*, une réponse linéaire est observée pour les dopages de 50 000 à 5 oocystes par moule. Seul 1 puits sur les 10 (n= 5 en duplicat) ne montre aucune courbe d'amplification pour le dopage à un oocyste, donc la LOD se situe entre 1 et 5 oocystes par dreissène. La technique s'avère être quantitative à partir de 5 oocystes par individu. L'efficacité de la qPCR est de 109 %, ce qui laisse à penser que des inhibiteurs sont présents dans les puits de qPCR.

Concernant les kystes de *G. duodenalis*, des Cq ont pu être obtenus pour chaque puits avec un $R^2 > 0,98$, donc les LOD et LOQ sont égales à 1 kyste par dreissène. L'efficacité de la qPCR est de 92,7 % pour ce parasite. Pour *C. parvum*, 1 puits ne montre aucune courbe d'amplification pour 50 oocystes, et seulement 3 puits présentent des Cq pour les dopages à 10 et 5 oocystes par moule et enfin aucune courbe d'amplification n'a été observée à 1 oocyste par moule (n=5 en duplicat). La LOD est donc comprise entre 50 et 100 oocystes par dreissène et la méthode est quantitative à partir de 100 oocystes par échantillon. L'efficacité de qPCR est estimée à 91 %.

b. Hémolymphes

Les calculs des LOD et LOQ ont été réalisés par Loïc Durand lors de son post-doctorat sur l'ANR MOBIDIC en partenariat avec ACTALIA (Centre technique et d'expertise agroalimentaire). Pour *T. gondii*, une amplification a lieu dans seulement 83 % des puits pour le dopage à 10 oocystes, la LOD est donc située entre 10 et 50 oocystes par échantillon et la technique devient quantitative à partir de 100 oocystes. L'efficacité de la PCR est de 101 %. Concernant *G. duodenalis*, seuls 67 % des puits (4/6) ont une courbe d'amplification pour le dopage à 5 kystes. La LOD se situe entre 5 et 10 kystes par échantillon avec une LOQ égale à 10 kystes. L'efficacité de PCR est faible : 65 %. Enfin, pour *C. parvum*, 80 % des puits (5/6) ont une amplification pour les dopages à 50 et 10 oocystes par échantillon. La LOD se situe donc entre 50 et 100 oocystes avec une technique quantitative à partir de 100 oocystes par échantillon. L'efficacité de PCR est de 102 %.

III. Viabilité et infectiosité des parasites accumulés par la dreissène

Afin d'évaluer le potentiel de la dreissène en tant qu'outil épurateur des protozoaires, il est nécessaire d'évaluer la viabilité et l'infectiosité des parasites accumulés.

1. Préparation des échantillons

Les dreissènes ayant potentiellement bioaccumulé des protozoaires, sont prélevées, dilacérées au scalpel et déposées dans un sac Stomacher®. Afin d'extraire les parasites des tissus, 12 mL d'une solution Trypsine (1X, 0,9 % NaCl) sont ajoutés dans le sac Stomacher® et ensuite incubés pendant 1 h 30 à 37 °C sous agitation (90 rpm). Le filtrat est prélevé et placé dans un Falcon® de 50 mL et le sac Stomacher® est rincé avec 20 mL de NaCl 0,9 %. L'utilisation du sac Stomacher® permet de limiter la présence de morceaux de tissus dans l'homogénat et donc leur dépôt sur la culture cellulaire, ce qui pourrait entraîner un risque de décollement du tapis cellulaire. Le filtrat et l'eau de rinçage sont centrifugés à 2 500 g pendant 10 min, les culots sont rincés à deux reprises avec 20 mL de NaCl 0,9 %. Afin de purifier au mieux les parasites de l'échantillon, un gradient de Percoll à 30 % est réalisé suivi d'un traitement à la Javel 1,6 % pendant 10 min à 4°C. Les oocystes sont ensuite culottés à 5 000 g pendant 5 min, certains seront utilisés pour les essais en culture cellulaire et d'autres *in vivo*.

2. Culture cellulaire couplée à la qPCR (CC-qPCR)

Ce protocole a été mis en place dans le but de tendre vers un remplacement des modèles animaux traditionnellement utilisés, il est décrit par Rousseau *et al.* (2019). Ce protocole ne peut être utilisé que sur des parasites intracellulaires comme *T. gondii* et *C. parvum*. Pour les parasites extracellulaires comme *G. duodenalis* celui-ci n'est pas adapté car des lavages du milieu de culture sont nécessaires afin de limiter le développement de moisissures, or les kystes de *Giardia* seraient extraits du milieu durant ces lavages.

a. Dékystement des parasites et cultures cellulaires

i. *Toxoplasma gondii*

Afin de libérer les sporocystes contenus dans les oocystes sans impacter leur infectiosité, les culots sont repris dans 350 μL de milieu de culture IMDM et déposés dans des tubes « Lysing Matrix E » (MP Biomedicals™) contenant des billes. Ces tubes sont ensuite mis dans un Tissue Lyser (broyeur exerçant un mouvement vertical) à 33 Hz pendant 30s. Les cellules Véro utilisées sont cultivées à 37 °C avec 5 % de CO₂ dans du milieu IMDM supplémenté avec 5 % de sérum fœtal bovin, 100 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ de streptomycine, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de pénicilline. Le surnageant est ensuite déposé dans les puits de culture cellulaire contenant 100 000 cellules Véro en présence de 2 mL de milieu de culture afin de diluer la matrice. Pour la moitié des puits, la culture est stoppée après 3 h d'incubation à 37 °C afin de constituer le point T0, le milieu est changé dans les puits restants. Dans ceux-ci, les cultures seront arrêtées après 5 jours à 37 °C.

ii. *Cryptosporidium parvum*

Le culot est repris dans du milieu IMDM avec 1,5 % l'acide taurocholique, puis incubé à 37 °C pendant 1 h 30 afin de dékyster les oocystes. Les cellules HTC-8 utilisées sont cultivées dans les mêmes conditions qu'expliquées ci-dessus. La suspension de sporozoïtes est déposée dans des puits contenant 100 000 cellules HTC-8 après 3 h d'incubation à 37 °C et 5 % de CO₂, la culture de la moitié des puits est arrêtée afin de servir de T0. Le milieu est changé et remplacé par du milieu de co-culture (IMDM supplémenté avec : 25 mM de glucose, 25 mM de HEPES buffer, 35 mg.L⁻¹ d'acide ascorbique, 100 000 UI.L⁻¹ de pénicilline / streptomycine, 5 % sérum foetal bovin, (v/v) et 100 UI.L⁻¹ d'insuline) pour les autres puits. Le dernier arrêt de culture est réalisé après 48 h d'incubation à 37 °C avec 5 % de CO₂.

b. Extraction de l'ADN des cultures

L'ADN présent dans les cultures cellulaires est extrait grâce au kit QIAamp DNA Mini (Qiagen) en suivant les instructions du constructeur. Le tapis cellulaire est décollé grâce à 180 µL de tampon ATL et 20 µL de Protéinase K. Après les différentes étapes d'extraction du kit, un traitement DNase est réalisé grâce au kit Ambion turbo DNase (Life Technologies) afin de limiter la destruction des ADN extraits. Le même protocole de qPCR de type TaqMan que ci-dessus est réalisé. Chaque échantillon est analysé en duplicat.

Une diminution de Cq entre T0 et le temps d'arrêt de la culture (48h pour *C. parvum* ou 5 jours pour *T. gondii*) met en évidence une multiplication parasitaire qui signe la viabilité des oocystes de *C. parvum* et de *T. gondii*. La différence de signal en qPCR est calculée grâce à la formule suivante :

$$\Delta Cq = Cq_{T0} - Cq_{arrêt\ de\ culture}$$

3. Essais *in vivo*

Les essais *in vivo* sont considérés comme étant les protocoles de référence. Toutes ces expériences, impliquant des animaux, ont été agréées par le Comité d'éthique local, conformément à la réglementation du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

a. *Toxoplasma gondii*

Ce bioessai a été réalisé au CHU de Reims. Le culot de l'homogénat de dreissène contenant potentiellement des oocystes est remis en suspension dans 900 μL d'eau physiologique et 100 μL contenant 100 000 UI.L^{-1} de pénicilline / streptomycine et d'amoxicilline à 0,1 g.mL^{-1} puis inoculé, par voie intrapéritonéale, chez des souris Swiss Webster femelles (Laboratoire Charles River, Neuilly-sur-Seine, France) pesant de 20 à 30 g comme décrit par Villena et al. (2004). Chaque échantillon de moule zébrée prélevée est inoculé pur ou dilué au $1/10^{\text{e}}$, $1/100^{\text{e}}$ et $1/1000^{\text{e}}$ à deux souris. Des souris témoins, non infectées, sont inoculées avec 500 μL de PBS sans oocyste. Les souris sont hébergées dans des cages et nourries avec des granules et de l'eau *ad libitum*. A quatre semaines post-inoculation, la présence d'anticorps anti-toxoplasmiques est testée grâce à un test d'agglutination modifié (MAT). Pour déterminer la quantité d'oocystes infectieux, les résultats d'inoculation sont rapportés à la gamme de dilution standardisée (Tableau 8) réalisée avec une suspension d'oocystes ($n=4$). Pour chaque échantillon, on regarde la dernière dilution pour laquelle il y a une séroconversion des souris, cette valeur est rapportée à la gamme, et, la quantité d'oocystes donnée par la gamme est corrigée en fonction du facteur de dilution.

Tableau 8 : Gamme de dilution standardisée par inoculation d'une suspension d'oocystes chez des souris.

Dose d'oocystes inoculée	Souris mortes	Souris avec séroconversion
1 000	1/4	3/3
100	0/4	4/4
10	0/4	1/4
1	0/4	0/4
0,1	0/4	0/4
0	0/4	0/4

b. *Cryptosporidium parvum*

Ce bioessai a été réalisé au CHU de Rouen. Pour ce test, on utilise des souris MNRI âgées de cinq jours (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France). Chaque culot d'homogénat de moules contenant les oocystes est remis en suspension dans 600 µL de PBS et six souriceaux sont gavés oralement par 100 µL, comme décrit précédemment par Delaunay *et al.* (2000). Des souris témoins non infectées sont gavées avec 100 µL de PBS sans oocyste. Pour déterminer la quantité d'oocystes infectieux, les résultats d'inoculation ont été rapportés à une gamme de dilution standardisée allant de 10 à 1 000 oocystes dans 100 µL de PBS. Les souriceaux nouveau-nés sont euthanasiés 7 jours après l'inoculation. L'intestin grêle entier des souris est prélevé, ouvert longitudinalement, coupé en petits morceaux et homogénéisé individuellement pendant 30 secondes dans 1,5 mL d'eau déionisée. Deux cents microlitres d'échantillon sont analysés en cytométrie en flux par immunofluorescence.

Les échantillons (homogénats intestinaux ou oocystes purifiés utilisés comme contrôle) sont incubés pendant 30 min à 37 °C avec une dilution finale au 1/20^e de l'anticorps

monoclonal conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) dirigé contre un antigène de la paroi de *Cryptosporidium spp.* (Crypt-a-Glo, Waterborne Inc., Nouvelle-Orléans, Louisiane, États-Unis). L'analyse en cytométrie en flux par immunofluorescence est réalisée à l'aide du cytomètre en flux LSR FORTESSA (système d'immunocytométrie Becton Dickinson (BDIS), San José, CA, USA) sur 13,3 % de la totalité de l'intestin. La détection des oocystes de *C. parvum* est réalisée en utilisant les paramètres suivants : détecteur de dispersion de la lumière à angle direct (FSC ; E00), détecteur de dispersion de la lumière à angle latéral (SSC ; 304 V), détecteur de fluorescence verte (Filtre passe long de 670 nm ; 505 V). Le comptage absolu d'oocystes est réalisé à l'aide de billes fluorescentes uniformes calibrées en ce qui concerne la granularité et l'intensité de fluorescence (Fluorosphères/Flow-count™; Beckman Coulter, Fullerton, Californie, USA). Les résultats obtenus sur les homogénats de moule sont rapportés à une gamme (Tableau 9).

Tableau 9 : Gamme réalisée par gavage des souriceaux avec une suspension d'oocystes

Dose d'oocystes utilisée pour le gavage	Nombre d'oocystes moyen dans 10% de l'intestin des souriceaux
1 000	179
100	74
10	51
0	0

IV. Evaluation de l'état physiologique des dreissènes en effluent de sortie de station d'épuration

Divers paramètres physiologiques des dreissènes vont être évalués afin de s'assurer que celles-ci pourront :

- Survivre en effluent de STEP, qui constitue un milieu particulièrement hostile.
- Remplir leur rôle présumé d'outil épurateur des protozoaires en effluent.

1. Taux de clairance

Afin d'évaluer le potentiel épurateur des dreissènes vis-à-vis des protozoaires, il est nécessaire de s'assurer que celles-ci filtrent et ingèrent les particules contenues dans l'eau, et ce, même en effluent de STEP. Pour cela, un protocole permettant de mesurer le taux de clairance *in tubo* au laboratoire et sur le terrain a été mis au point durant la première année du projet (janvier 2017).

Les bouchons de tubes Falcon® 50 mL ont été percés afin de permettre le passage d'un tuyau en silicone (diamètre 4 à 6 mm) servant au bullage (Figure 16). La sortie du bulleur est positionnée au niveau de la graduation des 10 mL avec un « débit » d'une bulle par seconde, ainsi le taux d'oxygène au fond du tube se maintient à 100 % sans provoquer de remous, ce qui risquerait de provoquer la fermeture des valves de la dreissène. Dans chaque tube, une concentration de $1.10^6.mL^{-1}$ d'algues fraîches *Chlorella pyrenoidosa* est ajoutée. Une dreissène est délicatement déposée au fond de chaque Falcon®, sur son byssus afin de ne pas entraver son ouverture. Avant l'allumage des bulleurs, 1 mL est prélevé dans chaque tube, ce prélèvement constituera le T0. Les dreissènes sont laissées à filtrer pendant 90 min dans le

noir à la température d'exposition, 1 mL est prélevé dans chaque tube au T90. Les tests réalisés ont montré qu'un plateau de clairance était atteint vers 90 min.

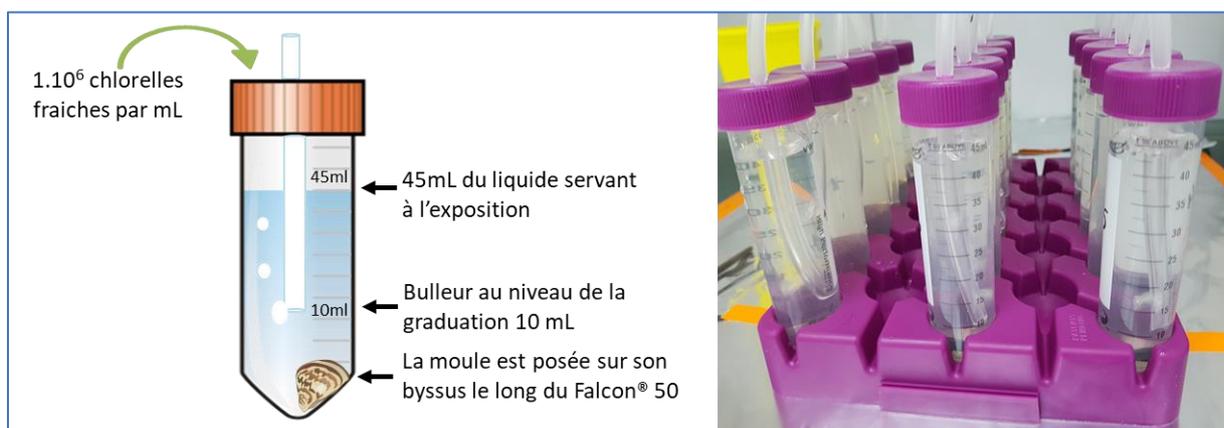


Figure 16 : Dispositif utilisé pour la mesure du taux de filtration.

Les chlorelles contenues dans chaque échantillon sont énumérées par un cytomètre en flux BD Accuri™ C6 (Accuri® Cytometers, Inc.) appartenant à la plateforme Mobicyte (URCA). Les échantillons sont vortexés avant chaque analyse, seuls 50 μL sont énumérés avec un flux ayant une vitesse de 35 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Les cellules algales sont quantifiées de manière absolue dans la région P1 (Figure 17), définie par la complexité des cellules (SSC) sur leur taille (FSC). Le taux de clairance est exprimé en pourcentage de cellules filtrées dans les 45 mL pendant 90 min, grâce à la formule suivante : $\frac{C_{T0} - C_{T90}}{C_{T0}} \times 100$ avec C = nombre d'évènements dans P1. Le nombre de dreissènes n'ayant pas filtré est également relevé.

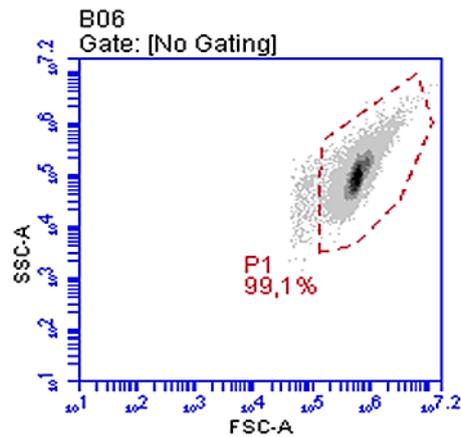


Figure 17 : Région P1 utilisée pour quantifier les chlorelles présentes dans l'échantillon.

2. Etat physiologique des hémocytes

Les hémocytes jouent un rôle dans les défenses immunitaires, la nutrition et la respiration. Afin d'évaluer leur état physiologique leur taux de mortalité, leur capacité de phagocytose et l'efficacité de phagocytose ont été mesurés. Les dreissènes prélevées ont été nourries avant la ponction d'hémolymphe au cours de la mesure de leur taux de filtration. Les prélèvements contiennent donc de nombreuses cellules algales de chlorelle, or les chlorelles ont une complexité et une taille similaires à celles des hémocytes ce qui peut entraîner une mauvaise interprétation des résultats. Afin de pallier à ce problème un protocole de triple marquage a été utilisé. En effet, les tests préliminaires ont montré que contrairement aux hémocytes, les chlorelles ne fixent pas la coloration par le Hoechst, ce qui nous a permis de différencier les deux types cellulaires.

a. Préparation des échantillons

L'hémolymphe est prélevée dans le muscle adducteur de la dreissène grâce à une seringue de 0,3 mL (29G x 1/2", 0,33 x 012 mm, Terumo® Myjector®) contenant au préalable 50 µL de milieu L15 -15 % (supplémenté en pénicilline, streptomycine et en L-glutamine) afin de limiter le stress subi par les hémocytes. Les prélèvements sont conservés sur glace et numérisés sur lame Kova® (Glasstic® Slide 10, Hycor). Le volume nécessaire pour obtenir 75 000 cellules est déposé dans les puits d'une microplaque (96-puits, fond rond, CellStar® Greiner Bio-One) puis complété jusqu'à 190 µL avec du milieu L15-15 % supplémenté.

Une solution de billes fluorescentes de 2 µm de diamètre (Fluoresbrite™ Carboxy YG 2.0 Micron Microsphères, Polysciences Inc.) est ajoutée à raison de 1,5 µL par puits. Les hémocytes sont incubés 4 h à 16 °C en présence des billes afin de leur laisser le temps de les phagocyter. Les cellules sont décollées des puits grâce à une solution de trypsine-EDTA 0,25X, colorées avec 0,5 mM d'Hoeschst pour les discriminer des chlorelles et 3 µL d'iodure de propidium à 10 mg.mL⁻¹ (IP). Seules les cellules sénescents ou mortes sont perméables à l'IP, ce qui permet d'évaluer le taux de mortalité des hémocytes.

b. Analyse en cytométrie en flux

Les échantillons sont analysés avec un cytomètre en flux de type BD Accuri™ C6 UV (Accuri® Cytometers, Inc.). Ils sont passés en « Autocollect » à une vitesse de 66 µL.min⁻¹, le run prend fin après 250 µL d'échantillons passés ou 10 000 événements comptés dans la région R1. Grâce au FL2-A (UV 427) les chlorelles, qui n'ont pas été marquées au Hoeschst, sont différenciées des hémocytes (Figure 18 A). La région R1 permet de cibler les hémocytes grâce à leur taille (FSC-A) et à leur complexité (SSC-A) (Figure 18 B). Afin d'évaluer le nombre

d'hémocytes morts ou sénescents, le pic dû à la coloration par l'IP est visible grâce au canal FL4-A (UV 780 nm) (Figure 18 C). La fluorescence des billes adsorbées ou phagocytées par les hémocytes est mise en évidence par le canal FL1-A (488-525 nm) (Figure 18 D). La capacité de phagocytose représente la capacité des hémocytes à reconnaître les particules étrangères, elle correspond au nombre d'hémocytes ayant adhéré/phagocyté trois billes et plus. L'efficacité de la phagocytose, quant à elle, correspond à la phagocytose effective, c'est donc le nombre d'hémocytes ayant phagocyté quatre billes et plus.

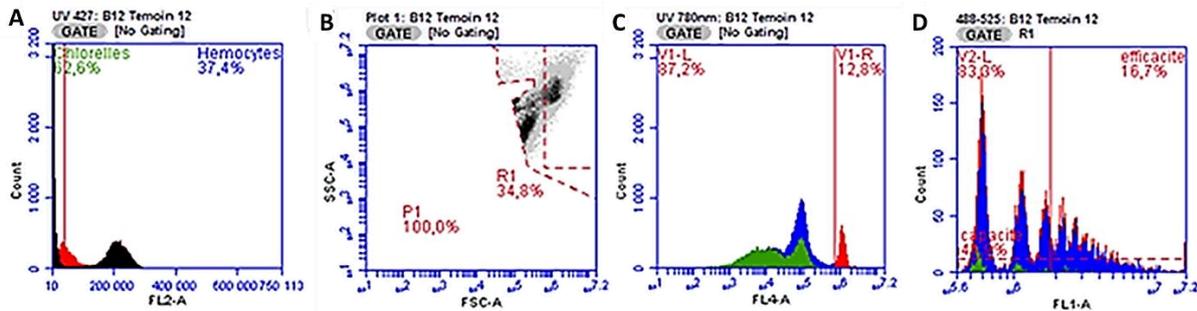


Figure 18 : Détails des analyses graphiques réalisées en cytométrie en flux.

3. Réserves énergétiques

Les taux de glycogène et de lipide de l'organisme constituent une part importante des réserves énergétiques. L'énergie joue un rôle dans le maintien et dans les défenses de celui-ci. Tous les dosages sont réalisés sur un spectromètre Cary® 50 Bio UV-visible (Varian). Les taux de lipide, de glycogène et de protéine sont convertis en mg par gramme de tissus disséqués.

a. Préparation des échantillons

Les tissus des dreissènes ont été entièrement prélevés, pesés et conservés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Après décongélation les échantillons sont conservés sur glace. Le tampon d'homogénéisation (tampon phosphate, 50 mM, pH 7,6) est ajouté à raison de $10\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$ de tissu. Les tissus sont broyés au broyeur Retsch® 400 MM grâce à 3 billes en inox (4 mm de diamètre, conservées au réfrigérateur) et à trois cycles d'une minute à 30 Hz. Les billes sont retirées de l'homogénat et $20\text{ }\mu\text{L}$ sont prélevés pour servir au dosage des protéines. Pour le dosage des lipides et du glycogène, $50\text{ }\mu\text{L}$ sont prélevés, auxquels on ajoute $25\text{ }\mu\text{l}$ de sulfate de sodium 2 % (m/v) et $675\text{ }\mu\text{L}$ de chloroforme/méthanol (1/2^e, v/v). L'homogénat est incubé pendant 1 h sur glace, puis centrifugé à $3\text{ }000\text{ g}$ pendant 10 min à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le surnageant est prélevé et stocké à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, il servira au dosage des lipides. Le culot est chauffé à $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans un bain sec durant 4 min puis stocké à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, il servira au dosage du glycogène.

b. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de Bradford (1976). Les échantillons sont laissés dans la glace pendant toute la durée de l'expérimentation et dilués au 1/4^e avec de l'eau distillée. Du réactif de Bradford est ajouté à $20\text{ }\mu\text{L}$ de la dilution à raison de 1 mL par échantillon avant d'être incubé 30 min à température ambiante dans l'obscurité. On mesure la densité optique immédiatement après à 595 nm.

Afin de soustraire la densité optique due au tampon phosphate, trois témoins sont réalisés avec $20\text{ }\mu\text{L}$ de tampon phosphate dilué au 1/4^e. Pour exprimer les résultats en $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ une gamme est réalisée grâce à des extraits de BSA de 0,125 ; 0,250 ; 0,500 ; 0,750 et $1\text{ }\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (n= 3).

c. Dosage des lipides

Le dosage des lipides est basé sur la réaction sulfo-phospho-vanillique, grâce à un protocole décrit par Cheng *et al.* (2011). Les 50 μL d'échantillon sont prélevés et transférés dans un tube en pyrex puis placés dans un bain sec à 95 °C pendant 10 min. De l'acide sulfurique à 95 % est ajouté à raison de 100 μL par tube puis incubé 10 min à 95 °C afin de solubiliser les lipides. Les tubes sont refroidis durant 5 min dans de l'eau glacée, 2,4 mL de solution de phospho-vanilline (1,2 g.L^{-1} de vanilline, 68 % d'acide ortho-phosphorique) sont ajoutés et placés 10 min à l'obscurité. En milieu acide, les lipides forment avec la vanilline un complexe ayant une coloration rose, dont la densité optique peut être mesurée à 525 nm.

Une gamme étalon est réalisée grâce à une solution d'huile d'olive à 0 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 et 1 g.L^{-1} diluée avec du chloroforme ($n=3$).

d. Dosage des glycogènes

Le dosage du glycogène est réalisé grâce à un protocole décrit par Van Handel (1965). Le culot est repris dans 400 μL d'eau d'ultrapure. Après 15 min, 3 billes en inox (4 mm) sont ajoutées, le tout est broyé 4 fois pendant 1 min à 30 Hz pour dissoudre le culot. Dans un tube en pyrex, 50 μL d'échantillon sont mélangés à 2,45 mL de réactif d'anthrone (1,41 g.L^{-1} d'anthrone, 60 % d'acide sulfurique). Les échantillons sont chauffés à 95 °C pendant 17 min puis refroidis dans un bain d'eau glacée pendant 5 min. L'acide sulfurique permet l'hydrolyse des polysides en oses afin que ceux-ci puissent réagir avec l'anthrone, la densité optique est mesurée à 630 nm.

Une gamme étalon est réalisée grâce à une solution de glucose à 0 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 et 1 g.L^{-1} ($n=3$).

4. Défenses antioxydantes et métabolisme cellulaire

Afin d'évaluer, chez les dreissènes, l'impact de l'exposition à un effluent de sortie de STEP sur leur mécanisme de défense contre le stress oxydant, les activités de la catalase, de la superoxyde dismutase (enzymes antioxydantes) et de la glutathion-S-transférase (enzyme de biotransformation) ont été mesurées. Les niveaux d'expression des gènes codant pour ces enzymes ont été mesurés, ainsi que le niveau d'expression de la glutathion peroxydase et également de l'ATP synthase et de la cytochrome-C-oxydase (tous deux impliqués dans le métabolisme cellulaire).

a. Activité des enzymes

Ces dosages ont été réalisés à l'INERIS (Institut national de l'environnement industriel et des risques) au sein de l'unité ECOT (ECOTOXICOLOGY *in vivo* & *in vitro*) appartenant à l'UMR-I 02 SEBIO. Les mélanges réactionnels ont été réalisés et déposés sur des microplaques grâce à un robot pipeteur Freedom EVO® (TECAN). Les densités optiques sont lues grâce à un lecteur de microplaque Hybrid Synergy™ H4 (BioTek™).

i. Préparation des échantillons

Les branchies et les glandes digestives sont prélevées sur le terrain, congelées dans de la carboglace puis stockées à -80 °C de retour au laboratoire. Du tampon phosphate (100 mM, pH 7,4) supplémenté avec 20 % de glycérol 2 µM de phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, afin de limiter la protéolyse) est ajouté dans chaque échantillon à raison de 250 µL. Les échantillons sont homogénéisés au broyeur FastPrep-24™ 5G (MP Biomedicals™) à 70 Hz durant 10s répétées deux fois grâce à une dizaine de billes en verre (Ø 1,4 mm). Après une

centrifugation à 10 000 g pendant 15 min à 4 °C, le surnageant est prélevé et congelé en attendant la suite du protocole. Les résultats sont exprimés en unité enzymatique par gramme de protéine pour chacune des enzymes étudiées.

ii. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé grâce à la méthode de Bradford (1976). La concentration en protéine permet de diluer chaque échantillon afin d'obtenir la même quantité de protéine.

iii. Dosage de l'activité de la Catalase

Le dosage de l'activité de la Catalase est réalisé selon une méthode décrite par Babo & Vasseur (1992). La Catalase permet la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et en oxygène (O_2), c'est cette réaction qui est utilisée pour mesurer l'activité. Dans une cuve en quartz, l'échantillon dilué ($0,6 \text{ g.L}^{-1}$ pour les branchies et $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ pour les glandes digestives) est mélangé v/v à une solution de peroxyde d'hydrogène (14 mM dans du tampon phosphate 100 mM). La densité optique est lue immédiatement en cinétique à 240 nm pendant 1 à 2 min à 25 °C. Les DO obtenues sont rapportées à une gamme standard de catalase d'érythrocytes bovins de 0 ; 6,25 ; 12,5 ; 25 et 50 U.mL^{-1} afin de calculer les résultats en U.mL^{-1} .

iv. Dosage de l'activité de la SuperOxyde Dismutase

La Superoxyde dismutase (SOD) est une oxydoreductase, la mesure de son activité utilise l'inhibition de l'oxydation du NADH par l'enzyme selon une méthode décrite par Paoletti *et al.* (1986). Moins il y a d'activité SOD plus le NADH s'oxyde, son oxydation est suivie en

spectrométrie et on considère que 50 % d'inhibition correspond à une unité d'enzyme. Pour cela, les échantillons sont dilués afin de contenir 0,5 g.L⁻¹ de protéine et mélangés à un mix réactionnel composé de tampon phosphate (100 mM pH 7,5), de 0,346 mM de β -NADH, 2,86 mM de EDTA et 0,144 mM de MnCl₂. La réaction débute grâce à l'ajout de 2-mercaptoéthanol dans les puits. Les DO sont lues en cinétique à 340 nm durant au moins 30 min. Le log(SOD) correspondant au 50 % d'inhibition est calculé grâce à une gamme standard de SOD à 0 ; 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 et 2 U.mL⁻¹ sachant que la concentration à 0 U.mL⁻¹ correspond à 100 % d'oxydation du β -NADH.

v. Dosage de l'activité Glutathion-S-Transférase

La Glutathion-S-transférase (GST) est une enzyme de phase II qui est responsable de la complexation avec le glutathion des métabolites réactifs générés par les cytochromes P450. Son activité est dosée grâce à la méthode décrite par Vandeputte *et al.* (1994) qui consiste à suivre la complexation du CDNB (Chloro dinitro benzene) et du GSH, catalysé par la GST, qui forme du thioéther et du HCL. Pour cela les échantillons sont dilués à 0,75 g.L⁻¹ et mélangés à un mix réactionnel contenant 1 mM de GSH et 1 mM de CDNB dilué dans du tampon phosphate (100 mM, pH 6,5). La formation de la SOD est suivie à 340 nm en cinétique durant une dizaine de minutes à 25 °C. Afin d'exprimer les résultats en U.mL⁻¹, les DO sont rapportées à une gamme standard de GST à 0 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 U.mL⁻¹.

b. Expression relative des gènes codant pour la SOD, la Catalase, la GST, la GPx, l'ATPs et la COX

i. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits des branchies ou des glandes digestives des dreissènes. Pour 50 à 100 mg de tissus utilisés, 1 mL de TriReagent® (MRC-Research, USA) est ajouté ainsi qu'une bille en inox (10 mm). L'échantillon est broyé au broyeur à billes Retsch® 400MM à 30 Hz durant 30s répétés deux fois. Du chloroforme est ajouté après 5 min de repos des échantillons à température ambiante à raison de 0,2 mL par mL de TriReagent®. Une centrifugation est réalisée à 12 000 g pendant 15 min à 4°C après 2 à 15 min de repos. L'extraction au phénol-chloroforme permet d'obtenir une phase rouge de phénol-chloroforme, une interphase contenant les ADNs et les protéines et enfin une phase aqueuse contenant les ARNs. Cette dernière est prélevée et complétée avec 0,5 mL d'isopropanol par mL de TriReagent®. Afin de culotter les ARNs, on réalise une centrifugation à 12 000 g pendant 8 min après 5 à 10 min de repos. Le culot est lavé grâce à 1 mL d'éthanol à 75 %, vortexé et re-culotté à 7 500 g pendant 5 min. Le culot d'ARN est séché à l'air libre avant d'être dissous dans 40 µL d'eau RNase-free.

L'intégrité des ARNs extraits est évaluée grâce à une révélation UV après électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % dans du TBE (tampon Tris Borate EDTA 0,5 %). Leur qualité est estimée en spectrométrie sur un spectromètre GenovaNano (Jenway) en mesurant les densités optiques à 260 nm et 280 nm : le ratio A_{260nm}/A_{280nm} indique la pureté de l'extraction ($1,7 < \text{acides nucléiques purs} < 2$). La concentration en ARN a été déterminée par la mesure à 260 nm ($1 \text{ U } DO_{260} = 40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \text{ ARN simple brin}$).

ii. Reverse transcription (RT)

La RT permet de transcrire les ARN totaux simple brin en ADN complémentaires double brin. Elle est réalisée grâce au kit Thermo Fisher® Verso SYBR Green 2-Step QRT-PCR ROX Mix, à partir de 400 ng d'ARN totaux, en suivant les instructions du fabricant et en utilisant une amorce Anchored oligo dT. La synthèse de l'ADNc se fait dans un thermocycleur (Eppendorf®) à 42 °C pendant 30 min, suivies d'un cycle à 95 °C pendant 2 min afin d'inactiver l'enzyme.

iii. PCR quantitative en temps réel

Les PCR quantitatives en temps réel ont été réalisées grâce au kit Thermo fisher® ABsolute blue QPCR SYBR Green ROX Mix avec 3 µL d'ADNc dilué au 1/10, selon le protocole décrit par (Kerambrun *et al.*, 2016b). Deux puits témoins sont réalisés avec 3 µL d'eau DNase-free afin de s'assurer de l'absence de contamination des mix utilisés. Sur chaque plaque, une dilution en cascade d'ADNc (1/10^e à 1/1 000^e) est faite afin de calculer l'efficacité de PCR (E). Le niveau d'expression de deux gènes de ménage est évalué : *act* (codant pour l'actine) et *s3* (codant pour la protéine ribosomale S3). Les amorces utilisées sont décrites dans le Tableau 10. Les concentrations en amorce ont été optimisées : 150 nM pour *s3*, 300 nM pour *act* et *cox* et 600 nM pour *cat*, *gst*, *gpx*, *sod* et *atp*. Les étapes de la qPCR, réalisées dans un thermocycleur CFX 96 (Bio-rad), commencent par une dénaturation initiale de 15 min à 95 °C puis 40 cycles d'amplification : 10s à 95 °C de dénaturation suivie 1 min à 60 °C de polymérisation. On réalise une courbe de fusion, entre 60 et 95 °C, afin de s'assurer qu'une seule séquence d'ADN a été amplifiée.

Tableau 10 : Amorces utilisées pour la PCR quantitative en temps réel

Cible	Abréviation NCBI	F primer	R primer	Taille (pb)
Actine	<i>act</i> AF0828 63	Act-F100 CCTCACCTCAAGTACCCCAT	Act-R100 TTGGCCTTTGGGTTGAGTG	153
Protéine ribosomale S3	<i>S3</i> AJ51768 7	S3-F100 CAGTGTGAGTCCCTGAGATA CAAG	S3-R100 AACTTCATGGACTTGGCTCTC TG	155
Catalase	<i>cat</i> EF68176 3	CAT-F100 ACGGCTATGGAAGCCACACG	CAT-R100 AGGTCGCGCATCGCATAGTC	157
Glutathion- S- Transferase	<i>gst</i> DG4599 93	GST-pi-F100 TCCGCTATATCTGCCTGGAC	GST-pi-R100 GCTCCTTCAGACCTGCTTTC	186
Glutathion Peroxidase	<i>gpx</i> EF19420 4	Se-GPx-F100 TAGACCGCCGCTCGGTAATC	Se-GPx-R100 CACTCCCAGCACCTGGAAAC	205
Superoxide Dismutase	<i>sod</i> AY3779 70	SOD-F100 GACAGCATGGCTTCCATGTG	SOD-R100 AGATTCTGGGCCAGTCAGAG	212
ATP synthase	<i>atp</i> Jq78113 5	ATPase_Dp_F100 GACTCCACCTCCCGTATCCT	ATPase_Dp_R100 TCCTCTGAAAGCTCGTCCAT	143
COX I	<i>cox</i> AAL555 13	COXI_Dp_For100 AGGCCCTGCGATAGATTTTT	COXI_Dp_Rev100 AAAGGGACCCGGTAAAATTG	132

Le SYBR® Green est un agent intercalant de l'ADN, il est peu fluorescent sous forme libre mais il produit un pic de fluorescence lorsqu'il est lié au double brin d'ADN. Ainsi, la fluorescence du milieu varie au cours d'un cycle PCR, elle augmente pendant la phase de polymérisation et diminue durant la phase de dénaturation de l'ADN (Figure 19). L'intensité de la fluorescence est mesurée à la fin de l'étape de polymérisation. Les résultats sont présentés en cycles de quantification ou Cq qui correspondent au cycle au cours duquel le signal d'émission de fluorescence devient significativement plus important que le bruit de fond de l'échantillon.

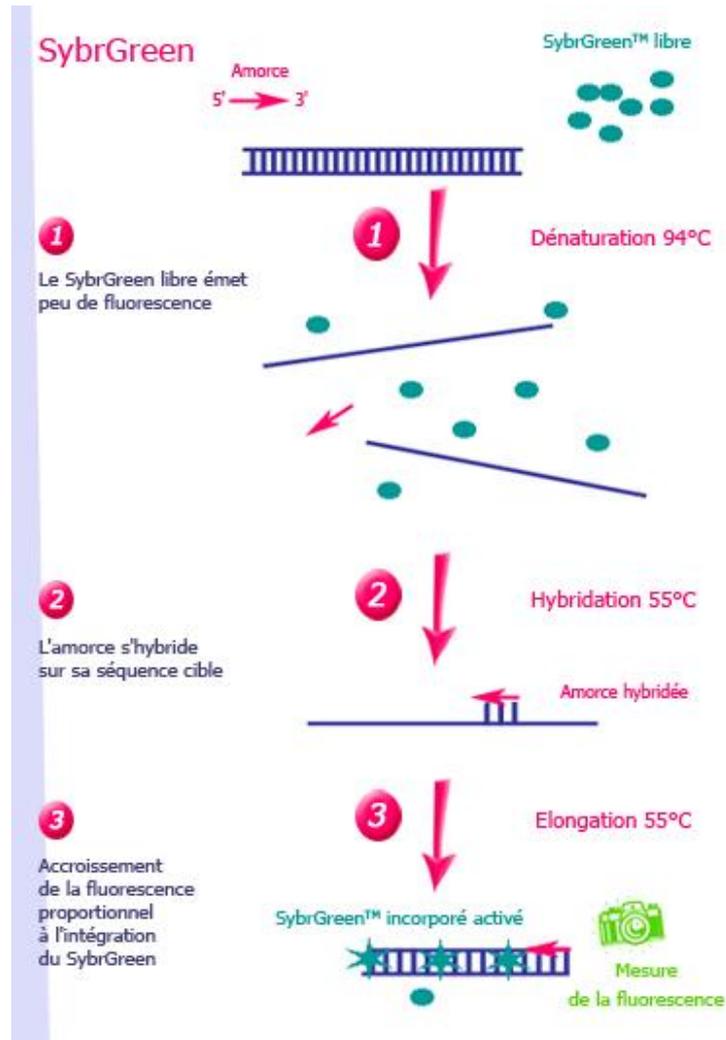


Figure 19 : Principe de la PCR quantitative en temps réel ⁵.

Le calcul de l'expression relative est basé sur la méthode $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Cette méthode prend en compte l'efficacité de la PCR. Une courbe standard basée sur une gamme de dilution d'ADN (1/10, 1/50, 1/100, 1/500 et 1/1000) est réalisée pour chaque couple d'amorces. Le tracé de cette courbe (Cq en fonction du logarithme de la quantité d'ADNc) permet de calculer l'efficacité (E) suivant la formule suivante : $E = (10^{\frac{1}{-a}}) - 1$ avec a le coefficient directeur de la courbe. Grâce à l'efficacité de la PCR, on peut ensuite calculer

⁵ <https://www.ilm.pf/PCRtempsreel/>

la quantité relative de molécules cibles (R) : $R = \frac{\text{Seuil de fluorescence}}{(1+E)^{Cq}}$. L'expression transcriptionnelle relative (ETR) est exprimée par rapport à la quantité relative de molécules cibles des gènes de ménage. Les gènes de ménage (*s3* et *act*) sont, à priori, toujours exprimés au même niveau chez les organismes, leur niveau d'expression sert de référence :

$$ETR = \frac{R \text{ du gène cible}}{\text{Moyenne géométrique des } R \text{ des gènes de ménage}}$$

V. Analyses statistiques et graphiques

Les graphiques et les analyses statistiques présentés ont tous été réalisés grâce au logiciel R (3.5.2 version). Le test de la normalité des données a été réalisé grâce au test Shapiro-Wilk et l'homogénéité a été testée par un test Levene. Ces données ne suivant jamais la loi paramétrique, un Kruskal–Wallis suivi d'un test post-hoc de Nemenyi ont été réalisés avec une erreur α inférieure à 5 %. Les graphiques ont été tracés à l'aide du package « ggplot2 ».

Chapitre III : Etude des cinétiques d'accumulation et de dépuration des protozoaires par la dreissène

Dans la littérature quelques études se sont intéressées à la bioaccumulation de *T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis* par la dreissène en conditions de laboratoire (Graczyk *et al.*, 2003, Palos Ladeiro *et al.*, 2014, 2015), cependant ces études sont souvent réalisées sur des temps d'exposition ou de dépuration relativement courts. Il existe donc un manque d'informations sur la cinétique d'accumulation des oocystes de *T. gondii*, de *C. parvum* et des kystes de *G. duodenalis* chez la dreissène. De même, aucune étude ne s'est intéressée à la cinétique de dépuration de la dreissène vis-à-vis de *T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis* sur plus de 14 jours. Ce chapitre a pour but d'améliorer les connaissances sur la dynamique d'accumulation et de dépuration de ces protozoaires par la moule *D. polymorpha*, afin d'évaluer le potentiel de la dreissène en tant qu'outil de bioremédiation en conditions contrôlées. Cependant, il était nécessaire de développer, au préalable, une technique plus sensible de détection des trois parasites accumulés dans les tissus des bivalves. Ceci a été rendu possible par l'axe 2 de l'ANR MOBIDIC qui a permis la mise en place d'un protocole d'extraction, décrit ci-dessus (cf. Chapitre II. II.), ayant des limites de détection très faibles. Cette expérimentation a bénéficié de l'aide précieuse de Manon Gicquel dans le cadre de son stage de BTS (Brevet de Technicien Supérieur).

I. Synthèse

L'expérimentation présentée ci-dessous s'intègre dans l'axe 3 du projet ANR MOBIDIC. *D. polymorpha* a été exposée en conditions semi-statiques à des oocystes de *T. gondii* ou de *C. parvum* ou à des kystes de *G. duodenalis*, à raison de 100 ; 1 000 ou 10 000 protozoaires par jour par moule. La cinétique d'accumulation est évaluée sur 21 jours durant lesquels dix moules zébrées sont prélevées à 0, 1, 2, 3, 7, 14 et 21 jours. Durant cette période d'exposition,

l'eau est entièrement renouvelée toutes les semaines et filtrée afin de dénombrer les parasites encore présents dans l'eau et les (pseudo)féces. Ces 21 jours sont suivis de 21 jours de dépuración en eau claire durant lesquels dix individus sont prélevés à 1, 2, 3, 7, 14 et 21 jours. Les moules sont nourries *ad libitum* durant les 42 jours de l'expérimentation à raison de 20 000 cellules de *Chlorella pyrenoidosa* et de *Scenedesmus obliquus* par jour et par bivalve. La quantité d'oocystes et de kystes bioaccumulés a été évaluée dans les tissus et dans l'hémolymphe des dreissènes.

La technique d'extraction utilisée est caractérisée par une limite de quantification (LOQ) en dessous de laquelle la quantité en protozoaires (Table 12), calculée grâce à la gamme, s'écarte de la quantité réelle. Afin de limiter le risque d'erreur de quantification, les résultats sont exprimés en deux temps : en pourcentage de détection — c'est-à-dire en pourcentage de moules détectées positives aux parasites — et en termes de quantité de protozoaires bioaccumulés, où seuls les individus ayant accumulé une quantité de parasites supérieure à la LOQ ont été représentés (Table 13).

Tout d'abord concernant les pourcentages de dreissènes positives aux protozoaires, pour *T. gondii* le nombre de moules positives est plus important vis-à-vis des tissus que de l'hémolymphe (Figure 20). Dans l'hémolymphe, *T. gondii* est détecté dès 7 jours d'exposition à la plus faible concentration d'exposition (100 oocystes/jour/moule) et dès 1 jour d'exposition pour les deux plus fortes concentrations (1 000 et 10 000 oocystes/jour/moule). Le nombre de moules positives augmente durant la période d'exposition, jusqu'à atteindre 100 % à 21 jours pour la plus forte concentration. Quelle que soit la concentration en protozoaires, l'hémolymphe des dreissènes reste positive à *T. gondii* jusqu'à 21 jours de dépuración. De plus, pour chaque temps de prélèvement, le nombre de moules positives

augmente avec la concentration en parasites dans les eaux. En effet, les 100 % d'échantillons positifs ne sont atteints que pour une concentration en *T. gondii* de $4,3e^6$ oocystes.L⁻¹ alors qu'un pourcentage d'hémolymphes positives compris entre 10 % et 30 % semble refléter des niveaux de contamination compris entre $1,1e^4$ et $1,1e^5$ oocystes.L⁻¹ et des pourcentages de 80 % à 90 % reflèteraient des contaminations comprises entre $2,8e^5$ et $4,3e^5$ oocystes.L⁻¹. Dans les tissus, *T. gondii* est détecté dès 1 jour d'exposition quelles que soient les conditions avec 100 % de tissus positifs dès 1 jour pour la plus forte concentration et dès 3 jours pour les deux plus faibles. Les oocystes sont encore détectés dans 100 % des tissus après 21 jours de dépuración pour les deux plus fortes concentrations et dans 90 % des tissus pour la concentration à 100 oocystes/jour/moule.

Concernant *G. duodenalis*, le pourcentage de dreissènes positives augmente également en fonction de la concentration de kystes dans les eaux pour chaque temps de prélèvement (Figure 21). Dans l'hémolymphe, *Giardia* est détecté dès 1 jour d'exposition, et ce, jusqu'à 21 jours de dépuración, quelle que soit la concentration étudiée. Le pourcentage d'hémolymphe positive augmente durant la période d'exposition et reste relativement stable durant toute la dépuración (variation de 20 %). Par exemple, des pourcentages d'hémolymphes positives compris entre 80 % et 100 % reflèteraient des concentrations de protozoaires comprises entre $5,3e^5$ et plus de $4,3e^6$ kystes.L⁻¹ alors que des pourcentages compris entre 10 % et 20 % représenteraient une contamination située entre $1,9e^3$ et $5,3e^4$ kystes.L⁻¹. Dans les tissus, les kystes sont détectés plus tardivement que dans l'hémolymphe : à partir de 7 jours (10 %), 2 jours (40 %) et 1 jour (50 %) d'exposition pour respectivement 100, 1 000 et 10 000 kystes/jour/moule. A chaque temps de prélèvement, le pourcentage de tissus positifs est en moyenne 10% plus faible que dans l'hémolymphe.

Peu de moules sont positives à *C. parvum*, que ce soit pour l'hémolymphe ou pour les tissus (Figure 22). Néanmoins, le pourcentage des échantillons d'hémolymphe positifs augmente entre 14 et 21 jours d'exposition pour les deux plus fortes concentrations et diminue en période de dépuration. Dans les tissus, le nombre d'échantillons positifs augmente légèrement avec la dose, sans dépasser les 50 %.

Les techniques d'extraction et de mesure utilisées ont permis une détection précoce de la contamination, dès 1 jour d'exposition, et ont mis en évidence une intégration de la contamination en protozoaires par les dreissènes, et ce, jusqu'à la fin de la phase de dépuration soit 21 jours. De plus, il semble que le pourcentage de détection permette l'évaluation d'un certain niveau de contamination : plus la concentration en protozoaires dans l'eau est forte, plus le nombre de dreissènes positives augmente.

Les résultats de quantification ont été présentés pour des conditions ayant au moins 50 % d'échantillons positifs et avec au moins 30 % de ces échantillons étant supérieurs à la LOQ. Ainsi, ont été présentés sous forme graphique les résultats relatifs au nombre d'oocystes de *T. gondii* bioaccumulés dans les tissus (pour 1 000 et 10 000 oocystes/jour/moule) et au nombre de kystes de *G. duodenalis* bioaccumulés dans l'hémolymphe (pour 10 000 kystes/jour/moule) et dans les tissus (pour 1 000 et 10 000 kystes/jour/moule). Le nombre de *T. gondii* accumulés dans les tissus ne varie pas significativement durant les expositions à 1 000 et 10 000 oocystes/jour/moule (Figure 23). Cependant, une tendance à la diminution est observée durant les 2 premiers jours de dépuration. Les oocystes restent accumulés dans les tissus jusqu'à 21 jours de dépuration en eau claire avec 7,7 oocystes (1/10 moule positive) et 38,2 (\pm 61,5) oocystes/moule pour une exposition à 1 000 et 10 000 oocystes/jour/moule respectivement. La quantité d'oocystes bioaccumulés n'est pas significativement différente

entre les deux concentrations et les différents temps de prélèvement. Le nombre de kystes de *Giardia* bioaccumulés dans l'hémolymphe (Figure 24) augmente significativement à 21 jours d'exposition ($218,7 \pm 143,3$) comparé à 3 jours ($15,8 \pm 0,6$) et 7 jours ($20,9 \pm 7,7$) d'exposition. Durant la période de dépuración, le nombre de kystes par échantillon d'hémolymphe diminue significativement après seulement 1 jour ($32,7 \pm 19,9$) et persiste jusqu'à 21 jours de dépuración ($36,1 \pm 13,6$). En parallèle, le nombre de kystes bioaccumulés dans les tissus (Figure 25) à 1 jour de dépuración augmente ($102,64 \pm 148,6$) par rapport à 21 jours d'exposition ($7,4 \pm 6,9$) pour la plus forte concentration (10 000 kystes/jour/moule). Ces résultats suggèrent qu'un transfert des kystes de l'hémolymphe vers les tissus pourrait avoir lieu durant les premières 24 h de dépuración. Une certaine quantité de kystes restent bioaccumulés jusqu'à 21 jours de dépuración avec $15,9 (\pm 25,4)$ et $25,6 (\pm 46,0)$ kystes par moule respectivement pour des concentrations d'exposition de 1 000 et 10 000 kystes/jour/moule. Aucune différence significative du nombre de kystes accumulés par moule n'a été observée entre les deux concentrations étudiées.

Ces résultats montrent une bioaccumulation précoce des oocystes de *T. gondii* et des kystes de *G. duodenalis* ainsi qu'une intégration de cette contamination dans les chairs des dreissènes durant les 21 jours de dépuración. Ce qui tend à montrer que la dreissène pourrait être un bon outil de détection et de zooextraction de ces contaminants.

Article : Use of the bivalve *Dreissena polymorpha* as a biomonitoring tool to reflect the protozoan load in freshwater bodies.

Water Research, 170. doi.org/10.1016/j.watres.2019.115297

Elodie Géba^{1,2}, Dominique Aubert², Loïc Durand³, Sandy Escotte², Stéphanie La Carbona³, Catherine Cazeaux³, Isabelle Bonnard¹, Fanny Bastien¹, Mélissa Palos Ladeiro¹, Jitender P. Dubey⁴, Isabelle Villena², Alain Geffard¹, Aurélie Bigot-Clivot^{1*}.

¹ UMR-I 02 SEBIO (Stress Environnementaux et BIOSurveillance des milieux aquatiques), Université de Reims Champagne Ardenne, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Campus Moulin de Housse, BP 1039, 51687 Reims cedex 2, France

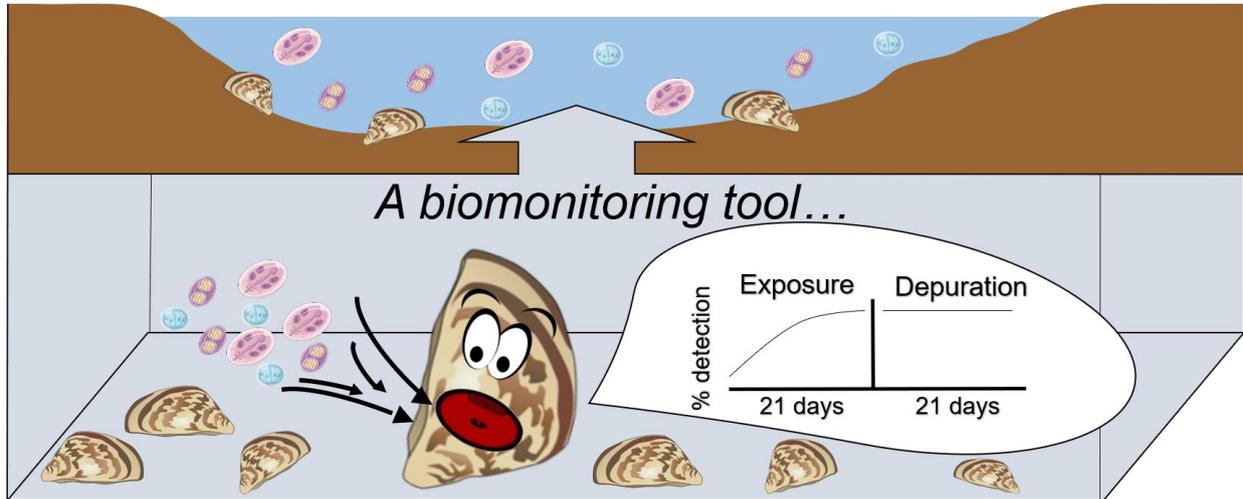
² EA7510, ESCAPE (Epidémiologie et Circulation des Parasites dans les Environnements) Université de Reims Champagne Ardenne, Faculté de Médecine, SFR Cap Santé Fed 4231, 51 Rue Cognacq Jay, 51096 Reims, France.

³ ACTALIA Food Safety Department, 310 Rue Popielujko, 50000 Saint-Lô, France

⁴ United States Department Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville Agricultural Research Center, Animal Parasitic Diseases Laboratory, building 1001, Beltsville, MD 20705 2350, USA

*Corresponding authors: aurelie.bigot@univ-reims.fr

Graphical abstract



Highlights

- LOD₉₅ and LOQ of protozoa by zebra mussel were defined.
- Methods are sensitive to detect *T. gondii* and *G. duodenalis* in zebra mussels.
- Percentage of positive mussels to protozoa could reflect protozoa loads in water.
- Quantification of protozoa in mussel is relevant to high protozoa level assessment.
- Zebra mussel can integrate past and present protozoa contamination.

Abstract:

Cryptosporidium parvum, *Toxoplasma gondii* and *Giardia duodenalis* are worldwide pathogenic protozoa recognized as major causal agents of waterborne disease outbreaks. To overcome the normative process (ISO 15553/2006) limitations of protozoa detection in aquatic systems, we propose to use the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*), a freshwater bivalve mollusc, as a tool for biomonitoring protozoan contamination. Mussels were exposed to three concentrations of *C. parvum* oocysts, *G. duodenalis* cysts or *T. gondii* oocysts for 21 days followed by 21 days of depuration in clear water. *D. polymorpha* accumulated protozoa in its tissues and haemolymph. Concerning *T. gondii* and *G. duodenalis*, the percentage of protozoa positive mussels reflected the contamination level in water bodies. As for *C. parvum* detection, oocysts did accumulate in mussel tissues and haemolymph, but in small quantities, and the limit of detection was high (between 50 and 100 oocysts). Low levels of *T. gondii* (1-5 oocysts /mussel) and *G. duodenalis* (less than 1 cyst/mussel) were quantified in *D. polymorpha* tissues. The ability of zebra mussels to reflect contamination by the three protozoa for weeks after the contamination event makes them a good integrative matrix for the biomonitoring of aquatic ecosystems.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; *Giardia duodenalis*; *Cryptosporidium parvum*; zebra mussel, biomonitoring

1. Introduction

Cryptosporidium parvum and *Giardia duodenalis* are the major causes of protozoal diarrhea in humans. Cryptosporidiosis and giardiasis can cause high morbidity and severe dehydration, and even death in immunocompromised hosts (Cacciò et al., 2005). *Toxoplasma gondii* is the causative agent of toxoplasmosis; it is usually asymptomatic in humans, but can cause severe clinical diseases in immunocompromised hosts or in case of congenital infection (Montoya and Liesenfeld, 2004). The minimal infectious doses for humans may be low: 9 to 1,042 *C. parvum* oocysts (Fayer et al., 2000) and down to 10 *G. duodenalis* cysts (Rendtorff, 1954). Although the minimal *T. gondii* infectious dose for humans has not been determined, based on animal experimentation one single oocyst can infect humans (Dubey, 2010). The environment including food and water are contaminated by these protozoa via human or animal faeces: felids faeces for *T. gondii* or mammals' faeces for *C. parvum* and *G. duodenalis*. The consumption of fruit and vegetables (McKerr et al., 2015; Pönka et al., 2009) and untreated water are known vectors of the foodborne transmission cycle (Moreno et al., 2018). The environmental stages, i.e. *Giardia* cysts, and *T. gondii* and *Cryptosporidium* oocysts (hereafter designated as protozoa throughout this paper) are extremely resistant and can persist in aquatic ecosystems for months (Bingham et al., 1979; Lindsay and Dubey, 2009; Olson et al., 1999). Protozoa have been found in several freshwater aquatic ecosystems such as surface water (Aubert and Villena, 2009; Bautista et al., 2018; Karanis et al., 2006; Vermeulen et al., 2019; Xiao et al., 2018) and underground water (Aubert and Villena, 2009; Hancock et al., 1998; Khaldi et al., 2011; Solo-Gabriele et al., 1998) but also in drinking water (Almeida et al., 2010; Aubert and Villena, 2009; Castro-Hermida et al., 2010; Cheun et al., 2013; Ware et al., 2010). Waterborne transmission to humans is the major cause of cryptosporidiosis (Putignani and Menichella, 2010) and giardiasis (Adam et al., 2016)

outbreaks. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. indeed caused 63% and 37% of waterborne parasitic disease outbreaks in Australia, North America and Europe between January 2011 and December 2016, respectively (Efstratiou et al., 2017), and *T. gondii* caused 2% between January 2004 and December 2010 (Baldursson and Karanis, 2011).

In the water matrix, *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts are currently detected by immunofluorescence (IF) in filtered water sample (ISO 15553/2006). However, this method is time consuming, expensive and requires expert image analysis, so it is unsuitable for rapid parasite detection. It requires a large volume of filtered water and a high parasite concentration in the samples. Furthermore, the filtration and the purification techniques can yield variable results depending on the water quality, the sampling period, the location and the water volume (Gallas-Lindemann et al., 2013; Karanis et al., 2006; Efstratiou et al., 2018). No normative process is available for *T. gondii* oocyst detection in water because, oocysts are present in limited numbers whereas *Giardia* and *Cryptosporidium* (oo)cysts are present in high numbers. This represents a limitation when applying a monitoring approach based on the water matrix and it seems necessary to investigate new methods for assessing water quality in terms of biological contamination.

Several studies have underlined the ability of filter-feeding species, such as bivalves, to accumulate and concentrate protozoa in their tissues (Aksoy et al., 2014; Arkush et al., 2003; Fayer et al., 2003; Gómez-Couso et al., 2004; Graczyk et al., 1999). Among bivalves, the freshwater zebra mussel – *Dreissena polymorpha* – has been particularly studied as a biomonitoring tool (Binelli et al., 2015). It is a sedentary species with a high filtration rate, (5 to 400 mL/h/mussel; Ackerman, 1999; Costa et al., 2008; Reeders et al., 1989). The ability of *D. polymorpha* to bioaccumulate *C. parvum*, *G. duodenalis* and *T. gondii* under laboratory conditions is well known (Graczyk et al., 2003; Palos Ladeiro et al., 2015, 2014). A few studies

have already used this bivalve to recover and concentrate environmental *C. parvum* (Graczyk et al., 2008, 2004; Lucy et al., 2010, 2008), *G. duodenalis* (Graczyk et al., 2008, 2004; Lucy et al., 2010, 2008) and *T. gondii* (Kerambrun et al., 2016). Using attached filter-feeding organisms allows for a representative measurement of protozoan contamination of the mussels living in water bodies and limits the variability of measurements by integrating temporal contamination. In addition, such a tool makes it possible to assess water contamination by *T. gondii*, *G. duodenalis* and *C. parvum* from only one sample. However, bivalves are a complex matrix that render measurements difficult, it is therefore necessary to determine the limit of detection and the limit of quantification of the method.

Before proposing *D. polymorpha* as a tool for biomonitoring protozoa, it is necessary to determine whether the parasite loads measured in zebra mussels are relevant to the water contamination levels. This study aimed to define for the first time the kinetics of *C. parvum*, *G. duodenalis* and *T. gondii* accumulation and depuration by *D. polymorpha* under control conditions, so as to propose recommendations for using *D. polymorpha* as a matrix to monitor the quality of watercourses. For this purpose, zebra mussels were exposed to three doses of these protozoa for 21 days. To characterize the integration of protozoa contamination by zebra mussels over time, the exposure period was followed by 21 days of depuration in clear water. Protozoa levels were measured in whole tissue and in the haemolymph because haemolymph collection can be considered as a nonlethal technique (Gustafson et al., 2005; McCartney and Wilbur, 2007) and the haemolymph bioaccumulates protozoa (Graczyk et al., 2004; Palos Ladeiro et al., 2015). In order to facilitate the use of zebra mussels as a biomonitoring tool, the three protozoa were detected by a molecular technique, and the same protocol of DNA extraction was used.

2. Materials and methods

a. Mussels and protozoan origins

Zebra mussels, *D. polymorpha*, were collected at about 5 m depth in Port de Nuisement (N 48°36'10.0728" E 4°44'57.408") at the Lac-du-Der-Chantecoq (Marne, France) in October 2015. Then mussels measuring 20 ± 2 mm were kept acclimating in the dark in aerated Cristaline® (Aurèle, France) drinking water at 12 °C during two weeks with two water changes per week to ensure that they were protozoan-free on the first exposure day. Mussels were fed *ad libitum* twice a week with 20,000 cells of two microalgae species, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* per mussel per day.

T. gondii oocysts of the strain ME49 genotype II were obtained as described previously (Dubey, 2010). Oocysts were sporulated in aqueous 2 % sulfuric acid and stored at 4°C until use. *C. parvum* oocysts and *G. duodenalis* cysts preparations were purchased from Waterborne™, Inc. (New Orleans, LA, USA) and kept at 4 °C until use.

b. Exposure conditions

Before exposure, zebra mussels were randomly divided into 10 groups of 195 mussels, 1 control group and 9 exposed groups. Each group was placed in a tank containing 10 L of Cristaline® (Aurèle, France) water. Zebra mussels were exposed to 0; 100; 1,000 or 10,000 protozoa per bivalve and per day for 21 days, which represent a protozoa concentration (protozoa.L⁻¹) of respectively $1.9e^3$, $1.9e^4$ and $1.9e^5$ at 1 days; $3.6e^3$, $3.6e^4$ and $3.6e^5$ at 2 days; $5.3e^3$, $5.3e^4$ and $5.3e^5$ at 3 days; $1.1e^4$, $1.1e^5$ and $1.1e^6$ at 7 days; $2.8e^4$, $2.8e^5$ and $2.8e^6$ at 14 days and $4.3e^4$, $4.3e^5$ and $4.3e^6$ at 21 days. Then, the bivalves were transferred into new tanks filled with clean water for the depuration period. During the exposure and the

depuration periods, 10 bivalves per condition were sampled at 1, 2, 3, 7, 14, and 21 days. Haemolymph was obtained from the posterior adductor muscle and whole tissues were collected, then stored at -80°C until testing.

Tank water was changed once a week and the volume of water was adapted to the number of remaining bivalves. The protozoa were spiked again after water changes to maintain the initial oocyst concentrations in the tanks. Mussels were still fed *ad libitum* twice a week with *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*.

c. DNA extraction from different matrices

Bivalve tissues were ground and digested by 1X Trypsin during 1h at 37 °C under 90 rpm agitation. Tissue homogenate was centrifuged at 5,000 g for 5min and the pellet was stored at -20 °C until DNA extraction. DNA was extracted using the FastDNA® SPIN Kit for Soil according to manufacturer's instruction (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France). This kit has been tested in our laboratory and appeared to be the most effective extraction method for the three protozoa in zebra mussel tissues (data not shown).

DNA was extracted from haemolymph samples using an optimized protocol based on Palos Ladeiro et al., (2014). Haemolymph were centrifuged at 5,000g for 5 min. Pellets with 100µL of supernatant were submitted to heat shock cycles consisting in freezing at -80 °C for 5 min and thawing at 95 °C for 4 min. These heat shock cycles were repeated six times to break the wall and to access protozoan DNA. Then, the samples were subjected to ultrasonic treatment at 37 Hz (Ultrasonics 88155) for 1 min for *C. parvum* and *G. duodenalis* samples and 10 min for *T. gondii* samples. DNA was extracted from the pellets using an InstaGene™ Matrix kit per manufacturer's instructions (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

d. TaqMan qPCR

DNA parasite detection was carried out by TaqMan real-time qPCR in a CFX96 TOUCH™ thermocycler (Bio-Rad, USA) according to (Palos Ladeiro et al., 2014). Primers, probes sequences and GenBank accession numbers are summarised in Table 11. qPCR amplifications were performed as specified by the manufacturer's instructions in the following mixtures: 5 µL of extracted DNA sample were added to 20 µL of mix containing 2X iQ® supermix (Bio-Rad), 1 µL of BSA (10 mg/mL; SIGMA, France), 400 nM of each primers and 200 nM of probe for *T. gondii* and *G. duodenalis* or 100 nM for *C. parvum*. A no-template control was added. DNA polymerase was activated after an initial 3 min denaturation step at 95 °C. Then, the samples were submitted to 45 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. The Cq values were collected and correspond to the cycle number at which the fluorescence exceeds a fixed threshold and allows the quantification of the amount of the target DNA. Each sample was analyzed in duplicate and to limit the inhibition effect, non-diluted and ten-fold diluted (10^{-1}) DNA extracts were analysed. In case of inhibition, non-diluted Cq values were extrapolated from the Cq of the $1/10^{\text{th}}$ dilution considering a Cq difference of 3.3 for a dilution factor equal to 10 and an optimal PCR efficacy equal to 2 ($\log_2(10)$). To determine the protozoan (oo)cyst number in the samples, reference curves were established using a serial dilution ranging from 1 to 50,000 (oo)cysts by inoculated to tissues or in water suspensions. For tissues, experiments were performed in quintuplicates for dilutions ranging from 1 to 100 protozoa (distributed in five points) and in triplicates for dilutions ranging from 500 to 50,000 (oo)cysts (also distributed in five points). For haemolymph, samples were spiked in triplicates with dilutions ranging from 10 to 10,000 (oo)cysts (distributed in six dilutions points). LOQ (Limit Of Quantification) was determined as the lowest number of parasites for which a linear relationship is observed between Cq and number of parasites ($r^2 > 0.98$) and LOD₉₅ (Limit Of

Detection) was defined as the lowest number of parasites for which 95% of the positive samples are detected).

Table 11 : Primers and probes used for protozoan detection in water samples and in tissues and haemolymph of *D. polymorpha* by TaqMan real time qPCR

Target	GenBank accession number	Primer sequences	Probe sequences	References
Specific 452-bp <i>C. parvum/hominis</i> sequence	AF188110	5'-GCTTCTCTAGCCTTTTCATGA-3' 5'-CTTACGTGTGTTTGCCAAT-3'	6FAM-CCAATCACAGAATCATCAGAATCGACTBHQ1	Fontaine and Guillot, (2002)
Small subunit Ribosomal <i>G. duodenalis</i> RNA gene sequence	M54878	5'-GACGGCTCAGGACAACGGTT-3' 5'-TTG CCA GCG GTG TCC G-3'	TxRd-CCCGCGGCGGTCCCTGCTAG-BHQ2	Verweij et al., (2003)
<i>T. gondii</i> strain RH repeat region	AF48755 0.1	5'-AGAGACACCGGAATGCGATCT-3' 5'-CCCTCTTCTCCACTCTTCAATTCT-3'	Cy3-ACGCTTTCCTCGTGGTGATG GCG-BHQ2	Lélu et al., (2011)

e. Statistical analysis

All statistical analyses were performed with R software (3.5.2 version). As physiological data did not comply with the parametric assumption of normality (Shapiro-Wilk tests) and homogeneity of variance (Levene tests), nonparametric tests were used. Kruskal–Wallis test and Nemenyi test for post hoc pairwise comparisons were used ($\alpha \leq 0.05$). Only data above the LOQ were presented in the graphs.

3. Results

a. Determination of LOD₉₅ and LOQ

For tissues samples, the performances of the method were determined using spiked tissues with 1 to 50,000 (oo)cysts (Table 12). For *T. gondii* oocysts, a linear response was observed from 50,000 to 5 oocysts. No amplification curve was obtained in 1 replicate corresponding to 1 oocyst. The slope coefficient was -3.1193 with a squared correlation coefficient (r^2) of 0.99. So, the LOD₉₅ was between one and five oocysts and the LOQ was five oocysts in whole tissues. For *G. duodenalis* cysts, LOD₉₅ was less than 1 cyst and LOQ was 1 cyst. The slope coefficient was -3.5093 with a squared correlation coefficient (r^2) of 0.99. For *C. parvum*, the LOD₉₅ was between 50 and 100 oocysts and LOQ was 100 oocysts, an amplification curve was obtained in only three replicates corresponding to 10 or 5 oocysts. The slope coefficient was -3.5673 with a squared correlation coefficient (r^2) of 0.96.

For haemolymph, samples were spiked in triplicates with dilutions ranging from 10 to 10,000 (oo)cysts (Table 12). For *T. gondii*, the slope coefficient was -3.2996 with a squared correlation coefficient (r^2) of 0.99. The LOD₉₅ was between 10 and 50 oocysts and the LOQ was 100 oocysts. For *G. duodenalis*, the slope coefficient was -4.591 with a squared correlation coefficient (r^2) of 0.99. The LOD₉₅ was between 5 and 10 cysts and the LOQ was 10 cysts in haemolymph samples. Lastly, for *C. parvum*, the LOD₉₅ was between 50 and 100 oocysts and the LOQ was 100 oocysts. The slope coefficient was -3.2776 with a squared correlation coefficient (r^2) of 0.98.

Chapitre III : Etude des cinétiques d'accumulation et de dépuration des protozoaires par la dreissène

Table 12 : Summary of LOD₉₅ and LOQ of *T. gondii*, *G. duodenalis* and *C. parvum* in *D. polymorpha* haemolymph and tissues. LOD₉₅ and LOQ are expressed in (oo)cyst number per bivalve.

		Haemolymph	Tissues
<i>T. gondii</i>	LOD ₉₅	10-50	1-5
	LOQ	100	5
<i>G. duodenalis</i>	LOD ₉₅	5-10	<1
	LOQ	10	1
<i>C. parvum</i>	LOD ₉₅	50-100	50-100
	LOQ	100	100

b. Protozoan levels in bivalves

In control samples, no protozoa were detected in haemolymph. In whole tissues 4.2 % (5/120) were positive to *T. gondii* oocysts with less than 1 oocyst per mussel. And, no *C. parvum* oocysts and *G. duodenalis* cysts were detected in control tissue samples.

i. Protozoan detection

The number of positive mussels to *T. gondii* was higher in tissues than in haemolymph (Figure 20). In haemolymph samples, at 100 oocysts/mussel/day condition zebra mussels were positive to *T. gondii* from seven days of exposure to the 21 days of depuration (Figure 20 A). But at higher concentrations, oocysts were detected in haemolymph from 1 day of exposure ($\geq 10\%$ of positive samples) and the number of positives mussels increased until 21 days of exposure reaching 100 % for the highest dose. In depuration period, irrespective of the exposition dose, mussel remained positive to *T. gondii* until 21 days. For each sampling time, percentage of positive mussels increased with protozoa concentration in water. In zebra mussel tissues, *T. gondii* oocysts were always detected from 1 day of exposure to 21 days of depuration at all tested oocyst concentrations (Figure 20 B). During the accumulation phase, 100 % of samples were positive from 1 day of exposure at the highest concentration and from

3 days for the two-lower concentrations (100 and 1,000 oocysts/mussel/day). During depuration, 100 % of mussels remained positive at the two highest doses while the percentage tended to decrease at 100 oocysts/mussel/day.

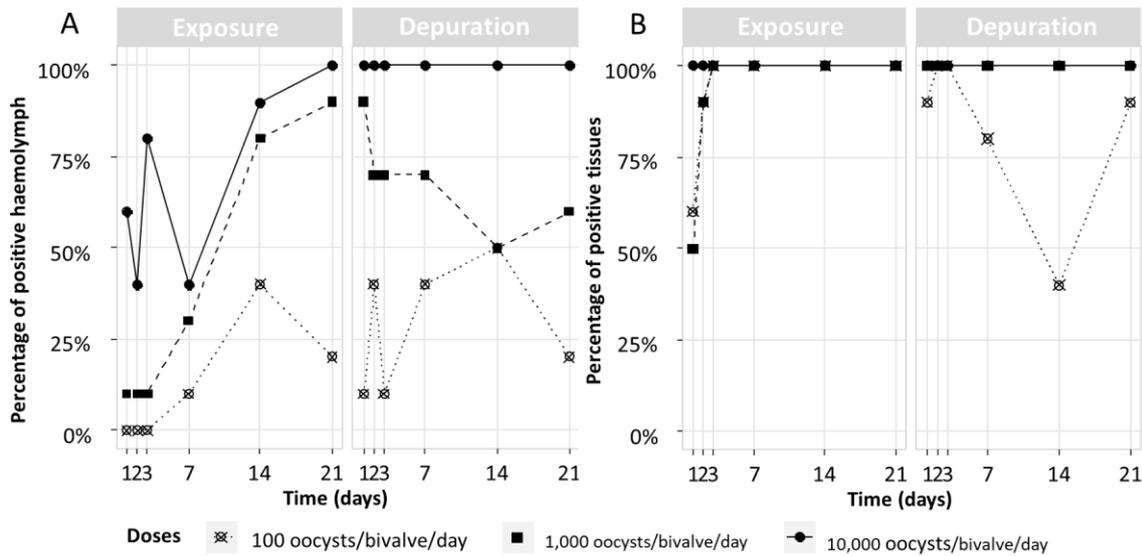


Figure 20 : Percentage of positive samples (n=10) to *T. gondii* oocysts per condition in bivalve haemolymph (A) and tissues (B).

Percentage of positive mussels to *Giardia duodenalis* cysts increased with protozoa concentration in water for each sampling time in haemolymph and tissues (Figure 21). In haemolymph, *Giardia duodenalis* cysts were detected from 1 day of exposure to 21 days of depuration (Figure 21 A). Percentage of positive haemolymph increased during the exposure period – reaching more than 50 % of positive haemolymph at the two lowest concentrations and 100 % at the highest concentration – and remained relatively steady during the depuration period, only varying by 20 %. In tissue (Figure 21 B), cysts were detected later than in haemolymph: at 7 days (10 %), 2 days (40 %) or 1 day (50 %) of exposure at 100; 1,000 and 10,000 cysts/mussel/day concentrations respectively. Percentage of positive tissues increased

until 21 days of exposure and cysts remained detected in mussel tissues after 21 days of depuration.

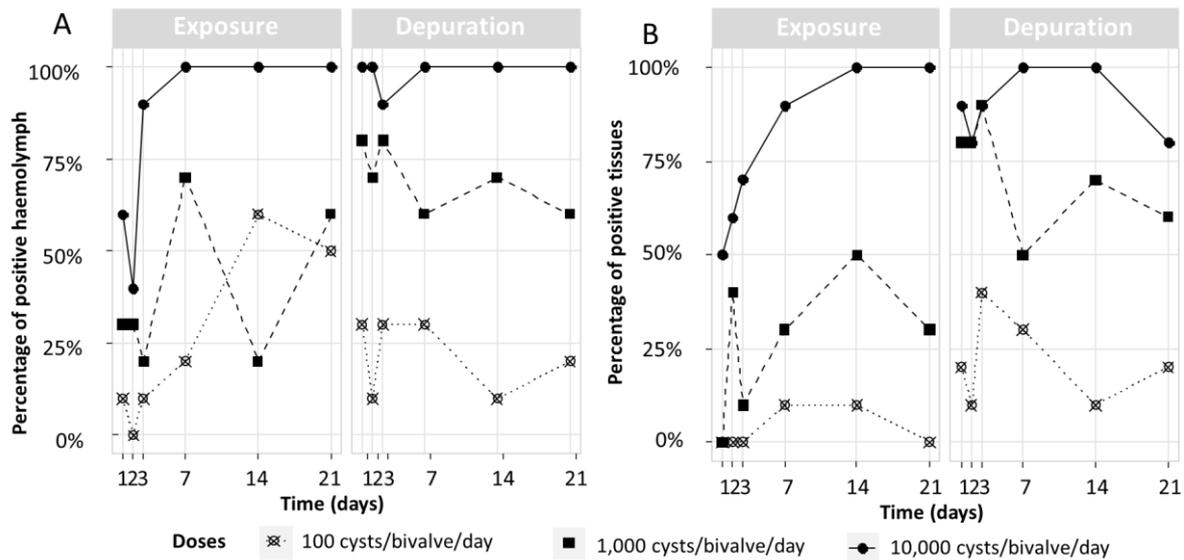


Figure 21 : Percentage of positive samples (n=10) to *G. duodenalis* cysts per condition in bivalve haemolymph (A) and tissues (B).

Few positive zebra mussel haemolymphs and tissues to *C. parvum* were detected (Figure 22). In haemolymph, detection percentage increased between 14 and 21 days of exposure for the two highest concentrations and decreased in depuration period. In tissues, detection increased slightly with concentration for each sampling time. No clear trend was observed and percentage of positive mussel did not exceed 50 % in haemolymph or tissues.

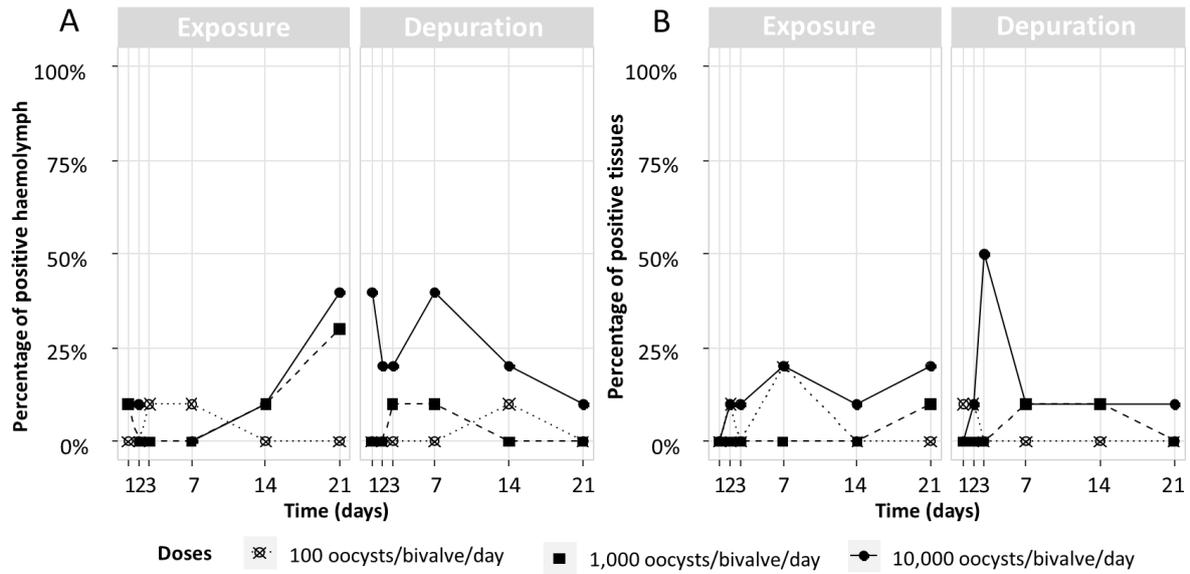


Figure 22 : Percentage of positive samples (n=10) to *C. parvum* oocysts per condition in bivalve haemolymph (A) and tissues (B).

ii. Protozoan quantification

Not all positive samples were quantifiable, the number of samples above the LOQ is summarized in Table 13. Quantification results were presented in graphs if, by condition, at least 50 % of the samples were greater than the LOD₉₅, and if at least 30 % of those detected samples were greater than the LOQ. Thus, were presented in graphs number of *T. gondii* bioaccumulated in tissues (at 1,000 and 10,000 oocysts/bivalve/days, Figure 23) and number of *G. duodenalis* bioaccumulated in haemolymph (at 10,000 cysts/bivalve/day, Figure 24) and in tissues (at 1,000 and 10,000 cysts/bivalve/day, Figure 25).

Table 13 : Number of quantifiable haemolymph and tissue samples for each exposure condition.

	Number of (oo)cysts per bivalve per day added	Number of quantifiable samples per positive samples	
		Haemolymph	Tissues
<i>T. gondii</i>	100	0/24	6/105
	1,000	0/64	35/114
	10,000	9/101	102/120
<i>G. duodenalis</i>	100	2/28	8/15
	1,000	11/65	39/60
	10,000	70/108	86/101
<i>C. parvum</i>	100	1/3	4/4
	1,000	1/7	3/3
	10,000	3/28	16/16

During the exposure period, the number of bioaccumulated *T. gondii* oocysts in tissues (Figure 23) did not significantly vary until 21 days with $10.2 (\pm 3.8)$ and $166.4 (\pm 231.4)$ oocysts respectively at 1,000 and 10,000 oocysts/mussel/day conditions. Then, a non-significant decrease was observed at 3 days of depuration with $3.1 (\pm 2.6)$ and $18.2 (\pm 10.8)$ oocysts respectively at 1,000 and 10,000 oocysts/mussel/day concentrations. Oocysts stilled accumulated in mussel tissues even after 21 days of depuration with respectively 7.7 (only one positive sample) and $38.2 (\pm 61.5)$ oocysts. Quantity of bioaccumulated oocysts was not significantly different between the two concentrations, all sampling times combined.

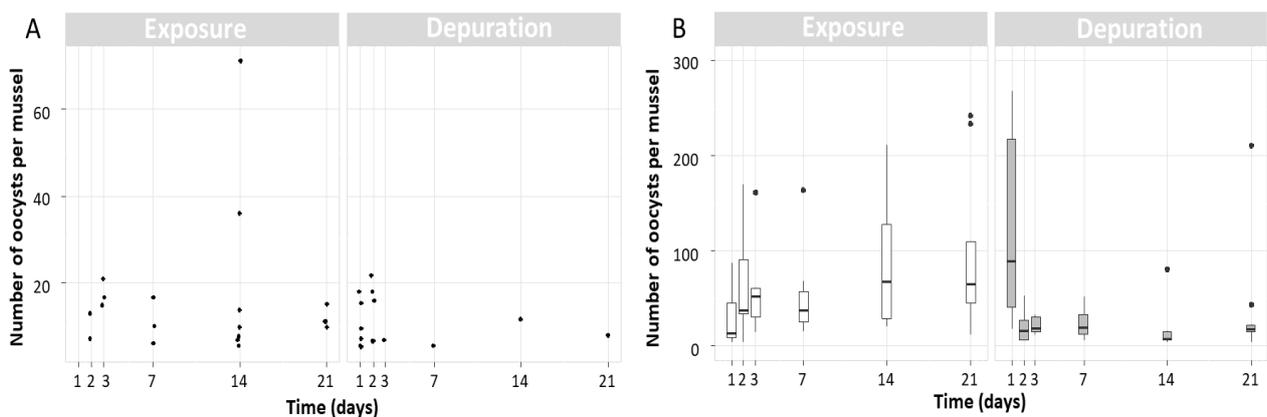


Figure 23 : Number of *T. gondii* oocysts in mussel tissues (scatterplot or boxplot with median, quartiles and outliers) after exposure to 1,000 oocysts/day/mussel (A) or 10,000 oocysts/day/mussel (B).

Numbers of *Giardia duodenalis* in haemolymph (Figure 24) increased significantly during the exposure period until 21 days (218.7 ± 143.3) compared to 3 days (15.8 ± 0.6) and 7 days (20.9 ± 7.7) of exposure. In depuration period, number of cysts per mussel decreased significantly at 1 day (32.7 ± 19.9) and cysts remained in haemolymph until 21 days (36.1 ± 13.6).

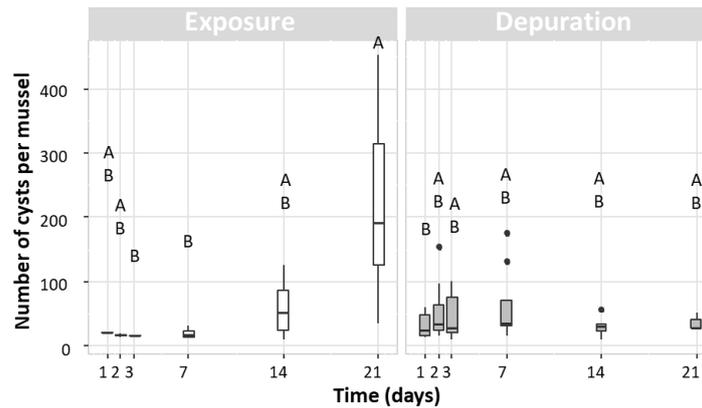


Figure 24 : Number of *G. duodenalis* cysts in mussel haemolymph (boxplot with median, quartiles and outliers) after exposure to 10,000 cysts/day/mussel. Groups with no common letters are statistically different from each other (Kruskal-Wallis, post-hoc Nemeyi, $\alpha \leq 0.05$)

In tissues (Figure 25), cyst quantity per mussel was very variable and no significant difference was shown at 1,000 cysts/mussel/day condition and between the two concentrations. For 10,000 cyst/mussel/day condition, number of bioaccumulated cysts at 1 day (102.64 ± 148.6) of depuration was significantly higher than at 3 days (2.0 ± 2.2) and 7 days (2.5 ± 2.4) of exposure. Then, at 1,000 and 10,000 oocysts/mussel/day condition a non-significant decrease was observed at 3 days of depuration (1.8 ± 1.4 and 4.3 ± 4.9 respectively) compared to 2 days of depuration (12.5 ± 22.9 and 13.4 ± 18.7 respectively). Cysts level persisted in tissues until 21 days of depuration with $15.9 (\pm 25.4)$ and $25.6 (\pm 46.0)$ cysts per mussel, respectively at 1,000 and 10,000 cysts/mussel/day conditions.

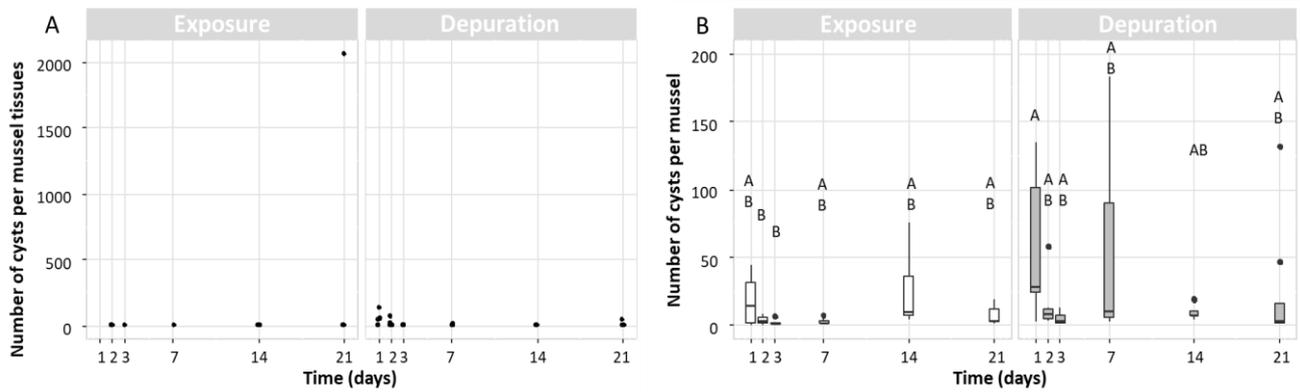


Figure 25 : Number of *G. duodenalis* cysts in mussel tissues (scatterplot or boxplot with median and quartiles) after exposure to 1,000 cysts/day/mussel (A) or 10,000 cysts/day/mussel (B). Groups with no common letters are statistically different from each other (Kruskal-Wallis, post-hoc Nemenyi, $\alpha \leq 0.05$).

4. Discussion

The waterborne transmission of *C. parvum* and *G. duodenalis* is well documented. Adam et al. (2016) identified 242 giardiasis outbreaks including 74.6 % with a waterborne origin between 1972 and 2011. Likewise, among the 70 cryptosporidiosis outbreaks reported between 2000 and 2010, 56.4% had a waterborne origin (Putignani and Menichella, 2010). The prevalence of *T. gondii* oocysts in watercourses has been studied only recently. Between 2004 and 2010 out of 325 waterborne protozoa outbreaks reported, 2 % were caused by *T. gondii* (Baldursson and Karanis, 2011). For example, *T. gondii* oocysts were found in 27.2% (n= 114) of drinking water samples in Poland (Sroka et al., 2006). *C. parvum* oocysts were detected in 10.2% (n= 167), 32.7% (n= 52) and 35% (n= 26) and *G. duodenalis* in 8.4% (n=167), 36.5% (n= 52) and 12% (n= 26) of drinking water samples in Portugal (Almeida et al., 2010), Spain (Castro-Hermida et al., 2010) and Japan (Hashimoto et al., 2002), respectively. Considering the low doses required for these parasites to infect humans, positive detection in water reflects a health risk.

This study addresses for the first time exposure of zebra mussels to *G. duodenalis* and *T. gondii* for 21 days and the subsequent depuration kinetics. The percentages of detection provided relevant results for assessing the presence of protozoa loads in aquatic environments. Detection of *T. gondii* and *G. duodenalis* in zebra mussel tissues or haemolymph indeed provided early diagnosis, i.e., as early as after 1 day of exposure to 100 (oo)cysts/mussel/day. (Oo)cysts were still detected after 21 days of depuration, therefore the method could reflect present or recent contamination of water bodies. Moreover, the percentages of positive samples appeared to reflect contamination levels with different levels of sensitivity depending on the compartment (tissues or haemolymph). This may be related to LOD₉₅, which differed according to each protozoan and each mussel compartment. For *G. duodenalis*, contamination was detected in the haemolymph from 1 day of exposure, with 10%, 30% or 60% of positive samples for punctual contamination levels of 1.9×10^3 , 1.9×10^4 and 1.9×10^5 cysts.L⁻¹, respectively. But contamination was not detected in the tissue samples. The percentage of positive haemolymph samples could reflect contamination by cysts, whether occasional or chronic (over a time span of 21 days): a percentage of 80 to 100% was representative of contamination ranging from 5.3×10^5 to more than 4.3×10^6 cysts.L⁻¹, while a percentage of 10 to 20% reflected a cyst level ranging from 1.9×10^3 to 5.3×10^4 cysts.L⁻¹. The percentage of positive mussels remained relatively stable throughout the depuration period (20% variation) and clearly distinct for each contamination level: 10 to 30%, 60 to 80% or 90 to 100% after chronic exposure to 4.3×10^4 , 4.3×10^5 and 4.3×10^6 cysts.L⁻¹, respectively. The same patterns were observed in tissues, with later and lower detection percentages of 10% on average for each cyst concentration. Contrary to *G. duodenalis*, *T. gondii* was detected earlier in tissues than in the haemolymph. The percentage of positive tissues reached 100% from 5.3×10^3 oocysts.L⁻¹, and remained stable for the 21 days of depuration after chronic

exposure (21 days) at 4.3×10^5 oocysts.L⁻¹. *T. gondii* detection in the haemolymph samples occurred later, but still provided an assessment of *T. gondii* levels in water. All haemolymph samples were positive following exposure to only 4.3×10^6 oocysts.L⁻¹; 10 to 30% of positive samples reflected oocyst levels ranging from 1.1×10^4 to 1.1×10^5 oocysts.L⁻¹, while 80 to 90% of positive samples tended to reflect contamination by 2.8×10^5 to 4.3×10^5 oocysts.L⁻¹. Zebra mussels integrated protozoan contamination over the 21 days of depuration. This underlines their ability to reflect past contamination of the water environment. Previous studies also showed integration of contamination by *T. gondii* (Palos Ladeiro et al., 2015), *C. parvum* and *G. duodenalis* (Graczyk et al., 2003) for 14 days of depuration in zebra mussels. In marine species, *T. gondii* oocysts were still detected in *M. galloprovincialis* 21 days after inoculation (Arkush et al. 2003) and *C. parvum* oocysts remained detected in gills and haemocytes of *Crassostrea virginica* 12 days after exposure (Fayer et al., 1997). In agreement with our results, *C. parvum* oocysts persisted 14 days' after inoculation in the freshwater mollusc *Corbicula fluminea* (Graczyk et al. 1998).

Many samples were not quantifiable, with protozoa loads in mussels was not representative of the water contamination level. Nevertheless, our experiment provided further details on bioaccumulation of (oo)cysts between 1 and 3 days of depuration. The number of *T. gondii* oocysts bioaccumulated in zebra mussel tissues dropped between 1 and 2 days of depuration, and then a minimal quantity per mussel seemed to persist up to 21 days of depuration. Palos Ladeiro et al. (2015) also showed a sharp decrease in the number of bioaccumulated oocysts after one week of depuration, which then remained the same the 2 following weeks. For *G. duodenalis*, an increasing trend was observed in tissues after 1 day in clear water compared to the exposure period. Simultaneously in the haemolymph, a significant increase of the number of cysts was observed after 21 days of exposure, followed

by a decrease after 1 day in clear water. Therefore, zebra mussels appeared to transfer cysts from the haemolymph to tissues in the depuration period which explained the concentration of *G. duodenalis* cysts after 1 day in clear water. As previously observed (Palos Ladeiro et al., 2015), *T. gondii* oocysts seemed to be less detected in the haemolymph than in tissues. As opposed to *T. gondii* oocysts, *G. duodenalis* cysts seemed to be more accumulated in the haemolymph than in tissues - especially during the exposure period - despite a higher LOQ in tissues than in the haemolymph. These two protozoa could be managed differently by zebra mussel cells. *T. gondii* oocysts and *G. duodenalis* cysts have different sizes (10-13 µm and 12-15 µm, respectively) and wall structures (Adam, 2001; Dumètre et al., 2013). Moreover, some authors have shown the presence of lectins in the gills and labial palp mucus in *Crassostrea virginica* (Pales Espinosa et al., 2009) and *M. edulis* (Pales Espinosa et al., 2010). These lectins recognized some carbohydrates on the surfaces of filtered particles that is used for a biochemical selection of particles. This mechanism could explain the differences between the number of *T. gondii* oocysts and *G. duodenalis* cysts accumulated by *D. polymorpha*. The higher LOD₉₅ for *C. parvum* oocysts might explain its low detection in zebra mussel matrix, whether haemolymph or tissue. Moreover, *C. parvum* oocysts have a small diameter (4-5 µm, Fayer et al., 2000) and their wall also has a different composition (Dumètre et al., 2012) than *T. gondii* oocysts and *G. duodenalis* cysts. Therefore, cellular management and biochemical selection of *C. parvum* oocysts by zebra mussels could lead to lower bioaccumulation or destruction of *C. parvum* oocysts. *In vitro* experiments showed that *C. parvum* oocysts could be internalized by *D. polymorpha* haemocytes (Palos Ladeiro et al., 2018), whereas *T. gondii* and *G. duodenalis* (oo)cysts were trapped in haemocyte aggregates owing to their large size (Le Guernic et al., 2018). These explanations are in agreement with the findings of other studies, in which *C. fluminea* haemocytes internalized *C. parvum* oocysts *in vivo* (Graczyk et

al., 1998) and phagocytized them *in vitro* (Graczyk et al., 1997). This might explain the difference in the DNA quantities we detected in mussels, whether from *T. gondii*/*G. duodenalis* or *C. parvum* (oo)cysts.

Molecular techniques seemed to underline a higher accumulation of *T. gondii* oocysts than *G. duodenalis* cysts and *C. parvum* oocysts in zebra mussels as previously highlighted (Palos Ladeiro et al., 2014). This could be explained by the differences in LOD₉₅ and LOQ observed for each parasite in tissues and in the haemolymph. The extraction method led to a sensitive LOD₉₅ for *T. gondii* (1-5 oocysts/mussel) and *G. duodenalis* (< 1 cyst/mussel) in tissues, but was less efficient for *C. parvum* (50-100 oocysts/mussel). The literature does not provide any data on the LOD of molecular techniques for *G. duodenalis* cyst detection in shellfish. However, our results highlighted a significant improvement in detection sensitivity for *T. gondii* and *C. parvum* oocysts in mussel tissues. Staggs et al. (2015) found a LOD $\geq 1,000$ *T. gondii* and *C. parvum* oocysts per *Mytilus* spp. tissues by TaqMan qPCR targeting the repeat region gene, and Esmerini et al. (2010) found a LOD ranging between 100 and 1,000 *T. gondii* oocysts per sample in *Mytella guyanensis* and *C. rhizophorae* by nested PCR targeting the B1 gene. The present study highlighted a LOD ranging between 10 and 50 *T. gondii* oocysts in mussel haemolymph samples. The same sensitivity was highlighted in *Perna canaliculus* haemolymph by qPCR targeting the repeat region gene (Coupe et al., 2019), but detection was more sensitive in *Mytilus* spp. haemolymph with a LOD ranging between 1 and 10 oocysts by TaqMan qPCR (repeat region gene, Staggs et al., 2015). For *C. parvum*, the LOD ranged between 50 and 100 oocysts in zebra mussel. Staggs et al. (2015) highlighted similar sensitivity in *Mytilus* spp.

The extraction technique should be improved for *C. parvum* in future experiments. The current extraction protocol (1) could be too drastic and might damage the DNA integrity of *C.*

parvum oocysts, or on the contrary (2) might partially damage the integrity of the oocyst wall and reduce access to oocyst DNA. In order to verify these hypotheses, it would be necessary to test different parameters of the DNA extraction protocol (Ahmed and Karanis, 2018): trypsin digestion, heat shock cycles (Manore et al., 2019), ultrasonic treatment, homogenization frequency. However, improving the method for *C. parvum* might alter the performance for *T. gondii* and *G. duodenalis*.

Zebra mussels could concentrate these two protozoa for a few weeks even during the depuration period, and could be used as an integrative matrix for biomonitoring aquatic ecosystems. The percentage of positive mussels used allows to limit the risk of false negatives compared to protozoa quantification in mussel matrix and reflect a health risk. The number of positive mussels could predict the water contamination level in water, therefore additional studies are needed to improve the sensitivity of this model. Our results underline higher numbers of positive samples and lower LOD₉₅ and LOQ for tissue samples than for haemolymph samples for the tree protozoa. Thus, within the framework of protozoa biomonitoring in watercourses, it seems more appropriate to search for protozoa in tissue samples. In the light of these results, we propose to analyze whole zebra mussels without haemolymph puncture. This method was previously used in our laboratory and did not impact the quality of DNA extraction or protozoa quantification, the LOD₉₅ and LOQ remained unchanged (data not shown). This simplifies handling, and handlers would not need any knowledge of zebra mussel anatomy or dissection. In addition, using pooled tissues (with pool of similar weights) could make the technique more reliable and limit inter-individual variation caused by zebra mussel size, for example (Lucy et al., 2010). *D. polymorpha* can be used for passive and active biomonitoring. The establishment of a reference population could provide a rapid and sustainable supply of zebra mussels to facilitate its caging. However, one should

keep in mind that zebra mussel is an invasive species that cannot be used outside its distribution area. But since it is mainly present in Europe and North America, its use as a biomonitoring tool can still be applied in many countries. Moreover, this methodology is less expensive and time consuming than the current normative process (ISO 15553/2006) and makes it possible to monitor contamination by protozoan (oo)cysts and reduce the variability of the results (induced by water quality, the sampling period, physicochemical parameters ...) using protozoa concentration in mussel tissues.

5. Conclusion

This study highlights a high sensitivity of molecular techniques to detect *G. duodenalis* and *T. gondii* in mussel's matrix: between 1 and 5 oocysts /mussels for *T. gondii* and less than 1 cyst/mussel for *G. duodenalis*. Percentage of detection in mussel could highlighted present or past protozoa contamination and reflect the contamination level in water bodies. *D. polymorpha* also concentrated *C. parvum* oocysts, but our technique is less sensitive and can be improved. Zebra mussel is a sedentary organism with a wide world distribution, allowing the monitoring of a wide range of water bodies. Its implementation is easier than normative process (ISO 15553/2006) and may limit result variations induced by water quality, sampling period or physicochemical parameter. The use of zebra mussel as an integrative tool may allow to assess the water quality in term of protozoa contamination and consequently can help to estimate the health risk associated with contaminated water which could be (re-)used for crop irrigation or recreational water.

Acknowledgments:

The authors thank Manon Gicquel (BTEC Higher National Diploma internship) for her contribution in this project. This work was supported in part by the French National Research Agency (ANR) with the MOBIDIC (Mollusc bivalves as indicators of contamination of water bodies by protozoan parasites; Project ANR- 15-CE34-0005) project and by the DROPE (*Dreissena polymorpha* as purifier tool of protozoa in wastewater treatment plant effluent) Ph.D. project which co-financed by the "Grand-Est" region and ERDF (European Regional Development Fund).

References

- Ackerman, J.D., 1999. Effect of velocity on the filter feeding of dreissenid mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): implications for trophic dynamics. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56, 1551–1561. <https://doi.org/10.1139/f99-079>
- Adam, E.A., Yoder, J.S., Gould, L.H., Hlavsa, M.C., Gargano, J.W., 2016. Giardiasis outbreaks in the United States, 1971-2011. *Epidemiol. Infect.* 144, 2790–801. <https://doi.org/10.1017/S0950268815003040>
- Adam, R.D., 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 447–475. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.447-475.2001>
- Aksoy, U., Marangi, M., Papini, R., Ozkoc, S., Bayram Delibas, S., Giangaspero, A., 2014. Detection of *Toxoplasma gondii* and *Cyclospora cayetanensis* in *Mytilus galloprovincialis* from Izmir Province coast (Turkey) by Real Time PCR/High-Resolution Melting analysis (HRM). *Food Microbiol.* 44, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.012>
- Almeida, A., Moreira, M.J., Soares, S., De Delgado, M.L., Figueiredo, J., Silva, E., Castro, A., Da Cosa, J.M.C., 2010. Presence of *Cryptosporidium spp.* and *Giardia duodenalis* in drinking water samples in the North of Portugal. *Korean J. Parasitol.* 48, 43–48. <https://doi.org/10.3347/kjp.2010.48.1.43>

- Arkush, K.D., Miller, M.A., Leutenegger, C.M., Gardner, I.A., Packham, A.E., Heckerroth, A.R., Tenter, A.M., Barr, B.C., Conrad, P.A., 2003. Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Int. J. Parasitol.* 33, 1087–1097. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00181-4](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00181-4)
- Aubert, D., Villena, I., 2009. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water: Proposition of a strategy and evaluation in Champagne-Ardenne region, France. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 290–295. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200023>
- Baldursson, S., Karanis, P., 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks – An update 2004–2010. *Water Res.* 45, 6603–6614. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2011.10.013>
- Bautista, M., Bonatti, T.R., Fiuza, V.R. da S., Terashima, A., Canales-Ramos, M., José, J., Franco, R.M.B., 2018. Occurrence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in raw water samples from the Rímac River, Peru. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 11454–11467. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1423-6>
- Binelli, A., Della Torre, C., Magni, S., Parolini, M., 2015. Does zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) represent the freshwater counterpart of *Mytilus* in ecotoxicological studies? A critical review. *Environ. Pollut.* 196, 386–403. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.10.023>
- Bingham, A.K., Jarroll, E.L., Meyer, E.A., Radulescu, S., 1979. *Giardia* sp.: Physical factors of excystation in vitro, and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. *Exp. Parasitol.* 47, 284–291. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(79\)90080-8](https://doi.org/10.1016/0014-4894(79)90080-8)
- Cacciò, S.M., Thompson, R.C.A., McLauchlin, J., Smith, H. V., 2005. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol.* 21, 430–437. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.06.013>
- Castro-Hermida, J.A., García-Presedo, I., González-Warleta, M., Mezo, M., 2010. *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in water bodies of Galicia, Spain. *Water Res.* 44, 5887–5896. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.010>
- Cheun, H. Il, Kim, C.H., Cho, S.H., Ma, D.W., Goo, B. La, Na, M.S., Youn, S.K., Lee, W.J., 2013. The First Outbreak of Giardiasis with Drinking Water in Korea. *Osong Public Heal. Res. Perspect.* 4, 89–92. <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2013.03.003>
- Costa, R., Aldridge, D.C., Moggridge, G.D., 2008. Seasonal variation of zebra mussel susceptibility to molluscicidal agents. *J. Appl. Ecol.* 45, 1712–1721. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2008.01555.x>

- Dubey, J.P., 2010. Toxoplasmosis of Animals and Humans, 2nd Editio. ed, *Journal of Parasitology*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/9781420092370>
- Dumetre, A., Dubey, J.P., Ferguson, D.J.P., Bongrand, P., Azas, N., Puech, P.-H., 2013. Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 11535–11540. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308425110>
- Efstratiou, A., Ongerth, J.E., Karanis, P., 2017. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011–2016. *Water Res.* 114, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.036>
- Fayer, R., Farley, C.A., Lewis, E.J., Trout, J.M., Graczyk, T.K., 1997. Potential Role of the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*, in the Epidemiology of *Cryptosporidium parvum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2086–8.
- Fayer, R., Morgan, U., Upton, S.J., 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: Transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.*, Thematic Issue: Emerging Parasite Zoonoses 30, 1305–1322. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00135-1](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00135-1)
- Fayer, R., Trout, J.M., Lewis, E.J., Santin, M., Zhou, L., Lal, A.A., Xiao, L., 2003. Contamination of Atlantic coast commercial shellfish with *Cryptosporidium*. *Parasitol. Res.* 89, 141–145. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0734-0>
- Fontaine, M., Guillot, E., 2002. Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 214, 13–17. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11318.x>
- Gallas-Lindemann, C., Sotiriadou, I., Mahmoodi, M.R., Karanis, P., 2013. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in different water resources by Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Acta Trop.* 125, 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.10.007>
- Gómez-Couso, H., Freire-Santos, F., Amar, C.F.L., Grant, K.A., Williamson, K., Ares-Mazás, M.E., McLauchlin, J., 2004. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multiplexed nested-PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 91, 279–288. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.07.003>
- Graczyk, T.K., Conn, D., Lucy, F., Minchin, D., Tamang, L., Moura, L.S., DaSilva, A., 2004. Human waterborne parasites in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from the Shannon River drainage area, Ireland. *Parasitol. Res.* 93, 385–391. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1142-4>

- 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*). *Parasitol. Res.* 89, 107–112. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0729-x>
- Graczyk, T.K., Fayer, R., Cranfield, M.R., Conn, D.B., 1998. Recovery of waterborne *Cryptosporidium parvum* oocysts by freshwater benthic clams (*Corbicula fluminea*). *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 427–30. <https://doi.org/10.1097/00006205-200205000-00010>
- Graczyk, T.K., Fayer, R., Cranfield, M.R., Conn, D.B., 1997. In Vitro Interactions of Asian Freshwater Clam (*Corbicula fluminea*) Hemocytes and *Cryptosporidium parvum* Oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2910–2.
- Graczyk, T.K., Fayer, R., Lewis, E.J., Trout, J.M., Farley, C.A., 1999. *Cryptosporidium* oocysts in Bent mussels (*Ischadium recurvum*) in the Chesapeake Bay. *Parasitol. Res.* 85, 518–521. <https://doi.org/10.1007/s004360050590>
- Graczyk, T.K., Lucy, F.E., Tamang, L., Minchin, D., Mirafior, A., 2008. Assessment of human waterborne parasites in Irish river basin districts - Use of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) as bioindicators. *Aquat. Invasions* 3, 305–313. <https://doi.org/10.3391/ai.2008.3.3.5>
- Gustafson, L.L., Stoskopf, M.K., Bogan, A.E., Showers, W., Kwak, T.J., Hanlon, S., Levine, J.F., 2005. Evaluation of a nonlethal technique for hemolymph collection in *Elliptio complanata*, a freshwater bivalve (*Mollusca: Unionidae*). *Dis. Aquat. Organ.* 65, 159–165. <https://doi.org/10.3354/dao065159>
- Hancock, C.M., Rose, J.B., Callahan, M., 1998. *Crypto* and *Giardia* in US groundwater. *J. Am. Water Work. Assoc.* 90, 58–61. <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1998.tb08396.x>
- Hashimoto, A., Kunikane, S., Hirata, T., 2002. Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the drinking water supply in Japan. *Water Res.* 36, 519–526. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00279-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00279-2)
- Karanis, P., Sotiriadou, I., Kartashev, V., Kourenti, C., Tsvetkova, N., Stojanova, K., 2006. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies of Russia and Bulgaria. *Environ. Res.* 102, 260–271. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2006.05.005>
- 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*. *J. Appl. Microbiol.* 120, 498–508. <https://doi.org/10.1111/jam.12999>

- Khaldi, S., Ratajczak, M., Gargala, G., Fournier, M., Berthe, T., Favennec, L., Dupont, J.P., 2011. Intensive exploitation of a karst aquifer leads to *Cryptosporidium* water supply contamination. *Water Res.* 45, 2906–2914. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.03.010>
- Le Guernic, A., Geffard, A., Rioult, D., Bonnard, I., Le Foll, F., Palos Ladeiro, M., 2018. First evidence of cytotoxic effects of human protozoan parasites on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) haemocytes. *Environ. Microbiol. Rep.* <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12720>
- Lélu, M., Gilot-Fromont, E., Aubert, D., Richaume, A., Afonso, E., Dupuis, E., Gotteland, C., Marnef, F., Poulle, M.L., Dumètre, A., Thulliez, P., Dardé, M.L., Villena, I., 2011. Development of a sensitive method for *Toxoplasma gondii* oocyst extraction in soil. *Vet. Parasitol.* 183, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.06.018>
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., 2009. Long-Term Survival of *Toxoplasma gondii* Sporulated Oocysts in Seawater. *J. Parasitol.* 95, 1019–1020. <https://doi.org/10.1645/GE-1919.1>
- Lucy, F.E., Connolly, M., Graczyk, T.K., Tamang, L., Sullivan, M.R., Mastitsky, S.E., 2010. Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) are effective sentinels of water quality irrespective of their size. *Aquat. Invasions* 5, 49–57. <https://doi.org/10.3391/ai.2010.5.1.7>
- Lucy, F.E., Graczyk, T.K., Tamang, L., Miraflor, A., Minchin, D., 2008. Biomonitoring of surface and coastal water for *Cryptosporidium*, *Giardia*, and human-virulent microsporidia using molluscan shellfish. *Parasitol. Res.* 103, 1369–1375. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1143-9>
- Mccartney, M.A., Wilbur, A.E., 2007. Project Title : An Evaluation of Hemolymph Extraction as a Non-Lethal Sampling Method for Genetic Identification of Freshwater Mussel Species in Southeastern North Carolina Final Report : FHWA / NC / 2006-11 Principle investigators : Department of Biology 1–42.
- McKerr, C., Adak, G.K., Nichols, G., Gorton, R., Chalmers, R.M., Kafatos, G., Cosford, P., Charlett, A., Reacher, M., Pollock, K.G., Alexander, C.L., Morton, S., 2015. An outbreak of *Cryptosporidium parvum* across England and Scotland associated with consumption of fresh pre-cut salad leaves, May 2012. *PLoS One* 10, e0125955. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125955>
- Montoya, J., Liesenfeld, O., 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* 363, 1965–1976. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)

- Moreno, Y., Moreno-Mesonero, L., Amorós, I., Pérez, R., Morillo, J.A., Alonso, J.L., 2018. Multiple identification of most important waterborne protozoa in surface water used for irrigation purposes by 18S rRNA amplicon-based metagenomics. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 221, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.10.008>
- Olson, M.E., Goh, J., Phillips, M., Guselle, N., McAllister, T.A., 1999. *Giardia* cyst and *Cryptosporidium* oocyst survival in water, soil, and cattle feces. *J. Environ. Qual.* 28, 1991. <https://doi.org/10.2134/jeq1999.00472425002800060040x>
- Pales Espinosa, E., Hassan, D., Ward, J.E., Shumway, S.E., Allam, B., 2010. Role of epicellular molecules in the selection of particles by the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Biol. Bull.* 219, 50–60. <https://doi.org/10.1086/BBLv219n1p50>
- Pales Espinosa, E., Perrigault, M., Ward, J.E., Shumway, S.E., Allam, B., 2009. Lectins associated with the feeding organs of the oyster *Crassostrea virginica* can mediate Particle Selection. *Biol. Bull.* 217, 130–141. <https://doi.org/10.1086/BBLv217n2p130>
- 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 Res.* 48, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.017>
- Palos Ladeiro, M., Bigot-Clivot, A., Aubert, D., Villena, I., Geffard, A., 2015. Assessment of *Toxoplasma gondii* levels in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) by real-time PCR: an organotropism study. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 13693–13701. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4296-y>
- Palos Ladeiro, M., Bigot-Clivot, A., Geba, E., Le Foll, F., Le Guernic, A., Leprêtre, M., Geffard, A., Aubert, D., Durand, L., Villena, I., La Carbona, S., Favennec, L., Gargala, G., Pierre, S., 2018. Mollusc Bivalves as Indicators of Contamination of Water Bodies by Protozoan Parasites. Ref. Modul. *Earth Syst. Environ. Sci.* <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10979-0>
- Pönkä, A., Kotilainen, P., Rimhanen-Finne, R., Hokkanen, P., Hänninen, M.L., Kaarna, A., Meri, T., Kuusi, M., 2009. A foodborne outbreak due to *Cryptosporidium parvum* in Helsinki, November 2008. *Euro Surveill.* 14, 19269. <https://doi.org/10.2807/ese.14.28.19269-en>
- Putignani, L., Menichella, D., 2010. Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/753512>
- Reeders, H.H., De Vaate, A.B., Slim, F.J., 1989. The filtration rate of *Dreissena polymorpha* (Bivalvia) in three Dutch lakes with reference to biological water quality management. *Freshw. Biol.* 22, 133–141. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1989.tb01088.x>

- Rendtorff, R.C., 1954. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites: II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *Am. J. Epidemiol.* 59, 209–222. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a119634>
- Solo-Gabriele, H.M., LeRoy Ager, A., Fitzgerald Lindo, J., Dubón, J.M., Neumeister, S.M., Baum, M.K., Palmer, C.J., 1998. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water supplies of San Pedro Sula, Honduras. *Rev. Panam. Salud Publica* 4, 398–400. <https://doi.org/10.1590/S1020-49891998001200006>
- Sroka, J., Wójcik-Fatla, A., Dutkiewicz, J., 2006. Occurrence of *Toxoplasma gondii* in water from wells located on farms. *Ann. Agric. Environ. Med.* 13, 169–75.
- Vermeulen, L.C., van Hengel, M., Kroeze, C., Medema, G., Spanier, J.E., van Vliet, M.T.H., Hofstra, N., 2019. *Cryptosporidium* concentrations in rivers worldwide. *Water Res.* 149, 202–214. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.069>
- Verweij, J.J., Schinkel, J., Laeijendecker, D., van Rooyen, M.A.A., van Lieshout, L., Polderman, A.M., 2003. Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. *Mol. Cell. Probes* 17, 223–225. [https://doi.org/10.1016/S0890-8508\(03\)00057-4](https://doi.org/10.1016/S0890-8508(03)00057-4)
- Ware, M.W., Augustine, S.A.J., Erisman, D.O., See, M.J., Wymer, L., Hayes, S.L., Dubey, J.P., Villegas, E.N., 2010. Determining UV inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts by using cell culture and a Mouse Bioassay. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5140–5147. <https://doi.org/10.1128/AEM.00153-10>
- Xiao, S., Zhang, Y., Zhao, X., Sun, L., Hu, S., 2018. Presence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in recreational lake water in Tianjin, China: A preliminary study. *Sci. Rep.* 8, 2353. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20902-3>

II. Recherche des parasites dans l'eau

L'eau est renouvelée toutes les semaines dans les aquariums, à cette occasion celle-ci a été filtrée durant la période d'exposition afin de quantifier le nombre de parasites résiduels contenus dans l'eau et les (pseudo)féces (Tableau 14). Pour les trois protozoaires étudiés, le nombre d'oocystes ou de kystes retrouvés dans les eaux augmente pour les deux dernières semaines (changement d'eau au 14^e jour et au 21^e jour) avec, par exemple pour la condition à 10 000 protozoaires/jour/moule $2,807e^{+07}$ et $8,931e^{+07}$ oocystes de *T. gondii* contre $1,778e^{+07}$ à 7 jours ; $3,284e^{+04}$ et $3,203e^{+04}$ kystes de *G. duodenalis* contre $3,183e^{+03}$ à 7 jours et $1,550e^{+05}$ et $1,585e^{+06}$ oocystes de *C. parvum* contre $1,943e^{+04}$ retrouvés à 7 jours. Seules les quantités retrouvées de *G. duodenalis* et *C. parvum* pour la plus faible concentration (100 parasites/moule/jour) n'augmentent pas avec le temps, on retrouve 145, 61 et 304 kystes de *Giardia* et 142, 489 et 3 oocystes de *Cryptosporidium* respectivement pour les changements d'eau à 7, 14 et 21 jours. Le nombre de protozoaires retrouvés augmente également avec la concentration ajoutée dans les aquariums. En effet, pour la condition à 10 000 protozoaires/jour/moule, on retrouve au changement d'eau du 21^e jour $8,931e^{+07}$ *T. gondii*, $3,203e^{+04}$ *G. duodenalis* et $1,585e^{+06}$ *C. parvum* contre respectivement $4,304e^{+05}$, 304 et 3 au 21^e jour pour la condition à 100 protozoaires/jour/moule.

Chapitre III : Etude des cinétiques d'accumulation et de dépuración des protozoaires par la dreissène

Tableau 14 : Nombre de protozoaires ajoutés dans les aquariums chaque semaine par rapport au nombre de protozoaires retrouvés à chaque changement d'eau (à 7, 14 et 21 jours d'exposition)

Temps de prélèvement de l'eau		<i>Toxoplasma gondii</i>			<i>Giardia duodenalis</i>			<i>Cryptosporidium parvum</i>		
		7 j	14 j	21 j	7 j	14 j	21 j	7 j	14 j	21 j
100 parasites/moule/jour	Nombre ajoutés	1,145e ⁺⁰⁵	2,160e ⁺⁰⁵	3,105e ⁺⁰⁵	1,145e ⁺⁰⁵	2,160e ⁺⁰⁵	3,105e ⁺⁰⁵	1,145e ⁺⁰⁵	2,160e ⁺⁰⁵	3,105e ⁺⁰⁵
	Nombre retrouvés	3,224e ⁺⁰⁴	1,511e ⁺⁰⁵	4,304e ⁺⁰⁵	145	61	304	142	489	3
	Nombre théorique extraits	8,226e ⁺⁰⁴	6,491e ⁺⁰⁴	-1,199 e ⁺⁰⁵	1,144e ⁺⁰⁵	2,159e ⁺⁰⁵	3,102e ⁺⁰⁵	1,144e ⁺⁰⁵	2,155e ⁺⁰⁵	3,102e ⁺⁰⁵
1 000 parasites/moule/jour	Nombre ajoutés	1,145e ⁺⁰⁶	2,160e ⁺⁰⁶	3,105e ⁺⁰⁶	1,145e ⁺⁰⁶	2,160e ⁺⁰⁶	3,105e ⁺⁰⁶	1,145e ⁺⁰⁶	2,160e ⁺⁰⁶	3,105e ⁺⁰⁶
	Nombre retrouvés	1,104e ⁺⁰⁵	1,209e ⁺⁰⁶	4,734e ⁺⁰⁶	256	642	2,439e ⁺⁰³	3,171e ⁺⁰³	3,528e ⁺⁰³	5,359e ⁺⁰⁴
	Nombre théorique extraits	1,031e ⁺⁰⁶	9,510e ⁺⁰⁵	-1,629 e ⁺⁰⁶	1,145e ⁺⁰⁶	2,159e ⁺⁰⁶	3,103e ⁺⁰⁶	1,141e ⁺⁰⁶	2,156e ⁺⁰⁶	3,051e ⁺⁰⁶
10 000 parasites/moule/jour	Nombre ajoutés	1,145e ⁺⁰⁷	2,160e ⁺⁰⁷	3,105e ⁺⁰⁷	1,145e ⁺⁰⁷	2,160e ⁺⁰⁷	3,105e ⁺⁰⁷	1,145e ⁺⁰⁷	2,160e ⁺⁰⁷	3,105e ⁺⁰⁷
	Nombre retrouvés	1,778e ⁺⁰⁷	2,807e ⁺⁰⁷	8,931e ⁺⁰⁷	3,183e ⁺⁰³	3,284e ⁺⁰⁴	3,203e ⁺⁰⁴	1,943e ⁺⁰⁴	1,550e ⁺⁰⁵	1,585e ⁺⁰⁶
	Nombre théorique extraits	-6,332 e ⁺⁰⁶	-6,469 e ⁺⁰⁶	-5,826 e ⁺⁰⁷	1,144e ⁺⁰⁷	2,157e ⁺⁰⁷	3,102e ⁺⁰⁷	1,143e ⁺⁰⁷	2,144e ⁺⁰⁷	2,947e ⁺⁰⁷

Ces résultats nous ont permis de calculer le nombre de parasites extraits du milieu par les moules zébrées grâce à une soustraction entre le nombre total de protozoaires déposés dans les aquariums chaque semaine et le nombre de parasites retrouvés dans les filtrats d'eau et de (pseudo)féces (Tableau 14). Le nombre de *T. gondii* extraits du milieu devient négatif au cours de la troisième semaine (changement d'eau au 21^e jour) pour les trois concentrations

utilisées, ce qui montrerait un rejet des oocystes par les bivalves, via les (pseudo)féces par exemple, après saturation des tissus. Cependant, pour la concentration à 10 000 oocystes/moule/jour, $1,778e^{+07}$ parasites ont été retrouvés dans les échantillons prélevés au 7^e jour (1^{ère} semaine) contre seulement $1,145e^{+07}$ parasites ajoutés. La gamme servant à la quantification surestimerait donc le nombre d'oocystes de *T. gondii*.

Le nombre d'oocystes de *C. parvum* et de kystes de *G. duodenalis* extraits est plus élevé pour la concentration à 10 000 parasites/moule/jour. L'extraction de *Giardia* et de *Cryptosporidium* semble très efficace au vu de la faible quantité de parasites retrouvés dans l'eau durant la troisième semaine (prélèvement au 21^e jour) :

- $3/3,105e^{+05}$; $5,359e^{+04}/3,105e^{+06}$ et $1,585e^{+06}/3,105e^{+07}$ oocystes de *C. parvum* retrouvés dans l'eau par rapport à la quantité ajoutée de 100, 1 000 et 10 000 oocystes/jour/moule respectivement.
- $304/3,105e^{+05}$; $2,439e^{+03}/3,105e^{+06}$ et $3,203e^{+04}/3,105e^{+07}$ kystes de *G. duodenalis* retrouvés par rapport à la quantité ajoutée de 100, 1 000 et 10 000 kystes/jour/moule respectivement.

Une infime quantité d'oocystes de *C. parvum* est retrouvée dans les eaux, or ceux-ci semblent également peu accumulés par la dreissène. Cela pourrait suggérer une dégradation effective des oocystes par la dreissène. En effet, leur internalisation par les hémocytes de la moule zébrée a été démontrée en conditions *in vitro* (Palos Ladeiro *et al.*, 2018), celle-ci pourrait aboutir à une phagocytose. Ce processus a été démontré chez *Corbicula fluminea* : les oocystes sont internalisés par les hémocytes en conditions *in vivo* (Graczyk *et al.*, 1998) et phagocytés en conditions *in vitro* (Graczyk *et al.*, 1997).

Les protozoaires retrouvés dans les échantillons d'eau peuvent se présenter sous forme libre dans l'eau, en particulier pour les parasites non filtrés par les bivalves, ou sous forme fixée aux fèces et pseudo-fèces. Graczyk *et al.* (1998) ont montré chez *Corbicula fluminea* que les oocystes de *C. parvum* rejetés avec les fèces étaient adsorbés sur ceux-ci. L'adsorption des parasites sur les fèces permettrait la stabilisation de cette contamination, voire l'extraction de celle-ci en cas de récupération de ces déchets. La capacité d'extraction des protozoaires a été testée en conditions de contamination chronique ce qui peut être à l'origine de l'effet de « saturation » observé ici. En effet, les concentrations utilisées, bien que cohérentes avec la pollution environnementale, sont ici ajoutées chaque jour. Il semble que dans l'environnement ces concentrations ne soient retrouvées que ponctuellement (Li *et al.*, 2006, Mons *et al.*, 2009), en particulier pour la plus forte concentration (Nasser *et al.*, 2012, Ramo *et al.*, 2017).

III. Conclusion générale

D. polymorpha étant capable d'intégrer la contamination par les oocystes de *T. gondii* et les kystes de *G. duodenalis* durant 21 jours minimum, celle-ci constitue un outil pertinent de bioremédiation par extraction du contaminant. Ces deux protozoaires sont détectés dès 1 jour dans les dreissènes, ce qui souligne la rapidité de l'extraction de la contamination par ces bivalves. Au vu de la quantité de parasites retrouvés dans les eaux, il semble que l'extraction des protozoaires par la dreissène soit plus efficace vis-à-vis de *G. duodenalis* que de *T. gondii*. Aucune corrélation entre la charge en protozoaires présente dans l'eau et la quantité de protozoaires bioaccumulés par les dreissènes n'a été mise en évidence. Néanmoins, il semble que le pourcentage de dreissènes positives permet de prédire le niveau de contamination des masses eaux.

Peu d'oocystes de *C. parvum* sont détectés dans l'hémolymphe ainsi que dans les tissus. Ceci peut être attribué aux sensibilités plus faibles de la technique vis-à-vis de ce protozoaire. Cependant, peu d'oocystes sont retrouvés dans l'eau et leur taux d'extraction dans cette matrice est parmi les plus élevés ce qui laisse penser à une destruction des oocystes par la dreissène.

La technique d'extraction évaluée dans ce chapitre montre de très bons seuils de sensibilité sur les tissus, permettant ainsi de futures évaluations de la quantité de parasites bioaccumulés en conditions environnementales. Les tissus offrant une meilleure quantification que l'hémolymphe pour ces trois protozoaires, à l'avenir seul ce compartiment sera utilisé pour mesurer la bioaccumulation.

Chapitre IV : Survie et maintien des dreissènes en effluent de STEP

Avant de proposer *D. polymorpha* comme outil de bioremédiation, il est nécessaire de s'assurer que celle-ci est capable de survivre et de se maintenir dans des conditions physiologiques suffisamment bonnes pour remplir son rôle d'épuration vis-à-vis des protozoaires. Dans la littérature, quelques études ont mis en évidence l'utilisation de la dreissène comme outil de bioremédiation en effluent de STEP (Binelli *et al.*, 2014, Magni *et al.*, 2015, Mezzanotte *et al.*, 2016), cependant ces expérimentations se sont déroulées en conditions semi-contrôlées et aucun marqueur de santé de la moule zébrée n'a été étudié. Ce chapitre vise à améliorer les connaissances sur les conditions physiologiques des dreissènes exposées à l'effluent de STEP à travers une exposition en laboratoire et une étude *in situ*. Les études présentées dans ce chapitre ont bénéficié de l'aide de Grégory Stephan, de Frédéric Ponsard et de Loïc Sinet d'Ardenne-Métropole ainsi que de Yannic Ambolet responsable de la station d'épuration de Charleville-Mézières.

I. En conditions expérimentales

Afin de rendre compte de la toxicité potentielle de l'effluent sur la dreissène, les dreissènes ont été exposées à de l'effluent pur ou dilué en conditions contrôlées.

1. Design expérimental

Dreissena polymorpha a été exposée durant 28 jours (du 8 février au 8 mars 2017) à 100 % d'effluent, 50 % d'effluent / 50 % d'eau Cristaline[®] (source Aurèle, France) ou 100 % d'eau Cristaline[®] (condition témoin) en dupliqua. L'effluent utilisé pour cette expérience a été prélevé dans le canal de sortie de la STEP de Charleville-Mézières le 28 novembre 2017, les bidons ont été conservés à 4 °C dans l'obscurité jusqu'au jour de l'expérimentation où la

température atteignait 12 °C. Les paramètres physico-chimiques de l'effluent ont été mesurés : pH à 6,88 ; 942 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ de conductivité ; 0,0759 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de nitrite ; 0,338 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de nitrate et 0,01935 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ d'ammonium. A chaque temps de prélèvement – 2, 7, 14, 21 et 28 jours – le taux de clairance (cf. Chapitre II. IV. 1.) de 12 individus (6 individus par aquarium en dupliqua) est mesuré, puis leur hémolymphe est ponctionnée afin d'évaluer le taux de mortalité des hémocytes ainsi que la capacité et l'efficacité de phagocytose (cf. Chapitre II. IV. 2.).

2. Résultats et discussion

Durant les 28 jours d'exposition, le taux de mortalité est relevé tous les jours : 0,81 % (1/124, au 13^e jour) de mortalité dans la condition témoin, 0,81 % (1/124, au 16^e jour) de mortalité dans la condition à 50 % d'effluent et 1,61 % (2/124, au 23^e et 28^e jour) dans la condition à 100 % d'effluent. La mortalité est donc très faible et reste similaire à celle observée dans notre laboratoire en conditions de stabulation.

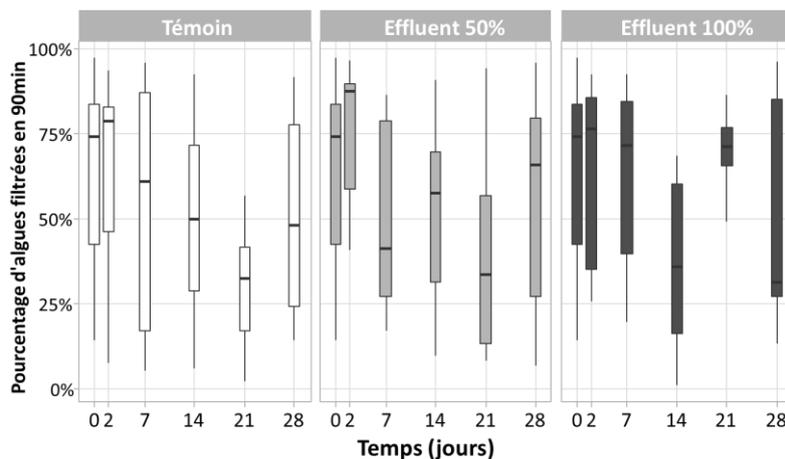


Figure 26 : Taux de clairance (n= 12) observé durant l'exposition en conditions témoins, à 50 % d'effluent et à 100 % d'effluent.

Le taux de clairance (Figure 26) ne montre aucune différence significative (Kruskal-Wallis) entre chacune de ces trois conditions d'exposition. Celui-ci reste relativement stable, il varie non significativement de 73,6 % ($\pm 19,9$ %) à 48 h jusqu'à 36,9 % ($\pm 16,0$ %) à 21 jours pour la condition témoin ; de 77,0 % ($\pm 21,5$ %) à 48 h jusqu'à 51,5 % ($\pm 28,8$ %) à 7 jours pour la condition à 50 % d'effluent et de 43,5 % ($\pm 20,9$ %) à 14 jours jusqu'à 70,8 % ($\pm 10,6$ %) à 21 jours pour la condition à 100 % d'effluent. Le nombre de bivalves ayant filtré à chaque temps de prélèvement est similaire pour chacune des trois conditions d'exposition : 7 à 12 bivalves filtrent à chaque prélèvement. Les taux de clairance observés durant cette exposition sont similaires à ceux observés durant les mises au point de ce test. Le processus de filtration est impliqué dans la nutrition et la respiration de l'organisme ainsi que dans sa capacité à bioaccumuler les contaminants. Or, il semble que l'effluent n'a eu aucun impact sur la capacité de la dreissène à filtrer.

Chez les bivalves, les hémocytes sont les cellules circulantes impliquées dans le transport des nutriments et de l'oxygène ainsi que dans l'immunité. Dans cette étude nous avons choisi d'évaluer trois marqueurs physiologiques des hémocytes (Figure 27) : leur taux de mortalité, la capacité de phagocytose (c'est-à-dire le pourcentage d'hémocytes ayant adhéré/phagocyté trois billes ou moins) et l'efficacité de phagocytose (c'est-à-dire le pourcentage d'hémocytes ayant phagocyté quatre billes et plus). La capacité et l'efficacité de phagocytose sont significativement plus faibles chez les dreissènes exposées à l'effluent dilué que chez celles issues de la condition témoin. En effet, ces deux marqueurs diminuent au cours du temps chez les dreissènes exposées à 50 % d'effluent et 50 % d'eau Cristaline[®] :

- La capacité de phagocytose est significativement plus faible à 28 jours (34,0 % \pm 12,7 %) qu'à T0 (57,7 % \pm 12,7 %), à 2 jours (54,8 % \pm 18 %) et à 7 jours (59,5 % \pm 10,0 %).

- L'efficacité de phagocytose est significativement plus faible à 21 jours ($21,3 \% \pm 13,6 \%$) et à 28 jours ($21,1 \% \pm 12,2 \%$) qu'à T0 ($41,0 \% \pm 15,2 \%$) et à 2 jours ($36,9 \% \pm 18,4 \%$).

Il paraît logique que ces marqueurs soient impactés de la même manière par l'exposition, car ils sont le reflet d'une même réponse : la phagocytose. Cependant, cette diminution n'est observée que dans cette condition d'exposition, aucune variation significative n'est observée chez les dreissènes exposées à l'effluent pur. En effet, on observe un maximum de $58,2 \% (\pm 16,4 \%)$ à 14 jours et un minimum de $47,9 \% (\pm 13,4 \%)$ à 21 jours pour la capacité de phagocytose et un minimum de $30,1 \% (\pm 18,2 \%)$ à 7 jours et un maximum de $41,1 \% (\pm 17,8 \%)$ à 14 jours pour l'efficacité de phagocytose. Il semble donc que la diminution observée pour la condition diluée ne soit pas liée à une toxicité de l'effluent.

Le taux de mortalité des hémocytes diminue au cours du temps pour chacune des trois conditions d'exposition :

- En condition témoin, une baisse significative est observée à 7 jours ($18,1 \% \pm 8,9 \%$) et 28 ($19,4 \% \pm 10,8 \%$) jours par rapport à T0 ($38,3 \% \pm 19,9 \%$) et à 2 jours ($31,0 \% \pm 9,8 \%$).
- En effluent dilué à 50 %, les résultats montrent une baisse significative à 28 jours ($11,7 \% \pm 5,4 \%$) par rapport à T0 ($38,3 \% \pm 19,9 \%$) et à 2 jours ($28,1 \% \pm 11,7 \%$).
- En effluent pur (100 %), une baisse du taux de mortalité est observée à 21 jours ($14,4 \% \pm 8,8 \%$) et 28 jours ($14,6 \% \pm 8,8 \%$) comparée à T0 ($38,3 \% \pm 19,9 \%$) et à 2 jours ($34,8 \% \pm 11,5 \%$).

Les taux de mortalité des hémocytes à T0 et à 2 jours étant très élevés, il semble que la période de stabulation des organismes n'ait pas été suffisante. La diminution de cette mortalité chez toutes les moules zébrées montre une acclimatation des dreissènes durant l'expérimentation.

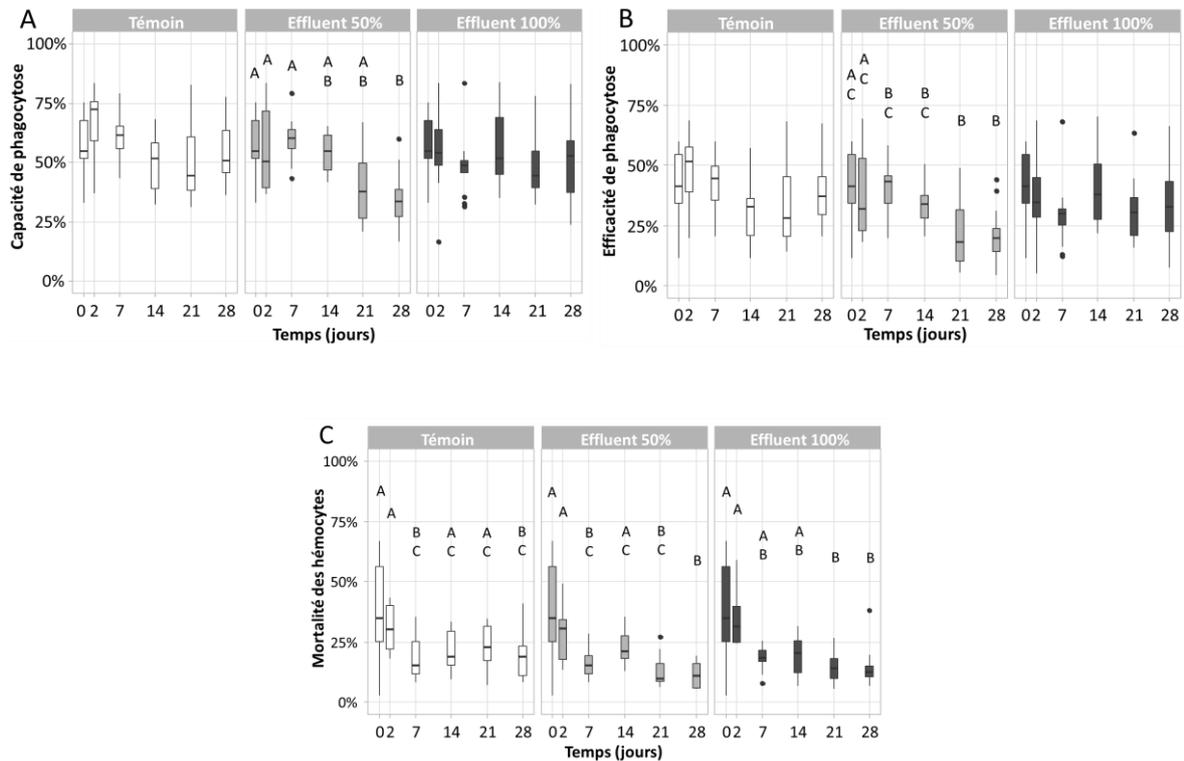


Figure 27 : Statut physiologique des hémocytes (n=12) : capacité de phagocytose (A), efficacité de phagocytose (B) et mortalité des hémocytes (C). Les groupes statistiques (Kruskal-Wallis, post hoc Nemenyi, $\alpha < 0,5\%$) sont représentés par des lettres, les boîtes à moustache n'ayant aucune lettre en commun sont significativement différentes entre elles au sein d'une même condition d'exposition.

Cette expérimentation n'a pas mis en évidence d'effet toxique de l'effluent sur les dreissènes en conditions contrôlées.

II. Evaluation *in situ*

L'effluent n'est pas la seule source potentielle de stress en station d'épuration pour les organismes. Les fortes variations de température, de débit, d'oxygénation ou encore de concentration en produits azotés sont autant de paramètres, qui mêlés au cocktail de contaminants que représente l'effluent de STEP, sont susceptibles d'induire de forts stress chez les organismes. C'est pourquoi, il nous a semblé nécessaire d'évaluer la survie des dreissènes *in situ*.

Synthèse

Afin d'évaluer l'impact des conditions physico-chimiques et toxicologiques de l'effluent de STEP sur le maintien de la dreissène et sur sa capacité de bioremédiation, les moules zébrées ont été engagées dans le canal de sortie de la station d'épuration de Charleville-Mézières (Ardennes, France) durant 28 jours (du 21 juin au 19 juillet 2017 ; Figure 28). A chaque temps de prélèvement (0, 2, 7, 14, 21 et 28 jours) plusieurs biomarqueurs sont mesurés : réserves énergétiques (taux de lipide et de glycogène), activités des enzymes antioxydantes (catalase et superoxyde dismutase), activité d'une enzyme de détoxification (Glutathion-S-transférase), taux de clairance, l'expression relative des gènes impliqués dans les défenses antioxydantes (Catalase – *cat*, Superoxyde dismutase – *sod*, Glutathion peroxydase – *gpx*), détoxification (Glutathion-S-transférase – *gst*) ou encore dans le métabolisme cellulaire (ATP synthase – *atp* et Cytochrome-c-oxydase – *cox*). Les paramètres physicochimiques de l'effluent ont été mesurés à chaque temps de prélèvement (Table 15) mais également durant les opérations de maintenance de la STEP (Table 16). Dans le but de s'assurer que les dreissènes soient capables de remplir leur rôle de bioremédiatrices des

protozoaires malgré les conditions de l'effluent, les parasites ont été recherchés dans les tissus des dreissènes au cours de chaque prélèvement ($n= 12$). En parallèle, en vue d'évaluer l'impact de l'effluent sur la croissance des individus, deux cages contenant de jeunes moules (72 dreissènes de $12,7 \pm 1,5$ mm) ont été réalisées : l'une a été déposée dans le canal de sortie tandis que l'autre a été déposée dans la Meuse en amont de la STEP (condition témoin). Cependant, le taux de croissance ayant été très faible dans les deux cages ($0,2 \pm 0,2$ mm), aucune conclusion n'a pu être apportée. En effet, les dreissènes pêchées pour cette étude étaient déjà trop grandes pour avoir une croissance très active en seulement 28 jours.



Figure 28 : Canal de sortie de STEP de Charleville-Mézières, le lieu d'encagement des dreissènes est indiqué par une flèche.

Les paramètres physicochimiques mesurés dans le canal de sortie de l'effluent montrent des conditions d'oxygénation faible ($48 \% \pm 1,5 \%$) ainsi qu'une vitesse de l'eau élevée (estimée entre $0,4$ et $0,6 \text{ m.s}^{-1}$). Ces conditions peuvent être préjudiciables pour la moule zébrée : un taux d'oxygénation inférieur à 50% peut induire un stress hypoxique et une vitesse de l'écoulement supérieure à $0,2 \text{ m.s}^{-1}$ inhiberait le taux de filtration (Ackerman, 1999). Le taux de clairance a été mesuré sur 20 individus, identifiés par un numéro, durant toute la durée de

l'expérimentation. Ce taux diminue significativement (Figure 30) durant la transplantation des moules dans l'effluent par rapport au T0 ($85,9\% \pm 9,4\%$), de plus à 28 jours le taux de clairance ($17,0\% \pm 9,4\%$) tend à diminuer par rapport à 21 jours et le nombre de moules ayant filtré est faible (8/15). Cependant après 5 jours de dépuración en eau claire au laboratoire ces mêmes individus recouvrent un taux de clairance élevé ($71,5\% \pm 12,4\%$) ce qui laisse supposer qu'aucune atteinte irrémédiable n'a été portée aux branchies et/ou à la fonction de filtration. Dans la glande digestive ($n= 12$, Figure 33), l'expression de la *cox* diminue uniquement à 28 jours ($3,6e^{+13} \pm 1,1e^{+20}$) par rapport à T0 ($6,9e^{+15} \pm 1,9e^{+16}$), 2 jours ($2,3e^{+20} \pm 7,5e^{+20}$) et 7 jours ($5,6e^{+19} \pm 1,9e^{+20}$) d'exposition alors que dans les branchies ($n= 12$, Figure 34) son niveau d'expression diminue de 7 à 21 jours (respectivement : $6,0e^{+08} \pm 2,0e^{+09}$; $6,9e^{+06} \pm 1,5e^{+07}$ et $2,6e^{+06} \pm 4,7e^{+06}$) par rapport au T0 ($1,7e^{+28} \pm 6,0e^{+28}$). L'expression de l'*atp* quant à elle diminue significativement dans les branchies entre 2 jours d'exposition ($16,7 \pm 31,1$) et 21 jours ($3,6e^{-02} \pm 7,0e^{-02}$). Certains auteurs ont montré qu'une sous-régulation de l'expression de la *cox* refléterait un stress hypoxique chez certaines espèces (Brown-Peterson *et al.*, 2005, McMullen & Storey, 2008, Woo *et al.*, 2013), ce qui pourrait expliquer les diminutions que l'on observe dans notre étude.

Concernant les activités des enzymes antioxydantes ($n= 12$, Figure 32), seule l'activité catalase varie dans la glande digestive : on observe une augmentation significative à 28 jours ($261\,420 \pm 55\,536$ UI.g⁻¹ de protéine) comparée à 2 jours d'exposition ($159\,603 \pm 70\,649$ UI.g⁻¹ de protéine). De plus, dans la glande digestive l'expression de la *gpx* augmente également à 28 jours ($1,4e^{-08} \pm 3,0e^{-08}$) par rapport à T0 ($1,4e^{-13} \pm 4,0e^{-13}$) et 21 jours d'exposition ($2,5e^{-13} \pm 6,8e^{-13}$; Figure 33). Cette stimulation des défenses antioxydantes souligne un stress oxydatif des organismes après 28 jours dans l'effluent. Ce stress pourrait avoir plusieurs origines, certains auteurs ont mis en évidence que l'exposition à différents polluants entraînerait un

stress oxydatif chez la dreissène (Binelli *et al.*, 2011, Faria *et al.*, 2009, Navarro *et al.*, 2011, Parolini *et al.*, 2010, 2015), tandis que d'autres suggèrent qu'un stress hypoxique provoquerait un stress oxydatif (Alves de Almeida *et al.*, 2007, Chandel *et al.*, 2000). Après 28 jours d'encagement dans l'effluent, les résultats montrent une baisse de la qualité de maintien des organismes : activation des défenses immunitaires, diminution de l'efficacité de filtration et un fort taux de mortalité (24 %).

Les réserves énergétiques sont connues pour être soumises aux variations saisonnières ainsi qu'au cycle de reproduction, or, notre expérimentation se déroule entre Juin et Juillet 2017 en période de post-ponte. En effet, une diminution des lipides est observée durant l'été en période de post-ponte chez les dreissènes, ceci explique la diminution du taux de lipides (n=12, Figure 31) mise en évidence entre 7 jours ($0,56 \pm 0,56 \text{ mg.g}^{-1}$) et 28 jours ($0,18 \pm 0,09 \text{ mg.g}^{-1}$). Cette diminution du taux de lipides engendre une perte de poids chez l'organisme et donc une diminution de l'indice de condition (Figure 29).

Les résultats montrent que *Dreissena polymorpha* est capable de se maintenir dans de bonnes conditions physiologiques jusqu'à 21 jours dans l'effluent *in situ*. Cependant, après 28 jours son statut physiologique décline, ceci pourrait être en partie dû au stress hypoxique de l'effluent. Néanmoins, malgré les conditions stressantes présentes dans le canal de la STEP, les dreissènes ont joué leur rôle de bioremédiation vis-à-vis des protozoaires (Table 18). En effet, des oocystes de *Toxoplasma gondii* ont été détectés dans les tissus de dreissènes dès 2 jours d'exposition (2/12) et ce jusqu'à 28 jours (7/12). Les kystes de *Giardia duodenalis*, quant à eux, ont été détectés à 2 jours (4/12) ainsi qu'à 7 jours (1/12) d'exposition uniquement.

Article : Resilience of *Dreissena polymorpha* in wastewater effluent: use as a bioremediation tool?

Soumis dans la revue Environmental Research

Elodie Géba^{1,4}, Damien Rioult^{1,2}, Olivier Palluel³, Odile Dedourge-Geffard², Stéphane Betoulle¹,
Dominique Aubert⁴, Aurélie Bigot-Clivot^{1*}

¹ *Université de Reims Champagne Ardenne, UMR-I 02 SEBIO (Stress Environnementaux et BIOSurveillance des milieux aquatiques), UFR Sciences Exactes et Naturelles, Campus Moulin de Housse, BP 1039, 51687 Reims cedex 2, France*

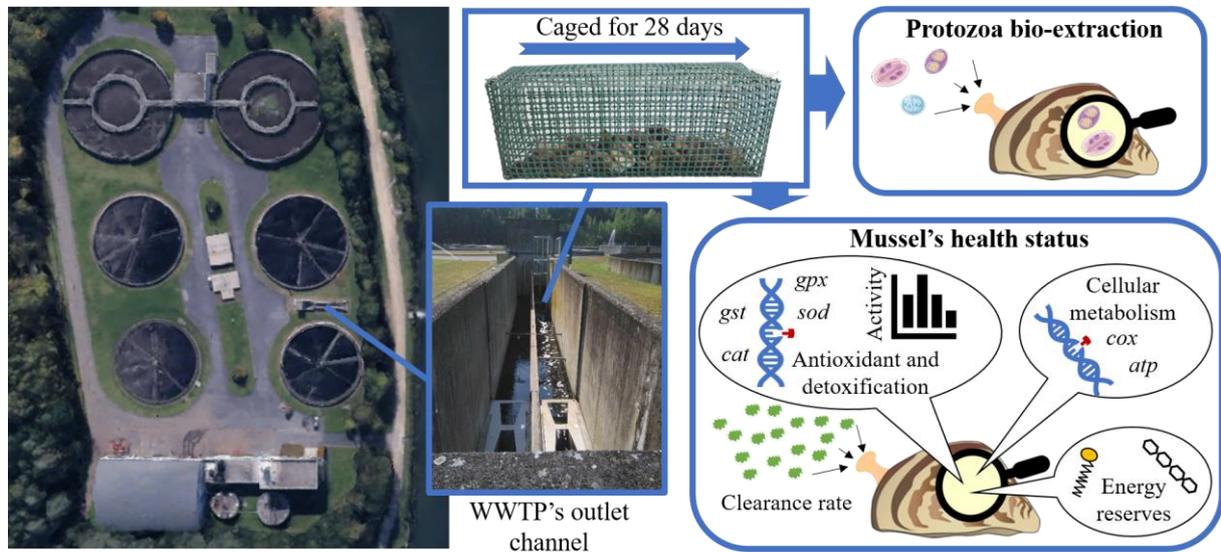
² *Université de Reims Champagne Ardenne, Plateau technique mobile de cytométrie environnementale MOBICYTE, Campus Moulin de la Housse, 51687 Reims, France.*

³ *Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), UMR-I 02 SEBIO (Stress Environnementaux et BIOSurveillance des milieux aquatiques), Unité d'Ecotoxicologie in vitro et in vivo, Verneuil-en-Halatte, France.*

⁴ *Université de Reims Champagne Ardenne, EA7510, ESCAPE (EpidémioSurveillance et Circulation des Parasites dans les Environnements) Université de Reims Champagne Ardenne, Faculté de Médecine, SFR Cap Santé Fed 4231, 51 Rue Cognacq Jay, 51096 Reims, France.*

*Corresponding authors: aurelie.bigot@univ-reims.fr

Graphical abstract:



Highlights:

- *Dreissena polymorpha* maintained in good health until 21days in wastewater.
- Some biomarkers suggested a hypoxic stress in outlet channel of WWTP at 28 days.
- Zebra mussel have bioaccumulated pathogenic protozoa during the exposure.
- *D. polymorpha* seems to be a promising tool for bioremediation in wastewater.

Abstract

Nowadays, it is necessary to improve the efficiency of wastewater treatment plant treatments. In this context the use of biofilter species, like *Dreissena polymorpha*, as a bioremediation tool in wastewater is increasingly highlighted. The aim of this study is to evaluate the zebra mussel survival in the outlet channel of a conventional WWTP in order to use them as bioremediation tool. For this, mussels were transplanted in the outlet channel for 28 days and different biomarkers were monitored. *D. polymorpha* maintained in good health until 21 days, yet at 28 days a high mortality rate (24 %), a decrease in filtration efficiency (8/15 filtered mussel and 17.0 % of clearance rate) and antioxidant system activation (CAT activity et *gpx* gene expression increase) suggest an exhaustion. Some biomarkers suggested a hypoxic stress. Despite the unfavourable conditions, bivalves have bioaccumulated pathogenic protozoa (*Toxoplasma gondii* and *Giardia duodenalis*) during the exposure. Zebra mussel seems to be a promising tool for bioremediation in wastewater.

Keywords: Zebra mussel; *Toxoplasma gondii*; *Giardia duodenalis*; *Cryptosporidium parvum*; Wastewater treatment plant

1. Introduction

Wastewater treatment plants (WWTP) are historically engineered to eliminate macropollutants (suspended solids, organic matter and nutrients) from wastewater effluent. Therefore, the conventional WWTP are inefficient for reducing several pollutants, such as pharmaceuticals, pesticides, personal care products or drugs (Bottoni et al., 2010; Eriksson et al., 2003; Munz et al., 2017). Chemical contaminants may be environmentally dangerous due their high persistence and low degradability (Farré et al., 2008). Beside this chemical problematic, WWTP's effluents are known to be contaminated by biological contamination (bacteria, viruses, protozoans...) which is a great concern to the public health because of its high associated infectious risk. Indeed, pathogenic microorganisms such as protozoa (Ajonina et al., 2012; Nasser et al., 2012; Ramo et al., 2017), bacteria (Ottoson et al., 2006) or enterovirus (Gibson, 2014; Okoh et al., 2010) may resist to some disinfection process and remain in effluents. All these residual biological and chemical pollutions put the improvement of effluent treatment as the centre concern of public and environmental health priorities. Nowadays, the main challenge is to design a new WWTP able to remove such contamination by reducing the infectiousness from effluents. This requires the introduction of new tertiary wastewater treatment, like reverse osmosis (Al-Rifai et al., 2011), ozonation (Reungoat et al., 2012), biological filtration (Kitajima et al., 2014; Reungoat et al., 2012), UV disinfection (Das, 2001; King et al., 2017) or membrane filtration (Ramo et al., 2017; Snyder et al., 2007). However, some of these processes may result in increased of effluent toxicity (Berninger da Costa et al., 2014; Magdeburg et al., 2012; Stalter et al., 2010) and can be very expensive (Alhumoud et al., 2010).

Recently, using biofilter species - as bivalves - for treatment of WWTP effluents is increasingly highlighted (Gifford et al., 2009; Gomes et al., 2018; McLaughlan and Aldridge, 2013). This is particularly the case of the fresh water mussel *Dreissena polymorpha* whose biological characteristics give it qualities adapted to this applied context. Indeed, *D. polymorpha* has a great filtration rate between 5 to 400 mL. bivalve⁻¹.h⁻¹ (Ackerman, 1999; Baldwin et al., 2002) and can filter a wide range of particle from 0.7 µm (Sprung and Rose, 1988) to 1 200 µm (Horgan and Mills, 1997). This mussel is able to reach a high population density, more than 32,000 mussels.m² (Berkman et al., 2000), giving them a very strong biofiltration capacity. Zebra mussels are considering as “ecosystem engineer” by filtering and redistributing aquatic nutrients (Karatayev et al., 2002; Zaiko et al., 2009) leading to reduce the eutrophication in some lakes (Arnott and Vanni, 1996; Goedkoop et al., 2011). Qualified as invasive species *D. polymorpha* has a high tolerance for chemical contaminations and physico-chemical conditions, which survives at elevated temperatures (up to 28 °C), moderate salinity (from 6 % to 10 %) and a wide pH range (from 6.5 to 9.3) (Bowman and Bailey, 1998; McMahon, 1996). The combination of its resistance to a broad range of conditions and its great biofiltration capacity makes this species a promising tool for the development of a new wastewater treatment procedure using it. Some authors have shown that *D. polymorpha* was able to extract and degraded chemicals and organic matter in a WWTP effluent, despite their multi-contaminated living conditions. Indeed, in the Milan’s pilot-plant (Milano-Nosedo, Italy), zebra mussel led to reduction in chromium (Magni et al., 2015), *Escherichia coli* bacteria (Mezzanotte et al., 2016) and pharmaceuticals concentrations in water (Binelli et al., 2014) and were able to inactivate enterovirus (Mezzanotte et al., 2016) in effluent. Elliott et al. (2008) underlined a clearance rate of 574 mL.h⁻¹.g⁻¹ of zebra mussel in wastewater effluent. The use of this species as a biofilter for wastewater epuration could therefore be an original

and low-cost solution to improve water quality by reducing the associated health risk (Gomes et al., 2018). It is therefore important to verify that this mollusc is able to withstand the particular and extreme physicochemical conditions of WWTP effluent. All the previous studies were carried out in semi-controlled conditions (controlled flow rate and temperature) or in a closed system where the physiological status of exposed mussels were not evaluated (Binelli et al., 2014; Elliott et al., 2008; Magni et al., 2015).

The aim of this study is to assess physiological responses and the survival of *D. polymorpha* in wastewater under field condition to assess its use as a bioremediation tool. For this, zebra mussels were caged in the outlet channel of a conventional WWTP for 28 days. During the exposure, different biomarkers were monitored such as energy reserve level (lipid and glycogen), activity of phase II detoxification (Glutathione S-Transferase) and antioxidant enzymes (Catalase and Superoxyde Dismutase) and relative gene expression of genes involved in cellular metabolic activities (Cytochrome-c-oxidase – *cox*, and ATP synthase – *atp*), detoxification process (Glutathione S-Transferase – *gst*) and oxidative stress (Catalase – *cat*, Superoxyde Dismutase – *sod* and Glutathion peroxidase – *gpx*). These biomarker responses may inform to the physiological state of caged mussels. Moreover, in order to determine zebra mussel biofiltration capacity under these stressful exposure conditions, their clearance rate was monitored throughout all the exposure duration. To ensure that these bivalves are able to performed their role as bio-extraction of biological contaminants, bioaccumulation of pathogenic protozoa as *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* were analysed in caged mussels (Graczyk et al., 2004; Lucy et al., 2010; Palos Ladeiro et al., 2014). Their environmental resistance forms, oocyst or cyst, are known to persist in the environment for a long time and contaminated water and food (Fayer et al., 2004; Shapiro et al., 2019) and have already been detected in wastewater effluent (Carmen Gallas-Lindemann

et al., 2013; Ramo et al., 2017). These waterborne pathogens have been identified as public health priorities by the World Health Organization (WHO, 2012).

2. Materials and methods

a. Mussel collection

Zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, were collected in June 2017 in the Der-Chantecoq lake (N48°34'00", E 4°45'00", France). In laboratory, mussels measuring 29.0 ± 2.0 mm were acclimated (6 L and 95 mussels per tank) in the dark in aerated mineral water (Cristaline®, Aurèle, France) at 18 ± 1 °C during two weeks in four tanks. Mussels were caged (cage: 20x7x7 cm, mesh 0.5 cm) one week before the experiment to allow their byssus fixation. One cage contained 20 zebra mussels individually identified with a number on their shell (with oil based marker, 4Artist Marker, Pébéo®) for clearance rate measurement and six cages contained 60 zebra mussels for biomarkers measurement. During their lab acclimation phase, mussels were fed twice a week with 2×10^6 cells of *Chlorella pyrenoidosa* per mussel per day.

b. Transplantation conditions

Mussel cages were caged from 21st June to 19th July 2017 in the outlet channel of Charleville-Mézières' WWTP (4°43'45.1103" E; 49°45'57.9935" N; France) before effluent discharge into the river. This conventional wastewater treatment plant was commissioned in 1996 in its current form named "activated sludge and phosphorus/nitrogen treatment" and mainly received domestic wastewater. Forty-eight mussels, previously caged, were sampled and stored at -80 °C to evaluate biomarkers responses and 12 mussels were sampled and frozen at -80 °C to check the absence/presence of protozoa in their tissues before

transplantation. During the 28 days of exposure period, one cage with 60 mussels was sampled at 2, 7, 14, 21 and 28 days to measure biomarker responses. The 20 identified mussels were removed from the channel at each sampling period to measure their clearance rate and then put back in the channel. After 28 days of exposure, cage containing the 20 numbered mussels was brought back to the laboratory and mussels were put into clear water for 5 days in order to measure their clearance rate in laboratory condition.

For each exposure time, the condition index (CI) of mussels (n= 24) was calculated using the following formula: $CI = \frac{\text{soft body wet weight}}{\text{total wet weight}}$.

At the beginning (day 0, D0) and at the end (day 28, D28) of exposure, 20L of water were sampled in the outlet channel for protozoan research. At each sampling time, temperature (°C), conductivity ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), pH, oxygen level (%), nitrate, nitrite and ammonium concentrations ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) were measured in outlet channel (Table 15). Temperature, conductivity, pH and oxygen level were assessed using a multiparameter probe pHenomenal® MU 6100 H (VWR™, Fontenay-sous-Bois, France) and nitrate, nitrite and ammonium concentrations were quantified using DR/2000 Spectrophotometer (HACH®, Colorado, USA) according to the manufacturer's instructions.

Table 15 : Physico-chemical parameters measured in outlet channel for each sampling time.

Sampling days	Temperature (°C)	Conductivity ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	pH	Oxygen (%)	Nitrite ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Nitrate ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ammonium ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
D0	20	1043	7.2	50.5	0.396	9.7	1.99
D2	20,7	1095	7.2	49.4	0.327	14.1	3.39
D7	21	818	7.3	46.9	0.317	11.9	1.91
D14	20.3	872	7.1	47.4	0.224	11.0	0.66
D21	20.4	710	7.2	47.5	0.218	10.1	0.59
D28	22	943	7.2	46.6	0.165	11.4	0.54

The WWTP manager provided additional data related to effluent physico-chemical characteristics, in outlet channel, for each week of exposure period (Table 16) : flow rate ($\text{m}^3\cdot\text{day}^{-1}$), suspended particulate matter (SPM; $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), chemical oxygen demand (COD; $\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$), biochemical oxygen demand (BOD; $\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$), nitrogen ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; Kjeldahl method), phosphorus level ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and pluviometry (mm).

Table 16 : Physico-chemical parameters measured in outlet channel for each week provided by the WWTP managers (mean \pm sd). SPM: Suspended Particulate Matter; COD: Chemical Oxygen Demand and BOD: Biochemical Oxygen Demand.

	Flow rate ($\text{m}^3\cdot\text{day}^{-1}$)	Pluviometry (mm)	SPM ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	COD ($\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$)	BOD ($\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$)	Nitrogen ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Phosphorus ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
D0-D2	12,293 \pm 183	0.0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
D2-D7	14,135 \pm 5,216	20.1	3.8 \pm 1.1	23.5 \pm 3.5	3.0 \pm 0.0	3.2 \pm 0.8	0.4 \pm 0.1
D7-D14	19,714 \pm 7,724	17.5	3.6 \pm 2.4	16.1 \pm 3.1	3.2 \pm 0.3	1.1 \pm 0.2	0.9 \pm 0.2
D14-D21	17,736 \pm 5,213	22.5	3.7 \pm 1.2	16.7 \pm 2.0	3.3 \pm 0.4	1.2 \pm 0.2	0.6 \pm 0.1
D21-D28	14,303 \pm 5,932	1.8	2.2 \pm 0.3	15.5 \pm 1.0	3.5 \pm 0.7	1.4 \pm 0.4	1.9 \pm 0.4

c. Clearance rate

The clearance rate of the twenty identified *Dreissena polymorpha* was monitoring at each exposure time directly on the field. Mussels were individually deposited at the bottom of a 50mL tube (Falcon®) containing effluent. Tube's caps have been previously pierced to allow the aerate system functioning during the clearance rate measurement period. Then, 1×10^6 microalgae (*Chlorella pyrenoidosa*) were spiked in each tube filled with 45mL freshly collected effluent. Bivalves have been filtering during 90 min and was collected in each tube at 0 min and 90 min. Number of microalgae was quantified for each sample using flow cytometer BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, N.Y., USA) in 50µL at 35 µL.min⁻¹ depending on cell complexity (SSC) and cell size (FSC). Results were expressed on percentage of filtered cells 1mL (without pseudofaeces and faeces) in 45mL during 90min using following formula:

$$\left[\frac{N_{0min} \times N_{90min}}{N_{0min}} \right] \times 100, \text{ with } N = \text{ number of quantified microalgae}$$

d. Biochemical analyses

i. Energy reserves

Digestive glands (n= 12) and gills (n= 12) were homogenized in an ice-cold phosphate buffer (0.01M, pH 6.5, 10µL per mg of tissues) using a homogenizer 400MM (Restch®, Eragny, Luxembourg) with 3 stainless steel beads (4mm diameters) during 3min at 30Hz. Lipid and glycogen were extracted and measured according to the protocol adapted from Cheng *et al.* (2011) and Van Handel (1965) respectively, using Cary® spectrometer (Varian, Californie, USA). Olive oil (Sigma-Aldrich Chemicals, France) and glucose solutions (Sigma Aldrich Chemicals, France) were used as standards. Results were expressed on mg.g of wet weigh⁻¹ tissue.

ii. Enzymatic assays

Digestive gland (n= 12) and gills (n= 12) were homogenized in 250 μ L of potassium phosphate buffer (100 mM, pH: 7.4, Sigma) modified with glycerol (20 %, Sigma) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 2 μ M, Sigma-Aldrich Chemicals, France) at 70 Hz during 10s. Samples were centrifuged at 10,000 g for 15min at +4 °C and supernatant was stored at -80 °C until analysis. Protein concentration was assessed using Bradford method (1976) with bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Chemicals, France). Homogenates were normalized to the protein concentration using robotic platform Freedom EVO[®] (Tecan, Männedorf, Suisse) at the level of: 0.6 g.L⁻¹, 0.5 g.L⁻¹ and 0.75 g.L⁻¹ for gills and 0.3 g.L⁻¹, 0.5 g.L⁻¹ and 0.75 g.L⁻¹ for digestive gland respectively for catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione-S-transferase (GST) assays. CAT, SOD and GST activities were measured according to protocols adapted from Babo & Vasseur (1992), Paoletti *et al.* (1986) and Vandeputte *et al.* (1994) respectively using a microplate reader Hybrid Synergy[™] H4 (BioTek[™], Vermont, USA). Results were expressed in enzymatic unity per g of protein (U.g⁻¹).

e. Gene expression levels

Total RNA was extracted from digestive glands (n= 12) and gills (n=12) using TriReagent (MRC-Research, USA) following the manufacturer's instructions. RNA integrity was estimated by UV revelation after electrophoresis on 1% agarose gel in Tris Borate EDTA (0.5 %) buffer. RNA purity was estimated by the measurement of the ratio of absorbance at 260 and 280 nm using Jenway[™] Genova Nano spectrometer (Fisher Scientific, France). Reverse transcription was performed on 400 ng of total RNA using Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, France). The reaction was conducted at 42 °C for 30 min using a PCR Mastercycler (Eppendorf).

Evaluation of *cox*, *atp*, *gst*, *cat*, *gpx* and *sod* gene expressions was carried out by real-time quantitative PCR using Absolute Blue qPCR SYBR Green ROX Mix (Thermo Scientific, France) according to the manufacturer's instructions. Two housekeeping genes were also analyzed, *s3* (ribosomal protein S3) and *act* (actin), according to Navarro *et al.* (2011). Specific reverse and forward primers are given in Table 17.

Table 17 : Summary of primer pairs used for PCR. Abbreviation, sequences of the designed primers, NCBI accession numbers of the original sequences of the studied genes, PCR efficiencies and primer concentrations in PCR are presented.

Gene	Abbreviation	NCI	F primer	R primer	E	Conc. (mM)
Actine	<i>act</i>	AF082863	CCTCACCTCAAGTAC CCCAT	TTGGCCTTTGGGTT GAGTG	0.98	300
Ribosomal protein S3	<i>s3</i>	AJ517687	CAGTGTGAGTCCCTG AGATAAAG	AACTTCATGGACTT GGCTCTCTG	1.00	150
Cytochrome c Oxidase	<i>cox</i>	AAL55513 .1	AGGCCCTGCGATAGA TTTTT	AAAGGGACCCGGT AAAATTG	0.90	300
ATP Synthase	<i>atp</i>	JQ781135 .1	GACTCCACCTCCCGT ATCCT	TCCTCTGAAAGCTC GTCCAT	0.89	600
Glutathion S Transferase	<i>gst</i>	DQ45999 3	TCCGCTATATCTGCCT GGAC	GCTCCTTCAGACCT GCTTTC	0.99	600
Catalase	<i>cat</i>	EF681763	ACGGCTATGGAAGCC ACACG	AGGTCGCGCATCGC ATAGTC	0.99	600
Glutathion Peroxidase	<i>gpx</i>	EF194204	TAGACCGCCGCTCGG TAATC	CACTCCCAGCACCT GGAAAC	0.78	600
Superoxide Dismutase	<i>sod</i>	AY377970	GACAGCATGGCTTCC ATGTG	AGATTCTGGGCCAG TCAGAG	0.99	600

Dilutions of the cDNA mixture between 1:10 and 1:1000 were tested to calculate the PCR efficiencies (E). The PCR steps consisted of 15-min initial denaturation at 95 °C followed by 40 cycles of heat denaturation at 95 °C for 10 s, annealing at 60 °C for 60 s and was carried out in a CFX96 Touch™ (Bio-Rad, France). To ensure that there was no contamination, no template control (NTC) and no reverse transcription control (No RT) were performed. The Ct (threshold cycle) corresponding to the number of PCR cycles at which a significant exponential increase in fluorescence is detected was collected. The relative gene expression level was calculated

using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method taking into account the PCR efficiency (E) and normalized by the geometric mean of the 2 housekeeping genes (Livak and Schmittgen, 2001).

f. Protozoa detection in *D. polymorpha* tissues and wastewater samples

Whole mussel tissues (n= 12) were digested by 1X trypsin during 1h30 at 37 °C under 90 rpm agitation. Tissue homogenate was centrifuged at 5,000 g during 5 min and pellet was stored at -20 °C until DNA extraction.

Water samples (20 L) were filtered using Envirocheck® capsules (Pall Life Sciences, France), particulate matters were eluted from the capsule filter (1 µm absolute pore size) with 200 mL elution buffer (Tris-EDTA buffer (0.01 M/0.001 M) containing SDS (1 g/L)). Eluates were centrifuged at 1,500 g during 10 min without brake, the supernatants were discarded, and pellets stored at -20 °C.

DNA was extracted according to protocol described by Géba et al (2020 *in press*), using the FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France). DNA parasite (*Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* and *Toxoplasma gondii*) detection was carried out by TaqMan real-time qPCR in a CFX96 Touch™ thermocycler (Bio-Rad, USA) according to Géba et al (2020 *in press*).

g. Statistical analysis

All statistical analyses were performed with R software (3.5.2 version). As physiological data did not comply with the parametric assumption of normality (Shapiro-Wilk tests) and homogeneity of variance (Levene tests), nonparametric tests were used. Kruskal–Wallis test and Nemenyi test for post hoc pairwise comparisons were used ($\alpha < 5 \%$).

3. Results

a. Mortality rate and condition index

No dead mussels were observed at 0, 2 and 7 days, but 4 % (3/80) of mortality were noted at 14 days of transplantation, 9 % (7/80) at 21 days and 24 % (19/80) at 28 days of exposure. The condition index decreased with time until it becomes significantly different ($\alpha \leq 0.05$) between D0 (0.18 ± 0.02) and 14 days (0.16 ± 0.02), 21 days (0.15 ± 0.02), 28 days (0.15 ± 0.03) of exposure (Figure 29).

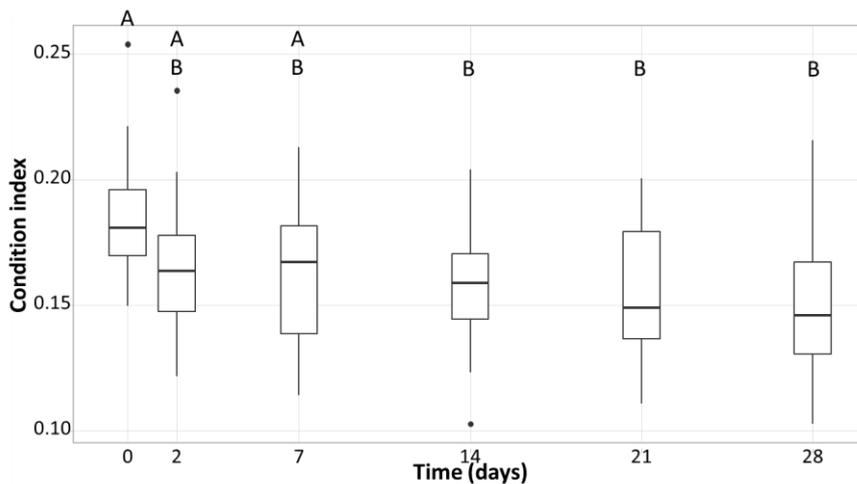


Figure 29 : Condition index variation ($n=24$; median and quartile) at each sampling time. Statistical groups are indicated above boxplot; groups with no common letters are statistically different from each other (Kruskal-Wallis, Nemenyi, $p \leq 0.05$).

b. Clearance rate

On the 20 identified mussels, some died during the experiment. Number of filtered bivalves varied during the exposure, 18/20 bivalve have filtered at D0, 16/20 at 2 days, 16/20 at 7 days, 18/19 at 14 days, 14/17 at 21 days and 8/15 at 28 days of exposure and 9/14 after 5 days of depuration. The highest clearance rate was observed at D0 ($85.9 \% \pm 9.4 \%$), then the clearance rate decreased significantly ($\alpha \leq 0.05$) during the exposure from 2 to 28 days of

exposure (Figure 30). The lowest value was measured at 28 days of exposure ($17.0\% \pm 11.9\%$), but after 5 days of depuration in laboratory (D33) the clearance rate increased significantly ($71.5\% \pm 12.4\%$).

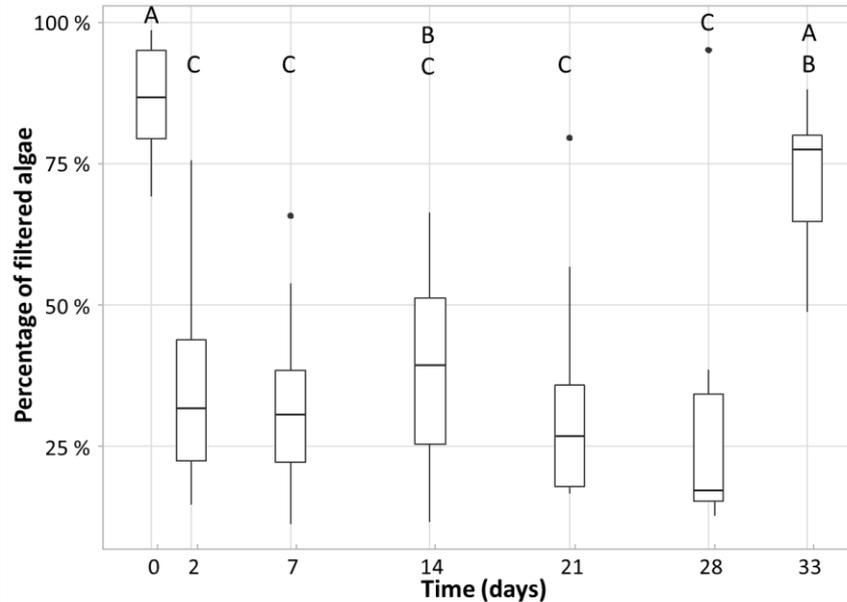


Figure 30 : Clearance rate in percentage of filtered algae during 90min ($n=20$; median and quartile) at each sampling time (0, 2, 7, 14, 21 and 28 days) and after 5 days of depuration in clear water (33 days). Statistical groups are indicated above boxplot; groups with no common letters are statistically different from each other (Kruskal-Wallis, Nemenyi, $p \leq 0.05$).

c. Energy reserve level

Lipid level ($\text{mg.g wet weight}^{-1}$) gradually decreased between 14 days ($0.27 \pm 0.17 \text{ mg.g wet weight}^{-1}$) up to 28 days ($0.18 \pm 0.09 \text{ mg.g wet weight}^{-1}$). A significant decrease was observed over time between 7 days and 28 days ($p = 0.029$) and between 2 days and 28 days of transplantation ($p = 0.016$; Figure 31 A). No significant variation was observed for glycogen level ($\text{mg.g wet weight}^{-1}$; Figure 31 B) ranged from $22.6 (\pm 13.9 \text{ mg.g wet weight}^{-1})$ at 2 days to $11.3 (\pm 4.9 \text{ mg.g wet weight}^{-1})$ at 21 days.

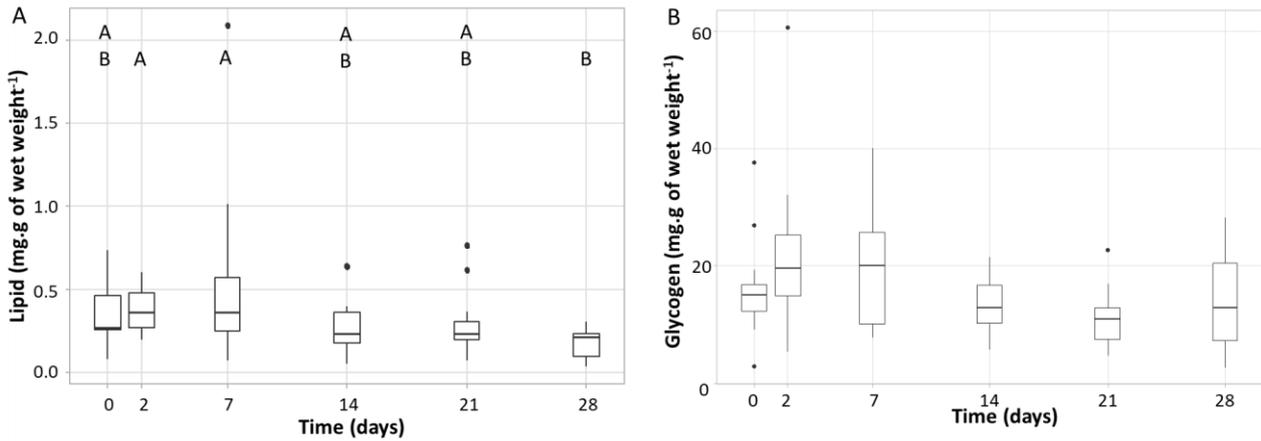


Figure 31 : Energy reserves levels in mg.g of wet weight⁻¹ (n= 12; median and quartile) at each sampling time (0, 2, 7, 14, 21 28 days) : lipid level (A) and glycogen level (B). Statistical groups are indicated above boxplot; no common letter indicate significant difference (Kruskal-Wallis, Nemenyi, $p \leq 0.05$).

d. Antioxidant defences and cellular metabolism

SOD activity didn't significantly vary during the exposure period for digestive glands or gills (Figure 32 A). In digestive gland (n= 12), SOD activity reached a minimal value at 2 days ($1,523 \pm 672$ U.g of protein⁻¹) and a maximal value at 14 days of exposure ($2,616 \pm 1,205$ U.g of protein⁻¹). In gills (n= 12), the same pattern was observed with a minimum at 2 days ($1,265 \pm 691$ U.g of protein⁻¹) and a maximum at 14 days of exposure ($2,172 \pm 611$ U.g of total protein⁻¹; Figure 32 A).

CAT activity in digestive gland (n= 12) was significantly higher at 28 days ($261,420 \pm 55,536$ U.g of protein⁻¹) of exposure than at 2 days ($159,603 \pm 70,649$ U.g of protein⁻¹; Figure 32 B). In gills (n= 12), no significant variation was measured and CAT activity was lower and less varied than in digestive glands ($p < 2.2e^{-16}$). CAT activity reached a maximum value at 14 days of exposure ($73,145 \pm 15,296$ U.g of protein⁻¹) and minimum at 28 days of exposure ($52,859 \pm 17,457$ U.g of protein⁻¹; Figure 32 B).

GST activity also didn't significantly vary for digestive glands or gills (Figure 32 C). In digestive gland (n= 12), GST activity reached a minimum at 2 days (796 ± 363 U.g of protein⁻¹) and a maximum at 28 days of exposure ($2,104 \pm 963$ U.g of protein⁻¹), there was too many inter-individual variations for observed a significant difference. In gills (n= 12), GST activity values were lower and less variable than in digestive glands ($p = 7.98e^{-16}$), a maximal activity was observed at 7 days (586 ± 180 U.g of protein⁻¹) and a minimal activity at 28 days of exposure (460 ± 182 U.g of protein⁻¹).

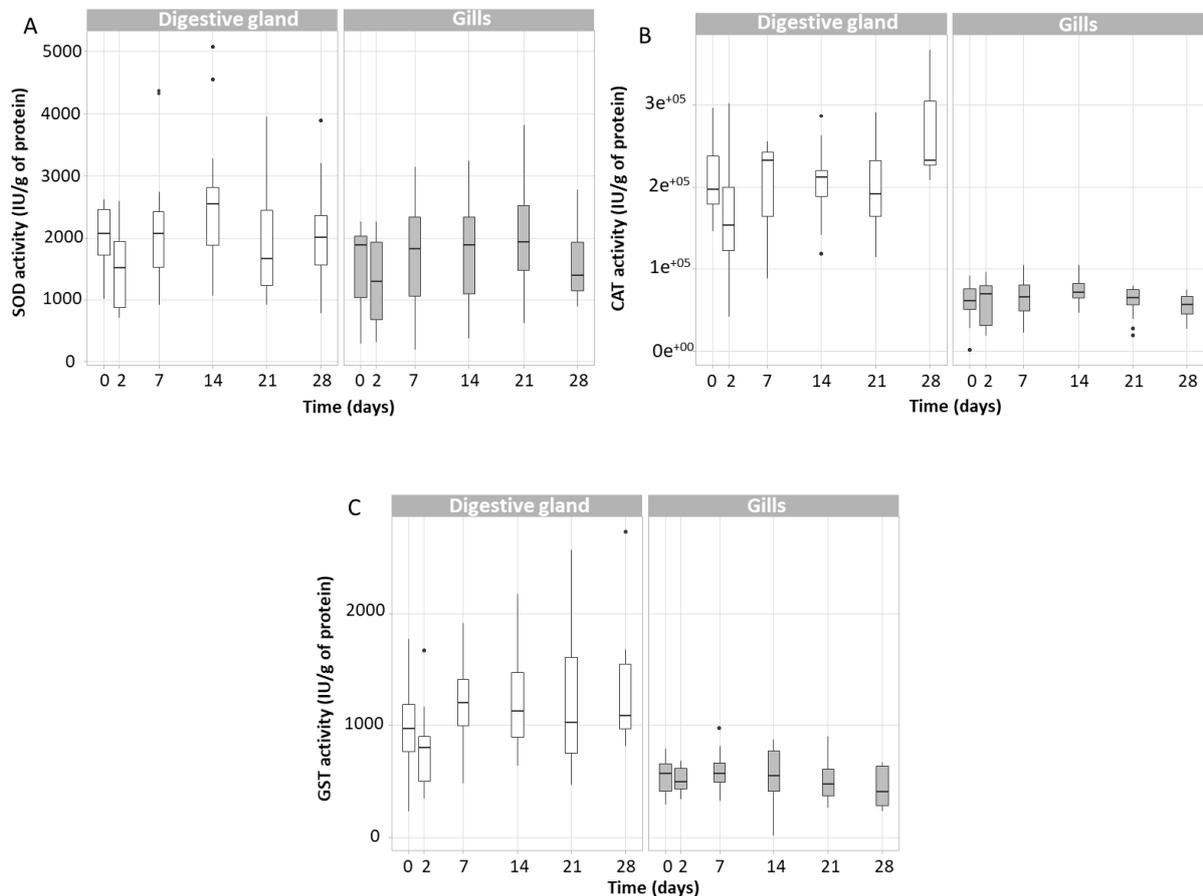


Figure 32 : Enzymatic activities in enzyme unit per g of total protein (median and quartile) for digestive glands (n= 12) and gills (n= 12) at each sampling time 0, 2, 7, 14, 21 28 days : SOD activity (A), CAT activity (B) and GST activity (C). Statistical group are indicated above boxplot; * indicates significant difference (Kruskal-Wallis, Nemenyi, $p \leq 0.05$).

Concerning gene expression levels, many inter-individual variations were observed in digestive glands and gills. In digestive gland (n= 12), *sod*, *gst* and *atp* relative mRNA expression didn't varied during the exposure period (Figure 33). Results showed a *cat* relative mRNA expression significantly lower at 14 days of exposure ($2.7e^{-14} \pm 7.9e^{-14}$) than at 2 days ($7.8e^{-08} \pm 2.6e^{-07}$; $p = 0.018$) and at 7 days ($4,2e^{-07} \pm 1,3e^{-06}$; $p = 0.0067$). For the *gpx* relative expression, a significant increase was observed at 28 days of exposure ($1.4e^{-08} \pm 3.0e^{-08}$) compared to D0 ($1.4e^{-13} \pm 4.0e^{-13}$; $p = 0.0238$), 14 days ($8,2e^{-08} \pm 2,7e^{-07}$; $p = 0.0244$) and 21 days of exposure ($2.5e^{-13} \pm 6.8e^{-13}$; $p = 0.0092$). Regarding the *cox* relative expression, results showed a significant decrease at 28 days of exposure ($3.6e^{+13} \pm 1.1e^{+14}$) compared to D0 ($6.9e^{+15} \pm 1.9e^{+16}$; $p = 0.049$), 2 days ($2.3e^{+20} \pm 7.5e^{+20}$; $p = 0.048$) and 7 days of exposure ($5.6e^{+19} \pm 1.9e^{+20}$; $p = 0.012$).

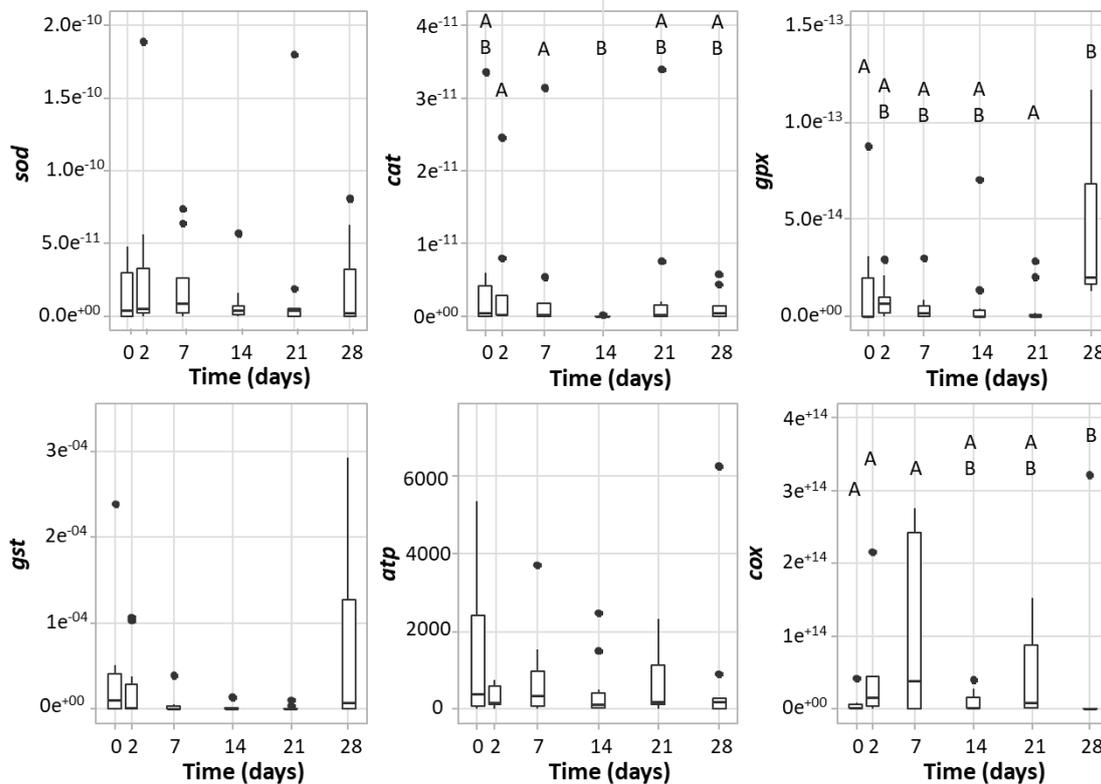


Figure 33 : Relative expression of *sod*, *cat*, *gst*, *gpx*, *atp* and *cox* genes (median and quartile) in digestive gland (n=12) at each sampling time (0, 2, 7, 14, 21 28 days). Statistical groups (Kruskal-Wallis, Nemenyi, $p \leq 0.05$) are indicated above boxplot; no common letter indicate significant difference.

In gills (n= 12; Figure 34), *sod* and *cat* relative mRNA expression didn't vary during the exposure time. For *gst* expression level, a significant decreased ($p = 0.00079$) was measured at 21 days of exposure ($1.9e^{-07} \pm 6.2e^{-07}$) compared to D0 ($1.0e^{-03} \pm 3.3e^{-03}$). Results highlighted a significant decrease at 14 days of exposure ($4.9e^{-19} \pm 8.1e^{-19}$) compared to D0 ($3.4e^{-15} \pm 4.8e^{-15}$; $p = 0.0017$) for *gpx* expression level and at 21 days ($3.6e^{-02} \pm 7.0e^{-02}$) compared to 2 days of exposure (16.7 ± 31.1 ; $p = 0.0038$) for *atp* relative expression. A decrease of *cox* relative expression was observed at 7 days ($6.0e^{+08} \pm 2.0e^{+09}$; $p = 0.006$), 14 days ($6.9e^{+06} \pm 1.5e^{+07}$; $p = 0.046$) and 21 days ($2.6e^{+06} \pm 4.7e^{+06}$; $p = 0.006$) of exposure compared to D0.

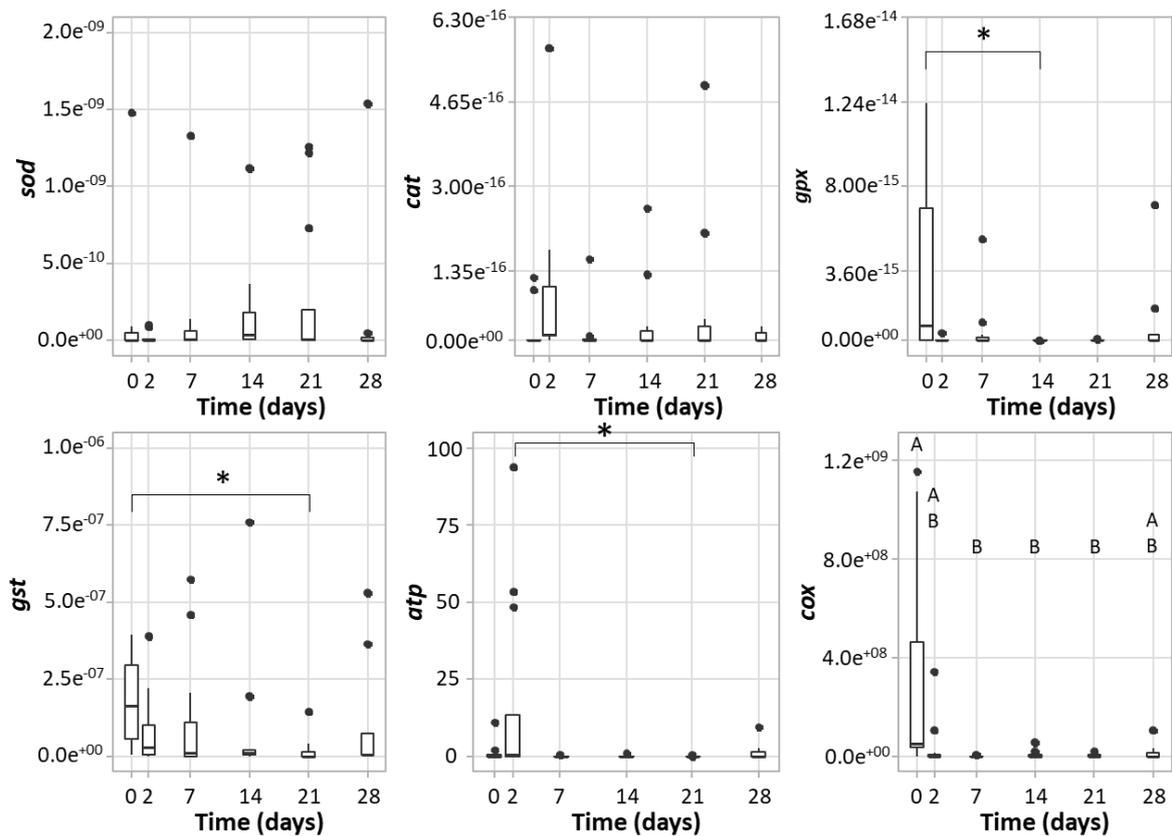


Figure 34 : Relative expression of *sod*, *cat*, *gst*, *gpx*, *atp* and *cox* genes (median and quartile) in gills (n=12) at each sampling time (0, 2, 7, 14, 21 28 days). Statistical groups (Kruskal-Wallis, Nemenyi, $p \leq 0.05$) are indicated above boxplot; * or no common letter indicate significant difference.

e. Protozoa bioaccumulation

Wastewater sampled at D0 was positive to *T. gondii* and *G. duodenalis*, and at 28 days wastewater sample was positive to *G. duodenalis* and *C. parvum* (Table 18). One mussel was positive to *T. gondii* before the exposure. Zebra mussels have bioaccumulated *T. gondii* oocysts during the exposure, at 2 days in outlet channel 2/12 mussels were positive then 8/12 at 7, 14 and 21 days and 7/12 at 28 days of exposure. *G. duodenalis* was detected at 2 days in 4/12 mussels and at 7 days in 1/12 zebra mussel. No *C. parvum* oocyst was detected in whole bivalve tissues for the exposure.

Table 18 : Detection of *T. gondii*, *G. duodenalis* and *C. parvum* in zebra mussel tissues (n=12) at 0, 2, 7, 14, 21 and 28 days; and in wastewater sampling (20 L, + for positive sample, – for negative sample) at 0 and 28 days.

	D0		D2	D7	D14	D21	D28	
	Tissues	Waste-water	Tissues	Tissues	Tissues	Tissues	Tissues	Waste-water
<i>Toxoplasma gondii</i>	1/12	+	2/12	8/12	8/12	8/12	7/12	-
<i>Giardia duodenalis</i>	0/12	+	4/12	1/12	0/12	0/12	0/12	+
<i>Cryptosporidium parvum</i>	0/12	-	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	+

4. Discussion

The wastewater effluent is a particularly stressful environment for aquatic organisms, in addition to the presence of multiple contaminants (Bottoni et al., 2010; Eriksson et al., 2003; Munz et al., 2017). Some physicochemical parameters of these waters can be harmful to certain species (Binelli et al., 2015). The wastewater temperature measured during the experiment (20.7 °C ± 0.7) remains below the lethal temperature observed for the European

zebra mussel (27 °C to 28 °C; McMahon, 1996). Physicochemical parameters measured in the effluent were reasonably acceptable for zebra mussel development (Ramcharan et al., 1992; Sprung, 1987), except for the oxygen saturation percentage (48 % \pm 1.5). Moreover, cages were inspected daily to prevent algae growth on their surfaces. According to Khalanski (1997), *Dreissena polymorpha* requires long term oxygenation greater than 50 % saturation, nevertheless zebra mussels have been found in hypoxic environments with 23 % saturation at 24 °C and 920 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Navarro et al., 2006) showing a resistance of the species to hypoxia and Yu & Culver (1999) have observed 76 % of survival mussels after one month in hypoxic condition (10.5 % - 17.8 % at 18 °C) in environmental condition exposure. Although zebra mussels seem to be able to survive under these oxygenation conditions, the O₂ saturation measured in the outlet channel could lead to a hypoxic stress.

Moreover, the flow rate measured in the outlet channel was high (16,340 \pm 6,148 m³.s⁻¹), which results in a water velocity estimated between 0.4 and 0.6 m.s⁻¹. This high water velocity could explain the decrease of zebra mussel clearance rate observed during the exposure period, compared to D0 and after 5 days of depuration in laboratory. Indeed, Ackerman (1999) have shown an inhibition of the zebra mussel clearance rate at 0.2 m.s⁻¹ while an optimum rate was observed at 0.1 m.s⁻¹. This inhibition seemed to be caused by a behaviour change, at 0.2 m.s⁻¹ zebra mussels were gaped but siphons were not extended unlike at 0.1 m.s⁻¹ condition for which siphons were extended (Ackerman, 1999). Elliott *et al.* (2008) have also shown an optimum clearance at 0.1 m.s⁻¹ in wastewater. Indeed, the clearance rate observed during our experimentation was higher in laboratory tank in stagnant water condition (at D0 and D33) than in effluent (D2 to D28). This increase of clearance rate in laboratory condition could be shown that the flow rate in outlet channel didn't caused any permanent alteration of zebra mussel filtration or that a mechanism for adapting organisms to the stream has been

set up. Estimated effluent velocity in outlet channel didn't seemed stressful for zebra mussel ; indeed, Sanz-Ronda et al. (2013) have shown a zebra mussel's velocity preference comprised between 0.3 and 0.8 m.s⁻¹. The filtration process is essential for the breathing and feeding of bivalve molluscs, therefore a key route for pollutant bio-extraction (Marigómez et al., 2002).

Cytochrome-c-oxidase and ATP synthase have a key role in cellular respiration: Cytochrome-c-oxidase is at the origin of the proton gradient used by the ATP synthase to synthetize the ATP molecule. The decreased of *cox* gene expression at 28 days in digestive gland and at 7, 14 and 21 days in gills might be due to hypoxic condition. Indeed, some authors have shown a down regulation of *cox* gene in hypoxic condition in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* (Woo et al., 2013), in crab *Callinectes sapidus* (Brown-Peterson et al., 2005) and in two insect species *Eurosta solidaginis* and *Epiblema scudderiana* (McMullen and Storey, 2008). Furthermore, results underlined an antioxidant activity at 28 days in digestive gland: CAT activity and *gpx* gene expression increased. Catalase and Glutathione peroxidase (GPx) are antioxidant enzymes involved in the decomposition of hydrogen peroxide. Some authors suggest that hypoxia might lead to oxidative stress which could explained this antioxidant activity (Alves de Almeida et al., 2007; Chandel et al., 2000). Nonetheless, antioxidant responses in zebra mussel has known as biomarker of exposure to some xenobiotic such as pharmaceutical compounds (Parolini et al., 2015, 2010), personal care products (Binelli et al., 2011) or metals (Faria et al., 2009; Navarro et al., 2011). So, antioxidant system activation in this study could also results to an oxidative stress caused by the multi-contamination of wastewater. Anyway, the increase in catalase activity at 28 days of exposure might suggest the reaching of a balance of oxidative status or an adaptation to the wastewater exposure of zebra mussels. These results suggest that the *D. polymorpha* have not been sufficiently affected by wastewater to unbalance their oxidative status until 21 days of exposure. Further

works are required to establish real impact of hypoxia or/and multi-stress on zebra mussel in wastewater effluent conditions.

At 28 days in WWTP's outlet channel, stress markers showed an impact of the effluent on *D. polymorpha*: 24 % of mussel's mortality, antioxidant system activation (CAT activity et *gpx* gene expression increase) and decrease in filtration efficiency (8/15 filtered mussel and lowest clearance rate $17.0 \% \pm 11.9 \%$). No clear increase in detoxification system (Glutathione-S-transferase) or antioxidant system was observed for 21 days, health status of transplanted zebra mussel declined only at 28 days which suggests an exhaustion of the organism. Moreover, decrease in *cox* expression and in *atp* expression (at 21 days in gills) might be leaded a cellular energy depletion which could contributed to the exhaustion effect.

Physiological responses studied during this experiment often seemed to be lower in the gills than in the digestive gland as CAT and GST activity and *atp*, *cox*, *gst* and *cat* gene expression. Difference in expression and/or activity of these enzymes in gills and digestive glands has already been described in the literature. For example, a *cat* gene expression lower in gills than in digestive gland has been observed in zebra mussel (Navarro *et al.*, 2011) and in *Corbicula fluminea* (Bigot *et al.*, 2011, 2009) and a higher CAT activity in digestive gland was also previously described in *Perna viridis* (Verlecar *et al.*, 2008). The same observation was noted for the GST activity in *Perna viridis* (Verlecar *et al.*, 2008), in *Mytilus galloprovincialis* and *Perna perna* (Kaaya *et al.*, 1999). Gills are the first barrier against the surrounding environment and so might be affected first by a stressful environment; indeed the downregulation of *cox* gene expression was earlier in gills than in digestive gland. However, digestive gland seemed to have a key role in antioxidative defence and detoxication system with a higher enzyme activity and gene expression.

The decrease in *D. polymorpha* lipid reserves that we observed during the experiment was also described in late spring and summer (Bruner et al., 1994; Palais et al., 2012). Bruner *et al.* (1994) have shown a decrease in lipid level for post-spawning-zebra mussel which would explain the lipid level decline in our study; indeed, mussel had spawning two to three weeks before the transplantation. This seasonal reserve depletion resulted a weight loss of zebra mussels, therefore a decrease of the condition index (Palais et al., 2011).

Thus, the different biomarkers which were measured during this study suggest that *D. polymorpha* could resist to the stressful condition of the effluent, at least until 21 days.

In water matrix, *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts were currently detected by immunofluorescence from filtered water sample (ISO 15553/2006), but no normative process exist for *Toxoplasma* oocysts detection. In this study, wastewater samples were filtered following ISO 15553/2006 recommendations and protozoa were detected by qPCR TaqMan to enable the three parasites detection. In wastewater, *G. duodenalis* cysts were detected at D0. The measurement made in the bivalve tissues is consistent with this result since cysts were detected in zebra mussels at 2 and 7 days of exposure. Moreover, no *C. parvum* oocysts were found in wastewater at D0 and in zebra mussel tissues, suggesting that no contamination has occurred during the exposure. *G. duodenalis* cysts and *C. parvum* oocysts were detected in wastewater at 28 days. Thus, if zebra mussels had been transplanted more than 28 days, they would probably bioaccumulated oocysts and cysts. Charleville-Mézières WWTP receive wastewater from a hospital, a slaughterhouse, a wildlife park, an agricultural college (which have a livestock) and from some villages with few farms. Well, the livestock represent an important source of *Cryptosporidium* and *Giardia* emission in environment and could explain the biological contamination highlighted in the WWTP effluent. *T. gondii* oocysts were

detected in wastewater at DO. This biological contamination was also highlighted due to bivalves since *T. gondii* oocysts were found in their tissues from 2 days up to 28 days of exposure. The number of positive tissues increase from 7 days, reflecting a chronic contamination and also the integrative capacity of *D. polymorpha*. Under laboratory condition, authors have been already shown an integration of *T. gondii* oocysts in zebra mussel tissues for 3 weeks of depuration after 3 weeks of exposure at 100, 1,000 or 10,000 oocysts/day/mussel (Géba et al 2020 *in press*). At 28 days no *T. gondii* oocysts were found in wastewater which is not consistent with the protozoan contamination revealed due to bivalves at 2, 7, 14, 21 and 28 days of exposure. Thus, normative process, based on a punctual filtration, could lead to a false negative and moreover, can yield variable results depending water quality, sampling period, place and quantity (Gallas-Lindemann *et al.*, 2013, Karanis *et al.*, 2006). This study underlined the need to use an integrative matrix of protozoa contamination to assess the real sanitary risk. Zebra mussels have thus performed their role of biomonitoring tool in WWTP about protozoan contamination since our study highlighted for the first time a protozoa bioaccumulation by zebra mussel in wastewater. However, future studies are needed to determine the extraction ratio of parasite in effluent by zebra mussels.

Our results showed that zebra mussels were able to bioaccumulate protozoa under unfavourable environmental conditions (limitation of their filtering capacities and hypoxia). Moreover, with a good oxygenation (> 80%) and appropriate water velocity ($0.1 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$), the exhaustion effect observed at 28 days could be prevented. In literature some authors have highlighted the interest of using zebra mussel for the removal of contaminants such as chromium (Magni *et al.*, 2015), *Escherichia coli* bacteria (Mezzanotte *et al.*, 2016), pharmaceutical concentration (Binelli *et al.*, 2014) and inactivated the enterovirus (Mezzanotte *et al.*, 2016) in the effluent. Binelli *et al.* (2015) have been highlighted a decrease in

effluent toxicity after zebra mussel biofiltration under laboratory condition. All of these studies were performed in the same pilot-plant in Milano-Nosedo, effluent flow between mussels were in a closed circuit. These results suggest that *Dreissena polymorpha* could be used as a bioremediation tool in wastewater. The use of a species as biofilter for wastewater decontamination is a low-cost solution to improve wastewater quality and a pioneering pest management approach (Gomes et al., 2018).

5. Conclusion

Our results highlighted that *D. polymorpha* survived until 21 days in the outlet channel of a conventional WWTP. At 28 days, a high mortality rate, an antioxidative activation and a decrease in filtration efficiency seemed underline the high stressful conditions for transplanted mussels. However, clearance rate return to a high value after only 5 days in clear water in laboratory showing no permanent alteration of the filtration rate of mussels. In addition to the multi-contamination of wastewater, it seemed that hypoxic conditions and effluent velocity could be stressful for mussel. Zebra mussels bioaccumulated two pathogenic protozoa (*T. gondii* and *G. duodenalis*) despite stressful condition. Results suggest that the zebra mussel is a promising tool for bioremediation in wastewater. Further studies may be carried out to optimize the biofiltration process by *D. polymorpha* into wastewater.

Acknowledgments: The authors thank Gregory Stephan, Frédéric Ponsart, Ludovic Sinet (Ardenne Metropole) and Yannic Ambolet (Vinci Construction) for giving us access to the wastewater treatment plant and for their involvement in this project. This work was supported by the DROPPE Ph.D. project (*Dreissena polymorpha* as purifier tool of protozoa in wastewater treatment plant effluent) which was co-funded by the “Grand-Est” Region (France) and by the European Regional Development Fund (ERDF).

References

- Ackerman, J.D., 1999. Effect of velocity on the filter feeding of dreissenid mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): implications for trophic dynamics. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56, 1551–1561. <https://doi.org/10.1139/f99-079>
- Ajonina, C., Buzie, C., Ajonina, I.U., Basner, A., Reinhardt, H., Gulyas, H., Liebau, E., Otterpohl, R., 2012. Occurrence of *cryptosporidium* in a wastewater treatment plant in north germany. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues* 75, 1351–1358. <https://doi.org/10.1080/15287394.2012.721167>
- Al-Rifai, J.H., Khabbaz, H., Schäfer, A.I., 2011. Removal of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in a water recycling process using reverse osmosis systems. *Sep. Purif. Technol.* 77, 60–67. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2010.11.020>
- Alhumoud, J.M., Al-Humaidi, H., Al-Ghusain, I.N., Alhumoud, A.M., 2010. Cost/Benefit Evaluation Of Sulaibiya Wastewater Treatment Plant In Kuwait. *Int. Bus. Econ. Res. J.* 9. <https://doi.org/10.19030/iber.v9i2.518>
- Alves de Almeida, E., Celso Dias Bainy, A., Paula de Melo Loureiro, A., Regina Martinez, G., Miyamoto, S., Onuki, J., Fujita Barbosa, L., Carrião Machado Garcia, C., Manso Prado, F., Eliza Ronsein, G., Alexandre Sigolo, C., Barbosa Brochini, C., Maria Gracioso Martins, A., Helena Gennari de Medeiros, M., Di Mascio, P., 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 146, 588–600. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.040>
- Arnott, D.L., Vanni, M.J., 1996. Nitrogen and phosphorus recycling by the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in the western basin of Lake Erie. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 646–659. <https://doi.org/10.1139/f95-214>

- Babo, S., Vasseur, P., 1992. In vitro effects of Thiram on liver antioxidant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 22, 61–68. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(92\)90036-M](https://doi.org/10.1016/0166-445X(92)90036-M)
- Baldwin, B.S., Mayer, M.S., Dayton, J., Pau, N., Mendillo, J., Sullivan, M., Moore, A., Ma, A., Mills, E.L., Mendilla, J., Sullivan, M., Moore, A., Ma, A., Mills, E.L., 2002. Comparative growth and feeding in zebra and quagga mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): implications for North American lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 60, 680–694. <https://doi.org/10.1139/f03-150>
- Berkman, P.A., Garton, D.W., Haltuch, M.A., Kennedy, G.W., Febo, L.R., 2000. Habitat shift in invading species: Zebra and quagga mussel population characteristics on shallow soft substrates. *Biol. Invasions* 2, 1–6. <https://doi.org/10.1023/A:1010088925713>
- Berninger da Costa, J., Rodgher, S., Daniel, L.A., Espíndola, E.L.G., 2014. Toxicity on aquatic organisms exposed to secondary effluent disinfected with chlorine, peracetic acid, ozone and UV radiation. *Ecotoxicology* 23, 1803–1813. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1346-z>
- Bigot, A., Doyen, P., Vasseur, P., Rodius, F., 2009. Metallothionein coding sequence identification and seasonal mRNA expression of detoxification genes in the bivalve *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 382–387. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.04.014>
- Bigot, A., Minguéz, L., Giambérini, L., Rodius, F., 2011. Early defense responses in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* exposed to copper and cadmium: Transcriptional and histochemical studies. *Environ. Toxicol.* 26, 623–632. <https://doi.org/10.1002/tox.20599>
- Binelli, A., Magni, S., Della Torre, C., Parolini, M., 2015. Toxicity decrease in urban wastewaters treated by a new biofiltration process. *Sci. Total. A., Magni, S., Della Torre, C., Parol. M. (2015). Toxic. decrease urban wastewaters Treat. by a new biofiltration Process. Sci. Total Environ.* 537, 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.537>, 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.005>
- Binelli, A., Magni, S., Soave, C., Marazzi, F., Zuccato, E., Castiglioni, S., Parolini, M., Mezzanotte, V., 2014. The biofiltration process by the bivalve *D. polymorpha* for the removal of some pharmaceuticals and drugs of abuse from civil wastewaters. *Ecol. Eng.* 71, 710–721. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.08.004>
- Binelli, A., Parolini, M., Pedriali, A., Provini, A., 2011. Antioxidant activity in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in response to triclosan exposure. *Water. Air. Soil Pollut.* 217, 421–430. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0597-4>

- Bottoni, P., Caroli, S., Caracciolo, A.B., 2010. Pharmaceuticals as priority water contaminants. *Toxicol. Environ. Chem.* 92, 549–565. <https://doi.org/10.1080/02772241003614320>
- Bowman, M.F., Bailey, R.C., 1998. Upper pH tolerance limit of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Can. J. Zool.* 76, 2119–2123. <https://doi.org/10.1139/z98-155>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brown-Peterson, N., Larkin, P., Denslow, N., King, C., Manning, S., Brouwer, M., 2005. Molecular indicators of hypoxia in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 286, 203–215. <https://doi.org/10.3354/meps286203>
- Bruner, K.A., Fisher, S.W., Landrum, P.F., 1994. The Role of the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*, in Contaminant Cycling: I. The Effect of Body Size and Lipid Content on the Bioconcentration of PCBs and PAHs. *J. Great Lakes Res.* 20, 725–734. [https://doi.org/10.1016/S0380-1330\(94\)71190-4](https://doi.org/10.1016/S0380-1330(94)71190-4)
- Chandel, N.S., McClintock, D.S., Feliciano, C.E., Wood, T.M., Melendez, J.A., Rodriguez, A.M., Schumacker, P.T., 2000. Reactive oxygen species generated at mitochondrial Complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: A mechanism of O₂ sensing. *J. Biol. Chem.* 275, 25130–25138. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001914200>
- Cheng, Y.S., Zheng, Y., VanderGheynst, J.S., 2011. Rapid quantitative analysis of lipids using a colorimetric method in a microplate format. *Lipids* 46, 95–103. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3494-0>
- Das, T.K., 2001. Ultraviolet disinfection application to a wastewater treatment plant. *Clean Prod. Process.* 3, 69–80. <https://doi.org/10.1007/s100980100108>
- Elliott, P., Aldridge, D.C., Moggridge, G.D., 2008. Zebra mussel filtration and its potential uses in industrial water treatment. *Water Res.* 42, 1664–1674. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2007.10.020>
- Eriksson, E., Auffarth, K., Eilersen, A.-M., Henze, M., Ledin, A., 2003. Household chemicals and personal care products as sources for xenobiotic organic compounds in grey wastewater. *Water SA* 29, 135–146. <https://doi.org/10.4314/wsa.v29i2.4848>
- Faria, M., Carrasco, L., Diez, S., Riva, M.C., Bayona, J.M., Barata, C., 2009. Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 149, 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.07.012>

- Farré, M. la, Pérez, S., Kantiani, L., 2008. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC Trends Anal. Chem.* 27, 991–1007. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2008.09.010>
- Fayer, R., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 2004. Zoonotic protozoa: From land to sea. *Trends Parasitol.* 20, 531–536. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.08.008>
- Gallas-Lindemann, Carmen, Sotiriadou, I., Mahmoodi, M.R., Karanis, P., 2013. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in different water resources by Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Acta Trop.* 125, 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.10.007>
- Gallas-Lindemann, C., Sotiriadou, I., Plutzer, J., Karanis, P., 2013. Prevalence and distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater and the surface, drinking and ground waters in the Lower Rhine, Germany. *Epidemiol. Infect.* 141, 9–21. <https://doi.org/10.1017/S0950268812002026>
- Géba, E., Aubert, D., Durand, L., Escotte, S., La Carbona, S., Cazeaux, C., Bonnard, I., Bastien, F., Ladeiro, M.P., Dubey, J.P., Villena, I., Geffard, A., Bigot-Clivot, A., 2020. Use of the bivalve *Dreissena polymorpha* as a biomonitoring tool to reflect the protozoan load in freshwater bodies. *Water Res.* 170 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115297>
- Gibson, K.E., 2014. Viral pathogens in water: Occurrence, public health impact, and available control strategies. *Curr. Opin. Virol.* 4, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.12.005>
- Gifford, S., Macfarlane, G.R., Koller, C.E., Dunstan, R.H., O'Connor, W., 2009. Zooremediation of contaminated aquatic systems through aquaculture initiatives. *New Technol. Aquac. Improv. Prod. Effic. Qual. Environ. Manag.* 750–768. <https://doi.org/10.1533/9781845696474.4.750>
- Goedkoop, W., Naddafi, R., Grandin, U., 2011. Retention of N and P by zebra mussels (*Dreissena polymorpha* Pallas) and its quantitative role in the nutrient budget of eutrophic Lake Ekoln, Sweden. *Biol. Invasions* 13, 1077–1086. <https://doi.org/10.1007/s10530-011-9950-9>
- Gomes, J., Matos, A., Quinta-Ferreira, R.M., Martins, R.C., 2018. Environmentally applications of invasive bivalves for water and wastewater decontamination. *Sci. Total Environ.* 630, 1016–1027. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.02.292>
- Graczyk, T.K., Conn, D., Lucy, F., Minchin, D., Tamang, L., Moura, L.S., DaSilva, A., 2004. Human waterborne parasites in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from the Shannon River drainage area, Ireland. *Parasitol. Res.* 93, 385–391. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1142-4>

- Horgan, M.J., Mills, E.L., 1997. Clearance rates and filtering activity of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): implications for freshwater lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54, 249–255. <https://doi.org/10.1139/f96-276>
- Kaaya, A., Najimi, S., Ribera, D., Narbonne, J.F., Moukrim, A., 1999. Characterization of glutathione S-transferases (GST) activities in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* used as a biomarker of pollution in the Agadir marine bay (South of Morocco), *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. <https://doi.org/10.1007/s001289900920>
- Karanis, P., Sotiriadou, I., Kartashev, V., Kourenti, C., Tsvetkova, N., Stojanova, K., 2006. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies of Russia and Bulgaria. *Environ. Res.* 102, 260–271. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2006.05.005>
- Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Padilla, D.K., 2002. Impacts of Zebra Mussels on Aquatic Communities and their Role as Ecosystem Engineers, in: *Invasive Aquatic Species of Europe. Distribution, Impacts and Management*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 433–446. https://doi.org/10.1007/978-94-015-9956-6_43
- Khalanski, M., 1997. Conséquences industrielles et écologiques de l'introduction de nouvelles espèces dans les hydrosystèmes continentaux : la moule zébrée et autres espèces invasives. *Bull. Français la Pêche la Piscic.* 385–404. <https://doi.org/10.1051/kmae:1997037>
- King, B., Fanok, S., Phillips, R., Lau, M., Akker, B. van den, Monis, P., van den Akker, B., Monis, P., 2017. *Cryptosporidium* attenuation across the wastewater treatment train: Recycled water fit for purpose. *Appl. Environ. Microbiol.* 83. <https://doi.org/10.1128/AEM.03068-16>
- Kitajima, M., Haramoto, E., Iker, B.C., Gerba, C.P., 2014. Occurrence of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Cyclospora* in influent and effluent water at wastewater treatment plants in Arizona. *Sci. Total Environ.* 484, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.036>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lucy, F.E., Connolly, M., Graczyk, T.K., Tamang, L., Sullivan, M.R., Mastitsky, S.E., 2010. Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) are effective sentinels of water quality irrespective of their size. *Aquat. Invasions* 5, 49–57. <https://doi.org/10.3391/ai.2010.5.1.7>
- Magdeburg, A., Stalter, D., Oehlmann, J., 2012. Whole effluent toxicity assessment at a wastewater treatment plant upgraded with a full-scale post-ozonation using aquatic key species. *Chemosphere* 88, 1008–1014. doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2012.04.017

- Magni, S., Parolini, M., Soave, C., Marazzi, F., Mezzanotte, V., Binelli, A., 2015. Removal of metallic elements from real wastewater using zebra mussel bio-filtration process. *J. Environ. Chem. Eng.* 3, 915–921. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2015.01.017>
- Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Giamberini, L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microsc. Res. Tech.* 56, 358–392. <https://doi.org/10.1002/jemt.10040>
- McLaughlan, C., Aldridge, D.C., 2013. Cultivation of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) within their invaded range to improve water quality in reservoirs. *Water Res.* 47, 4357–4369. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.043>
- McMahon, R.F., 1996. The physiological ecology of the zebra mussel, *dreissena polymorpha*, in north america and europe. *Am. Zool.* 36, 339–363. <https://doi.org/10.1093/icb/36.3.339>
- McMullen, D.C., Storey, K.B., 2008. Mitochondria of cold hardy insects: Responses to cold and hypoxia assessed at enzymatic, mRNA and DNA levels. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 367–373. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.12.003>
- Mezzanotte, V., Marazzi, F., Bissa, M., Pacchioni, S., Binelli, A., Parolini, M., Magni, S., Ruggeri, F.M., De Giuli Morghen, C., Zanotto, C., Radaelli, A., 2016. Removal of enteric viruses and *Escherichia coli* from municipal treated effluent by zebra mussels. *Sci. Total Environ.* 539, 395–400. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.007>
- Munz, N.A., Burdon, F.J., de Zwart, D., Junghans, M., Melo, L., Reyes, M., Schiøtzenberger, U., Singer, H.P., Spycher, B., Hollender, J., Stamm, C., 2017. Pesticides drive risk of micropollutants in wastewater-impacted streams during low flow conditions. *Water Res.* 110, 366–377. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.11.001>
- Nasser, A.M.M., Vaizel-Ohayon, D., Aharoni, A., Revhun, M., 2012. Prevalence and fate of *giardia* cysts in wastewater treatment plants. *J. Appl. Microbiol.* 113, 477–484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05335.x>
- Navarro, A., Faria, M., Barata, C., Piña, B., 2011. Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. *Environ. Pollut.* 159, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.09.018>
- Navarro, E., Bacardit, M., Caputo, L., Palau, T., Armengol, J., 2006. Limnological characterization and flow patterns of a three-coupled reservoir system and their influence on *dreissena polymorpha* populations and settlement during the stratification period. *Lake Reserv. Manag.* 22, 293–302. <https://doi.org/10.1080/07438140609354363>

- Okoh, A.I., Sibanda, T., Gusha, S.S., Okoh, A.I., Sibanda, T., Gusha, S.S., 2010. Inadequately Treated Wastewater as a Source of Human Enteric Viruses in the Environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7, 2620–2637. <https://doi.org/10.3390/ijerph7062620>
- Ottoson, J., Hansen, A., Björlenius, B., Norder, H., Stenström, T.A., 2006. Removal of viruses, parasitic protozoa and microbial indicators in conventional and membrane processes in a wastewater pilot plant. *Water Res.* 40, 1449–1457. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.01.039>
- 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>
- Palais, F., Mouneyrac, C., Dedourge-Geffard, O., Giambérini, L., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, A., 2011. One-year monitoring of reproductive and energy reserve cycles in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 83, 1062–1073. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.060>
- 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 Res.* 48, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.017>
- Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A., Caparrini, A., 1986. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Anal. Biochem.* 154, 536–541. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90026-6)
- Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D., Provini, A., 2010. Multi-biomarker approach for the evaluation of the cyto-genotoxicity of paracetamol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 79, 489–498. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.02.053>
- Parolini, M., Magni, S., Castiglioni, S., Zuccato, E., Binelli, A., 2015. Realistic mixture of illicit drugs impaired the oxidative status of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 128, 96–102. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2014.12.092>
- Ramcharan, C.W., Padilla, D.K., Dodson, S.I., 1992. Models to Predict Potential Occurrence and Density of the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49, 2611–2620. <https://doi.org/10.1139/f92-289>
- Ramo, A., Del Cacho, E., Sánchez-Acedo, C., Quílez, J., 2017. Occurrence and genetic diversity of *Cryptosporidium* and *Giardia* in urban wastewater treatment plants in north-eastern Spain. *Sci. Total Environ.* 598, 628–638. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.097>

- Reungoat, J., Escher, B.I., Macova, M., Argaud, F.X., Gernjak, W., Keller, J., 2012. Ozonation and biological activated carbon filtration of wastewater treatment plant effluents. *Water Res.* 46, 863–872. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2011.11.064>
- Sanz-Ronda, F.J., López-Sáenz, S., San-Martín, R., Palau-Ibars, A., 2013. Physical habitat of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in the lower Ebro River (Northeastern Spain): Influence of hydraulic parameters in their distribution. *Hydrobiologia* 735, 137–147. <https://doi.org/10.1007/s10750-013-1638-y>
- Shapiro, K., Bahia-Oliveira, L., Dixon, B., Dumètre, A., de Wit, L.A., VanWormer, E., Villena, I., 2019. Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food. *Food Waterborne Parasitol.* 15, e00049. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00049>
- Snyder, S.A., Adham, S., Redding, A.M., Cannon, F.S., DeCarolis, J., Oppenheimer, J., Wert, E.C., Yoon, Y., 2007. Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals. *Desalination* 202, 156–181. <https://doi.org/10.1016/J.DESAL.2005.12.052>
- Sprung, M., 1987. Ecological requirements of developing dreissena polymorpha eggs. *Arch. fuer Hydrobiol. Suppl.* 79, 69–86.
- Sprung, M., Rose, U., 1988. Influence of food size and food quantity on the feeding of the mussel *Dreissena polymorpha*. *Oecologia* 77, 526–532. <https://doi.org/10.1007/BF00377269>
- Stalter, D., Magdeburg, A., Weil, M., Knacker, T., Oehlmann, J., 2010. Toxication or detoxication? In vivo toxicity assessment of ozonation as advanced wastewater treatment with the rainbow trout. *Water Res.* 44, 439–448. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2009.07.025>
- Van Handel, E., 1965. Microseparation of glycogen, sugars, and lipids. *Anal. Biochem.* 11, 266–271. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(65\)90014-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(65)90014-X)
- Vandeputte, C., Guizon, I., Genestie-Denis, I., Vannier, B., Lorenzon, G., 1994. A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biol. Toxicol.* 10, 415–421. <https://doi.org/10.1007/BF00755791>
- Verlecar, X.N., Jena, K.B., Chainy, G.B.N., 2008. Seasonal variation of oxidative biomarkers in gills and digestive gland of green-lipped mussel *Perna viridis* from Arabian Sea. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 76, 745–752. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2007.08.002>
- WHO, 2012. Animal waste, water quality and human health, WHO. World Health Organization.

- Woo, S., Denis, V., Won, H., Shin, K., Lee, G., Lee, T.K., Yum, S., 2013. Expressions of oxidative stress-related genes and antioxidant enzyme activities in *mytilus galloprovincialis* (*bivalvia, mollusca*) exposed to hypoxia, *Zoological Studies*. <https://doi.org/10.1186/1810-522X-52-15>
- Yu, N., Culver, D.A., 1999. In situ survival and growth of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) under chronic hypoxia in a stratified lake, *Hydrobiologia*.
- Zaiko, A., Daunys, D., Olenin, S., 2009. Habitat engineering by the invasive zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas) in a boreal coastal lagoon: impact on biodiversity. *Helgol. Mar. Res.* 63, 85–94. <https://doi.org/10.1007/s10152-008-0135-6>

III. Conclusion générale

Les deux études, réalisées sur le terrain et en conditions de laboratoire, soulignent le maintien des dreissènes en effluent de STEP au moins jusqu'à 21 jours. L'épuisement des individus qui a été observé *in situ* après 28 jours d'encagement, pourrait en partie être dû aux difficultés d'oxygénation (faible saturation en oxygène et débit trop élevé). En effet, le taux de clairance n'est pas impacté par l'effluent en conditions de laboratoire (saturation en oxygène stable, conditions semi-statiques) contrairement à ce qui a été observé *in situ*. De plus, les dreissènes ont conservé leur aptitude à bioaccumuler les protozoaires lors de leur encagement dans le canal de sortie de la STEP. Ces résultats suggèrent que la dreissène pourrait être utilisée comme outil d'épuration des protozoaires dans les effluents au moins durant 21 jours. Des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre l'implication de la vitesse de l'eau et de l'oxygénation dans l'épuisement des moules zébrées, afin de limiter la mortalité et la baisse d'efficacité de cet outil de bioremédiation.

Chapitre V : Devenir des protozoaires accumulés par la dreissène

L'accumulation et la dépuración des protozoaires par la dreissène ont été caractérisées au cours de ce travail de thèse. Cependant les interactions entre la physiologie de la dreissène et les protozoaires restent très peu connues. Quelques études *ex vivo* ont mis en avant une internalisation des oocystes de *C. parvum* par les hémocytes (Palos Ladeiro *et al.*, 2018) alors que les oocystes de *T. gondii* ainsi que les kystes de *G. duodenalis* déclencheraient un comportement d'agrégation chez ces cellules (Le Guernic *et al.*, 2018). De plus, lors de nos expériences, nous avons observé une diminution du nombre de protozoaires bioaccumulés dans les dreissènes durant les trois premiers jours de dépuración, suggérant un rejet des parasites dans les eaux ou une dégradation de ceux-ci par le bivalve. Néanmoins aucune étude *in vivo* ne fait état du devenir des protozoaires une fois bioaccumulés par la moule zébrée ; or un oocyste ou un kyste, bien que bioaccumulé par un bivalve reste une source de risque sanitaire s'il a conservé son infectiosité et s'il est relargué par l'organisme dans les eaux. L'objectif de ce chapitre est donc d'améliorer ces connaissances sur le devenir des protozoaires accumulés dans les moules.

I. Synthèse

Afin d'améliorer les connaissances sur le devenir des protozoaires bioaccumulés par les dreissènes, deux expérimentations ont été conduites en laboratoire. La première a été menée dans le but d'évaluer les transferts d'oocystes entre les bivalves et l'eau. Pour cela, des dreissènes ont été exposées individuellement *in tubo* à 20 000 oocystes de *T. gondii* ou de *C. parvum* durant 24 h – dans le dispositif utilisé pour mesurer le taux de clairance – puis transférées dans un nouveau tube Falcon® en eau claire durant 7 jours. Les oocystes ont

ensuite été détectés et/ou quantifiés dans les tissus des moules zébrées (n= 3), dans l'eau et les (pseudo)fèces (n= 6) après 3 et 7 jours de dépuración, ainsi seuls les oocystes filtrés durant les 24 h d'exposition peuvent être retrouvés en période de dépuración.

Lors de cette première expérience, un transfert d'oocystes depuis les bivalves jusque dans les eaux et (pseudo)fèces a été observé (Table 19). En effet, des oocystes de *C. parvum* ont été retrouvés dans 5/6 échantillons d'eau à des quantités inférieures à la LOQ (10 oocystes) à 3 et 7 jours de dépuración et seule une moule (1/3) a été testée positive à 3 jours de dépuración avec une quantité inférieure à la LOQ (100 oocystes par moule). Concernant *T. gondii*, bien que des oocystes soient retrouvés dans 6/6 échantillons d'eau à chaque temps de prélèvement, ceux-ci restent également bioaccumulés dans les tissus des moules zébrées (3/3 ; < LOQ = 5 oocystes/moule), même après 7 jours de dépuración. Une diminution de la quantité globale des oocystes de *T. gondii* est observée au cours de la dépuración, 1 460 (\pm 1 937) oocystes sont quantifiés dans les eaux à 3 jours de dépuración contre seulement 515 (\pm 616) à 7 jours de dépuración. Cette diminution suggère que les oocystes ont été refiltrés par les dreissènes durant la dépuración, la quantité accumulée n'augmentant pas en parallèle dans les tissus des dreissènes il est possible que ceux-ci aient été dégradés.

Une deuxième expérience a été réalisée dans le but d'évaluer l'infectiosité des oocystes bioaccumulés par les moules zébrées. Pour cela, des dreissènes ont été exposées en conditions semi-statiques à 1 000 ou 10 000 oocystes de *T. gondii* ou de *C. parvum* par jour par moule durant 7 jours suivis de 7 jours de dépuración en eau claire. L'infectiosité des protozoaires est évaluée à 7 jours d'exposition et de dépuración grâce à deux méthodes : par bioessais *in vivo* (n= 3), technique quantitative considérée comme étant le test de référence,

et par culture cellulaire associée à une qPCR (CC-qPCR ; n= 3), approche alternative à l'utilisation d'animaux et qualitative (Rousseau *et al.*, 2019).

Au cours de cette seconde expérience, une diminution du nombre de *T. gondii* infectieux est observée grâce aux bioessais (Table 21), avec plus de 1 000 oocystes infectieux estimés à 7 jours d'exposition contre 10 à 100 oocystes infectieux à 7 jours de dépuración pour la plus faible concentration d'exposition (1 000 oocystes/jour/moule). Or, en parallèle le nombre de *T. gondii* accumulés dans les tissus des moules zébrées ne semble pas diminuer (Table 20). Ces résultats suggèrent que la diminution du nombre d'oocystes infectieux pourrait être due, non pas à un rejet dans les eaux, mais plutôt à une dégradation ou à une inactivation des oocystes de *T. gondii* par la dreissène. Cependant, aucune diminution du nombre d'oocystes infectieux n'est observée pour la plus forte concentration. Ceci pourrait être attribué à une plus grande sensibilité des souris, utilisées pour les bioessais, pour une concentration plus forte de protozoaires dans les moules ou à une diminution de l'efficacité des voies de dépuración ou de dégradation de la dreissène. Les résultats obtenus en CC-qPCR montrent une intégration de parasites infectieux dans les tissus des bivalves, et ce, même après 7 jours de dépuración, ce qui est cohérent avec les résultats des bioessais (Figure 35).

Pour *C. parvum*, aucun oocyste n'a été détecté dans les tissus des dreissènes à 7 jours d'exposition. Cependant, après 7 jours d'exposition 410 (\pm 67) et 404 (\pm 16) oocystes infectieux sont mesurés pour des concentrations respectivement de 1 000 et 10 000 oocystes/jour/bivalve, montrant une bioaccumulation effective de *C. parvum* par la moule zébrée (Figure 36). De plus, le nombre d'oocystes infectieux diminue après 7 jours de dépuración (323 \pm 29 et 358 \pm 16 oocystes infectieux par moule respectivement), ceci pourrait être provoqué par un rejet d'oocystes dans les eaux ou une dégradation des oocystes par la

dreissène. En l'absence de donnée relative à la quantité d'oocystes bioaccumulés par la moule zébrée lors de chaque prélèvement, aucune conclusion ne peut être apportée quant au rejet ou à la dégradation de *C. parvum* par *D. polymorpha*. Le nombre d'oocystes infectieux par bivalve est similaire pour les deux concentrations (1 000 et 10 000 oocystes/jour/moule), les oocystes semblent avoir atteint un seuil maximal de bioaccumulation dans les tissus des moules zébrées. La CC-qPCR a permis de détecter des oocystes infectieux uniquement après 7 jours d'exposition à la plus forte concentration (10 000 oocystes/jour/moule ; Figure 35). Aucun oocyste infectieux n'étant détecté après 7 jours de dépuración, les résultats suggèrent que les oocystes pourraient être éliminés des tissus durant la dépuración ou que leur nombre pourrait être en-dessous du niveau de détection de la méthode.

Article : Survival and infectivity of *Toxoplasma gondii* and *Cryptosporidium parvum* oocysts bioaccumulated by *Dreissena polymorpha*.

Ecrit pour la revue International Journal of Hygiene and Environmental Health

Elodie Géba^{1,2}, Angélique Rousseau^{2,3}, Antoine Le Guernic¹, Sandie Escotte-Binet², Loïc Favennec⁴, Stéphanie La Carbona³, Gilles Gargala⁴, Jitender P. Dubey⁵, Isabelle Villena², Stéphane Betoulle¹, Dominique Aubert² and Aurélie Bigot-Clivot^{1*}

¹ UMR-I 02 SEBIO (*Stress Environnementaux et BIOsurveillance des milieux aquatiques*), Université de Reims Champagne Ardenne, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Campus Moulin de Housse, BP 1039, 51687 Reims cedex 2, France

² EA7510, ESCAPE (*EpidémioSurveillance et Circulation des Parasites dans les Environnements*), Université de Reims Champagne Ardenne, Faculté de Médecine, SFR Cap Santé Fed 4231, 51 Rue Cognacq Jay, 51096 Reims, France.

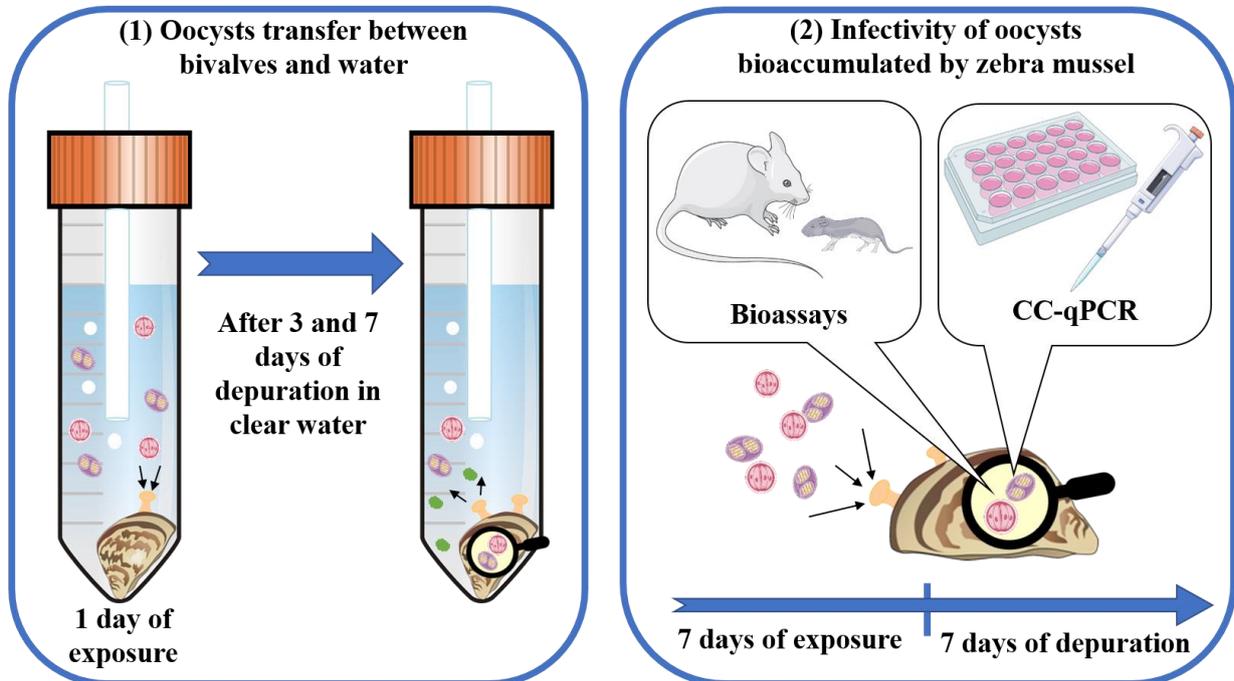
³ ACTALIA Food Safety Department, 310 Rue Popielujko, 50000 Saint-Lô, France

⁴ EA7510, ESCAPE (*EpidémioSurveillance et Circulation des Parasites dans les Environnements*), Université de Rouen, 76183 Rouen Cedex, France

⁵ United States Department Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville Agricultural Research Center, Animal Parasitic Diseases Laboratory, building 1001, Beltsville, MD 20705 2350, USA

*Corresponding authors: aurelie.bigot@univ-reims.fr

Graphical abstract:



Highlights:

- Zebra mussels released oocysts in water and/or (pseudo)faeces in depuration period
- Number of infectious oocysts decreased in zebra mussels after 7 days of depuration
- *Toxoplasma gondii* remained bioaccumulated in mussel tissues for 7 days of depuration

Abstract:

In the literature, used of *Dreissena polymorpha* as biomonitoring and bioextract tool for *Cryptosporidium parvum* and *Toxoplasma gondii* protozoa is described and some authors have shown a decrease in bioaccumulated oocysts during depuration periods. To understand this depuration process in zebra mussel, two experiments were performed: (1) *in tubo* exposure to investigated oocyst transfers between bivalves and water and (2) *in vivo* exposure to assessed the ability of zebra mussel to degrade oocysts. Our results highlighted a transfer of oocysts from the mussels to the water at 3 and 7 days of depuration, however some of oocysts were still bioaccumulated in mussel's tissues (1). Between seven days of exposure at 1,000 or 10,000 oocysts/mussel/day and 7 days of depuration, the number of bioaccumulated *T. gondii* did not varied but the number of infectious oocysts decreased which suggested a degradation of *T. gondii* oocysts by *D. polymorpha*. Few *C. parvum* oocysts were detected in tissues therefore no conclusion could be reached as to possible degradation of *C. parvum* or their release into the water and (pseudo)faeces. Results highlighted a decrease in infectious oocysts bioaccumulated by zebra mussels.

Keywords: Zebra mussel; Infectious protozoa; Bioremediation; CC-qPCR; Bioassay

1. Introduction

Cryptosporidium parvum is the agent of cryptosporidiosis, leading to severe recurrent diarrhoea or intestinal disorders and is the most commonly reported etiological agent in protozoan waterborne outbreaks worldwide (Efstratiou et al., 2017). Toxoplasmosis, caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*, is usually asymptomatic in immunocompetent individuals and resulting in the formation of latent cysts in tissues and organs throughout the body (Robert-Gangneux and Dardé, 2012). Nonetheless, it can lead to severe ocular, cerebral, or multivisceral complications, especially in congenitally infected infants and in immunocompromised people. These protozoan parasites are mentioned in the Directive 2003/99/CE as “zoonotic agents to be monitored” in Europe and considered as public health priorities by World Health Organization (WHO, 2012). They are known to have high water transmission, for example the half of 70 cryptosporidiosis outbreak recorded between 2000 and 2010 had a waterborne origin (Putignani and Menichella, 2010). Moreover, *T. gondii* and *C. parvum* have been responsible of respectively 2 % and 60.3 % of parasitic protozoan waterborne outbreaks between January 2004 and December 2010 in the world (Baldursson and Karanis, 2011). Indeed, their environmental form, called oocysts, can contaminate any environmental compartments *via* human or animal faeces. Runoff from contaminated surfaces carries these protozoa to aquatic environments where oocysts can persist for month (Freire-Santos et al., 1999; Lindsay et al., 2003; Lindsay and Dubey, 2009; Olson et al., 1999). Therefore, oocysts are found in natural aquatic environments such as surface water (Mons et al., 2009; Swaffer et al., 2018; Villena et al., 2004; Wells et al., 2015; Xiao et al., 2006), underground water (Aubert and Villena, 2009; Hancock et al., 1998; Solo-Gabriele et al., 1998), recreational water (Castro-Hermida et al., 2010) or irrigation water (Thurston-Enriquez et al., 2002). These oocysts have a great resistance to physicochemical treatments used in water

treatment plant so they are found in treated waters like drinking water (Helmi et al., 2011; Karanis et al., 2006; Sroka et al., 2006; Triviño-Valencia et al., 2016) or wastewater effluent (Ajonina et al., 2012; Domenech et al., 2018; Gallas-Lindemann et al., 2013; Ramo et al., 2017). The inefficiency of the water treatment used results in a serious health risk.

Nowadays, the use of biofilter species for the extraction, degradation or stabilization of contaminants is increasingly being investigated (Gifford et al., 2007). In the literature, it has been shown that several bivalve species were able to accumulate *T. gondii* and *C. parvum* oocysts such as *Mytilus edulis* (Lévesque et al., 2010; Li et al., 2006; Lowery et al., 2001; Tedde et al., 2019), *Mytilus galloprovincialis* (Aksoy et al., 2014; Freire-Santos et al., 2000; Gómez-Couso et al., 2006; Marangi et al., 2015) or *Crassostrea spp* (Esmerini et al., 2010, Fayer et al., 2002, Graczyk et al., 2007, Monteiro et al., 2019, Putignani et al., 2011). Many studies have focused on marine bivalves because it is an important food resource which could represent a health risk for consumers. However, among the bivalve species, freshwater bivalves are less studied whereas these ecosystems are the receptor for a wide variety of contaminants, including protozoa (Castro-Hermida et al., 2010; Villena et al., 2004). Nevertheless, *Dreissena polymorpha* (zebra mussel) is increasingly being promoted by authors as an effective bioremediation tool (Binelli et al., 2014; Gomes et al., 2018; Magni et al., 2015; Mezzanotte et al., 2016). Indeed, zebra mussel has a great filtration rate between 5 to 400 mL.bivalve⁻¹.h⁻¹ (Ackerman, 1999; Baldwin et al., 2002) and can filter a wide range of particle from 0.7 µm to 1,200 µm (Horgan and Mills, 1997; Sprung and Rose, 1988), particles with a diameter greater than 40 µm are released into the pseudofaeces (Ten Winkel and Davids, 1982). Its ability to bioaccumulate and thus bioextract *C. parvum* and *T. gondii* oocysts from water has been described under laboratory conditions (Graczyk et al., 2003; Palos Ladeiro et al., 2015, 2014; Géba et al., 2020 *in press*) and under environmental conditions (Graczyk et al., 2008, 2004;

Kerambrun et al., 2016; Lucy et al., 2010, 2008). But, what happens to the protozoa bioaccumulated by *D. polymorpha*? Some authors have shown a decrease in bioaccumulated oocyst number during depuration periods in laboratory experiments (Graczyk et al., 2003; Palos Ladeiro et al., 2015; Géba et al., 2020 *in press*) This decrease could be explained by the degradation of protozoa by zebra mussel, or by release of oocysts into the water.

To verify these hypothesis, two experiments were carried out in laboratory. Firstly, to investigate oocyst transfers between bivalves and water, *D. polymorpha* were individually exposed to 20,000 *T. gondii* or *C. parvum* oocysts during 24h following by seven days of depuration in clear water. After three and seven days of depuration, the number of bioaccumulated oocysts and number of oocysts released into water by zebra mussel were measured. Secondly, to assess the effect of zebra mussel physiological mechanisms on oocysts infectivity, mussels were exposed to 1,000 or 10,000 *T. gondii* or *C. parvum* oocysts/day/mussel for seven days following by seven days of depuration in clear water. Infectivity of bioaccumulated oocysts were evaluated with two methods: by cell-culture associated to quantitative PCR assay, a non-quantitative approach which is an alternative to animal bioassays (Rousseau et al., 2019), and by *in vivo* assay, a quantitative approach which is the “gold standard”.

2. Material and method

a. Mussel collection

Zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, were collected at about five meters' depth in the Lac-du-Der-Chantecoq (N48°34'00", E 4°45'00", Marne, France). In laboratory, mussels were kept one day at field temperature (8 ± 1 °C), in the dark, in tanks aerated containing 50 % of

lake water and 50 % of Cristaline® source water (Aurèle, France). Then mussels measuring 22.0 ± 3.0 mm were acclimated in the dark only in aerated Cristaline® water (six liters and 100 mussels per tank) at 11 ± 1 °C during two weeks in four tanks before experiments. Zebra mussels were fed twice a week with 2,000,000 cells of *Chlorella pyrenoidosa*.

b. Protozoan origin

T. gondii oocysts of the strain ME49 genotype II were obtained as described previously (Dubey, 2010). Oocysts were sporulated in aqueous 2 % sulfuric acid (Sigma-Aldrich Chemicals, France) and stored at 4 °C until use. Prior to experiments, oocysts were washed three times in sterile distilled water (dH₂O) to remove sulfuric acid and then the concentration of parasites suspension was calibrated by KOVA® Glasstic Slide 10 (with counting grids, Jeulin, France) in sodium dodecyl sulfate (SDS, 0.5 %, Sigma-Aldrich Chemicals, France), using a phase contrast microscope (Axioskop 40, ZEISS SAS, Germany). Oocysts were 9 months aged for experiment 1 and oocysts were 26 days aged and 73 % of viable oocysts were detected in RT-qPCR for the experiment 2.

C. parvum oocysts (Iowa isolate) were purchased at Waterborne™ Inc (New Orleans, LA, USA) and kept at 4 °C before use to guaranty their viability. Oocysts were 3 months aged for experiment 1 and oocysts were 17 days aged and 96 % of viable oocysts were detected in RT-qPCR for the experiment 2.

c. Exposure condition

i. Experiment 1: oocyst transfer between bivalves and water

Twenty-four mussels were individually deposited at the bottom of a Falcon® 50 mL whose cap has been previously pierced to allow the aerate system functioning (maintains 100 % oxygen at the bottom of the tube) and exposed to 20,000 *T. gondii* (n= 12) or *C. parvum* oocysts (n= 12) during 24 h. Then, for depuration period, zebra mussels were individually deposited in new Falcon® 50 mL in clear water for 7 days. *D. polymorpha* were still fed *ad libitum* twice a week with *Chlorella pyrenoidosa* and kept at 11 ± 1 °C in obscurity during the entire duration of the experiment. Three mussels and six water samples (entire content of the Falcon®) were took at 3 and 7 days of depuration for each protozoan. Whole zebra mussel tissues were collected, then stored at -80 °C until analysis. Water samples were centrifuged 10 min at 3 000 g and washed twice with SDS 0.5 %, then supernatant stored at -80 °C until analysis. These samples will be used to detect and quantify the number of oocysts in each compartment: *D. polymorpha* tissues and water/(pseudo)faeces samples.

ii. Experiment 2: infectivity of bioaccumulated oocysts

Zebra mussels were randomly divided into four groups (100 mussel per tank) for each condition and duplicate tanks at 11 ± 1 °C in obscurity. Mussels were exposed to 1,000 or 10,000 of each protozoan per mussel per day for seven days, then were transferred in clear water for seven days of depuration. *D. polymorpha* were still fed *ad libitum* twice a week with *Chlorella pyrenoidosa*. Mussels were sampled at D0, after seven days of exposure (D7) and after seven days of depuration (D14). Water volumes of tanks were proportionally adjusted to number of mussels during the exposure. To ensure that infectivity of protozoa in Cristaline®

water was not altered, 1,000 or 10,000 of each protozoan were put into tube (1.5 mL) containing Cristaline® water. These tubes were deposited in tanks in order to be exposed to the same experimental conditions (11 ± 1 °C in obscurity).

Three zebra mussels were randomly sampled at each sampling time for bioaccumulation measurement or for bioassays assessment and six were sampled for sporocyst-based CC-qPCR assessment (three mussels for D0 and three mussels for cell culture final time).

d. Protozoa detection and quantification

Whole tissues were digested by 1X Trypsin (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) during 1h30 at 37 °C under 90 rpm agitation. Tissue homogenate was centrifuged at 5,000 g during 5 min and pellet was storage at -20 °C until DNA extraction. DNA was extracted to tissues and water samples according to protocol described by Géba et al. (2020 *in press*), using the FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France). DNA parasite detection was carried out by TaqMan real-time qPCR in a CFX96 TOUCH™ thermocycler (Bio-Rad, USA) as described by Géba et al. (2020 *in press*).

e. Assessment of protozoan infectivity

i. Parasite extraction from matrix and oocyst purification

Whole tissues were sampled, sliced with a scalpel and immediately digested by 1X trypsin added in stomacher bag (Bagpage R400, Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, France) during 1h30 at 37 °C under 90 rpm agitation. Filtrates were collected and 12.5 mL of NaCl 0.9 % (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) was added to wash stomacher bag. Samples were then washed twice with NaCl 0.9 % and centrifuged at 2,500 g, at 10 °C during 10 min.

ii. Cell culture associated to quantitative PCR assay (CC-qPCR)

T. gondii oocysts purification and cell culture were previously described by Rousseau et al., (2019).

For *C. parvum*, HCT-8 cells (CCL-244) were used and obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). They were maintained in culture in IMDM growth media previously described. Cells were grown to 80 % confluence on 75 cm² culture flask (VWR, Canada) in 5 % CO₂ atmosphere at 37 °C. Once confluent, cells were washed with PBS 1X and trypsinized to remove the cell monolayer from the flask. Before inoculation with sporocysts sample, about 1.10⁶ cells were seeded into each well of 24 well culture plates in growing medium for 24h. The oocyst pellets from the trypsinic digestion were washed and purified by Percoll gradient 30 %. Sporozoites were obtained after an incubation in sodium hypochlorite 1.6 % for 10 min at 4°C followed by 1h30 in 1.5 % taurocholic acid at 37 °C. Culture medium was removed from 24h HCT-8 cultures and 1 mL per well of IMDM growth medium containing freshly isolated sporozoites was added to cell monolayers for 2h at 37 °C. One microliter of IMDM medium supplemented with paraaminobenzoic acid 4 mg.L⁻¹ (Sigma, St Louis, MO, USA), ascorbic acid 35 mg.L⁻¹, glucose 25 mmol.L⁻¹ (Merck, Darmstadt, Germany), insulin 100 IU.L⁻¹ (Novo Nordisk Pharmaceutique, Boulogne Billancourt, France), HEPES 15 mmol.L⁻¹, streptomycin 500 mg.L⁻¹ (Gibco BRL), penicillin 105 IU.L⁻¹ (Gibco BRL) and foetal bovine serum 20 % (v/v) was added to each well, and cells were cultured for an additional 48h (Gargala et al., 2000). After washing, three cell monolayer wells (CC0) were extracted and the others at the end of the two days' period (CC2).

Using the QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France), the supernatant was discarded from the wells and cell-culture was suspended in 180 µL of the ATL buffer and 20 µL

of proteinase K. The suspension was transferred into a 1.5 mL Eppendorf tube (Hambourg, Allemagne) and sample was processed further by following the manufacture-recommended procedures. DNA were eluted in a final volume of 90 μ L water. Infectivity was highlighted by parasite multiplication and therefore by the reduction of Cq value obtained at cell culture stop (CC2 for *C. parvum* or CC3 for *T. gondii*) compared to Cq value obtained at CC0. Thus Δ Cq were calculated. For *C. parvum*, Δ Cq = Cq_{CC0} – Cq_{CC2} and for *T. gondii*, Δ Cq = Cq_{CC0} – Cq_{CC3}. A positive Δ Cq value indicates the presence of infectious oocysts in tissues sample.

iii. *In vivo* infectivity assays

All procedures involving animals were supervised by the local ethical committee, according to the regulations of the French Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche.

T. gondii assay

As described previously (Villena et al., 2004), *T. gondii* oocysts were bioassayed in outbreed female Swiss Webster mice (Charles River Laboratory, Neuilly-sur-Seine, France) weighting 20-30 g. Each mollusc pellets, obtained after oocyst extraction and purification (2.5.1), were resuspended into 900 μ L of physiological water and 100 μ L of penicillin 1.10^5 U.L⁻¹, streptomycin 1.10^5 μ g.mL⁻¹ and amoxicillin 0.1 μ g.mL⁻¹. Each sample was diluted 1 to 1.10^3 and each dilution was inoculated in two mice. Uninfected control mice (n= 2) were inoculated by 1 mL of PBS without oocyst. Each mouse was intraperitoneally inoculated as this procedure allow to control dose of inoculation. After feeding, mice were housed in sterile capped cages equipped with a grill ceiling providing granules and water *ad libitum*. Mice were tested for *T. gondii* seroconversion with the modified agglutination test (MAT) four weeks

post-infection (Villena et al., 2004). Microscopic examination of brain homogenates permitted to detect tissue cysts in mouse brains (Aubert et al., 2010). To determine infectious oocysts quantity, we reported to the standard range the last dilution with a seroconversion and applied the corresponding factor. Oocysts serial dilutions in water, ranging from 1.10^{-1} to 1.10^3 , were performed to obtain a semi-quantitative bioassay (Rousseau et al., 2019).

C. parvum assay

To evaluate *C. parvum* infectivity, five-day-old MNRI mice (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France), were used. Each mollusc pellets were resuspended into 600 μ L PBS and 6 suckling mice were gavaged orally by 100 μ L as previously described (Delaunay et al., 2000). To determine infectious oocysts quantity, inoculation results were reported to the standard range dilution in 100 μ L PBS containing from 1.10^3 to 1.10^1 oocysts. Uninfected control mice were inoculated by 100 μ L PBS without oocysts. Seven days after inoculation, neonate mice were euthanized. The entire small intestine was removed, opened longitudinally, cut into small pieces, and individually homogenized vigorously for 30 s in 1.5 mL of deionized water. Two hundred microliters of sample were used for further immunofluorescence flow cytometry analysis.

Samples (intestinal homogenates or purified oocysts used as control) were incubated for 30 min at 37 °C with an 1:20 final dilution of fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated monoclonal antibody (MAb) directed against a *Cryptosporidium* spp. wall antigen (Crypt-a-Glo, Waterborne Inc., New OrLéans, Louisiana, USA). Immunofluorescence flow cytometry analysis was performed using a LSR FORTESSA cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems (BDIS), San Jose, CA, USA). Flow cytometry detection of *C. parvum* oocysts was

performed using the following settings: (1) forward angle light scatter detector (FSC): E00, (2) side angle light scatter detector (SSC) : 304 V , (3) green fluorescence detector (670 nm long pass filter) : 505 V. Absolute oocyst counts were performed using fluorescent calibrated beads highly uniform with respect to granularity and fluorescence intensity (Fluorospheres/Flow-count™ ; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

f. Graphical designs

R software (3.4.2 version) was used for drawing the graphics with “ggplot2” package. No statistical analysis was performed because of an insufficient number of biological replicate (three or six biological replicates).

3. Results

a. Experiment 1: Oocyst transfer between bivalves and water

T. gondii oocysts (Table 19) were detected in every water samples (n= 6), a decrease was observed between 3 days of depuration ($1,460 \pm 1,937$ oocysts) and 7 days of depuration (515 ± 616 oocysts). Mussels (n= 3) were all positive to *T. gondii* oocysts and bioaccumulated an oocyst quantity lower than limit of quantification (LOQ = 5 oocysts).

C. parvum oocysts were detected in 5/6 water samples (less than 10 oocysts) at 3 and 7 days of depuration. Only one mussel was positive to *C. parvum* at 3 days of depuration with a quantity lower than LOQ (= 100 oocysts per mussel).

Table 19 : Number of *Toxoplasma gondii* and *Cryptosporidium parvum* oocysts in water sample (n=6) and bivalve tissues (n=3) at 3 and 7 days of depuration.

	3 days of depuration				7 days of depuration			
	Water and (pseudo)faeces		Bivalve		Water and (pseudo)faeces		Bivalve	
	Detection	Quantification (oocysts ± SD)	Detection	Quantification (oocysts ± SD)	Detection	Quantification (oocysts ± SD)	Detection	Quantification (oocysts ± SD)
<i>T. gondii</i>	6/6	1,460 ± 1,937	3/3	< LOQ (< 5 oocysts)	6/6	515 ± 616	3/3	< LOQ (< 5 oocysts)
<i>C. parvum</i>	5/6	< LOQ (< 10 oocysts)	1/3	< LOQ (< 100 oocysts)	5/6	< LOQ (< 10 oocysts)	0/3	N/A

b. Experiment 2: infectivity of bioaccumulated oocysts

C. parvum and *T. gondii* oocysts kept in Cristaline® water were still infectious after 7 and 14 days of storage (CC-qPCR assessment, data not shown).

i. Oocyst bioaccumulation

At 1,000 oocysts/bivalve/day, *T. gondii* was detected (Table 20) in 2/3 zebra mussels at 7 days of exposure (D7) and in 3/3 at 7 days of depuration (D14) with a quantity of oocysts per mussel not exceeding the LOQ (LOQ =5 oocysts/mussel). At the highest concentration (10,000 oocysts/mussel/day), 3/3 mussels were positive to *T. gondii* at each sampling times with 14.3 ± 3.0 oocysts/mussel and 35.9 ± 13.8 oocysts/mussel respectively at 7 days of exposure (D7) and 7 days of depuration (D14).

No *C. parvum* oocysts were detected in mussel tissues during the experiment.

Table 20 : Number of positive bivalves (n=3) and number of *Toxoplasma gondii* oocysts in bivalves tissues at 7 days of exposure (D7) and 7 days of depuration (D14).

		1,000 oocysts/bivalve/day		10,000 oocysts/bivalve/day	
		Detection	Quantification (oocysts ±SD)	Detection	Quantification (oocysts ±SD)
<i>T. gondii</i>	D7	2/3	<LOQ (< 5 oocysts)	3/3	14.3 ± 3.0
	D14	3/3		3/3	35.9 ± 13.8

ii. CC-qPCR assay

After 7 days of exposure, the *T. gondii* oocysts bioaccumulated by zebra mussels were detected by CC-qPCR and the qPCR signal decreased between CC0 and CC3 ($\Delta Cq = 3.55$ and $\Delta Cq = 2.75$ for 1,000 and 10,000 protozoa/mussel/day respectively), highlighting infective oocysts. Even after 7 days of depuration (D14), *T. gondii* oocysts remained infective ($\Delta Cq = 1.75$ and $\Delta Cq = 1.26$ for 1,000 and 10,000 protozoa/mussel/day condition respectively) (Figure 35).

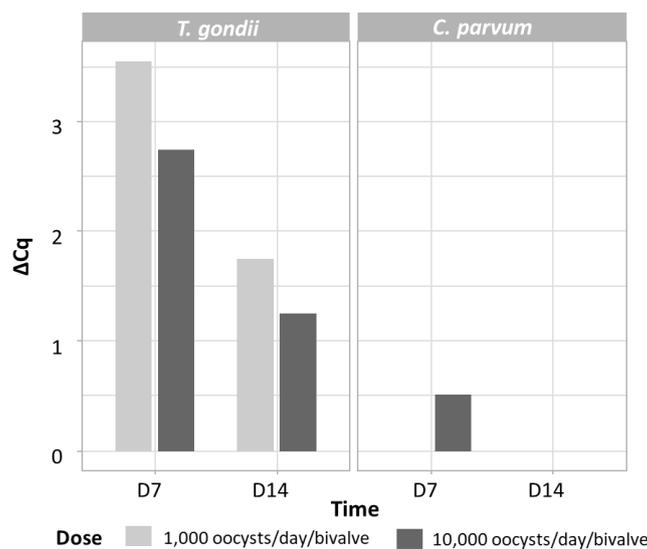


Figure 35 : Infectivity of *T. gondii* and *C. parvum* oocysts in *D. polymorpha* by CC-qPCR (n= 3). Barplot represents the ΔCq mean (for *T. gondii* $\Delta Cq = Cq_{CC0} - Cq_{CC3}$; for *C. parvum* $\Delta Cq = Cq_{CC0} - Cq_{CC2}$) for each time (D7 : 7 days of exposure; D14 : 7 days of depuration), for each dose (1,000 and 10,000 oocysts/day/mussel).

C. parvum oocysts (Figure 35) were detected after seven days of exposure (D7) but only for the highest concentration (DCq = 0.51). After seven days of depuration (D14), no signal was obtained suggesting that parasites were eliminated during depuration by zebra mussels or that the level of oocysts was too low to be detected by this method. In any case, if oocysts were able to persist in bivalve tissues, they were probably less infectious.

iii. In vivo assay

In zebra mussels (Table 21) exposed to 1,000 *T. gondii* oocysts/day/mussel for seven days (D7): one mouse was dead and seroconversion was observed in all mice (5/5) with pure inoculate sample. Seroconversion was still observed when mussel tissues were 1,000 times diluted (2/6 mice) indicating that more than 1,000 infectious oocysts/mussel were still present in the sample. After seven days of depuration (D14), no seroconversion was obtained anymore at the 1/100th dilution demonstrated that infectious oocysts were present in bivalves tissues but a depuration occurred since number of infectious oocysts decrease between the D7 and the D14. At the high dose of 10,000 oocysts/day/mussel, pure inoculate samples of D7 and D14, led to the die of four mice and the seroconversion of the two remaining mice (2/2). The absence of seroconversion at the 1/1000th dilution indicated that the number of infective oocysts was between 100 and 1,000 oocysts/mussel after bioaccumulation (D7) and depuration (D14). *T. gondii* oocysts remained infectious in mussel tissues after seven days of depuration in clear water at the two tested concentrations.

Table 21 : Number of mice seroconversion observed with MAT and number of mice dead before 60 days post-inoculation with *Dreissena polymorpha* samples. The samples were collected after seven days of exposition to *T. gondii* oocysts (D7) and seven days of depuration (D14) (n=3). Two exposition doses were tested (1000 and 10000 oocysts/day/mussel). Serial dilutions of sample were inoculated to estimate the number of infective *T. gondii* oocysts in each condition.

		7 days				14 days			
		Pure	1/10 th	1/100 th	1/1,000 th	Pure	1/10 th	1/100 th	1/1,000 th
1,000 oocysts/day/ mussel	Mortality	1/6	0/6	0/6	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6
	Seroconversion	5/5	1/6	2/6	2/6	4/5	1/6	0/6	0/6
	Infectious oocysts number	> 1,000				10 – 100			
10,000 oocysts/day/ mussel	Mortality	4/6	0/6	0/6	0/6	4/6	0/6	0/6	0/6
	Seroconversion	2/2	6/6	2/6	0/6	2/2	6/6	1/6	0/6
	Infectious oocysts number	100 - 1,000				100 - 1,000			

After seven days of exposure (D7) to 1,000 and 10,000 *C. parvum* oocysts/days/mussel, 410 (± 67) and 404 (± 16) infectious oocysts were respectively bioaccumulated by *D. polymorpha* (Figure 36). The infectious oocysts number bioaccumulated by zebra mussel wasn't dependent on the exposure dose (1,000 or 10,000 oocysts/days/mussel). *C. parvum* remained infectious after seven days of depuration (D14) with 323 (± 29) and 358 (±16) infectious oocysts respectively for 1,000 and 10,000 oocysts/days/mussel conditions. Nevertheless, the infectious oocyst quantity was lower at seven days of depuration than at seven days of exposure, showing a depuration by the zebra mussel.

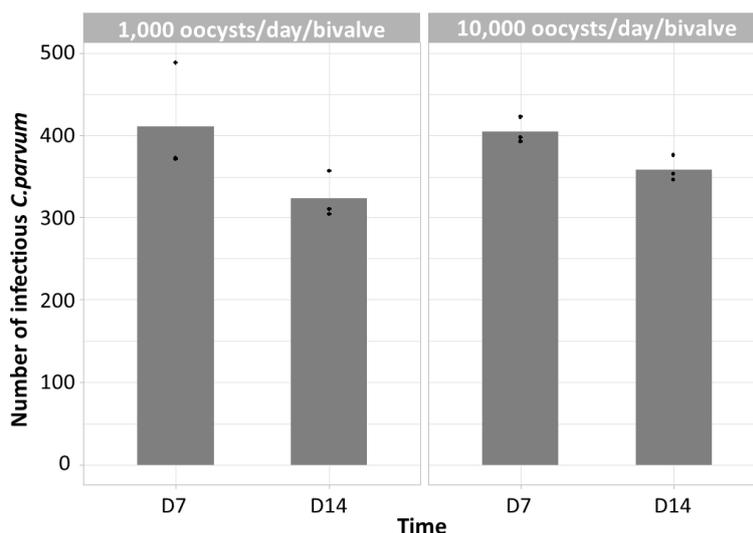


Figure 36 : Evaluation of *C. parvum* oocysts infectivity in *D. polymorpha* tissues by neonatal mice bioassay. Scatterplot represents number of infectious oocysts per mussel and barplot represents the infectious oocysts mean for each time (D7: 7 days of exposure; D14 : 7 days of depuration), for each dose (1,000 and 10,000 oocysts/day/mussel) ($n=3$).

4. Discussion

The bioaccumulation capacity of zebra mussel with regard to *T. gondii* or *C. parvum* oocysts has already been shown by several authors, whether in laboratory or environmental conditions (Graczyk et al., 2008, 2004, 2003; Kerambrun et al., 2016; Lucy et al., 2010, 2008; Palos Ladeiro et al., 2015, 2014; Géba et al., 2020 *in press*). Among these studies, some have assessed the number of oocysts bioaccumulated by *D. polymorpha* during the depuration period, and a decrease of bioaccumulated oocyst quantity was observed (Graczyk et al., 2003; Palos Ladeiro et al., 2015; Géba et al., 2020 *in press*). To understand the depuration process in zebra mussel, *D. polymorpha* were individually exposed *in tubo* to 20,000 oocysts for one day and were transferred to a new tube for depuration period. In this way, only the oocysts previously filtered during 24h of exposure and released in water and (pseudo)faeces in depuration period could be quantified in the water samples (experiment 1). Moreover, to

study the ability of zebra mussel to degrade oocysts, *D. polymorpha* were exposed to 1,000 or 10,000 oocysts/day/mussel for 7 seven day following by seven days of depuration. Infectivity of bioaccumulated oocysts was assessed at seven days of exposure and seven days of depuration by CC-qPCR, a qualitative method which is considered as an alternative to animal bioassays (Rousseau et al., 2019), and mouse infectivity assay, a quantitative method which is the “gold standard” (experiment 2).

During the first experiment, number of *T. gondii* oocysts released in water decreased during the depuration (3 days: 1,461 oocysts \pm 1,937 and 7 days: 516 oocysts \pm 616) and the quantity of oocysts accumulated in the tissues remains below 5 oocysts/mussel. Thus, zebra mussels seemed to release some of bioaccumulated *T. gondii* into water and refilter them during depuration period. The overall quantity of oocysts decreased within Falcon® suggesting a destruction of *T. gondii* oocysts during the depuration period. In the second experiment, *T. gondii* oocysts remained bioaccumulated in 3/3 mussel tissues after 7 days of depuration and number of oocysts didn't varied between 7 days of exposure and 7 days of depuration. Moreover, a decrease of infectious oocysts was highlighted by mice bioassay after seven days of depuration (10 to 100 infectious *T. gondii* oocysts) compared to seven days of exposure (> 1,000 infectious *T. gondii* oocysts) at 1,000 oocysts/mussel/day condition. These results suggested that the decrease of infectious oocysts number was no caused by a release of bioaccumulated oocysts in water, but that *D. polymorpha* might be able to degrade or inactivate oocysts which would reduce their infectivity. However, no decrease of infectious oocyst number was observed for the highest exposure condition (10,000 oocysts/mussel/day). Two hypotheses could explain this result: (1) at high exposure dose mouse bioassay could be too sensitive to show an infectivity reduction, (2) zebra mussel's degradation pathways could had lower efficiency at high exposure dose.

For *C. parvum*, few oocysts have been found in water (less than 10 oocysts) and in tissue samples (only one positive sample) considering the exposure dose during the first experiment. However, after seven days of exposure (experiment 2), 410 (± 67) and 404 (± 16) infectious oocysts were found in tissues by mouse bioassay, showing an effective bioaccumulation of *C. parvum* for seven days and a maintaining infectivity. Moreover, number of infectious oocysts in tissues was similar at 1,000 or 10,000 oocysts/mussel/day conditions, it seemed that a maximal bioaccumulated oocysts threshold has been reached by zebra mussel. After seven days of depuration, number of infectious oocysts in zebra mussel decreased (323 \pm 29 and 358 \pm 16 infectious oocysts per mussel), suggested a released of bioaccumulated oocysts into water or a degradation by zebra mussel. Few oocysts (< 10 oocysts) were found in the water during the experiment 1, which supports the hypothesis of oocyst degradation. However, before rejecting the hypothesis of infectious oocysts decrease in mussel because of oocyst released in water by zebra mussel; future experiments are necessary to evaluate the number of oocysts bioaccumulated and released into the water by mussel and their infectivity in the same time.

Techniques used in the present studies seemed to be more effective in assessing the bioaccumulation and infectivity of *T. gondii* than *C. parvum* oocysts. Indeed, no or few *C. parvum* oocysts were detected in zebra mussel tissues by molecular techniques during the two experiments while more than 300 infectious oocysts were measurement by bioassay (during experiment 2). Thereby, the qPCR TaqMan protocol used did not allow the detection of *Cryptosporidium* oocysts while they were present in mussel tissues. Moreover, the quantity of bioaccumulated *Toxoplasma* oocysts seemed to be underestimated by qPCR (14.3 \pm 3.0) compared to by bioassay (> 1,000) at 7 days of depuration (10,000 oocysts/bivalve/mussel). The difference in sensitivity observed between *T. gondii* and *C. parvum* detection in mussel

certainly results from the limit of detection of this method for each protozoan: between 1 and 5 oocysts/mussel and between 50 and 100 oocysts/mussel respectively (Géba et al., 2020 *in press*). *T. gondii* infectivity assessment by CC-qPCR was highly sensitive (LOQ < 10 oocysts) and consistent with the results observed in bioassay although not quantitative (Rousseau et al., 2019). Previously, CC-qPCR had only been tested on bivalve tissues spiked *ex vivo* with oocysts (Rousseau et al., 2019), and the present study to show that this technique was also sensitive for *in vivo* conditions. Nonetheless, *C. parvum* oocysts were detected by CC-qPCR only at seven days of exposure at 10,000 oocysts/mussel/day, probably because of low sensitivity of CC-qPCR for *C. parvum* infectivity assessment. Indeed, the detection limit (LOD) is between 190 and 1,900 infective oocysts per mussel while only 304 to 488 oocysts were estimated to be infectious by mouse bioassay. So, CC-qPCR did not allow a sensitive measurement of infectious *C. parvum* and should be improved.

T. gondii and *C. parvum* oocyst infectivity was evaluated for the first time in the *D. polymorpha* tissues. In some marine species, the infectivity of oocysts has been mainly evaluated qualitatively, showing an integration of oocysts infectivity in tissues. For example, *T. gondii* oocysts remained infective until 85 days post-exposure in *Crassostrea virginica* (Lindsay et al., 2004). Moreover, *C. parvum* oocyst remained infective in *Tapes decussatus* and *Ostrea edulis* after 31 days post-exposure (Freire-Santos et al., 2002) or in *Mytilus galloprovincialis* after 14 days post-exposure (Tamburrini and Pozio, 1999). Other studies have focused on the quantification of viable oocysts in bivalve, since a non-viable oocyst is unable to infect its host and therefore no longer constitutes a health risk. For example, Freire-Santos et al. (2002) have shown, in *Tapes decussatus* and *Ostrea edulis*, a significant decreased (around of 70 %) of *C. parvum* oocysts viability during the first days of depuration, it has been decreasing until reached around 15 % of viable oocysts after 10 days of depuration. Likewise,

in *Mytilus edulis* a *T. gondii* viability decreased (50%) after one day of depuration (Arkush et al., 2003). The decrease of infectious oocyst number observed in our study could be explained by lower viability of accumulated oocysts.

In bivalves, several ways could be possible to altered oocysts, but which are poorly studied. Nevertheless, in *D. polymorpha*, some *ex vivo* experiments have shown that haemocytes are able to internalize the oocysts of *C. parvum* (Palos Ladeiro et al., 2018) while *T. gondii* lead to haemocyte aggregation suggesting potential encapsulation (Le Guernic et al., 2018). Oocysts had been detected in zebra mussel haemolymph suggesting that haemocyte-oocyst interaction may be possible *in vivo* (Graczyk et al., 2004; Palos Ladeiro et al., 2014; Géba et al., 2020 *in press*). Moreover, in *Corbicula fluminea* an increase of phagocytosed *C. parvum* oocysts until 7 days of depuration with a maximum at 3 days had been shown, which supports the hypothesis of *C. parvum* oocysts destruction by freshwater bivalve (Graczyk et al., 1998). Defense proteins contained in epithelial mucus, such as lysozyme, defensin or protease (Allam and Pales Espinosa, 2016; Pales Espinosa et al., 2015), or digestive enzymes in intestinal tract might also alter the infectivity of oocysts. Indeed, in *Tapes decussatus* Gómez-Couso et al., (2005) assumed that *C. parvum* oocysts that have only been in contact with mucus and the intestinal tract have lost their viability after several re-filtration by bivalves.

Using *Dreissena polymorpha* to bioextracte the protozoan contamination to water ecosystem have already been described under laboratory condition (Graczyk et al., 2003, Palos Ladeiro et al., 2014, 2015; Géba et al., 2020 *in press*) and in environmental condition (Graczyk et al., 2004, 2008, Kerambrun et al., 2016, Lucy et al., 2008, 2010). This present study highlighted a potential degradation of oocysts showing that zebra mussel could also be used

as a biodegradation tool to improve the water treatment. However, further studies are needed to improve our knowledge of these potential degradation processes and their effectiveness, before thinking about their implementation *in situ*, such as assess the number of infectious oocysts release into the water and (pseudo)faeces.

5. Conclusion

Dreissena polymorpha could release some oocysts in water and/or (pseudo)faeces during 7 days of depuration in clear water. Nevertheless, oocysts remained bioaccumulated in zebra mussel tissues for 7 days of depuration, especially for *T. gondii* oocysts. Moreover, results highlighted a decrease of infectious oocyst number in mussel tissues which could suggest a degradation of bioaccumulated *T. gondii* and a release or a degradation of *C. parvum* by zebra mussel. This preliminary study highlights the interest of using *D. polymorpha* as a tool for bioremediation of protozoa. However, more research is required to determine the potential degradation pathways and their limits in environmental conditions.

Acknowledgments:

This work was supported by the DROPPE (*Dreissena polymorpha* as purifier tool of protozoa in wastewater treatment plant effluent) Ph.D. project which co-financed by the “Grand-Est” region and ERDF (European Regional Development Fund).

References

- Ackerman, J.D., 1999. Effect of velocity on the filter feeding of dreissenid mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): implications for trophic dynamics. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56, 1551–1561. <https://doi.org/10.1139/f99-079>
- Ajonina, C., Buzie, C., Ajonina, I.U., Basner, A., Reinhardt, H., Gulyas, H., Liebau, E., Otterpohl, R., 2012. Occurrence of *cryptosporidium* in a wastewater treatment plant in north germany. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues* 75, 1351–1358. <https://doi.org/10.1080/15287394.2012.721167>
- Aksoy, U., Marangi, M., Papini, R., Ozkoc, S., Bayram Delibas, S., Giangaspero, A., 2014. Detection of *Toxoplasma gondii* and *Cyclospora cayetanensis* in *Mytilus galloprovincialis* from Izmir Province coast (Turkey) by Real Time PCR/High-Resolution Melting analysis (HRM). *Food Microbiol.* 44, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.012>
- Allam, B., Pales Espinosa, E., 2016. Bivalve immunity and response to infections: Are we looking at the right place? *Fish Shellfish Immunol.* 53, 4–12. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2016.03.037>
- Arkush, K.D., Miller, M.A., Leutenegger, C.M., Gardner, I.A., Packham, A.E., Heckerroth, A.R., Tenter, A.M., Barr, B.C., Conrad, P.A., 2003. Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Int. J. Parasitol.* 33, 1087–1097. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00181-4](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00181-4)
- Aubert, D., Ajzenberg, D., Richomme, C., Gilot-Fromont, E., Terrier, M.E., de Gevigney, C., Game, Y., Maillard, D., Gibert, P., Dardé, M.L., Villena, I., 2010. Molecular and biological characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from wildlife in France. *Vet. Parasitol.* 171, 346–349. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.03.033>
- Aubert, D., Villena, I., 2009. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water: Proposition of a strategy and evaluation in Champagne-Ardenne region, France. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 290–295. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200023>
- Baldursson, S., Karanis, P., 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks – An update 2004–2010. *Water Res.* 45, 6603–6614. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2011.10.013>
- Baldwin, B.S., Mayer, M.S., Dayton, J., Pau, N., Mendillo, J., Sullivan, M., Moore, A., Ma, A., Mills, E.L., Mendilla, J., Sullivan, M., Moore, A., Ma, A., Mills, E.L., 2002. Comparative growth and feeding in zebra and quagga mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): implications for North American lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 60, 680–694. <https://doi.org/10.1139/f03-150>

- Binelli, A., Magni, S., Soave, C., Marazzi, F., Zuccato, E., Castiglioni, S., Parolini, M., Mezzanotte, V., 2014. The biofiltration process by the bivalve *D. polymorpha* for the removal of some pharmaceuticals and drugs of abuse from civil wastewaters. *Ecol. Eng.* 71, 710–721. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.08.004>
- Castro-Hermida, J.A., García-Presedo, I., González-Warleta, M., Mezo, M., 2010. *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in water bodies of Galicia, Spain. *Water Res.* 44, 5887–5896. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.010>
- Delaunay, A., Gargala, G., Li, X., Favennec, L., Ballet, J.J., 2000. Quantitative flow cytometric evaluation of maximal *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in a neonate mouse model. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4315–4317. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4315-4317.2000>
- Domenech, E., Amorós, I., Moreno, Y., Alonso, J.L., 2018. *Cryptosporidium* and *Giardia* safety margin increase in leafy green vegetables irrigated with treated wastewater. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 221, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.10.009>
- Dubey, J.P., 2010. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*, ISBN: ISBN 978-1-4200-9236-3 (Hardback). 313 p., 2nd Editio. ed, Journal of Parasitology. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/9781420092370>
- Efstratiou, A., Ongerth, J.E., Karanis, P., 2017. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011–2016. *Water Res.* 114, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.036>
- Esmerini, P.O., Gennari, S.M., Pena, H.F.J., 2010. Analysis of marine bivalve shellfish from the fish market in Santos city, São Paulo state, Brazil, for *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.* 170, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.036>
- Fayer, R., Trout, J., Lewis, E., Xiao, L., Lal, A., Jenkins, M., Graczyk, T., 2002. Temporal variability of *Cryptosporidium* in the Chesapeake Bay. *Parasitol. Res.* 88, 998–1003. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0697-1>
- Freire-Santos, F., Gómez-Couso, H., Ortega-Iñarrea, M., Castro-Hermida, J., Oteiza-López, A., García-Martín, O., Ares-Mazás, M., 2002. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from experimentally contaminated oysters (*Ostrea edulis*) and clams (*Tapes decussatus*). *Parasitol. Res.* 88, 130–133. <https://doi.org/10.1007/s004360100470>
- Freire-Santos, F., Oteiza-López, A.M., Vergara-Castiblanco, C.A., Ares-Mazás, E., Álvarez-Suárez, E., García-Martín, O., 2000. Detection of *Cryptosporidium* Oocysts in Bivalve Molluscs Destined for Human Consumption. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[0853:DOCOIB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[0853:DOCOIB]2.0.CO;2) 86, 853–854.

- Freire-Santos, F., Oteiza-López, A.M., Vergara-Castiblanco, C.A., Ares-Mazás, M.E., 1999. Effect of salinity, temperature and storage time on mouse experimental infection by *Cryptosporidium parvum*. *Vet. Parasitol.* 87, 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00160-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00160-0)
- Gallas-Lindemann, C., Sotiriadou, I., Mahmoodi, M.R., Karanis, P., 2013. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in different water resources by Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Acta Trop.* 125, 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.10.007>
- Gargala, G., Delaunay, A., Li, X., Brasseur, P., Favennec, L., Ballet, J.J., 2000. Efficacy of nitazoxanide, tizoxanide and tizoxanide glucuronide against *Cryptosporidium parvum* development in sporozoite-infected HCT-8 enterocytic cells. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 57–60. <https://doi.org/10.1093/jac/46.1.57>
- Gifford, S., Dunstan, R.H., O'Connor, W., Koller, C.E., MacFarlane, G.R., 2007. Aquatic zooremediation: deploying animals to remediate contaminated aquatic environments. *Trends Biotechnol.* 25, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.12.002>
- Gomes, J., Matos, A., Quinta-Ferreira, R.M., Martins, R.C., 2018. Environmentally applications of invasive bivalves for water and wastewater decontamination. *Sci. Total Environ.* 630, 1016–1027. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.02.292>
- Gómez-Couso, H., Freire-Santos, F., Hernández-Córdova, G.A., Ares-Mazás, M.E., 2005. A histological study of the transit of *Cryptosporidium parvum* oocysts through clams (*Tapes decussatus*). *Int. J. Food Microbiol.* 102, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.002>
- Gómez-Couso, H., Méndez-Hermida, F., Ares-Mazás, E., 2006. Levels of detection of *Cryptosporidium* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by IFA and PCR methods. *Vet. Parasitol.* 141, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.015>
- Graczyk, T.K., Conn, D., Lucy, F., Minchin, D., Tamang, L., Moura, L.S., DaSilva, A., 2004. Human waterborne parasites in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from the Shannon River drainage area, Ireland. *Parasitol. Res.* 93, 385–391. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1142-4>
- 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*). *Parasitol. Res.* 89, 107–112. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0729-x>

- Graczyk, T.K., Fayer, R., Cranfield, M.R., Conn, D.B., 1998. Recovery of waterborne *Cryptosporidium parvum* oocysts by freshwater benthic clams (*Corbicula fluminea*). *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 427–30.
- Graczyk, T.K., Lewis, E.J., Glass, G., Dasilva, A.J., Tamang, L., Girouard, A.S., Curriero, F.C., 2007. Quantitative assessment of viable *Cryptosporidium parvum* load in commercial oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Parasitol. Res.* 100, 247–253. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0261-5>
- Graczyk, T.K., Lucy, F.E., Tamang, L., Minchin, D., Miraflor, A., 2008. Assessment of human waterborne parasites in Irish river basin districts - Use of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) as bioindicators. *Aquat. Invasions* 3, 305–313. <https://doi.org/10.3391/ai.2008.3.3.5>
- Hancock, C.M., Rose, J.B., Callahan, M., 1998. *Crypto* and *Giardia* in US groundwater. *J. Am. Water Work. Assoc.* 90, 58–61. <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1998.tb08396.x>
- Helmi, K., Skraber, S., Burnet, J.B., Leblanc, L., Hoffmann, L., Cauchie, H.M., 2011. Two-year monitoring of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* occurrence in a recreational and drinking water reservoir using standard microscopic and molecular biology techniques. *Environ. Monit. Assess.* 179, 163–175. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1726-7>
- Horgan, M.J., Mills, E.L., 1997. Clearance rates and filtering activity of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): implications for freshwater lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54, 249–255. <https://doi.org/10.1139/f96-276>
- Karanis, P., Sotiriadou, I., Kartashev, V., Kourenti, C., Tsvetkova, N., Stojanova, K., 2006. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies of Russia and Bulgaria. *Environ. Res.* 102, 260–271. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2006.05.005>
- 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*. *J. Appl. Microbiol.* 120, 498–508. <https://doi.org/10.1111/jam.12999>
- Le Guernic, A., Geffard, A., Rioult, D., Bonnard, I., Le Foll, F., Palos Ladeiro, M., 2018. First evidence of cytotoxic effects of human protozoan parasites on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) haemocytes. *Environ. Microbiol. Rep.* <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12720>
- Lévesque, B., Barthe, C., Dixon, B.R., Parrington, L.J., Martin, D., Doidge, B., Proulx, J.-F., Murphy, D., 2010. Microbiological quality of blue mussels (*Mytilus edulis*) in Nunavik, Quebec: a pilot study. *Can. J. Microbiol.* 56, 968–977. <https://doi.org/10.1139/W10-078>

- Li, X., Guyot, K., Dei-Cas, E., Mallard, J.P., Ballet, J.J., Brasseur, P., 2006. *Cryptosporidium* oocysts in mussels (*Mytilus edulis*) from Normandy (France). *Int. J. Food Microbiol.* 108, 321–325. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.018>
- Lindsay, D.S., Collins, M. V., Mitchell, S.M., Cole, R.A., Flick, G.J., Wetch, C.N., Lindquist, A., Dubey, J.P., 2003. Sporulation and Survival of *Toxoplasma gondii* Oocysts in Seawater, in: *Journal of Eukaryotic Microbiology.* pp. 687–688. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2003.tb00688.x>
- Lindsay, D.S., Collins, M. V., Mitchell, S.M., Wetch, C.N., Rosypal, A.C., Flick, G.J., Zajac, A.M., Lindquist, A., Dubey, J.P., 2004. Survival of *Toxoplasma Gondii* Oocysts in Eastern Oysters (*Crassostrea Virginica*). *J. Parasitol.* 90, 1054–1057. <https://doi.org/10.1645/GE-296R>
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., 2009. Long-Term Survival of *Toxoplasma gondii* Sporulated Oocysts in Seawater. *J. Parasitol.* 95, 1019–1020. <https://doi.org/10.1645/GE-1919.1>
- Lowery, C.J., Nugent, P., Moore, J.E., Millar, B.C., Xiru, X., Dooley, J.S., 2001. PCR – IMS detection and molecular typing of *Cryptosporidium parvum* recovered from a recreational river source and an associated mussel (*Mytilus edulis*) bed in. *Epidemiol. Infect.* 127, 545–553.
- Lucy, F.E., Connolly, M., Graczyk, T.K., Tamang, L., Sullivan, M.R., Mastitsky, S.E., 2010. Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) are effective sentinels of water quality irrespective of their size. *Aquat. Invasions* 5, 49–57. <https://doi.org/10.3391/ai.2010.5.1.7>
- Lucy, F.E., Graczyk, T.K., Tamang, L., Miraflor, A., Minchin, D., 2008. Biomonitoring of surface and coastal water for *Cryptosporidium*, *Giardia*, and human-virulent microsporidia using molluscan shellfish. *Parasitol. Res.* 103, 1369–1375. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1143-9>
- Magni, S., Parolini, M., Soave, C., Marazzi, F., Mezzanotte, V., Binelli, A., 2015. Removal of metallic elements from real wastewater using zebra mussel bio-filtration process. *J. Environ. Chem. Eng.* 3, 915–921. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2015.01.017>
- Marangi, M., Giangaspero, A., Lacasella, V., Lonigro, A., Gasser, R.B., 2015. Multiplex PCR for the detection and quantification of zoonotic taxa of *Giardia*, *Cryptosporidium* and *Toxoplasma* in wastewater and mussels. *Mol. Cell. Probes* 29, 122–125. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2015.01.001>
- Mezzanotte, V., Marazzi, F., Bissa, M., Pacchioni, S., Binelli, A., Parolini, M., Magni, S., Ruggeri, F.M., De Giuli Morghen, C., Zanotto, C., Radaelli, A., 2016. Removal of enteric viruses and *Escherichia coli* from municipal treated effluent by zebra mussels. *Sci. Total Environ.* 539, 395–400. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.007>

- Mons, C., Dumètre, A., Gosselin, S., Galliot, C., Moulin, L., 2009. Monitoring of *Cryptosporidium* and *Giardia* river contamination in Paris area. *Water Res.* 43, 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.10.024>
- Monteiro, T.R.M., Rocha, K.S., Silva, J., Mesquita, G.S.S., Rosário, M.K.S., Ferreira, M.F.S., Honorio, B.E.T., Melo, H.F.R., Barros, F.N.L., Scofield, A., Abel, I., Moraes, C.C.G., 2019. Detection of *Toxoplasma gondii* in *Crassostrea spp.* oysters cultured in an estuarine region in eastern Amazon. *Zoonoses Public Health* 66, 296–300. <https://doi.org/10.1111/zph.12564>
- Olson, M.E., Goh, J., Phillips, M., Guselle, N., McAllister, T.A., 1999. *Giardia* Cyst and *Cryptosporidium* Oocyst Survival in Water, Soil, and Cattle Feces. *J. Environ. Qual.* 28, 1991. <https://doi.org/10.2134/jeq1999.00472425002800060040x>
- Pales Espinosa, E., Koller, A., Allam, B., 2015. Proteomic characterization of mucosal secretions in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Proteomics* 132, 63–76. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.11.018>
- 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 Res.* 48, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.017>
- Palos Ladeiro, M., Bigot-Clivot, A., Aubert, D., Villena, I., Geffard, A., 2015. Assessment of *Toxoplasma gondii* levels in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) by real-time PCR: an organotropism study. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 13693–13701. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4296-y>
- Palos Ladeiro, M., Bigot-Clivot, A., Geba, E., Le Foll, F., Le Guernic, A., Leprêtre, M., Geffard, A., Aubert, D., Durand, L., Villena, I., La Carbona, S., Favennec, L., Gargala, G., Pierre, S., 2018. Mollusc Bivalves as Indicators of Contamination of Water Bodies by Protozoan Parasites. *Ref. Modul. Earth Syst. Environ. Sci.* <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10979-0>
- Putignani, L., Mancinelli, L., Chierico, F. Del, Menichella, D., Adlerstein, D., Angelici, M.C., Marangi, M., Berrilli, F., Caffara, M., Regalbono, D.A.F. di, Giangaspero, A., 2011. Investigation of *Toxoplasma gondii* presence in farmed shellfish by nested-PCR and real-time PCR fluorescent amplicon generation assay (FLAG). *Exp. Parasitol.* 127, 409–417. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.09.007>
- Putignani, L., Menichella, D., 2010. Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *cryptosporidium*. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/753512>

- Ramo, A., Del Cacho, E., Sánchez-Acedo, C., Quílez, J., 2017. Occurrence and genetic diversity of *Cryptosporidium* and *Giardia* in urban wastewater treatment plants in north-eastern Spain. *Sci. Total Environ.* 598, 628–638. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.097>
- Robert-Gangneux, F., Dardé, M.L., 2012. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>
- Rousseau, A., Escotte-Binet, S., La Carbona, S., Dumètre, A., Chagneau, S., Favennec, L., Kubina, S., Dubey, J.P., Majou, D., Bigot-Clivot, A., Villena, I., Aubert, D., 2019. Assessing *Toxoplasma gondii* oocyst infectivity using a sporocyst-based cell-culture assay combined with qPCR for environmental applications. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM.01189-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.01189-19>
- Solo-Gabriele, H.M., LeRoy Ager, a, Fitzgerald Lindo, J., Dubón, J.M., Neumeister, S.M., Baum, M.K., Palmer, C.J., 1998. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water supplies of San Pedro Sula, Honduras. *Rev. Panam. Salud Publica* 4, 398–400. <https://doi.org/10.1590/S1020-49891998001200006>
- Sprung, M., Rose, U., 1988. Influence of food size and food quantity on the feeding of the mussel *Dreissena polymorpha*. *Oecologia* 77, 526–532. <https://doi.org/10.1007/BF00377269>
- Sroka, J., Wójcik-Fatla, A., Dutkiewicz, J., 2006. Occurrence of *Toxoplasma gondii* in water from wells located on farms. *Ann. Agric. Environ. Med.* 13, 169–75.
- Swaffer, B., Abbott, H., King, B., van der Linden, L., Monis, P., 2018. Understanding human infectious *Cryptosporidium* risk in drinking water supply catchments. *Water Res.* 138, 282–292. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.063>
- Tamburrini, A., Pozio, E., 1999. Long-term survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and in experimentally infected mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Int. J. Parasitol.* 29, 711–715. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00033-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00033-8)
- Tedde, T., Marangi, M., Papini, R., Salza, S., Normanno, G., Virgilio, S., Giangaspero, A., 2019. *Toxoplasma gondii* and Other Zoonotic Protozoans in Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and Blue Mussel (*Mytilus edulis*): A Food Safety Concern? *J. Food Prot.* 82, 535–542. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-18-157>
- Ten Winkel, E.H., Davids, C., 1982. Food selection by *Dreissena polymorpha* Pallas (*Mollusca: Bivalvia*). *Freshw. Biol.* 12, 553–558. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1982.tb00647.x>

- Thurston-Enriquez, J.A., Watt, P., Dowd, S.E., Enriquez, R., Pepper, I.L., Gerba, C.P., 2002. Detection of Protozoan Parasites and Microsporidia in Irrigation Waters Used for Crop Production. *J. Food Prot.* 65, 378–382. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.2.378>
- Triviño-Valencia, J., Lora, F., Zuluaga, J.D., Gomez-Marin, J.E., 2016. Detection by PCR of pathogenic protozoa in raw and drinkable water samples in Colombia. *Parasitol. Res.* 115, 1789–1797. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4917-5>
- Villena, I., Aubert, D., Gomis, P., Ferté, H., Ingland, J.C., Denis-Bisiaux, H., Dondon, J.M., Pisano, E., Ortis, N., Pinon, J.M., 2004. Evaluation of a strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4035–4039. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4035-4039.2004>
- Wells, B., Shaw, H., Innocent, G., Guido, S., Hotchkiss, E., Parigi, M., Opsteegh, M., Green, J., Gillespie, S., Innes, E.A., Katzer, F., 2015. Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in water samples from Scotland and a comparison between the 529bp real-time PCR and ITS1 nested PCR. *Water Res.* 87, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.015>
- WHO, 2012. Animal waste, water quality and human health, WHO. World Health Organization.
- Xiao, L., Alderisio, K.A., Jiang, J., 2006. Detection of Cryptosporidium Oocysts in Water: Effect of the Number of Samples and Analytic Replicates on Test Results. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5942–5947. <https://doi.org/10.1128/AEM.00927-06>

II. *Giardia duodenalis*

Les deux expériences présentées dans l'article ci-dessus ont également été réalisées avec des kystes de *Giardia duodenalis*. Cependant, aucune donnée n'est disponible pour l'expérimentation n°2 (évaluation de l'infectiosité des kystes bioaccumulés). En effet, comme développé dans le Chapitre II (cf. Chapitre II : III. Viabilité et infectiosité des parasites accumulés par la dreissène), *G. duodenalis* étant un parasite extracellulaire, le protocole de CC-qPCR n'a pu être mis au point pour celui-ci. De plus, il était prévu que les broyats de dreissène soient également inoculés à des gerbilles afin d'évaluer l'infectiosité des kystes, malheureusement toutes les gerbilles sont mortes après le gavage et les causes exactes de leur mort restent inconnues.

L'évaluation des transferts bivalve/eau des kystes de *Giardia duodenalis* a pu être réalisée au cours de l'expérimentation n°1. Le même design expérimental, les mêmes protocoles et le même lot de dreissènes que présentés ci-dessus ont été utilisés. Peu d'échantillons se sont révélés être positifs à *Giardia duodenalis* :

- Dans l'eau, 1/6 des échantillons à 3 jours de dépuración et 2/6 des échantillons à 7 jours de dépuración sont positifs. Les quantités retrouvées seraient inférieures à la LOQ (1 kyste/bivalve).
- Dans les bivalves, 2/3 des bivalves à 3 jours de dépuración et 1/3 des bivalves à 7 jours sont positifs. Les quantités relevées dans les tissus sont supérieures à la LOQ (1 kyste/bivalve) avec 3 et 34 kystes/bivalve à 3 jours et 71 kystes/bivalve à 7 jours de dépuración.

Peu de kystes sont retrouvés dans les différents compartiments durant la dépuraction : la période de 24 h d'exposition est peut-être trop courte pour permettre une accumulation importante de parasites ou bien la moule zébrée a pu dégrader les kystes lors de la dépuraction. En effet, lors de la caractérisation de la cinétique d'accumulation seules 5/10 dreissènes sont positives après une exposition de 24 h à 10 000 kystes/jour/moule, et ce, avec une faible quantité de kystes accumulés ($15,1 \pm 19,9$). Cependant, en l'absence de données relatives à l'infectiosité, il est difficile d'apporter une quelconque réponse ou hypothèse afin d'expliquer ces résultats.

III. Conclusion générale

Les résultats ont mis en évidence un transfert des oocystes et des kystes depuis les bivalves vers les eaux. Néanmoins les trois protozoaires étudiés restent bioaccumulés dans les tissus des moules même après 7 jours de dépuración. De plus, les résultats des bioessais montrent une diminution au cours du temps du nombre d'oocystes infectieux de *T. gondii* et *C. parvum* bioaccumulés, ce qui pourrait souligner une dégradation des oocystes par la dreissène. Ainsi la moule zébrée pourrait être envisagée comme outil de biodégradation des protozoaires dans le but d'améliorer le traitement des eaux.

Toutefois, de futures études sont nécessaires afin d'améliorer nos connaissances sur ces potentielles voies de dégradation des parasites ainsi que leur efficacité et sur l'infectiosité des kystes de *Giardia duodenalis* bioaccumulés.

Chapitre VI : Discussion et perspectives

I. Stratégie abordée lors du projet de thèse

La capacité de bioaccumulation des oocystes de *Toxoplasma gondii* et de *Cryptosporidium parvum* ainsi que des kystes de *Giardia duodenalis* par *Dreissena polymorpha* est connue depuis quelques années. En effet, l'accumulation de *C. parvum* et de *G. duodenalis* a été décrite sur 5 semaines par immunofluorescence (Graczyk *et al.*, 2003) tandis que celle de *T. gondii* a été évaluée sur 4 semaines par qPCR TaqMan (Palos Ladeiro *et al.*, 2015). De plus, ces deux études avaient montré que les parasites bioaccumulés persistaient dans les tissus des dreissènes au moins jusqu'à 2 semaines de dépuración. Néanmoins ces études n'ont apporté aucune information sur la corrélation entre la charge en protozoaires dans les eaux et la quantité bioaccumulée dans les dreissènes. De plus, les techniques d'immunofluorescence présentent plusieurs inconvénients :

- Elles sont coûteuses.
- Le taux de récupération des parasites n'est estimé qu'à 51,1% (Graczyk *et al.*, 1999), entraînant un fort risque de faux négatif.
- La détection des oocystes de *T. gondii* est impossible, car aucun anticorps dirigé contre ces oocystes n'est commercialisé à l'heure actuelle.

C'est pourquoi au début de ce projet, la mise au point d'une technique de détection commune aux trois protozoaires s'est avérée nécessaire. Ceci a été rendu possible par l'axe 2 de l'ANR MOBIDIC qui a abouti à la mise en place d'un protocole d'extraction de l'ADN des parasites ayant des limites de détection très faibles, décrit ci-dessus (cf. Chapitre II. II.). Ces nouvelles techniques nous ont permis de caractériser la cinétique d'accumulation ainsi que la cinétique de dépuración des trois parasites chez la dreissène à travers deux compartiments :

l'hémolymphe et les tissus. L'étude distincte de ces deux compartiments nous a paru primordiale, en effet, le système circulatoire des bivalves est semi-ouvert, c'est — à-dire que l'hémolymphe circule dans les vaisseaux, le cœur mais également dans les organes, permettant le transport, entre autres, des contaminants vers les tissus. Afin de mieux appréhender les mécanismes et la vitesse d'accumulation des protozoaires, ceux-ci ont donc été recherchés dans l'hémolymphe et dans les tissus dès 1, 2 et 3 jours, et ce, durant une période d'exposition et de dépuraction de 21 jours. Cette étude a permis de souligner la rapidité avec laquelle la moule zébrée est capable d'extraire les parasites de l'eau : dès 1 jour pour les trois protozoaires. De plus, peu d'oocystes de *C. parvum* et de kystes de *G. duodenalis* sont retrouvés dans les eaux après 7 jours d'exposition ce qui semble souligner l'importance de cette extraction. La caractérisation des limites de détection et de quantification de l'extraction des ADN des protozoaires dans une eau chargée en fèces, pseudo-fèces et autres débris n'ont pas pu être réalisées durant ce projet de thèse. Il semble, par exemple, que cette technique ait surestimé le nombre d'oocystes de *Toxoplasma* présents dans l'eau des aquariums utilisés lors des cinétiques d'accumulation (cf. Chapitre III : Etude des cinétiques d'accumulation et de dépuraction des protozoaires par la dreissène).

La bioaccumulation rapide des protozoaires par la dreissène met en évidence un potentiel d'extraction sensible et souligne l'intérêt de l'utilisation de la moule zébrée en tant qu'outil de bioremédiation. Des comportements différents ont toutefois été montrés durant cette première expérimentation (cf. Chapitre III : Etude des cinétiques d'accumulation et de dépuraction des protozoaires par la dreissène), ces parasites ne seraient donc pas gérés de la même manière par les moules : *Toxoplasma gondii* semble avoir une accumulation rapide et forte dans les tissus tandis que *Giardia duodenalis* est plus rapidement détecté dans l'hémolymphe. De plus, peu d'oocystes de *Cryptosporidium parvum* sont détectés dans les

tissus, dans l'hémolymphe ainsi que dans l'eau. Bien que le protocole d'extraction ait une sensibilité plus faible pour *C. parvum* que pour les deux autres parasites (50 oocystes/moule < LOD < 100 oocystes/moule), il semble étonnant qu'aussi peu d'oocystes puissent être détectés au vu des fortes concentrations d'exposition.

Ces résultats ont soulevé beaucoup de questions quant au devenir des parasites bioaccumulés par la dreissène. En effet, les bivalves étant des hôtes paraténiques, peu d'études se sont intéressées aux interactions possibles entre la physiologie des dreissènes et celle des protozoaires. Récemment, certains auteurs se sont penchés sur les interactions entre les hémocytes des moules zébrées et les formes environnementales de *T. gondii*, *G. duodenalis* et de *C. parvum* en *ex vivo* et ont ainsi mis en évidence deux gestions différentes de la contamination par les hémocytes. Les oocystes de *C. parvum* ont été internalisés par les hémocytes (Palos Ladeiro *et al.*, 2018), rendant possible une potentielle phagocytose de ceux-ci, alors que les oocystes de *T. gondii* et les kystes de *G. duodenalis* provoquent une agrégation des hémocytes, ce qui semble plutôt suggérer un comportement d'encapsulation (Le Guernic *et al.*, 2018). Ces études soulignent une réaction *ex vivo* des hémocytes vis-à-vis des protozoaires, cependant ces résultats ne reflètent pas forcément le comportement *in vivo* de ces cellules.

Afin d'améliorer les connaissances sur le devenir des protozoaires au sein de la dreissène, deux expérimentations complémentaires ont été mises en place à une échelle plus globale (cf. Chapitre V : Devenir des protozoaires accumulés par la dreissène) : l'une a permis d'évaluer la quantité de parasites rejetés dans les eaux durant 7 jours de dépuración tandis que l'autre s'est intéressée à l'infectiosité des protozoaires bioaccumulés après 7 jours d'exposition et 7 jours de dépuración. La quantité de *Toxoplasma* et de *Cryptosporidium*

rejetée dans les eaux reste faible et diminue au cours de la dépuración, ce qui suggère une ré-accumulation des oocytes rejetés, de plus l'infectiosité des oocytes bioaccumulés diminue après 7 jours de dépuración. Si les oocystes sont peu rejetés dans les eaux et que leur infectiosité diminue dans les bivalves, on peut supposer que les dreissènes sont capables d'altérer leur mécanisme d'infection. Cependant, ces études ne sont que préliminaires et ne permettent pas de conclure quant à la dégradation ou à l'altération effective des protozoaires par la dreissène. De plus, de futures expérimentations devront être réalisées afin d'évaluer le devenir des kystes de *Giardia* bioaccumulés par la dreissène.

Les précédents résultats ont permis de mettre en évidence le rôle de la dreissène en tant qu'outil d'extraction des protozoaires en milieu aquatique, toutefois avant de proposer la moule zébrée comme outil de dépuración en effluent de STEP, il a été nécessaire d'évaluer l'impact de l'effluent sur sa survie et sur son efficacité à extraire les protozoaires. Certains auteurs ont montré que la moule zébrée était capable de survivre en effluent de STEP dans des conditions semi-contrôlées (débit, température...) et sur des temps relativement courts (de 24 h à 3 semaines) (Binelli *et al.*, 2014, Elliott *et al.*, 2008, Magni *et al.*, 2015), tout en éliminant des eaux divers contaminants : métaux (Magni *et al.*, 2015), produits pharmaceutiques (Binelli *et al.*, 2014), virus (Mezzanotte *et al.*, 2016). Afin de rendre compte de l'impact de l'effluent sur la dreissène, une première expérimentation en conditions contrôlées a été réalisée durant 28 jours, celle-ci n'a mis en évidence aucun impact de l'effluent sur les fonctions hémocytaires ou sur le taux de clairance. L'effluent n'étant pas la seule source potentielle de stress en station de dépuración, une deuxième expérience a été menée *in situ* afin d'évaluer l'impact des fortes variations de certains paramètres physico-chimiques (température, oxygène, débit...), qui, mêlés aux multiples contaminants, sont susceptibles d'induire de forts stress chez les organismes exposés. L'encagement de

dreissènes dans le canal de sortie de la STEP de Charleville-Mézières (Ardennes, France) a permis de mettre en évidence un temps de maintien des moules zébrées compris entre 21 jours et 28 jours. En effet, à 28 jours passés dans le canal de sortie, l'efficacité de filtration des individus diminue, le taux de mortalité augmente et certains marqueurs du système antioxydant s'activent. Malgré les conditions difficiles rencontrées dans la STEP (débit trop élevé, oxygénation trop faible, épuisement des individus à 28 jours) les dreissènes ont bioaccumulé des oocystes de *Toxoplasma gondii* ainsi que des kystes de *Giardia duodenalis* présents dans l'effluent, conservant ainsi leur fonction de bioremédiation vis-à-vis des parasites.

Bien que de nombreuses questions restent en suspens, l'ensemble de ces résultats tend à montrer que la dreissène pourrait être un bon outil de bioremédiation des protozoaires, et ce, même en effluent de STEP. La carte heuristique présentée ci-dessous (Figure 37) schématise la stratégie abordée au cours de ce projet de thèse en représentant d'une part les objectifs atteints durant ces trois ans et d'autre part les perspectives d'études qui en découlent.

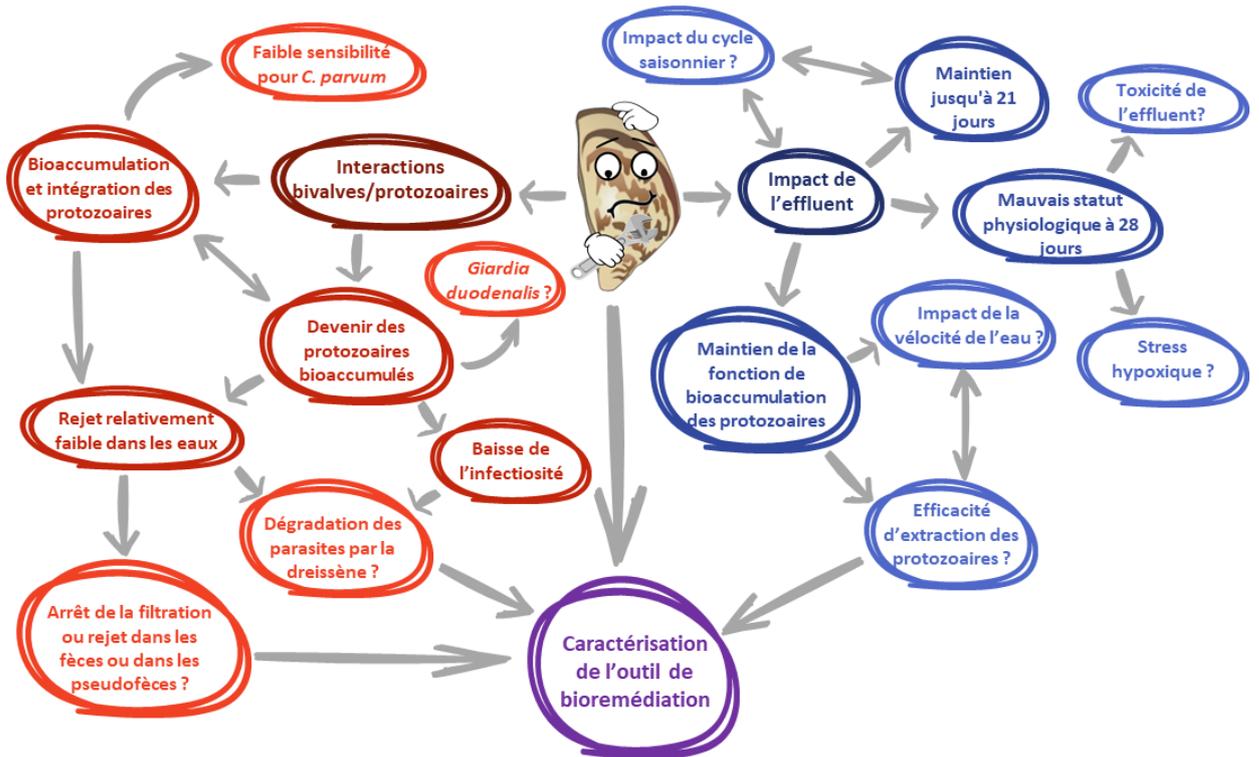


Figure 37 : Carte heuristique représentant la stratégie abordée au cours de la thèse. En rouge les questions concernant les interactions bivalves/protozoaires et en bleu les expériences se rapportant au comportement des dreissènes dans les effluents.

II. Interactions bivalves/protozoaires

Les interactions entre la dreissène et les protozoaires sont au cœur des processus de bioaccumulation des protozoaires. Ces interactions passent par la filtration des protozoaires *via* les branchies, par la sélection de ceux-ci au niveau des palpes labiaux et par leur prise en charge par l'organisme à travers l'hémolymphe ou divers organes de la moule zébrée.

1. Bioaccumulation des protozoaires

Au cours des travaux réalisés durant ces trois années de thèse, nous avons montré une extraction efficace des protozoaires par la dreissène. En effet, la dreissène accumule les protozoaires dès le premier jour de l'exposition et très peu de *C. parvum* et de *G. duodenalis*

sont retrouvés dans les eaux durant l'exposition. Celle-ci est également capable de conserver cette contamination en période de dépuración (durant 21 jours au moins), néanmoins nos expériences ont montré un faible rejet de protozoaires dans les eaux après exposition suivie d'une re-filtration des parasites rejetés par la dreissène. Lors d'exposition des dreissènes à de plus faibles concentrations de *C. parvum* et de *G. duodenalis* (106 oocystes et 304 kystes tous les jours pour 220 moules zébrées), aucun oocyste ou kyste n'a été retrouvé dans les eaux ni dans les sédiments durant les 5 semaines d'exposition ainsi que durant les 2 semaines de dépuración (Graczyk *et al.*, 2003). Les rejets observés en période de dépuración lors de nos expérimentations pourraient donc être imputés à des doses de contamination trop importantes (20 000 protozoaires par moule pendant 24 h et entre 100 et 10 000 protozoaires par moule par jour pendant 28 jours) qui engendreraient une saturation des systèmes d'accumulation de la dreissène provoquant une baisse de l'ingestion des parasites (production de pseudo-fèces) ou une élimination *via* le tractus intestinal (production de fèces).

Bien qu'aucune corrélation entre la quantité de protozoaires bioaccumulés et la charge en parasites dans les eaux n'ait été clairement mise en évidence, il semble néanmoins que le pourcentage de dreissènes positives aux protozoaires soit corrélé avec le niveau de contamination. En effet, les pourcentages de détection augmentent avec les concentrations de *T. gondii* et *G. duodenalis* dans les eaux. *T. gondii* est détecté très vite dans les tissus : 100 % des tissus sont positifs dès 3 jours, ne permettant pas de discriminer les concentrations retrouvées dans l'eau passé ce délai. Néanmoins, la détection des oocystes de *Toxoplasma* dans l'hémolymphe reflète le niveau de contamination de l'eau, et ce, dès 7 jours d'exposition et jusqu'à 21 jours de dépuración. Or, les techniques d'extraction utilisées permettent la détection de *T. gondii* dès 1 à 5 oocystes dans les tissus contre 10 à 50 oocystes dans l'hémolymphe. Ces différentes limites de détection pour chacun des compartiments peuvent

expliquer ces niveaux de détection différents. Pour *G. duodenalis*, en revanche, la détection est plus précoce et les pourcentages de détection sont 10% en moyenne plus élevés à chaque temps de prélèvement dans l'hémolymphe que dans les tissus malgré une méthode plus sensible pour les tissus (LOD < 1 oocyste/moule) que pour l'hémolymphe (5 < LOD < 10). De plus, la quantité des kystes retrouvés dans l'hémolymphe diminue brutalement durant les premières 24 h de dépuración, en parallèle une augmentation des kystes bioaccumulés est observée dans les tissus. Ces résultats semblent suggérer que les kystes pourraient être bioaccumulés préférentiellement dans l'hémolymphe puis seraient transférés dans les tissus en période de dépuración.

Lors de nos différentes études, nous avons toujours observé une plus forte quantité de *T. gondii* que de *G. duodenalis* et que de *C. parvum* dans les tissus des dreissènes pour une même concentration ajoutée au départ. Les mêmes observations ont été réalisées grâce à l'utilisation de la qPCR TaqMan lors d'expositions simples et simultanées des moules zébrées aux trois parasites (Palos Ladeiro *et al.*, 2014). *A contrario*, Graczyk *et al.* (2003) ont montré une accumulation plus importante de *C. parvum* dans les dreissènes que de *G. duodenalis* malgré une concentration trois fois plus élevée de *Giardia* que de *Cryptosporidium* ajoutée quotidiennement. Ces résultats ont été obtenus par immunofluorescence, or cette technique permet la visualisation de parasites altérés comme des parois d'oocystes et de kystes vides ou contenant de l'ADN dégradé (Gómez-Couso *et al.*, 2004, Graczyk *et al.*, 2004). Il est possible que les protozoaires les plus altérés aient été mis en évidence par immunofluorescence, contrairement aux mesures réalisées en biologie moléculaire qui ciblent l'ADN des parasites. De plus, les techniques d'extraction d'ADN doivent être suffisamment drastiques pour permettre la destruction des parois des parasites (billes de broyage, cycles de chaud/froid) et

l'accès à leur ADN, ce qui pourrait provoquer la dégradation des ADN des oocystes les plus fragiles.

La faible accumulation des oocystes de *C. parvum* que nous avons observée peut également être attribuée à un protocole moins sensible : la LOD est située entre 50 et 100 oocystes par bivalve dans les tissus ainsi que dans l'hémolymphe pour une LOQ située à 100 oocystes/bivalve. Nos résultats ont clairement sous-estimé la quantité de *C. parvum* bioaccumulés : lors des cinétiques d'accumulation aucun oocyste n'a été détecté dans l'hémolymphe ou dans les tissus des dreissènes après 7 jours d'exposition à 1 000 oocystes/jour/bivalve et seulement deux moules positives (< LOQ) à 10 000 oocystes/jour/bivalve (cf. Chapitre III : Etude des cinétiques d'accumulation et de dépuraison des protozoaires par la dreissène); alors que lors de l'évaluation de l'infectiosité des oocystes bioaccumulés (cf. Chapitre V : Devenir des protozoaires accumulés par la dreissène), les bioessais ont estimé le nombre d'oocystes infectieux par bivalve à 410 ± 67 et 404 ± 16 après 7 jours d'exposition à respectivement 1 000 et 10 000 oocystes/bivalve. Beaucoup de verrous techniques persistent encore aujourd'hui à propos de la détection des protozoaires dans des matrices complexes et les résultats varient énormément d'une technique à l'autre (Robertson, 2007). En effet, le choix de l'échantillon (pool, organisme entier, organe en particulier), la méthode de préparation (homogénéat, lavage), les procédures de purification ou de concentration (séparation immunomagnétique, centrifugation, gradient) ainsi que la méthode de détection (PCR, nested PCR, immunofluorescence...) vont influencer la sensibilité finale de la détection. Les auteurs ne s'accordent pas sur l'utilisation d'une technique en particulier. Miller *et al.* (2005) ont mis en évidence une sensibilité plus élevée de la PCR pour la détection de *C. parvum* alors que d'autres auteurs ont montré que la PCR a échoué à identifier 59 % (Fayer *et al.*, 2003) ou encore 90,5 % (Gómez-Couso *et al.*, 2006) des échantillons pourtant

déTECTÉS positifs à *C. parvum* en IFA. A l'inverse, ces mêmes études ont également mis en évidence que 50 % (Fayer *et al.*, 2003) et 46,1 % (Gómez-Couso *et al.*, 2006) des échantillons positifs à *C. parvum* étaient négatifs en IFA. Malgré tout, le protocole d'extraction et de qPCR TaqMan que nous avons utilisé a permis d'obtenir des sensibilités de détection allant de 1 kyste/bivalve pour *G. duodenalis* et entre 1 et 5 oocystes de *T. gondii* dans les tissus de *D. polymorpha*.

2. Dégradation des protozoaires

L'altération et/ou la dégradation des protozoaires par la dreissène n'a/n'ont pas pu être démontrée(s) avec certitude, cependant la diminution de l'infectiosité de *C. parvum* et de *T. gondii* ainsi que leurs faibles rejets dans le milieu nous laisse supposer que l'existence de tels mécanismes est possible. Bien que la dreissène soit un hôte paraténique des protozoaires étudiés, ces altérations pourraient être le produit de réactions immunitaires face à la présence de corps étrangers.

Certaines études *ex vivo* se sont intéressées au rôle des hémocytes dans cette interaction bivalve/protozoaire. En effet, les hémocytes sont les cellules du maintien de l'homéostasie, elles sont impliquées dans de nombreuses fonctions dont les défenses immunitaires à travers différents mécanismes (médiation humorale, système phénoloxydase, production d'espèces réactives de l'oxygène et médiation cellulaire). Or, les hémocytes semblent se comporter de manière différente avec les oocystes de *T. gondii* et les kystes de *G. duodenalis* par rapport aux oocystes de *C. parvum*. Lors d'expositions *ex vivo* des hémocytes à différents ratios de protozoaires (0:1 à 10:1 oocystes ou kystes par hémocyte), les auteurs ont mis en évidence en cytométrie en flux une mortalité des hémocytes augmentant de manière dose-dépendante en

présence de *T. gondii* et de *G. duodenalis* (Le Guernic *et al.*, 2018, Palos Ladeiro *et al.*, 2018), alors qu'aucune augmentation de la mortalité hémoduodénale n'a été observée lors de l'exposition aux oocystes de *C. parvum*. De plus, comme expliqué précédemment, les oocystes de *C. parvum* ont été internalisés par les hémoduodéniocytes (Palos Ladeiro *et al.*, 2018), rendant possible une potentielle phagocytose de ceux-ci, alors que, les oocystes de *T. gondii* et les kystes de *G. duodenalis* provoquent une agrégation des hémoduodéniocytes, ce qui semble plutôt suggérer un comportement d'encapsulation (Le Guernic *et al.*, 2018).

La phagocytose permet l'internalisation de petits corps étrangers et leur destruction grâce aux enzymes lysosomales et à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les oocystes de *C. parvum* ne mesurant que 4 à 5 µm de diamètre (Fayer *et al.*, 2000), soit la moitié à peine du diamètre des hémoduodéniocytes (8 à 12 µm), leur phagocytose peut être rendue possible. Contrairement aux oocystes de *T. gondii* et aux kystes de *G. duodenalis*, qui eux mesurent respectivement 10 à 12 µm (Dubey, 2004) et 12 à 15 µm (Adam, 2001). Ces deux protozoaires étant plus grands que les hémoduodéniocytes, ceux-ci sont incapables de les phagocyter et auront plutôt un comportement d'agrégation. L'encapsulation correspond à l'agrégation des hémoduodéniocytes autour d'un corps étranger trop imposant pour être phagocyté. Les hémoduodéniocytes vont sécréter de nombreux produits cytotoxiques (enzymes de dégradation et radicaux libres) au sein de la capsule ainsi formée afin de détruire le corps étranger. L'excrétion de ces composés cytotoxiques par les hémoduodéniocytes lors du processus d'encapsulation pourrait être à l'origine de la mortalité hémoduodénale observée.

Ces études soulignent une réaction *ex vivo* des hémoduodéniocytes vis-à-vis des protozoaires, cependant ces résultats ne reflètent pas forcément le comportement *in vivo* de ces cellules. Chez *Tapes decussatus*, une étude histologique a permis le suivi d'oocystes de *C. parvum*

durant leur accumulation ; les auteurs ont ainsi montré que les oocystes passaient par les siphons et les branchies puis étaient ingérés et se mélangeaient au bol alimentaire dans l'estomac, les diverticules digestifs et les intestins sans jamais traverser les épithéliums branchiaux et gastro-intestinaux (Gómez-Couso *et al.*, 2005b). Cependant, lors de nos expérimentations des oocystes de *T. gondii* et des kystes de *G. duodenalis* ont été retrouvés dans l'hémolymphe dès 24 h d'exposition, de même des oocystes de *C. parvum* ont été retrouvés dans l'hémolymphe de dreissène en conditions environnementales (Graczyk *et al.*, 2004). Ces protozoaires seraient donc capables de traverser la barrière épithéliale chez *D. polymorpha* et pourraient entrer en contact avec les hémocytes.

D'autres processus immunitaires peuvent également intervenir en amont et sont susceptibles d'interagir avec les parois des protozoaires et, entre autres, de modifier la nature des interactions observées en *ex vivo*. En effet, les épithéliums (branchies, palpes labiaux et manteaux) constituent la première ligne de défense des organismes contre le milieu extérieur ainsi que le milieu extra-palléal. Ces épithéliums sont recouverts d'un mucus participant, par exemple, à la protection de l'organisme grâce à des lysozymes, des protéases ou encore des défensines (Allam & Pales Espinosa, 2016, Pales Espinosa *et al.*, 2015). Ces protéines du système immunitaire pourraient reconnaître les protozoaires lors de leur passage à travers les branchies (Gómez-Couso *et al.*, 2005b) ou dans la cavité palléale et, par exemple, altérer certaines protéines membranaires (Harito *et al.*, 2016, Liu *et al.*, 2010). Chez *Ruditapes philippinarum*, le manteau sécrète des lysozymes dans la cavité extra-palléale en réponse à un pathogène spécifique du bivalve (Allam & Pales Espinosa, 2016). Lors d'une étude sur l'organotropisme de *T. gondii* chez la moule zébrée, les auteurs ont mis en évidence une accumulation préférentielle des oocystes dans le manteau (Palos Ladeiro *et al.*, 2015), or un mécanisme de défense similaire à celui observé chez *Ruditapes philippinarum* pourrait avoir

lieu chez la moule zébrée. Cependant, à l'heure actuelle aucune étude de la composition du mucus de *D. polymorpha* n'a été réalisée, de plus, chez les bivalves le mucus participe également à la sélection chimique des particules ingérées (Pales Espinosa *et al.*, 2016).

A l'avenir il pourrait être intéressant de s'intéresser aux interactions existantes entre le mucus et les protozoaires, afin de mieux comprendre les modalités d'accumulation et la gestion des parasites par la dreissène. De plus, les enzymes contenues dans le mucus ainsi que dans le système digestif des moules zébrées sont susceptibles d'impacter leur viabilité et leur infectiosité, comme cela a été démontré chez *Tapes decussatus* lors de l'étude histologique (Gómez-Couso *et al.* 2005b). Afin de vérifier ces hypothèses, l'infectiosité des parasites pourrait être testée en parallèle dans les tissus et/ou l'hémolymphe des dreissènes ainsi que dans les fèces et pseudo-fèces. De plus, seule l'utilisation des bioessais nous permet une quantification et une forte sensibilité vis-à-vis des parasites infectieux, or c'est une technique coûteuse qui entraîne un sacrifice animal. L'utilisation de la CC-qPCR pour la détection de l'infectiosité de *T. gondii* pourrait être une alternative aux modèles animaux (Rousseau *et al.*, 2019), cependant cette technique ne permet pas la quantification des oocystes infectieux.

Afin d'améliorer les connaissances sur le devenir des parasites bioaccumulés, d'autres pistes ont été suivies au sein du laboratoire. L'utilisation de techniques de microscopie telle que l'histologie pourrait nous permettre d'observer les tissus dans lesquels les oocystes et kystes seraient préférentiellement accumulés et peut être de déterminer le niveau d'intégrité de leur paroi. Durant les 7 jours de dépuration des dreissènes après une exposition de 24 h à 20 000 protozoaires, trois moules ont été prélevées à 3 et 7 jours afin d'être analysées en histologie. Cependant, ces tests sont encore en phase de mise au point, les techniques

d'immunohistologie ne permettant pas de visualiser le niveau d'intégrité des parois, l'objectif est de coupler ces observations avec une coloration spécifique des protozoaires. De plus, il n'existe aucun anticorps dirigé contre les oocystes de *Toxoplasma*, or il semble que certains oocystes perdent leur autofluorescence naturelle en fonction des aléas de la coupe. Par manque de temps, nous n'avons pas pu trouver de coloration permettant de discriminer les protozoaires des tissus des bivalves, ce verrou technique représente ainsi une perspective d'étude intéressante.

III. Vers un prototype utilisant la dreissène comme outil de bioremédiation ?

Le rôle de la dreissène en tant qu'outil d'extraction des protozoaires a précédemment été discuté, toutefois avant de proposer la moule zébrée comme outil d'épuration en effluent de STEP, il a été nécessaire de comprendre quel peut être l'impact de l'effluent sur sa survie et sur son efficacité à extraire les protozoaires.

1. Maintien de la dreissène en effluent de STEP

Lors de nos recherches, nous avons mis en évidence un temps de maintien en bonne santé des dreissènes en effluent compris entre 21 et 28 jours. Elliott *et al.* (2008) ont également montré que les moules zébrées peuvent survivre 3 semaines en effluent industriel en circuit ouvert et en conditions semi-contrôlées (densité des individus, vitesse de l'eau), tandis que Binelli *et al.* (2014) n'ont observé aucun impact de l'effluent sur le taux de lipides, la quantité de protéine totale et le taux de mortalité des dreissènes conservées durant 3 mois dans un effluent en circuit fermé et en débit contrôlé. Ces différentes études soulignent la forte

résistance de cette espèce face aux conditions physico-chimiques des effluents ainsi qu'aux nombreux contaminants pouvant s'y trouver. Lors de l'encagement des organismes dans le canal de sortie de la STEP de Charleville-Mézières (Ardennes, France), nous avons observé une baisse de l'efficacité de filtration, un fort taux de mortalité ainsi qu'un stress oxydatif à 28 jours d'exposition. Or, la dreissène s'étant avérée être relativement résistante aux effluents en conditions semi-contrôlées (Binelli *et al.*, 2014, Elliott *et al.*, 2008), il est probable que la diminution du maintien des organismes encagés soit due aux conditions hypoxiques mesurées ($48\% \pm 1,5$ d'oxygène) dans le canal plutôt qu'à la toxicité de l'effluent. De plus, la vitesse élevée de l'effluent dans le canal de sortie de la STEP (estimée entre 40 et 60 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) est connue pour inhiber le taux de filtration des dreissènes (Ackerman, 1999) et peut donc contribuer au stress hypoxique. Aucun impact de l'effluent n'a été relevé lors de notre exposition en laboratoire (en conditions semi-statiques), ce qui étaye l'hypothèse du stress hypoxique.

Cependant, les effluents utilisés lors de l'exposition en laboratoire ont été conservés un mois et demi à 4°C dans le noir alors qu'il est préconisé que la conservation des effluents ne dépasse pas 48h à 5°C (Ministère de la Transition écologique et solidaire, 2018). En effet, certains composés ont pu se dégrader modifiant les paramètres physico-chimiques et la toxicité de l'effluent. Afin de mieux appréhender les causes du fort taux de mortalité d'autres études doivent être réalisées, par exemple en dérivant l'effluent jusqu'à un bac de rétention contenant les dreissènes ce qui permettrait de contrôler le débit ainsi que l'oxygénation de l'effluent, à l'image de la station pilote de Milan-Nosedo (Figure 38 ; Italie).



Figure 38 : Bac d'exposition de dreissènes de la station pilote de Milan-Nosedo (Italie), la ligne jaune représente la circulation de l'effluent (Binelli *et al.*, 2014)

Une telle structure, fonctionnant en circuit ouvert, permettrait également d'évaluer plus facilement l'impact de l'effluent sur la moule zébrée tout au long de l'année. En effet, la toxicité de l'effluent est susceptible de varier au gré des rejets, de la pluviométrie et des saisons (Comber *et al.*, 2019, Sun *et al.*, 2014). La dreissène peut également avoir une susceptibilité différente aux contaminants en fonction de son stade de reproduction. Il a ainsi été observé une sensibilité des dreissènes plus importante aux molluscicides en période de ponte (Costa *et al.*, 2008). Afin de vérifier ces effets saisonniers, un deuxième encagement était prévu en hiver, malheureusement les conditions météorologiques sur notre site d'approvisionnement en dreissènes ont entraîné une interdiction de pêche durant cette période.

Lors de l'étude *in situ*, les dreissènes restées 28 jours dans le canal de sortie de la STEP ont recouvré un fort taux de clairance après seulement 5 jours passés en eau claire au laboratoire. Ces résultats suggèrent qu'aucune atteinte irrémédiable de leur fonction de

filtration n'a été causée par les conditions retrouvées dans l'effluent. Il serait également intéressant de suivre les autres biomarqueurs en période de dépuración afin d'évaluer le temps nécessaire à la dreissène pour revenir à un bon statut physiologique. Si effectivement, la moule zébrée est capable de se remettre rapidement d'une exposition, il pourrait être possible de réutiliser plusieurs fois des organismes exposés à l'effluent à des fins de bioremédiation.

2. Efficacité de l'outil de bioremédiation

Durant notre exposition *in situ* nous avons mis en évidence une accumulation de *T. gondii* et de *G. duodenalis* dans les tissus des moules zébrées engagées dans le canal de sortie de la STEP. Les pourcentages de détection relevés dans les dreissènes semblent être cohérents avec la présence des protozoaires dans l'effluent et montrent une intégration de cette information sur le long terme. En effet, *T. gondii* et *G. duodenalis* ont été retrouvés dans les effluents à T0 puis dans les tissus des dreissènes lors du prélèvement qui a suivi (2 jours). Cependant, à 28 jours *C. parvum* et *G. duodenalis* sont retrouvés dans l'effluent alors que ces protozoaires ne sont pas retrouvés dans les tissus des dreissènes. Il semble que le temps de mise en contact de l'effluent n'a pas été assez important pour permettre l'extraction des parasites. Néanmoins, ces résultats ont mis en évidence que les dreissènes étaient capables de bioaccumuler ces protozoaires en effluent de STEP et de les conserver dans leur tissu, en particulier pour *T. gondii* qui est retrouvé lors de chaque prélèvement alors que l'analyse de l'effluent à 28 jours est négative.

L'efficacité d'extraction des protozoaires par la dreissène n'a été évaluée qu'en conditions de laboratoire avec de fortes quantités journalières de protozoaires ajoutées pour lesquelles

une extraction efficace de *C. parvum* et *G. duodenalis* semble avoir eu lieu alors que *T. gondii* aurait plutôt été stabilisé grâce à son accumulation dans les fèces. Or, les quantités de parasites retrouvés dans l'effluent peuvent être très variables et soumises à diverses variations physico-chimiques (débit, pluviométrie, saison, type de traitement utilisé...). En Italie, par exemple, des auteurs ont trouvé en moyenne entre 0,21 et 56 oocystes de *C. parvum*.L⁻¹ et entre 1,4 et 6 160 kystes de *G. duodenalis*.L⁻¹ dans les différents effluents testés positifs (Giangaspero et al., 2007 pour review). En Espagne, la littérature montre des quantités de protozoaires dans les effluents allant de 0,5 à 1 157 *C. parvum*.L⁻¹ et de 0,6 à 6 000 *G. duodenalis*.L⁻¹. Ces concentrations environnementales sont souvent plus faibles que celles testées durant nos expériences, de plus, les plus fortes concentrations ne sont retrouvées que ponctuellement dans l'environnement.

Des études complémentaires sont donc nécessaires afin de caractériser l'efficacité de l'extraction de la dreissène vis-à-vis des protozoaires pour des concentrations environnementales ainsi que les limites du modèle. L'efficacité de l'extraction pourrait également être évaluée grâce à un système en dérivation en circuit ouvert permettant la quantification des protozoaires présents dans les eaux avant et après biofiltration, dans les dreissènes ainsi que dans les (pseudo)fèces. Plusieurs paramètres sont à prendre en considération lors de cette caractérisation. En effet, la température, par exemple, influe sur le taux de filtration : plus la température augmente plus le taux de filtration est élevé (Morton, 1971) ; ce qui entraîne une variation saisonnière du taux de clairance des dreissènes avec une augmentation relevée de janvier à juillet (Costa et al., 2008). Ces variations pourraient ainsi entraîner une variation de l'efficacité d'extraction des protozoaires par la dreissène. Le taux de clairance est également impacté par la taille des individus, plus la surface de la coquille est importante plus le taux de clairance est élevé (Horgan & Mills, 1997, Morton, 1971).

Cependant, d'autres auteurs ont montré que la taille des individus n'impactait pas la charge en protozoaires bioaccumulés dans les tissus des dreissènes (Lucy *et al.*, 2010). Certains paramètres physico-chimiques doivent également être pris en compte, c'est le cas par exemple de la vitesse de l'eau : le taux de clairance augmente jusqu'à atteindre un plateau pour des vitesses comprises entre 4 et 12 cm.s⁻¹ (Elliott *et al.*, 2008) puis est inhibé pour des vitesses supérieures à 20 cm.s⁻¹ (Ackerman, 1999). Il semble que cette inhibition soit due à un changement de comportement des dreissènes, en effet à 20 cm.s⁻¹ les dreissènes sont ouvertes mais les siphons ne sont pas étendus contrairement à 10 cm.s⁻¹.

Il serait intéressant de définir une densité et une surface optimales de moules zébrées à utiliser afin d'optimiser l'extraction des protozoaires des eaux. Par exemple, Graczyk *et al.* (2001) ont estimé que la moule zébrée serait capable de bioaccumuler $1,3 \cdot 10^7$ oocystes de *C. parvum* par m² de colonie de moules. Cependant, cette estimation a été réalisée à partir des densités moyennes observées, ici les auteurs ont pris en compte une densité 30 000 dreissènes.m⁻², et une quantité de *C. parvum* retrouvés dans les tissus lors d'exposition en laboratoire. L'impact de la densité sur l'efficacité de l'extraction des protozoaires n'a pas été étudié en conditions environnementales. Des auteurs ont néanmoins mis en avant une influence positive de la densité des moules zébrées sur l'abattement de la chlorophylle (Elliott *et al.*, 2008) et de la matière en suspension (Zaiko & Daunys, 2012).

3. Optimisation d'un prototype : quelles questions subsistent ?

Durant ce projet de thèse, la mise en œuvre d'une structure prototype permettant l'ajout d'un réservoir de dreissènes en tant que traitement tertiaire des STEPs n'a pas pu être abordée par manque de temps. Cependant, les résultats obtenus au cours de ce travail soulignent

l'intérêt de la dreissène en tant qu'outil de bioremédiation des protozoaires. De plus, la mise en place d'un traitement par biofiltration des dreissènes permettrait également l'extraction et la stabilisation de divers contaminants comme des métaux lourds (Magni *et al.*, 2015), des produits pharmaceutiques (Binelli *et al.*, 2014), d'entérovirus ou encore de la bactérie *Escherichia coli* (Mezzanotte *et al.*, 2016). Il nous a donc semblé important de s'intéresser à l'application de cet outil et aux précautions à prendre.

Un brevet a été déposé aux Etats-Unis en 1997 (US5628904A ; Bean, 1997 ; expiré en 2015) proposant un prototype permettant la filtration des eaux usées par la dreissène (Figure 39). L'auteur propose de fixer les dreissènes sur des plans verticaux, l'eau circulant de part et d'autre de ces plans sera filtrée par les organismes fixés. Des renforcements situés au bas du système permettent de récolter les fèces, pseudo-fèces et les moules mortes afin de récupérer ces matières pouvant contenir des contaminants, dans le but de les évacuer. Ce prototype a l'avantage de permettre la récupération des protozoaires stabilisés à travers les fèces et pseudo-fèces dans le but de les traiter en tant que déchets biologiques.

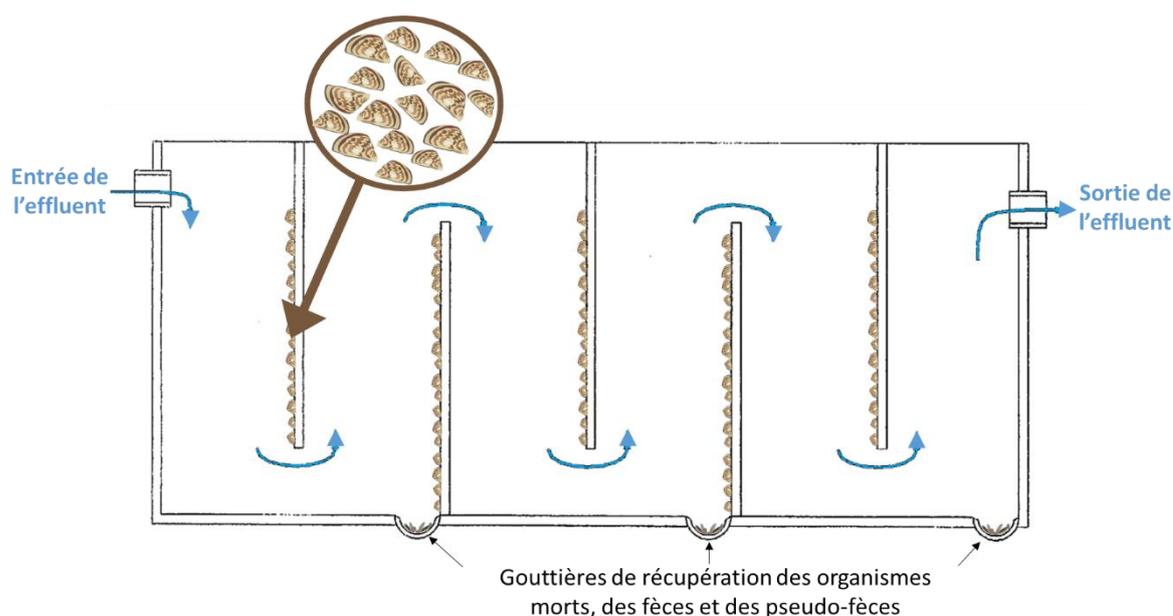


Figure 39 : Schéma du prototype proposé par le brevet n° US5628904A, vue latérale de la structure (modifié d'après Bean, 1997)

La station pilote de Milan-Nosedo (Italie) a une structure similaire à celle du prototype proposé par le brevet n° US5628904A, à la différence qu'elle ne permet pas la récupération des (pseudo)féces car l'effluent circule de gauche à droite dans le réservoir, et non de haut en bas. Durant la mise en place de cette station pilote, les conditions de stabulation étaient optimisées afin de réduire le taux de mortalité. Les auteurs préconisent un temps de fixation des dreissènes sur les plaques d'une à deux semaines en eau claire (Binelli *et al.*, 2015b). Ce laps de temps permet le développement des filaments du byssus et leur solidification, assurant ainsi une fixation robuste des bivalves sur les plaques. Une étude a montré que des dreissènes fixées grâce à leur byssus étaient plus résistantes à la chlorure que des dreissènes non fixées (Rajagopal *et al.*, 2002). Le bon attachement des dreissènes à leur substrat semble donc jouer un rôle important dans la survie de celles-ci, en particulier lors d'une exposition aux effluents de STEP. Il est également important de sélectionner des matériaux qui permettent de faciliter cette fixation, par exemple, il a été montré que les dreissènes préfèrent les surfaces texturées aux surfaces lisses avec une très forte préférence pour le Plexiglas (Marsden & Lansky, 2000).

Afin de permettre l'utilisation de la dreissène à grande échelle, il est également nécessaire de trouver une source d'approvisionnement pérenne en organismes. Or, à l'heure actuelle l'élevage des larves de *D. polymorpha* est très compliqué à mettre en place en conditions de laboratoire, avec entre autres une forte mortalité des larves pédivéligères (Stoeckel *et al.*, 2005). Néanmoins, plusieurs types de structures de recrutement des larves de bivalve dans le milieu aquatique existent, celles-ci permettent le développement des moules jusqu'au stade adulte (McLaughlan & Aldridge, 2013). Ces structures sont utilisées à des fins de mytiliculture et permettent donc un prélèvement rapide des organismes, par exemple des filets de pêche fixés horizontalement à 2,5 m de profondeur (lagune de Szczecin, mer Baltique) ont permis la

fixation de 6 400 moules zébrées.m⁻² en moyenne (Stybel *et al.*, 2009). De plus, lors du nettoyage de certains aménagements artificiels (écluse, digue, lac, barrage...), il arrive que des tapis de moules zébrées soient raclés et détruits afin d'éviter l'obstruction de ces structures. Les dreissènes ainsi prélevées des plans d'eau pourraient alors être sauvées à des fins de biofiltration.

Cependant, *D. polymorpha* est une « espèce exotique envahissante », bien que ne figurant pas sur la liste d'espèces non indigènes dont l'introduction est interdite (fixée par l'arrêté du 14 février 2018, articles du code l'environnement L411-4 et L411-5), il est tout de même primordial qu'aucun individu ne soit accidentellement relâché dans l'environnement. C'est pourquoi, la station d'épuration de Charleville-Mézières (Ardennes, France) a été choisie comme terrain d'étude, en effet, les dreissènes sont présentes dans la Meuse (fleuve dans lequel est rejeté l'effluent) dans le secteur de Charleville-Mézières. A la station pilote de Milan-Nosedo (Italie), les dreissènes sont placées avant le traitement tertiaire, constitué d'une filtration sur sable et d'une désinfection par acide peracétique, empêchant ainsi le relargage des organismes et de leurs gamètes dans l'environnement. A l'heure actuelle, de nombreuses stations d'épuration ne disposent pas de traitements tertiaires, il sera donc nécessaire de développer des systèmes empêchant toute libération accidentelle des dreissènes (grillage, inactivation UV des gamètes...).

Ces considérations devront être abordées au cours de futures expérimentations afin de permettre à un prototype de voir le jour.

Conclusion générale

Conclusion générale

Conclusion générale

Grâce à une approche combinant des expérimentations en laboratoire et sur le terrain, ce travail a souligné l'intérêt de l'utilisation de *Dreissena polymorpha* en tant qu'outil d'épuration des protozoaires en effluent de STEP.

Les nouvelles techniques d'extraction de l'ADN des parasites, utilisées au cours de ce travail, ont permis une détection sensible (par qPCR TaqMan) des oocystes toxoplasmiques et des kystes de *G. duodenalis* bioaccumulés, en particulier dans les tissus avec une limite de détection (LOD) respectivement comprise entre 1 et 5 oocystes/bivalve et inférieure à 1 kyste/bivalve. Ces techniques n'ont pas mis en évidence de corrélation entre la quantité de parasites bioaccumulés par les dreissènes et la charge en protozoaires dans les eaux, que ce soit dans les tissus ou dans l'hémolymphe. Néanmoins, le pourcentage des dreissènes positives aux protozoaires permet, quant à lui, d'évaluer le niveau de contamination des masses d'eau. Ces expériences ont également montré que la dreissène est capable d'extraire rapidement les protozoaires des eaux : dès 1 jour d'exposition en laboratoire pour les trois protozoaires. De plus, les protozoaires restent bioaccumulés dans les moules zébrées durant au moins 21 jours de dépuration en eau claire, mettant en évidence une extraction qui persiste sur le long terme.

Nos résultats montrent qu'une partie des protozoaires bioaccumulés dans les dreissènes est relarguée dans les eaux, sûrement *via* les pseudo-fèces et fèces. Lors des expositions en laboratoire, peu d'oocystes de *C. parvum* et de kystes de *G. duodenalis* sont retrouvés dans les eaux et (pseudo)fèces au vu des fortes concentrations d'exposition utilisées, ce qui suggère une efficacité de l'extraction importante de ces parasites par la dreissène. De plus, une diminution du nombre d'oocystes de *T. gondii* et de *C. parvum* infectieux bioaccumulés a été mise en évidence après 7 jours de dépuration. Or, la quantité d'oocystes bioaccumulés, elle,

Conclusion générale

n'a pas diminué dans le temps. Les dreissènes pourraient donc être capables d'altérer l'infectiosité des oocytes bioaccumulés. Toutefois, de futures études seront nécessaires afin d'améliorer nos connaissances sur ces potentielles voies de dégradation des parasites et de leurs efficacités, ainsi que sur l'infectiosité des kystes de *Giardia duodenalis* bioaccumulés.

Les précédents résultats ont permis de mettre en évidence le rôle de la dreissène en tant qu'outil de bioremédiation des protozoaires, toutefois l'impact de l'effluent de STEP sur le maintien de la dreissène et sur son efficacité d'extraction des protozoaires a également été étudié. Les résultats mettent en évidence un maintien en bonne santé des dreissènes au moins jusqu'à 21 jours dans l'effluent que ce soit en laboratoire ou sur le terrain. Un épuisement des individus a été constaté à 28 jours lors de l'encagement des moules zébrées dans le canal de sortie de la STEP. Celui-ci serait, en partie, provoqué par le stress hypoxique, engendré par une faible saturation en oxygène et un débit trop élevé, rencontré par les organismes transplantés. Néanmoins, les dreissènes ont conservé leur aptitude à bioaccumuler les protozoaires lors de leur transplantation dans le canal de sortie de la STEP, conservant ainsi leur rôle d'outil de bioremédiation. Des études supplémentaires seront nécessaires avant de proposer un prototype utilisant la biofiltration des dreissènes à des fins de bioremédiation ; il est important de déterminer l'implication du stress hypoxique dans l'épuisement des moules zébrées, afin de limiter la mortalité et la baisse d'efficacité de cet outil prometteur.

Références bibliographiques

- Abinandan, S., Subashchandrabose, S. R., Venkateswarlu, K. & Megharaj, M. (2018) Microalgae–bacteria biofilms: a sustainable synergistic approach in remediation of acid mine drainage. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102(3), 1131–1144. doi:10.1007/s00253-017-8693-7
- 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. *Can. J. Zool.* 72(7), 1169–1179. doi:10.1139/z94-157
- Ackerman, J. D. (1999) Effect of velocity on the filter feeding of dreissenid mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): implications for trophic dynamics. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56(9), 1551–1561. doi:10.1139/f99-079
- Adam, R. D. (2001) Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(3), 447–475. doi:10.1128/CMR.14.3.447-475.2001
- Adam, E. A., Yoder, J. S., Gould, L. H., Hlavsa, M. C. & Gargano, J. W. (2016) Giardiasis outbreaks in the United States, 1971-2011. *Epidemiol. Infect.* 144(13), 2790–801. doi:10.1017/S0950268815003040
- Afssa. (2005) Toxoplasmose : état des connaissances et évaluation du risque lié à l'alimentation Rapport du groupe de travail « *Toxoplasma gondii* » Afssa. Retrieved from <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC-Ra-Toxoplasmose.pdf>
- Ajonina, C., Buzie, C., Ajonina, I. U., Basner, A., Reinhardt, H., Gulyas, H., Liebau, E., et al. (2012) Occurrence of *Cryptosporidium* in a wastewater treatment plant in north germany. *J. Toxicol. Environ. Heal.* 75(22–23), 1351–1358. doi:10.1080/15287394.2012.721167
- Aksoy, U., Marangi, M., Papini, R., Ozkoc, S., Bayram Delibas, S. & Giangaspero, A. (2014) Detection of *Toxoplasma gondii* and *Cyclospora cayetanensis* in *Mytilus galloprovincialis* from Izmir Province coast (Turkey) by Real Time PCR/High-Resolution Melting analysis (HRM). *Food Microbiol.* 44, 128–135. doi:10.1016/j.fm.2014.05.012
- Allam, B. & Pales Espinosa, E. (2016) Bivalve immunity and response to infections: Are we looking at the right place? *Fish Shellfish Immunol.* 53, 4–12. doi:10.1016/J.FSI.2016.03.037
- Alum, A. & Abbaszadegan, M. (2016) Waterborne Enteric Viruses: Diversity, Distribution, and Detection. In: Manual of Environmental Microbiology, 4th Edition, 3.1.5-1-3.1.5-13. American Society of Microbiology. doi:10.1128/9781555818821.ch3.1.5

- Alves de Almeida, E., Celso Dias Bainy, A., Paula de Melo Loureiro, A., Regina Martinez, G., Miyamoto, S., Onuki, J., Fujita Barbosa, L., et al. (2007) Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 146(4), 588–600. doi:10.1016/j.cbpa.2006.02.040
- Alves de Almeida, A., Moreira, M. J., Soares, S., Delgado, M. L. De, Figueiredo, J., Silva, E., Castro, A., et al. (2010) Presence of *Cryptosporidium spp.* and *Giardia duodenalis* in drinking water samples in the North of Portugal. *Korean J. Parasitol.* 48(1), 43–48. doi:10.3347/kjp.2010.48.1.43
- Amadi, B., Kelly, P., Mwiya, M., Mulwazi, E., Sianongo, S., Changwe, F., Thomson, M., et al. (2001) Intestinal and systemic infection, HIV, and mortality in Zambian children with persistent diarrhea and malnutrition. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 32(5), 550–554. doi:10.1097/00005176-200105000-00011
- Amorós, I., Alonso, J. L. & Cuesta, G. (2010) *Cryptosporidium* oocysts and giardia cysts on salad products irrigated with contaminated water. *J. Food Prot.* 73(6), 1138–40. doi:10.4315/0362-028X-73.6.1138.
- Ancelle T., Carme B., Thulliez P., Du Mazaubrun C., Wizclo M., Tirard Fleury V., Lordier A., Baril L., G. V. (1996) La toxoplasmose chez la femme enceinte en France en 1995. Résultats d'une enquête nationale périnatale. Paris, France. Retrieved from <http://www.bdsp.ehesp.fr/Base/143624/>
- Arapov, J., Ezgeta-Bali, D., Peharda, M. & Gladan, N. (2010) Bivalve Feeding — How and What They Eat ? *Croat. J. Fish., Vol. 68.*
- Ardern, E. & Lockett, W. T. (1914) Experiments on the oxidation of sewage without the aid of filters. *J. Soc. Chem. Ind.* 33(10), 523–539. John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1002/jctb.5000331005
- Arkush, K. D., Miller, M. A., Leutenegger, C. M., Gardner, I. A., Packham, A. E., Heckerroth, A. R., Tenter, A. M., et al. (2003) Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Int. J. Parasitol.* 33(10), 1087–1097. doi:10.1016/S0020-7519(03)00181-4
- Armon, R., Gold, D., Brodsky, M. & Oron, G. (2002) Surface and subsurface irrigation with effluents of different qualities and presence of *Cryptosporidium* oocysts in soil and on crops. *Water Sci. Technol.* 46(3), 115–122. doi: 10.2166/wst.2002.0067
- Arnott, D. L. & Vanni, M. J. (1996) Nitrogen and phosphorus recycling by the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in the western basin of Lake Erie. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53(3), 646–659. doi:10.1139/f95-214

- Aubert, D. & Villena, I. (2009) Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water: Proposition of a strategy and evaluation in Champagne-Ardenne region, France. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104(2), 290–295. doi:10.1590/S0074-02762009000200023
- Babo, S. & Vasseur, P. (1992) In vitro effects of Thiram on liver antioxidant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 22(1), 61–68. doi:10.1016/0166-445X(92)90036-M
- Balderrama-Carmona, A. P., Gortáres-Moroyoqui, P., Álvarez-Valencia, L. H., Castro-Espinoza, L., Mondaca-Fernández, I., Balderas-Cortés, J. de J., Chaidez-Quiroz, C., et al. (2014) Occurrence and quantitative microbial risk assessment of *Cryptosporidium* and *Giardia* in soil and air samples. *Int. J. Infect. Dis.* 26, 123–127. doi:10.1016/j.ijid.2014.05.002
- Baldursson, S. & Karanis, P. (2011) Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks – An update 2004–2010. *Water Res.* 45(20), 6603–6614. doi:10.1016/J.WATRES.2011.10.013
- Baldwin, B. S., Mayer, M. S., Dayton, J., Pau, N., Mendillo, J., Sullivan, M., Moore, A., et al. (2002) Comparative growth and feeding in zebra and quagga mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): implications for North American lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 60(11), 680–694. doi:10.1139/f03-150
- Barron, M. G. (1990) Bioconcentration: Will water-borne organic chemicals accumulate in aquatic animals? *Environ. Sci. Technol.* 24(11), 1612–1618. doi:10.1021/es00081a001
- Bautista, M., Bonatti, T. R., Fiuza, V. R. da S., Terashima, A., Canales-Ramos, M., José, J. & Franco, R. M. B. (2018) Occurrence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in raw water samples from the Rímac River, Peru. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25(12), 11454–11467. doi:10.1007/s11356-018-1423-6
- Bean, R. A. (1997) Process for treatment of wastewater utilizing zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). USA. Retrieved from <http://www.google.com/patents/US5628904>
- Behera, B. K., Das, A., Sarkar, D. J., Weerathunge, P., Parida, P. K., Das, B. K., Thavamani, P., et al. (2018) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in inland aquatic ecosystems: Perils and remedies through biosensors and bioremediation. *Environ. Pollut.* 241, 212–233. doi:10.1016/j.envpol.2018.05.016
- Belosevic, M., Craik, S. A., Stafford, J. L., Neumann, N. F., Kruihof, J. & Smith, D. W. (2001) Studies on the resistance/reactivation of *Giardia muris* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts exposed to medium-pressure ultraviolet radiation. *FEMS Microbiol. Lett.* 204(1), 197–203. doi:10.1016/S0378-1097(01)00403-7

- Bénard, A., Petersen, E., Salamon, R., Chêne, G., Gilbert, R. & Salmi, L. R. (2008) Survey of European programmes for the epidemiological surveillance of congenital toxoplasmosis. *Euro Surveill.* 13(15). doi:10.2807/ese.13.15.18834-en
- Berger, F., Goulet, V., Strat, Y. Le & Desenclos, J. C. (2009) Toxoplasmosis among pregnant women in France: Risk factors and change of prevalence between 1995 and 2003. *Rev. Epidemiol. Sante Publique* 57(4), 241–248. doi:10.1016/j.respe.2009.03.006
- Berglund, B., Dienus, O., Sokolova, E., Berglind, E., Matussek, A., Pettersson, T. & Lindgren, P. E. (2017) Occurrence and removal efficiency of parasitic protozoa in Swedish wastewater treatment plants. *Sci. Total Environ.* 598, 821–827. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.04.015
- Berkman, D. S., Lescano, A. G., Gilman, R. H., Lopez, S. L. & Black, M. M. (2002) Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: A follow-up study. *Lancet* 359(9306), 564–571. doi:10.1016/S0140-6736(02)07744-9
- Bertrand, I. & Schwartzbrod, J. (2007) Detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in wastewater: Relation between assemblages and faecal contamination origin. *Water Res.* 41(16), 3675–3682. doi:10.1016/j.watres.2007.02.043
- Betancourt, W. Q. & Rose, J. B. (2004) Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Vet. Parasitol.* 126(1-2 SPEC.ISS.), 219–234. doi:10.1016/j.vetpar.2004.09.002
- Binelli, A., Ricciardi, F., Riva, C. & Provini, A. (2006) Integrated use of biomarkers and bioaccumulation data in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) for site-specific quality assessment. *Biomarkers* 11(5), 428–448. doi:10.1080/13547500600733788
- Binelli, A., Parolini, M., Pedriali, A. & Provini, A. (2011) Antioxidant activity in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in response to triclosan exposure. *Water. Air. Soil Pollut.* 217(1–4), 421–430. doi:10.1007/s11270-010-0597-4
- Binelli, A., Magni, S., Soave, C., Marazzi, F., Zuccato, E., Castiglioni, S., Parolini, M., *et al.* (2014) The biofiltration process by the bivalve *D. polymorpha* for the removal of some pharmaceuticals and drugs of abuse from civil wastewaters. *Ecol. Eng.* 71, 710–721. doi:10.1016/j.ecoleng.2014.08.004
- Binelli, A., Torre, C. Della, Magni, S. & Parolini, M. (2015a) Does zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) represent the freshwater counterpart of *Mytilus* in ecotoxicological studies? A critical review. *Environ. Pollut.* 196(Supplement C), 386–403. doi:10.1016/j.envpol.2014.10.023

- Binelli, A., Magni, S., Torre, C. Della & Parolini, M. (2015b) Toxicity decrease in urban wastewaters treated by a new biofiltration process. *Sci. Total Environ.* 537, 235–242. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.08.005
- Bingham, A. K., Jarroll, E. L., Meyer, E. A. & Radulescu, S. (1979) *Giardia sp.*: Physical factors of excystation in vitro, and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. *Exp. Parasitol.* 47(2), 284–291. doi:10.1016/0014-4894(79)90080-8
- Bonadonna, L., Briancesco, R., Ottaviani, M. & Veschetti, E. (2002) Occurrence of *Cryptosporidium* Oocysts in Sewage Effluents and Correlation with Microbial, Chemical and Physical Water Variables. *Environ. Monit. Assess.* 75(3), 241–252. doi:10.1023/A:1014852201424
- Borcherding, J. (1991) The annual reproductive cycle of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* Pallas in lakes. *Oecologia* 87(2), 208–218. doi :10.1007/BF00325258
- Bottoni, P., Caroli, S. & Caracciolo, A. B. (2010) Pharmaceuticals as priority water contaminants. *Toxicol. Environ. Chem.* 92(3), 549–565. doi:10.1080/02772241003614320
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72(1–2), 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brown-Peterson, N., Larkin, P., Denslow, N., King, C., Manning, S. & Brouwer, M. (2005) Molecular indicators of hypoxia in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 286, 203–215. doi:10.3354/meps286203
- Budu-Amoako, E., Greenwood, S. J., Dixon, B. R., Barkema, H. W. & McClure, J. T. (2012) Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* on beef farms and water sources within the vicinity of the farms on Prince Edward Island, Canada. *Vet. Parasitol.* 184(1), 1–9. doi:10.1016/j.vetpar.2011.10.027
- Campbell, A. T. & Wallis, P. (2002) The effect of UV irradiation on human-derived *Giardia lamblia* cysts. *Water Res.* 36(4), 963–969. doi:10.1016/S0043-1354(01)00309-8
- 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(4), 729–745. doi:10.1016/0045-6535(94)90042-6
- Canler J. P., & Cotteux Eric, Graveleau Laure, Hyvrard Nathalie, Larrigauderie André, Meinhold Jens, P. R. (2005) Dysfonctionnements biologiques des stations d'épuration : origines et solutions. (Cemagref, Ed.), Cemagref é. Lyon: Ministère de l'Agriculture et de la Pêche. Retrieved from <http://www.eau.fndae.fr>.

- Caractéristiques et sources de *Cryptosporidium spp.* (2011). France. Retrieved from <http://www.cdc.gov/crypto/>
- Caractéristiques et sources de *Giardia duodenalis.* (2011). France. Retrieved from www.alapubhealth.com
- Carpenter, C., Fayer, R., Trout, J. & Beach, M. J. (1999) Chlorine disinfection of recreational water for *Cryptosporidium parvum.* *Emerg. Infect. Dis.* 5(4), 579–584. doi:10.3201/eid0504.990425
- Castro-Hermida, J. A., García-Preedo, I., González-Warleta, M. & Mezo, M. (2010) *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in water bodies of Galicia, Spain. *Water Res.* 44(20), 5887–5896. doi:10.1016/j.watres.2010.07.010
- Chaidez, C., Soto, M., Gortares, P. & Mena, K. (2005) Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in irrigation water and its impact on the fresh produce industry. *Int. J. Environ. Health Res.* 15(5), 339–345. doi:10.1080/09603120500289010
- Chalmers, R. M., Sturdee, A. P., Mellors, P., Nicholson, V., Lawlor, F., Kenny, F. & Timpson, P. (1997) *Cryptosporidium parvum* in environmental samples in the Sligo area, Republic of Ireland: A preliminary report. *Lett. Appl. Microbiol.* 25(5), 380–384. doi:10.1046/j.1472-765X.1997.00248.x
- Chalmers, R.M., (2012) Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. *Ann. Ist. Super. Sanita* 48(4 PG-429–46), 429–446. doi:DOI: 10.4415/ANN_12_04_10
- Chandel, N. S., McClintock, D. S., Feliciano, C. E., Wood, T. M., Melendez, J. A., Rodriguez, A. M. & Schumacker, P. T. (2000) Reactive oxygen species generated at mitochondrial Complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: A mechanism of O₂ sensing. *J. Biol. Chem.* 275(33), 25130–25138. doi:10.1074/jbc.M001914200
- Chaturvedi, A. D., Pal, D., Penta, S. & Kumar, A. (2015) Ecotoxic heavy metals transformation by bacteria and fungi in aquatic ecosystem. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31(10), 1595–1603. doi:10.1007/s11274-015-1911-5
- Cheng, Y. S., Zheng, Y. & VanderGheynst, J. S. (2011) Rapid quantitative analysis of lipids using a colorimetric method in a microplate format. *Lipids* 46(1), 95–103. doi:10.1007/s11745-010-3494-0
- Cheun, H. Il, Kim, C. H., Cho, S. H., Ma, D. W., Goo, B. La, Na, M. S., Youn, S. K., et al. (2013) The First Outbreak of Giardiasis with Drinking Water in Korea. *Osong Public Heal. Res. Perspect.* 4(2), 89–92. doi:10.1016/j.phrp.2013.03.003

- Chevreuli, M., Blanchard, M., Teil, M.-J., Carru, A.-M., Testard, P. & Chesterikoff, A. (1996) Evaluation of the pollution by organochlorinated compounds (polychlorobiphenyls and pesticides) and metals (Cd, Cr, Cu and Pb) in the water and in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha pallas*) of the river Seine. *Water. Air. Soil Pollut.* 88(3–4), 371–381. doi:10.1007/BF00294112
- Comber, S. D. W., Gardner, M. J. & Ellor, B. (2019) Seasonal variation of contaminant concentrations in wastewater treatment works effluents and river waters. *Environ. Technol.* 1–15. doi:10.1080/09593330.2019.1579872
- Condoleo, R., Rinaldi, L., Sette, S. & Mezher, Z. (2018) Risk Assessment of Human Toxoplasmosis Associated with the Consumption of Pork Meat in Italy. *Risk Anal.* 38(6), 1202–1222. doi:10.1111/risa.12934
- Contardo-Jara, V., Lorenz, C., Pflugmacher, S., Nützmann, G., Kloas, W. & Wiegand, C. (2011a) Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha*. *Aquat. Toxicol.* 105(3–4), 428–437. doi:10.1016/J.AQUATOX.2011.07.017
- Contardo-Jara, V., Lorenz, C., Pflugmacher, S., Nützmann, G., Kloas, W. & Wiegand, C. (2011b) Molecular effects and bioaccumulation of levonorgestrel in the non-target organism *Dreissena polymorpha*. *Environ. Pollut.* 159(1), 38–44. doi:10.1016/J.ENVPOL.2010.09.028
- Costa, R., Aldridge, D. C. & Moggridge, G. D. (2008) Seasonal variation of zebra mussel susceptibility to molluscicidal agents. *J. Appl. Ecol.* 45(6), 1712–1721. doi:10.1111/j.1365-2664.2008.01555.x
- Costa, Raquel, Elliott, P., Aldridge, D. C. & Moggridge, G. D. (2011) Enhanced mortality of the biofouling zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, through the application of combined control agents. *J. Great Lakes Res.* 37(2), 272–278. doi:10.1016/j.jglr.2011.01.005
- Cotner, J. B., Gardner, W. S., Johnson, J. R., Sada, R. H., Cavaletto, J. F. & Heath, R. T. (1995) Effects of Zebra Mussels (*Dreissena polymorpha*) on Bacterioplankton: Evidence for Both Size-Selective Consumption and Growth Stimulation. *J. Great Lakes Res.* 21(4), 517–528. doi:10.1016/S0380-1330(95)71063-2
- Coupe, S., Delabre, K., Pouillot, R., Houdart, S., Santillana-Hayat, M. & Derouin, F. (2006) Detection of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bieneusi* in surface water, including recreational areas: A one-year prospective study. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 47(3), 351–359. doi:10.1111/j.1574-695X.2006.00098.x

- Coupe, A., Howe, L., Burrows, E., Sine, A., Pita, A., Velathanthiri, N., Vallée, E., *et al.* (2018) First report of *Toxoplasma gondii* sporulated oocysts and *Giardia duodenalis* in commercial green-lipped mussels (*Perna canaliculus*) in New Zealand. *Parasitol. Res.* 117(5), 1453–1463. doi:10.1007/s00436-018-5832-8
- Czachor, J. S. (1992) Unusual aspects of bacterial water-borne illnesses. *Am. Fam. Physician* 46(3), 797–804.
- Daniels, N. A., Neimann, J., Karpati, A., Parashar, U. D., Greene, K. D., Wells, J. G., Srivastava, A., *et al.* (2000) Traveler's Diarrhea at Sea: Three Outbreaks of Waterborne Enterotoxigenic *Escherichia coli* on Cruise Ships. *J. Infect. Dis.* 181(4), 1491–1495. doi:10.1086/315397
- Dardé, M. L. (2008) *Toxoplasma gondii*, 'new' genotypes and virulence. *Parasite* 15(3), 366–371. doi:10.1051/parasite/2008153366
- Delaunay, A., Gargala, G., Li, X., Favennec, L. & Ballet, J. J. (2000) Quantitative flow cytometric evaluation of maximal *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in a neonate mouse model. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(10), 4315–4317. doi:10.1128/AEM.66.10.4315-4317.2000
- DeRegnier, D. P., Cole, L., Schupp, D. G. & Erlandsen, S. L. (1989) Viability of *Giardia* cysts suspended in lake, river, and tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(5), 1223–1229.
- Domenech, E., Amorós, I., Moreno, Y. & Alonso, J. L. (2018) *Cryptosporidium* and *Giardia* safety margin increase in leafy green vegetables irrigated with treated wastewater. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 221(1), 112–119. doi:10.1016/j.ijheh.2017.10.009
- Dubey, J. P., Miller, N. L. & Frenkel, J. K. (1970) Characterization of the New Fecal Form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 56(3), 447. doi:10.2307/3277601
- Dubey, J. P. (1998) *Toxoplasma gondii* Oocyst Survival under Defined Temperatures. *J. Parasitol.* 84(4), 862. doi:10.2307/3284606
- Dubey, J. P. (2004) Toxoplasmosis - A waterborne zoonosis. *Vet. Parasitol. Waterborne Zoonotic Parasites* 126(1-2 SPEC.ISS.), 57–72. doi:10.1016/j.vetpar.2004.09.005
- Dumètre, A., Aubert, D., Puech, P.-H., Hohweyer, J., Azas, N. & Villena, I. (2012) Interaction Forces Drive the Environmental Transmission of Pathogenic Protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(4), 905. doi:10.1128/AEM.06488-11
- Dumètre, A. & Dardé, M. L. (2003) How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? *FEMS Microbiol. Rev.* 27(5), 651–661. doi:10.1016/S0168-6445(03)00071-8

- Dumètre, A., Bras, C. Le, Baffet, M., Meneceur, P., Dubey, J. P., Derouin, F., Duguet, J. P., *et al.* (2008) Effects of ozone and ultraviolet radiation treatments on the infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. *Vet. Parasitol.* 153(3–4), 209–213. doi:10.1016/j.vetpar.2008.02.004
- ECDC. (2018) Cryptosporidiosis. Annual epidemiological report for 2015. Stockholm. Retrieved from https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AER_for_2015-cryptosporidiosis.pdf
- EFESE. (2018) Les milieux humides et aquatiques continentaux. Retrieved from <https://www.ecologique-solidaire.gouv.fr/sites/default/files/Théma>
- Efstratiou, A., Ongerth, J. E. & Karanis, P. (2017) Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011–2016. *Water Res.* 114(20), 14–22. doi:10.1016/j.watres.2017.01.036
- Elliott, P., Aldridge, D. C. & Moggridge, G. D. (2008) Zebra mussel filtration and its potential uses in industrial water treatment. *Water Res.* 42(6–7), 1664–1674. doi:10.1016/J.WATRES.2007.10.020
- Eriksson, E., Auffarth, K., Eilersen, A.-M., Henze, M. & Ledin, A. (2003) Household chemicals and personal care products as sources for xenobiotic organic compounds in grey wastewater. *Water SA* 29(2), 135–146. doi:10.4314/wsa.v29i2.4848
- Esmerini, P. O., Gennari, S. M. & Pena, H. F. J. (2010) Analysis of marine bivalve shellfish from the fish market in Santos city, São Paulo state, Brazil, for *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.* 170(1–2), 8–13. doi:10.1016/j.vetpar.2010.01.036
- Fairbairn, D. J., Arnold, W. A., Barber, B. L., Kaufenberg, E. F., Koskinen, W. C., Novak, P. J., Rice, P. J., *et al.* (2016) Contaminants of Emerging Concern: Mass Balance and Comparison of Wastewater Effluent and Upstream Sources in a Mixed-Use Watershed. *Environ. Sci. Technol.* 50(1), 36–45. doi:10.1021/acs.est.5b03109
- Falabi, J. A., Gerba, C. P. & Karpiscak, M. M. (2002) *Giardia* and *Cryptosporidium* removal from waste-water by a duckweed (*Lemna gibba* L.) covered pond. *Lett. Appl. Microbiol.* 34(5), 384–387., Ltd. doi:10.1046/j.1472-765X.2002.01104.x
- Faria, M., Carrasco, L., Diez, S., Riva, M. C., Bayona, J. M. & Barata, C. (2009) Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 149(3), 281–288. doi:10.1016/j.cbpc.2008.07.012

- Farthing, M. J. G., Mata, L., Urrutia, J. J. & Kronmal, R. A. (1986) Natural history of *Giardia* infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth. *Am. J. Clin. Nutr.* 43(3), 395–405. doi:10.1093/ajcn/43.3.395
- Faust, C., Stallknecht, D., Swayne, D. & Brown, J. (2009) Filter-feeding bivalves can remove avian influenza viruses from water and reduce infectivity. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 276(1673), 3727–3735. doi:10.1098/rspb.2009.0572
- Fayer, R. (1994) Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(8), 2732–2735.
- Fayer, R., Graczyk, T. K., Lewis, E. J., Trout, J. M. & Parley, C. A. (1998) Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and Eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(3), 1070–1074.
- Fayer, R., Lewis, E. J., Trout, J. M., Graczyk, T. K., Jenkins, M. C., Higgins, J., Xiao, L., et al. (1999) *Cryptosporidium parvum* in oysters from commercial harvesting sites in the Chesapeake Bay. *Emerg. Infect. Dis.* 5(5), 706–710. doi:10.3201/eid0505.990513
- Fayer, R., Morgan, U. & Upton, S. J. (2000) Epidemiology of *Cryptosporidium*: Transmission, detection and identification. *Int. J. Parasitol.* 30(12–13), 1305–1322. doi:10.1016/S0020-7519(00)00135-1
- Fayer, R., Trout, J., Lewis, E., Xiao, L., Lal, A., Jenkins, M. & Graczyk, T. (2002) Temporal variability of *Cryptosporidium* in the Chesapeake Bay. *Parasitol. Res.* 88(11), 998–1003. doi:10.1007/s00436-002-0697-1
- Fayer, R., Trout, J. M., Lewis, E. J., Santin, M., Zhou, L., Lal, A. A. & Xiao, L. (2003) Contamination of Atlantic coast commercial shellfish with *Cryptosporidium*. *Parasitol. Res.* 89(2), 141–145. doi:10.1007/s00436-002-0734-0
- Fayer, R. (2004) *Cryptosporidium*: A water-borne zoonotic parasite. *Vet. Parasitol. Waterborne Zoonotic Parasites* 126(1-2 SPEC.ISS.), 37–56. doi:10.1016/j.vetpar.2004.09.004
- Fayer, R. & Xiao, L. (2007) *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. (T. & Francis Group, Ed.), 2nd editio.
- Feng, Y., Li, N., Duan, L. & Xiao, L. (2009) *Cryptosporidium* genotype and subtype distribution in raw wastewater in Shanghai, China: Evidence for possible unique cryptosporidium hominis transmission. *J. Clin. Microbiol.* 47(1), 153–157. doi:10.1128/JCM.01777-08
- Folwell, B. D., McGenity, T. J. & Whitby, C. (2016) Biofilm and Planktonic Bacterial and Fungal Communities Transforming High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 82(8), 2288–2299. doi:10.1128/aem.03713-15

- Fontaine, J.-P., Delage, A. & Lauraire, M.-C. (1984) Sur l'épidémiologie de la giardiase. *Ann. Parasitol. Hum. Comparée* 59(6), 541–554. doi:10.1051/parasite/1984596541
- Fontaine, M. & Guillot, E. (2002) Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 214(1), 13–17. doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11318.x
- Forouzanfar, M. H., Afshin, A., Alexander, L. T., Anderson, H. R., Bhutta, Z. A., Biryukov, S., Brauer, M., *et al.* (2016) Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 388(10053), 1659–1724. doi:10.1016/S0140-6736(16)31679-8
- Freire-Santos, F., Oteiza-López, A. M., Vergara-Castiblanco, C. A. & Ares-Mazás, M. E. (1999) Effect of salinity, temperature and storage time on mouse experimental infection by *Cryptosporidium parvum*. *Vet. Parasitol.* 87(1), 1–7. doi:10.1016/S0304-4017(99)00160-0
- Freire-Santos, F., Oteiza-López, A. M., Vergara-Castiblanco, C. A., Ares-Mazás, E., Álvarez-Suárez, E. & García-Martín, O. (2000) Detection of *Cryptosporidium* Oocysts in Bivalve Molluscs Destined for Human Consumption. *J. of Parasitol.* 86(4), 853–854. doi:10.1645/0022-3395(2000)086[0853:DOCOIB]2.0.CO;2
- Freire-Santos, F., Gómez-Couso, H., Ortega-Iñarrea, M., Castro-Hermida, J., Oteiza-López, A., García-Martín, O. & Ares-Mazás, M. (2002) Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from experimentally contaminated oysters (*Ostrea edulis*) and clams (*Tapes decussatus*). *Parasitol. Res.* 88(2), 130–133. doi:10.1007/s004360100470
- Frenkel, J. K., Ruiz, A. & Chinchilla, M. (1975) Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24(3), 439–443. doi:10.4269/ajtmh.1975.24.439
- Fu, W., Sun, L., Zhang, X. & Zhang, W. (2006) Potential of the marine sponge Hymeniacidon perleve as a bioremediator of pathogenic bacteria in integrated aquaculture ecosystems. *Biotechnol. Bioeng.* 93(6), 1112–1122. doi:10.1002/bit.20823
- Fu, C. Y., Xie, X., Huang, J. J., Zhang, T., Wu, Q. Y., Chen, J. N. & Hu, H. Y. (2010) Monitoring and evaluation of removal of pathogens at municipal wastewater treatment plants. *Water Sci. Technol.* 61(6), 1589–1599. doi:10.2166/wst.2010.757
- Gallas-Lindemann, C., Sotiriadou, I., Mahmoodi, M. R. & Karanis, P. (2013a) Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in different water resources by Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Acta Trop.* 125(2), 231–236. doi:10.1016/j.actatropica.2012.10.007

- Gallas-Lindemann, C., Sotiriadou, I., Plutzer, J. & Karanis, P. (2013b) Prevalence and distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater and the surface, drinking and ground waters in the Lower Rhine, Germany. *Epidemiol. Infect.* 141(1), 9–21. doi:10.1017/S0950268812002026
- Galvani, A. T., Christ, A. P. G., Padula, J. A., Barbosa, M. R. F., Araújo, R. S. de, Sato, M. I. Z. & Razzolini, M. T. P. (2019) Real-time PCR detection of *Toxoplasma gondii* in surface water samples in São Paulo, Brazil. *Parasitol. Res.* 118(2), 631–640. doi:10.1007/s00436-018-6185-z
- Géba, E., Aubert, D., Durand, L., Escotte, S., La Carbona, S., Cazeaux, C., Bonnard, I., Bastien, F., Ladeiro, M.P., Dubey, J.P., Villena, I., Geffard, A., Bigot-Clivot, A., 2020. Use of the bivalve *Dreissena polymorpha* as a biomonitoring tool to reflect the protozoan load in freshwater bodies. *Water Res.*170 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115297>
- Ghozzi, K., Marangi, M., Papini, R., Lahmar, I., Challouf, R., Houas, N., Dhiab, R. Ben, et al. (2017) First report of Tunisian coastal water contamination by protozoan parasites using mollusk bivalves as biological indicators. *Mar. Pollut. Bull.* 117(1–2), 197–202. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.01.057
- Giangaspero, A., Molini, U., Iorio, R., Traversa, D., Paoletti, B. & Giansante, C. (2005) *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater clams (*Chamelea gallina*) in Italy. *Prev. Vet. Med.* 69(3–4), 203–212. doi:10.1016/j.prevetmed.2005.02.006
- Giangaspero, A., Berrilli, F. & Brandonisio, O. (2007) *Giardia* and *Cryptosporidium* and public health: The epidemiological scenario from the Italian perspective. *Parasitol. Res.* 101(5), 1169–1182. doi:10.1007/s00436-007-0598-4
- Gibson, K. E. (2014) Viral pathogens in water: Occurrence, public health impact, and available control strategies. *Curr. Opin. Virol.* 4, 50–57. doi:10.1016/j.coviro.2013.12.005
- Gifford, S., Dunstan, R. H., O'Connor, W., Roberts, T. & Toia, R. (2004) Pearl aquaculture - Profitable environmental remediation? *Sci. Total Environ.* 319(1–3), 27–37. doi:10.1016/S0048-9697(03)00437-6
- Gifford, S., Dunstan, R. H., O'Connor, W., Koller, C. E. & MacFarlane, G. R. (2007) Aquatic zooremediation: deploying animals to remediate contaminated aquatic environments. *Trends Biotechnol.* 25(2), 60–65. doi:10.1016/j.tibtech.2006.12.002
- Gifford, S., Macfarlane, G. R., Koller, C. E., Dunstan, R. H. & O'Connor, W. (2009) Zooremediation of contaminated aquatic systems through aquaculture initiatives. *New Technol. Aquac. Improv. Prod. Effic. Qual. Environ. Manag.* 750–768. doi:10.1533/9781845696474.4.750

- Gilles, H. M. (1999) Protozoan Diseases. (H. M. Gilles, Ed.), Arnold. London, United Kingdom.
- Gomes, J., Matos, A., Quinta-Ferreira, R. M. & Martins, R. C. (2018) Environmentally applications of invasive bivalves for water and wastewater decontamination. *Sci. Total Environ.* 630, 1016–1027. doi:10.1016/J.SCITOTENV.2018.02.292
- Gómez-Couso, H., Freire-Santos, F., Amar, C. F. L., Grant, K. A., Williamson, K., Ares-Mazás, M. E. & McLauchlin, J. (2004) Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in molluscan shellfish by multiplexed nested-PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 91(3), 279–288. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2003.07.003
- Gómez-Couso, H., Freire-Santos, F., Martínez-Urtaza, J., García-Martín, O., Ares-Mazás, M. E., Martínez-Urtaza, J., García-Martín, O., et al. (2003) Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium* oocysts: The need for new quality control standards. *Int. J. Food Microbiol.* 87(1–2), 97–105. doi:10.1016/S0168-1605(03)00057-6
- Gómez-Couso, H., Méndez-Hermida, F., Ares-Mazás, E. & Castro-Hermida, J. A. (2005a) Occurrence of *Giardia* Cysts in Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) Destined for Human Consumption. *J. Food Prot.* 68(8), 1702–1705. doi:10.4315/0362-028X-68.8.1702
- Gómez-Couso, H., Freire-Santos, F., Hernández-Córdova, G. A. & Ares-Mazás, M. E. (2005b) A histological study of the transit of *Cryptosporidium parvum* oocysts through clams (*Tapes decussatus*). *Int. J. Food Microbiol.* 102(1), 57–62. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.002
- Gómez-Couso, H., Méndez-Hermida, F. & Ares-Mazás, E. (2006) Levels of detection of *Cryptosporidium* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by IFA and PCR methods. *Vet. Parasitol.* 141(1–2), 60–65. doi:10.1016/j.vetpar.2006.04.015
- Gossiaux, D. C., Landrum, P. F. & Fisher, S. W. (1998) The assimilation of contaminants from suspended sediment and algae by the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Chemosphere* 36(15), 3181–3197. doi:10.1016/S0045-6535(98)00020-4
- Gouma, S., Fragoeiro, S., Bastos, A. C. & Magan, N. (2014) Bacterial and Fungal Bioremediation Strategies. In: *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, 301–323. doi:10.1016/B978-0-12-800021-2.00013-3
- Graczyk, T. K., Fayer, R., Cranfield, M. R. & Conn, D. B. (1997) *In Vitro* Interactions of Asian Freshwater Clam (*Corbicula fluminea*) Hemocytes and *Cryptosporidium parvum* Oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(7), 2910–2.
- Graczyk, T. K., Fayer, R., Cranfield, M. R. & Conn, D. B. (1998) Recovery of waterborne *Cryptosporidium parvum* oocysts by freshwater benthic clams (*Corbicula fluminea*). *Appl. Environ. Microbiol.* 64(2), 427–30. doi:10.1097/00006205-200205000-00010

- Graczyk, T. K., Fayer, R., Lewis, E. J., Trout, J. M. & Farley, C. A. (1999) *Cryptosporidium* oocysts in Bent mussels (*Ischadium recurvum*) in the Chesapeake Bay. *Parasitol. Res.* 85(7), 518–521. doi:10.1007/s004360050590
- Graczyk, T. K., Marcogliese, D. J., Lafontaine, Y. de, Silva, A. J. Da, Mhangami-Ruwende, B. & Pieniazek, N. J. (2001) *Cryptosporidium parvum* oocysts in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): evidence from the St. Lawrence River. *Parasitol. Res.* 87(3), 231–234. doi:10.1007/s004360000293
- Graczyk, T. K., Conn, D. B., Marcogliese, D. J., Graczyk, H. & Lafontaine, Y. De. (2003) Accumulation of human waterborne parasites by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*). *Parasitol. Res.* 89(2), 107–112. doi:10.1007/s00436-002-0729-x
- Graczyk, T. K., Conn, D., Lucy, F., Minchin, D., Tamang, L., Moura, L. S. & DaSilva, A. (2004) Human waterborne parasites in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from the Shannon River drainage area, Ireland. *Parasitol. Res.* 93(5), 385–391. doi:10.1007/s00436-004-1142-4
- Graczyk, T. K., Lewis, E. J., Glass, G., Dasilva, A. J., Tamang, L., Girouard, A. S. & Curriero, F. C. (2007) Quantitative assessment of viable *Cryptosporidium parvum* load in commercial oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Parasitol. Res.* 100(2), 247–253. doi:10.1007/s00436-006-0261-5
- Gray, S. H. (2008) Animal Invaders : Zebra Mussel. Ann Arbor Cherry Lake Publ.
- Gudimov, A. V. (2002) Zooremediation, a new biotechnology solution for shoreline protection and cleanup. Proc. 25th Arct. Mar.
- Guernic, A. Le, Geffard, A., Rioult, D., Bonnard, I., Foll, F. Le & Palos Ladeiro, M. (2018) First evidence of cytotoxic effects of human protozoan parasites on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) haemocytes. *Environ. Microbiol. Rep.* 11(3). doi:10.1111/1758-2229.12720
- Guerrant, R. L. (1997) Cryptosporidiosis: An Emerging, Highly Infectious Threat. *Emerg. Infect. Dis.* 3(1), 51–57. doi:10.3201/eid0301.970106
- Handel, E. Van. (1965) Microseparation of glycogen, sugars, and lipids. *Anal. Biochem.* 11(2), 266–271. doi:10.1016/0003-2697(65)90014-X
- Harito, J. B., Campbell, A. T., Prestrud, K. W., Dubey, J. P. & Robertson, L. J. (2016) Surface binding properties of aged and fresh (recently excreted) *Toxoplasma gondii* oocysts. *Exp. Parasitol.* 165, 88–94. doi:10.1016/j.exppara.2016.03.022

- Harp, J. A., Fayer, R., Pesch, B. A. & Jackson, G. J. (1996) Effect of pasteurization on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water and milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(8), 2866–8.
- Helmi, K., Skraber, S., Burnet, J. B., Leblanc, L., Hoffmann, L. & Cauchie, H. M. (2011) Two-year monitoring of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* occurrence in a recreational and drinking water reservoir using standard microscopic and molecular biology techniques. *Environ. Monit. Assess.* 179(1–4), 163–175. doi:10.1007/s10661-010-1726-7
- Horgan, M. J. & Mills, E. L. (1997) Clearance rates and filtering activity of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): implications for freshwater lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54(2), 249–255. doi:10.1139/f96-276
- Hoxie, N. J., Davis, J. P., Vergeront, J. M., Nashold, R. D. & Blair, K. A. (1997) Cryptosporidiosis-Associated Mortality Following a Massive Waterborne Outbreak in Milwaukee, Wisconsin. *Am J Public Health.* 87(12): 2032–2035.
- Hughes-Hanks, J. M., Rickard, L. G., Panuska, C., Saucier, J. R., O’Hara, T. M., Dehn, L. & Rolland, R. M. (2005) Prevalence of *Cryptosporidium spp.* and *Giardia spp.* in Five Marine Mammal Species. *J. Parasitol.* 91(5), 1225–1228. doi:10.1645/GE-545R.1
- Jantz, B. & Neumann, D. (1998) Growth and reproductive cycle of the zebra mussel in the River Rhine as studied in a river bypass. *Oecologia* 114(2), 213–225. doi:10.1007/s004420050439
- Jensen, S. K., Aars, J., Lydersen, C., Kovacs, K. M. & Åsbakk, K. (2010) The prevalence of *Toxoplasma gondii* in polar bears and their marine mammal prey: evidence for a marine transmission pathway? *Polar Biol.* 33(5), 599–606. doi:10.1007/s00300-009-0735-x
- Karanis, P., Sotiriadou, I., Kartashev, V., Kourenti, C., Tsvetkova, N. & Stojanova, K. (2006) Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water supplies of Russia and Bulgaria. *Environ. Res.* 102(3), 260–271. doi:10.1016/j.envres.2006.05.005
- Karatayev, A. Y., Boltovskoy, D., Burlakova, L. E., Padilla, D. K., Karatayev, A. Y., Boltovskoy, D., Burlakova, L. E., et al. (2015) Parallels and Contrasts Between *Limnoperna fortunei* and Species of *Dreissena*. *Invading Nature-Springer Ser. Invasion Ecol.* 10. doi:10.1007/978-3-319-13494-9_15
- Keawvichit, R., Wongworapat, K., Putsyainant, P., Silprasert, A. & Karnchanawong, S. (2001) Parasitic and bacterial contamination in collards using effluent from treated domestic wastewater in Chiang Mai, Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 32 (2), 240–4.

- Kerambrun, E., Palos Ladeiro, M., Bigot-Clivot, A., Dedourge-Geffard, O., Dupuis, E., Villena, I., Aubert, D., et al. (2016a) Zebra mussel as a new tool to show evidence of freshwater contamination by waterborne *Toxoplasma gondii*. *J. Appl. Microbiol.* 120(2), 498–508. doi:10.1111/jam.12999
- Kerambrun, E., Rioult, D., Delahaut, L., Evariste, L., Pain-Devin, S., Auffret, M., Geffard, A., et al. (2016b) Variations in gene expression levels in four European zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, populations in relation to metal bioaccumulation: A field study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 134, 53–63. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.08.018
- Khalanski, M. (1997) Conséquences industrielles et écologiques de l'introduction de nouvelles espèces dans les hydrosystèmes continentaux : la moule zébrée et autres espèces invasives. *Bull. Français la Pêche la Piscic.* (344–345), 385–404. doi:10.1051/kmae:1997037
- Khalidi, S., Ratajczak, M., Gargala, G., Fournier, M., Berthe, T., Favennec, L. & Dupont, J. P. (2011) Intensive exploitation of a karst aquifer leads to *Cryptosporidium* water supply contamination. *Water Res.* 45(9), 2906–2914. doi:10.1016/j.watres.2011.03.010
- Khalil, I. A., Troeger, C., Rao, P. C., Blacker, B. F., Brown, A., Brewer, T. G., Colombara, D. V., et al. (2018) Morbidity, mortality, and long-term consequences associated with diarrhoea from *Cryptosporidium* infection in children younger than 5 years: a meta-analysis study. *Lancet Glob. Heal.* 6(7), 758–768. doi:10.1016/S2214-109X(18)30283-3
- King, B., Fanok, S., Phillips, R., Lau, M., Akker, B. van den, Monis, P., Akker, B. van den, et al. (2017) *Cryptosporidium* attenuation across the wastewater treatment train: Recycled water fit for purpose. *Appl. Environ. Microbiol.* 83(5). doi:10.1128/AEM.03068-16
- Kirby, M. X. & Miller, H. M. (2005) Response of a benthic suspension feeder (*Crassostrea virginica* Gmelin) to three centuries of anthropogenic eutrophication in Chesapeake Bay. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 62(4), 679–689. doi:10.1016/j.ecss.2004.10.004
- Kitajima, M., Haramoto, E., Iker, B. C. & Gerba, C. P. (2014) Occurrence of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Cyclospora* in influent and effluent water at wastewater treatment plants in Arizona. *Sci. Total Environ.* 484(1), 129–136. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.03.036
- Korich, D. G., Mead, J. R., Madore, M. S., Sinclair, N. A. & Sterling, C. R. (1990) Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(5), 1423–1428.
- Lass, A., Szostakowska, B., Korzeniewski, K. & Karanis, P. (2017a) The first detection of *Toxoplasma gondii* DNA in environmental air samples using gelatine filters, real-time PCR and loop-mediated isothermal (LAMP) assays: qualitative and quantitative analysis. *Parasitology* 144(13), 1791–1801. doi:10.1017/s0031182017001172

- Lass, A., Szostakowska, B., Korzeniewski, K. & Karanis, P. (2017b) Detection of *Giardia intestinalis* in water samples collected from natural water reservoirs and wells in northern and north-eastern Poland using LAMP, real-time PCR and nested PCR. *J. Water Health* 15(5), 775–787. doi:10.2166/wh.2017.039
- Lavrentyev, P. J., Gardner, W. S., Cavaletto, J. F. & Beaver, J. R. (1995) Effects of the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha* Pallas) on Protozoa and Phytoplankton from Saginaw Bay, Lake Huron. *J. Great Lakes Res.* 21(4), 545–557. doi:10.1016/S0380-1330(95)71065-6
- Leal, D. A. G., Pereira, M. A., Franco, R. M. B., Branco, N., Neto, R. C., Guiguet Leal, D. A., Pereira, M. A., et al. (2008) First report of *Cryptosporidium* spp. oocysts in oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and cockles (*Tivela mactroides*) in Brazil. *J. Water Health* 6(4), 527–532. doi:10.2166/wh.2008.065
- Lei, J., Payne, B. S. & Wang, S. Y. (1996) Filtration dynamics of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53(1), 29–37. doi:10.1139/f95-164
- Lélu, M., Gilot-Fromont, E., Aubert, D., Richaume, A., Afonso, E., Dupuis, E., Gotteland, C., et al. (2011) Development of a sensitive method for *Toxoplasma gondii* oocyst extraction in soil. *Vet. Parasitol.* 183(1–2), 59–67. doi:10.1016/j.vetpar.2011.06.018
- Lélu, M., Villena, I., Dardé, M.-L., Aubert, D., Geers, R., Dupuis, E., Marnef, F., et al. (2012) Quantitative estimation of the viability of *Toxoplasma gondii* oocysts in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(15), 5127–32. doi:10.1128/AEM.00246-12
- Lepoutre, A. (2019) Mollusques bivalves : bioindicateurs de contamination des eaux douces par les cyanotoxines microcystines et la toxine environnementale B-N-Méthylamino-L-Alanine (BMAA) ? Th. 262, Biologie des organismes : Reims n°547
- Les, R., Debr, R., Par, A., Mourier, L., Mondor, H., Initiative, G., Ef, J., et al. (2009) Epidémiologie de la cryptosporidiose humaine en France en 2006 et 2007 : données du réseau Cryptosporidies Anofel. France. Retrieved from http://www.med.univ-angers.fr/service_serveur/
- Lévesque, B., Barthe, C., Dixon, B. R., Parrington, L. J., Martin, D., Doidge, B., Proulx, J.-F., et al. (2010) Microbiological quality of blue mussels (*Mytilus edulis*) in Nunavik, Quebec: a pilot study. *Can. J. Microbiol.* 56(11), 968–977. doi:10.1139/W10-078
- Li, X., Guyot, K., Dei-Cas, E., Mallard, J. P., Ballet, J. J. & Brasseur, P. (2006) *Cryptosporidium* oocysts in mussels (*Mytilus edulis*) from Normandy (France). *Int. J. Food Microbiol.* 108(3), 321–325. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.018
- Li, T. C., Miyamura, T. & Takeda, N. (2007) Short report: Detection of hepatitis E virus RNA from the bivalve Yamato-Shijimi (*Corbicula japonica*) in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*

- 76(1), 170–172. doi:10.4269/ajtmh.2007.76.170
- Licciano, M., Stabili, L. & Giangrande, A. (2005) Clearance rates of *Sabella spallanzanii* and *Branchiomma luctuosum* (Annelida: Polychaeta) on a pure culture of *Vibrio alginolyticus*. *Water Res.* 39(18), 4375–4384. doi:10.1016/j.watres.2005.09.003
- Linden, K. G., Shin, G. A., Faubert, G., Cairns, W. & Sobsey, M. D. (2002) UV disinfection of *Giardia lamblia* cysts in water. *Environ. Sci. Technol.* 36(11), 2519–2522. doi:10.1021/es0113403
- Lindsay, D. S., Collins, M. V., Mitchell, S. M., Cole, R. A., Flick, G. J., Wetch, C. N., Lindquist, A., et al. (2003) Sporulation and Survival of *Toxoplasma gondii* Oocysts in Seawater. *J. Eukaryot. Microbiol.*, Vol. 50, 687–688. doi:10.1111/j.1550-7408.2003.tb00688.x
- Lindsay, D. S. & Dubey, J. P. (2009) Long-Term Survival of *Toxoplasma gondii* Sporulated Oocysts in Seawater. *J. Parasitol.* 95(4), 1019–1020. doi:10.1645/GE-1919.1
- Liu, Y., Kuhlenschmidt, M. S., Kuhlenschmidt, T. B. & Nguyen, T. H. (2010) Composition and Conformation of *Cryptosporidium parvum* Oocyst Wall Surface Macromolecules and Their Effect on Adhesion Kinetics of Oocysts on Quartz Surface. *Biomacromolecules* 11(8), 2109–2115. doi:10.1021/bm100477j
- Liu, P. W. G., Liou, J. W., Li, Y. T., Su, W. L. & Chen, C. H. (2015) The optimal combination of entrapped bacteria for diesel remediation in seawater. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 102, 383–391. doi:10.1016/j.ibiod.2015.05.002
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25(4), 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lone, M. I., He, Z., Stoffella, P. J. & Yang, X. (2008) Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: progresses and perspectives. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 9(3), 210–20. doi:10.1631/jzus.B0710633
- Lonigro, A., Pollice, A., Spinelli, R., Berrilli, F., Cave, D. Di, D’Orazi, C., Cavallo, P., et al. (2006) *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in membrane-filtered municipal wastewater used for irrigation. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(12), 7916–7918. doi:10.1128/AEM.01903-06
- Lowery, C. J., Nugent, P., Moore, J. E., Millar, B. C., Xiru, X. & Dooley, J. S. (2001) PCR – IMS detection and molecular typing of *Cryptosporidium parvum* recovered from a recreational river source and an associated mussel (*Mytilus edulis*) bed in Northern Ireland. *Epidemiol. Infect.* 127(3), 545–553. doi: 10.1017/S0950268801006276

- Lucy, F. E., Graczyk, T. K., Tamang, L., Miraflor, A. & Minchin, D. (2008) Biomonitoring of surface and coastal water for *Cryptosporidium*, *Giardia*, and human-virulent microsporidia using molluscan shellfish. *Parasitol. Res.* 103(6), 1369–1375. doi:10.1007/s00436-008-1143-9
- Lucy, F. E., Connolly, M., Graczyk, T. K., Tamang, L., Sullivan, M. R. & Mastitsky, S. E. (2010) Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) are effective sentinels of water quality irrespective of their size. *Aquat. Invasions* 5(1), 49–57. doi:10.3391/ai.2010.5.1.7
- Ma, L., Sotiriadou, I., Cai, Q., Karanis, G., Wang, G., Wang, G., Lu, Y., et al. (2014) Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in agricultural and water environments in the Qinghai area of China by IFT and PCR. *Parasitol. Res.* 113(9), 3177–3184. doi:10.1007/s00436-014-3979-5
- 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. In: *Hydrobiologia*, Vol. 219, 251–268. doi:10.1007/BF00024759
- Magne, D., Chochillon, C., Savel, J. & Gobert, J. G. (1996) *Giardia intestinalis* et giardiose. *J. Pédiatrie Puériculture* 9(2), 74–83. doi:10.1016/S0987-7983(96)80083-1
- Magni, S., Parolini, M., Soave, C., Marazzi, F., Mezzanotte, V. & Binelli, A. (2015) Removal of metallic elements from real wastewater using zebra mussel bio-filtration process. *J. Environ. Chem. Eng.* 3(2), 915–921. doi:10.1016/j.jece.2015.01.017
- Makarewicz, J. C., Lewis, T. W. & Bertram, P. (1999) Phytoplankton Composition and Biomass in the Offshore Waters of Lake Erie: Pre- and Post-*Dreissena* Introduction (1983–1993). *J. Great Lakes Res.* 25(1), 135–148. doi:10.1016/S0380-1330(99)70722-7
- Marangi, M., Giangaspero, A., Lacasella, V., Lonigro, A. & Gasser, R. B. (2015) Multiplex PCR for the detection and quantification of zoonotic taxa of *Giardia*, *Cryptosporidium* and *Toxoplasma* in wastewater and mussels. *Mol. Cell. Probes* 29(2), 122–125. doi:10.1016/j.mcp.2015.01.001
- Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M. P., Angulo, E. & Giamberini, L. (2002) Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microsc. Res. Tech.* 56(5), 358–392. doi:10.1002/jemt.10040
- Marquis, N. D., Bishop, T. J., Record, N. R., Countway, P. D. & Fernández Robledo, J. A. (2019) Molecular Epizootiology of *Toxoplasma gondii* and *Cryptosporidium parvum* in the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) from Maine (USA). *Pathog.* 8(3), 125. doi:10.3390/pathogens8030125

- Marsden, J. E. & Lansky, D. M. (2000) Substrate selection by settling zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, relative to material, texture, orientation, and sunlight. *Can. J. Zool.* 78(5), 787–793. doi:10.1139/z00-004
- McGregor, C. G. A., Fleck, D. G., Nagington, J., Stovin, P. G., Cory-Pearce, R. & English, T. A. (1984) Disseminated toxoplasmosis in cardiac transplantation. *J. Clin. Pathol.* 37(1), 74–77. doi:10.1136/jcp.37.1.74
- McLaughlan, C. & Aldridge, D. C. (2013) Cultivation of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) within their invaded range to improve water quality in reservoirs. *Water Res.* 47(13), 4357–4369. doi:10.1016/j.watres.2013.04.043
- McMullen, D. C. & Storey, K. B. (2008) Mitochondria of cold hardy insects: Responses to cold and hypoxia assessed at enzymatic, mRNA and DNA levels. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38(3), 367–373. doi:10.1016/J.IBMB.2007.12.003
- Mezzanotte, V., Marazzi, F., Bissa, M., Pacchioni, S., Binelli, A., Parolini, M., Magni, S., et al. (2016) Removal of enteric viruses and Escherichia coli from municipal treated effluent by zebra mussels. *Sci. Total Environ.* 539, 395–400. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.09.007
- Milanese, M., Chelossi, E., Manconi, R., Sarà, A., Sidri, M. & Pronzato, R. (2003) The marine sponge *Chondrilla nucula* Schmidt, 1862 as an elective candidate for bioremediation in integrated aquaculture. *Biomol. Eng.* 20(4–6), 363–368. doi:10.1016/S1389-0344(03)00052-2
- Miller, M. A., Gardner, I. A., Kreuder, C., Paradies, D. M., Worcester, K. R., Jessup, D. A., Dodd, E., et al. (2002) Coastal freshwater runoff is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). *Int. J. Parasitol.* 32(8), 997–1006. doi:10.1016/S0020-7519(02)00069-3
- Miller, W. A., Atwill, E. R., Gardner, I. A., Miller, M. A., Fritz, H. M., Hedrick, R. P., Melli, A. C., et al. (2005) Clams (*Corbicula fluminea*) as bioindicators of fecal contamination with *Cryptosporidium* and *Giardia spp.* in freshwater ecosystems in California. *Int. J. Parasitol.* 35(6), 673–684. doi:10.1016/J.IJPARA.2005.01.002
- Miller, M. A., Miller, W. A., Conrad, P. A., James, E. R., Melli, A. C., Leutenegger, C. M., Dabritz, H. A., et al. (2008) Type X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: New linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. *Int. J. Parasitol.* 38(11), 1319–1328. doi:10.1016/j.ijpara.2008.02.005
- Ministère de la Transition écologique et solidaire. (2018) Guide de mise en œuvre relatif aux

opérations d'échantillonnage et d'analyse de substances dans les rejets aqueux des ICPE.

- Mladineo, I., Trumbic, Z., Jozic, S. & Segvic, T. (2009) First Report of *Cryptosporidium* sp (*Coccidia, Apicomplexa*) oocysts in the black mussel (*Mytilus galloprovincialis*) reared in the Mali Ston Bay, Adriatic Sea. *J. Shellfish Res.* 28(3), 541–546. doi:10.2983/035.028.0316
- Molini, U., Traversa, D., Ceshia, G., Iorio, R., Boffo, L., Zentilin, A., Capelli, G., et al. (2007) Temporal Occurrence of *Cryptosporidium* in the Manila Clam *Ruditapes philippinarum* in Northern Adriatic Italian Lagoons. *J. Food Prot.* 70(2), 494–499. doi:10.4315/0362-028X-70.2.494
- Mons, C., Dumètre, A., Gosselin, S., Galliot, C. & Moulin, L. (2009) Monitoring of *Cryptosporidium* and *Giardia* river contamination in Paris area. *Water Res.* 43(1), 211–217. doi:10.1016/j.watres.2008.10.024
- Monteiro, T. R. M., Rocha, K. S., Silva, J., Mesquita, G. S. S., Rosário, M. K. S., Ferreira, M. F. S., Honorio, B. E. T., et al. (2019) Detection of *Toxoplasma gondii* in *Crassostrea* spp. oysters cultured in an estuarine region in eastern Amazon. *Zoonoses Public Health* 66(3), 296–300. doi:10.1111/zph.12564
- Morita, S., Namikoshi, A., Hirata, T., Oguma, K., Katayama, H., Ohgaki, S., Motoyama, N., et al. (2002) Efficacy of UV irradiation in inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(11), 5387–5393. doi:10.1128/AEM.68.11.5387-5393.2002
- Morton, B. (1971) Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pall: V. Some aspects of filter-feeding and the effect of micro-organisms upon the rate of filtration. *J. Molluscan Stud.* 39(4), 289–301. doi:10.1093/oxfordjournals.mollus.a065108
- Munz, N. A., Burdon, F. J., Zwart, D. de, Junghans, M., Melo, L., Reyes, M., Schinenberger, U., et al. (2017) Pesticides drive risk of micropollutants in wastewater-impacted streams during low flow conditions. *Water Res.* 110, 366–377. doi:10.1016/j.watres.2016.11.001
- Nasser, A. M. M., Vaizel-Ohayon, D., Aharoni, A. & Revhun, M. (2012) Prevalence and fate of *giardia* cysts in wastewater treatment plants. *J. Appl. Microbiol.* 113(3), 477–484. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05335.x
- Navarro, A., Faria, M., Barata, C. & Piña, B. (2011) Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. *Environ. Pollut.* 159(1), 100–107. doi:10.1016/J.ENVPOL.2010.09.018
- Nelson, J. C., Kauffmann, D. J., Ciavarella, D. & Senisi, W. J. (1989) Acquired toxoplasmic retinochoroiditis after platelet transfusions. *Ann. Ophthalmol.* 21(7), 253–254.

- Neto, R. C., Santos, J. U. & Franco, R. M. B. (2006) Evaluation of activated sludge treatment and the efficiency of the disinfection of *Giardia* species cysts and cryptosporidium oocysts by UV at a sludge treatment plant in Campinas, south-east Brazil. *Water Sci. Technol.* 54(3), 89–94. doi:10.2166/wst.2006.453
- Nichols, S. J. (1996) Variations in the Reproductive Cycle of *Dreissena Polymorpha* in Europe, Russia, and North America. *Am. Zool.* 36(3), 311–325. doi:10.1093/icb/36.3.311
- Nichols, G., Chalmers, R., Lake, I., Sopwith, W., Hunter, P., Grenfell, P., Harrison, F., *et al.* (2006) Cryptosporidiosis: A report on the surveillance and epidemiology of *Cryptosporidium* infection in England and Wales. Dwi0849
- Nygård, K., Schimmer, B., Søbstad, Ø., Walde, A., Tveit, I., Langeland, N., Hausken, T., *et al.* (2006) A large community outbreak of waterborne giardiasis- delayed detection in a non-endemic urban area. *BMC Public Health* 6(1), 141. doi:10.1017/S0814062600002202
- Oifi, B. El & Védry, B. (2014) La révolution des boues activées a 100 ans. *Cah. l'Association Sci. Eur. pour l'Eau la Santé* 18(1), 25–32. doi:10.1051/asees/2014002
- Okoh, A. I., Sibanda, T., Gusha, S. S., Okoh, A. I., Sibanda, T. & Gusha, S. S. (2010) Inadequately Treated Wastewater as a Source of Human Enteric Viruses in the Environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7(6), 2620–2637. doi:10.3390/ijerph7062620
- Olson, M. E., Goh, J., Phillips, M., Guselle, N. & McAllister, T. A. (1999) *Giardia* Cyst and *Cryptosporidium* Oocyst Survival in Water, Soil, and Cattle Feces. *J. Environ. Qual.* 28(6), 1991. doi:10.2134/jeq1999.00472425002800060040x
- OMS & UNICEF. (2017) Progrès en Matière d'eau, d'assainissement et d'hygiène. Retrieved from <http://apps.who.int/bookorders>.
- Ossani, R. A., Borges, H. A. T., Souza, A. P., Sartor, A. A., Miletto, L. C., Federle, M., Moura, A. B., *et al.* (2017) *Toxoplasma gondii* in milk of naturally infected dairy ewes on west mesoregion of Santa Catarina state, Brazil. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* 69(5), 1294–1300. doi:10.1590/1678-4162-9177
- Ottoson, J., Hansen, A., Westrell, T., Johansen, K., Norder, H. & Stenström, T. A. (2006) Removal of Noro- and Enteroviruses, *Giardia* Cysts, *Cryptosporidium* Oocysts, and Fecal Indicators at Four Secondary Wastewater Treatment Plants in Sweden. *Water Environ. Res.* 78(8), 828–834. doi:10.2175/106143006X101719
- Owlad, M., Aroua, M. K., Daud, W. A. W. & Baroutian, S. (2009) Removal of Hexavalent Chromium-Contaminated Water and Wastewater: A Review. *Water. Air. Soil Pollut.* 200(1–4), 59–77. doi:10.1007/s11270-008-9893-7

- Palais, F., Mouneyrac, C., Dedourge-Geffard, O., Giambérini, L., Biagianti-Risbourg, S. & Geffard, A. (2011) One-year monitoring of reproductive and energy reserve cycles in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 83(8), 1062–1073. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.01.060
- Pales Espinosa, E., Koller, A. & Allam, B. (2015) Proteomic characterization of mucosal secretions in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Proteomics* 132, 63–76. doi:10.1016/j.jprot.2015.11.018
- Pales Espinosa, E., Cerrato, R. M., Wikfors, G. H. & Allam, B. (2016) Modeling food choice in the two suspension-feeding bivalves, *Crassostrea virginica* and *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 163(2), 1–13. doi:10.1007/s00227-016-2815-0
- 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 Res.* 48(1), 148–155. doi:10.1016/j.watres.2013.09.017
- Palos Ladeiro, M., Bigot-Clivot, A., Aubert, D., Villena, I. & Geffard, A. (2015) Assessment of *Toxoplasma gondii* levels in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) by real-time PCR: an organotropism study. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22(18), 13693–13701. doi:10.1007/s11356-015-4296-y
- Palos Ladeiro, M., Bigot-Clivot, A., Géba, E., Foll, F. Le, Guernic, A. Le, Leprêtre, M., Geffard, A., et al. (2018) Mollusc Bivalves as Indicators of Contamination of Water Bodies by Protozoan Parasites. *Ref. Modul. Earth Syst. Environ. Sci.* doi:10.1016/B978-0-12-409548-9.10979-0
- Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A. & Caparrini, A. (1986) A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Anal. Biochem.* 154(2), 536–541. doi:10.1016/0003-2697(86)90026-6
- Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D. & Provini, A. (2010) Multi-biomarker approach for the evaluation of the cyto-genotoxicity of paracetamol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 79(5), 489–498. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.02.053
- Parolini, M., Magni, S., Castiglioni, S., Zuccato, E. & Binelli, A. (2015) Realistic mixture of illicit drugs impaired the oxidative status of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 128, 96–102. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2014.12.092
- Peeters, J. E., Mazas, E. A., Masschelein, W. J., Villacorta, I., Maturana, And, M. De & Debacker, E. (1989) Effect of Disinfection of Drinking Water with Ozone or Chlorine Dioxide on Survival of *Cryptosporidium parvum* Oocysts.
- Perez, T., Sarrazin, L., Rebouillon, P. & Vacelet, J. (2002) First evidences of surfactant

- biodegradation by marine sponges (*Porifera*): An experimental study with a linear alkylbenzenesulfonate. *Hydrobiologia* 489(1/3), 225–233. doi:10.1023/A:1023217218585
- Perez, T., Wafo, E., Fourt, M. & Vacelet, J. (2003) Marine sponges as biomonitor of polychlorobiphenyl contamination: Concentration and fate of 24 congeners. *Environ. Sci. Technol.* 37(10), 2152–2158. doi:10.1021/es026234v
- Phelps, H. L. (1994) The Asiatic Clam (*Corbicula fluminea*) Invasion and System-Level Ecological Change in the Potomac River Estuary near Washington, D. C. *Estuaries* 17(3), 614. doi:10.2307/1352409
- Pilote, M., André, C., Turcotte, P., Gagné, F. & Gagnon, C. (2018) Metal bioaccumulation and biomarkers of effects in caged mussels exposed in the Athabasca oil sands area. *Sci. Total Environ.* 610–611, 377–390. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.08.023
- Putignani, L. & Menichella, D. (2010) Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen cryptosporidium. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2010. doi:10.1155/2010/753512
- Putignani, L., Mancinelli, L., Chierico, F. Del, Menichella, D., Adlerstein, D., Angelici, M. C., Marangi, M., et al. (2011) Investigation of *Toxoplasma gondii* presence in farmed shellfish by nested-PCR and real-time PCR fluorescent amplicon generation assay (FLAG). *Exp. Parasitol.* 127(2), 409–417. doi:10.1016/j.exppara.2010.09.007
- Rajagopal, S., Velde, G. Van Der & Jenner, H. A. (2002) Does status of attachment influence survival time of zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, exposed to chlorination? *Environ. Toxicol. Chem.* 21(2), 342–346. doi:10.1002/etc.5620210216
- Ramo, A., Cacho, E. Del, Sánchez-Acedo, C. & Quílez, J. (2017) Occurrence and genetic diversity of *Cryptosporidium* and *Giardia* in urban wastewater treatment plants in north-eastern Spain. *Sci. Total Environ.* 598, 628–638. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.04.097
- Reinoso, R. & Bécares, E. (2008) Environmental inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts in waste stabilization ponds. *Microb. Ecol.* 56(4), 585–592. doi:10.1007/s00248-008-9378-7
- Reinoso, R., Torres, L. A. & Bécares, E. (2008) Efficiency of natural systems for removal of bacteria and pathogenic parasites from wastewater. *Sci. Total Environ.* 395(2–3), 80–86. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.02.039
- Rendtorff, R. C. (1954) The experimental transmission of human intestinal protozoan

- parasites: II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *Am. J. Epidemiol.* 59(2), 209–222. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a119634
- Ribeiro, L. A., Santos, L. K. N. S. S., Brito Jr., P. A., Maciel, B. M., Silva, A. V. Da & Albuquerque, G. R. (2015) Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in Brazilian oysters (*Crassostrea rhizophorae*). *Genet. Mol. Res.* 14(2), 4658–4665. doi:10.4238/2015.May.4.25
- Robertson, L. J., Campbell, A. T. & Smith, H. V. (1992) Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(11), 3494–3500. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC183134/>
- Robertson, L. J. (2007) The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: A review. *Int. J. Food Microbiol.* 120(3), 201–216. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.058
- Rousseau, A., Escotte-Binet, S., Carbona, S. La, Dumètre, A., Chagneau, S., Favennec, L., Kubina, S., *et al.* (2019) Assessing *Toxoplasma gondii* oocyst infectivity using a sporocyst-based cell-culture assay combined with qPCR for environmental applications. *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.01189-19
- Ryan, U., Fayer, R. & Xiao, L. (2014) *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs, *Parasitol.* 41(13):1667-85 doi:10.1017/S0031182014001085
- Ryu, H., Alum, A., Mena, K. D. & Abbaszadegan, M. (2007) Assessment of the risk of infection by *Cryptosporidium* and *Giardia* in non-potable reclaimed water. *Water Sci. Technol.* 55(1–2), 283–290. doi:10.2166/wst.2007.047
- Saeedi, E., Jonaidi Jafari, N. & Salehzadeh, A. (2018) Detection of *Giardia lamblia* Cysts in Surface Waters of Rasht City, Iran. *J. Med. Microbiol. Infect. Dis.* 6(1), 8–12. doi:10.29252/JoMMID.6.1.8
- Santos, A. L., Oliveira, L. T. F. de, Souza, A. L. A., Hauser-Davis, R. A. & Simone, S. G. De. (2018) *Cryptosporidium* spp. Contamination in *Perna perna* Mussels Destined for Human Consumption in Southeastern Rio de Janeiro, Brazil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 100(2), 240–244. doi:10.1007/s00128-017-2223-2
- Schets, F. M., Berg, H. H. J. L. van den, Engels, G. B., Lodder, W. J. & Roda Husman, A. M. de. (2007) *Cryptosporidium* and *Giardia* in commercial and non-commercial oysters (*Crassostrea gigas*) and water from the Oosterschelde, the Netherlands. *Int. J. Food Microbiol.* 113(2), 189–194. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.031
- Schets, F. M., Wijnen, J. H. Van, Schijven, J. F., Schoon, H. & Roda Husman, A. M. De. (2008) Monitoring of waterborne pathogens in surface waters in Amsterdam, the Netherlands,

- and the potential health risk associated with exposure to *Cryptosporidium* and *Giardia* in these waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(7), 2069–2078. doi:10.1128/AEM.01609-07
- Schets, F. M., Schijven, J. F. & Roda Husman, A. M. de. (2011) Exposure assessment for swimmers in bathing waters and swimming pools. *Water Res.* 45(7), 2392–2400. doi:10.1016/j.watres.2011.01.025
- Schwitzguébel, J.-P., Comino, E., Plata, N. & Khalvati, M. (2011) Is phytoremediation a sustainable and reliable approach to clean-up contaminated water and soil in Alpine areas? *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18(6), 842–856. doi:10.1007/s11356-011-0498-0
- Seneca Lake State Park Spraypark Recreational Water 2005. (2005). Retrieved from <http://outbreakdatabase.com/details/seneca-lake-state-park-spraypark-recreational-water-2005/>
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A. & Ahmed, S. (2008) Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* 26(3), 246–265. doi:10.1016/J.BIOTECHADV.2007.12.005
- Shapiro, K., Vanwormer, E., Aguilar, B. & Conrad, P. A. (2015) Surveillance for *Toxoplasma gondii* in California mussels (*Mytilus californianus*) reveals transmission of atypical genotypes from land to sea. *Environ. Microbiol.* 17(11), 4177–4188. doi:10.1111/1462-2920.12685
- Sheehan, D. & Collieran, E. (2003) Uses of Bacteria in Bioremediation. In: *Bioremediation Protocols*, 3–22. doi:10.1385/0-89603-437-2:3
- Ślódkiewicz-Kowalska, A., Majewska, A. C., Rzymiski, 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* 51, 32–36. doi:10.1016/j.limno.2014.12.001
- Smith, H. V., Nichols, R. A. B. & Grimason, A. M. (2005) *Cryptosporidium* excystation and invasion: Getting to the guts of the matter. *Trends Parasitol.* 21(3), 133–142. doi:10.1016/j.pt.2005.01.007
- Sobsey, M. D., Shields, P. A., Hauchman, F. H., Hazard, R. L. & Caton, L. W. (1986) Survival and Transport of Hepatitis a Virus in Soils, Groundwater and Wastewater. *Water Sci. Technol.* 18(10), 97–106. doi:10.2166/wst.1986.0116
- Sprung, M. & Rose, U. (1988) Influence of food size and food quantity on the feeding of the mussel *Dreissena polymorpha*. *Oecologia* 77(4), 526–532. doi:10.1007/BF00377269
- Srisuphanunt, M., Saksirisampant, W. & Karanis, P. (2013) Detection of *Cryptosporidium*

- oocysts in green mussels (*Perna viridis*) from shell-fish markets of Thailand . *Parasite* 16(3), 235–239. doi:10.1051/parasite/2009163235
- Srivastava, N. K. & Majumder, C. B. (2008) Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater. *J. Hazard. Mater.* 151(1), 1–8. doi:10.1016/J.JHAZMAT.2007.09.101
- Sroka, J., Wójcik-Fatla, A. & Dutkiewicz, J. (2006) Occurrence of *Toxoplasma gondii* in water from wells located on farms. *Ann. Agric. Environ. Med.* 13(1), 169–75.
- Sroka, J., Stojecki, K., Zdybel, J., Karamon, J., Cencek, T. & Dutkiewicz, J. (2013) Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in effluent from sewage treatment plant from eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* . 1(1), 57–62.
- Staggs, S. E., Keely, S. P., Ware, M. W., Schable, N., See, M. J., Gregorio, D., Zou, X., et al. (2015) The development and implementation of a method using blue mussels (*Mytilus spp.*) as biosentinels of *Cryptosporidium spp.* and *Toxoplasma gondii* contamination in marine aquatic environments. *Parasitol. Res.* 114(12), 4655–4667. doi:10.1007/s00436-015-4711-9
- Stoeckel, J. A., Padilla, D. K., Schneider, D. W. & Rehmann, C. R. (2005) Laboratory culture of *Dreissena polymorpha* larvae: spawning success, adult fecundity, and larval mortality patterns. *Can. J. Zool.* 82(9), 1436–1443. doi:10.1139/z04-125
- Stumpf, P., Failing, K., Papp, T., Nazir, J., Böhm, R. & Marschang, R. E. (2010) Accumulation of a Low Pathogenic Avian Influenza Virus in Zebra Mussels (*Dreissena polymorpha*). *Avian Dis.* 54(4), 1183–1190. doi:10.1637/9162-111709-Reg.1
- Stybel, N., Fenske, C. & Schernewski, G. (2009) Mussel cultivation to improve water quality in the szczecin lagoon. *J. Coast. Res.* 56(SPEC. ISSUE 56), 1459–1463.
- Sun, S., Kong, L. Y., Zhang, H. Q., He, S. A. & Niwa, M. (2004) The asymmetric synthesis of linear dihydropyrano-coumarins for Alzheimer’s Disease. *Heterocycles* 63(2), 271–282. doi:10.1016/S0987-7983(96)80083-1
- Sun, Q., Lv, M., Hu, A., Yang, X. & Yu, C.-P. (2014) Seasonal variation in the occurrence and removal of pharmaceuticals and personal care products in a wastewater treatment plant in Xiamen, China. *J. Hazard. Mater.* 277, 69–75. doi:10.1016/J.JHAZMAT.2013.11.056
- Suresh Kumar, K., Dahms, H. U., Won, E. J., Lee, J. S. & Shin, K. H. (2015) Microalgae - A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 329–352. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.12.019

- Swaffer, B., Abbott, H., King, B., Linden, L. van der & Monis, P. (2018) Understanding human infectious *Cryptosporidium* risk in drinking water supply catchments. *Water Res.* 138, 282–292. doi:10.1016/j.watres.2018.03.063
- Tedde, T., Marangi, M., Papini, R., Salza, S., Normanno, G., Virgilio, S. & Giangaspero, A. (2019) *Toxoplasma gondii* and Other Zoonotic Protozoans in Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and Blue Mussel (*Mytilus edulis*): A Food Safety Concern? *J. Food Prot.* 82(3), 535–542. doi:10.4315/0362-028x.jfp-18-157
- Tei, F. F., Kowalyk, S., Reid, J. A., Presta, M. A., Yesudas, R. & Mayer, D. C. G. (2016) Assessment and molecular characterization of human intestinal parasites in bivalves from orchard beach, NY, USA. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13(4), 381. doi:10.3390/ijerph13040381
- Tenter, A. M., Heckeroth, A. R. & Weiss, L. M. (2000) *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 30(12–13), 1217–1258. doi:10.1016/S0020-7519(00)00124-7
- Tenter, A. M. (2009) *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104(2), 364–369. doi:10.1590/S0074-02762009000200033
- Thompson, R. C. A. (2004) The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet. Parasitol. Waterborne Zoonotic Parasites* 126(1-2 SPEC.ISS.), 15–35. doi:10.1016/j.vetpar.2004.09.008
- Thurston-Enriquez, J. A., Watt, P., Dowd, S. E., Enriquez, R., Pepper, I. L. & Gerba, C. P. (2002) Detection of Protozoan Parasites and Microsporidia in Irrigation Waters Used for Crop Production. *J. Food Prot.* 65(2), 378–382. doi:10.4315/0362-028X-65.2.378
- Torgerson, P. R. & Mastroiacovo, P. (2013) The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Bull. World Health Organ.* 91(7), 501–508. doi:10.2471/blt.12.111732
- Tourdjman, M., Tcheandjieu, C., Valk, H. de, Goulet, V. & Strat, Y. le. (2015) Toxoplasmosis among pregnant women in France: trends in seroprevalence and associated factors between 1995 and 2010. *Epidemiol. Recent.* (15/16), 264–272.
- Triviño-Valencia, J., Lora, F., Zuluaga, J. D. & Gomez-Marin, J. E. (2016) Detection by PCR of pathogenic protozoa in raw and drinkable water samples in Colombia. *Parasitol. Res.* 115(5), 1789–1797. doi:10.1007/s00436-016-4917-5
- Uma Devi, K., Swapna, G. & Suneetha, S. (2014) Microalgae in Bioremediation: Sequestration of Greenhouse Gases, Clearout of Fugitive Nutrient Minerals, and Subtraction of Toxic Elements from Waters. In: *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, 436–456. doi:10.1016/B978-0-12-800021-2.00019-4

- Vandeputte, C., Guizon, I., Genestie-Denis, I., Vannier, B. & Lorenzon, G. (1994) A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biol. Toxicol.* 10(5–6), 415–421. doi:10.1007/BF00755791
- Vavasseur, A. (2014) ÉNERGIE-SANTÉ Bioremédiation des sols et des eaux : application aux pollutions chimique et nucléaire Bioremediation of soil and water: application to chemical and nuclear pollutions. Retrieved from <http://www.appa.asso.fr>
- Verweij, J. J., Schinkel, J., Laeijendecker, D., Rooyen, M. A. A. van, Lieshout, L. van & Polderman, A. M. (2003) Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. *Mol. Cell. Probes* 17(5), 223–225. doi:10.1016/S0890-8508(03)00057-4
- Villena, I., Aubert, D., Gomis, P., Ferté, H., Ingland, J. C., Denis-Bisiaux, H., Dondon, J. M., *et al.* (2004) Evaluation of a strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(7), 4035–4039. doi:10.1128/AEM.70.7.4035-4039.2004
- Wainwright, K. E., Lagunas-Solar, M., Miller, M. A., Barr, B. C., Gardner, I. A., Pina, C., Melli, A. C., *et al.* (2007) Physical inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(17), 5663–5666. doi:10.1128/AEM.00504-07
- Wainwright, K. E., Lagunas-Solar, M., Miller, M. A., Barr, B. C., Melli, A. C., Packham, A. E., Zeng, N., *et al.* (2010) Radiofrequency-induced thermal inactivation of *toxoplasma gondii* oocysts in water. *Zoonoses Public Health* 57(1), 74–81. doi:10.1111/j.1863-2378.2009.01280.x
- Weiss, L. M., Laplace, D., Takvorian, P. M., Tanowitz, H. B., Cali, A. & Wittner, M. (1995) A Cell Culture System for Study of the Development of *Toxoplasma gondii* Bradyzoites. *J. Eukaryot. Microbiol.* 42(2), 150–157. doi:10.1111/j.1550-7408.1995.tb01556.x
- Wells, B., Shaw, H., Innocent, G., Guido, S., Hotchkiss, E., Parigi, M., Opsteegh, M., *et al.* (2015) Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in water samples from Scotland and a comparison between the 529bp real-time PCR and ITS1 nested PCR. *Water Res.* 87, 175–181. doi:10.1016/j.watres.2015.09.015
- WHO. (2012) Animal waste, water quality and human health. (A. Dufour, J. Bartram, R. Bos & V. Gannon, Eds.) WHO. World Health Organization.
- Widerström, M., Schönning, C., Lilja, M., Lebbad, M., Ljung, T., Allestam, G., Ferm, M., *et al.* (2014) Large outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection transmitted through the public water supply, Sweden. *Emerg. Infect. Dis.* 20(4), 581–9. doi:10.3201/eid2004.121415

- Wilkes, G., Edge, T., Gannon, V., Jokinen, C., Lyautey, E., Medeiros, D., Neumann, N., *et al.* (2009) Seasonal relationships among indicator bacteria, pathogenic bacteria, *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and hydrological indices for surface waters within an agricultural landscape. *Water Res.* 43(8), 2209–2223. doi:10.1016/J.WATRES.2009.01.033
- Wilkig, H., Thamm, M., Stark, K., Aebischer, T. & Seeber, F. (2016) Prevalence, incidence estimations, and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study. *Sci. Rep.* 6, 22551. doi:10.1038/srep22551
- Willer, D. & Aldridge, D. C. (2017) Microencapsulated diets to improve bivalve shellfish aquaculture. *R. Soc. Open Sci.* 4(11), 171142. doi:10.1098/rsos.171142
- Winkel, E. H. Ten & Davids, C. (1982) Food selection by *Dreissena polymorpha* Pallas (*Mollusca: Bivalvia*). *Freshw. Biol.* 12(6), 553–558. doi:10.1111/j.1365-2427.1982.tb00647.x
- Woo, S., Denis, V., Won, H., Shin, K., Lee, G., Lee, T. K. & Yum, S. (2013) Expressions of oxidative stress-related genes and antioxidant enzyme activities in *mytilus galloprovincialis* (*bivalvia, mollusca*) exposed to hypoxia. *Zool. Stud.*, Vol. 52. doi:10.1186/1810-522X-52-15
- Xiao, L., Alderisio, K. A. & Jiang, J. (2006) Detection of *Cryptosporidium* Oocysts in Water: Effect of the Number of Samples and Analytic Replicates on Test Results. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(9), 5942–5947. doi:10.1128/AEM.00927-06
- Xiao, S., Zhang, Y., Zhao, X., Sun, L. & Hu, S. (2018) Presence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in recreational lake water in Tianjin, China: A preliminary study. *Sci. Rep.* 8(1), 2353. doi:10.1038/s41598-018-20902-3
- Yu, N. & Culver, D. A. (1999) Estimating the effective clearance rate and refiltration by zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, in a stratified reservoir. *Freshw. Biol.*, Vol. 41.
- Zaiko, A. & Daunys, D. (2012) Density effects on the clearance rate of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*: flume study results. *Hydrobiologia* 680(1), 79–89. doi:10.1007/s10750-011-0904-0
- Zhang, X., Zhang, W., Xue, L., Zhang, B., Jin, M. & Fu, W. (2010) Bioremediation of bacteria pollution using the marine sponge *Hymeniacidon perlevis* in the intensive mariculture water system of turbot *Scophthalmus maximus*. *Biotechnol. Bioeng.* 105(1), 59–68. doi:10.1002/bit.22522
- Zhang, W., Yin, K. & Chen, L. (2013) Bacteria-mediated bisphenol A degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97(13), 5681–5689. doi:10.1007/s00253-013-4949-z

Zhou, L., Singh, A., Jiang, J. & Xiao, L. (2003) Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp. in raw wastewater in Milwaukee: implications for understanding outbreak occurrence and transmission dynamics. *J. Clin. Microbiol.* 41(11), 5254–7. doi:10.1128/JCM.41.11.5254-5257.2003

Références bibliographiques

Annexes

Valorisation des travaux de recherche



Articles de journaux

- **Géba E.**, Aubert D., Durand L., Escotte S., La Carbona S., Palos Ladeiro M., Dubey J.P., Villena I., Geffard A., Bigot-Clivot A. 2020. Use of the bivalve *Dreissena polymorpha* as a biomonitoring tool to reflect the protozoan load in freshwater bodies. *Water Research*, 170. doi.org/10.1016/j.watres.2019.115297
- **Géba E.**, Rioult D., Palluel O., Dedourge-Geffard O., Aubert D, Betoulle S., Bigot-Clivot A. Resilience of *Dreissena polymorpha* in wastewater effluent: use as a bioremediation tool? Soumis dans *Environmental Research*.
- **Géba E.**, Rousseau A., Le Guernic A., Escotte-Binet S., Favennec L., Gargala G., Dubey J.P., Villena I., Aubert D., Betoulle S., Bigot-Clivot A. Survival and infectivity of *Toxoplasma gondii* and *Cryptosporidium parvum* oocysts bioaccumulated by *Dreissena polymorpha*. En cours de rédaction pour *International Journal of Hygiene and Environmental Health*.
- **Géba E.**, Geffard A., Bigot-Clivot A., David E., Joachim S., Porcher J-M, Dedourge-Geffard O. Impact of caging on physiological responses in *Dreissena polymorpha*: a mesocosm study. En cours de rédaction pour *Environmental Science and Pollution Research*



Chapitres de livres

- Palos Ladeiro, M., Barjhoux, I., Bigot-Clivot, A., Bonnard, M., David, E., Dedourge-Geffard, O., **Géba, E.**, Lance, E., Lepretre, M., Magniez, G., Rioult, D., Aubert, D., Villena, I., Daniele, G., Salvador, A., Vulliet, E., Armengaud, J., Geffard, A., 2017. Mussel as a tool to define

continental watershed quality. In: Ray, S. (Ed.) Organismal and molecular malacology, Intech, pp. 43-69.

- Palos Ladeiro, M., Bigot-Clivot, A., **Géba, E.**, Le Foll, F., Le Guernic, A., Leprêtre, M., Geffard, A., Aubert, D., Durand, L., Villena, I., La Carbona, S., Favennec, L., Gargala, G., Pierre, S., 2018. Mollusc bivalves as indicators of contamination of water bodies by protozoan parasites. In: Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, Elsevier, DOI: 10.1016/B978-0-12-409548-9.10979-0.



Communication orale dans des colloques internationaux

- **Géba E.**, Aubert D., Betoulle S., Dedourge-Geffard O., Rioult D., Durand L., La Carbona S., Villena I., Geffard A., Bigot-Clivot A. *Dreissena polymorpha* as purifier tool of protozoa in wastewater treatment plant effluent. Communication orale présentée au 18e congrès de la Society of Environmental Toxicology and Chemistry (Europe), 13 au 17 mai 2018, Rome (Italie).

- **Géba E.**, Aubert D., Betoulle S., Dedourge-Geffard O., Rioult D., Villena I., Geffard A., Bigot-Clivot A. *Dreissena polymorpha* : un outil de biosurveillance et d'épuration des milieux aquatiques en protozoaires ? Communication orale présentée au 14ème colloque international francophone en écotoxicologie aquatique EcoBIM 2018, 22 au 25 mai 2018, Bordeaux (France).

- Bigot-Clivot A., **Géba E.**, Palos Ladeiro M., La Carbona S., Aubert D., Villena I., Geffard A. Estimation of protozoan contamination of the aquatic environment using freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. Communication orale présentée au 3e International Caparica Conference on Pollutant Toxic Ions and Molecules, du 4 au 7 novembre 2019, Caparica (Portugal).



Communications orales dans des colloques nationaux

- **Géba E.**, Aubert D., Bastien F., Bonnard I., Cazeaux C., Durand L., Escotte S., La Carbona S., Palos Ladeiro M., Villena I., Geffard A., Bigot-Clivot A. Capacités de bioaccumulation et de dépuración de protozoaires par les bivalves *Mytilus edulis* et *Dreissena polymorpha*. Communication orale présentée au 1er colloque du Réseau Public Contaminants Nouveaux risques & contaminants émergents, 22 au 23 novembre 2017, Arcachon (France).
- **Géba E.**, Aubert D., Betoulle S., Dedourge-Geffard O., Rioult D., Durand L., La Carbona S., Villena I., Geffard A., Bigot-Clivot A. La dreissène comme outil épurateur des protozoaires dans les effluents de STEP. Communication orale présentée à la 1^{ère} journée doctorale transfrontalière de l'école doctorale STS (URCA), 07 mars 2018, Reims (France).
- Rousseau A, **Géba E.**, La Carbona S., Bigot-Clivot A., Escotte S., Favennec L., Villena I., Aubert D. Potentiel infectieux des oocystes de *Toxoplasma gondii* et *Cryptosporidium parvum* bioaccumulés par des moules bleues (*Mytilus edulis*) et des dreissènes (*Dreissena polymorpha*). Journée des Jeunes Chercheurs, 18 Octobre 2018, Pôle Santé, Reims.
- Rousseau A., **Géba E.**, La Carbon, S., Bigot-Clivot A., Escotte S., Favennec L., Villena I., Aubert D. Etude de la viabilité et de l'infectiosité des (oo)cystes de *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* et *Giardia duodenalis* en matrices complexes : *Mytilus edulis* et *Dreissena polymorpha*. Mai 2018, Société Française de Parasitologie, Nice, France.



Posters

- **Géba E.**, Rioult D., Geffard A., Villena I., Aubert D., Betoulle S., Bigot-Clivot A. Mesure du taux de filtration de mollusques bivalves par cytométrie en flux : application chez *Dreissena polymorpha*. Poster présenté au congrès de l'Association française de Cytométrie, 7 au 9 novembre 2017, Reims (France).
- **Géba E.**, Rioult D., Geffard A., Villena I., Aubert D., Betoulle S., Bigot-Clivot A. Mesure du taux de filtration de mollusques bivalves par cytométrie en flux : application chez *Dreissena polymorpha*. Poster présenté à la 1^{ère} journée doctorale transfrontalière de l'école doctorale STS (URCA), 07 mars 2018, Reims (France).

Résumé :

Les effluents de station d'épuration (STEP) sont le siège de nombreuses contaminations chimiques et biologiques avec des traitements mis en place inefficaces pour certaines d'entre elles. Parmi les contaminants biologiques, certains font l'objet de nouvelles recherches, comme c'est le cas pour trois parasites protozoaires pathogènes de l'espèce humaine : *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* et *Giardia duodenalis*. En effet, ces protozoaires sont clairement identifiés comme des priorités de santé publique puisqu'ils correspondent aux trois principaux parasites responsables d'épidémies hydriques. Ce travail de thèse a pour but d'étudier l'utilisation de *Dreissena polymorpha*, un mollusque bivalve d'eau douce (moule zébrée), en tant qu'outil de bioremédiation des protozoaires en effluent de STEP. Pour cela, la cinétique d'accumulation et de dépuration des dreissènes vis-à-vis de ces trois protozoaires d'intérêt a été caractérisée sur 21 jours, afin d'évaluer leur capacité de bioextraction. La survie et le maintien des moules zébrées en effluent de STEP ont également été évalués *in situ*. Ces expérimentations ont permis de montrer que la dreissène survit en effluent de STEP, mais est également capable d'extraire et d'intégrer sur le long terme les protozoaires présents dans le milieu. Des expériences complémentaires ont été réalisées afin de mieux comprendre le devenir des parasites bioaccumulés par la dreissène en termes de viabilité et d'infectiosité. Ce travail souligne l'intérêt de *Dreissena polymorpha* en tant qu'outil de bioremédiation des protozoaires, en particulier en effluent de station d'épuration.

Mots-clefs : *Dreissena polymorpha*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis*, bioremédiation, eaux usées, stations d'épuration

Abstract :

Wastewater treatment plant (WWTP) effluents are the source of many chemical and biological contaminations, and the treatments used are inefficient for some of them. Among biological contaminants, some are the focus for new research, such as three human pathogenic protozoan parasites: *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis*. Indeed, these protozoa are clearly identified as public health priorities since they correspond to the three main parasites responsible for waterborne outbreaks. The aim of this doctoral work is to investigate the use of *Dreissena polymorpha*, a freshwater bivalve mollusc (zebra mussel), as a tool for bioremediation of protozoa in WWTP effluent. For this, the kinetics of protozoa accumulation and depuration by zebra mussel were characterized over 21 days, in order to evaluate the bioextraction capacity of this bivalve. The survival and health status of zebra mussels in WWTP effluent were also assessed *in situ*. These experiments showed that mussels survived in WWTP effluent and were also capable of extracting and integrating the protozoa present in the environment. Additional experiments were carried out to better understand the fate of parasites bioaccumulated by *D. polymorpha* as regards viability and infectivity. This work highlights the interest of *Dreissena polymorpha* as a tool for bioremediation of protozoa, particularly in wastewater treatment plant effluent.

Keywords : *Dreissena polymorpha*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis*, bioremediation, sewage, wastewater treatment plant

Laboratoire

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