UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

ÉCOLE DOCTORALE ABIES

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEURE DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline **:** ***PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS - INTERACTIONS***

Spécialité : ECOTOXICOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement par

Clarisse SEGUIN

Le 12 novembre 2025

Transfert trophique du mercure du phytoplancton à *Dreissena polymorpha* : études en laboratoire et en milieu naturel

Thèse dirigée par Mme. Claudia COSIO, Professeure

Co-encadrée par M. Damien RIOULT, Ingénieur de Recherche

JURY

M. Patrice GONZALEZ	Directeur de Recherche **Président**	Université de Bordeaux
Mme. Claudia COSIO	Professeure **Directrice de thèse**	Université de Reims Champagne-Ardenne
M. Damien RIOULT	Ingénieur de Recherche **Encadrant scientifique**	Université de Reims Champagne-Ardenne
Mme Vera SLAVEYKOVA	Professeure **Rapporteur**	Université de Genève
M. Paco BUSTAMANTE	Professeur **Examinateur**	Université de la Rochelle
M. Frédéric GIMBERT	Maître de Conférences **Examinateur**	Université Marie-et-Louis-Pasteur

REMERCIEMENTS

Pour commencer, je souhaite remercier les membres de mon jury de thèse, M. Patrice Gonzalez, Mme Vera Slaveykova, M. Frédéric Gimbert et M. Paco Bustamante d'avoir accepté de consacrer du temps à la lecture du manuscrit et d'évaluer ce travail de thèse. Merci également pour les précieux échanges post-soutenance. A cela s'ajoute mes remerciements aux membres de mon comité de suivi de thèse, Benjamin Marie, David Amouroux et Caroline Rémond, pour leurs conseils et expertises.

Les premières personnes que je souhaite remercier sont Claudia Cosio, directrice de thèse, et Damien Rioult, co-encadrant de thèse. Merci à toi, Claudia, de m'avoir accueillie en tant que stagiaire M2 puis de m'avoir fait confiance et donné la chance pour 3 ans de plus en thèse. La thèse n'était pas forcément ce à quoi j'aspirais mais, intéressée par le sujet et par le fait de poursuivre les travaux avec toi, je me suis lancée. Et je ne regrette pas ! Merci pour ces 3 années riches en terrain (on se souviendra du froid et de la pluie) et en expérimentations, en collaboration avec d'autres laboratoires et universités qui m'ont permis de découvrir d'autres techniques et fonctionnements, mais également riches en conférences/congrès. Damien, merci de m'avoir fait découvrir ta passion pour la cytométrie en flux et l'impression 3D. Le développement de la filtration n'aurait pas été possible sans toi. Tout ça pour aller au congrès de l'AFC et danser au Palais de la Bourse de Marseille ! Merci également pour l'accompagnement sur le terrain, l'apprentissage à la conduite du camion, la prospection à vélo et les dissections. Merci à vous deux pour les conseils et discussions, formels et informels, qui m'ont permis de prendre un peu plus confiance en moi, même s'il reste encore du chemin à parcourir.

Ensuite, merci à Isabelle Bonnard et Laurence Delahaut, pour votre disponibilité à toutes épreuves, que ce soit pour m'accompagner sur le terrain, me former aux techniques de laboratoire, m'aider à mettre en place une manip ou à disséquer. Merci également à Véronique Gaillet pour toutes les analyses de biochimie. On se sera bien cassé la tête ! Merci à vous trois, d'être là au quotidien pour les doctorants, stagiaires, post-doc, qui sont parfois perdus sur le fonctionnement du laboratoire. Sans vous, il m'aurait été difficile de mener cette thèse à bien.

Merci également à Masha, pour tous les kilomètres parcourus et les litres d'eau filtrés lors de nos sorties terrain. J'ai pu sortir de ma zone de confort et parler anglais ! Merci à Evan Bossard (stagiaire de M2) pour toutes les analyses de biologie moléculaire et de biochimie réalisées pendant ton stage. Merci à Dina Aggad pour la formation à la biologie moléculaire et ses mystères.

Merci à toutes les personnes qui m'ont accueilli dans leur laboratoire ou unité de recherche pour une collaboration : Frank Le Foll et Gauthier Tremolet pour la valvométrie, David Amouroux et Emmanuel Tessier pour les analyses d'isotopes stables du mercure, David Renault et Nathalie Le Bris pour la métabolomique ciblée, Lars-Eric Heimburger pour les analyses de mercure total et méthylmercure et Benjamin Marie pour la métabolomique non ciblée. Merci également à toutes les personnes qui ont contribué aux manip de thèse et analyses d'échantillons : Jean Armengaud pour la protéomique, Taina Rocha De Almeida pour la transcriptomique, Nicolas Borie et Benjamin Bertaux pour le lyoph, Jean-François Guise pour l'expertise sur les microalgues, Matteo Gios et Bastiaan Ibelings pour la pêche des quaggas, Joao Santos et Vera

Slaveykova pour la culture de diatomées, Jean-Luc Loizeau et Killian Kavanagh pour les analyses de mercure, Robin Richoux pour les accès aux sites d'exposition sur la Seine et Baghdad Ouddane pour les prélèvements de sédiments.

Merci, bien évidemment, à toute l'équipe de SEBIO Reims pour l'accueil, les discussions scientifiques et les moments de convivialité. Merci à tous mes collègues, devenus amis aujourd'hui, qui ont fait de cette thèse, une aventure plus facile à traverser. Je tiens tout particulièrement à remercier Audrey, pour les sorties running qui m'ont permis de développer mon cardio et ma capacité à parler et courir en même temps (à reprendre en 2026 !!) ; Nicolas, pour tous ces débats et conversations sans fins qui ont rythmé nos stages de M2 et thèses respectifs, qui débouchent sur notre couronnement en 2026 ; Jérémy, el famoso collègue, pour toutes nos rigolades (j'ai bien fait de t'alpaguer) ; Iris et Ondine, mes bibitches, pour nos moments passés à refaire le monde avec une pointe de « e prépausal » ; Clément, pour les appels rassurants dans les moments de doute ; Héloïse, Julie et Aurore, mes camarades de bureau qui ont supporté le fait que je réfléchisse à voix haute et les questionnements imprévus…

Merci à mes parents, mes sœurs, mes beaux-parents et mes amis du crew Mattéo, Corentin, Titouan, Jessica, pour votre soutien inconditionnel. Merci à ma bestie, Léa, pour tous les week-ends et activités extra-scolaires qui m'ont permis de m'évader et toi aussi, pour ton soutien dans les moments difficiles.

Last but not least, Julien, qui m'a accompagné dans cette aventure, entre le déménagement dans l'est de la France, les compromis, le soutien, un quotidien de 3 ans axé autour de ma thèse… Je ne te remercierai jamais assez. C'est à ton tour maintenant.

RÉSUMÉ

Cette thèse porte sur la bioaccumulation et les effets du mercure chez le bivalve *Dreissena polymorpha* par transfert trophique. Le projet combine des expositions contrôlées en laboratoire à des microalgues isolées, et des encagements in situ, afin d'évaluer : 1) la bioaccumulation du Hg en conditions réalistes, et 2) les réponses moléculaires, cellulaires et comportementales de *D. polymorpha*.

En laboratoire, deux espèces de microalgues aux parois contrastées ont été utilisées : la microalgue verte *Chlorella vulgaris* et la diatomée *Cyclotella meneghiniana*. Ces expérimentations révèlent un rôle du Hg présent dans la paroi dans la bioaccumulation et des différences marquées de bioaccumulation entre les organes selon l'espèce de microalgues, ainsi que des effets sur le comportement de filtration.

Les expositions en milieu naturel, par encagements de dreissènes dans deux rivières aux sources de Hg contrastées, la Seine et la Deûle, ont été réalisés en hiver et été. Les résultats montrent que la Deûle induit une bioaccumulation et des réponses moléculaires et cellulaires plus fortes que la Seine, tandis que la saison, la position dans le cours d'eau et le sexe des individus n'influencent pas significativement ces réponses.

Ce travail comble un manque de connaissances sur le transfert et les effets du Hg entre producteurs primaires et bivalves, et contribue à une meilleure évaluation des risques liés aux contaminants dans les écosystèmes aquatiques. Ces résultats ont également mis en lumière des manques de connaissance sur le métabolisme du modèle et son exposome, qui orienteront les investigations futures.

Mots-clés : mercure, transfert trophique, *Dreissena polymorpha*, bioaccumulation, omiques

ABSTRACT

This PhD thesis focuses on the bioaccumulation and effects of mercury (Hg) in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*, with particular attention to trophic transfer. The project combines laboratory exposures to isolated microalgae and in situ caging to assess: 1) Hg bioaccumulation and its subcellular partitioning under environmentally realistic conditions, and 2) molecular, cellular, and behavioral responses in *D. polymorpha*.

In the laboratory, two phytoplankton species with contrasting cell wall compositions were used: the green alga *Chlorella vulgaris* and the diatom *Cyclotella meneghiniana*. These experiments reveal a role of parietal Hg in bioaccumulation and marked differences in bioaccumulation between organs depending on the species of microalgae, as well as effects on filtration behavior.

Field experiments with caged individuals in two rivers with contrasting Hg sources, the Seine and the Deûle, were conducted in winter and summer. Results show that mussels caged in the Deûle exhibited higher Hg bioaccumulation and stronger molecular and cellular responses than those in the Seine, whereas season, position along the river, and sex of individuals had no significant influence.

This thesis fills a knowledge gap on Hg transfer and toxic effects between primary producers and bivalves, thereby contributing to a better understanding of the bivalve exposome and improving risk assessment of contaminants in aquatic food webs and ecosystems.

Keywords: mercury, trophic transfer, *Dreissena polymorpha*, bioaccumulation, omics

VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE

Publication scientifique :

Seguin C., Marant A., Palacios-Paris S., Bonnard I., Loizeau J.-L., David E., Rioult D., Cosio C. 2025. Unveiling the hidden threat: Molecular, cellular and behavioral effects of dietborne inorganic mercury and methylmercury in *Dreissena polymorpha*. Chemosphere 376, 144306. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2025.144306

Présentations orales :

Seguin C., Marant A., Palacios-Paris S., Bonnard I., Loizeau J.-L., David E., Rioult D., Cosio C. Effets du mercure inorganique et du méthylmercure par l'alimentation chez *Dreissena polymorpha*. Colloque annuel de la Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA), Besançon, France, 3 et 4 juillet 2024.

Seguin C., Rioult D., Petrova M., Bossard B., Bonnard I., Le Bris N., Renault D., Armengaud J., Heimbürger-Boavida L. and Cosio C. Mercury uptake and biological effects in *Dreissena polymorpha*: comparative study in Seine and Deûle Rivers. ICOBTE & ICHMET 2025, Busan, Corée du Sud, 22 au 26 septembre 2025. *(à venir)*

Présentation de posters scientifiques

Seguin C., Marie B., Armengaud J., Rioult D., Cosio C. Effects of dietary mercury on proteome and metabolome in *Dreissena polymorpha*, a sentinel of our aquatic environment. Symposium "Transdisciplinary research for a healthy planet", Reims, France, 30 et 31 mars 2023.

Seguin C., Asensio O., Tessier E., Rioult D., Amouroux D., Cosio C. Dietborne mercury bioaccumulation in *Dreissena polymorpha* using specific enriched stable isotopes. Journées des Jeunes Chercheurs de la Société Française des Isotopes Stables (SFIS), Strasbourg, France, 14 et 15 novembre 2023.

Seguin C., Rioult D., Claudia C. Diversité phytoplanctonique saisonnière de deux cours d'eau français. Congrès annuel de l'Association Française de Cytométrie (AFC), Marseille, France, 16 au 19 décembre 2024.

Seguin C., Rioult D., Petrova M., Bossard E., Tessier E., Le Bris N., Renault D., Amouroux D., Heimbürger-Boavida L., Cosio C. Unveiling the toxic trail: how methylmercury accumulates and impacts zebra mussels in field and the lab. Congrès annuel de la Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Vienne, Autriche, 11 au 15 mai 2025.

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ i
ABSTRACT ii
VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE iii
TABLE DES MATIERES i
LISTE DES FIGURES v
LISTE DES TABLEAUX viii
LISTE DES ANNEXES x
LISTE DES ABREVIATIONS xii
INTRODUCTION GÉNÉRALE - 1 -
1. Le mercure (Hg) : sources, cycle et formes - 2 -
2. Transfert trophique, biodisponibilité et bioaccumulation du Hg dans les écosystèmes aquatiques - 3 -
3. Effets du Hg dans les écosystèmes aquatiques - 6 -
4. Organismes d'études - 8 -
4.1. Rôle des microalgues dans le transfert trophique du Hg : focus sur *Chlorella vulgaris* et *Cyclotella meneghiniana* - 8 -
4.2. *Dreissena polymorpha* : un organisme filtreur clé dans la biosurveillance et le transfert trophique du Hg - 11 -
5. Objectifs, questions et hypothèses de la thèse - 12 -
Références - 14 -
CHAPITRE 1: Bioaccumulation et effets du Hg par l'alimentation chez *Dreissena polymorpha* en conditions contrôlées - 25 -
Partie 1 : Unveiling the hidden threat: molecular, cellular and behavioral effects of dietborne inorganic mercury and methylmercury in *Dreissena polymorpha* - 26 -
1. Introduction - 29 -
2. Material and methods - 32 -
2.1. Consumables and glasswares - 32 -
2.2. Biological models - 32 -
2.3. Hg exposure of *Nannochloropsis* sp. - 32 -
2.4. Dietary exposure of *D. polymorpha* - 32 -
2.5. Hg analysis - 33 -
2.6. Hg effects in *D. polymorpha* - 33 -
2.7. Statistics - 34 -
3. Results - 35 -
3.1. Filtration rate - 35 -
3.2. Hg bioaccumulation - 37 -
3.3. Histopathology - 39 -
3.4. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation - 40 -
3.5. Gene expression level - 41 -
4. Discussion - 45 -
5. Conclusion - 47 -
6. References - 48 -
7. Supplemental data - 54 -
Partie 2 : Essais de valvométrie HFNI chez *Dreissena polymorpha* - 56 -

1. Matériels et méthodes - 57 -
2. Résultats et discussion - 57 -
3. Conclusion - 59 -
4. Références - 60 -
CHAPITRE 2 : Bioaccumulation du Hg par l'alimentation chez *Dreissena polymorpha* : réponses transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques - 61 -
1. Introduction - 65 -
2. Material and methods - 66 -
2.1. Biological models - 66 -
2.2. Dietary exposure of *D. polymorpha* - 66 -
2.3. THg and MeHg concentrations - 66 -
2.4. Transcriptomics - 66 -
2.5. Shotgun proteomics - 67 -
2.6. Enzyme activities of antioxidant proteins and lipid peroxidation - 69 -
2.7. Data analysis and statistics - 69 -
3. Results - 70 -
3.1. THg and MeHg in *Nannochloropsis* and *D. polymorpha* - 70 -
3.2. Multi-omics - 70 -
3.3. Enzyme activities of antioxidant proteins and lipid peroxidation - 74 -
4. Discussion - 75 -
5. Conclusion - 77 -
6. Références - 77 -
CHAPITRE 3 : Comparaison de la bioaccumulation du mercure chez *Dreissena bugensis* exposée par l'eau et par voie alimentaire - 83 -
1. Introduction - 85 -
2. Matériel et méthodes - 86 -
2.1. Consommables et verrerie - 86 -
2.2. Organismes d'étude - 86 -
2.3. Exposition des microalgues à ^{199}IHg et ^{201}MeHg - 87 -
2.4. Exposition de *D. bugensis* au Hg par l'alimentation et par l'eau - 87 -
2.5. Spéciation du Hg - 88 -
2.6. Effets du Hg par l'alimentation sur la filtration de *D. bugensis* - 89 -
2.7. Analyses statistiques - 90 -
3. Résultats - 90 -
3.1. Concentrations en Hg dans l'eau et les microalgues - 90 -
3.2. Bioaccumulation du Hg chez *D. bugensis* - 91 -
3.3. Effets du Hg par l'alimentation sur la filtration de *D. bugensis* - 94 -
4. Discussion - 95 -
4.1. Exposition par l'eau *vs* par voie alimentaire - 95 -
4.2. Exposition par voie alimentaire : Chlorelles *vs* Diatomées - 96 -
5. Conclusion - 98 -
6. Références - 99 -
7. Annexes - 105 -
CHAPITRE 4 : Bioaccumulation et effets du Hg par voie alimentaire chez *D. polymorpha* exposée en milieu naturel - 109 -
1. Introduction - 112 -

2. Matériel et méthodes - 113 -
2.1. Description des sites - 113 -
2.2. Encagements de *D. polymorpha* - 115 -
2.3. Prélèvements et analyses d'eau - 115 -
2.4. Concentrations en Hg chez *D. polymorpha* - 116 -
2.5. Isotopes stables du carbone ($\delta^{13}C$) et de l'azote ($\delta^{15}N$) - 116 -
2.6. Activité des enzymes du système antioxydant et péroxydation lipidique - 116 -
2.7. Expression relative du niveau des gènes du système antioxydant et de défense - 117 -
2.8. Métabolomique ciblée - 118 -
2.9. Protéomique - 119 -
2.10. Exposition en laboratoire : bioaccumulation des isotopes stables et enrichis du Hg - 119 -
2.11. Analyses statistiques - 121 -
Partie 1 : Du terrain au laboratoire - 124 -
1. Résultats et discussion - 125 -
1.1. Exposition en milieu naturel - 125 -
1.2. Exposition en laboratoire : bioaccumulation du Hg - 131 -
2. Conclusion - 136 -
3. Références - 136 -
4. Annexes - 142 -
Partie 2 : Influence des rejets urbains et industriels - 145 -
1. Résultats et discussion - 146 -
1.1. Paramètres physico-chimiques des cours d'eau - 146 -
1.2. Isotopes stables du carbone (^{13}C) et de l'azote (^{15}N) - 147 -
1.3. Bioaccumulation chez *D. polymorpha* - 148 -
1.4. Réponses enzymatiques et de défense chez *D. polymorpha* - 151 -
1.5. Niveau relatif des gènes du système antioxydant chez *D. polymorpha* - 152 -
1.6. Métabolomique - 153 -
2. Conclusion - 155 -
3. Références - 156 -
4. Annexes - 159 -
Partie 3 : Pollution et saisonnalité - 161 -
1. Résultats et discussion - 162 -
1.1. Encagements en hiver - 162 -
1.2. Encagements en été - 166 -
2. Conclusion - 177 -
3. Références - 178 -
4. Annexes - 178 -
DISCUSSION GÉNÉRALE - 186 -
1. Bioaccumulation et effets biologiques du Hg par l'alimentation chez *D. polymorpha* - 187 -
1.1. Des différences marquées entre les branchies et la glande digestive - 188 -
1.2. La variabilité inter-individuelle chez *D. polymorpha* - 189 -
1.3. Les approches omiques : vers une intégration dans les programmes de biosurveillance ? - 190 -

1.4. Du laboratoire au terrain : une méthode innovante pour étudier le transfert et les effets du Hg - 192 -
2. Importance des caractéristiques du phytoplancton pour le transfert trophique du Hg vers le consommateur - 193 -
2.1. En laboratoire - 193 -
2.2. En milieu naturel - 194 -
3. Influence des sources de pollution au Hg sur la bioaccumulation et les effets biologiques chez *D. polymorpha* : perspectives pour les encagements - 196 -
3.1. Les approches temporelles - 196 -
3.2. Approches spatiales - 197 -
3.3. Approches tissulaires - 197 -
3.4. Caractérisation de la biodisponibilité du Hg dans l'eau - 198 -
4. Conclusion - 198 -
5. Références - 199 -

LISTE DES FIGURES

Figure 0-1. Cycle biogéochimique simplifié du Hg dans les milieux aquatiques, adapté de Dranguet et al., 2014. Le cercle rouge désigne le niveau trophique étudié dans cette thèse. ..- 3 -
Figure 0-2. Photos de *Chlorella vulgaris* (à gauche) et *Cyclotella meneghiniana* (à droite). Photos extraites de www.algaebase.org (© Maike Lorenz, SAG et Karl Bruun). .....- 10 -
Figure 0-3. Photo de *Dreissena polymorpha* en stabulation. .....- 11 -
Figure 1-1. Filtration rate (%) of *D. polymorpha* and negative control (no mussel) at the beginning of feeding at 24 h (A), 48 h (B) and 96 h (C). Different letters indicate statistically different groups (n = 4; $p \leq 0.05$). .....- 37 -
Figure 1-2. Concentrations of THg (µg / g; bar chart), % of IHg and MeHg (pie chart) and the bioaccumulation factor (BAF g-1) in gills (A), digestive gland (B) and rests (C) of *D. polymorpha* exposed to IHg and MeHg by diet (mean ± SD; n = 3, $p < 0.05$). .....- 39 -
Figure 1-3. .....- 40 -
Figure 1-4. (A) Temps moyen passé à l'état fermé (DTC), (B) nombre de mouvements valvaires moyen (VB) et (C) nombre de transitions moyen entre l'état ouvert et l'état fermé (T) chez *D. polymorpha* exposée 4 jours à des microalgues contrôle ou contaminées au Hg (n = 4 à 6). .- 58 -
Figure 2-1. .....- 72 -
Figure 2-2. Enriched KEGG pathways of differentially expressed genes (DEG) and differential abundant proteins (DAP) compared to control in gills (g) and digestive glands (DG) of *D. polymorpha* exposed by diet to IHg and MeHg. .....- 73 -
Figure 3-1. Photo de *Dreissena bugensis* en stabulation. .....- 86 -
Figure 3-2. Schéma récapitulatif de la préparation des microalgues. Ce protocole est appliqué pour les cultures de chlorelles et diatomées, exposées au Hg ou contrôle. .....- 87 -
Figure 3-3. Plan expérimental d'exposition de *D. bugensis* par l'eau et l'alimentation (A) et photo du dispositif expérimental (B). .....- 88 -
Figure 3-4. Répartition du ^{201}MeHg et ^{199}IHg chez les Chlorelles et les Diatomées. Couleur hachurée : fraction non extractible et couleur pleine : fraction extractible. .....- 91 -
Figure 3-5. Concentrations en ^{199}IHg et ^{201}MeHg dans les branchies et la glande digestive de *D. bugensis* après exposition par l'eau et aux Chlorelles (CV) contaminées (* = $p < 0.05$, n=4 à 5) - 92 -
Figure 3-6. Concentrations en ^{199}IHg et ^{201}MeHg dans les branchies et la glande digestive de *D. bugensis* après une exposition par Chlorelles (CV) et Diatomées (D) (* = $p < 0.05$, n=4 à 5). ..- 93 -
Figure 3-7. Concentrations en ^{201}MeHg et ^{199}IHg dans les branchies et la glande digestive de *D. bugensis* après une exposition par microalgues contaminées : Chlorelles (CV), Chlorelles$_{nonext}$ (CV_{nonext}), Diatomées (D) et Diatomées$_{nonext}$ (D_{nonext}). Les lettres représentent les différences significatives ($p < 0.05$, n=4 à 5). .....- 94 -
Figure 3-8. Temps moyen nécessaire à *D. bugensis* pour atteindre une filtration de 50 % des microalgues (FR50, en minutes) après exposition à des microalgues contaminées à IHg et MeHg ou contrôle (n = 4, * : p-valeur < 0.05). .....- 95 -
Figure 4-1. Sites d'encagement sur la Seine, en amont et en aval de Paris (A : amont et B : aval) et la Deûle, en amont et aval de l'ancienne fonderie Metaleurop (C : amont et D : aval). .....- 114 -

Figure 4-2. Paramètres physico-chimiques et concentrations en Hg hebdomadaires de la Seine sur les 3 semaines d'encagements (X : pas de valeur). Les valeurs des paramètres de l'eau sont fournies par le SIAAP. ..... - 125 -
Figure 4-3. Concentrations en IHg (A) et MeHg (B, ng/g) et %MeHg dans les tissus entiers de *D. polymorpha* contrôle et exposée 3 semaines dans la Seine (moyenne ± écart-type ; n=4 à 5, * = p <0.05 vs contrôle, NS = non significatif). ..... - 126 -
Figure 4-4. Activités enzymatiques des protéines du système antioxydant (A : CAT, B : GST et C : SOD) et peroxydation des lipides (D : LOOH) chez *D. polymorpha* exposées 3 semaines dans la Seine (* = p<0,05 vs contrôle, n=10). ..... - 128 -
Figure 4-5. Expression relative des gènes du système antioxydant (A : *cat*, B : *gst*, C : *sod* et D : *mt*) chez *D. polymorpha* exposées 3 semaines dans la Seine (* = p<0,05 vs contrôle, n=10).- 129 -
Figure 4-6. Concentrations de métabolites ciblés dans les tissus entiers de *D. polymorpha* non exposée (T0) et exposée 3 semaines dans la Seine (T3). A) PLS-DA, B) Heatmap des concentrations en métabolite (* = p < 0,05). ..... - 130 -
Figure 4-7. Concentrations (ng/g) en ^{199}IHg (A) et ^{201}MeHg (B) %MeHg (en gras) dans les tissus entiers de *D. polymorpha* exposée pendant 4 jours par l'alimentation suivi de 4 jours de dépuration (n=4 à 5, p <0.05). ..... - 133 -
Figure 4-8. Modélisation toxicocinétique des concentrations (ng/g) en ^{199}IHg (A) et ^{201}MeHg (B) dans les tissus entiers de *D. polymorpha* exposée pendant 4 jours par l'alimentation suivi de 4 jours de dépuration (n=4 à 5)..... - 135 -
Figure 4-9. Valeurs moyennes de δ^{15}N et δ^{13}C (‰) de *D. polymorpha* (n = 3) et du seston filtré (n = 1) en juillet 2023. ..... - 148 -
Figure 4-10. Concentrations en THg et MeHg (ng/g) dans les tissus entiers de *D. polymorpha* exposées 1 à 3 semaines dans la Seine et la Deûle (n = 14 à 20 pour THg et n = 5 pour MeHg). La ligne grise représente les concentrations pour les individus T0 (moyenne ± SD). ..... - 150 -
Figure 4-11. Activités enzymatiques des CAT, GST, SOD et péroxydation des lipides (LOOH) dans les tissus de *D. polymorpha* exposées 3 semaines dans la Seine ou dans la Deûle (p<0,05 vs contrôle, n = 6 à 10). La ligne grise représente les activités enzymatiques et la péroxydation lipidique des individus contrôle (moyenne ± SD). ..... - 151 -
Figure 4-12. Niveau d'expression relatif des gènes *cat*, *gst*, *sod* et *mt* dans les tissus de *D. polymorpha* exposées 3 semaines dans la Seine ou dans la Deûle (p<0,05 vs contrôle, n = 5 à 6). La ligne grise représente les niveaux d'expression des gènes des individus contrôle (moyenne ± SD). ..... - 152 -
Figure 4-13. PLSDA des concentrations de métabolites dans les tissus entiers de *D. polymorpha* exposée 3 semaines dans la Seine ou la Deûle selon le site d'exposition et le sexe (n = 4 à 5).- 153 -
Figure 4-14. Concentrations en acide lactique (nmoles/mg poids sec) chez *D. polymorpha* non exposée (T0) et exposée 3 semaines dans la Seine et la Deûle (n = 9, p < 0.05). ..... - 153 -
Figure 4-15. Concentrations en THg et MeHg chez *D. polymorpha* exposée 1, 2 et 3 semaines (T1, T2, T3) en hiver en amont (SAM) et en aval (SAV) de la Seine ou en amont (DAM) et en aval (DAV) de la Deûle (n = 3 à 4, p < 0.05, NS = Non Significatif). ..... - 162 -
Figure 4-16. Valeurs moyennes de δ^{15}N et $^{\delta}$13C (‰) de *D. polymorpha* (n = 3) et du seston filtré (n = 1) en janvier 2024..... - 163 -

Figure 4-17. ACP représentant les concentrations en THg et MeHg et les réponses enzymatiques et de défense (CAT, GST, SOD, LOOH) chez *D. polymorpha* exposée 3 semaines en hiver en amont (SAM) et en aval (SAV) de la Seine ou en amont (DAM) et en aval (DAV) de la Deûle (n = 3 à 4).- 164 -
Figure 4-18. Concentrations en glycérol (nmoles/mg poids sec) chez *D. polymorpha* non exposée (T0) et exposée 3 semaines en amont et aval de la Seine (SAM, SAV) et de la Deûle (DAM, DAV) (n =3 à 5, p < 0.05). ..... - 164 -
Figure 4-19. ACP représentant les concentrations en THg et MeHg et les concentrations en métabolites chez *D. polymorpha* exposée 3 semaines en hiver en amont (SAM) et en aval (SAV) de la Seine ou en amont (DAM) et en aval (DAV) de la Deûle (n = 3 à 4). ..... - 166 -
Figure 4-20. Concentrations en THg et MeHg chez *D. polymorpha* exposée 1, 2 et 3 semaines (T1, T2, T3) en été en amont (SAM) et en aval (SAV) de la Seine ou en amont (DAM) et en aval (DAV) de la Deûle (n = 3 à 4, p < 0.05, NS = Non Significatif). ..... - 168 -
Figure 4-21. Valeurs moyennes de $\delta^{15}N$ et $^{\delta}13C$ (‰) de *D. polymorpha* (n = 3) et du seston filtré (n = 1) en juin 2024. ..... - 169 -
Figure 4-22. ACP représentant les concentrations en THg et MeHg et les réponses enzymatiques et de défense (CAT, GST, SOD, LOOH) dans les tissus entiers de *D. polymorpha* exposée 3 semaines en été en amont (SAM) et en aval (SAV) de la Seine ou en amont (DAM) et en aval (DAV) de la Deûle (n = 3 à 4). ..... - 170 -
Figure 4-23. PLS-DA des concentrations de métabolites dans les tissus entiers de *D. polymorpha* femelle et mâle exposée 3 semaines en été en amont (SAM) et en aval (SAV) de la Seine et en amont (DAM) et en aval (DAV) de la Deûle (n = 3 à 4). ..... - 172 -
Figure 4-24. ACP représentant les concentrations en THg et MeHg et les concentrations en métabolites chez *D. polymorpha* exposée 3 semaines en été en amont (SAM) et en aval (SAV) de la Seine ou en amont (DAM) et en aval (DAV) de la Deûle (n = 3 à 4). ..... - 173 -
Figure 4-25. Diagramme de Venn des protéines significativement modulées par rapport au T0 en fonction des sites d'encagement (SAM : Seine amont, SAV : Seine aval, DAM : Deûle amont et DAV : Deûle aval). ..... - 174 -
Figure 4-26. PLS-DA des spectral count des protéines dans les tissus entiers de *D. polymorpha* exposée 3 semaines en été en amont (SAM) et en aval (SAV) de la Seine ou en amont (DAM) et en aval (DAV) de la Deûle selon le site d'exposition et le sexe (n = 4 à 5). ..... - 174 -
Figure 4-27. Diagramme de Venn des protéines modulées (VIP score > 1, issu d'une PLS-DA) par une exposition en milieu naturel chez *D. polymorpha* et corrélées à la bioaccumulation de THg ou MeHg (p-value < 0.05). ..... - 175 -
Figure 5-1. Cytogrammes des populations de pico- (**bleu**) et nanophytoplancton (**vert**) dans l'eau prélevée à T3 en amont et aval de la Seine et de la Deûle en 2024. Les concentrations totales de cellules/mL sont indiquées en gras. ..... - 195 -

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 0-1. Concentrations de THg et MeHg dans l'eau (ng/L) et dans le biote (ng/g, poids frais) extraites de la fiche de données toxicologiques et environnementale de l'INERIS (2010). ..... - 5 -
Tableau 1-1. Studies on effects of waterborne Hg in aquatic vertebrates and invertebrates. - 31 -
Tableau 1-2. Concentration of THg and MeHg (fg/cell) in Nannochloropsis at the beginning of exposure. ..... - 32 -
Tableau 1-3. Histopathological scores in *D. polymorpha* exposed by diet to control, IHg2, IHg20, MeHg2 and MeHg20. ..... - 40 -
Tableau 1-4. Enzyme activities of CAT (U / g protein), GST (µmol CDNB / g protein · min), SOD (U / g protein) and LOOH (µmol TBH / g protein) in gills, digestive gland and rests of *D. polymorpha* exposed by diet 24 h, 48 h and 96 h to IHg and MeHg (mean ± SD, n = 4 to 6 animals; different letters show statistical significance $p < 0.05$). ..... - 42 -
Tableau 1-5. Relative gene expression level in gills, digestive gland and rests of cat, sod, gst, mt involved in defence and atp, cox, ldh, ampk, cs, aox, and cs involved in energy metabolism of *D. polymorpha* exposed 24h, 48h and 96h by diet to IHg and MeHg (mean ±SD, n=3-6; bold shows $p< 0.05$ against Control, different letters show $p<0.05$ between treatments when relevant). ..... - 43 -
Tableau 2-1. THg bioaccumulation in *D. polymorpha* in µg THg/g dw and percentage of MeHg in THg (%) (n=8). ..... - 70 -
Tableau 2-2. Results of pairwise PERMANOVA analyses conducted when the overall PERMANOVA p-value was < 0.05 (n = 4 to 5, * = $p < 0.05$). ..... - 70 -
Tableau 2-3. Enzyme activities of CAT (U g $prot^{-1}$), GST (µmol CDNB g $prot^{-1}$ min^{-1}), SOD (U g $prot^{-1}$) and lipid peroxidation (LOOH; µmol TBH g $prot^{-1}$) in gills and digestive gland of *D. polymorpha* exposed by diet to IHg and MeHg (* = $p < 0.05$ vs control, n=8). ..... - 75 -
Tableau 3-1. Limites de détection analytique et expérimentale du ^{199}IHg et ^{201}MeHg pour les microalgues, tissus et coquilles des dreissènes (ng/g) et l'eau d'exposition brute et filtrée (ng/L). ..... - 89 -
Tableau 3-2. Concentrations en ^{199}IHg et ^{201}MeHg (ng/L) dans les eaux d'exposition des dreissènes exposées directement par l'eau (moyenne ±SD des trois réplicats d'injection). ... - 90 -
Tableau 3-3. Concentrations en IHg naturel (fg/cell) chez les microalgues contrôle et en ^{201}MeHg et ^{199}IHg (fg/cell) chez les microalgues exposées (moyenne ± SD des trois réplicats d'injection). - 91 -
Tableau 3-4. Facteurs de bioaccumulation (BAF, g^{-1}) après exposition aux Chlorelles et aux Diatomées contaminées et de bioconcentration (BCF) après exposition par l'eau chez *D. bugensis* (n = 4 à 5). ..... - 94 -
Tableau 4-1. Résumé des conditions d'acclimatation et d'encagement de *D. polymorpha* par sous-partie du Chapitre 4. ..... - 115 -
Tableau 4-2. Caractéristiques des amorces de gènes utilisées pour la RT-qPCR. L'actine et la protéine ribosomale S3 sont les gènes de référence. ..... - 117 -
Tableau 4-3. Caractéristiques d'identification des métabolites utilisées dans l'analyseur GC-MS. ..... - 118 -
Tableau 4-4. Limites de détection analytique et expérimentale du ^{199}IHg et ^{201}MeHg pour l'eau d'exposition brute et filtrée (ng/L), les microalgues (ng/g, poids sec) et les tissus des dreissènes (ng/g, poids sec). ..... - 121 -

Tableau 4-5. Valeurs statistiques des 13 métabolites significativement modulés dans les tissus entiers de *D. polymorpha* après 3 semaines d'encagements comparés à des individus contrôle (p<0.05, MetaboAnalyst). - 131 -
Tableau 4-6. Facteurs de bioaccumulation (BAF, g^{-1}; moyenne ± SD) chez *D. polymorpha* exposées dans la Seine et en conditions contrôlées (n = 5). - 133 -
Tableau 4-7. Paramètres médians (50%) et intervalle de crédibilité à 95% (2.5% - 97.5% quantiles) du modèle toxicocinétique ajusté aux données d'accumulation et de dépuration en utilisant l'application $MOSAIC_{bioacc}$ pour ^{201}MeHg et ^{199}IHg. ku : constante d'accumulation, ke : constante d'élimination, BMF : facteur de biomagnification, $T_{1/2}$: temps nécessaire pour que la concentration dans l'organisme diminue de 50 %. - 135 -
Tableau 4-8. Paramètres physico-chimiques, concentrations en THg et %MeHg dans l'eau et les particules de la Seine et de la Deûle sur la période d'encagement (5 au 26 juillet 2023). X : pas de donnée. - 146 -
Tableau 4-9. Facteurs de bioaccumulation (BAF, moyenne ± SD) chez *D. polymorpha* exposées 1 à 3 semaines dans la Seine et la Deûle (n = 14 à 20 pour THg et n = 5 pour MeHg). - 150 -
Tableau 4-10. Concentrations de métabolites (nmoles/mg poids sec, moyenne ± SD) dans les tissus entiers de *D. polymorpha* exposée 3 semaines dans la Seine ou la Deûle (T3), p-valeurs de l'ANOVA et p-valeurs ajustées (Benjamin Hochberg, ***** = p < 0,05, n = 9). - 154 -
Tableau 4-11. Concentrations en métabolites (nmoles/mg poids sec, moyenne ± SD) dans les tissus entiers de *D. polymorpha* exposée 3 semaines en hiver en amont (SAM) et en aval (SAV) de la Seine ou en amont (DAM) et en aval (DAV) de la Deûle (n = 3 à 4, p < 0.05). - 165 -
Tableau 4-12. Concentrations en métabolites (nmoles/mg poids sec, moyenne ± SD) dans les tissus entiers de *D. polymorpha* exposée 3 semaines en été en amont (SAM) et en aval (SAV) de la Seine ou en amont (DAM) et en aval (DAV) de la Deûle (n = 3 à 4, p < 0.05). - 171 -
Tableau 4-13. Résultats d'enrichissement KEGG (WebGestalt) des protéines corrélées avec la bioaccumulation du THg. - 176 -
Tableau 4-14. Résultats d'enrichissement KEGG (WebGestalt) des protéines corrélées avec la bioaccumulation du MeHg. - 176 -

LISTE DES ANNEXES

Figure S3-1. Taux de filtration modélisés sur 90 minutes à partir de la fonction du modèle de Gompertz pour 4 individus *D. bugensis* exposés aux Chlorelles contaminées à IHg, MeHg ou non contaminées (Ctrl) pendant 4 jours. Les FR50 calculés à partir de la fonction $y = a \cdot \exp(-b \cdot \exp(-c \cdot x))$ pour les 4 jours sont indiqués en vert. - 105 -
Figure S3-2. Taux de filtration modélisés à partir de la fonction du modèle de Gompertz pour 4 individus *D. bugensis* exposés aux Diatomées contaminées à IHg, MeHg ou non contaminées (Ctrl) pendant 4 jours. Les FR50 calculés à partir de la fonction $y = a \cdot \exp(-b \cdot \exp(-c \cdot x))$ pour les 4 jours sont indiqués en orange. - 106 -
Figure S 4-1. Coefficients de corrélation par la méthode Pearson des concentrations en IHg et MeHg dissout (IHg_d et $MeHg_d$), particulaire (IHg_p et $MeHg_p$) et dans les tissus des dreissènes ($IHg_{_moules}$ et $MeHg_{_moules}$) (* = p-value < 0,05. - 142 -
Figure S 4-2. Concentration des métabolites (nmoles/mg dw, moyenne ± SD) dans les tissus mous entiers de *D. polymorpha* non exposée (T0) et exposée 3 semaines dans la Seine (T3). Les différences significatives sont indiquées en gras ($p < 0,05$; $n = 4$ à 5). - 143 -
Figure S 4-3. Proportions moyennes en pico- et nanophytoplancton sur les 3 semaines d'encagement dans la Seine et la Deûle (moyenne ± SD, n = 4). - 159 -
Figure S4-4. Coefficients de corrélation entre Hg dissout (THg_d, $MeHg_d$), Hg particulaire (THg_p, $MeHg_p$) et Hg bioaccumulé dans les tissus de *D. polymorpha* ($THg_{_moules}$, $MeHg_{_moules}$) exposée dans la Seine et dans la Deûle (n = 4, moyennes des 3 temps d'exposition et le T0 ; * = p-value < 0,05). - 159 -

Tableau S1-1. Primer pairs used in quantitative RT-PCR, accession, sequences, size of amplicons and concentration used for qPCR are shown. - 54 -
Tableau S1-2. Bioaccumulation of THg, percent of MeHg in THg and the bioaccumulation factor (BAF) in tissues of *D. polymorpha* exposed by diet (mean± SD, n=3 mussels, p<0.05). - 55 -
Tableau S3-1. Composition du milieu commercial BG11 (Cyanobacteria BG-11 Freshwater Solution, Sigma-Aldrich) utilisé pour les cultures de *C. vulgaris*. - 106 -
Tableau S3-2. Composition du milieu commercial de diatomées (CCAP FADM-C Diatom Medium) utilisé pour les cultures de *C. meneghiniana*. - 107 -
Tableau S4-1. Concentrations de métabolites ciblés dans les tissus entiers de *D. polymorpha* exposée 3 semaines dans la Seine ou la Deûle (T3) (n = 4 à 5). - 160 -
Tableau S4-2. Paramètres physico-chimiques, concentrations en THg et %MeHg dans l'eau, les particules et les sédiments de la Seine et de la Deûle sur la période d'encagement en hiver (9 au 31 janvier 2024). X : pas de donnée. - 179 -
Tableau S4-3. Activité des CAT, GST et SOD et LOOH dans les tissus de *D. polymorpha* exposée 3 semaines dans SAM, SAV, DAM et DAV en hiver (n = 3 à 6, p < 0.05). - 180 -
Tableau S4-4. VIP score des métabolites dans les tissus entiers de *D. polymorpha* exposée 3 semaines en hiver en amont (SAM) et en aval (SAV) de la Seine ou en amont (DAM) et en aval (DAV) de la Deûle (n = 4 à 5). Les métabolites dont les VIP score sont supérieurs à 1 sont indiqués en gras. - 181 -

Tableau S4-5. Paramètres physico-chimiques, concentrations en THg et %MeHg dans l'eau, les particules et les sédiments de la Seine et de la Deûle sur la période d'encagement en été (5 au 27 juin 2024). X : pas de donnée. ..... - 182 -
Tableau S4-6. Activité des CAT, GST et SOD et LOOH dans les tissus de *D. polymorpha* exposée 3 semaines dans SAM, SAV, DAM et DAV en été (n = 3 à 6, p < 0.05). ..... - 183 -
Tableau S4-7. VIP score des métabolites dans les tissus entiers de *D. polymorpha* exposée 3 semaines en été en amont (SAM) et en aval (SAV) de la Seine ou en amont (DAM) et en aval (DAV) de la Deûle (n = 4 à 5). Les métabolites dont les VIP score sont supérieurs à 1 sont indiqués en gras. ..... - 184 -

LISTE DES ABREVIATIONS

ACP/PCA : analyses en composantes principales
AMA : Analyseur Automatique de Mercure
ampk : amp kinase sub-unit α
aox : alternative oxidase
ATP : adénosine triphosphate
atp : atp synthase
BAF : facteur de bioaccumulation
BMF : facteur de biomagnification
CAT : catalase
COD : Carbone Organique Dissous
cox : cytochrome c oxidase A
cs : citrate synthase
Ctrl : contrôle
d.w. : poids sec
DAM : Deûle amont
DAM : métabolite différentiellement abondant
DAP : protéine différentiellement abondante
DAV : Deûle aval
DCE : Directive Cadre sur l'Eau
DEG : gène différentiellement exprimé
DMHg : diméthylmercure
DOM : matière organique dissoute
DTC : temps passé à l'état fermé
EDTA : Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EQS/NQE : Norme de Qualité Environnementale
FR : filtration rate
GC-CV-AFS : chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de fluorescence atomique
GC-ICP-MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à plasma inductif
GST : glutathione-S-transférase
HCl : acide chlorhydrique
HFNI : Valvométrie Haute Fréquence Non Invasive
Hg : Mercure
Hg^0 : gaz élémentaire mercure
Hg^I : formes ioniques monovalentes du mercure
Hg^{II} : formes ioniques divalentes du mercure
HNO_3 : acide nitrique
IHg : Mercure inorganique
IHg_d : mercure inorganique dissout
IHg_p : mercure inorganique particulaire
KEGG : Kyoto encyclopedia of genes and genomes
LD : limite de détection
ldh : lactate déshydrogénase
LDH : lactate déshydrogénase
LOOH : hydroperoxyde de lipides
MeHg : méthylmercure
$MeHg_d$: méthylmercure dissout
$MeHg_p$: méthylmercure particulaire
MES : matières en suspension
MS/MS : spectrométrie de masse en tandem
MT : métallothionéine
PLS-DA : partial least squares discriminant analysis
PS3 : protéine ribosomale S3
qPCR : réaction de polymérisation en chaîne quantitative
ROS : espèces réactives de l'oxygène
RT : transcriptase inverse
SAM : Seine amont
SAV : Seine aval
SD : écart-type
SIAAP : Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne
SiO_2 : dioxyde de silicium
SOD : superoxyde dismutase
T : nombre de transitions entre l'état ouvert et l'état fermé.
THg : Mercure Total (IHg + MeHg)
THg_d : mercure total dissout
THg_p : mercure total particulaire
TMAH : TetraMethylAmmonium Hydroxide
VB : nombre de mouvements valvaires
w.w. : poids frais

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. Le mercure (Hg) : sources, cycle et formes

Le mercure (Hg) est un métal naturellement présent dans la croûte terrestre et émis épisodiquement lors d'activité géothermique tels que les éruptions volcaniques ou l'altération ubiquitaire des roches. La principale source actuelle d'émission du Hg provient de son utilisation pour des activités anthropiques, augmentant ainsi de 300 à 500 % les concentrations de Hg dans l'atmosphère au cours du siècle dernier (UNEP, 2013). Depuis l'ère industrielle, le Hg est émis par l'extraction artisanale et à petite échelle de l'or, la combustion du charbon, la production de métaux non ferreux, la production de ciment et l'élimination des déchets contenant du Hg (UNEP, 2013, 2019). Le Hg était également utilisé dans la production de chlore et de soude caustique, comme catalyseur dans la production de chlorure de vinyle monomère, amalgames dentaires, pesticides et produits pharmaceutiques (Sivaramakrishna & Radhakrishnaiah, 2000; UNEP, 2013). Ces sources anthropiques d'émission du Hg représentent environ 30% de la quantité totale de Hg entrant dans l'atmosphère (UNEP, 2013). En 2015, l'inventaire mondial des émissions de Hg dans l'atmosphère était estimé à 7400 dont 30% sont issues des activités anthropiques, 60 % résultent de processus environnementaux, notamment le recyclage du Hg anthropique précédemment déposé sur les sols et dans l'eau et 10 % proviennent de sources naturelles actuelles telles que l'activité volcanique (UNEP, 2019). Une fois dans l'atmosphère, Hg peut y résider jusqu'à 12 mois pouvant ainsi être transporté facilement sur de longues distances (Schroeder & Munthe, 1998).

Le cycle biogéochimique du Hg aujourd'hui connu et décrit est le suivant : le Hg est relargué sous forme de gaz élémentaire (Hg^0) dans l'atmosphère, qui au contact de l'air, s'oxyde en deux formes ioniques monovalentes (Hg^I) et divalentes (Hg^{II}) (Horowitz et al., 2017). Les environnements aquatiques sont contaminés par des dépôts secs et humides de Hg inorganique (IHg) en provenance de l'atmosphère (Figure 0-1). Ces dépôts s'accumulent notamment dans les sédiments, qui jouent un rôle central dans le cycle du Hg en constituant un réservoir majeur de IHg. L'IHg peut être transformé en formes organiques du Hg, notamment le mono-méthylmercure (MeHg, CH_3Hg^+) par bioconversion microbienne, et le di-méthylmercure (DMHg, $[CH_3]_2Hg$) par des mécanismes abiotiques encore mal caractérisés. Plus précisément, le MeHg est principalement produit dans les sédiments et dans des microenvironnements suboxiques (Driscoll et al. 2013 ; Yu et al. 2018) par des micro-organismes portant le gène hgcA (Parks et al., 2013), tels que les bactéries sulfato-réductrices ou encore les bactéries méthanogènes (Yu et al., 2018). Dans la colonne d'eau, Hg^0 représente généralement moins de 30% du Hg total (THg = IHg + MeHg + Hg^0), tandis que le MeHg représente en moyenne moins de 1% du Hg total (Bravo et al., 2014a). Dans les sédiments, l'IHg domine également le THg, le MeHg étant présent en faibles proportions.

Dans les eaux douces, y compris les lacs, les activités anthropiques historiques ou en cours, ont laissé des concentrations en Hg encore mesurables. Par exemple, la rivière Deûle, dans le nord de la France, contaminée par une ancienne fonderie de plomb et de zinc, présente des concentrations en THg dans les eaux de surface allant de 8 à 21 ng/L et dans les sédiments de 9,9 ± 2,2 µg/g avec une proportion de MeHg de 0,021 % (Daye et al., 2015). Dans l'estuaire de la Seine, une zone impactée par de nombreuses pressions urbaines et industrielles, les concentrations en THg dans les eaux de surface varient de 1 à 5 ng/L (Nakhlé et al., 2007) et dans les sédiments de 0.3 et 1.5 µg/g avec des proportions de MeHg allant de 0.6 à 3 % de MeHg (Ouddane et al., 2008). A l'international, on observe également des contaminations importantes,

comme dans les sédiments du réservoir de Babeni de la rivière Olt en Roumanie, où les concentrations atteignaient 8 ng/L et 21 µg/g en aval d'une usine de chlore et de soude caustique (Bravo et al., 2010). La compréhension fine du cycle du Hg, de ses sources à sa biotransformation en MeHg, est essentielle pour évaluer son impact environnemental. La persistance du Hg dans les milieux aquatiques, même des décennies après l'arrêt des émissions, souligne l'importance de surveiller les compartiments sensibles.

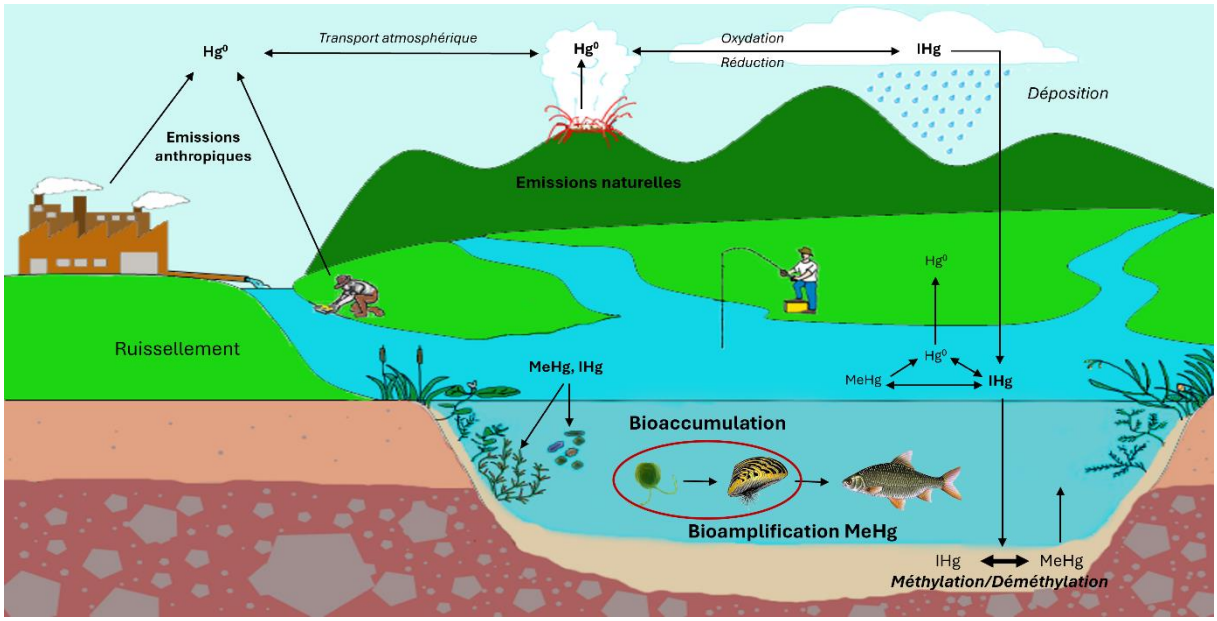

Figure 0-1. Cycle biogéochimique simplifié du Hg dans les milieux aquatiques, adapté de Dranguet et al., 2014. Le cercle rouge désigne le niveau trophique étudié dans cette thèse.

2. Transfert trophique, biodisponibilité et bioaccumulation du Hg dans les écosystèmes aquatiques

Le transfert trophique du Hg a été mis en évidence avec la découverte de la Maladie de Minamata au Japon en 1956 causée par l'ingestion de poissons contaminés au MeHg rejeté dans la baie via les eaux usées d'une usine chimique (Harada, 1995). Cette tragédie a conduit à de nombreuses études sur les concentrations en Hg dans les produits de la mer et les risques associés à leur consommation (Burger et Gochfeld 2007 ; Groth 2010 ; Storelli et al. 2010). Elle a également suscité un intérêt croissant pour la compréhension du transfert trophique du Hg dans les réseaux aquatiques. Les organismes aquatiques ont été classés en quatre niveaux trophiques (Suedel et al., 1994) :

- Niveau 0 : producteurs primaires ;
- Niveau 1 : consommateurs primaires ;
- Niveau 2 : consommateurs secondaires ;
- Niveau 3 : consommateurs tertiaires.

Bien que simplifiée, cette classification a permis d'évaluer les dynamiques de transfert du Hg. Ainsi, dans la baie de Jiaozhou (Chine), des organismes de différents niveaux ont été collectés pour mesurer le transfert et la bioaccumulation du Hg. Les poissons présentaient les concentrations les plus élevées, suivis des crustacés, puis des mollusques, et le MeHg y était bien plus bioaccumulé et biomagnifié que IHg, soulignant son comportement distinct dans la chaîne alimentaire (Mao et al., 2021). Néanmoins, contrairement à une vision linéaire du transfert

trophique, les réseaux alimentaires aquatiques présentent une structure complexe, influencée par la diversité des espèces, leurs interactions et les dynamiques locales, entraînant une variabilité marquée de la bioaccumulation du Hg selon les habitats, les saisons et les conditions environnementales. La contamination du biote est influencée par la concentration de Hg dans le milieu, notamment via les apports atmosphériques ou les sources locales (Hammerschmidt & Fitzgerald, 2006; Paterson et al., 2006). Cependant, la capacité du Hg à s'accumuler chez les organismes dépend largement de sa biodisponibilité, soit la proportion d'un contaminant qui atteint l'organisme sous sa forme initiale et peut exercer un effet dans l'organisme. Elle conditionne directement son absorption et son effet toxicologique. La bioconcentration correspond à l'accumulation d'un contaminant dans les tissus d'un organisme par contact direct avec le milieu abiotique, tandis que l'absorption par voie alimentaire est le résultat de l'ingestion de proie et/ou de particules contaminées (Ali & Khan, 2019). Ces deux voies contribuent à la bioaccumulation, c'est-à-dire l'accumulation progressive d'un contaminant à partir de l'environnement et de l'alimentation (Macek et al. 1979 ; Ali et Khan 2019). Enfin, la bioamplification se manifeste par une augmentation progressive de la concentration du contaminant à mesure de la progression dans le réseau trophique (Ali & Khan, 2019).

Dans le contexte du cycle biogéochimique du Hg, le MeHg représente une forme cruciale en raison de sa capacité à traverser les membranes biologiques et de sa bioamplification dans les réseaux trophiques (Wang et Wong 2003; Lavoie et al. 2013). En effet, bien que l'IHg soit la forme majoritaire dans le milieu aquatique, le MeHg peut représenter jusqu'à 100% du THg chez les poissons situés aux plus hauts niveaux trophiques et environ 50% chez les bivalves, en raison de sa capacité de bioamplification (Bravo et al., 2014; Briant et al., 2017). Parmi les métaux, le MeHg est celui qui se bioamplifie le plus efficacement, en raison de sa forte assimilation et de sa lente élimination par les organismes (Mason et al. 1996 ; Reinfelder et al. 1998). Le MeHg est à la fois bioconcentré, bioaccumulé et bioamplifié le long des réseaux trophiques (Scheuhammer et al., 2007). Cela représente un risque non seulement pour les organismes aquatiques, mais également pour la santé humaine via la consommation de poissons (Clarkson et al. 2003 ; Sheehan et al. 2014). Dans le cadre des normes internationales de sécurité alimentaire établies par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), la teneur maximale indicative en THg dans les poissons non prédateurs destinés à la consommation humaine est fixée à 0,5 mg/kg de poids humide, tandis que pour les poissons prédateurs cette valeur est de 1,0 mg/kg (Codex Alimentarius Commission OMS/FAO, 1995).

Les mesures de bioaccumulation du Hg dans la faune et la flore sont principalement basées sur la quantification du THg et MeHg. Des facteurs de bioaccumulation (BAF) sont calculés à partir des concentrations en Hg dans la source, telles que l'eau ou le biote. Les plus fortes augmentations de MeHg se rencontrent à la base du réseau alimentaire, conditionnant ainsi les concentrations de Hg des niveaux trophiques supérieurs (Rolfhus et al. 2011 ; Cardoso et al. 2012 ; Mathews et Fisher 2008). Ainsi, pour le MeHg, il a été observé un BAF de $5x10^5$ pour les producteurs primaires, et jusqu'à 10^7 pour les prédateurs supérieurs dans le réservoir de Babeni, alors que le IHg montrait un BAF entre 10^4 et 10^5 (Bravo et al., 2014a). Le MeHg présente généralement un degré élevé de bioaccumulation, notamment chez les poissons prédateurs, avec des concentrations plusieurs millions de fois plus élevées que dans les eaux de surface (Lindqvist et al. 1991 ; McMeans et al. 2015 ; Wiener 2013). Cette accumulation progressive du MeHg, d'un niveau trophique à l'autre, est principalement liée à l'alimentation, identifiée comme

la voie majeure d'exposition au MeHg chez les animaux (Bravo et al., 2014a; Wiener, 2013). Cependant, la bioaccumulation du Hg varie selon plusieurs paramètres physiologiques : l'espèce, l'âge, la taille, le tissu étudié ou encore les mécanismes de détoxication mis en place par l'organisme (Ray, 1986). Elle est également influencée par des facteurs écologiques et environnementaux l'habitat (benthique vs pélagique), le pH, la température, la matière organique dissoute (DOM) et le taux d'oxygène. Dans les eaux douces, IHg tend à se complexer à la DOM, aux particules et ions présents, diminuant la biodisponibilité du Hg pour les organismes aquatiques (Chiasson-Gould et al., 2014). En résumé, le MeHg est facilement absorbé par voie alimentaire, traverse les membranes biologiques et s'accumule efficacement dans les tissus, tandis que l'IHg est moins biodisponible, plus facilement complexé dans l'environnement et moins assimilable par les organismes. Toutefois, la biodisponibilité du Hg demeure encore difficile à estimer précisément à l'aide des modèles actuels, en raison de la complexité de ses interactions physico-chimiques dans l'environnement. Dans ce contexte, les isotopes stables enrichis du Hg constituent un nouvel outil puissant pour tracer précisément le transfert et la biotransformation du Hg dans le biote. En permettant de différencier les sources de Hg et de suivre sa bioaccumulation, ils offrent une sensibilité et une spécificité accrues, même à de faibles concentrations environnementales. Leur utilisation facilite ainsi une meilleure compréhension des mécanismes de transfert du Hg par la voie alimentaire et des effets biologiques associés (Feng et al., 2015 ; Gentès et al., 2015 ; Kwon et al., 2013).

Dans le cadre de la Directive-Cadre sur l'Eau (DCE), des Normes de Qualité Environnementale (NQE) ont été établies pour le Hg afin de protéger les écosystèmes aquatiques et la santé humaine. Pour l'eau et le biote, la NQE pour le THg est fixée à 70 ng/L et 20 ng/g poids humide (ww ; 2008/105/CE du 16 décembre 2008). Ces valeurs servent de référence pour évaluer les niveaux de contamination observés dans l'eau et les tissus des organismes aquatiques. À noter qu'aucune NQE n'a été établie pour les sédiments dans le cadre de la DCE, bien que ce compartiment constitue un réservoir important et persistant de contamination au Hg. Néanmoins, la Convention de Minamata sur le Hg, adoptée en 2013, souligne l'importance de limiter les formes les plus toxiques du Hg, notamment le MeHg, représentant la forme la plus préoccupante en raison de sa forte affinité pour les tissus biologiques et de sa capacité à se bioamplifier. Les données compilées par l'INERIS (Tableau 0-1) montrent que les concentrations mesurées de THg et MeHg dans le biote dépassent la NQE, illustrant un risque potentiel pour les organismes aquatiques.

Tableau 0-1. Concentrations de THg et MeHg dans l'eau (ng/L) et dans le biote (ng/g, poids frais) extraites de la fiche de données toxicologiques et environnementale de l'INERIS (2010).

Forme de Hg	Milieu	Concentration
Eau		
THg	Eaux souterraines	0,5 à 15
	Lacs	0,5 à 12
	Rivières	0,01 à 6
	Mers	0,05 à 3
MeHg	Lacs	0,04 à 8
	Eaux pluviales	< 0,5 à 0,5
Biote		
THg	Poissons d'eau douce	200 à 7 000
	Poissons d'eau de mer	10 à 1500
	Thon, espadon	300 à 7 000
	Coquillages, crustacés	10 à 1 000

Dans ce contexte réglementaire, plusieurs études ont mis en évidence des concentrations de THg dépassant largement la NQE pour le biote chez des poissons provenant de rivières européennes, bien que la NQE pour l'eau soit respectée. Par exemple, des concentrations entre 0,02 et 0,43 µg/g ont été mesurées dans la Seine (Azimi & Rocher, 2016), entre 0,07 et 0,32 µg/g dans le Rhône (Babut et al., 2011), entre 0,10 et 0,25 µg/g dans le Rhin (CIPR, 2011). En plus des poissons, plusieurs études ont également été menées sur des bivalves, organismes filtreurs reconnus comme espèce sentinelle en raison de leur sédentarité et de leur capacité à accumuler les polluants. Les mesures de concentration sont généralement réalisées pour le THg et sur les tissus entiers des individus dans le cadre d'une biosurveillance passive, qui repose sur l'analyse d'individus prélevés dans leur environnement naturel. Des concentrations élevées ont été mesurées dans les tissus de *Dreissena Polymorpha* collectés dans le fleuve Ebre (Espagne) allant de 200 à 8100 ng/g de poids frais (Carrasco et al. 2008) et chez *Dreissena sp*. dans la rivière Olt (Roumanie) avec des niveaux de 160 et 6810 ng/g de poids sec (d.w.), équivalent 15 à 681 ng/g de poids humide avec 90% de contenu en eau (Vasile et al., 2019). Bien que cette approche reflète fidèlement les niveaux d'exposition chronique aux contaminants dans un environnement, elle peut être biaisée par des facteurs biologiques tels que l'âge, la taille ou l'état de reproduction des individus, ce qui complique leur interprétation (Tsangaris et al., 2011).

Pour pallier ces limites, la biosurveillance active est de plus en plus utilisée. Elle consiste à encager des organismes provenant de sites de référence peu ou non contaminés, dans des zones ciblées. Cette méthode permet une meilleure standardisation des conditions expérimentales et un meilleur contrôle des facteurs confondants, fournissant des résultats robustes et reproductibles (Besse et al., 2012). Des études ont ainsi évalué les concentrations en Hg chez des bivalves encagés : entre 0. 1 et 140 ng/g de poids sec chez *D. polymorpha* exposée 1 mois dans l'estuaire de la Neva (mer Baltique, Berezina et al. 2023), 100 ng/g de poids sec chez *Corbicula fluminea* exposée 1 mois à South River (Virginie, USA, Neufeld 2010), 127 ± 0.10 ng/g de poids sec chez *Scrobicularia plana* exposée 25 jours dans la Baie de Laranjo (Ria de Aveiro, Portugal, Cardoso et al. 2015) ou encore 90 ± 10 ng/g de poids sec chez *Unio pictorum* exposé 4 semaines dans la Rivière Cecina (Toscane, Italie, Guidi et al. 2010). Ainsi, les données issues de la biosurveillance confirment l'importance de la bioaccumulation du Hg dans les organismes aquatiques, et l'utilité des approches basées sur le biote pour évaluer les risques environnementaux associés au Hg. Néanmoins, les effets toxiques potentiels de ces concentrations en Hg ne sont pas connus.

3. Effets du Hg dans les écosystèmes aquatiques

L'IHg et le MeHg sont reconnus pour leurs effets délétères sur la santé humaine, notamment sur les fœtus et les enfants (Grandjean et al. 1997 ; Morrissette et al. 2004) et sur le développement et le système nerveux (Järup, 2003). Chez les vertébrés et les invertébrés, plusieurs études ont mis en évidence des perturbations physiologiques, comportementales et moléculaires telles qu'une inhibition de la croissance et de l'alimentation, une réduction de la survie embryonnaire, des anomalies de développement, des troubles de la locomotion ou encore une baisse de la capacité à capturer des proies actives (revue dans Yang et al. 2020). La toxicité du Hg se fait notamment au niveau cellulaire en se fixant aux groupements thiols des protéines, ce qui perturbe les fonctions enzymatiques et provoque un stress oxydatif (Carvalho et al., 2008). De plus, le MeHg est connu pour s'accumuler dans les mitochondries, où il peut perturber la

chaine de transport des électrons générant la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), et induire la peroxydation lipidique (Königsberg et al., 2001).

Le stress oxydatif est souvent évalué par la modulation des activités des enzymes antioxydantes telles que les catalases (CAT), superoxydes dismutases (SOD) ainsi que par la réponse de protéines impliquées dans la détoxication et la protection cellulaire, telles que les métallothionéines (MT) et les glutathion-S-transférases (GST). Une augmentation de l'activité de ces enzymes est souvent interprétée comme une réponse de défense de l'organisme face à la production de ROS induite par le Hg, voire au stress oxydatif causé par ces ROS. Chez la carpe *Cyprinus carpio*, l'activité des SOD et une péroxydation lipidique ont été mesurées après 96h d'exposition à 10 µg/L d'IHg (García-Medina et al., 2017). Chez la daurade royale (*Sparus aurata*) exposé à 10 µg/L de MeHg pendant 30 jours, une augmentation de l'activité des SOD et CAT dans le foie a été mesurée après seulement 2 jours d'exposition et des dommages histologiques ont été relevés sur la peau et le foie (Guardiola et al., 2016). Chez la palourde *Corbicula fluminea*, les activités des CAT et GST sont ainsi augmentées après 8 jours d'exposition à 30 µg d'IHg/L (Oliveira et al., 2018). De même, chez *D. polymorpha*, une exposition au MeHg de 7 jours à 280 ng/L a induit une augmentation de l'activité des SOD (Baratange et al., 2022). Chez le poisson *Pelteobagrus fulvidraco*, une exposition de 6 semaines à 2 et 10 µg/L de IHg a provoqué des modulations dans l'activité des enzymes antioxydantes ainsi que l'expression des gènes liés au stress oxydatif, suggérant une réponse au stress oxydatif induit (Sun et al., 2018). Par ailleurs, cette exposition a également entrainé des lésions histologiques et de l'immunotoxicité dans la rate et le foie. Des effets similaires sur le système immunitaire ont été observés chez *Mytilus edulis* après des expositions chroniques et aigues à des concentrations allant de 10^{-3} à 10^{-9} M. Ces expositions ont conduit à une inhibition des fonctions phagocytaires, suggérant un effet immunotoxique (Duchemin et al., 2008). Cependant, ce sont des concentrations expérimentales fortement supérieures aux niveaux environnementaux marins (de 0,0005 à 27 µg/L; Gworek et al., 2016).

Des effets sur le comportement des bivalves en présence de Hg ont également été mis en évidence, notamment sur le taux de filtration. Celui-ci est diminué chez *C. fluminea*, exposé 8 jours à 30 µg IHg/L (Oliveira et al. 2018), de même chez le bivalve *Ruditapes philippinarum* exposé 4 jours à 10 µg/L de IHg (Sıkdokur et al., 2020). Une exposition de *Bathymodiolus azoricus* pendant 21 jours à 20 µg/L de IHg a entrainé une augmentation significative de la durée d'ouverture des valves, suggérant un effet inhibiteur du Hg sur le muscle adducteur, responsable de la fermeture des valves (Kádár et al., 2005). A notre connaissance, aucune étude sur les effets du MeHg sur le comportement n'est disponible.

Enfin, à l'échelle moléculaire, le Hg perturbe des processus biologiques clés. Chez *Dreissena polymorpha* exposée 7 jours à des concentrations allant de 0,2 à 0,5 µg/L de MeHg, plusieurs protéines impliquées dans le développement du cytosquelette, le métabolisme énergétique et celui des acides aminés sont altérées (Baratange et al. 2022 ; 2023). Une étude de transcriptomique menée chez la morue d'Atlantique (*Gadus morhua*) exposée pendant 14 jours à 0,5 et 2 mg/kg de poids corporel de MeHg a révélé une altération des voies métaboliques liées au métabolisme énergétique, à la réponse au stress oxydatif, à la réponse immunitaire et au remodelage du cytosquelette (Yadetie et al., 2013).

L'exposition au Hg par voie alimentaire, tout comme l'exposition par l'eau, peut provoquer des effets toxiques chez les organismes aquatiques tels que du stress oxydatif, des lésions

cérébrales et des altérations comportementales, comme observé chez le saumon atlantique *Salmo salar* (Berntssen et al., 2003). Elle peut également induire des modifications du protéome chez le consommateur, comme chez le gammare *Gammarus fossarum* via l'ingestion de *Elodea nuttallii* contaminées au MeHg (Cosio et al., 2021). L'exposition par voie alimentaire au MeHg peut également entrainer la suppression du développement gonadique, de la production d'œufs et du comportement de fraie chez les jeunes têtes-de-boule *Pimephales promelas* (Sandheinrich & Miller, 2006). Chez le poisson zèbre *Danio rerio*, l'exposition par voie alimentaire a entrainé l'expression différentielle de 18 gènes liés à la défense, au stress oxydatif, à l'apoptose, à la signalisation du système nerveux et au métabolisme mitochondrial, avec des voies métaboliques distinctes pour IHg et MeHg (Gentès et al., 2015). Cependant, peu d'études ont été menées sur le transfert trophique du MeHg à concentration réaliste, notamment chez les consommateurs primaires de bas niveau trophique, tels que les bivalves.

En résumé, le Hg cause une large gamme d'effets toxiques chez les organismes aquatiques, affectant leur physiologie, leur comportement, leur système immunitaire ainsi que leur intégrité cellulaire et moléculaire. Alors que de nombreuses études se sont concentrées sur l'exposition à IHg via l'eau, souvent à des concentrations bien supérieures à celles observées en milieu naturel, d'autres mettent en évidence des effets tout aussi préoccupants liés à l'exposition par voie alimentaire, notamment pour le MeHg. Cette voie d'exposition, plus représentative de la réalité écologique, peut provoquer des effets. Ces données, bien que parfois issues de conditions expérimentales peu représentatives, soulignent le potentiel écotoxique du Hg, en particulier du MeHg, et justifient la nécessité de mieux caractériser ses effets à des concentrations environnementales réalistes, notamment en tenant compte du transfert trophique au sein des réseaux aquatiques. L'intégration des approches omiques pourrait ainsi s'avérer déterminante pour comprendre les mécanismes d'action du Hg à basse concentration et identifier de nouveaux biomarqueurs de contamination. Les outils classiques, centrés principalement sur des marqueurs physiologiques ou enzymatiques au niveau de l'organisme, montrent en effet leurs limites pour détecter des effets subtils ou précoces à des concentrations environnementales réalistes, alors que la persistance du Hg dans les écosystèmes aquatiques en fait une menace constante pour le biote. Ces dernières années, le développement d'approches omiques (transcriptomique, protéomique, métabolomique) offre de nouvelles perspectives pour explorer finement les réponses biologiques aux faibles doses de contaminants. Ces outils permettent de détecter des altérations précoces et subtiles des fonctions moléculaires, même en l'absence d'effets visibles à l'échelle physiologique ou comportementale. Leur sensibilité et leur puissance exploratoire sont particulièrement adaptées à l'étude des effets du MeHg à des concentrations environnementales faibles, souvent difficilement mesurables par les approches classiques.

4. Organismes d'études

4.1. Rôle des microalgues dans le transfert trophique du Hg : focus sur *Chlorella vulgaris* et *Cyclotella meneghiniana*

Les producteurs primaires soutiennent les écosystèmes par la production de biomasse et jouent un rôle écologique majeur dans les écosystèmes d'eau douce en tant que source de nourriture pour les niveaux élevés de la chaîne trophique, et dans le cycle des nutriments. En accumulant le Hg depuis la colonne d'eau, le phytoplancton influence directement son cycle

biogéochimique en modulant sa concentration et altérant sa spéciation (Le Faucheur et al. 2014 ; Cossart et al. 2022). Dans les eaux de surface, le phytoplancton est exposé à différentes formes de Hg : Hg élémentaire (Hg^0), Hg monovalent (Hg^I), instable dans des conditions environnementales naturelles, et Hg divalent (Hg^{II}), présent sous forme inorganique (IHg, Hg^{2+}) et organique (MeHg, CH_3Hg^+). Ces formes sont davantage distribuées entre la fraction particulaire (>0,45 mm) et la fraction dissoute (<0,45 mm), définies opérationnellement, et leur spéciation exacte dépend fortement de la composition chimique du milieu.

La bioaccumulation du Hg par le phytoplancton dépend fortement de sa forme, de l'espèce et de sa densité cellulaire. En effet, la biodisponibilité des métaux par voie trophique dépend de la nature de la liaison métal/phytoplancton (Metian et al., 2009). Les membranes algales, constituées de bicouches lipidiques hydrophobes limitent l'entrée des molécules chargées et polaires. Les microalgues possèdent donc un grand ensemble de protéines de transport intégrées dans leur membrane permettant l'entrée des métaux essentiels dans leurs cellules (Hanikenne et al., 2009). Les mécanismes d'absorption du Hg par le phytoplancton restent encore largement méconnus, tout comme leur cinétique. Les données disponibles suggèrent plusieurs voies : diffusion passive de complexes non chargés (Bienvenue et al., 1984; Kim et al., 2024; Mason et al., 1996), diffusion facilitée (Bienvenue et al., 1984; Boudou et al., 1991; Gutknecht, 1981; Le Faucheur et al., 2011), et éventuellement transport actif (Miles et al., 2001 ; Moye et al., 2002 ; Pickhardt et Fisher, 2007). Chez les diatomées et chlorophycées, la diffusion passive du MeHg semble la voie privilégiée, en raison du fort rapport surface/volume de leurs cellules, tandis que chez le dinoflagellé *Prorocentrum minimum*, un mécanisme actif a été suggéré (Lee et Fisher, 2016). Par ailleurs, des études sur modèles animaux et cellulaires ont montré que l'IHg et le MeHg exploitent le mimétisme moléculaire et ionique pour pénétrer dans les cellules (Bridges & Zalups, 2005, 2017). Les complexes Hg-thiol comme le glutathion (GSH, glutamate-cystéine-glycine), très stables, imitent des acides aminés essentiels ou des dipeptides, leur permettant d'utiliser des transporteurs membranaires normalement dédiés à ces nutriments, comme les systèmes OAT (Organic Anion Transporters). Chez certaines bactéries, l'IHg est transporté activement par des protéines codées par l'opéron *mer*, comme MerT (Sone et al., 2013), facilitant son absorption avant réduction et détoxication. Ce mécanisme illustre une stratégie biologique d'entrée sélective du Hg et suggère que des transporteurs spécifiques pourraient jouer un rôle similaire chez le phytoplancton (Beauvais-Flück et al., 2016). Chez le phytoplancton, il est probable que l'absorption du Hg implique des transporteurs de métaux essentiels ou de leurs conjugués organiques (Beauvais-Flück et al., 2016). Néanmoins, à ce jour, aucun transporteur prenant en charge le Hg^{II} n'a encore été identifié précisément pour le phytoplancton.

Le transfert du Hg depuis le phytoplancton vers le consommateur peut être affecté par sa localisation cellulaire. En effet, plusieurs travaux suggèrent que la composition des parois cellulaires des producteurs primaires pourrait influencer le transfert du Hg. Chez les diatomées, par exemple, il a été démontré que seul le MeHg présent dans le compartiment intracellulaire était efficacement transféré aux copépodes, tandis que le Hg lié aux frustules siliceux des parois cellulaires était non assimilé (Mason et al., 1996). A l'inverse, chez le macrophyte *Elodea nuttallii*, dont les parois cellulaires sont principalement constituées de cellulose, d'hémicellulose et de pectine, le Hg associé à la paroi s'est révélé plus transférable vers les gammares que le Hg intracellulaire (Beauvais-Flück et al., 2016). De plus, des expériences menées sur des

chironomes nourris avec des macrophytes ont montré que le MeHg, qu'il soit localisé dans la paroi ou dans le cytoplasme, était davantage transféré vers le chironome que l'IHg (Beauvais-Flück et al., 2017). Ces différences pourraient être liées à la spéciation du Hg, propre à la composition cellulaire de chaque microalgue, qui influence sa toxicité, sa biodisponibilité, ainsi que son devenir métabolique chez le consommateur après ingestion. La connaissance de l'interaction entre le MeHg et les organismes de bas niveau trophique est essentielle et fournit des informations clés sur le contrôle et la prévention de l'exposition au MeHg le long du réseau trophique. C'est dans ce contexte que nous avons sélectionné deux grandes familles de phytoplancton d'eau douce représentant deux types de morpho-physiologie contrastés : les microalgues vertes et les diatomées. Afin de les représenter, deux espèces ont été choisies : *Chlorella vulgaris* (Chlorelles), une microalgue verte et *Cyclotalla meneghiniana* (Diatomées), une diatomée (Figure 0-2).

C. vulgaris est une algue sphérique microscopique (2 à 10µm) évoluant dans l'eau douce (Safi et al., 2014) et identifiée dans les lacs où vivent communément les moules zébrées (Ma et al., 1999). Elle est utilisée pour nourrir *Dreissena polymorpha* en laboratoire (Juhel et al. 2006 ; Zhong et al. 2013) et a permis de caractériser sa filtration (Kryger & Riisgård, 1988). Sa paroi est une matrice composée de pectine et de 4 celluloses garnis de polysaccharides et de glycoprotéines (Gerken et al., 2013). *C. meneghiniana* est une algue centrique unicellulaire microscopique (6 à 18 µm) largement répandue dans les habitats d'eau douce (Wehr et al., 2015). Sa paroi cellulaire est composée de dioxyde de silicium (SiO_2), appelée frustule (Hildebrand et al., 2018). Son implication dans le transfert trophique du MeHg a été montrée dans une étude expérimentale portant sur la chaîne trophique phytoplancton (*Chlamydomonas reinhardtii* et *C. meneghiniana*) vers le zooplancton (*Daphnia pulex*) vers le poisson (*Fundulus heteroclitus*). Les résultats ont révélé un facteur de transfert trophique nettement supérieur entre le phytoplancton et le zooplancton comparé à celui entre le zooplancton et le poisson, soulignant le rôle clé du phytoplancton dans la voie alimentaire.

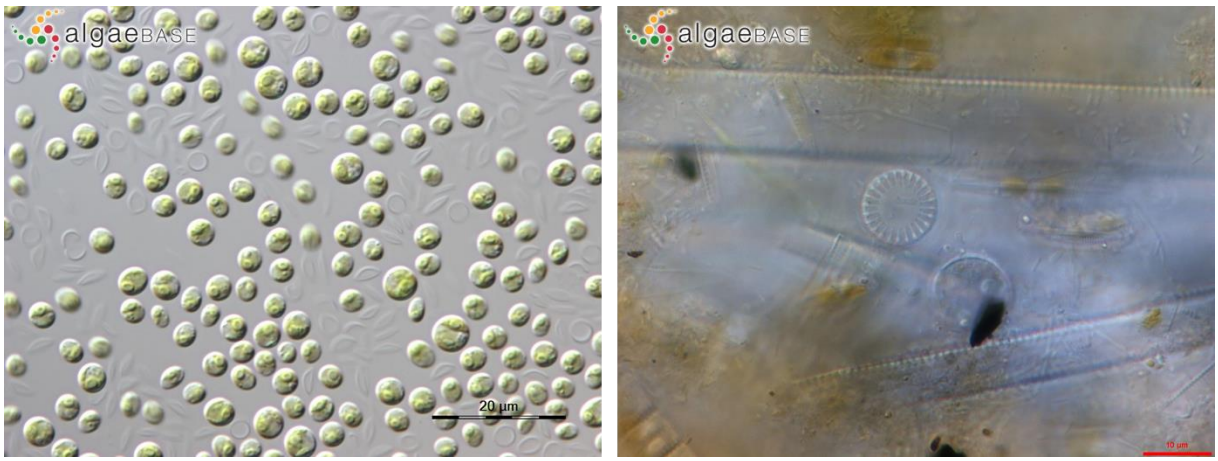

Figure 0-2. Photos de *Chlorella vulgaris* (à gauche) et *Cyclotella meneghiniana* (à droite). Photos extraites de www.algaebase.org (© Maike Lorenz, SAG et Karl Bruun).

L'analyse de ces deux espèces permettra d'évaluer comment la composition des parois cellulaires et les processus d'absorption influencent la biodisponibilité et le transfert du Hg vers les niveaux trophiques supérieurs. Cette connaissance est essentielle pour mieux comprendre les facteurs qui gouvernent la contamination des réseaux trophiques aquatiques par le Hg.

4.2. *Dreissena polymorpha* : un organisme filtreur clé dans la biosurveillance et le transfert trophique du Hg

Les mollusques bivalves ont la capacité d'accumuler des métaux traces à partir de leur nourriture, de l'eau mais aussi par l'ingestion de particules inorganiques (Phillips, 1977). *Dreissena polymorpha*, aussi appelée moule zébrée, est un bivalve classé parmi les 100 espèces exotiques les plus invasives au monde (Lowe, S et al., 2000, Figure 0-3). L'espèce est native des bassins de drainage des mers Noire, Caspienne et d'Azov et a rapidement colonisé l'Europe au 19ème siècle avec le transport fluvial (Hebert et al., 1989). La moule zébrée est aujourd'hui caractérisée par une forte abondance et une distribution étendue dans les systèmes aquatiques. Elle est consommée par au moins 58 espèces de poissons benthivores en Europe et en Amérique du Nord (Burlakova et al., 2022), plus de 38 espèces d'oiseaux (Molloy et al., 1997) mais également par le rat musqué (*Ondatra zibethicus*) et certaines espèces d'écrevisses. Elle tolère d'importants changements environnementaux (Ladeiro et al., 2017) et a une capacité de filtration allant de 5 à 400 ml/bivalve/h (Baldwin et al., 2002), lui permettant de rendre des services écosystémiques importants tels que la purification de l'eau, la réduction de la production de phytoplancton primaire ou encore la modification du cycle des nutriments, atténuant ainsi les effets de l'eutrophisation (Burlakova et al., 2022; Goedkoop et al., 2021). Ces services écosystémiques peuvent également alléger les coûts de traitement de l'eau potable. Grâce à sa grande capacité de filtration, *D. polymorpha* permettait aux usines de potabilisation d'économiser de 110 à 12 000 € par million de m^3 d'eau traitée dans plusieurs rivières néerlandaises (J. Wang et al., 2021). La moule zébrée est également une espèce utilisée comme organisme sentinelle pour l'évaluation et la biosurveillance des contaminants tels que les métaux (Kwan et al. 2003 ; Carrasco et al. 2008 ; Faria et al. 2009 ; Kocabaş et al. 2024), polluants organiques (Binelli et al., 2015) et pathogènes (Le Guernic et al. 2022 ; Géba et al. 2020 ; Palos Ladeiro et al. 2014).



Figure 0-3. Photo de *Dreissena polymorpha* en stabulation.

En résumé, la moule zébrée, est un filtreur efficace capable d'accumuler des contaminants, y compris le Hg, depuis ses sources environnementales et alimentaires. Grâce à sa large répartition, sa forte capacité de filtration, sa tolérance environnementale et son rôle de proie pour de nombreuses espèces, elle est un excellent modèle pour l'étude du transfert trophique et la biosurveillance des métaux. La place centrale de *D. polymorpha* dans les écosystèmes aquatiques tempérés en fait un indicateur pertinent pour évaluer l'exposition trophique au Hg.

Comprendre sa réponse physiologique et sa bioaccumulation face à différentes formes de Hg est fondamental pour mieux interpréter les risques écotoxicologiques liés à la contamination au Hg.

5. Objectifs, questions et hypothèses de la thèse

Le Hg est un contaminant environnemental majeur, reconnu pour sa toxicité et sa persistance dans les écosystèmes aquatiques. Sous ses formes IHg et MeHg, il peut s'accumuler dans les organismes vivants et se transférer tout au long des réseaux trophiques, avec des conséquences délétères sur la santé des organismes, y compris les humains. Parmi les organismes aquatiques, les bivalves filtreurs, tels que *Dreissena polymorpha* jouent un rôle clé en tant que consommateurs primaires, capables de concentrer les contaminants présents dans leur environnement et de le transférer aux niveaux trophiques supérieurs. Cependant, la compréhension du transfert trophique du Hg et de ses effets par la voie alimentaire, particulièrement à des concentrations proches de celles rencontrées en milieu naturel, reste encore partielle. La complexité des interactions biologiques et chimiques, ainsi que la diversité du phytoplancton qui constitue la base alimentaire de ces bivalves, soulignent la nécessité d'approches intégrées pour élucider les mécanismes de bioaccumulation et les réponses biologiques associées. Dans ce contexte, cette thèse s'inscrit dans une démarche visant à mieux caractériser le transfert et la toxicité du Hg par l'alimentation dans les milieux d'eau douce, en combinant des analyses biochimiques, moléculaires et omiques permettant de travailler à des concentrations plus réalistes. L'objectif est également de démontrer l'intérêt de *D. polymorpha* comme modèle représentatif de consommateur primaire dans une chaîne trophique simplifiée, afin de mieux appréhender les effets écotoxicologiques du Hg dans les écosystèmes aquatiques. Ce travail s'insère dans le projet ANR Mercur-Food et l'action 1.3.3 du programme de recherche MeSeine innovation portés par Claudia Cosio et a bénéficié de l'allocation de thèse DiMer par la Région Grand Est et l'école doctorale ABIES (Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé) de l'Université de Reims Champagne-Ardenne.

Cette étude vise à approfondir la compréhension du transfert du Hg par voie alimentaire, et répondre aux questions de recherche suivantes :

1) Quels sont la bioaccumulation et les effets biologiques du Hg par l'alimentation chez *D. polymorpha* ?
2) Comment la composition cellulaire du phytoplancton influence-t-elle la bioaccumulation du Hg chez *D. polymorpha* ?
3) Comment les différentes sources de pollution au Hg modulent-elles la bioaccumulation et les effets biologiques chez *D. polymorpha* ?

Sur la base de ces questions, nous avons émis les hypothèses suivantes, qui guideront les travaux expérimentaux de cette thèse :

1) *D. polymorpha*, en tant qu'organisme bivalve filtreur constitue une entrée pour le Hg dans les réseaux trophiques d'eau douce ;
2) La biodiversité du phytoplancton, et en particulier la composition de sa paroi, module la bioaccumulation du Hg chez *D. polymorpha* ;
3) Le Hg exerce un impact significatif sur les réponses biologiques chez *D. polymorpha* ;
4) L'exposition au MeHg par l'alimentation cause une bioaccumulation et des réponses biologiques plus fortes chez *D. polymorpha* qu'une exposition à l'IHg ;

Les questions 1 à 3 seront abordées dans les chapitres 1 à 3, menés au laboratoire en conditions contrôlées et simplifiées. Ces chapitres permettront d'étudier de manière approfondie la bioaccumulation et les effets biologiques du Hg, ainsi que l'influence de la composition cellulaire du phytoplancton sur ce processus, en utilisant des approches combinant biochimie, biologie moléculaire, outils omiques et isotopes stables enrichis du Hg. Le chapitre 4, quant à lui, portera sur la question 3 à travers une étude réalisée sur des sites naturels, afin d'évaluer la bioaccumulation du Hg et les réponses biologiques chez *D. polymorpha* dans un contexte environnemental réaliste. Cette combinaison d'approches expérimentales et en milieu naturel vise à mieux caractériser le transfert trophique du Hg et ses effets dans les écosystèmes d'eau douce.

L'ensemble des résultats a été présenté lors de conférences scientifiques, assurant ainsi leur diffusion et leur discussion au sein de la communauté. La première partie du chapitre 1 a donné lieu à une publication dans une revue scientifique à comité de lecture en 2025 et les autres chapitres sont en cours de finalisation en vue de publications complémentaires. Ce manuscrit adopte ainsi un format « sur article », garantissant la diffusion progressive et validée des travaux. Si ce choix entraîne certaines reprises inévitables entre introductions, celles-ci ont volontairement été synthétisées pour préserver la clarté et mettre en lumière les questions de recherche spécifiques à chaque partie. Enfin, une discussion générale a été développée afin d'intégrer l'ensemble des résultats et d'ouvrir des perspectives de recherche élargies.

6. Références

Ali, H., & Khan, E. (2019). Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs—Concepts and implications for wildlife and human health. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, 25(6), 1353-1376. https://doi.org/10.1080/10807039.2018.1469398

Azimi, S., & Rocher, V. (2016). Influence of the water quality improvement on fish population in the Seine River (Paris, France) over the 1990-2013 period. The Science of the Total Environment, 542(Pt A), 955-964. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.094

Babut, M., Roy, A., Lopes, C., & Pradelle, S. (2011). PCB and Persistent Contaminant Contamination of Freshwater Fish in the Rhône-Méditerranée Basin. https://policycommons.net/artifacts/15797533/pcb-and-other-persistent-compounds-contamination-of-freshwater-fish-in-the-rhone-mediterranee-basin/16688392/

Baldwin, B., Mayer, M., Dayton, J., Pau, N., Mendilla, J., Sullivan, M., Moore, A., Ma, A., & Mills, E. (2002). Comparative growth and feeding in zebra and quagga mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): Implications for North American lakes. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences - CAN J FISHERIES AQUAT SCI, 59, 680-694. https://doi.org/10.1139/f02-043

Baratange, C., Baali, H., Gaillet, V., Bonnard, I., Delahaut, L., Gaillard, J.-C., Grandjean, D., Sayen, S., Gallorini, A., Le Bris, N., Renault, D., Breider, F., Loizeau, J.-L., Armengaud, J., & Cosio, C. (2023). Bioaccumulation and molecular effects of carbamazepine and methylmercury co-exposure in males of *Dreissena polymorpha*. Science of The Total Environment, 897, 165379. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165379

Baratange, C., Paris-Palacios, S., Bonnard, I., Delahaut, L., Grandjean, D., Wortham, L., Sayen, S., Gallorini, A., Michel, J., Renault, D., Breider, F., Loizeau, J.-L., & Cosio, C. (2022). Metabolic, cellular and defense responses to single and co-exposure to carbamazepine and methylmercury in *Dreissena polymorpha*. Environmental Pollution, 300, 118933. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.118933

Beauvais-Flück, R., Chaumot, A., Gimbert, F., Quéau, H., Geffard, O., Slaveykova, V. I., & Cosio, C. (2016). Role of cellular compartmentalization in the trophic transfer of mercury species in a freshwater plant-crustacean food chain. Journal of Hazardous Materials, 320, 401-407. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.08.055

Beauvais-Flück, R., Gimbert, F., Méhault, O., & Cosio, C. (2017). Trophic fate of inorganic and methyl-mercury in a macrophyte-chironomid food chain. Journal of Hazardous Materials, 338, 140-147. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.05.028

Berezina, N., Maximov, A., Sharov, A., Gubelit, Y., & Kholodkevich, S. (2023). Environmental Assessment with Cage Exposure in the Neva Estuary, Baltic Sea: Metal Bioaccumulation and Physiologic Activity of Bivalve Molluscs. Journal of Marine Science and Engineering, 11(9), Article 9. https://doi.org/10.3390/jmse11091756

Berntssen, M. H. G., Aatland, A., & Handy, R. D. (2003). Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. Aquatic Toxicology, 65(1), 55-72. https://doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00104-8

Besse, J.-P., Geffard, O., & Coquery, M. (2012). Relevance and applicability of active biomonitoring in continental waters under the Water Framework Directive. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 36, 113-127. https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.04.004

Bienvenue, E., Boudou, A., Desmazes, J. P., Gavach, C., Georgescauld, D., Sandeaux, J., Sandeaux, R., & Seta, P. (1984). Transport of mercury compounds across bimolecular lipid membranes: Effect of lipid composition, pH and chloride concentration. Chemico-Biological Interactions, 48(1), 91-101. https://doi.org/10.1016/0009-2797(84)90009-7

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

Boudou, A., Delnomdedieu, M., Georgescauld, D., Ribeyre, F., & Saouter, E. (1991). Fundamental roles of biological barriers in mercury accumulation and transfer in freshwater ecosystems (analysis at organism, organ, cell and molecular levels). Water Air & Soil Pollution, 56(1), 807-821. https://doi.org/10.1007/BF00342318

Bravo, A. G., Cosio, C., Amouroux, D., Zopfi, J., Chevalley, P.-A., Spangenberg, J. E., Ungureanu, V.-G., & Dominik, J. (2014). Extremely elevated methyl mercury levels in water, sediment and organisms in a Romanian reservoir affected by release of mercury from a chlor-alkali plant. Water Research, 49, 391-405. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.024

Bravo, A. G., Loizeau, J.-L., Bouchet, S., Richard, A., Rubin, J. F., Ungureanu, V.-G., Amouroux, D., & Dominik, J. (2010). Mercury human exposure through fish consumption in a reservoir contaminated by a chlor-alkali plant: Babeni reservoir (Romania). Environmental Science and Pollution Research, 17(8), 1422-1432. https://doi.org/10.1007/s11356-010-0328-9

Briant, N., Chouvelon, T., Martinez, L., Brach-Papa, C., Chiffoleau, J., Savoye, N., Sonke, J., & Knoery, J. (2017). Spatial and temporal distribution of mercury and methylmercury in bivalves from the French coastline. Marine Pollution Bulletin, 114(2), 1096-1102. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.018

Bridges, C. C., & Zalups, R. K. (2005). Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. Toxicology and applied pharmacology, 204(3), 274-308. https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.09.007

Bridges, C. C., & Zalups, R. K. (2017). Mechanisms involved in the transport of mercuric ions in target tissues. Archives of toxicology, 91(1), 63-81. https://doi.org/10.1007/s00204-016-1803-y

Burger, J., & Gochfeld, M. (2007). Risk to consumers from mercury in Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) from the Aleutians: Fish age and size effects. Environmental Research, 105(2), 276-284. https://doi.org/10.1016/j.envres.2007.05.004

Burlakova, L. E., Karatayev, A. Y., Boltovskoy, D., & Correa, N. M. (2022). Ecosystem services provided by the exotic bivalves *Dreissena polymorpha*, *D. rostriformis bugensis*, and *Limnoperna fortunei*. Hydrobiologia. https://doi.org/10.1007/s10750-022-04935-4

Cardoso, P. G., Grilo, T. F., Reis, A. T., Coelho, J. P., Pereira, E., & Pardal, M. A. (2015). Field transplantation of the bivalve *Scrobicularia plana* along a mercury gradient in Ria de Aveiro (Portugal): Uptake and depuration kinetics. Science of The Total Environment, 512-513, 55-61. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.027

Cardoso, P. G., Pereira, E., Grilo, T. F., Duarte, A. C., & Pardal, M. A. (2012). Kinetics of Mercury Bioaccumulation in the Polychaete *Hediste diversicolor* and in the Bivalve *Scrobicularia plana*, Through a Dietary Exposure Pathway. Water, Air, & Soil Pollution, 223(1), 421-428. https://doi.org/10.1007/s11270-011-0870-1

Carrasco, L., Díez, S., Soto, D. X., Catalan, J., & Bayona, J. M. (2008). Assessment of mercury and methylmercury pollution with zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in the Ebro River (NE Spain) impacted by industrial hazardous dumps. Science of The Total Environment, 407(1), 178-184. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.07.031

Carvalho, C. M. L., Chew, E.-H., Hashemy, S. I., Lu, J., & Holmgren, A. (2008). Inhibition of the Human Thioredoxin System: A MOLECULAR MECHANISM OF MERCURY TOXICITY. Journal of Biological Chemistry, 283(18), 11913-11923. https://doi.org/10.1074/jbc.M710133200

Chiasson-Gould, S. A., Blais, J. M., & Poulain, A. J. (2014). Dissolved Organic Matter Kinetically Controls Mercury Bioavailability to Bacteria. Environmental Science & Technology, 48(6), 3153-3161. https://doi.org/10.1021/es4038484

CIPR. (2011). Rapport sur la contamination des poissons par des substances polluantes dans le bassin du Rhin – études en cours et achevées dans les États riverains du Rhin (2000–2010) (Rapport technique No. 195F). Commission Internationale pour la Protection du Rhin. https://www.iksr.org/fileadmin/user_upload/DKDM/Dokumente/Fachberichte/FR/rp_Fr_0195.pdf

Clarkson, T. W., Magos, L., & Myers, G. J. (2003). The Toxicology of Mercury—Current Exposures and Clinical Manifestations. New England Journal of Medicine, 349(18), 1731-1737. https://doi.org/10.1056/NEJMra022471

Cosio, C., Degli-Esposti, D., Almunia, C., Gaillet, V., Sartelet, H., Armengaud, J., Chaumot, A., Geffard, O., & Geffard, A. (2021). Subcellular Distribution of Dietary Methyl-Mercury in *Gammarus fossarum* and Its Impact on the Amphipod Proteome. Environmental Science & Technology, 55(15), 10514-10523. https://doi.org/10.1021/acs.est.1c02385

Cossart, T., Garcia-Calleja, J., Santos, J. P., Kalahroodi, E. L., Worms, I. A. M., Pedrero, Z., Amouroux, D., & Slaveykova, V. I. (2022). Role of phytoplankton in aquatic mercury speciation and transformations. Environmental Chemistry, 19(4), 104-115. Scopus. https://doi.org/10.1071/EN22045

Daye, M., Kadlecova, M., & Ouddane, B. (2015). Biogeochemical factors affecting the distribution, speciation, and transport of Hg species in the Deûle and Lys Rivers (Northern France). Environmental Science and Pollution Research, 22(4), 2708-2720. https://doi.org/10.1007/s11356-014-3528-x

Dranguet, P., Flück, R., Regier, N., Cosio, C., Le Faucheur, S., & Slaveykova, V. I. (2014). Towards Mechanistic Understanding of Mercury Availability and Toxicity to Aquatic Primary Producers. Chimia, 68(11), 799-805. https://doi.org/10.2533/chimia.2014.799

Driscoll, C. T., Mason, R. P., Chan, H. M., Jacob, D. J., & Pirrone, N. (2013). Mercury as a Global Pollutant: Sources, Pathways, and Effects. Environmental Science & Technology, 47(10), 4967-4983. https://doi.org/10.1021/es305071v

Duchemin, M. B., Auffret, M., Wessel, N., Fortier, M., Morin, Y., Pellerin, J., & Fournier, M. (2008). Multiple experimental approaches of immunotoxic effects of mercury chloride in the blue mussel, *Mytilus edulis*, through in vivo, in tubo and in vitro exposures. Environmental Pollution, 153(2), 416-423. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.08.015

Faria, M., Carrasco, L., Diez, S., Riva, M. C., Bayona, J. M., & Barata, C. (2009). Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 149(3), 281-288. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.07.012

Feng, C., Pedrero, Z., Gentès, S., Barre, J., Renedo, M., Tessier, E., Berail, S., Maury-Brachet, R., Mesmer-Dudons, N., Baudrimont, M., Legeay, A., Maurice, L., Gonzalez, P., & Amouroux, D. (2015). Specific Pathways of Dietary Methylmercury and Inorganic Mercury Determined by Mercury Speciation and Isotopic Composition in Zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Science & Technology, 49(21), 12984-12993. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03587

García-Medina, S., Galar-Martínez, M., Gómez-Oliván, L. M., Ruiz-Lara, K., Islas-Flores, H., & Gasca-Pérez, E. (2017). Relationship between genotoxicity and oxidative stress induced by mercury on common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. Aquatic Toxicology, 192, 207-215. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.09.019

Géba, E., Aubert, D., Durand, L., Escotte, S., La Carbona, S., Cazeaux, C., Bonnard, I., Bastien, F., 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, 115297. https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115297

Gentès, S., Maury-Brachet, R., Feng, C., Pedrero, Z., Tessier, E., Legeay, A., Mesmer-Dudons, N., Baudrimont, M., Maurice, L., Amouroux, D., & Gonzalez, P. (2015). Specific Effects of Dietary Methylmercury and Inorganic Mercury in Zebrafish (*Danio rerio*) Determined by Genetic, Histological, and Metallothionein Responses. Environmental Science & Technology, 49(24), 14560-14569. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03586

Gerken, H. G., Donohoe, B., & Knoshaug, E. P. (2013). Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. Planta, 237(1), 239-253. https://doi.org/10.1007/s00425-012-1765-0

Goedkoop, W., Choudhury, M. I., Lau, D. C. P., & Grandin, U. (2021). Inverting nutrient fluxes across the land-water interface – Exploring the potential of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) farming. Journal of Environmental Management, 281, 111889. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111889

Grandjean, P., Weihe, P., White, R. F., Debes, F., Araki, S., Yokoyama, K., Murata, K., Sørensen, N., Dahl, R., & Jørgensen, P. J. (1997). Cognitive Deficit in 7-Year-Old Children with Prenatal

Exposure to Methylmercury. Neurotoxicology and Teratology, 19(6), 417-428. https://doi.org/10.1016/S0892-0362(97)00097-4

Groth, E. (2010). Ranking the contributions of commercial fish and shellfish varieties to mercury exposure in the United States: Implications for risk communication. Environmental Research, 110(3), 226-236. https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.12.006

Guardiola, F. A., Chaves-Pozo, E., Espinosa, C., Romero, D., Meseguer, J., Cuesta, A., & Esteban, M. A. (2016). Mercury Accumulation, Structural Damages, and Antioxidant and Immune Status Changes in the Gilthead Seabream (*Sparus aurata L.*) Exposed to Methylmercury. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 70(4), 734-746. https://doi.org/10.1007/s00244-016-0268-6

Guidi, P., Frenzilli, G., Benedetti, M., Bernardeschi, M., Falleni, A., Fattorini, D., Regoli, F., Scarcelli, V., & Nigro, M. (2010). Antioxidant, genotoxic and lysosomal biomarkers in the freshwater bivalve (*Unio pictorum*) transplanted in a metal polluted river basin. Aquatic Toxicology, 100(1), 75-83. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.07.009

Gutknecht, J. (1981). Inorganic mercury (Hg2+) transport through lipid bilayer membranes. The Journal of Membrane Biology, 61(1), 61-66. https://doi.org/10.1007/BF01870753

Gworek, B., Bemowska-Kałabun, O., Kijeńska, M., & Wrzosek-Jakubowska, J. (2016). Mercury in Marine and Oceanic Waters—A Review. Water, Air, & Soil Pollution, 227(10), 371. https://doi.org/10.1007/s11270-016-3060-3

Hammerschmidt, C. R., & Fitzgerald, W. F. (2006). Methylmercury in Freshwater Fish Linked to Atmospheric Mercury Deposition. Environmental Science & Technology, 40(24), 7764-7770. https://doi.org/10.1021/es061480i

Hanikenne, M., Merchant, S. S., & Hamel, P. (2009). Chapter 10 - Transition Metal Nutrition: A Balance Between Deficiency and Toxicity. In E. H. Harris, D. B. Stern, & G. B. Witman (Éds.), The *Chlamydomonas* Sourcebook (Second Edition) (p. 333-399). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370873-1.00018-6

Harada, M. (1995). Minamata Disease: Methylmercury Poisoning in Japan Caused by Environmental Pollution. Critical Reviews in Toxicology, 25(1), 1-24. https://doi.org/10.3109/10408449509089885

Hebert, P. D. N., Muncaster, B. W., & Mackie, G. L. (1989). Ecological and Genetic Studies on *Dreissena polymorpha* (Pallas): A New Mollusc in the Great Lakes. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 46(9), 1587-1591. https://doi.org/10.1139/f89-202

Hildebrand, M., Lerch, S. J. L., & Shrestha, R. P. (2018). Understanding Diatom Cell Wall Silicification—Moving Forward. Frontiers in Marine Science, 5. https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00125

Horowitz, H. M., Jacob, D. J., Zhang, Y., Dibble, T. S., Slemr, F., Amos, H. M., Schmidt, J. A., Corbitt, E. S., Marais, E. A., & Sunderland, E. M. (2017). A new mechanism for atmospheric mercury redox chemistry: Implications for the global mercury budget. Atmospheric Chemistry and Physics, 17(10), 6353-6371. https://doi.org/10.5194/acp-17-6353-2017

Järup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. British Medical Bulletin, 68(1), 167-182. https://doi.org/10.1093/bmb/ldg032

Juhel, G., Davenport, J., O'Halloran, J., Culloty, S., Ramsay, R., James, K., Furey, A., & Allis, O. (2006). Pseudodiarrhoea in zebra mussels *Dreissena polymorpha* (Pallas) exposed to microcystins. Journal of Experimental Biology, 209(5), 810-816. https://doi.org/10.1242/jeb.02081

Kádár, E., Costa, V., Santos, R. S., & Lopes, H. (2005). Behavioural response to the bioavailability of inorganic mercury in the hydrothermal mussel *Bathymodiolus azoricus*. Journal of Experimental Biology, 208(3), 505-513. https://doi.org/10.1242/jeb.01415

Kim, Y. G., Kwon, S. Y., Washburn, S. J., Brooks, S. C., Yoon, J. W., & Besnard, L. (2024). Reconsidering mercury sources and exposure pathways to bivalves: Insights from mercury stable isotopes. Water Research, 248, 120843. https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120843

Kryger, J., & Riisgård, H. U. (1988). Filtration rate capacities in 6 species of European freshwater bivalves. Oecologia, 77(1), 34-38. https://doi.org/10.1007/BF00380921

Kutluyer Kocabaş, F., Başaran, E., & Kocabaş, M. (2024). Seasonal Monitoring of Heavy Metal Pollution in Water and Zebra Mussels *Dreissena polymorpha* as a Potential Bioindicator Species from Lake Habitat. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 112(3), 43. https://doi.org/10.1007/s00128-024-03869-y

Kwan, K. H. M., Chan, H. M., & de Lafontaine, Y. (2003). Metal contamination in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) along the St. Lawrence river. Environmental Monitoring and Assessment, 88(1-3), 193-219. Scopus. https://doi.org/10.1023/A:1025517007605

Kwon, S. Y., Blum, J. D., Chirby, M. A., & Chesney, E. J. (2013). Application of mercury isotopes for tracing trophic transfer and internal distribution of mercury in marine fish feeding experiments. Environmental Toxicology and Chemistry, 32(10), 2322-2330. https://doi.org/10.1002/etc.2313

Ladeiro, M. P., Barjhoux, I., Bigot-Clivot, A., Bonnard, M., David, E., Dedourge-Geffard, O., Geba, E., Lance, E., Lepretre, M., Magniez, G., Rioult, D., Aubert, D., Villena, I., Daniele, G., Salvador, A., Vulliet, E., Armengaud, J., Geffard, A., Ladeiro, M. P., … Geffard, A. (2017). Mussel as a Tool to Define Continental Watershed Quality. In Organismal and Molecular Malacology. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/67995

Lavoie, R. A., Jardine, T. D., Chumchal, M. M., Kidd, K. A., & Campbell, L. M. (2013). Biomagnification of Mercury in Aquatic Food Webs: A Worldwide Meta-Analysis. Environmental Science & Technology, 47(23), 13385-13394. https://doi.org/10.1021/es403103t

Le Faucheur, S., Campbell, P. G. C., Fortin, C., & Slaveykova, V. I. (2014). Interactions between mercury and phytoplankton: Speciation, bioavailability, and internal handling. Environmental Toxicology and Chemistry, 33(6), 1211-1224. https://doi.org/10.1002/etc.2424

Le Faucheur, S., Tremblay, Y., Fortin, C., & Campbell, P. G. C. (2011). Acidification increases mercury uptake by a freshwater alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. Environmental Chemistry, 8(6), 612-622. https://doi.org/10.1071/EN11006

Le Guernic, A., Palos Ladeiro, M., Boudaud, N., Do Nascimento, J., Gantzer, C., Inglard, J.-C., Mouchel, J.-M., Pochet, C., Moulin, L., Rocher, V., Waldman, P., Wurtzer, S., & Geffard, A. (2022).

First evidence of SARS-CoV-2 genome detection in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Journal of Environmental Management, 301, 113866. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113866

Lindqvist, O., Johansson, K., Bringmark, L., Timm, B., Aastrup, M., Andersson, A., Hovsenius, G., Håkanson, L., Iverfeldt, Å., & Meili, M. (1991). Mercury in the Swedish environment—Recent research on causes, consequences and corrective methods. Water, Air, and Soil Pollution, 55(1), xi-261. https://doi.org/10.1007/BF00542429

Lowe, S, Browne, M, Boudjelas, S., & De Poorter, M. (2000). 100 of the World's Worst Invasive Alien Species: A selection from the Global Invasive Species Database (p. 12). Invasive Species Specialist Group (ISSG), IUCN Species Survival Commission (SSC). https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/2000-126.pdf

Ma, X., Bruner, K. A., Fisher, S. W., & Landrum, P. F. (1999). Absorption of Hydrophobic Contaminants from Ingested *Chlamydomonas rheinhardtii* and *Chlorella vulgaris* by Zebra Mussels, *Dreissena polymorpha*. Journal of Great Lakes Research, 25(2), 305-317. https://doi.org/10.1016/S0380-1330(99)70739-2

Macek, K. J., Petrocelli, S. R., & Sleight, B. H. (1979). Considerations in Assessing the Potential for, and Significance of, Biomagnification of Chemical Residues in Aquatic Food Chains. https://doi.org/10.1520/STP34892S

Mao, L., Liu, X., Wang, Z., Wang, B., Lin, C., Xin, M., Zhang, B.-T., Wu, T., He, M., & Ouyang, W. (2021). Trophic transfer and dietary exposure risk of mercury in aquatic organisms from urbanized coastal ecosystems. Chemosphere, 281, 130836. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130836

Mason, R. P., Reinfelder, J. R., & Morel, F. M. M. (1996). Uptake, Toxicity, and Trophic Transfer of Mercury in a Coastal Diatom. Environmental Science & Technology, 30(6), 1835-1845. https://doi.org/10.1021/es950373d

Mathews, T., & Fisher, N. S. (2008). Evaluating the trophic transfer of cadmium, polonium, and methylmercury in an estuarine food chain. Environmental Toxicology and Chemistry, 27(5), 1093-1101. https://doi.org/10.1897/07-318.1

McMeans, B. C., Arts, M. T., & Fisk, A. T. (2015). Impacts of food web structure and feeding behavior on mercury exposure in Greenland Sharks (Somniosus microcephalus). Science of The Total Environment, 509-510, 216-225. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.128

Metian, M., Bustamante, P., Hédouin, L., Oberhänsli, F., & Warnau, M. (2009). Delineation of heavy metal uptake pathways (seawater and food) in the variegated scallop *Chlamys varia*, using radiotracer techniques. Marine Ecology Progress Series, 375, 161-171. https://doi.org/10.3354/meps07766

Molloy, D. P., Karatayev, A. Y., Burlakova, L. E., Kurandina, D. P., & Laruelle, F. (1997). Natural enemies of zebra mussels: Predators, parasites, and ecological competitors. Reviews in Fisheries Science, 5(1), 27-97. https://doi.org/10.1080/10641269709388593

Morrissette, J., Takser, L., St-Amour, G., Smargiassi, A., Lafond, J., & Mergler, D. (2004). Temporal variation of blood and hair mercury levels in pregnancy in relation to fish consumption history in

a population living along the St. Lawrence River. Environmental Research, 95(3), 363-374. https://doi.org/10.1016/j.envres.2003.12.007

Nakhlé, K., Cossa, D., Claisse, D., Beliaeff, B., & Simon, S. (2007). Cadmium and mercury in Seine Estuary flounders and mussels: The results of two decades of monitoring. ICES Journal of Marine Science, 64(5), 929-938. https://doi.org/10.1093/icesjms/fsm031

Neufeld, D. S. G. (2010). Mercury accumulation in caged *Corbicula*: Rate of uptake and seasonal variation. Environmental Monitoring and Assessment, 168(1), 385-396. https://doi.org/10.1007/s10661-009-1121-4

Oliveira, P., Barboza, L. G. A., Branco, V., Figueiredo, N., Carvalho, C., & Guilhermino, L. (2018). Effects of microplastics and mercury in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774): Filtration rate, biochemical biomarkers and mercury bioconcentration. Ecotoxicology and Environmental Safety, 164, 155-163. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.062

Ouddane, B., Mikac, N., Cundy, A. B., Quillet, L., & Fischer, J. C. (2008). A comparative study of mercury distribution and methylation in mudflats from two macrotidal estuaries: The Seine (France) and the Medway (United Kingdom). Applied Geochemistry, 23(4), 618-631. https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2007.11.001

Palos Ladeiro, M., Aubert, D., Villena, I., Geffard, A., & Bigot, A. (2014). Bioaccumulation of human waterborne protozoa by zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): Interest for water biomonitoring. Water Research, 48, 148-155. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.017

Parks, J. M., Johs, A., Podar, M., Bridou, R., Hurt, R. A., Smith, S. D., Tomanicek, S. J., Qian, Y., Brown, S. D., Brandt, C. C., Palumbo, A. V., Smith, J. C., Wall, J. D., Elias, D. A., & Liang, L. (2013). The Genetic Basis for Bacterial Mercury Methylation. Science, 339(6125), 1332-1335. https://doi.org/10.1126/science.1230667

Paterson, M. J., Blanchfield, P. J., Podemski, C., Hintelmann, H. H., Gilmour, C. C., Harris, R., Ogrinc, N., Rudd, J. W., & Sandilands, K. A. (2006). Bioaccumulation of newly deposited mercury by fish and invertebrates: An enclosure study using stable mercury isotopes. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 63(10), 2213-2224. https://doi.org/10.1139/f06-118

Phillips, D. J. H. (1977). The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments—A review. Environmental Pollution (1970), 13(4), 281-317. https://doi.org/10.1016/0013-9327(77)90047-7

Reinfelder, J. R., Fisher, N. S., Luoma, S. N., Nichols, J. W., & Wang, W.-X. (1998). Trace element trophic transfer in aquatic organisms: A critique of the kinetic model approach. Science of The Total Environment, 219(2), 117-135. https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00225-3

Rolfhus, K. R., Hall, B. D., Monson, B. A., Paterson, M. J., & Jeremiason, J. D. (2011). Assessment of mercury bioaccumulation within the pelagic food web of lakes in the western Great Lakes region. Ecotoxicology, 20(7), 1520-1529. https://doi.org/10.1007/s10646-011-0733-y

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 35, 265-278. https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007

Sandheinrich, M. B., & Miller, K. M. (2006). Effects of dietary methylmercury on reproductive behavior of fathead minnows (*Pimephales promelas*). Environmental Toxicology and Chemistry, 25(11), 3053-3057. Scopus. https://doi.org/10.1897/05-641R.1

Scheuhammer, A. M., Meyer, M. W., Sandheinrich, M. B., & Murray, M. W. (2007). Effects of Environmental Methylmercury on the Health of Wild Birds, Mammals, and Fish. AMBIO: A Journal of the Human Environment, 36(1), 12-19. https://doi.org/10.1579/0044-7447(2007)36%255B12:EOEMOT%255D2.0.CO;2

Schroeder, W. H., & Munthe, J. (1998). Atmospheric mercury—An overview. Atmospheric Environment, 32(5), 809-822. https://doi.org/10.1016/S1352-2310(97)00293-8

Sheehan, M. C., Burke, T. A., Navas-Acien, A., Breysse, P. N., McGready, J., & Fox, M. A. (2014). Global methylmercury exposure from seafood consumption and risk of developmental neurotoxicity: A systematic review. Bulletin of the World Health Organization, 92(4), 254-269F. https://doi.org/10.2471/BLT.12.116152

Sivaramakrishna, B., & Radhakrishnaiah, K. (2000). Chapter 14 Mercury induced alterations in the energetics of hepatopancreas of two freshwater molluscs, *Pila globosa* and *Lamellidens marginalis*. In B. Markert & K. Friese (Éds.), Trace Metals in the Environment (Vol. 4, p. 389-409). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0927-5215(00)80017-X

Sıkdokur, E., Belivermiş, M., Sezer, N., Pekmez, M., Bulan, Ö. K., & Kılıç, Ö. (2020). Effects of microplastics and mercury on manila clam *Ruditapes philippinarum*: Feeding rate, immunomodulation, histopathology and oxidative stress. Environmental Pollution, 262, 114247. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114247

Sone, Y., Nakamura, R., Pan-Hou, H., Itoh, T., & Kiyono, M. (2013). Role of MerC, MerE, MerF, MerT, and/or MerP in resistance to mercurials and the transport of mercurials in *Escherichia coli*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 36(11), 1835-1841. https://doi.org/10.1248/bpb.b13-00554

Storelli, M. M., Barone, G., Cuttone, G., Giungato, D., & Garofalo, R. (2010). Occurrence of toxic metals (Hg, Cd and Pb) in fresh and canned tuna: Public health implications. Food and Chemical Toxicology, 48(11), 3167-3170. https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.08.013

Suedel, B. C., Boraczek, J. A., Peddicord, R. K., Clifford, P. A., & Dillon, T. M. (1994). Trophic Transfer and Biomagnification Potential of Contaminants in Aquatic Ecosystems. In G. W. Ware (Éd.), Reviews of Environmental Contamination and Toxicology (p. 21-89). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2656-7_2

Sun, Y., Li, Y., Rao, J., Liu, Z., & Chen, Q. (2018). Effects of inorganic mercury exposure on histological structure, antioxidant status and immune response of immune organs in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Journal of Applied Toxicology, 38(6), 843-854. https://doi.org/10.1002/jat.3592

Tsangaris, C., Hatzianestis, I., Catsiki, V.-A., Kormas, K. Ar., Strogyloudi, E., Neofitou, C., Andral, B., & Galgani, F. (2011). Active biomonitoring in Greek coastal waters: Application of the integrated biomarker response index in relation to contaminant levels in caged mussels. Science of The Total Environment, 412-413, 359-365. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.10.028

UNEP. (2013). Global Mercury Assessment 2013: Sources, emissions, releases, and environmental transport. United Nation Environment Programme, Chemicals Branch Geneva, Switzerland.

UNEP. (2019). Global Mercury Assessment 2018. United Nation Environment Programme, Chemicals and Health Branch Geneva, Switzerland.

Vasile, G. G., Gheorghe, S., Ene, C., Serban, E. A., & Stoica, C. (2019). Total mercury in fish and benthic invertebrates collected from Olt river, Romania. Revista de Chimie, 70(1), 263-268. Scopus. https://doi.org/10.37358/rc.19.1.6896

Wang, J., Koopman, K. R., Collas, F. P. L., Posthuma, L., de Nijs, T., Leuven, R. S. E. W., & Hendriks, A. J. (2021). Towards an ecosystem service-based method to quantify the filtration services of mussels under chemical exposure. Science of The Total Environment, 763, 144196. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144196

Wang, W.-X., & Wong, R. S. K. (2003). Bioaccumulation kinetics and exposure pathways of inorganic mercury and methylmercury in a marine fish, the sweetlips *Plectorhinchus gibbosus*. Marine Ecology Progress Series, 261, 257-268. https://doi.org/10.3354/meps261257

Wehr, J., Sheath, R., & Kociolek, P. (2015). Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification.

Wiener, J. G. (2013). Mercury exposed: Advances in environmental analysis and ecotoxicology of a highly toxic metal. Environmental Toxicology and Chemistry, 32(10), 2175-2178. https://doi.org/10.1002/etc.2333

Yadetie, F., Karlsen, O. A., Lanzén, A., Berg, K., Olsvik, P., Hogstrand, C., & Goksøyr, A. (2013). Global transcriptome analysis of Atlantic cod (*Gadus morhua*) liver after in vivo methylmercury exposure suggests effects on energy metabolism pathways. Aquatic Toxicology, 126, 314-325. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.09.013

Yang, L., Zhang, Y., Wang, F., Luo, Z., Guo, S., & Strähle, U. (2020). Toxicity of mercury: Molecular evidence. Chemosphere, 245, 125586. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125586

Yu, R.-Q., Reinfelder, J. R., Hines, M. E., & Barkay, T. (2018). Syntrophic pathways for microbial mercury methylation. The ISME Journal, 12(7), Article 7. https://doi.org/10.1038/s41396-018-0106-0

Zhong, H., Kraemer, L., & Evans, D. (2013). Influence of body size on Cu bioaccumulation in zebra mussels *Dreissena polymorpha* exposed to different sources of particle-associated Cu. Journal of Hazardous Materials, 261, 746-752. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.03.068

CHAPITRE 1 : Bioaccumulation et effets du Hg par l'alimentation chez *Dreissena polymorpha* en conditions contrôlées

Partie 1 : Unveiling the hidden threat: molecular, cellular and behavioral effects of dietborne inorganic mercury and methylmercury in *Dreissena polymorpha*

Cette partie du chapitre a été publiée dans Chemosphere :

Seguin, C., Marant, A., Palacios-Paris, S., Bonnard, I., Loizeau, J.-L., David, E., Rioult, D., Cosio, C., 2025. Unveiling the hidden threat: Molecular, cellular and behavioral effects of dietborne inorganic mercury and methylmercury in *Dreissena polymorpha*. Chemosphere 376, 144306. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2025.144306

Résumé

La bioaccumulation du méthylmercure (MeHg) dans les réseaux trophiques est reconnue depuis plus de 50 ans comme un risque majeur pour la santé, mais la majorité des études se concentrent sur de fortes concentrations de mercure inorganique dissous (IHg). Cette étude évalue les effets d'une exposition alimentaire au Hg, à des niveaux environnementaux réalistes d'IHg et de MeHg, au sein d'une chaîne trophique d'eau douce.

Les moules d'eau douce *Dreissena polymorpha* ont été nourries avec des microalgues préalablement contaminées par 2 ou 20 fg d'IHg ou de MeHg par cellule pendant 4 jours. Le comportement de filtration, la bioaccumulation du Hg, l'histopathologie, l'activité des enzymes antioxydantes ainsi que l'expression de gènes impliqués dans la défense et le métabolisme énergétique ont été évalués dans les branchies, la glande digestive et le reste des tissus mous après 1, 2 et 4 jours d'exposition. Après 22 h, toutes les microalgues sont filtrées, seule l'exposition au MeHg entraine une réduction de la filtration dès la première heure. Les facteurs de bioaccumulation sont plus élevés pour le MeHg que pour l'IHg, en particulier dans les branchies. L'exposition alimentaire au MeHg induit également davantage de fibrose et de modifications structurales des branchies que l'IHg, en cohérence avec les niveaux de bioaccumulation. Dans la glande digestive, des phénomènes de nécrose, d'atrophie tubulaire et d'infiltration d'hémocytes sont observés. L'IHg comme le MeHg provoquent un stress oxydatif, attesté par des variations significatives de l'activité des enzymes antioxydantes et une augmentation des niveaux de péroxydation lipidique. L'exposition au MeHg entraîne, en outre une surexpression du gène *sod* dans les restes et module l'expression des gènes *cs* et *aox* impliqués dans le métabolisme énergétique, selon l'organe et la durée d'exposition.

Ces résultats confirment les cibles de toxicité déjà connues du Hg, mais révèlent également des différences de réponses selon la forme de Hg et le tissu considéré, soulignant l'importance de prendre en compte la spéciation du Hg et la spécificité tissulaire dans l'évaluation de sa toxicité.

Mots-clés : Bioaccumulation, métabolisme énergétique, filtration, histopathologie, microalgues, stress oxydatif

Abstract

Methylmercury (MeHg) bioaccumulation in food webs has been recognized as a significant health risk for over 50 years, yet most studies focus on high concentrations of waterborne inorganic mercury (IHg). This study investigates the effects of dietborne mercury (Hg) exposure at environmentally realistic IHg and MeHg levels on a freshwater food chain.

Freshwater mussels, *Dreissena polymorpha*, were fed with microalgae previously contaminated with 2 and 20 fg IHg or MeHg per cell for 4 d. Filtration behavior, Hg bioaccumulation, histopathology, antioxidant enzyme activity, and gene expression related to defense and energy metabolism were measured across gills, digestive glands, and other soft tissues (rests) for 1, 2, and 4 d. While all microalgae were filtered after 22 h, only MeHg exposure led to a reduced filtration within the first hour. Bioaccumulation factors were higher for MeHg than IHg, particularly in gills. Dietborne MeHg also caused more fibrosis and structural changes in gills than IHg, in line with bioaccumulation. Necrosis, tubular atrophy, and hemocyte infiltration were observed in the digestive gland. Both IHg and MeHg triggered oxidative stress, as evidenced by significant changes in antioxidant enzyme activities and increased lipid peroxidation levels. MeHg exposure significantly upregulated the *sod* gene in rests and modulated *cs* and *aox* genes involved in energy metabolism in gills and digestive gland, depending on exposure duration.

The findings aligned with established Hg toxicity targets but demonstrated notable differences in response depending on Hg forms and tissue type, emphasizing the importance of Hg speciation and tissue type in assessing toxicity.

Keywords: Bioaccumulation, energy metabolism, filtration, histopathology, microalgae, oxidative stress

1. Introduction

Mercury (Hg) is a global priority pollutant in aquatic ecosystems due to its threat to plants, animals, and humans. Methylmercury (MeHg) is recognized as a significant public health risk, particularly for humans exposed through the consumption of contaminated fish and seafood. As a result, Hg is targeted by the European Stockholm Convention and the global Minamata Convention, both of which aim to protect human health and the environment by reducing Hg's harmful effects and limiting anthropogenic emissions worldwide.

Atmospheric Hg contamination contributes to the contamination of soils and aquatic environments through both wet and dry deposits of inorganic Hg (IHg) (Driscoll et al., 2013). This deposited IHg can subsequently undergo biotic methylation in sediment and suboxic microenvironments through microbial activity, producing MeHg (Driscoll et al., 2013, Yu et al., 2018). MeHg then bioaccumulates in primary producers and biomagnifies in food webs, resulting in increasing tissue concentrations that correlate with organismal age and trophic level (Carrasco et al., 2011; Bravo et al., 2014). Consequently, dietary exposure to MeHg is the primary route of contamination for animals (Wang et al., 2012; Mao et al., 2021; van Rooyen et al., 2023). In this context, the burden and the toxicity of dietary MeHg in aquatic biota are expected to rise in the future (Pack et al., 2014; Schaefer et al. 2020).

Chronic exposure to dietary Hg for humans can lead to neurological and psychological effects including tremors, personality changes, anxiety, sleep disorders and depression (Järup. 2003, Yang et al., 2020). Similar toxic effects of Hg were observed in vertebrates and invertebrates, manifesting as inhibited growth and feeding, reduced embryo survival, developmental abnormalities, impaired locomotion, and decreased ability to capture active prey (Yang et al., 2020). Other effects such as behavioral changes, histological and DNA damages or oxidative stress were observed in aquatic invertebrates exposed to waterborne IHg (Tableau 1-1).

In freshwater fish, dietary exposures to high concentration of MeHg caused mortality, lipid peroxidation, brain damage, altered male reproductive behavior, impaired locomotion and feeding, with symptom severity correlating with Hg bioaccumulation (reviewed in Depew et al., 2012). In *Crassostrea angulata* dietary exposure to high IHg concentrations (mg/L) led to reprotoxicity, oxidative stress and histological lesions to testicular and ovarian tissues (Zhang et al., 2013). In zebrafish, dietary MeHg and IHg exposure for 2 months (50 ng Hg / g, 80 % as MeHg; 10 µg Hg / g, 95% as MeHg; 10 µg Hg / g, 99 % as IHg) caused more damages in muscle and liver tissues following MeHg exposure than IHg (Gentès et al., 2015). Additionally, Hg form influenced responses at the molecular level, as seen in the differential expression of 18 genes related to defense, oxidative stress, apoptosis, nervous system signaling, and mitochondrial metabolism, suggesting distinct toxicity pathways for IHg and MeHg (Gentès et al., 2015).

The plant-animal interface plays an essential ecological and ecotoxicological role in aquatic ecosystems, driving the transfer of energy, nutrients, and contaminants to higher trophic levels Studies on the dietary impact of Hg on lower trophic level animals, such as invertebrate primary consumers that play a crucial role in introducing Hg into the food chain, remain limited. Notably, freshwater biota remains significantly less studied than marine biota in the context of Hg fate and toxicity. Moreover, many studies on waterborne Hg have used concentrations 10^3 to 10^6× higher than those observed in natural environments and have often excluded MeHg, significantly

reducing their environmental relevance. Consequently, the effects of MeHg biomagnification within food webs are not well understood and therefore difficult to accurately predict. Despite advances in understanding global Hg fluxes due to decades of research on the Hg cycle, key questions remain unanswered. Notably, the link between Hg bioaccumulation, molecular responses, and behavioral changes are underexplored (Evers et al, 2024; Morcillo et al., 2017).

Mussels belong to the 2nd largest animal phylum, Mollusca, which comprises over 10^6 species (Fernández Robledo et al., 2019). Among these, bivalves are particularly important for benthic-pelagic coupling; they filter large volumes of water, cycle particulate matter and phytoplankton, alter community composition in their surroundings, and contribute to higher trophic levels (Newel, 2004; Smith et al., 2018). Mussels feed on phytoplankton, a group crucial to the cycling of MeHg, and they can also directly accumulate contaminants from the water column, making them ideal representatives of macrobenthic biota for studying Hg uptake and effects (Bravo et al., 2014; Roditi et al., 2000; Zuykov et al., 2013). A field study along the Gambia River (Senegal), in areas recently impacted by artisanal gold mining, showed that bivalves accumulated more Hg than other animals, highlighting the significant role of these lower-trophic-level species play in Hg transfer from sediments to higher trophic levels (Niane et al., 2015). In freshwater ecosystems, *D. polymorpha* is highly tolerant to environmental changes (Palos-Ladeiro et al., 2017), widely distributed throughout the Northern Hemisphere and provides valuable ecosystem services, such as supporting drinking water production, and reducing eutrophication through filtration (5 to 400 ml / bivalve / h ; Baldwin et al., 2002) and phytoplankton consumption valued at 12 k€ / 10^6 m^3 (Wang et al., 2021; Ludovisi et al., 2022). Furthermore, *D. polymorpha* serves as a food source for crustaceans, fish, birds and mammals (Molloy et al., 1997; Kobak and Kakareko, 1997), impacting population dynamics across freshwater ecosystems. Presence of *D. polymorpha* was linked to increased Hg in fish, likely due to biomagnification of MeHg in freshwater environments (Blinick et al., 2024). Nonetheless, the bioaccumulation and impact of dietary IHg and MeHg in *D. polymorpha* remain unknown.

Here, we aimed to investigate the bioaccumulation and effects of dietary IHg and MeHg in *D. polymorpha* to test whether MeHg causes more effects than IHg. We analyzed enzyme activities and transcript levels involved in antioxidant defense, lipid peroxidation as an indicator of oxidative stress, and histological damage. Analyses were conducted on the gills, digestive gland, and other soft tissues (rests): gills were chosen because they are involved in filtration and are the first tissues exposed to microalgae; the digestive gland as it plays a detoxification role and facilitates microalgae digestion; and the rests as they represent indirect dietary exposure after digestion. Filtration behavior in *D. polymorpha* was also assessed as a proxy for feeding activity.

Tableau 1-1. Studies on effects of waterborne Hg in aquatic vertebrates and invertebrates.

Organism	Hg	Concentration (µg/L)	Duration	Effects	Reference
Ictalurus melas	IHg	35, 70, 140	10 days	Alteration in enzyme activities involved in defense against reactive oxygen species	Elia et al., 2003
Pelteobagrus fulvidraco	IHg	2, 10	6 weeks	Histological damages, oxidative stress, immunotoxicity	Sun et al., 2018
Cyprinus carpio	IHg	10	4 days	Oxidative stress, genotoxicity DNA damage	Garcia-Medina et al., 2017
Bathymodiolus azoricus	IHg	20	21 days	Valve opening and shell gaping	Kádár et al., 2005
Cerastoderma edule	IHg	1, 10, 100	6 days	Alteration in the estimated desaturases and elongases' activities, increase in enzymatic and non-enzymatic antioxidants, histological damages	Bejaoui et al., 2020
Corbicula fluminea	IHg	30	8 days	Decrease in filtration rate, oxidative stress	Oliveira et al., 2018
Ruditapes philippinarum	IHg	10	4 days	Decrease in filtration rate, immunomodulation, histological damages	Sikdokur et al., 2020
Dreissena polymorpha	MeHg	0.2 to 0.5	1 to 7 days	Alterations in cell and organelle structure, enzyme and gene expression related to oxidative stress defense, modulation of proteins involved in stress response, development, cytoskeleton, energy and amino acid metabolism	Baratange et al., 2022, 2023
Tigriopus japonicus	MeHg	0 to 1	4 days	Adverse effects on growth rate and reproduction, increase of antioxidant enzymatic activities, activation of MAPK pathways	Lee et al., 2017

2. Material and methods

2.1. Consumables and glasswares

Consumables and glassware were cleaned with three consecutive acid baths, each lasting one week: 10 % (v / v) HNO_3 (1st bath) and 10 % (v / v) HCl (2nd and 3rd baths). After each bath, items were rinsed three times with demineralized water and dried under a fume hood.

2.2. Biological models

D. polymorpha specimens were collected in April 2021 from Der Lake (Grand Est, France 48°36'22.02" N, 4°46'34.0" E), cleaned, and size-selected (18-20 mm). To avoid any sex bias, females were identified by gonadal puncture and distributed across 3 tanks filled with natural spring water (spring Aurèle, Cristaline®). Mussels underwent a 20 - d depuration period at the lake's collection temperature (10.5 °C) and were fed twice weekly with 4×10^6 cells / individual / d of *Nannochloropsis* (Nanno 3600 1L, Reed Mariculture, Planktovie). Tanks were continuously aerated, and water was refreshed before feeding. One week prior to exposure, 60 mussels were randomly placed in exposure tanks with 45ml of water per individual to acclimate and establish byssal attachment.

2.3. Hg exposure of *Nannochloropsis* sp.

Exposures were designed to simulate a microalgal bloom of 3.5×10^4 cell/ml exposed to 70 ng/L THg, which is the Environmental Quality Standards (EQS) in Europe, corresponding to 2 fg/cell. We also used a concentration 10 × higher to represent a site contaminated with Hg. Microalgae cell concentration was measured using flow cytometry (BD Accuri C6). Initially, $2.9 \pm 0.27 \times 10^{10}$ *Nannochloropsis* cells in spring water (spring Aurèle, Cristaline) were exposed to five conditions: a control without Hg, 2 fg/cell of IHg (IHg2), 2 fg / cell of MeHg (MeHg2), 20 fg/cell of IHg (IHg20) and 20 fg/cell of MeHg (MeHg20) using IHg standard solution ($Hg(NO3)_2$ 1 g/L, Sigma-Aldrich Supelco) and MeHg standard solution (CH_3HgCl 1 g/L, Alfa Aesar). Following exposure, microalgae were placed on an orbital shaker for 2h and then centrifuged for 10 min at 1,300 *g*. The supernatant was discarded, and the microalgae were resuspended in spring water before being again centrifuged for 10 min at 1300 *g* to remove any unbound Hg. The Hg concentrations measured in *Nannochloropsis* are given in Tableau 1-2.

Tableau 1-2. Concentration of THg and MeHg (fg/cell) in Nannochloropsis at the beginning of exposure.

Condition	THg	MeHg
Control	0.00 ± 0.00	0.00
IHg2	0.59 ± 0.01	0.00
MeHg2	1.10 ± 0.02	0.01
IHg20	10.07 ± 0.08	0.00
MeHg20	6.52 ± 0.23	3.87

2.4. Dietary exposure of *D. polymorpha*

Water was renewed daily prior to feeding mussels with a nominal concentration of 1×10^8 microalgae cells/individual/d, while the effective concentration reached $0.42 \pm 0.12 \times 10^8$ cells/individual ·d. Before each water renewal, water sample from each tank were collected, filtered (Sterivex, 0.45 µm), acidified to 0.5 % with HCl (Suprapur), and stored in Teflon tubes at 4 °C until Hg analysis. Eighteen mussels per tank were sampled at 24, 48, and 96 h for various

analyses: bioaccumulation (n=6), gene expression level (n=6), protein activity and abundance (n=6). Gills, the digestive gland, and other soft tissues (rests) were dissected, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until analysis. The mussels that remained in the tanks at 96 h (n = 6) were used for histopathological analyses. No mortality of *D. polymorpha* was observed during the experiment.

2.5. Hg analysis

For bioaccumulation analysis, soft tissues of mussels were rinsed before dissection 5 min with 1 mM EDTA and 1 mM cysteine to remove loosely bound Hg. For total Hg (THg = IHg + MeHg) measurements, mussels and microalgae samples were freeze-dried and analyzed by atomic absorption spectrometry using the Advanced Hg Analyzer AMA 254 (Altec s.r.l., Czech Republic). For MeHg analysis, mussels and microalgae samples were freeze-dried, grinded, and digested in 30 % (v/v) HNO_3 at 60 °C for 12 h. THg concentrations in water were analyzed using MERX® T System (Brooks Rand Instruments, Seattle, WA, USA), while MeHg concentration in water, microalgae, and mussels were analyzed using MERX® M System (Brooks Rand Instruments, Seattle, WA, USA). Analytical quality was verified using certified reference material (DORM-4; NRC – CNRC) and blanks. THg and MeHg recovery was determined at 93 ± 6 and 100 ± 12 %, respectively. The bioaccumulation factor (BAF, g^{-1}) was calculated at 96 h as: (*THg effective concentration in mussels (µg/g)) / (THg effective amount in 10^8 cells of microalgae (µg) × 4 d of exposure)*. Before exposure, IHg concentration in the whole body of *D. polymorpha* was 0.07 ± 0.01 µg/g, with MeHg accounting for 46 % of the total Hg. These values were subtracted from final bioaccumulation data.

2.6. Hg effects in *D. polymorpha*

2.6.1. Filtration rate

To observe the filtration behavior of *D. polymorpha*, we adapted the system previously described by Géba et al. (2021). Each mussel was placed in a tube with 45 ml of spring water continuously bubbled with air to both oxygenate the medium and prevent microalgae sedimentation. Four tubes, each housing one mussel, were prepared for each condition. After one day of acclimation, mussels were fed with 1×10^8 microalgae cells/individual/d prepared as described in section 2.4. For each condition, a tube without mussel was prepared, as negative control, which also received microalgae to ensure that microalgae concentration was stable in the filtration device. The number of unconsumed microalgae cells was measured daily in each tube 1 h (beginning) and 22 h (end) after feeding by flow cytometry (NovoCyte Advanteon) using cell complexity (SSC) and cell size (FSC) at a flow rate of 35 µL/min, using 50 µL of sample. The filtration rate (FR) was expressed as the percentage of filtered cells in 45 mL per hour and calculated using the formula: $FR = ((N_{initial} - N_{final})/N_{initial}) \times 100$ where N = number of microalgae in 45 mL.

2.6.2. Histopathology

The protocol for histopathology was previously described in Baratange et al. (2022). Entire soft tissues were immediately fixed in Bouin's aqueous solution for 24 h. Tissues were then dehydrated and embedded in paraffin following the protocol detailed in Paris-Palacios et al. (2000). Five µm-sections were obtained, stained with nuclear fast red (NR) and picro-indigo-carmin (PIC), and mounted on glass slides for microscopic analysis. Mussels exhibiting

parasite(s) were excluded from the study. To evaluate the frequency and the intensity of potential pathologies in gills or the digestive gland, three sections from each mussel were examined and scored (adapted from Jaffal et al., 2015 and Jacquin et al., 2019). A global score of histological perturbations was calculated as the median value of all scores.

2.6.3. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation

Protocols were previously detailed in Baratange et al. (2022). Briefly, samples were homogenized using a 400 MM homogenizer (Restch®, Eragny, Luxembourg) with a single stainless-steel bead (8 mm) for 2 × 30 sec intervals at 30 Hz in 800 µL of 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1 mM L-Serine borate per 100 mg of tissues. Protein concentration, glutathione-S-transferase (GST) activity, and lipid peroxidation were measured using a Gallery® spectrometer (ThermoFisher Scientific). Protein concentration was determined at 600 nm using the red pyrogallol method. GST activity was assessed at 340 nm with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (0.9 mM) and reduced glutathione (1 mM) in phosphate buffer (0.1 M, pH 6.5). Lipid hydroperoxide levels (LOOH), indicative of lipid peroxidation damage, were measured at 620 nm using the Fox method. Catalase (CAT) activity was evaluated at 240 nm with a Cary 50 spectrophotometer (Agilent) using hydrogen peroxide (14 mM) in phosphate buffer (50 mM, pH 7.4). SuperOxide Dismutase (SOD) activity was measured at 340 nm with a Tecan® spectrophotometer (Spark™ 10 M) using β-mercaptoethanol (10 mM) and NADH (7.5 mM) in phosphate buffer (50 mM, pH 7.4).

2.6.4. Gene relative expression level

Total RNA was extracted from tissues using TRI Reagent™ according to manufacturer instructions (Euromedex). RNA purity was assessed by measuring the absorbance ratio at 260 and 280 nm with a micro-volume spectrophotometer (GenovaNano, Jenway). RNA integrity was evaluated using electrophoresis on 1 % agarose gel in TBE (Tris Borate EDTA 0.5 %) buffer. Reverse transcription (RT) was performed using 400 ng of RNA with the Thermo Scientific Verso cDNA kit employing a mixture of oligo-dT and random primers as specified in manufacturer instructions. Quantitative PCR (qPCR) analysis was conducted using a BioRad CFX 96 system with Absolute Blue SYBR Green ROX Mix (Thermo Scientific) on cDNA samples diluted (1:10) in a total volume of 15 µL. Cycling conditions consisted of 95 °C for 2 min, 95 °C for 5 sec and 60 °C for 45 sec, repeated 40 ×. Target genes included catalase (*cat*), glutathione-s-transferase (*gst*), superoxide dismutase (*sod*) and metallothionein (*mt*) involved in detoxication mechanisms and atp synthase (*atp*), cytochrome c oxidase A (*cox*), lactate deshydrogenase (*ldh*), amp kinase sub-unit α (*ampk*), citrate synthase (*cs*) and alternative oxidase (*aox*) involved in energy metabolism. The relative expression levels of target genes were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method with actin and s3 protein serving as reference genes (Tableau S1-1). Thereafter, to distinguish gene expression level from enzyme activities, the name of the former is written in lower case and the later in upper case.

2.7. Statistics

Statistical analyses were conducted using R software version 4.0.3. We compared the effect of all the exposure conditions (ctrl, MeHg2, MeHg20, IHg2 and IHg20) independently for each time point (24 h, 48 h, 96 h). For each endpoint, the normality of residuals (Shapiro-Wilk's test, $\alpha = 0.01$) and homoscedasticity (Brown Forsythe's test, $\alpha = 0.05$) were evaluated prior to interpreting the ANOVA results. A one-way ANOVA was then performed followed by the Tukey post-doc test ($\alpha =$

0.05). When necessary, a log transformation was applied to meet these criteria. If only the homoscedasticity criterion was not met, one-way Welch's ANOVA (α = 0.05) was performed followed by the Games Howell post-hoc test (α = 0.05). In case where neither criterion was met, a nonparametric one-way Kruskall-Wallis test (α = 0.05) was conducted, followed by the Wilcoxon's post-hoc for independent samples test with the Hochberg p-value adjustment (α = 0.05) for multiple comparisons.

3. Results

3.1. Filtration rate

Filtration activity was used as a proxy for feeding. The highest FR at the beginning of feeding was observed in mussels exposed to microalgae contaminated with IHg2 (93.3 ± 8.0 %) and IHg20 (87.5 ± 14.7 %) at 24 h; however, these values were not significantly different from the control (Figure 1-1). Notably, FR of mussels exposed to IHg was significantly higher than FR measured without mussel, which was not observed for control, MeHg2 and MeHg20 exposures. Additionally, filtration activity appeared to be reduced in mussels exposed to MeHg compared to those exposed to IHg, with a significant difference observed between mussels exposed to IHg2 and MeHg20. Nonetheless these differences in FR at the beginning of feeding were not significant on following days, although MeHg2 exposure reduced strongly FR in 38 % of the individuals. Nonetheless, at the end of feeding, FR reached 98.80 % ± 0.39 for control, 97.69 % ± 3.46 for IHg2, 85.38 % ± 15.79 for MeHg2, 95.48 % ± 5.19 for IHg20, and 99.21 % ± 0.63 for MeHg20. These results supported that all mussels demonstrated active filtration over the whole exposure under our experimental conditions. By the end of feeding, all microalgae had been filtered, confirming trophic Hg uptake.

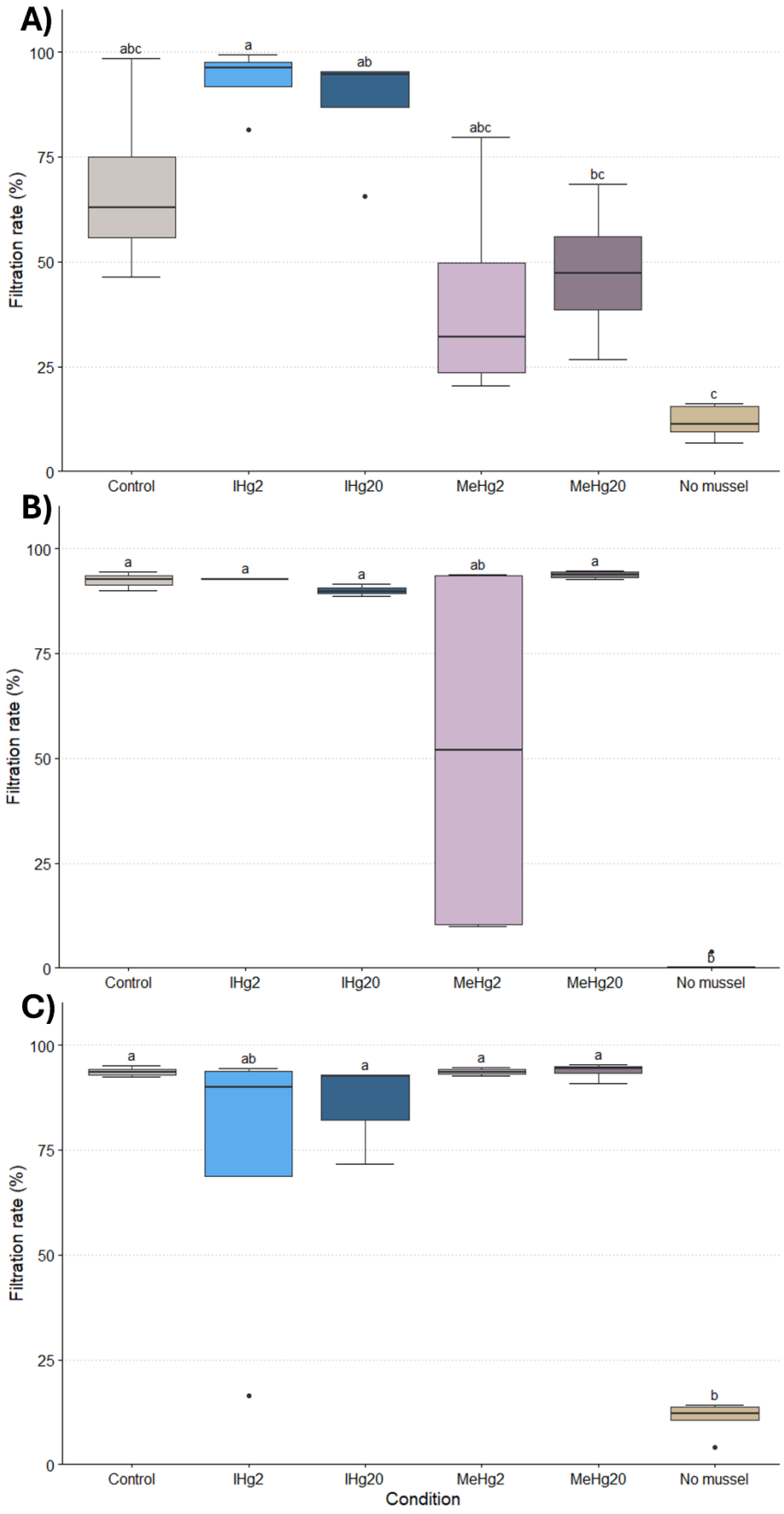
A)
B)
C)
Filtration rate (%)
0
25
50
75
100
abc
a
ab
abc
bc
c
a
a
a
ab
a
b
a
ab
a
a
a
b
Control
IHg2
IHg20
MeHg2
MeHg20
No mussel
Condition

Figure 1-1. Filtration rate (%) of *D. polymorpha* and negative control (no mussel) at the beginning of feeding at 24 h (A), 48 h (B) and 96 h (C). Different letters indicate statistically different groups (n = 4; $p \leq 0.05$).

3.2. Hg bioaccumulation

Both IHg and MeHg were bioaccumulated in tissues of *D. polymorpha,* exhibiting high variability among individuals but higher values in gills and digestive gland than rests (Figure 1-2 ; Tableau S1-2). Overall, the mean of bioaccumulation increased over time, with MeHg bioaccumulation being higher than IHg bioaccumulation. In gills, THg concentrations with MeHg20 were 13 ×, 12 × and 6 × higher at 24, 48 and 96 h, respectively, compared to MeHg2. Similarly, THg concentrations with IHg20 were respectively 12 ×, 16 × and 8 × higher at 24, 48 and 96 h than those for IHg2. These trends were consistent in the digestive gland and rests. Exposure to MeHg20 in gills resulted in BAF 17 × higher than IHg20. Conversely, exposure to IHg2 led to a BAF 10 × and 3 × higher than IHg20 and MeHg20 respectively. As anticipated, % MeHg was higher during MeHg exposure. Moreover, %MeHg in IHg20 exposure also increased compared to control and IHg2 in all tissues at 48h and 96h, reaching values approximately 200 × higher.

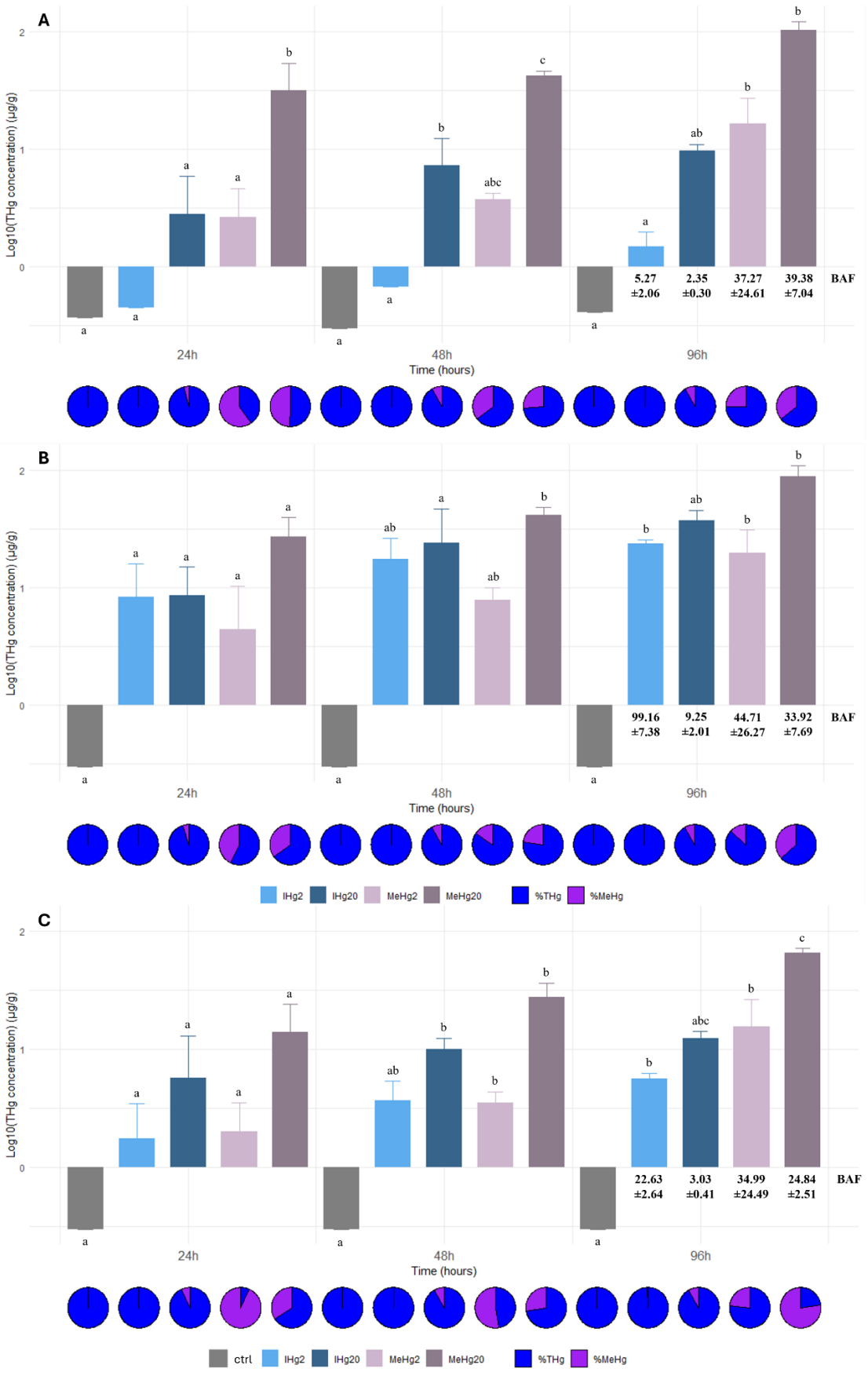
A
B
C
Log10(THg concentration) (µg/g)
24h
48h
96h
Time (hours)
BAF
5.27 ±2.06
2.35 ±0.30
37.27 ±24.61
39.38 ±7.04
99.16 ±7.38
9.25 ±2.01
44.71 ±26.27
33.92 ±7.69
22.63 ±2.64
3.03 ±0.41
34.99 ±24.49
24.84 ±2.51
ctrl
IHg2
IHg20
MeHg2
MeHg20
%THg
%MeHg

Figure 1-2. Concentrations of THg (µg / g; bar chart), % of IHg and MeHg (pie chart) and the bioaccumulation factor (BAF g-1) in gills (A), digestive gland (B) and rests (C) of *D. polymorpha* exposed to IHg and MeHg by diet (mean ± SD; n = 3, $p < 0.05$).

3.3. Histopathology

In the gills of both control and exposed mussels, we observed collagen deposits indicative of fibrosis, alterations in the shape of the gill filaments, and erosion of the ciliary border (Figure 1-3). These changes were more frequent and severe in mussels exposed to MeHg. The gut, stomach, and style bag of mussels displayed very few histopathological alterations under control and IHg conditions, with only moderate fibrosis and some cellular alterations noted in the gut (Tableau 1-3). In the digestive gland, collagen deposits around digestive tubules were thin in control but larger in mussels exposed to IHg and MeHg. Some collagen deposited in interstitial areas indicated higher levels of fibrosis. Abnormal shape and staining of digestive cells suggested both plasmolysis (large round and clear cell) and necrosis (small irregular dark cell) in the most severely affected tubules. Mussels fed with algae contaminated with both IHg and MeHg, exhibited histological damages consistent with a typical inflammatory response, including important amount of hemolymphatic fluid leading to some edema in the digestive gland, a high number of circulating cells concentrated around the more severely altered digestive tubules, and obvious inter-tubule fibrosis. These alterations were accompanied by a high frequency of abnormal cells with perturbed nuclei, as well as tubular breakage, atresia, or complete destruction. Alterations were more frequent and intense in gills and guts of mussels exposed to MeHg compared to those exposed to IHg. However, nuclear alterations were more pronounced in digestive glands of mussels exposed to IHg. Notably, fibrosis in gut were higher in mussels exposed to IHg20 and MeHg20.

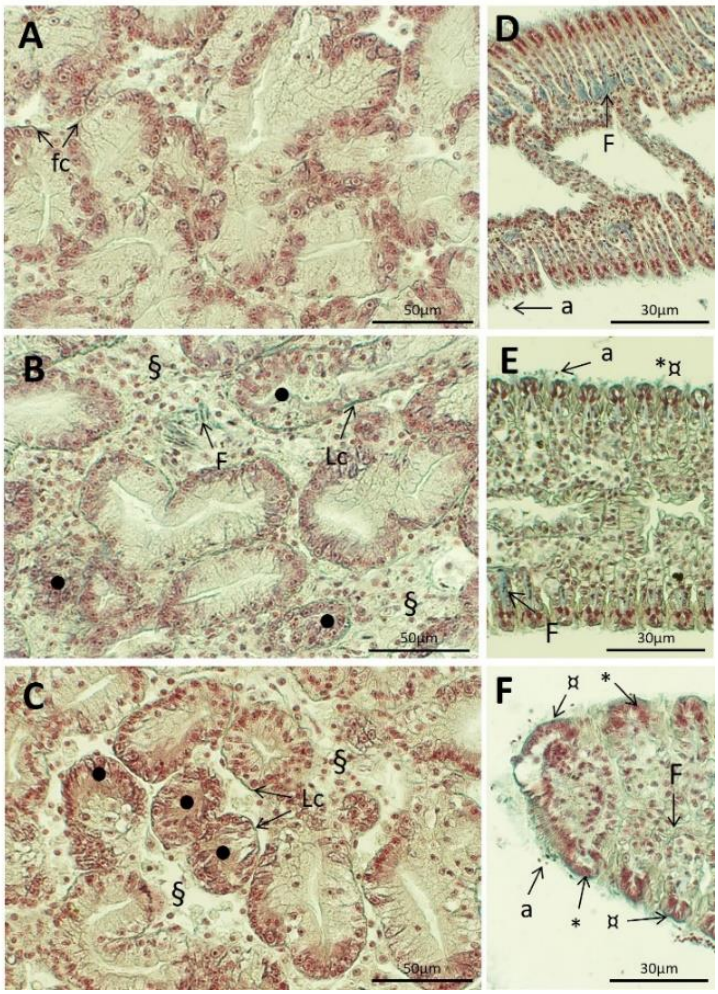

Figure 1-3.
Histopathological alterations of the digestive gland (A-C) and gills (D-F) of *D. polymorpha* exposed by diet to control (A, D), IHg20 (B, E) and MeHg20 (C, F); *: alteration of gill filament shape, ¤: erosion of the ciliary border, a: algae observed in the mucus surrounding gills, fc: fine digestive tubules, Lc: large digestive tubules, F: fibrosis, ●: altered tubules, §: enlargement of interstitial areas, accumulation of coelomocytes and fibrosis; tubules are stained blue with indigo.

Tableau 1-3. Histopathological scores in *D. polymorpha* exposed by diet to control, IHg2, IHg20, MeHg2 and MeHg20.

Organ	Pathology	Control	IHg2	IHg20	MeHg2	MeHg20
Gills	Fibrosis	15 ± 8	17.5 ± 5	14 ± 3	24 ± 8	22 ± 8
	Alteration	11 ± 3	28.5 ± 24	20 ± 6	50 ± 18	40 ± 15
Gut	Destructuration and alteration	0	5 ± 7	0	50 ± 11	45 ± 10
Digestive gland	Inflammation	0.3 ± 0.8	2.8 ± 1.0	2.2 ± 1.0	1.0 ± 0.5	1.2 ± 0.7
	Fibrosis	0.4 ± 0.5	0.8 ± 0.4	1.8 ± 0.4	0.6 ± 0.3	1.1 ± 0.6
	Tubule alteration (%)	15 ± 5	31 ± 8	34 ± 6	32 ± 8	34 ± 9
	Nuclear alteration (%)	22 ± 7	44 ± 10	45 ± 6	32 ± 5	33 ± 6

3.4. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation

Both MeHg and IHg in the diet impacted enzyme activities and LOOH abundance (Tableau 1-4). In gills, CAT activity was generally lower across all the Hg exposures compared to the control, with a significant reduction (2.9 ×) in MeHg20 exposure. In gills in IHg2 at 24 h, LOOH concentration increased. In the digestive gland, CAT activity increased by 4.6 × in IHg2 and 3.5 × in MeHg2 at 24 h compared to control. At 24 h, LOOH concentration increased in IHg2 (1.7 ×), MeHg2 (1.8 ×) and IHg20 (1.7 ×) exposures. In rests, SOD activity decreased in MeHg20 exposure at 24 h (2.1 ×), 48 h (1.8 ×) and 96 h (2.8 ×), while it increased in MeHg2 exposure at 24 h (1.5 ×), 48 h (1.4 ×) and 96 h (1.4 ×). In rests, LOOH concentration rose significantly in MeHg2 at 24 h (2.4 ×), 48 h (3.2 ×) and 96 h (2.6 ×), as well as in MeHg20 at 24 h (1.6 ×), 48 h (2.8 ×) and 96 h (2.2 ×) compared to control. In IHg2, LOOH concentration was higher at 48 h (2.3 ×) and 96 h (2.1 ×), though no significant difference was observed in IHg20 exposure compared to the control.

3.5. Gene expression level

At the transcript level, the expression level of the *sod* gene involved in antioxidant defences was significantly upregulated (2.74 ×) in the rests of mussels exposed 96 h to MeHg20 compared to the control (Tableau 1-5). Genes related to energy metabolism also showed significant changes of expression compared to the control: in the digestive gland at 96 h, *cs* transcripts were downregulated 1.92 × and 1.56 × in MeHg2 and IHg20, respectively; in gills at 48 h, *aox* transcripts were downregulated by 1.79 × and 1.70 × in IHg2 and MeHg20 respectively; in the rests at 24 h, *aox* gene expression level was upregulated 2.13 × in IHg20. Further differences between Hg exposures were observed: at 24 h in rests, *mt* transcripts were more upregulated in MeHg2 than MeHg20, and *atp* transcript levels were higher in rests at 24 h in IHg20 than IHg2. No significant changes were detected in the expression of *cat*, *gst*, *cox*, *ldh* and *ampk* gene expression under these experimental conditions.

Tableau 1-4. Enzyme activities of CAT (U / g protein), GST (µmol CDNB / g protein · min), SOD (U / g protein) and LOOH (µmol TBH / g protein) in gills, digestive gland and rests of *D. polymorpha* exposed by diet 24 h, 48 h and 96 h to IHg and MeHg (mean ± SD, n = 4 to 6 animals; different letters show statistical significance $p < 0.05$).

Tissue	Time	Exposure	CAT	GST	SOD	LOOH
Gills	24 h	Control	102.57 ± 70.67 [a]	125.35 ± 34.15 [a]	4.14 ± 1.20 [a]	18.76 ± 2.28 [a]
		IHg2	49.93 ± 31.08 [a]	118.26 ± 27.01 [a]	5.06 ± 1.52 [a]	44.34 ± 6.55 [b]
		MeHg2	43.85 ± 20.38 [a]	108.39 ± 21.07 [a]	4.36 ± 1.10 [a]	21.48 ± 11.94 [a]
		IHg20	47.84 ± 21.47 [a]	104.53 ± 32.30 [a]	4.41 ± 0.38 [a]	15.53 ± 0.71 [a]
		MeHg20	34.48 ± 13.75 [b]	176.02 ± 73.83 [a]	4.84 ± 1.55 [a]	22.44 ± 13.21 [ab]
	48 h	Control	44.74 ± 9.65 [a]	133.19 ± 25.19 [a]	4.72 ± 0.74 [a]	49.12 ± 13.88 [a]
		IHg2	87.62 ± 64.65 [a]	94.23 ± 22.39 [a]	4.84 ± 0.96 [a]	26.74 ± 16.71 [a]
		MeHg2	34.80 ± 20.38 [a]	127.22 ± 29.84 [a]	5.18 ± 1.77 [a]	25.73 ± 14.78 [a]
		IHg20	61.89 ± 38.45 [a]	138.63 ± 27.14 [a]	4.79 ± 1.49 [a]	28.65 ± 12.81 [a]
		MeHg20	39.04 ± 38.28 [a]	121.57 ± 34.40 [a]	4.51 ± 1.05 [a]	43.32 ± 20.57 [a]
	96 h	Control	66.23 ± 47.02 [a]	144.65 ± 43.93 [a]	4.94 ± 2.61 [a]	34.35 ± 15.70 [a]
		IHg2	51.06 ± 13.02 [a]	116.13 ± 26.76 [a]	3.54 ± 0.65 [a]	26.14 ± 2.00 [a]
		MeHg2	33.52 ± 15.54 [a]	118.64 33.42 [a]	4.91 ± 1.44 [a]	24.86 ± 17.29 [a]
		IHg20	54.56 ± 9.81 [a]	110.04 ± 18.25 [a]	4.38 ± 0.74 [a]	19.46 ± 9.40 [a]
		MeHg20	65.85 ± 30.33 [a]	137.03 ± 13.28 [a]	3.77 ± 0.58 [a]	20.50 ± 6.27 [a]
Digestive gland	24 h	Control	46.32 ± 23.65 [a]	245.07 ± 68.30 [a]	5.97 ± 2.30 [a]	38.77 ± 23.61 [a]
		IHg2	212.41 ± 89.52 [b]	239.84 ± 47.80 [a]	6.46 ± 1.41 [a]	34.26 ± 19.86 [a]
		MeHg2	164.15 ± 37.96 [b]	256.13 ± 69.47 [a]	5.86 ± 1.09 [a]	36.71 ± 18.20 [a]
		IHg20	96.35 ± 62.30 [ab]	237.60 ± 100.51 [a]	7.18 ± 3.17 [a]	31.07 ± 15.76 [a]
		MeHg20	123.93 ± 80.21 [ab]	237.36 ± 69.54 [a]	6.56 ± 1.58 [a]	36.55 ± 18.97 [a]
	48 h	Control	93.48 ± 63.56 [a]	236.28 ± 46.86 [a]	4.82 ± 1.44 [a]	55.54 ± 7.84 [a]
		IHg2	173.46 ± 43.06 [a]	227.04 ± 58.03 [a]	5.39 ± 0.26 [a]	43.92 ± 12.01 [a]
		MeHg2	108.86 ± 67.05 [a]	263.92 ± 112.80 [a]	5.99 ± 1.71 [a]	41.16 ± 19.86 [a]
		IHg20	135.49 ± 22.46 [a]	320.98 ± 81.76 [a]	5.06 ± 0.87 [a]	33.79 ± 15.99 [a]
		MeHg20	95.41 ± 62.15 [a]	247.94 ± 102.08 [a]	6.66 ± 2.07 [a]	36.60 ± 16.46 [a]
	96 h	Control	210.42 ± 35.15 [a]	258.30 ± 5.08 [a]	5.03 ± 1.21 [a]	65.51 ± 9.87 [a]
		IHg2	137.41 ± 73.50 [a]	295.58 ± 80.64 [a]	4.95 ± 0.58 [a]	39.57 ± 8.95 [a]
		MeHg2	114.95 ± 27.10 [a]	231.50 ± 93.63 [a]	4.60 ± 1.53 [a]	37.26 ± 11.20 [a]
		IHg20	145.56 ± 42.35 [a]	307.05 ± 62.55 [a]	6.02 ± 0.64 [a]	39.46 ± 8.91 [a]
		MeHg20	114.79 ± 53.54 [a]	312.61 ± 106.77 [a]	4.21 ± 0.45 [a]	50.59 ± 13.31 [a]
Rests	24 h	Control	29.97 ± 11.50 [a]	140.36 ± 24.30 [a]	4.86 ± 0.40 [a]	34.50 ± 7.84 [a]
		IHg2	30.78 ± 5.30 [a]	204.17 ± 24.05 [b]	8.51 ± 1.41 [b]	48.26± 16.02 [ab]
		MeHg2	37.98 ± 14.40 [a]	143.43 ± 26.37 [a]	7.49 ± 0.98 [b]	81.94 ± 10.13 [c]
		IHg20	32.51 ± 16.56 [a]	137.43 ± 36.84 [a]	5.14 ± 0.33 [a]	26.49 ± 75.08 [a]
		MeHg20	24.90 ± 6.44 [a]	155.64 ± 40.86 [ab]	2.33 ± 1.11 [c]	56.82 ± 4.72 [b]
	48 h	Control	30.07 ± 6.35 [a]	150.13 ± 19.44 [a]	4.87 ± 0.58 [a]	23.65 ± 4.17 [a]
		IHg2	40.64 ± 13.28 [a]	167.08 ± 43.65 [ab]	6.60 ± 1.28 [ab]	54.93 ± 10.98 [bc]
		MeHg2	41.82 ± 17.74 [a]	155.62 ± 32.46 [ab]	6.88 ± 0.78 [b]	76.07 ± 11.64 [b]
		IHg20	47.09 ± 15.63 [a]	209.31 ± 30.19 [b]	9.47 ± 0.78 [c]	49.89 ± 13.52 [ab]
		MeHg20	49.00 ± 19.59 [a]	144.04 ± 36.67 [a]	2.75 ± 0.53 [d]	65.73 ± 6.17 [c]
	96 h	Control	45.30 ± 28.25 [a]	165.93 ± 33.36 [a]	5.08 ± 0.57 [a]	29.13 ± 11.48 [a]
		IHg2	25.85 ± 4.92 [a]	148.87 ± 20.44 [a]	10.08 ± 2.10 [b]	60.86 ± 7.65 [bc]
		MeHg2	39.69 ± 6.40 [a]	150.17 ± 38.09 [a]	7.17 ± 0.43 [b]	76.44 ± 10.00 [b]
		IHg20	44.59 ± 23.80 [a]	208.19 ± 49.39 [a]	8.70 ± 1.38 [b]	41.68 ± 14.77 [ac]
		MeHg20	35.18 ± 6.54 [a]	153.82 ± 29.08 [a]	1.82 ± 0.47 [c]	63.14 ± 3.56 [bc]

Tableau 1-5. Relative gene expression level in gills, digestive gland and rests of cat, sod, gst, mt involved in defence and atp, cox, ldh, ampk, cs, aox, and cs involved in energy metabolism of *D. polymorpha* exposed 24h, 48h and 96h by diet to IHg and MeHg (mean ±SD, n=3-6; bold shows p< 0.05 against Control, different letters show p<0.05 between treatments when relevant).

Organ	Time	Condition	cat	sod	gst	mt	atp	cox	ldh	ampk	cs	aox
Gills	24h	Ctrl	1.00 ±0.30	1.00 ±0.37	1.00 ±0.36	1.00 ±0.90	1.00 ±0.56	1.00 ±0.37	1.00 ±0.42	1.00 ±0.38	1.00 ±0.28	1.00 ±0.44
		IHg2	1.38 ±0.90	1.02 ±0.90	1.08 ±0.43	0.76 ±0.55	1.37 ±0.49	1.02 ±0.26	1.02 ±0.56	1.04 ±0.81	1.08 ±0.38	0.70 ±.39
		MeHg2	0.82 ±0.22	1.12 ±0.53	0.85 ±0.30	1.11 ±0.93	1.31 ±0.80	1.24 ±0.74	0.85 ±0.32	1.73 ±1.37	1.18 ±0.72	0.53 ±0.47
		IHg20	0.67 ±0.27	1.16 ±0.51	1.07 ±0.39	0.73 ±0.37	1.60 ±0.57	1.25 ±0.37	0.70 ±0.34	1.49 ±0.23	0.83 ±0.27	0.86 ±0.26
		MeHg20	1.46 ±0.64	1.82 ±0.70	0.65 ±0.45	1.07 ±0.74	1.78 ±0.67	1.29 ±0.49	0.97 ±0.32	0.93 ±0.37	1.01 ±0.36	1.34 ±1.12
	48h	Ctrl	1.00 ±0.26	1.00 ±1.27	1.00 ±0.28	1.00 ±0.36	1.00 ±0.48	1.00 ±0.43	1.00 ±0.74	1.00 ±0.95	1.00 ±0.42	1.00 ±0.27
		IHg2	0.81 ±0.57	0.90 ±0.24	0.83 ±0.37	0.64 ±0.42	1.29 ±0.35	1.13 ±0.49	0.62 ±0.13	2.21 ±0.90	1.11 ±0.32	0.56 ±0.10
		MeHg2	0.61 ±0.53	0.70 ±0.45	0.69 ±0.36	0.54 ±0.21	1.40 ±1.40	1.30 ±1.03	0.85 ±0.25	2.43 ±2.17	1.25 ±0.22	1.19 ±0.66
		IHg20	1.64 ±1.46	0.91 ±0.39	0.95 ±1.03	0.73 ±0.37	1.27 ±0.93	0.83 ±0.42	0.59 ±0.07	1.43 ±0.59	1.36 ±1.62	0.23 ±0.34
		MeHg20	1.53 ±0.98	1.14 ±0.81	0.99 ±0.59	1.06 ±1.19	2.16 ±1.23	0.83 ±0.23	0.68 ±0.38	1.06 ±0.61	1.55 ±2.30	0.59 ±0.08
	96h	Ctrl	1.00 ±0.21	1.00 ±0.64	1.00 ±0.68	1.00 ±0.64	1.00 ±0.43	1.00 ±0.33	1.00 ±0.51	1.00 ±0.59	1.00 ±0.37	1.00 ±0.50
		IHg2	0.87 ±0.32	0.96 ±0.33	1.33 ±0.21	0.49 ±0.22	1.56 ±1.14	0.74 ±0.41	0.55 ±0.11	0.92 ±0.45	0.82 ±0.38	0.80 ±0.89
		MeHg2	1.10 ±0.40	1.25 ±0.74	0.89 ±0.11	0.73 ±0.57	1.96 ±0.63	1.01 ±0.78	0.69 ±0.31	1.08 ±0.59	0.95 ±0.45	1.71 ±0.39
		IHg20	1.33 ±0.32	1.76 ±0.86	0.96 ±0.75	0.76 ±0.18	1.52 ±1.24	0.69 ±0.53	0.86 ±1.23	1.17 ±1.24	1.41 ±1.91	0.86 ±1.28
		MeHg20	1.04 ±0.38	1.57 ±0.79	0.82 ±0.47	0.82 ±0.36	2.12 ±1.45	0.76 ±0.40	0.53 ±0.24	0.46 ±0.24	1.16 ±0.21	1.85 ±1.40
Digestive gland	24h	Ctrl	1.00 ±0.44	1.00 ±0.41	1.00 ±0.91	1.00 ±1.04	1.00 ±1.95	1.00 ±1.07	1.00 ±1.58	1.00 ±0.68	1.00 ±1.90	1.00 ±.66
		IHg2	1.05 ±1.47	1.35 ±1.08	0.90 ±0.65	0.43 ±0.79	0.70 ±1.08	1.29 ±0.81	0.72 ±0.58	1.01 ±0.59	0.60 ±0.22	0.65 ±0.52
		MeHg2	0.57 ±0.32	1.03 ±0.60	0.54 ±0.24	0.64 ±0.44	0.49 ±0.18	0.90 ±0.43	0.60 ±0.32	0.59 ±0.34	0.48 ±0.46	0.59 ±0.26
		IHg20	0.68 ±0.38	1.82 ±0.63	0.88 ±0.49	1.20 ±0.40	0.51 ±0.18	0.95 ±0.23	0.41 ±0.34	0.65 ±0.44	0.54 ±0.17	0.59 ±0.29
		MeHg20	1.00 ±0.66	1.33 ±0.31	0.67 ±0.37	1.01 ±0.95	0.74 ±0.73	1.71 ±1.85	0.47 ±0.35	1.13 ±0.51	0.82 ±0.38	1.17 ±0.44
	48h	Ctrl	1.00 ±0.50	1.00 ±0.54	1.00 ±1.25	1.00 ±1.10	1.00 ±0.97	1.00 ±0.36	1.00 ±0.80	1.00 ±0.29	1.00 ±0.42	1.00 ±0.52^{ab}
		IHg2	0.63 ±0.20	1.09 ±0.45	0.80 ±1.38	0.86 ±0.61	1.03 ±0.72	0.75 ±0.44	0.57 ±0.16	1.06 ±0.28	0.82 ±0.34	0.60 ±0.17^{a}
		MeHg2	0.59 ±0.34	0.78 ±0.44	0.71 ±0.23	0.69 ±0.44	1.24 ±0.67	0.65 ±0.43	0.47 ±0.26	0.87 ±0.41	0.71 ±0.72	0.98 ±0.59^{ab}
		IHg20	0.60 ±0.65	1.02 ±1.15	0.69 ±0.30	0.86 ±0.25	1.02 ±0.08	0.63 ±0.41	0.60 ±0.06	0.79 ±0.48	0.61 ±0.15	0.62 ±0.20^{a}
		MeHg20	0.47 ±0.35	1.10 ±0.44	0.62 ±0.20	0.99 ±0.73	1.53 ±0.54	0.75 ±0.34	0.69 ±0.44	1.10 ±0.80	1.09 ±0.33	1.99 ±0.24^{b}
	96h	Ctrl	1.00 ±0.80	1.00 ±0.35	1.00 ±1.23	1.00 ±0.70^{ab}	1.00 ±0.57	1.00 ±0.70	1.00 ±0.34	1.00 ±0.36	1.00 ±0.29	1.00 ±0.60

		IHg2	1.04 ±0.53	1.53 ±0.58	1.31 ±0.80	1.61 ±1.05^{ab}	1.11 ±0.26	1.08 ±0.80	0.57 ±0.51	1.24 ±0.27	0.78 ±0.17	0.79 ±0.29

Tableau 1-5 – Suite. Relative gene expression level in gills, digestive gland and rests of cat, sod, gst, mt involved in defence and atp, cox, ldh, ampk, cs, aox, and cs involved in energy metabolism of *D. polymorpha* exposed 24h, 48h and 96h by diet to IHg and MeHg (mean ±SD, n=3-6; bold shows p< 0.05 against Control, different letters show p<0.05 between treatments when relevant).

Organ	Time	Condition	cat	sod	gst	mt	atp	cox	ldh	ampk	cs	aox
Digestive gland	96h	MeHg2	0.69 ±0.49	0.95 ±0.61	0.48 ±0.34	0.52 ±0.24^{a}	0.87 ±0.33	0.80 ±0.30	0.50 ±0.34	0.67 ±0.80	0.52 ±0.13	0.98 ±0.35
		IHg20	0.92 ±0.34	1.64 ±0.90	1.13 ±0.83	1.44 ±0.95^{b}	0.67 ±0.52	0.72 ±0.23	0.76 ±0.26	0.95 ±0.22	0.64 ±0.13	0.74 ±0.39
		MeHg20	0.82 ±0.46	1.51 ±0.83	0.83 ±0.33	0.95 ±0.23^{ab}	1.21 ±0.88	0.77 ±0.25	0.65 ±0.29	0.79 ±0.75	0.74 ±0.30	1.41 ±1.28
Rests	24h	Ctrl	1.00 ±0.31	1.00 ±0.69	1.00 ±0.56	1.00 ±0.67	1.00 ±0.19^{ab}	1.00 ±0.55	1.00 ±0.62	1.00 ±0.75	1.00 ±0.52	1.00 ±0.35
		IHg2	0.87 ±0.65	0.73 ±0.46	0.73 ±0.33	0.79 ±0.71	0.66 ±0.20^{a}	1.80 ±0.74	1.07 ±0.36	1.01 ±0.58	0.69 ±0.18	0.77 ±0.41
		MeHg2	0.79 ±0.53	0.80 ±0.40	0.69 ±0.49	0.68 ±0.50	0.62 ±0.41^{ab}	1.14 ±0.82	1.02 ±0.30	0.89 ±0.90	1.15 ±0.90	1.14 ±0.56
		IHg20	0.74 ±0.29	1.17 ±0.71	1.49 ±1.03	1.04 ±0.41	1.54 ±1.13^{b}	2.46 ±1.37	1.44 ±0.53	1.59 ±1.41	1.11 ±0.50	2.13 ±0.72
		MeHg20	1.12 ±0.67	0.76 ±0.38	0.76 ±0.28	1.05 ±1.22	0.88 ±1.53^{ab}	1.73 ±1.55	1.22 ±0.31	1.02 ±0.87	1.50 ±0.53	1.63 ±0.50
	48h	Ctrl	1.00 ±0.23	1.00 ±0.99	1.00 ±0.39	1.00 ±0.56	1.00 ±0.27	1.00 ±0.26	1.00 ±0.41	1.00 ±0.30	1.00 ±0.34	1.00 ±0.37
		IHg2	0.77 ±0.22	1.77 ±1.43	0.94 ±0.34	0.91 ±0.14	0.91 ±0.52	0.78 ±0.45	0.98 ±0.41	1.82 ±2.85	0.92 ±0.68	1.12 ±0.65
		MeHg2	0.79 ±0.21	1.25 ±0.40	0.93 ±0.34	0.95 ±0.70	1.03 ±0.80	0.64 ±0.30	0.89 ±0.27	1.10 ±0.75	1.07 ±0.70	1.46 ±0.89
		IHg20	0.63 ±0.24	1.65 ±1.17	0.91 ±0.54	1.12 ±0.83	1.01 ±0.34	0.77 ±0.28	0.90 ±0.22	1.22 ±0.73	0.95 ±0.39	1.08 ±0.43
		MeHg20	1.07 ±0.27	1.46 ±1.85	0.76 ±0.32	0.84 ±0.89	1.07 ±0.92	0.81 ±0.55	1.02 ±0.54	1.31 ±1.19	1.40 ±0.70	1.21 ±0.57
	96h	Ctrl	1.00 ±0.46	1.00 ±0.68	1.00 ±0.57	1.00 ±0.38^{ab}	1.00 ±0.34	1.00 ±0.16	1.00 ±0.35	1.00 ±0.28	1.00 ±0.34	1.00 ±0.20
		IHg2	1.24 ±0.71	1.92 ±1.01	2.02 ±0.41	0.55 ±0.79^{ab}	1.81 ±0.68	0.26 ±0.82	1.19 ±0.09	1.16 ±0.59	1.16 ±0.54	0.89 ±0.40
		MeHg2	1.07 ±0.65	1.29 ±0.65	1.15 ±1.01	1.96 ±1.30^{a}	1.29 ±0.17	1.12 ±0.43	1.23 ±0.27	1.07 ±1.07	1.30 ±0.37	0.99 ±0.46
		IHg20	1.16 ±0.21	2.25 ±1.00	1.50 ±1.27	1.35 ±0.76^{ab}	1.22 ±0.35	0.94 ±0.48	1.47 ±0.46	1.11 ±0.34	1.44 ±0.48	1.03 ±0.54
		MeHg20	1.13 ±0.08	2.74 ±0.50	1.90 ±0.97	0.33 ±1.04^{b}	1.31 ±0.47	1.02 ±0.62	1.28 ±0.25	1.25 ±0.81	1.16 ±0.51	1.36 ±0.71

4. Discussion

Comparing the bioaccumulation and effects of dietary IHg and MeHg in *D. polymorpha* revealed differences in both their bioaccumulation patterns and subsequent impacts. In MeHg exposure, mussels showed a reduced FR at the beginning of feeding at 24 h and in 38 % of individuals in longer exposures. However, *D. polymorpha* bioaccumulated more MeHg than IHg in the three tissues, with highest concentrations in gills in MeHg20 exposure. In congruence, there was more histological damages observed in MeHg exposures. In contrast, effects on antioxidant enzymes were mainly observed in rests, that were not directly exposed to diet and few modulations were observed in gene expression.

D. polymorpha accumulated both IHg and MeHg over the 96 h-exposure period with higher BAFs for MeHg2 and MeHg20 in the gills and higher BAF for IHg2 in the digestive gland. This is in line with a higher THg concentration in the digestive gland at 96 h than in other tissues. In previous studies, *D. polymorpha* exposed to 280 ng/L MeHg in water for 1 and 7 d had BAF of 755 and 3973 respectively (Baratange et al., 2022). Our findings suggested that dietary exposure to MeHg led to lower BAF values than water exposure in *D. polymorpha,* although comparison remains limited because of quite different concentrations. However, data on IHg bioaccumulation in *D. polymorpha* remain unavailable. For comparison, in *Perna perna* exposed to 50 µg/L IHg in water over 2 and 4 d, whole soft tissues accumulated 3 and 7 µg THg/g respectively (Anandraj et al. 2002). This is 5.8 × and 3.4 × lower than for IHg2 in the digestive gland of *D. polymorpha*, and comparable to those found in the rests after 2 and 4 d (3.44 and 5.36 µg/g), in our study. This suggests comparable Hg bioaccumulation in *D. polymorpha* when exposed via diet, underscoring the relevance of dietary exposure in realistic environmental conditions. Nonetheless, these comparisons between whole tissue and specific organs emphasize a notable gap in research on Hg organotropism and fate in bivalves.

Consistent with the higher BAF for MeHg than IHg in gills, MeHg exposure appeared to reduce filtration activity during the first hour compared to IHg, though this effect did not persist with longer exposures. By the end of feeding, all microalgae had been filtered, confirming trophic Hg uptake and indicating no correlation between early filtration behavior and final bioaccumulation levels. There is a lack of studies examining the effects of dietary Hg on bivalve filtration rates, limiting direct comparisons with our experimental conditions and underscoring the need for more research concerning bivalves. For instance, a study exposing *D. polymorpha* to 40 µg / L of waterborne MeHg and IHg for 2 h reported non-significant difference in FR compared to control (Faria et al., 2009), though the concentration used was approximately 500 × the Hg EQS. In *C. fluminea,* a 1 h exposure to 30 µg / L waterborne IHg reduced filtration activity by 78 % (Oliveira et al., 2018). Similarly, in *P. perna,* exposure to 50 µg/L IHg for 2, 4, 8, 16, 24 d significantly reduced FR by 42 and 61% by 2 and 16 d, respectively, compared to the control (Anandraj et al., 2002). However, these studies were conducted at concentrations 400-700 × above the EQS, raising questions about their environmental relevance and limiting comparability with our exposure levels. Our findings suggest that MeHg exposure may influence FR of *D. polymorpha* in the first hour, a response not observed with IHg and during prolonged exposures. Together with other studies, these results suggest Hg may alter filtration behavior in bivalves. Gills of *Mytilus edulis* and *Crassostrea virginica* were shown to contain serotonergic and dopaminergic fibers which function both as peripheral and ganglionic neurotransmitters that regulate cilia beating rate

(Sauvey et al., 2021). In *D. polymorpha* flow rate was shown to be under the control of gills muscles that responded to neurotransmitters (Medler and Silverman, 2021). Effects on motor functions related to valve opening and shell gaping have been documented, for example in *B. azoricus* exposed to 20 µg/L IHg over 21 d under controlled laboratory conditions (Kádár et al., 2005), consistent with its expected neurotoxicity (Baatrup et al., 1991). Similarly, shell gaping in *Corbicula fluminea* in response to IHg exposure was observed for exposures ≥ 5.1 µg/L and duration ≥ 5 h (Tran et al., 2007). Thus, a reduction in filtration could indicate a neurotoxic effect of MeHg in our experimental conditions. Despite these findings, further investigation is necessary to confirm whether such neurotoxic effects impact feeding. In bivalves, the neural regulation of filtration for feeding remains a debated topic, as filtration rates appeared mainly influenced by the physical characteristics of microalgae and chemosensory detection (Rosa et al., 2018).

Histopathological analyses have shown that waterborne Hg bioaccumulation can significantly impact mussel tissues: IHg exposure has been reported to damage gills and disrupt the structure of digestive gland tissues, leading to necrosis, tubular atrophy, and hemocyte infiltration (Chalghmi et al., 2015; Sheir et al., 2010; Sikdokur et al., 2020) aligning with our observations. For example, *Mytilus edulis* exposed to 50 µg/L IHg for 14 d exhibited gill injuries, including cilia erosion and severe degeneration of digestive tubules (Amachree et al., 2014). At lower IHg concentrations, *Cerastoderma edule* exposed to 10 µg/L IHg for 6 d developed fibrosis in interstitial tubules and extensive hemocytes infiltration, which we also observed here (Bejaoui et al., 2020). In the present study, MeHg exposure led to 22-50 % fibrosis and gill alterations, while 32-34 % of digestive gland tubules were affected. These effects are consistent with those seen in *D. polymorpha* exposed for 7 d to 430 ng/L of waterborne MeHg (Baratange et al., 2022). Comparing our findings with the reported effects of waterborne Hg, dietary Hg exposure appears to produce similar tissue damages in mussels. Notably, MeHg caused more pronounced pathologies than IHg, likely due to its higher bioaccumulation, except for nuclear alterations in digestive glands. However, the scarcity of histopathological studies on MeHg in bivalves limits direct comparisons. Cellular ultrastructure, a key indicator of cellular function, has proven valuable in ecotoxicology (Segner and Braunbeck, 1990, 1998; Biagianti-Risbourg, 1997). Here, findings indicated that dietary MeHg bioaccumulation in gills leads to cellular alterations, which may compromise tissue functionality.

A selection of biomarkers was used to evaluate defense responses (Oliveira et al, 2015). We observed significant increase in CAT, GST and SOD activity in *D. polymorpha* exposed to dietary IHg2, IHg20, consistent with responses observed in other species exposed to waterborne IHg. For instance, CAT, GST, and SOD activities increased in *C. edule* exposed for 6 d to 1, 10 and 100 µg/L IHg (Bejaoui et al, 2020). Similarly, CAT and GST activities rose in *C. fluminea* exposed 8 d to 30 µg/L IHg in water (Oliveira et al, 2018). In addition, MeHg2 and MeHg20 exposures elevated SOD activity in rests, aligning with findings in *D. polymorpha* exposed for 7 d to 280 ng/L MeHg in water, which showed 1.6 × increased in SOD activity in gills and 1.2 × increase in the digestive gland (Baratange et al. 2022). This comparison reveals distinct cellular responses, although similar Hg bioaccumulation was reported in the latter study. Increase in LOOH levels, which indicate oxidative damage, were also observed 2.5 × higher in *C. fluminea* compared to control (Oliveira et al, 2018), aligning with our observations in rests of *D. polymorpha* exposed to IHg and MeHg at 24, 48 and 96 h. Among the three tissues examined, rests showed the most rapid and highest lipid peroxidation levels, while gills showed no oxidative stress. Our study demonstrated that Hg

ingested through contaminated microalgae influenced antioxidant enzyme activity and caused lipid peroxidation in *D. polymorpha* tissues, both through direct exposure and after digestion. This suggested that dietborne Hg can impair or even overwhelm the repair and protective mechanisms against oxidative damage. Conversely, Hg exposure through water and diet elicited broadly similar overall responses in *D. polymorpha*, likely due to inherent chemical properties of Hg. However, the specific exposure pathway and the form of Hg led to distinct, nuanced responses when examined in detail.

In our experimental conditions, we observed changes in the expression of genes related to defense responses. Specifically, *sod* transcripts were upregulated in rests of *D. polymorpha* exposed to MeHg20 compared to control. This upregulation of *sod* transcripts may suggest an increase in transcription to counter the observed decrease in SOD activity when *D. polymorpha* is exposed to MeHg20. Similar upregulation of *sod* and *cat* transcripts was previously reported in gills of *D. polymorpha* exposed 7 d to 430 ng/L waterborne MeHg (Baratange et al. 2022), consistent with the increased ROS production often associated with Hg exposure and its impact on antioxidant defenses. In addition, we observed only one significant gene response in MeHg20 at 96h within rests, which are indirectly exposed by microalgal digestion. Mitochondria and energy metabolism are additional key toxicity targets of Hg. MeHg exposure impacted mitochondria (Ferreira et al., 2018; Corrêa et al., 2020), causing mitochondrial membrane depolarization in synaptosomes (Hare and Atchinson, 1992), as well as mitochondrial bodies and membrane damage that impair metabolic capacities (Baratange et al., 2022). Previous studies showed that proteins involved in energy metabolism were modulated, as observed via shotgun proteomics in *D. polymorpha* exposed to 430 ng/L waterborne MeHg (Baratange et al., 2023). Here, transcripts associated with energy metabolism were downregulated in gills and digestive gland: *cs* is involved in the first phase of the Krebs cycle (Siu et al., 2003) and *aox* in the integration of carbon metabolism and electron transport (Vanlerberghe and Ordog, 2002). Their downregulation suggested an impact of Hg on the energy metabolism of *D. polymorpha*, particularly in organs directly exposed to contaminated food. Overall, the distinct response patterns observed between IHg and MeHg exposure supported that each Hg form had different molecular toxicity targets.

5. Conclusion

Data presented here demonstrated that dietborne Hg led to molecular and cellular damage in *D. polymorpha* across all three studied tissues. The most pronounced histological effects occurred at higher concentrations of Hg, with greater severity observed for MeHg compared to IHg exposures, aligning with the differences in BAF. Additionally, the filtration behavior of *D. polymorpha* indicated varying toxicity between dietary MeHg and IHg, though both forms led to significant bioaccumulation within *D. polymorpha* tissues. The use of enriched stable isotopes of Hg would be useful to characterize its speciation and bioconversion in microalgae and zebra mussels to further characterize the dietary transfer of Hg between the two species. Overall, these data suggested that exposure to dietborne IHg and MeHg caused toxicity symptoms similar to those observed with waterborne Hg exposure. However, the effects varied between the gills, digestive gland, and rests. This variability likely arises from the different modes of exposure: gills are affected by direct contact, the digestive gland is impacted through both contact and digestion, while rests are influenced exclusively after digestion. This highlights the importance of

understanding the fate of Hg in relation to the observed responses. For example, genes involved in antioxidant responses were activated in rests, whereas genes involved in energy metabolism were affected in gills and the digestive gland. In addition, differences in effects between IHg and MeHg also plaid for different toxicity pathways. These differences are not fully elucidated by endpoints used here. Non-targeted high throughput approaches, such as metabolomic and proteomic could provide valuable insights into the molecular toxicity pathways of IHg and MeHg.

Due to their ecological significance, abundance, and potential for biomonitoring, it is crucial to study the fate and cellular toxicity pathways of dietary Hg at environmental concentrations in representative bivalves. Aquatic ecosystems are vulnerable and interconnected. Hg contamination can affect the health of various species within these ecosystems, from plankton, low trophic level invertebrates to fish and mammals, including humans. Governments and environmental organizations require comprehensive data on Hg risks to develop more effective regulations and conservation strategies. Understanding the dietary pathways of Hg and the associated toxicity will help assess its overall impact on biodiversity and ecosystem stability.

6. References

Amachree, D., Moody, A.J., Handy, R.D., 2014. Comparison of intermittent and continuous exposures to inorganic mercury in the mussel, *Mytilus edulis*: Accumulation and sub-lethal physiological effects. Ecotoxicol. Environ. Saf. 109, 133–142. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.07.025

Anandraj, A., Marshall, D., Gregory, M., McClurg, T., 2002. Metal accumulation, filtration and O2 uptake rates in the mussel *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia) exposed to Hg2+, Cu2+ and Zn2+. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 132, 355–63. https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00081-9

Baatrup, E., 1991. Structural and functional effects of heavy metals on the nervous system, including sense organs, of fish. Comp. Biochem. Physiol. C: Comparative Pharmacology 100, 253–257. https://doi.org/10.1016/0742-8413(91)90163-N

Baldwin, B.S., Mayer, M.S., Dayton, J., Pau, N., Mendilla, J., Sullivan, M., Moore, A., Ma, A., Mills, E.L., 2002. Comparative growth and feeding in zebra and quagga mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): Implications for North American lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci 59, 680–694. https://doi.org/10.1139/f02-043

Baratange, C., Baali, H., Gaillet, V., Bonnard, I., Delahaut, L., Gaillard, J.-C., Grandjean, D., Sayen, S., Gallorini, A., Le Bris, N., Renault, D., Breider, F., Loizeau, J.-L., Armengaud, J., Cosio, C., 2023. Bioaccumulation and molecular effects of carbamazepine and methylmercury co-exposure in males of *Dreissena polymorpha*. Sci. Total. Environ. 897, 165379. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165379

Baratange, C., Paris-Palacios, S., Bonnard, I., Delahaut, L., Grandjean, D., Wortham, L., Sayen, S., Gallorini, A., Michel, J., Renault, D., Breider, F., Loizeau, J.-L., Cosio, C., 2022. Metabolic, cellular and defense responses to single and co-exposure to carbamazepine and methylmercury in *Dreissena polymorpha*. Environ. Pollut. 300, 118933. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.118933

Bejaoui, S., Chaâbane, M., Fouzai, C., Chetoui, I., Chalbi, E., Nechi, S., Chalghaf, M., El Cafsi, M., Soudani, N., 2020. Exploring the impacts of mercury chloride exposure on fatty acids profile, oxidative stress response and histomorphological aspect of *Cerastoderma edule* detoxifying organs. Ecol. Indic. 118, 106798. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106798

Biagianti-Risbourg, S., 1997. Les perturbations (ultra)structurales du foie des poissons utilisées comme biomarqueurs de la qualité sanitaire des milieux aquatiques. In: Lagadic Amiard, J.C., Caquet, T., And Ramande, F., (EDS), Utilisation de biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux. Masson Pub., Paris, 355-391

Blinick N.S., Link D., Ahrenstorff T.D., Bethke B.J., Fleishman A.B., Janssen S.E., Krabbenhoft D.P., Nelson J.K.R., Rantala H.M., Rude C.L., Hansen G.J.A., 2024. Increased mercury concentrations in walleye and yellow perch in lakes invaded by zebra mussels. Sci Total Environ, 957, 177515. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.177515

Bravo, A.G., Cosio, C., Amouroux, D., Zopfi, J., Chevalley, P.-A., Spangenberg, J.E., Ungureanu, V.-G., Dominik, J., 2014. Extremely elevated methyl mercury levels in water, sediment and organisms in a Romanian reservoir affected by release of mercury from a chlor-alkali plant. Water Res. 49, 391–405. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.024

Carrasco, L., Díez, S., Soto, D.X., Catalan, J., Bayona, J.M., 2008. Assessment of mercury and methylmercury pollution with zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in the Ebro River (NE Spain) impacted by industrial hazardous dumps. Sci. Total. Environ. 407, 178–184. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.07.031

Chalghmi, H., Bourdineaud, J.-P., Haouas, Z., Gourves, P.-Y., Zrafi, I., Saidane-Mosbahi, D., 2016. Transcriptomic, Biochemical, and Histopathological Responses of the Clam *Ruditapes decussatus* from a Metal-Contaminated Tunis Lagoon. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 70, 241–256. https://doi.org/10.1007/s00244-015-0185-0

Corrêa, M.G., Bittencourt, L.O., Nascimento, P.C., Ferreira, R.O., Aragão, W.A.B., Silva, M.C.F., Gomes-Leal, W., Fernandes, M.S., Dionizio, A., Buzalaf, M.R., Crespo-Lopez, M.E., Lima, R.R., 2020. Spinal cord neurodegeneration after inorganic mercury long-term exposure in adult rats: Ultrastructural, proteomic and biochemical damages associated with reduced neuronal density. Ecotoxicol. Environ. Saf. 191, 110159. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110159

Depew, D.C., Basu, N., Burgess, N.M., Campbell, L.M., Devlin, E.W., Drevnick, P.E., Hammerschmidt, C.R., Murphy, C.A., Sandheinrich, M.B., Wiener, J.G., 2012. Toxicity of dietary methylmercury to fish: derivation of ecologically meaningful threshold concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 31, 1536–1547. https://doi.org/10.1002/etc.1859

Driscoll, C.T., Mason, R.P., Chan, H.M., Jacob, D.J., Pirrone, N., 2013. Mercury as a Global Pollutant: Sources, Pathways, and Effects. Environ. Sci. Technol. 47, 4967–4983. https://doi.org/10.1021/es305071v

Elia, A.C., Galarini, R., Taticchi, M.I., Dörr, A.J.M., Mantilacci, L., 2003. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. Ecotoxicol. Environ. Saf. 55, 162–167. https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00123-9

Evers, D.C., Ackerman, J.T., Åkerblom, S., Bally, D., Basu, N., Bishop, K., Bodin, N., Braaten, H.F.V., Burton, M.E.H., Bustamante, P., Chen, C., Chételat, J., Christian, L., Dietz, R., Drevnick,

P., Eagles-Smith, C., Fernandez, L.E., Hammerschlag, N., Harmelin-Vivien, M., Harte, A., Krümmel, E.M., Brito, J.L., Medina, G., Barrios Rodriguez, C.A., Stenhouse, I., Sunderland, E., Takeuchi, A., Tear, T., Vega, C., Wilson, S., Wu, P., 2024. Global mercury concentrations in biota: their use as a basis for a global biomonitoring framework. Ecotoxicology 33, 325–396. https://doi.org/10.1007/s10646-024-02747-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, 281–288. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.07.012

Fernández Robledo, J.A., Yadavalli, R., Allam, B., Pales Espinosa, E., Gerdol, M., Greco, S., Stevick, R.J., Gómez-Chiarri, M., Zhang, Y., Heil, C.A., Tracy, A.N., Bishop-Bailey, D., Metzger, M.J., 2019. From the raw bar to the bench: Bivalves as models for human health. Dev. Comp. Immunol. 92, 260–282. https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.11.020

Ferreira, F.F., Nazari, E.M., Müller, Y.M.R., 2018. MeHg Causes Ultrastructural Changes in Mitochondria and Autophagy in the Spinal Cord Cells of Chicken Embryo. J. Toxicol. 2018, 8460490. https://doi.org/10.1155/2018/8460490

García-Medina, S., Galar-Martínez, M., Gómez-Oliván, L.M., Ruiz-Lara, K., Islas-Flores, H., Gasca-Pérez, E., 2017. Relationship between genotoxicity and oxidative stress induced by mercury on common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. Aquat. Toxicol. 192, 207–215. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.09.019

Géba, E., Rioult, D., Palluel, O., Dedourge-Geffard, O., Betoulle, S., Aubert, D., Bigot-Clivot, A., 2021. Resilience of *Dreissena polymorpha* in wastewater effluent: Use as a bioremediation tool? J. Environ. Manag. 278, 111513. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111513

Gentès, S., Maury-Brachet, R., Feng, C., Pedrero, Z., Tessier, E., Legeay, A., Mesmer-Dudons, N., Baudrimont, M., Maurice, L., Amouroux, D., Gonzalez, P., 2015. Specific effects of dietary methylmercury and inorganic mercury in zebrafish (*Danio rerio*) determined by genetic, histological, and metallothionein responses. Environ. Sci. Technol. 49, 14560–14569. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03586

Hare, M.F., Atchison, W.D., 1992. Comparative action of methylmercury and divalent inorganic mercury on nerve terminal and intraterminal mitochondrial membrane potentials. J. Pharmacol. Exp. Ther. 261, 166–172.

Jacquin, L., Gandar, A., Aguirre-Smith, M., Perrault, A., Hénaff, M.L., Jong, L.D., Paris-Palacios, S., Laffaille, P., Jean, S., 2019. High temperature aggravates the effects of pesticides in goldfish. Ecotoxicol. Environ. Saf. 172, 255–264. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.085

Jaffal, A., Betoulle, S., Biagianti-Risbourg, S., Terreau, A., Sanchez, W., Paris-Palacios, S., 2015. Heavy metal contamination and hepatic toxicological responses in brown trout (*Salmo trutta*) from the Kerguelen Islands. Polar Res. https://doi.org/10.3402/polar.v34.22784

Järup, L., 2003. Hazards of heavy metal contamination. Br. Med. Bull. 68, 167–182. https://doi.org/10.1093/bmb/ldg032

Kádár, E., Costa, V., Santos, R.S., Lopes, H., 2005. Behavioural response to the bioavailability of inorganic mercury in the hydrothermal mussel Bathymodiolus azoricus. J. Exp. Biol. 208, 505–513. https://doi.org/10.1242/jeb.01415

Kobak, J., Kakareko, T., 2011. The effectiveness of the induced anti-predator behaviour of zebra mussel *Dreissena polymorpha* in the presence of molluscivorous roach *Rutilus rutilus*. Aquat. Ecol. 45, 357–366. https://doi.org/10.1007/s10452-011-9359-7

Lee, Y.H., Kang, H.-M., Kim, D.-H., Wang, M., Jeong, C.-B., Lee, J.-S., 2017. Adverse effects of methylmercury (MeHg) on life parameters, antioxidant systems, and MAPK signaling pathways in the copepod *Tigriopus japonicus*. Aquat. Toxicol. 184, 133–141. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.01.010

Ludovisi, A., Goretti, E., Pallottini, M., Lucentini, L., Pizzirani, C., Vizzini, S., Mancinelli, G., 2022. Stable isotope analysis reveals trophic segregation between the invasive zebra mussel *Dreissena polymorpha* and the native duck mussel *Anodonta anatina* in Lake Trasimeno (Italy). Hydrobiologia 849, 2091–2108. https://doi.org/10.1007/s10750-022-04846-4

Mao, L., Liu, X., Wang, Z., Wang, B., Lin, C., Xin, M., Zhang, B.-T., Wu, T., He, M., Ouyang, W., 2021. Trophic transfer and dietary exposure risk of mercury in aquatic organisms from urbanized coastal ecosystems. Chemosphere 281, 130836. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130836

Medler, S., Silverman, H., 1997. Functional Organization of Intrinsic Gill Muscles in Zebra Mussels, *Dreissena polymorpha* (Mollusca: Bivalvia), and Response to Transmitters in Vitro. Invertebr. Biol. 116, 200–212. https://doi.org/10.2307/3226897

Molloy, D.P., Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Kurandina, D.P., Laruelle, F., 1997. Natural enemies of zebra mussels: Predators, parasites, and ecological competitors. Rev. Fish. Sci. Aquac 5, 27–97. https://doi.org/10.1080/10641269709388593

Morcillo, P., Esteban, M.A., Cuesta, A., Morcillo, P., Esteban, M.A., Cuesta, A., 2017. Mercury and its toxic effects on fish. AIMS Environ. Sci. 4, 386–402. https://doi.org/10.3934/environsci.2017.3.386

Newell, R.I.E., 2004. Ecosystem influences of natural and cultivated populations of suspension-feeding bivalve molluscs: a review. J. Shellfish Res. 23, 51–62.

Niane, B., Guédron, S., Moritz, R., Cosio, C., Ngom, P.M., Deverajan, N., Pfeifer, H.R., Poté, J., 2015. Human exposure to mercury in artisanal small-scale gold mining areas of Kedougou region, Senegal, as a function of occupational activity and fish consumption. Environ. Sci. Pollut. Res. 22, 7101–7111. https://doi.org/10.1007/s11356-014-3913-5

Oliveira, P., Barboza, L.G.A., Branco, V., Figueiredo, N., Carvalho, C., Guilhermino, L., 2018. Effects of microplastics and mercury in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774): Filtration rate, biochemical biomarkers and mercury bioconcentration. Ecotoxicol. Environ. Saf. 164, 155–163. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.062

Oliveira, P., Lopes-Lima, M., Machado, J., Guilhermino, L., 2015. Comparative sensitivity of European native (*Anodonta anatina*) and exotic (*Corbicula fluminea*) bivalves to mercury. Estuar. Coast. Shelf Sci., 167, 191–198. https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.06.014

Pack, E. chul, Lee, S., Kim, C., Lim, C., Sung, D., Kim, M., Park, K., Lim, K., Choi, D., Kim, S., 2014. Effects of environmental temperature change on mercury absorption in aquatic organisms with respect to climate warming. J. Toxicol. Environ. Health. Part A 77, 1477–90. https://doi.org/10.1080/15287394.2014.955892

Palos-Ladeiro, M., Barjhoux, I., Bigot-Clivot, A., Bonnard, M., David, E., Dedourge-Geffard, O., Geba, E., Lance, E., Lepretre, M., Magniez, G., Rioult, D., Aubert, D., Villena, I., Daniele, G., Salvador, A., Vulliet, E., Armengaud, J., Geffard, A., Ladeiro, M.P., Barjhoux, I., Bigot-Clivot, A., Bonnard, M., David, E., Dedourge-Geffard, O., Geba, 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: Organismal and Molecular Malacology. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/67995

Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S., Vernet, G., 2000. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. Aquat. Toxicol. 50, 109–124. https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00090-9

Roditi, H.A., Fisher, N.S., Sañudo-Wilhelmy, S.A., 2000. Uptake of dissolved organic carbon and trace elements by zebra mussels. Nature 407, 78–80. https://doi.org/10.1038/35024069

Rosa, M., Ward, J.E., Shumway, S.E., 2018. Selective Capture and Ingestion of Particles by Suspension-Feeding Bivalve Molluscs: A Review. J. Shellfish Res. 37, 727–746. https://doi.org/10.2983/035.037.0405

Sauvey, A., Denis, F., Hégaret, H., Le Roy, B., Lelong, C., Jolly, O., Pavie, M., Fauchot, J., 2021. Interactions between Filter-Feeding Bivalves and Toxic Diatoms: Influence on the Feeding Behavior of *Crassostrea gigas* and *Pecten maximus* and on Toxin Production by *Pseudo-nitzschia*. Toxins 13, 577. https://doi.org/10.3390/toxins13080577

Schaefer, K., Elshorbany, Y., Jafarov, E., Schuster, P.F., Striegl, R.G., Wickland, K.P., Sunderland, E.M., 2020. Potential impacts of mercury released from thawing permafrost. Nat. Commun. 11, 4650. https://doi.org/10.1038/s41467-020-18398-5

Segner, H., Braunbeck, T., 1990. Qualitative and quantitative assessment of the response of milkfish, *Chanos chanos*, fry to low-level copper exposure, in: Perkins, F.O., Cheng, T.C. (Eds.), Pathology in Marine Science. Academic Press, San Diego, pp. 347–368. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-550755-4.50040-9,

Siu, P.M., Donley, D.A., Bryner, R.W., Alway, S.E., 2003. Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. J. Appl. Physiol. 94, 555–560. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00821.2002

Sıkdokur, E., Belivermiş, M., Sezer, N., Pekmez, M., Bulan, Ö.K., Kılıç, Ö., 2020. Effects of microplastics and mercury on manila clam *Ruditapes philippinarum*: Feeding rate, immunomodulation, histopathology and oxidative stress. Environ. Pollut. 262, 114247. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114247

Smith, C.S., Ito, M., Namba, M., Nakaoka, M., 2018. Oyster aquaculture impacts *Zostera marina* epibiont community composition in Akkeshi-ko estuary, Japan. PLOS ONE 13, e0197753. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197753

Sun, Y., Li, Y., Rao, J., Liu, Z., Chen, Q., 2018. Effects of inorganic mercury exposure on histological structure, antioxidant status and immune response of immune organs in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). J. Appl. Toxicol. 38, 843–854. https://doi.org/10.1002/jat.3592

Tran, D., Fournier, E., Durrieu, G., Massabuau, J.-C., 2007. Inorganic mercury detection by valve closure response in the freshwater clam *Corbicula fluminea*: integration of time and water metal concentration changes. Environ. Toxicol. Chem. 26, 1545–1551. https://doi.org/10.1897/06-390R1.1

Vanlerberghe, G.C., Ordog, S.H., 2002. Alternative Oxidase: Integrating Carbon Metabolism and Electron Transport in Plant Respiration, in: Foyer, C.H., Noctor, G. (Eds.), Photosynthetic Nitrogen Assimilation and Associated Carbon and Respiratory Metabolism. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 173–191. https://doi.org/10.1007/0-306-48138-3_11

Van Rooyen, D., Erasmus, J.H., Gerber, R., Nachev, M., Sures, B., Wepener, V., Smit, N.J., 2023. Bioaccumulation and trophic transfer of total mercury through the aquatic food webs of an African sub-tropical wetland system. Sci. Total. Environ. 889, 164210. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164210

Wang, S., Li, B., Zhang, M., Xing, D., Jia, Y., Wei, C., 2012. Bioaccumulation and trophic transfer of mercury in a food web from a large, shallow, hypereutrophic lake (Lake Taihu) in China. Environ. Sci. Pollut. Res. 19, 2820–2831. https://doi.org/10.1007/s11356-012-0787-2

Wang, J., Koopman, K.R., Collas, F.P.L., Posthuma, L., de Nijs, T., Leuven, R.S.E.W., Hendriks, A.J., 2021. Towards an ecosystem service-based method to quantify the filtration services of mussels under chemical exposure. Sci. Total. Environ. 763, 144196. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144196

Yang, L., Zhang, Y., Wang, F., Luo, Z., Guo, S., Strähle, U., 2020. Toxicity of mercury: Molecular evidence. Chemosphere 245, 125586. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125586

Yu, R.-Q., Reinfelder, J.R., Hines, M.E., Barkay, T., 2018. Syntrophic pathways for microbial mercury methylation. The ISME Journal 12, 1826–1835. https://doi.org/10.1038/s41396-018-0106-0

Zhang, Q.-H., Huang, L., Zhang, Y., Ke, C.-H., Huang, H.-Q., 2013. Proteomic approach for identifying gonad differential proteins in the oyster (*Crassostrea angulata*) following food-chain contamination with HgCl2. J. Proteomics 94, 37–53. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.08.018

7. Supplemental data

Tableau S1-1. Primer pairs used in quantitative RT-PCR, accession, sequences, size of amplicons and concentration used for qPCR are shown.

Gene	NCBI	Forward primer Reverse primer	Size (pb)	Conc. (nM)
Actin (*act*)	AF082863	CCTCACCCTCAAGTACCCCAT TTGGCCTTTGGGTTGAGTG	153	300
S3 Protein (*ps3*)	AJ517687	CAGTGTGAGTCCCTGAGATACAAG AACTTCATGGACTTGGCTCTCTG	155	150
Catalase (*cat*)	EF681763	ACGGCTATGGAAGCCACACG AGGTCGCGCATCGCATAGTC	157	600
Gluthation-S-transferase (*gst*)	DQ459993	TCCGCTATATCTGCCTGGAC GCTCCTTCAGACCTGCTTTC	186	600
SuperOxyde Dismutase (*sod*)	AY377970	GAGAGCATGGCTTCCATGTG GAGATTCTGGGCCAGTCAGA	212	600
Methallotionein (*mt*)	U67347.1	GCGTTGAAACCGGTGATTGC GCCACAACAGTTGGGTTTGC	104	300
ATP Synthase (*atp*)	JQ781135	GACTCCACCTCCCGTATCCT TCCTCTGAAAGCTCGTCCAT	143	600
Cytochrome c oxidase 1 (*cox*)	AAL55513	AGGCCCTGCGATAGATTTTT AAAGGGACCCGGTAAAATTG	132	300
Lactate deshydrogenase (*ldh*)	Q7TNG8	TGCCCAAACTACATTGCCAAAT ATTGGGATTGGCAAACGGGA	181	150
AMP kinase sub-unit α (*ampk*)	Q8BRK8	TGCTAAATGAAAGAGGTGACGC CATGTGGTGGCATATACGATGT	117	300
Citrate synthase (*cs*)	MN579511	GTGCCCTGTCAGACCCTTAC CTGTCCTGCCTTGAGTGTGT	182	300
Alternative oxydase (*aox*)	Q9P959	GTGAACCATACCCTCGCCTC TGTAGTGACTGCGGATGGTC	154	300

Tableau S1-2. Bioaccumulation of THg, percent of MeHg in THg and the bioaccumulation factor (BAF) in tissues of *D. polymorpha* exposed by diet (mean± SD, n=3 mussels, p<0.05).

Tissue	Condition	THg (µg/g) (%MeHg)			BAF (g^{-1})
		24h	48h	96h	
Gills	Control	0.07 ±0.08 ^{a} (0.00 ±0.00 ^{a})	0.00 ±0.00 ^{a} (0.00 ±0.00 ^{a})	0.11 ±0.05 ^{a} (0.00 ±0.00 ^{a})	
	IHg2	0.15 ±0.05 ^{a} (0.00 ±0.00 ^{a})	0.38 ±0.23 ^{a} (0.00 ±0.00 ^{a})	1.18±0.49 ^{a} (0.00 ±0.00 ^{a})	5.27 ±2.06 ^{bc}
	MeHg2	2.34 ±1.96 ^{a} (59.31 ±52.85 ^{a})	3.46 ±0.49 ^{b} (35.83 ±50.12 ^{a})	16.27 ±10.79 ^{ab} (25.44 ±16.87 ^{ab})	37.27 ±24.61 ^{ac}
	IHg20	2.49 ±3.09 ^{a} (4.25 ±14.43)	7.03 ±4.98 ^{abc} (8.33 ±6.08 ^{a})	9.40 ±1.19 ^{b} (8.33 ±1.06 ^{b})	2.35 ±0.30 ^{b}
	MeHg20	31.32 ±21.99 ^{b} (49.53 ±62.82 ^{a})	41.63 ±3.97 ^{c} (26.28 ±4.15 ^{a})	102.67 ±18.36 ^{b} (35.76 ±13.47 ^{ab})	39.38 ±7.04 ^{a}
Digestive gland	Control	0.00 ±0.00 ^{a} (0.00 ±0.00 ^{a})	0.00 ±0.00 ^{a} (0.00 ±0.00 ^{a})	0.00 ±0.00 ^{a} (0.00 ±0.00 ^{abc})	
	IHg2	8.05 ±7.60 ^{a} (0.00 ±0.00 ^{a})	17.34 ±8.79 ^{ab} (0.00 ±0.00 ^{a})	23.43 ±1.75 ^{b} (0.03 ±0.00 ^{a})	99.16 ±7.38 ^{a}
	MeHg2	4.09 ±5.86 ^{a} (43.22 ±61.90 ^{a})	7.56 ±2.10 ^{a} (15.51 ±17.82 ^{a})	19.54 ±11.52 ^{ab} (13.02 ±7.68 ^{ab})	44.71 ±26.27 ^{ab}
	IHg20	8.34 ±6.39 ^{a} (4.66 ±9.17 ^{a})	23.73 ±23.20 ^{ab} (8.51 ±8.35 ^{a})	37.17 ±8.10 ^{b} (8.51 ±1.86 ^{b})	9.25 ±2.01 ^{b}
	MeHg20	26.85 ±12.28 ^{a} (35.14 ±43.11 ^{a})	41.29 ±6.69 ^{b} (22.80 ±9.17 ^{a})	88.42 ±20.06 ^{b} (36.42 ±10.33 ^{c})	33.92 ±7.69 ^{b}
Rest	Control	0.00 ±0.00 ^{a} (0.00 ±0.00 ^{a})	0.00 ±0.00 ^{a} (0.00 ±0.00 ^{a})	0.00 ±0.00 ^{a} (0.00 ±0.00 ^{a})	
	IHg2	1.45 ±1.74 ^{a} (0.00 ±0.00 ^{a})	3.37 ±1.72 ^{ab} (0.00 ±0.00 ^{a})	5.29 ±0.62 ^{b} (0.49 ±0.32 ^{a})	22.63 ±2.64 ^{a}
	MeHg2	1.70 ±1.54 ^{a} (92.97 ±89.06 ^{a})	3.24 ±0.79 ^{b} (52.46 ±64.93 ^{a})	15.27 ±10.74 ^{abc} (23.28 ±16.36 ^{abc})	34.99 ±24.49 ^{a}
	IHg20	5.45 ±7.15 ^{a} (6.75 ±12.51 ^{a})	9.64 ±2.52 ^{b} (8.17 ±2.13 ^{a})	12.14 ±1.66 ^{b} (8.37 ±1.16 ^{b})	3.03 ±0.41 ^{a}
	MeHg20	13.61 ±10.08 ^{a} (34.33 ±26.34 ^{a})	27.34 ±8.60 ^{b} (27.58 ±8.57 ^{a})	64.74 ±6.54 ^{c} (76.91 ±17.92 ^{c})	24.84 ±2.51 ^{a}

Partie 2 : Essais de valvométrie Non Invasive à Haute Fréquence (HFNI) chez *Dreissena polymorpha*

Cette partie du chapitre est en collaboration avec : Nour Fodil[1], Gauthier Tremolet[1], Julien Baudry[2], Florian Germain[2], Bastien Saint-leandre[1], Damien Olivier[2] et Frank Le Foll

[1]Université Le Havre Normandie, Université de Reims Champagne-Ardenne, INERIS, Normandie Univ, UMR-I 02 SEBIO, F-76600 Le Havre, France

[2]Normandie Univ, UNIHAVRE, UNIROUEN, LITIS, 76600 Le Havre, France

1. Matériels et méthodes

Pour aller plus loin sur les paramètres physiologiques de la dreissène après exposition aux microalgues contaminées au Hg, nous avons réalisé de la valvométrie non invasive à haute fréquence. Les dreissènes ont été placées dans 5 bacs différents (contrôle, IHg2, IHg20, MeHg2 et MeHg20) équipés de platines valvométriques imprimées en 3D. Chaque platine dispose de 6 emplacements dans lesquels des capteurs à effet Hall ont été intégrés et sur lesquels les dreissènes sont collées par leur valve inférieure. Sur chaque valve supérieure, un aimant est également collé. Une carte d'acquisition permet d'échantillonner, à raison de 10 points par seconde, la tension fournie par le capteur, qui correspond à sa distance à l'aimant, fonction de l'écartement valvaire. Ces points sont horodatés et forment des séries temporelles enregistrées (une série par dreissène) dans une base de données de type PostgreSQL. Une fois les dreissènes en place, celles-ci ont été exposées suivant le même protocole que décrit pour la filtration (partie 2.6.1).

Les séries temporelles obtenues font l'objet d'un pré-traitement utilisant un code Python pour agréger les données par pas de 10 secondes, linéariser le signal (le capteur répond en fonction de l'inverse de la distance au carré), transposer et linéariser les écartements valvaires entre 0 (moule fermée) et 100 % (moule ouverte au maximum). L'analyse repose sur des algorithmes orientés mouvement qui permettent d'extraire plusieurs paramètres descripteurs de l'activité valvaire. La dérivée temporelle de l'écartement valvaire permet de détecter les mouvements d'ouverture et de fermeture qui sont comptabilisés sur un intervalle de temps défini. L'état fermé est défini par un seuil fixé par l'expérimentateur, ici 20 Les résultats sont présentés sous forme de moyennes des paramètres sur 4 jours avec les descripteurs suivants : temps passé à l'état fermé (Dwell Time Closed, DTC), nombre de mouvements valvaires (Valve Beat, VB) et nombre de transitions entre l'état ouvert et l'état fermé (T).

2. Résultats et discussion

Le temps moyen passé à l'état fermé des dreissènes est légèrement augmenté, atteignant 48% pour les conditions IHg20, MeHg2 et MeHg20 sans différence statistiquement significative par rapport aux autres groupes (Figure 1-4). En comparaison, les individus contrôles et IHg2 passent seulement 25% du temps à l'état fermé. En revanche, le nombre de transition moyen ente l'état « fermé » et l'état « ouvert » est 2 x supérieur pour les individus exposés à IHg2 par rapport au contrôle. Cette augmentation de la fréquence des mouvements valvaires est en accord avec les données de filtration mesurées dans les mêmes conditions expérimentales, où les dreissènes exposées à IHg2 présentaient un taux de filtration initialement supérieur à celui des témoins. Ce comportement suggère une plasticité adaptative permettant aux individus d'ajuster leur rythme d'ouverture/fermeture des valves afin d'équilibrer efficacement les besoins en alimentation tout en limitant l'exposition au contaminant. On observe ainsi ici deux profils distincts dans le comportement valvaire : un groupe (IHg20, MeHg2, MeHg20) passant plus de temps fermé, et un autre (contrôle, IHg2) avec un temps fermé moindre mais des transitions plus fréquentes. En comparaison, le comportement de filtration révèle un seul profil marqué, avec une réduction transitoire de la filtration principalement observée pour MeHg, et des taux élevés maintenus dans toutes les conditions par la suite. Cette dissociation entre comportements valvaires et filtration souligne un effet graduel et spécifique des différentes formes et concentrations de Hg sur les réponses physiologiques et comportementales des dreissènes.

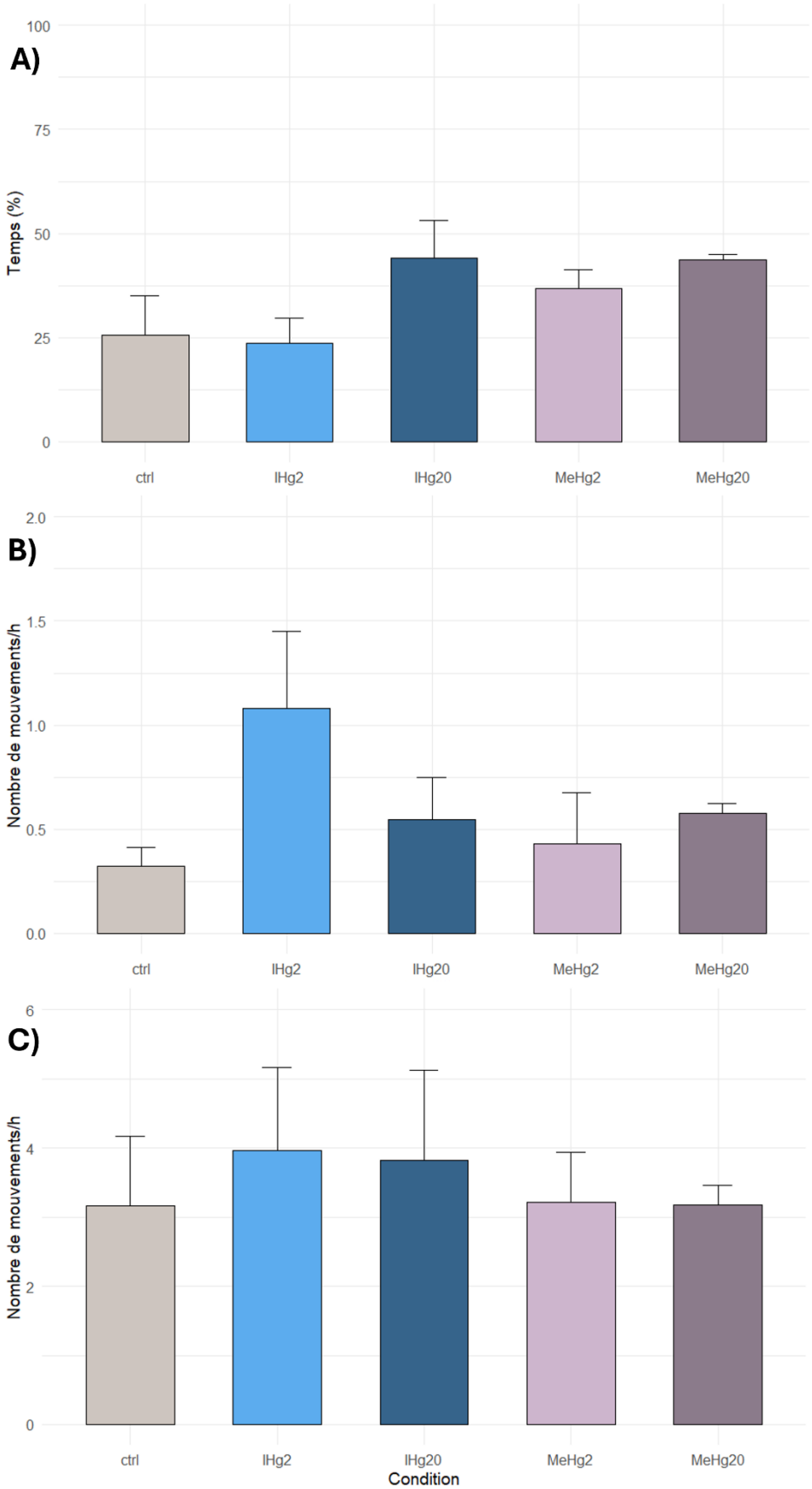

Figure 1-4. (A) Temps moyen passé à l'état fermé (DTC), (B) nombre de mouvements valvaires moyen (VB) et (C) nombre de transitions moyen entre l'état ouvert et l'état fermé (T) chez *D. polymorpha* exposée 4 jours à des microalgues contrôle ou contaminées au Hg (n = 4 à 6).

Chez les bivalves, une augmentation du temps passé en fermeture est une stratégie comportementale d'évitement bien documentée, visant à réduire les échanges avec l'environnement et ainsi limiter l'absorption de contaminants, ce qui peut contribuer à diminuer la bioaccumulation (Ait Fdil et al., 2006; Kelleghan et al., 2023; Moroishi et al., 2009). Cependant, le nombre total de mouvements valvaires reste similaire entre les conditions, indiquant que l'activité globale des valves n'est pas significativement modifiée par les expositions expérimentales. De manière cohérente, dans des conditions identiques, *D. polymorpha* a maintenu une filtration active dans toutes les expositions, avec seulement une diminution transitoire observée en début de nourrissage sous MeHg. À la fin de l'expérimentation, les taux de filtration étaient élevés (>85 %) dans tous les groupes, témoignant de l'absence (Oliveira et al., 2018) d'inhibition durable de l'activité de filtration. Ces observations indiquent que, dans notre cadre expérimental, les expositions à l'IHg et au MeHg n'induisent pas de perturbations comportementales durables ni d'altérations significatives de l'activité valvaire ou alimentaire, bien que des effets légers et transitoires du MeHg sur la filtration aient été notés. Ces résultats contrastent avec plusieurs études précédentes rapportant des effets marqués du Hg sur le comportement des bivalves. Par exemple, une réduction du taux de filtration a été documentée chez *C. fluminea* après 8 jours d'exposition à 30 µg/L d'IHg (Oliveira et al., 2018) et chez *R. philippinarum* après 4 jours à 10 µg/L (Sıkdokur et al., 2020). De plus, *B. azoricus* exposé à 20 µg/L d'IHg pendant 21 jours a montré une augmentation significative de la durée d'ouverture des valves, suggérant un effet inhibiteur du Hg sur le muscle adducteur (Kádár et al., 2005). Les divergences entre ces résultats et les nôtres peuvent s'expliquer par des différences d'espèces, de concentrations internes effectives en Hg et de durée d'exposition. Il est également possible que *D. polymorpha* présente une tolérance accrue ou développe des mécanismes compensatoires, masquant à court terme les effets comportementaux du Hg. *D. polymorpha* présente également une forte variabilité interindividuelle dans ses réponses comportementales, ce qui peut masquer des effets subtils liés aux expositions au Hg et limiter la détection de différences statistiquement significatives avec le nombre d'échantillons utilisé dans cette étude. Afin de mieux appréhender cette variabilité et d'améliorer la puissance statistique, il serait pertinent, dans de futures expérimentations, d'augmenter le nombre d'individus étudiés, ainsi que d'associer ces observations comportementales à des biomarqueurs physiologiques ou moléculaires liés au comportement. L'intégration de biomarqueurs moléculaires liés à la neurophysiologie, tels que l'expression génique de neurotransmetteurs, de récepteurs neuronaux, ou d'enzymes impliquées dans la transmission synaptique telle que l'acétylcholinestérase, pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux modifications comportementales observées chez *D. polymorpha* en réponse à l'exposition au Hg.

3. Conclusion

Bien que nos résultats préliminaires ne mettent pas en évidence de modifications comportementales marquées et/ou durables liées à l'exposition au Hg, ils révèlent une variabilité interindividuelle et suggèrent que l'augmentation du temps passé à l'état fermé pourrait constituer une réponse adaptative chez *D. polymorpha* visant vraisemblablement à limiter la bioaccumulation. Pour approfondir cette hypothèse, des expérimentations complémentaires seront nécessaires. Il serait notamment utile d'étudier des durées d'exposition prolongées et d'effectuer un suivi simultané des comportements valvaires et de filtration, ainsi que des

analyses physiologiques associées, afin de mieux caractériser la sensibilité comportementale de l'espèce face aux différentes formes de Hg.

4. Références

Ait Fdil, M., Mouabad, A., Outzourhit, A., Benhra, A., Maarouf, A., & Pihan, J. C. (2006). Valve movement response of the mussel *Mytilus galloprovincialis* to metals (Cu, Hg, Cd and Zn) and phosphate industry effluents from Moroccan Atlantic coast. Ecotoxicology, 15(5), 477-486. https://doi.org/10.1007/s10646-006-0083-3

Kádár, E., Costa, V., Santos, R. S., & Lopes, H. (2005). Behavioural response to the bioavailability of inorganic mercury in the hydrothermal mussel *Bathymodiolus azoricus*. Journal of Experimental Biology, 208(3), 505-513. https://doi.org/10.1242/jeb.01415

Kelleghan, D. B., O'Callaghan, L., Huggard, F., Crowe, T. P., & Brooks, P. R. (2023). Using valve gape analysis to compare sensitivity of native Mytilus edulis to invasive *Magallana gigas* when exposed to heavy metal contamination. Marine Environmental Research, 189, 106043. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2023.106043

Moroishi, J., Kang, I. J., Nagafuchi, K., Honjo, T., Shimasaki, Y., & Oshima, Y. (2009). Biological Monitoring to Detect Both Water Pollution and Water Pollution and Water Quality Recovery Based on Value Movements of Freshwater Bivalves (*Corbicula japonica*). 54(2), 413-420. https://doi.org/10.5109/16124

Oliveira, P., Barboza, L. G. A., Branco, V., Figueiredo, N., Carvalho, C., & Guilhermino, L. (2018). Effects of microplastics and mercury in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774): Filtration rate, biochemical biomarkers and mercury bioconcentration. Ecotoxicology and Environmental Safety, 164, 155-163. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.062

Sıkdokur, E., Belivermiş, M., Sezer, N., Pekmez, M., Bulan, Ö. K., & Kılıç, Ö. (2020). Effects of microplastics and mercury on manila clam *Ruditapes philippinarum*: Feeding rate, immunomodulation, histopathology and oxidative stress. Environmental Pollution, 262, 114247. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114247

CHAPITRE 2 : Bioaccumulation du Hg par l'alimentation chez *Dreissena polymorpha* : réponses transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques

Dietary mercury contamination in *Dreissena polymorpha*: transcriptomic, proteomic, and metabolomic insights

- En préparation -

Clarisse Seguin[1], Tainá Rocha De Almeida[1], Isabelle Bonnard[1], Benjamin Marie[3], Jean Armengaud[4], Jean-Luc Loizeau[5], Damien Rioult[1,2] and Claudia Cosio[1,*]

[1] Université de Reims Champagne-Ardenne, Université Le Havre Normandie, INERIS, Normandie Univ, UMR-I 02 SEBIO, Reims, France
[2] Université de Reims Champagne-Ardenne, URCATech, MOBICYTE, Reims, France
[3] UMR CNRS 7245 MCAM, Museum National d'Histoire Naturelle, 75231 Paris Cedex 05
[4] Laboratory « Innovative technologies for Detection and Diagnostics », CEA-Marcoule, 30200 Bagnols-sur-Cèze
[5] Department F.-A. Forel for Environmental and Aquatic Sciences, and Institute for Environmental Sciences, Université de Genève, Boulevard Carl-Vogt 66, 1211, Genève 4, Suisse

Résumé

La toxicité du méthylmercure (MeHg) est reconnue chez l'Homme par l'ingestion de produits de la mer contaminés. mais ses effets chez les organismes aquatiques, notamment par voie alimentaire, restent encore peu étudiés. Si l'usage de biomarqueurs classiques pour évaluer les effets des métaux est aujourd'hui courant en écotoxicologie, l'essor des approches « omiques » au cours de la dernière décennie offre de nouvelles perspectives pour caractériser la fitness des organismes à l'échelle moléculaire. Dans ce contexte, cette étude explore les réponses transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques chez le bivalve d'eau douce *Dreissena polymorpha* exposé par voie alimentaire à l'IHg et au MeHg.

Les résultats montrent une accumulation plus élevée de THg dans la glande digestive, organe clé de la digestion et de la détoxication, tandis que la proportion de MeHg est supérieure dans les branchies, reflétant une bioaccumulation spécifique au tissu et une sensibilité potentiellement différente. En tant qu'interface directe avec le milieu, les branchies pourraient représenter une cible précoce pour la toxicité du MeHg. Les analyses enzymatiques ont révélé un stress oxydatif globalement limité, cohérent avec une bioaccumulation modérée, mais mettent en évidence des modulations distinctes des enzymes antioxydantes, suggérant des réponses de défense différenciées. Au niveau moléculaire, l'IHg affecte principalement le transcriptome, tandis que le MeHg induit des altérations plus marquées du protéome et métabolome, en particulier des voies métaboliques liées au métabolisme énergétique.

Ces résultats montrent à la fois la spécificité tissulaire et la diversité des mécanismes activés par les deux formes de Hg, soulignant la complexité de la toxicité du Hg. L'intégration des biomarqueurs fonctionnels et des approches multi-omiques fournit des informations mécanistiques précieuses, renforçant notre compréhension du mode d'action du Hg et de ses impacts écologiques sur les bivalves d'eau douce.

Mots-clés : *Dreissena polymorpha*, mercure, transfert trophique, multi-omiques, organes

Abstract

Methylmercury (MeHg) toxicity is well recognized in humans through the consumption of contaminated seafood, yet its effects on aquatic organisms, particularly via dietary exposure, remain insufficiently studied. While the use of classical biomarkers to assess metal effects has become common in ecotoxicology, the rise of "omics" approaches over the past decade offers new opportunities to characterize organismal fitness at the molecular scale. In this context, the present study investigates transcriptomic, proteomic, and metabolomic responses in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* exposed through the diet to IHg and MeHg.

THg concentrations were higher in the digestive gland, the primary site of digestion and detoxification, while the proportion of MeHg was notably elevated in the gills, reflecting tissue-specific bioaccumulation and potential differential sensitivity. As the interface with the external environment, the gills may represent an early target for MeHg toxicity. Enzymatic assays indicated limited oxidative stress overall, consistent with moderate bioaccumulation, but revealed distinct modulations in antioxidant enzymes, suggesting nuanced defence responses. At the molecular level, IHg mainly affected transcriptomic profiles, whereas MeHg induced more pronounced alterations in proteomic and metabolomic pathways, especially those linked to energy metabolism.

These findings demonstrate tissue-specific effects and distinct molecular pathways influenced by each Hg form, underscoring the complexity of Hg toxicity. Integrating functional biomarkers with multi-omics approaches provided valuable mechanistic insights, advancing our understanding of Hg's mode of action and ecological impact in freshwater bivalves.

Keywords: *Dreissena polymorpha*, mercury, dietary, multi-omics, tissue-specific

1. Introduction

Mercury (Hg) is a globally distributed pollutant of major concern, ranked among the top priority hazardous substances due to its persistence, high mobility, and ability to bioaccumulate (UNEP, 2019). Its organic form, methylmercury (MeHg), is particularly toxic as it readily crosses biological membranes and accumulates in higher trophic levels, posing a critical environmental concern to both wildlife and humans through seafood consumption (Boening, 2000). In freshwater ecosystems, benthic filter-feeding bivalves, such as *Dreissena polymorpha,* are of special interest. This invasive species has established dense populations across European and North American rivers and lakes, making them easy to find and collect. *D. polymorpha* serve as important bioindicators, especially because dietary exposure via contaminated microalgae constitutes a major route of MeHg uptake (Mao et al., 2021). Understanding the differential bioaccumulation patterns and molecular responses to inorganic mercury (IHg) and MeHg is essential for elucidating the mechanisms underlying Hg toxicity and its ecological impact.

Traditional biomarkers such as enzymatic activities (e.g., catalase, superoxide dismutase, glutathione S-transferase) or oxidative damage endpoints provide useful indicators of stress, but they often capture only a narrow part of the organism's response and may lack specificity. By contrast, "omics" technologies allow for a global, untargeted exploration of molecular responses, offering insights into both known and unexpected pathways of toxicity (Campos et al., 2012). The most widely used omics methods are transcriptomics, proteomics and metabolomics. Transcriptomics refers to the study of an organism's genome at the mRNA level, proteomics is the large-scale study of an organism's proteins (function, expression and structure) and metabolomics, is the systematic study of the unique fingerprints that specific cellular processes leave behind, particularly the study of their small molecule metabolic profiles (Garcia-Reyero & Perkins, 2011).

« Omics » methods have already been used to highlight metal-modulated metabolic pathways in invertebrates (Chora et al., 2009; M. Wang et al., 2013; Q.-L. Zhang et al., 2020), abiotic parameters (L. Chen et al., 2023; Guo et al., 2016; Q.-L. Zhang et al., 2019), mixtures of substances (Baratange et al., 2023, 2025) or multi-stresses (Campillo et al., 2015; Laurent et al., 2023, 2024). They have also already proven themselves in the tissues of *D. polymorpha* under controlled conditions (Baratange et al., 2023; Lance et al., 2023) and in the natural environment (Hani et al., 2021; Prud'homme et al., 2020). In the context of Hg exposure, these methods are particularly relevant to identify early and tissue-specific molecular perturbations that precede visible physiological impairments. For instance, integrated metabolomics and transcriptomics of bivalves exposed to IHg, revealed disruptions in detoxification pathways, immune defence, and energy metabolism (Jiang et al., 2021; Xie et al., 2024).

Despite these advances, multi-omics approaches integrating transcriptomics, proteomics and metabolomics, in addition to the classic biomarkers of oxidative stress, remain scarce in freshwater bivalves, and to date, no study has investigated those responses to dietary exposure of both IHg and MeHg. Given that dietary uptake is a dominant exposure pathway for Hg to filter-feeding organisms, filling this gap is essential to better understand the early molecular mechanisms underlying Hg bioaccumulation and toxicity. This study investigates the multi-omics responses, including transcriptomics, proteomics, and metabolomics, together with oxidative stress biomarkers in *D. polymorpha* exposed to dietary IHg and MeHg, highlighting tissue-specific

effects and the influence of Hg form. By integrating functional biomarkers with multi-omics approaches, we aimed to unravel the complexity of Hg-induced toxicity and improve ecotoxicological risk assessments.

2. Material and methods

2.1. Biological models

Specimens of *D. polymorpha* were collected in January 2021 in the Der Lake (Grand Est, France). Individuals were cleaned, size-selected (18-20 mm) and females were chosen by gonadal puncture to minimize sex-related variability. Mussels were distributed in three tanks filled with natural spring water (Aurèle spring, Cristaline®) and experienced a 20-day depuration period at the lake's collection temperature (10.5°C). They were fed twice a week with *Nannochloropsis* (*Nanno 3600*, Reed Mariculture, Planktovie) with 4×10^6 cells/individual/day. Tanks were continuously aerated, and water was renewed prior to each feeding. One week before exposure, 54 mussels were randomly transferred to exposure tanks, filled with 45 mL/individual of natural spring water, allowing for acclimatization and byssal attachment.

2.2. Dietary exposure of *D. polymorpha*

The protocol for dietary exposure of *D. polymorpha* was previously described in Seguin et al. (2025). First, *Nannochloropsis* cells ($2.9 \pm 0.27 \times 10^{10}$) were exposed to control, 20 fg/cell of IHg from IHg standard solution ($Hg(NO_3)_2$ 1 g/L, Sigma- Aldrich Supelco) and 20 fg/cell of MeHg from MeHg standard solution (CH_3HgCl 1 g/L, Alfa Aesar). After 2h on an orbital shaker, cells were centrifuged (10 min, 1,300 g), resuspended in spring water, and centrifuged again to remove unbound Hg. THg concentrations in *Nannochloropsis* were 10.07 ± 0.08 and 6.52 ± 0.23 fg/cell for IHg and MeHg exposures respectively and MeHg concentrations were 0 and 3.87 fg/cell for IHg and MeHg exposures respectively.

Mussels were then fed with 1×10^7 microalgae cells/individual. At 24h, mussels from each tank were sampled, dissected to collect gills and digestive gland, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. No mortality of *D. polymorpha* was observed during the experiment.

2.3. THg and MeHg concentrations

Samples for THg measurements were freeze-dried. Those for MeHg measurements were freeze-dried, ground, and digested in 30% HNO_3 (v/v) at 60°C for 12h. THg concentrations in *D. polymorpha* and *Nannochloropsis* were determined by atomic absorption spectrometry using an Advanced Hg Analyzer AMA 254 (Altec s.r.l., Czech Republic), while MeHg concentrations were measured using a MERX® M System (Brooks Rand Instruments, Seattle, WA, USA). MeHg concentrations are expressed as a percentage of MeHg as THg (%MeHg) calculated with averages of THg and MeHg concentrations. The bioaccumulation factor (BAF; g^{-1}) was calculated as the ratio of THg concentration in mussels (µg/g) to the THg concentration in 1×10^7 microalgae cells (µg).

2.4. Transcriptomics

2.4.1. Sample preparation

Total RNA extraction was performed on gills and digestive gland individually using TRI Reagent™ according to manufacturer instructions (Euromedex). Absorbance ratio at 260 and 280

nm with a micro-volume spectrophotometer (GenovaNano, Jenway) were measured to ensure the quantity and purity of the extracted RNA. Total RNA from the samples was sent to GeT-PlaGe Genomic Platform (Toulouse, France) for sequencing.

2.4.2. Differential analysis

GCA_020536995.1_UMN_Dpol_1.0_genomic.fna as the reference genome and *GCA_020536995.1_UMN_Dpol_1.0_genomic.gff* as the reference annotation were used to process raw sequencing reads using nf-core/rnaseq v2.0 (parameters --skip_biotype_qc and --aligner star_rsem). Subsequently, read quality was evaluated with FastQC (Andrew, 2010), and adapter trimming using Trim Galore (Krueger et al., 2021). Finally, reads were aligned to the reference genome using STAR (Dobin et al., 2013) and quantified with RSEM (Li et al., 2011). The gene count file generated from this process was then used for downstream analysis. Software versions and default pipeline parameters are available on the nf-core/rnaseq v2.0 website under commit hash *bc5fc76f40b2da6082a854927184c9d6e5060393*.

Briefly, the gene count table was filtered to retain only genes with at least 10 reads in a minimum of 4 samples, giving us 15,512 genes for the gills and 16,286 for the digestive gland. Differential expression analysis was conducted in RStudio (version 2023.06.0+421, Posit Team 2023) with the DESeq2 package (Love, Huber, and Anders 2014), using log fold-change shrinkage applied via the *ashr* package (Stephens, 2017). All libraries were included in the analysis where the condition variable encompassed all experimental groups: Control (Ctl), IHg, and MeHg for both gills and digestive gland, resulting in six groups. Pairwise contrasts were performed between each exposed group and its respective control (Ctl). Genes were classified as differentially expressed genes (DEGs) if they met the significance threshold of an adjusted p-value < 0.05 and a log2 fold change > 0.50.

2.4.3. Enrichment and functional analysis

Genes were annotated using the GCA_020536995.1_UMN_Dpol_1.0_protein.faa protein file with eggnog-mapper (http://eggnog5.embl.de) version 2.1.4-2 using "-m diamond" parameters. Gene-protein relations were extracted from the eggnog-mapper result files and GCA_020536995.1_UMN_Dpol_1.0_genomic.gff with Unix shell commands. Both files were linked using basic R functions. Protein preferred names were used for further functional analysis. Enrichment Analysis based on over-representation analysis of DEGs was performed using the WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt; http://www.webgestalt.org/). The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database for “Homo Sapiens” was used as the functional database for pathway enrichment. The reference set was chosen as genome, other parameters were conducted using default settings. Significant pathways were selected if the p-value < 0.05 and DEGs ≥ 2. The false discovery rate (FDR) was set to 0.05 using the BH method and then the top most significant categories were selected. This threshold was adjusted throughout conditions of exposure.

2.5. Shotgun proteomics

2.5.1. Sample extraction and acquisition

The sample preparation protocol has been described previously in Baratange et al. (2023). Analyses were performed on whole tissues of *D. polymorpha*, which had been freeze-dried and

then mechanically ground with an 8 mm stainless steel bead for 8 min at 30 Hz. The powder was then pelleted, weighted and dissolved in 12.5 µL of LDS1X (Thermo) per mg of powder. The mix was bead-beating once again for 6 cycles of 20 s at 7200 rpm and ultrasonicate 30 s (4 cycles, 90 % amplitude, 6500 rpm; Hielscher UP50H sonicator). Samples were centrifuged individually for 3 minutes at 10,000g and the remaining supernatant was diluted in 7 volumes of LDS1X. Proteins were then denatured and the content of 30 µL was subjected to denaturing electrophoresis on a NuPAGE 4-12% gradient gel in MES buffer (Thermo) for 5 min, as described in Hartmann & Armengaud (2014). Proteomes from each mussel were treated individually as a single slice of polyacrylamide gel and proteolyzed with trypsin and 0.01% of surfactant ProteaseMAX (Promega; Hartmann & Armengaud, 2014)). Peptides (2 µL out of 50 µL) were analysed with a Q-Exactive HF mass spectrometer (Thermo) operating in data-dependent mode according to previously described parameters (Klein et al., 2016). Peptides were resolved on an Acclaim PepMap100 C18 (3 µm, 100 Å, 75 µm id x 50 cm) at a flow rate of 0.2 µL per min along a 90 min gradient of acetonitrile spiked with 0.1% formic acid (3.2%-20% over 75 min then 20%-32% over 15min). A dataset of 2,048,241 high-resolution MS/MS spectra was recorded and queried with the MASCOT software (Matrix Science) against a RNA-seq derived database named Dreissena_HJ1_pep_20170801.fasta, resulting in the identification of 6,316 proteins. A second database was constructed corresponding to the sequences of these 6,316 proteins and the 300 additional protein sequences from the previously established Dreissena_polymorpha_Cosio300seq_2020-11-11.fasta. This new database was named MS24-067(A)_Dpolymorfa_Cosio300_2025-01-08.fasta that was searched with standard parameters (FDR below 1%).

2.5.2. Proteomic data interpretation and functional analyses

The abundance of proteins in each condition was assessed by their spectral count (number of MS/MS spectra assigned per protein). Proteins were considered if they had at least seven spectral counts when merging all conditions. Spectral counts were compared between conditions based on proteins that satisfied |T-fold| (≥1.5) and p-value (≤0.05). The functional annotation of the most interesting proteins was carried out by sequence similarity with the EggNOG v5.0 software (http://eggnog5.embl.de) using the default parameters of the software (automatic adjustment per query, annotation transfer from any ortholog, E-value threshold set at 10^{-3}, a minimum identity of 40%, and a minimum coverage of 20% for both the query and the subject). Enrichment analysis was performed as well using the KEGG pathway database and Gene Ontology (GO) terms through WebGestalt software.

2.5.3. Non targeted metabolites detection and quantification

The protocol was previously described in Lance et al. (2023). Briefly, digestive glands (n = 6) and gills (n = 6) were weighted and mechanically grounded in a politron (GLH 850 OMNI) with a constant ratio of methanol solution (75%) acidified with 0.1% formic acid for 10 mg of wet biomass. Subsequently, samples were sonicated (Sonics VibraCell, Newton, CT, USA) for 30 seconds with an intensity of 60% and centrifuged at 4°C (15,000 g, 15 min). Finally, supernatants were collected and directly analyzed by ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC, ELUTE, Bruker) on a Polar Advance-II C_{18} column (2.5 µm pore-size). Analytes were then ionized and analyzed using a high-resolution hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer with electrospray ionization (ESI-Qq-TOF Compact, Bruker, Bremen Germany, France) at a speed of 2

Hz over the range 50-1500 *m/z* in positive single MS mode, then in broadband collision ion dissociation mode or positive autoMS/MS mode at a speed of 2-8 Hz over the range 50-1500 m/z with information-dependent acquisition.

MS data were analysed using MetaboScape 4.0 software (Bruker, Bremen, Germany) for recalibration, peak detection, selection of ions with an intensity > 5000 counts in at least 10% of samples, and peak realignment. The list of peaks (MS/MS spectra between 1 and 15 min of the LC gradient) was generated from recalibrated MS spectra (<0.5 ppm, using Na formate as an internal calibrant for automatic recalibration). Classical adducts and isotopic forms were grouped using a 0.8 co-elution coefficient threshold. Data were acquired from a single LC-MS run, with QC and blank samples injected every six runs to ensure reproducibility. Charge states and adducts were grouped, and the area under the peak was determined to create a unique global data matrix with semi-quantitative results for each metabolite, including the mean neutral mass and retention time of each analyte. Finally, 1,604 and 1,589 analytes were detected in the gills exposed to IHg and MeHg, respectively, while 1,600 and 1,566 were detected for the digestive gland. The analytes were first annotated using MetaboScape 4.0 (Bruker, Bremen, Germany) with NPAtlas V1.0 structural database (van Santen et al., 2022) regarding their MS data, then their MS/MS data were further annotated with MetGem 1.3.6 (Olivon et al., 2018) regarding MS/MS data according to interrogation of spectral database available on GNPS and MS-DIAL (HMDB, Massbank, EMBL, GNPS, CASMI and NIH), and manually curated.

2.6. Enzyme activities of antioxidant proteins and lipid peroxidation

Protocols were previously detailed in Seguin et al. (2025). Samples were homogenized using a 400 MM homogenizer (Restch®) with a stainless-steel bead in 800 µL of 50 mM phosphate buffer (pH 7.4), containing 1 mM PMSF and 1 mM L-Serine borate per 100 mg tissue. Protein concentration, GST activity, and lipid peroxidation were measured using a Gallery® spectrometer. Protein was quantified at 600 nm with the pyrogallol method. GST activity was assessed at 340 nm using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (0.9 mM) and reduced glutathione (1 mM) in phosphate buffer (0.1 M, pH 6.5). Lipid peroxidation was evaluated at 620 nm by the Fox method (LOOH). Catalase (CAT) activity was measured at 240 nm using hydrogen peroxide (14 mM) and phosphate buffer (50 mM, pH 7.4). SOD activity was measured at 340 nm using β-mercaptoethanol (10 mM) and NADH (7.5 mM) in phosphate buffer (50 mM, pH 7.4).

2.7. Data analysis and statistics

For transcriptomic, proteomic and metabolomic data analysis, partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) was performed in R Studio using the package mixOmics (Rohart et al., 2017). The Mahalanobis distance was used to assess classification performance, yielding error rates of 25.8%, 18.9%, and 15.9% for the first three components of the transcriptomic, proteomic, and metabolomic datasets, respectively. To evaluate the overall effect of exposure conditions on the omics profiles, a PERMANOVA was performed using Bray-Curtis dissimilarity indices (999 permutations) implemented in the R package vegan (vegan: community ecology package; https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html). If the p-value < 0.05, a pairwise Permanova was performed (Ctrl vs IHg, Ctrl vs MeHg, IHg vs MeHg). Additionally, the Venn diagrams were drawn on the website InteractiVenn (https://www.interactivenn.net/; Heberle et al., 2015) and illustrate the number of differentially expressed genes (DEGs), differentially abundant proteins (DAPs), and differentially abundant metabolites (DAMs) in each

tissue and exposure condition. For enzyme activities, normality (Shapiro-Wilk's test, α = 0.01) and homoscedasticity (Brown-Forsythe's test, α = 0.05) were checked before ANOVA. A one-way ANOVA was conducted, followed by Tukey's post-hoc test (α = 0.05). If necessary, log transformation was applied. If homoscedasticity was unmet, Welch's ANOVA (α = 0.05) and Games-Howell post-hoc test were used. If both criteria were unmet, a Kruskal-Wallis test (α = 0.05) was performed, followed by Wilcoxon's post-hoc test with Hochberg's p-value adjustment (α = 0.05). Statistical analyses were performed using R software (version 4.0.3).

3. Results

3.1. THg and MeHg in *Nannochloropsis* and *D. polymorpha*

For IHg exposure, THg concentrations are 28.4 times higher in the digestive gland than in the gills while %MeHg in MeHg exposure is 2 times higher in the gills than in the digestive gland (Tableau 2-1). In IHg exposure, BAF are 2.8 g^{-1} in the gills and 78.9 g^{-1} in the digestive gland, in congruence with THg concentrations, while in MeHg exposure, BAF are similar in the gills and the digestive gland, 3.9 and 3.1 g^{-1} respectively.

Tableau 2-1. THg bioaccumulation in *D. polymorpha* in µg THg/g dw and percentage of MeHg in THg (%) (n=8).

Organism	Condition	THg	%MeHg
Gills	Ctrl	0.04 ± 0.00	1.93
	IHg	0.28 ± 0.10	1.08
	MeHg	0.73 ± 0.40	20.79
Digestive gland	Ctrl	0.04 ± 0.00	4.45
	IHg	7.95 ± 3.15	0.02
	MeHg	1.03 ± 0.70	11.83

3.2. Multi-omics

For transcriptomic and proteomic, PLS-DA showed a clear separation between gills and the digestive gland (Figure 2-1). In metabolomic, the distinction between tissues was less pronounced. In MeHg exposures, samples were well separated from the control for the three molecular levels. For transcriptomic in IHg exposures, samples were close to the control, while for proteomic and metabolomic, IHg and MeHg exposures samples were overlapped within each tissue type. Overall, the transcriptome of *D. polymorpha* was statistically different from the control in gills for MeHg exposure, and in the digestive gland for both IHg and MeHg exposures (Tableau 2-2). The proteome was statistically different from the control in IHg and MeHg exposures in both tissues. In contrast, the metabolome was statistically different from the control in the digestive gland in IHg and MeHg exposures.

Tableau 2-2. Results of pairwise PERMANOVA analyses conducted when the overall PERMANOVA p-value was < 0.05 (n = 4 to 5, * = p < 0.05).

	Gills			Digestive gland		
	Ctrl vs IHg	Ctrl vs MeHg	IHg vs MeHg	Ctrl vs IHg	Ctrl vs MeHg	IHg vs MeHg
Transcriptomic	0.116	0.014 *	0.073	0.030 *	0.035 *	0.088
Proteomic	0.005 *	0.005 *	0.234	0.005 *	0.005 *	0.663
Metabolomic	0.365	0.075	0.176	0.048 *	0.015 *	0.145

In transcriptomics, the gills showed a higher number of significantly modulated DEGs than in the digestive gland, i.e., 5.2 x in IHg exposure and 1.3 x in MeHg exposure (Figure 2-1). In both tissues, IHg exposure caused close to 2x more DEGs than MeHg exposure. In gills, 30% of the DEGs modulated by IHg exposure were also modulated in MeHg exposure, while in MeHg exposure, 58% of the DEGs were also modulated in IHg exposure. On the opposite, in the digestive gland, 50% of the DEGs modulate by IHg exposure were common with MeHg exposure, while 33% of the DEGs in MeHg exposure, were also modulated in IHg exposure.

In proteomics as in transcriptomics, 1.9x and 2.4x more Differentially Abundant Proteins (DAPs) were observed in the gills than in the digestive gland in both IHg and MeHg exposure, respectively. On the opposite to transcriptomics, in the gills, MeHg exposure caused 2 x more DAPs than IHg exposure. In MeHg exposure, 23% of the DAPs were also modulated in IHg exposure, while in IHg exposure, 38% of the DAPs were also modulated in MeHg exposure. In the digestive gland, in MeHg exposure, 22% of the DAPs were also modulated in IHg exposure, while in IHg exposure, 28% of the DAPs were also modulated in MeHg exposure.

In contrast, in metabolomics, a similar number of Differentially Abundant Metabolites (DAMs) were modulated by IHg and MeHg in the gills, while in the digestive gland, MeHg exposure resulted in 1.4 x more DAMs than IHg. In the gills, 30 % of the DAMs were modulated in both IHg and MeHg exposure, while 66 % were modulated in all other conditions as well. Similarly, in the digestive gland, IHg exposure resulted in 47% of DAMs also modulated in MeHg exposure and 51% were modulated in all other conditions. In contrast, in MeHg exposure, 30 % of the DAMs were specifically modulated, 33 % were also modulated in IHg exposure and 36 % were modulated in all other conditions. These results suggest that only MeHg exposure resulted in specific responses in metabolomics.

DEGs and DAPs displayed similar response patterns (Figure 2-1), in congruence with the Venn diagrams. In the gills, both DEGs and DAPs were predominantly upregulated in IHg exposure representing 88 % and 95 % and MeHg exposure representing 87 % and 97 %, respectively. In contrast, in the digestive gland, DEGs and DAPs were more balanced, with upregulation representing 35 % and 51 % in IHg and 44 % and 82 % in MeHg exposure respectively. Conversely, DAMs abundance was mainly reduced. Indeed, in MeHg exposure, all DAMs were reduced, while in IHg exposure, 88 % and 70 % of DAMs were reduced in the gills and the digestive gland, respectively.

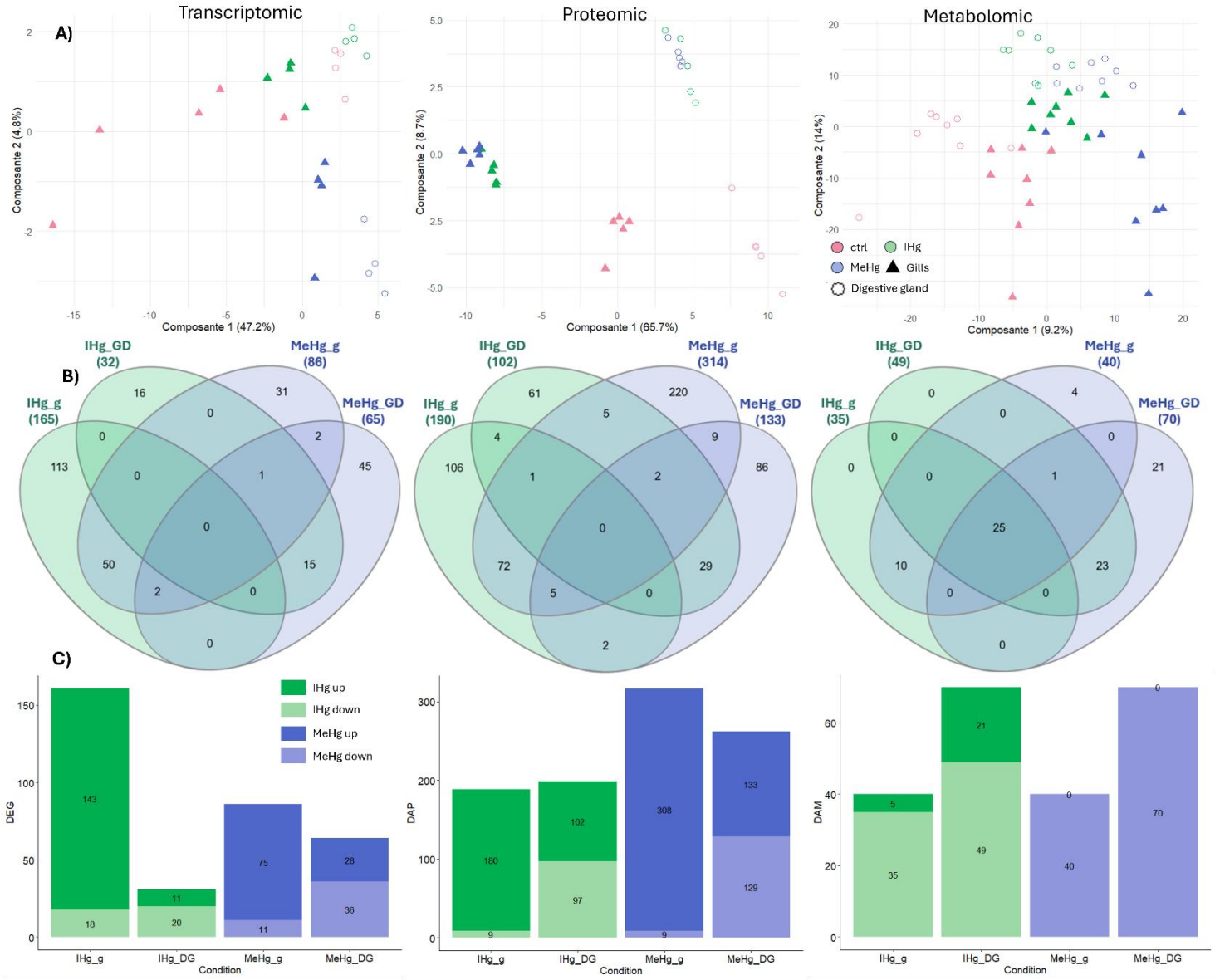

Figure 2-1.
(A) PLS-DA of individuals in control, IHg, and MeHg dietary exposures for differentially expressed genes (DEGs), differentially abundant proteins (DAPs), and differentially abundant metabolites (DAMs) in gills (g) and digestive glands (DG).
(B) Venn diagram of DEGs, DAPs and DAMs.
(C) Regulation patterns of DEGs, DAPs, and DAMs in IHg and MeHg exposures vs control.

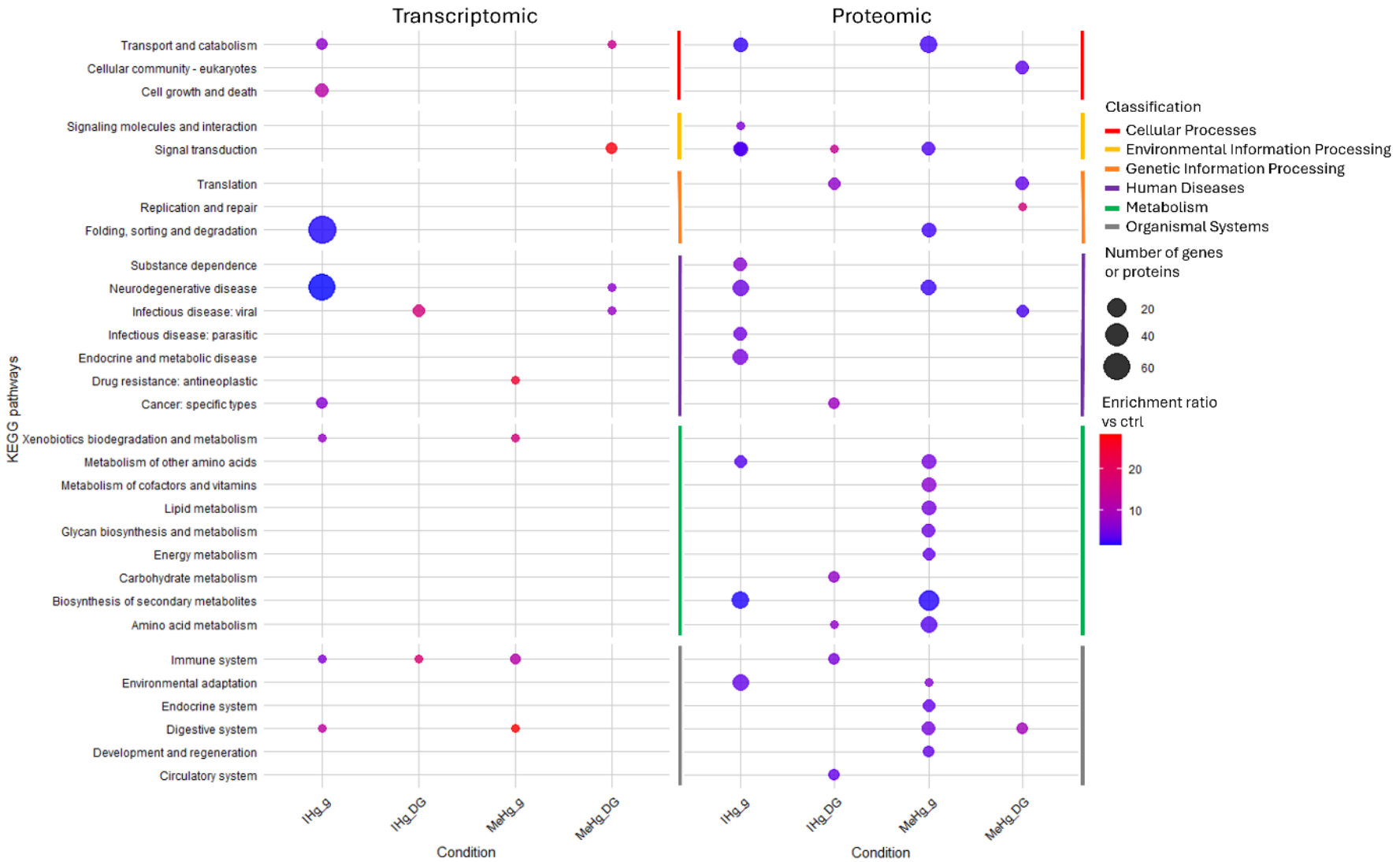

Figure 2-2. Enriched KEGG pathways of differentially expressed genes (DEG) and differential abundant proteins (DAP) compared to control in gills (g) and digestive glands (DG) of *D. polymorpha* exposed by diet to IHg and MeHg.

According to KEGG classification, metabolic pathways modulated by dietary IHg and MeHg are grouped into six main categories: Cellular Processes, Environmental Information Processing, Genetic Information Processing, Human Diseases, Metabolism, and Organismal Systems (Figure 2-2).

Transcriptomic analyses revealed that IHg exposure resulted in enrichment of 10 metabolic pathways in the gills and 3 pathways in the digestive gland compared to control. However, enrichment ratio in the digestive gland was up to 5 x higher than in the gills. In MeHg exposure, the enriched pathways varied according to tissue. In the gills, DEGs were primarily involved in xenobiotic biodegradation and metabolism, as well as the immune and digestive systems. In the digestive gland, DEGs were mainly involved in transport, catabolism and signal transduction. When comparing DEG in the gills in IHg and MeHg exposure, MeHg resulted in 3 times higher enrichment ratios than IHg. However, in IHg exposure, DEGs were involved in 10 metabolic pathways compared to only 2 in MeHg exposure. IHg and MeHg exposures caused the modulation of common DEGs whose enriched pathways were linked to the digestive and immune systems, xenobiotic metabolism and biodegradation, and transport and catabolism. When comparing DEG in the digestive gland in IHg and MeHg exposure, enrichment ratios reached up to 17 and 14 and DEGs were involved in 3 and 2 pathways, respectively. 'Human diseases' category was enriched in both IHg and MeHg exposure.

Proteomic analyses revealed that IHg exposure enriched 14 metabolic pathways in the gills and 8 in the digestive gland compared to control. As in transcriptomic, enrichment ratios in the gills were 1.9 x lower than in the digestive gland. In IHg exposure, pathways enriched in the digestive gland involved around 2.5 x less DAPs than in the gills but generally belonged to the same pathways. MeHg exposure resulted in 18 enriched metabolic pathways in the gills and 8 in the digestive gland, with average enrichment ratios in the same range as those observed for IHg exposure. Similarly, in MeHg exposure, pathways enriched in the digestive gland involved around 2.5 x less DAPs than in the gills. In the gills, the main metabolic pathways grouped as 'Metabolism' and 'Organismal systems' were enriched in MeHg exposure, which is not the case in the digestive gland, suggesting that DAPs in the gills reflect a stronger effect than those in the digestive gland. Additionally, when comparing IHg and MeHg exposure, IHg in the gills enriched 10 metabolic pathways compared to 15 for MeHg, with similar average enrichment ratios (4.8 for IHg and 5.4 for MeHg). However, the enriched pathways differed, as those modulated in IHg exposure mainly belonged to the 'Environmental Information Processing' and 'Human Diseases' categories.

For metabolomics, too few DAMs were identified to allow enrichment analysis.

3.3. Enzyme activities of antioxidant proteins and lipid peroxidation

In gills, GST activity increased by 1.6x in IHg exposure and 1.9× in MeHg exposure compared to control. In the digestive gland, CAT activity decreased 2.8× in MeHg exposure compared to control (Tableau 2-3). No significant effect was observed for SOD activity, and LOOH concentrations when comparing each exposure and tissue.

Tableau 2-3. Enzyme activities of CAT (U g prot^{-1}), GST (µmol CDNB g prot^{-1} min^{-1}), SOD (U g prot^{-1}) and lipid peroxidation (LOOH; µmol TBH g prot^{-1}) in gills and digestive gland of *D. polymorpha* exposed by diet to IHg and MeHg (* = $p < 0.05$ vs control, n=8).

Tissue	Condition	CAT	GST	SOD	LOOH
Gills	Ctrl	24.4 ± 13.9	82.9 ± 29.4	3.1 ± 1.0	16.7 ± 10.2
	IHg	27.6 ± 4.6	135.2 ± 28.4 *	3.5 ± 1.4	25.9 ± 9.0
	MeHg	27.7 ± 8.9	157.6 ± 39.8 *	4.4 ± 2.0	20.3 ± 12.7
Digestive gland	Ctrl	108.3 ± 29.2	235 ± 95.8	4.9 ± 1.5	59.3 ± 26.4
	IHg	84.2 ± 15.6	207 ± 60.8	4.3 ± 1.8	77.2 ± 14.9
	MeHg	38.2 ± 10.5*	210.2 ± 70.6	4.2 ± 1.7	56.2 ± 27.0

4. Discussion

Overall, dietary exposure to IHg led to higher THg concentrations in the digestive gland compared to the gills, which is consistent with our previous observations from chapter 1. Indeed, due to its digestive function, the digestive gland is the tissue most likely to accumulate Hg from its food. However, the %MeHg was higher in the gills than in the digestive gland, despite similar concentrations and BAFs between the two tissues. In chapter 1, %MeHg values were similar between the two tissues. The main difference from chapter 1 lies in the use of a 10 x lower quantity of microalgae to feed the mussels, which explains the lower concentration observed, as well as 3 x lower %MeHg. Although the microalgae were prepared with 20 fg Hg/cell, the 24h bioaccumulation fell within the same range as the 2 fg Hg/cell condition from chapter 1, suggesting that both quantity of microalgae and the Hg content per cell drive bioaccumulation in the consumer.

Regarding antioxidant responses and oxidative stress, no increase in lipid peroxidation (LOOH) was observed, unlike in chapter 1 (Seguin et al., 2025), where a significant increase in LOOH levels was observed in the gills after exposure to IHg2. On the other hand, modulations of enzymatic activities of GST and CAT were observed, which is partially similar to the results of chapter 1. The absence of modulation of antioxidant enzymes typically modulated by IHg exposure (Wang et al., 2013), such as SOD or CAT, were also not modulated in *Gammarus fossarum* following dietary exposure to MeHg (Cosio et al., 2021). Nevertheless, an increase in GST activity with IHg and MeHg in the gills as well as a decrease in CAT activity with MeHg in the digestive gland compared to control was observed. These differences in enzyme profiles, along with the absence of lipid peroxidation, suggested that global oxidative stress remained limited. This is consistent with the bioaccumulation levels measured and suggests that exposures were within the metabolic tolerance range of *D. polymorpha*.

Transcriptomic and proteomic analyses revealed different responses between the gills and the digestive gland. A more marked enrichment of metabolic pathways was observed in the gills while THg concentrations after IHg and MeHg exposure were higher in the digestive gland. As the primary site for microalgae digestion, the digestive gland plays a central role in metal accumulation and cellular detoxification processes (Bustamante et al., 2002; Giambérini & Cajaraville, 2005; Raftopoulou & Dimitriadis, 2011). It also exhibits generally higher basal levels of enzyme activity than the gills (Baratange et al., 2022), suggesting greater background antioxidant capacity and, consequently, a higher threshold for oxidative imbalance. On the other hand, the gills, in direct contact with the environment, have a %MeHg higher than in the digestive

gland, suggesting that the gills could represent an early target of MeHg toxicity. This tissue-specific sensitivity highlights the importance of further investigating gill responses, particularly under environmentally realistic exposure conditions.

KEGG analyses of the transcriptome highlighted an enrichment of the pathways involved in « Xenobiotics biodegradation and metabolism », which is consistent with the known toxicity targets of Hg. An enrichment of pathways related to immune signaling was also observed with IHg and MeHg, suggesting an involvement of the immune system in the response to exposure. These observations agree with previous studies that have highlighted the immunotoxic effects of IHg in bivalves (Duchemin et al., 2008; Sauvé et al., 2002; Sheir et al., 2010). In addition, a study conducted in the intestine of the zebrafish *D. rerio* exposed to IHg revealed molecular pathways involved in immune signaling pathways, reinforcing the hypothesis of IHg-induced immunotoxicity (Zhang et al., 2020). Studies in fish (Guardiola et al., 2016; Oliveira Ribeiro et al., 2006; Yadetie et al., 2013) or crayfish (Zhang et al., 2022) have also revealed that exposure to MeHg can trigger alterations of the immune system in different tissues. Integrating immunological biomarkers, such as phagocytic capacity, hemocyte motility, cell viability, and phagocytic efficiency and avidity, more systematically into Hg toxicity assessments would be highly relevant. These functions, some of which are known to be inhibited by chemical contaminants, have already been validated in *D. polymorpha* (Gendre et al., 2023a; b).

In proteomics, pathways enriched by IHg exposure are mainly classified as “Human disease” and “Metabolism”, involving pathways related to secondary metabolites and amino acid metabolism. The pathways enriched by MeHg exposure are mainly classified as “Metabolism” and “Organismal System”, thus revealing pathways involved in energy, lipids and amino acids metabolism, sugar synthesis and metabolism or even the digestive and endocrine system. These results reveal both common enriched pathways between IHg and MeHg, including amino acid metabolism and specific pathways for IHg or MeHg. A proteomic study in *G. fossarum* exposed to dietary MeHg reported a bioaccumulation of THg up to 0.1 µg/g d.w. with MeHg accounting for 78% of the total, and identified 151 modulated proteins (Cosio et al., 2021), 2 x less than in our study. The functional analysis of these proteins in *G. fossarum* highlighted metabolic pathways involved in development, energy metabolism, reproduction and locomotion (Cosio et al., 2021). Among these functions, only energy metabolism was also enriched in our study, suggesting that it is a primary target of MeHg toxicity, as discussed in chapter 1. The differences observed for the other functions could be explained by distinct experimental conditions and biological models. In addition to the results observed in *G. fossarum*, exposures to MeHg by water in *D. polymorpha* also revealed modulations of DAPs involved in the cytoskeleton and cell development (Baratange et al., 2023; Cosio et al., 2021). However, these processes were not affected in our study suggesting that, under our experimental conditions, dietary exposure to MeHg in *D. polymorpha* did not markedly alter cell development and the cytoskeleton, which is consistent with the absence of lipid peroxidation and the overall low level of stress.

Unlike transcriptomic and proteomic, metabolomic revealed more marked modulations in the digestive gland and the gills. It also identified metabolites specifically modulated in MeHg exposure while IHg caused only modulations common with those observed for MeHg. However, due to the lack of available annotations for *D. polymorpha*, precise identification of these metabolites could not be achieved and comparison with transcriptomic, proteomic and the

literature is therefore limited. To overcome this difficulty of lack of knowledge of this model, a targeted metabolomics approach can be considered to identify the main metabolic pathways disrupted by dietary exposure to IHg and MeHg. However, in a previous study in *D. polymorpha* exposed to MeHg by water for 7 days, bioaccumulation level was similar and targeted metabolomic showed no significant modulation demonstrating the inherent limitations of a targeted approach (Baratange et al., 2022). However, since the trophic pathway is the primary route of MeHg contamination, exposures via contaminated microalgae may lead to distinct molecular modulations or the alteration of different metabolites.

5. Conclusion

Multi-omic responses in bivalves exposed to Hg are still underutilized. This study highlights that the responses to Hg exposure depend on targeted tissue, Hg chemical form and the level of biological organization. Overall, the transcriptome and proteome of *D. polymorpha* were more altered in the gills, in direct contact with the environment, whereas the metabolome is more impaired in the digestive gland, the primary organ of detoxification and defence. IHg predominantly altered the transcriptome level, while MeHg altered more strongly the proteome and disrupted energy metabolism, as evidenced by a general decrease in metabolite abundance. These findings suggest two distinct molecular toxicity pathways, despite some shared molecular targets. Thus, the response to Hg exposure involves not only the intensity of the effect but also the specificity of the impacted metabolic pathways. Our results underscored the value of integrating complementary approaches, such as measurements of enzymatic activities related to antioxidant and defence system, which reflect functional responses to oxidative stress and serve for phenotypic anchoring. In parallel, multi-omics analyses offer mechanistic insights and help identify metabolic pathways potentially disrupted by Hg exposure.

6. Références

Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/

Baratange, C., Baali, H., Gaillet, V., Bonnard, I., Delahaut, L., Gaillard, J.-C., Grandjean, D., Sayen, S., Gallorini, A., Le Bris, N., Renault, D., Breider, F., Loizeau, J.-L., Armengaud, J., & Cosio, C. (2023). Bioaccumulation and molecular effects of carbamazepine and methylmercury co-exposure in males of *Dreissena polymorpha*. *Science of The Total Environment*, *897*, 165379. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165379

Baratange, C., Paris-Palacios, S., Bonnard, I., Delahaut, L., Grandjean, D., Wortham, L., Sayen, S., Gallorini, A., Michel, J., Renault, D., Breider, F., Loizeau, J.-L., & Cosio, C. (2022). Metabolic, cellular and defense responses to single and co-exposure to carbamazepine and methylmercury in Dreissena polymorpha. *Environmental Pollution*, *300*, 118933. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.118933

Baratange, C., Rocha de Almeida, T., Armengaud, J., Bonnard, I., David, E., Delahaut, L., Gaillet, V., Guillon, E., Kielbasa, M., Loizeau, J.-L., Maurin, N., Sayen, S., & Cosio, C. (2025). Molecular and genotoxic effects of carbamazepine and methylmercury on the gonads of Dreissena polymorpha. *Aquatic Toxicology*, *287*, 107493. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2025.107493

Boening, D. W. (2000). Ecological effects, transport, and fate of mercury: A general review. *Chemosphere*, *40*(12), 1335-1351. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00283-0

Bustamante, P., Cosson, R. P., Gallien, I., Caurant, F., & Miramand, P. (2002). Cadmium detoxification processes in the digestive gland of cephalopods in relation to accumulated cadmium concentrations. *Marine Environmental Research*, *53*(3), 227-241. https://doi.org/10.1016/S0141-1136(01)00108-8

Campillo, J. A., Sevilla, A., Albentosa, M., Bernal, C., Lozano, A. B., Cánovas, M., & León, V. M. (2015). Metabolomic responses in caged clams, *Ruditapes decussatus*, exposed to agricultural and urban inputs in a Mediterranean coastal lagoon (Mar Menor, SE Spain). *Science of The Total Environment*, *524-525*, 136-147. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.136

Chen, L., Zhang, H., Shi, H., Li, Z., & Xue, C. (2023). Application of multi-omics combined with bioinformatics techniques to assess salinity stress response and tolerance mechanisms of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) during depuration. *Fish & Shellfish Immunology*, *137*, 108779. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108779

Chora, S., Starita-Geribaldi, M., Guigonis, J.-M., Samson, M., Roméo, M., & Bebianno, M. J. (2009). Effect of cadmium in the clam *Ruditapes decussatus* assessed by proteomic analysis. *Aquatic Toxicology*, *94*(4), 300-308. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.07.014

Cosio, C., Degli-Esposti, D., Almunia, C., Gaillet, V., Sartelet, H., Armengaud, J., Chaumot, A., Geffard, O., & Geffard, A. (2021). Subcellular Distribution of Dietary Methyl-Mercury in Gammarus fossarum and Its Impact on the Amphipod Proteome. *Environmental Science & Technology*, *55*(15), 10514-10523. https://doi.org/10.1021/acs.est.1c02385

Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR : Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, *29*(1), 15-21. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635

Duchemin, M. B., Auffret, M., Wessel, N., Fortier, M., Morin, Y., Pellerin, J., & Fournier, M. (2008). Multiple experimental approaches of immunotoxic effects of mercury chloride in the blue mussel, *Mytilus edulis*, through in vivo, in tubo and in vitro exposures. *Environmental Pollution*, *153*(2), 416-423. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.08.015

Gendre, H., Ben Cheikh, Y., Le Foll, F., Geffard, A., & Palos Ladeiro, M. (2023). Comparative immune responses of blue mussel and zebra mussel haemocytes to simultaneous chemical and bacterial exposure. *Fish & Shellfish Immunology*, *135*, 108654. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108654

Gendre, H., Palos Ladeiro, M., Geffard, A., Poret, A., Le Foll, F., & Ben Cheikh, Y. (2023). Modulation of haemocyte motility by chemical and biological stresses in *Mytilus edulis* and *Dreissena polymorpha*. *Fish & Shellfish Immunology*, *139*, 108919. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108919

Giambérini, L., & Cajaraville, M. P. (2005). Lysosomal responses in the digestive gland of the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha,* experimentally exposed to cadmium. *Environmental Research*, *98*(2), 210-214. https://doi.org/10.1016/j.envres.2004.11.003

Guardiola, F. A., Chaves-Pozo, E., Espinosa, C., Romero, D., Meseguer, J., Cuesta, A., & Esteban, M. A. (2016). Mercury Accumulation, Structural Damages, and Antioxidant and Immune Status Changes in the Gilthead Seabream (Sparus aurata L.) Exposed to Methylmercury. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *70*(4), 734-746. https://doi.org/10.1007/s00244-016-0268-6

Guo, H., Xian, J.-A., & Wang, A.-L. (2016). Analysis of digital gene expression profiling in hemocytes of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under nitrite stress. *Fish & Shellfish Immunology*, *56*, 1-11. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.059

Hani, Y. M. I., Prud'Homme, S. M., Nuzillard, J.-M., Bonnard, I., Robert, C., Nott, K., Ronkart, S., Dedourge-Geffard, O., & Geffard, A. (2021). 1H-NMR metabolomics profiling of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) : A field-scale monitoring tool in ecotoxicological studies. *Environmental Pollution*, *270*, 116048. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116048

Hartmann, E. M., & Armengaud, J. (2014). Shotgun proteomics suggests involvement of additional enzymes in dioxin degradation by Sphingomonas wittichii RW1. *Environmental Microbiology*, *16*(1), 162-176. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12264

Heberle, H., Meirelles, G. V., da Silva, F. R., Telles, G. P., & Minghim, R. (2015). InteractiVenn : A web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics*, *16*(1), 169. https://doi.org/10.1186/s12859-015-0611-3

Jiang, W., Fang, J., Du, M., Gao, Y., Fang, J., & Jiang, Z. (2021). Integrated transcriptomics and metabolomics analyses reveal benzo[*a*]pyrene enhances the toxicity of mercury to the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *213*, 112038. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112038

Klein, G., Mathé, C., Biola-Clier, M., Devineau, S., Drouineau, E., Hatem, E., Marichal, L., Alonso, B., Gaillard, J.-C., Lagniel, G., Armengaud, J., Carrière, M., Chédin, S., Boulard, Y., Pin, S., Renault, J.-P., Aude, J.-C., & Labarre, J. (2016). RNA-binding proteins are a major target of silica nanoparticles in cell extracts. *Nanotoxicology*, *10*(10), 1555-1564. https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1244299

Krueger, F., James, F., Ewels, P., Afyounian, E., & Schuster-Boeckler, B. (2021). *FelixKrueger/TrimGalore : V0.6.7 - DOI via Zenodo*. https://doi.org/10.5281/zenodo.5127899

Lance, E., Sartor, L., Foucault, P., Geffard, A., & Marie, B. (2023). Insights on the Organ-Dependent, Molecular Sexual Dimorphism in the Zebra Mussel, Dreissena polymorpha, Revealed by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Metabolomics. *Metabolites*, *13*(10), Article 10. https://doi.org/10.3390/metabo13101046

Laurent, J., Le Berre, I., Armengaud, J., Kailasam, S., Couteau, J., Waeles, M., Le Floch, S., Laroche, J., & Pichereau, V. (2023). Integration of environmental signatures and omics-based approaches on the European flounder to assist with health assessment of estuarine ecosystems in Brittany, France. *Science of The Total Environment*, *878*, 163195. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163195

Laurent, J., Le Berre, I., Armengaud, J., Waeles, M., Sturbois, A., Durand, G., Le Floch, S., Laroche, J., & Bichereau, V. (2024). Environmental signatures and fish proteomics: A multidisciplinary

study to identify the major stressors in estuaries located in French agricultural watersheds. *Environmental Pollution*, *363*, 124876. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.124876

Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics. 2011 Aug 4;12(1):323.

Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology. 2014 Dec 5;15(12):550.

Mao, L., Liu, X., Wang, Z., Wang, B., Lin, C., Xin, M., Zhang, B.-T., Wu, T., He, M., & Ouyang, W. (2021). Trophic transfer and dietary exposure risk of mercury in aquatic organisms from urbanized coastal ecosystems. *Chemosphere*, *281*, 130836. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130836

Oliveira Ribeiro, C. A., Filipak Neto, F., Mela, M., Silva, P. H., Randi, M. A. F., Rabitto, I. S., Alves Costa, J. R. M., & Pelletier, E. (2006). Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. *Environmental Research*, *101*(1), 74-80. https://doi.org/10.1016/j.envres.2005.11.005

Olivon, F., Elie, N., Grelier, G., Roussi, F., Litaudon, M., & Touboul, D. (2018). MetGem Software for the Generation of Molecular Networks Based on the t-SNE Algorithm. *Analytical Chemistry*, *90*(23), 13900-13908. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03099

Prud'homme, S. M., Hani, Y. M. I., Cox, N., Lippens, G., Nuzillard, J.-M., & Geffard, A. (2020). The Zebra Mussel (Dreissena polymorpha) as a Model Organism for Ecotoxicological Studies: A Prior 1H NMR Spectrum Interpretation of a Whole Body Extract for Metabolism Monitoring. *Metabolites*, *10*(6), 256. https://doi.org/10.3390/metabo10060256

Raftopoulou, E. K., & Dimitriadis, V. K. (2011). Comparative study of the accumulation and detoxification of Cu (essential metal) and Hg (nonessential metal) in the digestive gland and gills of mussels *Mytilus galloprovincialis*, using analytical and histochemical techniques. *Chemosphere*, *83*(8), 1155-1165. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.003

Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., & Cao, K.-A. L. (2017). mixOmics : An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLOS Computational Biology*, *13*(11), e1005752. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005752

Sauvé, S., Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Senécal, L., Goudreau, P., & Fournier, M. (2002). Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: In vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic Toxicology*, *58*(3), 189-200. https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00232-6

Seguin, C., Marant, A., Palacios-Paris, S., Bonnard, I., Loizeau, J.-L., David, E., Rioult, D., & Cosio, C. (2025). Unveiling the hidden threat: Molecular, cellular and behavioral effects of dietborne inorganic mercury and methylmercury in *Dreissena polymorpha*. *Chemosphere*, *376*, 144306. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2025.144306

Sheir, S. K., Handy, R. D., & Galloway, T. S. (2010). Tissue injury and cellular immune responses to mercuric chloride exposure in the common mussel *Mytilus edulis*: Modulation by

lipopolysaccharide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *73*(6), 1338-1344. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.01.014

Stephens, M. (2017). False discovery rates: A new deal. *Biostatistics*, *18*(2), 275-294. https://doi.org/10.1093/biostatistics/kxw041

UNEP. (2019). *Global Mercury Assessment 2018*. United Nation Environment Programme, Chemicals and Health Branch Geneva, Switzerland.

van Santen, J. A., Poynton, E. F., Iskakova, D., McMann, E., Alsup, T. A., Clark, T. N., Fergusson, C. H., Fewer, D. P., Hughes, A. H., McCadden, C. A., Parra, J., Soldatou, S., Rudolf, J. D., Janssen, E. M.-L., Duncan, K. R., & Linington, R. G. (2022). The Natural Products Atlas 2.0: A database of microbially-derived natural products. *Nucleic Acids Research*, *50*(D1), D1317-D1323. https://doi.org/10.1093/nar/gkab941

Wang, M., Wang, Y., Zhang, L., Wang, J., Hong, H., & Wang, D. (2013). Quantitative proteomic analysis reveals the mode-of-action for chronic mercury hepatotoxicity to marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Aquatic Toxicology*, *130-131*, 123-131. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.01.012

Xie, M., Bao, Y., Xie, X., Ying, Z., Ye, G., Li, C., Guo, Q., Zhang, W., & Luo, Z. (2024). Integrated transcriptomics and metabolomics reveal the toxic mechanisms of mercury exposure to an endangered species *Tachypleus tridentatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *105*, 104345. https://doi.org/10.1016/j.etap.2023.104345

Yadetie, F., Karlsen, O. A., Lanzén, A., Berg, K., Olsvik, P., Hogstrand, C., & Goksøyr, A. (2013). Global transcriptome analysis of Atlantic cod (*Gadus morhua*) liver after in vivo methylmercury exposure suggests effects on energy metabolism pathways. *Aquatic Toxicology*, *126*, 314-325. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.09.013

Zhang, L., Zhou, Y., Song, Z., Liang, H., Zhong, S., Yu, Y., Liu, T., Sha, H., He, L., & Gan, J. (2022). Mercury Induced Tissue Damage, Redox Metabolism, Ion Transport, Apoptosis, and Intestinal Microbiota Change in Red Swamp Crayfish (*Procambarus clarkii*): Application of Multi-Omics Analysis in Risk Assessment of Hg. *Antioxidants*, *11*(10), 1944. https://doi.org/10.3390/antiox11101944

Zhang, Q.-L., Dong, Z.-X., Luo, Z.-W., Zhang, M., Deng, X.-Y., Guo, J., Wang, F., & Lin, L.-B. (2020). The impact of mercury on the genome-wide transcription profile of zebrafish intestine. *Journal of Hazardous Materials*, *389*, 121842. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121842

Zhang, Q.-L., Zhang, G.-L., Xiong, Y., Li, H.-W., Guo, J., Wang, F., Deng, X.-Y., Chen, J.-Y., Wang, Y.-J., & Lin, L.-B. (2019). Genome-wide gene expression analysis reveals novel insights into the response to nitrite stress in gills of *Branchiostoma belcheri*. *Chemosphere*, *218*, 609-615. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.156

CHAPITRE 3 : Comparaison de la bioaccumulation du mercure chez *Dreissena bugensis* exposée par l'eau et par voie alimentaire

Ce chapitre est en collaboration avec Emmanuel Tessier et David Amouroux de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, E2S UPPA, CNRS, Institut des Sciences Analytiques et des Physico-Chimie pour l'Environnement et les Matériaux (IPREM), Pau, France

Résumé

Ce chapitre s'intéresse à la bioaccumulation du IHg et MeHg chez *Dreissena bugensis*, en comparant deux voies d'exposition : l'eau et l'alimentation, via des microalgues contaminées. Deux types de microalgues sont étudiées : les Chlorelles, dont la paroi organique riche en cellulose et pectine offre de nombreux sites de liaison au Hg, et les Diatomées, caractérisées par une paroi siliceuse. Les expositions sont réalisées en utilisant des concentrations en Hg réalistes, grâce à l'utilisation des isotopes stables du Hg. Les résultats montrent que l'exposition par l'eau entraîne une accumulation plus élevée de IHg et MeHg dans les branchies, tandis que l'exposition par l'alimentation conduit à une accumulation préférentielle dans la glande digestive. L'étude révèle que la structure cellulaire des microalgues joue un rôle dans le transfert du Hg, soulignant l'importance des caractéristiques des parois dans l'accessibilité du Hg pour les organismes consommateurs. Par ailleurs, les Diatomées sont filtrées plus rapidement que les Chlorelles par *D. bugensis*, suggérant des différences dans la consommation et l'assimilation du Hg selon le type de microalgues. Ces résultats soulignent ainsi l'importance de la composition cellulaire du phytoplancton dans la dynamique du Hg au sein des réseaux trophiques aquatiques et la complexité des interactions entre contaminants et organismes. Compte tenu du caractère persistant et toxique du Hg, ces résultats mettent également en évidence la nécessité d'intégrer des scénarios d'exposition réalistes pour mieux évaluer les risques écotoxicologiques associés au Hg dans les écosystèmes d'eau douce.

1. Introduction

Le Hg est un polluant prioritaire naturellement présent dans l'environnement, dont les concentrations ont fortement augmenté à cause des activités anthropiques (combustion du charbon, exploitation minière, rejets industriels) au cours du dernier siècle, contaminant ainsi les sols et les eaux en Hg (UNEP, 2019). Dans les milieux aquatiques, le Hg subit de nombreux processus biogéochimiques, comme la méthylation, principalement réalisée par des bactéries sulfato-réductrices et méthanogènes, conduisant à la formation du MeHg (Gilmour & Henry, 1991; Parks et al., 2013). Le MeHg, forme organique la plus toxique du Hg, se bioamplifie dans les réseaux trophiques, faisant du transfert trophique le principal vecteur de contamination pour les animaux et l'Homme (Boening, 2000; Clarkson et al., 2003). Cependant, le transfert trophique chez les consommateurs primaires, en particulier dans les milieux d'eau douce, reste encore peu documenté.

Les micro-organismes phototrophes tels que les diatomées et les microalgues vertes constituent la base des réseaux trophiques aquatiques et jouent un rôle clé dans la spéciation et la biodisponibilité du Hg (Gojkovic et al., 2022; Grégoire & Poulain, 2018). Bien qu'ils ne représentent qu'une infime fraction de la biomasse photosynthétique, la bioconcentration du Hg par le phytoplancton est considérée comme l'un des principaux mécanismes par lesquels le Hg est transféré du milieu aquatique vers les niveaux trophiques supérieurs (Dranguet et al., 2014; Le Faucheur et al., 2014). La nature des parois cellulaires des microalgues, notamment leur composition chimique, pourrait moduler le transfert du Hg vers les consommateurs primaires. Par exemple, le MeHg intracellulaire est plus efficacement transféré aux consommateurs comme les copépodes que le Hg adsorbé sur les frustules siliceuses des diatomées (Mason et al., 1996). En revanche, chez les macrophytes, le Hg lié aux parois cellulaires riches en cellulose et pectine semble biodisponible pour certains consommateurs (Beauvais-Flück et al., 2016, 2017). De plus, il a récemment été montré que certaines diatomées, comme *C. meneghiniana*, peuvent accumuler jusqu'à 5 x plus de THg que des microalgues vertes comme *C. reinhardtii* (Millet et al., 2024). Chez les organismes aquatiques, le mode d'exposition et les stratégies d'alimentation influencent la bioaccumulation. Alors que l'exposition par l'eau est la plus étudiée, des travaux expérimentaux de terrain montrent que l'exposition par voie alimentaire constitue souvent la principale source de MeHg (Lee & Fisher, 2017; Mathews & Fisher, 2008; Riva-Murray et al., 2013)

Dans ce contexte, cette étude vise à évaluer l'influence de l'espèce de phytoplancton sur la bioaccumulation de l'IHg et du MeHg chez *Dreissena bugensis*, bivalve filtreur d'eau douce et consommateur primaire clé. Plus spécifiquement, les objectifs sont de déterminer : 1) si l'exposition au Hg par l'alimentation conduit à une bioaccumulation plus importante que l'exposition par l'eau ; 2) si la nature de la microalgue (chlorelle versus diatomée) influence la prise alimentaire et la bioaccumulation des différentes formes de Hg chez *D. bugensis*. Pour répondre à ces questions, deux microalgues d'eau douce ont été choisies en raison de leur composition cellulaire et de leur importance écologique : *Chlorella vulgaris*, microalgue verte à paroi riche en cellulose et pectine, et *Cyclotella meneghiniana*, diatomée caractérisée par une frustule siliceuse. Le bivalve *Dreissena bugensis* (ou *Dreissena rostriformis bugensis*), aussi appelée « moule quagga », peut filtrer jusqu'à 280 L/g/j (Higgins & Zanden, 2010) et bioconcentrer les substances toxiques présentes dans l'eau (Figure 3-1). Originaire du bassin ponton-caspien, sa distribution s'est limitée à l'Ukraine jusqu'au milieu du 20ème siècle environ. Sa propagation initiale a été lente, mais elle a augmenté considérablement depuis les années 1980 en Europe de

l'Est et de l'Ouest, ainsi qu'en Amérique du Nord (Zhulidov et al., 2004), parfois en cohabitation avec *D. polymorpha* mais occupant des niches écologiques différentes, notamment des zones plus profondes (Baldwin et al., 2002). Comme *D. polymorpha*, *D. bugensis* se nourrit de phytoplancton, zooplancton et bactérioplancton (Karatayev & Burlakova, 2025). Sa capacité à accumuler les métaux, notamment le Hg, a été montrée en milieu naturel (N. A. Berezina et al., 2024; Le et al., 2011; Mueting & Gerstenberger, 2010), ce qui en fait un organisme de biosurveillance prometteur.



Figure 3-1. Photo de *Dreissena bugensis* en stabulation.

Ainsi, à travers des expositions contrôlées comparant les expositions par l'eau et par l'alimentation du ^{199}IHg et ^{201}MeHg, ce travail vise à mieux comprendre les mécanismes de transfert et de bioaccumulation du Hg chez les bivalves. Ces résultats permettront de mieux évaluer le rôle des consommateurs primaires dans la dynamique du Hg dans les écosystèmes d'eau douce et de renforcer les outils de biosurveillance et de gestion des risques écotoxicologiques liés au Hg.

2. Matériel et méthodes

2.1. Consommables et verrerie

La verrerie ainsi que les pièges en or ont été chauffés dans un four à 400°C pendant 1h pour éliminer les traces de Hg. Le matériel en plastique a été lavé à l'acide.

2.2. Organismes d'étude

Les Chlorelles *Chlorella vulgaris* (MNHN-ALCP-0000-035.1) ont été cultivées dans des erlenmeyers de 500 mL contenant 150 mL de milieu BG11 1% (Sigma-Aldrich ; Tableau S3-1). *C. vulgaris* ont été cultivées dans une enceinte fermée à 24°C sur un plateau agitateur (100 rpm) avec une lumière continue de 150 lux jusqu'à atteindre la phase exponentielle de croissance.

Les Diatomées *Cyclotella meneghiniana* (CCAC 0036 strain, Collection of Algal Cultures, University of Duisburg-Essen, Germany) ont été cultivées dans des erlenmeyers de 2L contenant 600 mL de milieu pour diatomées (CCAP FADM-C Diatom Medium ; Tableau S3-2). *C. meneghiniana* ont été cultivées dans une enceinte fermée à 20°C sans agitation avec un cycle lumière:obscurité 8 : 16h à 300 lux jusqu'à atteindre la phase exponentielle de croissance.

Les moules quaggas *D. bugensis* ont été collectées dans le lac Léman (Port de Versoix-Bourg, Suisse, 46°16'34.3"N 6°10'14.8"E) en mars 2024 puis acclimatées dans des aquariums avec un bullage constant pendant 3 semaines. Le stade de maturité sexuelle des individus n'a pas permis

de les sexer, indiquant que les individus sont en phase de repos. Les quaggas ont été nourries deux fois par semaine avec 4×10^6 cellules/individu/jour de *Nannochloropsis* (Nanno 3600 1L, Reed Mariculture, Planktovie).

2.3. Exposition des microalgues à ^{199}IHg et ^{201}MeHg

Les expositions ont été conçues pour simuler un bloom de microalgues de $3,5\times10^4$ cellules/ml exposé à 70 ng/L de Hg total, la NQE européenne, correspondant à 2 fg/cellule.

Les cultures de chlorelles (6.28 ± 3.03 x10^8 cellules/50mL) et diatomées (7.63 ± 1.77 x10^7 cellules/50mL) ont été exposées 2h sous agitation orbitale à des concentrations de 2 fg/cellule de ^{199}IHg (199Hg-enriched Standard Solution, ISC Science) et 0.2 fg/cellule de ^{201}MeHg (^{201}Hg-enriched Methylmercury, ISC Science), correspondant à un ratio de 10% afin de mimer ce qui peut être observé dans l'environnement (Bravo et al., 2014a; Regier et al., 2013). Les cultures de chlorelles et diatomées non exposées (contrôle) ont également été agitée pendant 2h. Les microalgues exposées et contrôle ont ensuite été centrifugées (1800 g, 10 min), rincées à l'eau de source et de nouveau centrifugées. Cette étape de rinçage est répétée une fois. Afin de comprendre si la localisation du Hg chez les microalgues impacte le transfert vers le consommateur, des microalgues ont été rincées 5 min avec une solution d'EDTA-cystéine (10^{-3} M) qui permet de retirer le Hg labile des parois et ainsi évaluer les concentrations intracellulaires, c'est-à-dire non extractibles du Hg : Chlorelles$_{non\text{-}ext}$ et Diatomées$_{non\text{-}ext}$ (Larras et al., 2013). En effet, l'EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid) est un agent chélatant capable de se lier à un ion métallique (Hassler et al., 2004) et la cystéine, grâce à son groupe thiol (-SH), forme des liaisons covalentes Hg-S (Srikhaow et al., 2020). La cystéine attaque les sites de Hg fortement liés en formant des complexes thiols-Hg et l'EDTA stabilise ces complexes ou capte les ions Hg libérés, les maintenant en solution sous forme soluble. Ces microalgues seront également rincées à l'eau de source puis centrifugées. Les culots obtenus sont re-suspendus dans 5 mL d'eau de source (Figure 3-2).

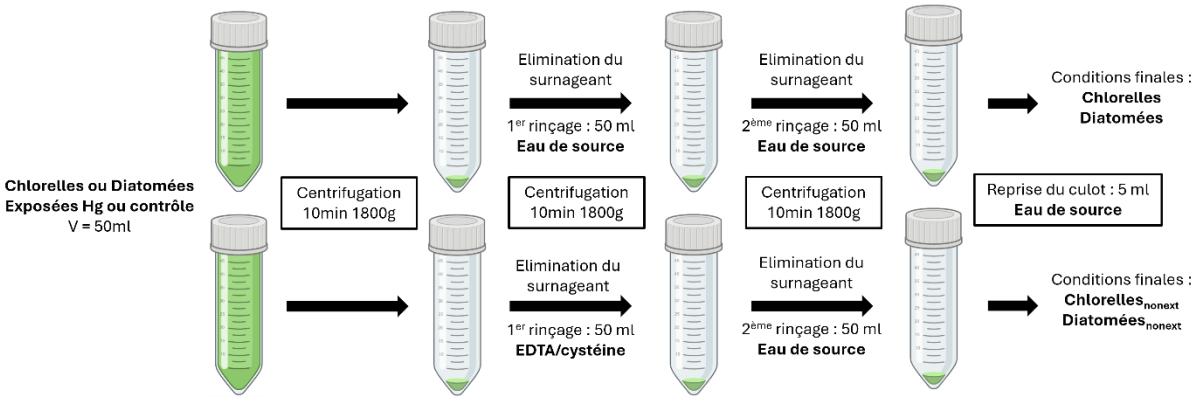

Figure 3-2. Schéma récapitulatif de la préparation des microalgues. Ce protocole est appliqué pour les cultures de chlorelles et diatomées, exposées au Hg ou contrôle.

2.4. Exposition de *D. bugensis* au Hg par l'alimentation et par l'eau

Trois jours avant l'exposition, 10 béchers, cinq témoins (contrôles) et cinq exposés, contenant chacun cinq moules quaggas, représentant les 5 conditions d'exposition ont été utilisées : 1 pour l'exposition par l'eau et 4 pour les expositions par alimentation (Chlorelles, Diatomées, Chlorelles$_{non\text{-}ext}$ et Diatomées$_{non\text{-}ext}$) avec 45 mL d'eau par moule et un bullage permanent. Les arrivées d'air principales permettant le bullage étaient équipées d'un filtre au

charbon actif et les arrivées d'air individuelles dans chaque bécher d'un piège en or pour limiter les risques d'entrée de Hg par le bullage. Les béchers étaient également recouverts de parafilm pour limiter l'évaporation de l'eau (Figure 3-3).

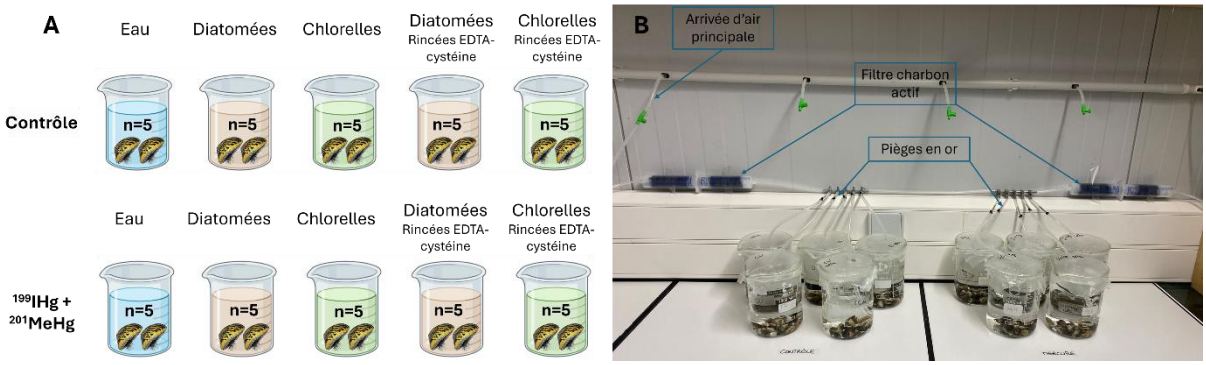

Figure 3-3. Plan expérimental d'exposition de *D. bugensis* par l'eau et l'alimentation (A) et photo du dispositif expérimental (B).

Les quaggas, exposées par voie alimentaire, ont été nourries quotidiennement pendant 4 jours, avec 10^6 cellules/individus correspondant à 2 fg/cellule pour ^{199}IHg et 0.2 fg/cellule pour ^{201}MeHg respectivement. Celles exposées par l'eau, ont reçu quotidiennement 40 µL de ^{199}IHg et 8 µL de ^{201}MeHg sur une période de 4 jours. Ainsi, les quaggas ont été exposées à une quantité équivalente de Hg par l'alimentation ou par l'eau. L'eau a été renouvelée tous les jours juste avant la nouvelle exposition. A l'issu des 4 jours d'exposition, les branchies et la glande digestive des moules ont été prélevés et conservés à -80°C pour des analyses de bioaccumulation et biotransformation du Hg. Les coquilles des moules exposées par l'eau ont été prélevées et conservées à -80°C et l'eau d'exposition acidifiée à 0.5% (v/v) avec HCl suprapur et conservée à 4°C. Une portion des microalgues exposées et non exposées a été centrifugé et stockée à -80°C avant mesure des concentrations en Hg pour déterminer la répartition du Hg au sein des cellules et mesurer le Hg transféré des microalgues vers les moules.

2.5. Spéciation du Hg

2.5.1. Préparation des échantillons

Les branchies, glandes digestives, coquilles et microalgues ont été lyophilisés, pesés puis digérés individuellement dans 1 mL de TetraMethylAmmonium Hydroxide (TMAH) pour les branchies et glandes digestives, 3 mL de HNO_3 6N pour les coquilles et 1 mL de HNO_3 3N pour les microalgues (Garcia-Calleja et al., 2021; Monperrus et al., 2008). Les coquilles ont en plus subi une digestion micro-onde à 75°C pendant 3 minutes. Une quantité connue de spikes enrichis en ^{198}IHg et ^{202}MeHg (ISC Sciences, Oviedo Espagne), préalablement caractérisés en termes d'abondance isotopique et de concentration, a été ajoutée aux échantillons. Seules les eaux des béchers témoins n'ont pas reçu de spike enrichi en ^{202}MeHg dû aux concentrations en MeHg très faibles, voire inexistantes, attendues. Ensuite, 5 mL de tampon acide acétique/acétate (0,1 M, pH 3,9) ont été ajouté puis le pH ajusté à 3,9 avec du HCl ou HNO_3. Les espèces de Hg ont été éthylées en ajoutant du tétraéthylborate de sodium (NaBrEt4, 5% v/v) et extraites dans de l'isooctane (entre 0.2 et 3 mL) par agitation pendant 20 minutes.

2.5.2. Analyse par GC-ICP-MS et dilution isotopique

Les échantillons ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à plasma inductif (GC-ICP-MS), comme détaillé par Bridou et al. (2011). Chaque échantillon a été injecté en triplicat et la quantification des isotopes enrichis ^{199}iHg et du ^{201}MeHg a été réalisée en appliquant la méthodologie de déconvolution du modèle isotopique (Garcia-Calleja et al., 2021; Rodriguez-Gonzalez et al., 2013). Les limites de détection (LD) analytiques et expérimentales sont répertoriées dans le Tableau 3-1. La LD analytique est calculée comme 3 x l'écart-type des blancs (3 blancs de TMAH ou HNO_3), qui permet de décrire la performance analytique de l'instrument et de la méthode, reflétant les concentrations que l'on peut réellement quantifier dans nos échantillons (Kleindienst et al., 2025). La LD expérimentale est calculée comme 3 x l'écart-type des échantillons témoin. La limite de détection analytique n'est d'ailleurs pas calculée pour l'eau car nous avons analysé l'eau directement sans passer par la phase de digestion dans un substrat. Pour le ^{201}MeHg chez *C. vulgaris*, les blancs de HNO_3 n'ont pas été spikés, donc la limite de détection analytique ne peut pas être calculée. Le facteur de bioaccumulation (BAF, g^{-1}) a été calculé comme le rapport entre la concentration en THg chez les dreissènes (µg/g) et la concentration effective en THg dans 1×10^6 cellules de microalgues (µg) et le facteur de bioconcentration (BCF) comme le rapport entre la concentration en THg chez les dreissènes (µg/g) et la concentration en THg dans l'eau (µg/L).

Tableau 3-1. Limites de détection analytique et expérimentale du ^{199}IHg et ^{201}MeHg pour les microalgues, tissus et coquilles des dreissènes (ng/g) et l'eau d'exposition brute et filtrée (ng/L).

	Limites de détection analytiques		**Limites de détection expérimentales**	
	^{201}MeHg	^{199}IHg	^{201}MeHg	^{199}IHg
Eau	0,05	0,05		1,53
Microalgues	1,49	1,49	13,77	12,40
Tissus	0,01	0,01	25,98	28,93
Coquilles	0,02	0,02	0,11	478,37

2.6. Effets du Hg par l'alimentation sur la filtration de *D. bugensis*

Pour observer le comportement de filtration de *D. bugensis* en fonction de l'espèce de microalgue donnée, nous avons utilisé le même dispositif que décrit dans Seguin et al. (2025). Chaque moule a été placée dans un tube contenant 45 ml d'eau de source et un bullage permanent pour oxygéner le milieu et minimiser la sédimentation des microalgues. L'arrivée d'air comprenait un filtre en or permettant de limiter l'entrée de Hg par le bullage. Quatre tubes, contenant chacun une moule, ont été préparés pour chaque condition (Ctrl, IHg et MeHg) et espèce de microalgue (Chlorelles et Diatomées). Pour chaque condition, un tube sans moule a été préparé, servant de contrôle négatif, pour s'assurer de la stabilité de la concentration en microalgues dans le dispositif de filtration. Les moules quaggas ont été nourries avec 10^6 cellules de microalgues/individu tous les jours pendant 4 jours. L'eau a été renouvelée avant chaque nourrissage. Le nombre de microalgues non consommées dans chaque tube a été mesuré après 0, 10, 20, 30, 40, 60 et 90 minutes par cytométrie en flux (NovoCyte Advanteon V6Y4B5, Agilent). Le taux de filtration (FR) a été calculé à l'aide du modèle de Gompertz (Zwietering et al., 1990), utilisé pour décrire des croissances asymptotiques. La formule utilisée est la suivante : $y = a \times \exp(-b \times \exp(-c \times x))$ où *a* représente l'asymptote maximale, *b* détermine la position de l'inflexion, et *c* le taux de croissance initial. Cette fonction permet de déterminer le temps pour

lequel on observe un taux de filtration de 50% (FR50) pour chaque individu à J1, J2, J3 et J4. Les ajustements individuels ont été réalisés par régression non linéaire en utilisant la fonction nls() sur R Studio.

2.7. Analyses statistiques

Afin de tester l'influence du mode d'exposition sur la bioaccumulation du Hg dans les tissus de *D. bugensis*, nous avons comparé 1/ l'exposition par l'eau et par Chlorelles, 2/ l'exposition par Chlorelles et par Diatomées et 3/ les expositions par Chlorelles, Diatomées, $Chlorelles_{non\text{-}ext}$ et $Diatomées_{non\text{-}ext}$ pour chaque tissu (branchies et glande digestive) et chaque forme de Hg (IHg et MeHg). Pour chaque comparaison, la normalité des résidus (test de Shapiro-Wilk, α =0,01) et l'homoscédasticité (test de Brown Forsythe, α =0,05) ont été évalués avant d'interpréter les résultats de l'ANOVA. Des ANOVA 1 facteur ont été réalisées suivie du test post-doc de Tukey (α =0,05). Si nécessaire, une transformation logarithmique a été appliquée pour répondre à ces critères. Si seul le critère d'homoscédasticité n'était pas rempli, une ANOVA de Welch à 1 facteur (α =0,05) a été réalisée, suivie du test post-hoc de Games Howell (α =0,05). Si aucun des deux critères n'était rempli, un test non paramétrique à sens unique de Kruskall-Wallis (α =0,05) a été effectué, suivi du test post-hoc de Wilcoxon pour les échantillons indépendants avec ajustement de la valeur p de Hochberg (α =0,05) pour les comparaisons multiples.

Les effets des conditions (Ctrl, IHg et MeHg), des espèces de microalgues (chlorelles et diatomées) ainsi que leur interaction sur les FR50 ont été évalués à l'aide d'une PERMANOVA pour comparaisons multiples à l'aide de la fonction aovp() du package lmPerm (Wheeler, 2010), avec 5000 permutations sur R Studio. Si des effets significatifs ont été détectés ($p < 0,05$), des comparaisons post-hoc par paires ont été réalisées à l'aide de la fonction pairwisePermutationMatrix() du package rcompanion (Mangiafico, 2024) avec un ajustement des p-values (Benjamini-Hochberg).

3. Résultats

3.1. Concentrations en Hg dans l'eau et les microalgues

3.1.1. Eau d'exposition

Les concentrations effectives en ^{199}IHg et ^{201}MeHg mesurées dans l'eau des dreissènes exposées par l'eau sont stables sur les 4 jours d'exposition et confirment que les changements d'eau entre chaque jour d'exposition permettent de retirer les éventuelles traces de Hg de l'exposition du jour précédent (Tableau 3-2). Les concentrations en ^{199}IHg et ^{201}MeHg dans les béchers contenant les moules non exposées sont en-dessous des limites de détection analytiques du GC-MS.

Tableau 3-2. Concentrations en ^{199}IHg et ^{201}MeHg (ng/L) dans les eaux d'exposition des dreissènes exposées directement par l'eau (moyenne ±SD des trois réplicats d'injection).

	Temps d'exposition	**^{201}MeHg**	**^{199}IHg**
Brute	J1	4,00 ±0,18	53,59 ±1,16
	J2	3,38 ±0,09	41,91 ±0,61
	J3	3,36 ±0,10	45,69 ±0,49
	J4	3,96 ±0,06	47,22 ±1,92
Filtrée	J1	3,78 ±0,24	52,75 ±2,20

	J2	3,10 ±0,07	46,70 ±0,81
	J3	3,33 ±0,02	45,87 ±1,34
	J4	3,77 ±0,08	49,85 ±1,53

3.1.2. Concentrations en Hg chez les chlorelles et les diatomées

Les concentrations en ^{201}MeHg et ^{199}IHg sont respectivement 4 x et 3 x plus élevées chez les Chlorelles que chez les Diatomées, suggérant que les Chlorelles accumulent plus de Hg. Les concentrations en ^{201}MeHg et ^{199}IHg sont supérieures de 3.2 x et 1.9 x chez les Diatomées par rapport aux Diatomées$_{non-ext}$. Pour les Chlorelles$_{non-ext}$, les concentrations en Hg diminuent également de 1.6 x pour ^{201}MeHg et 1.9 x pour ^{199}IHg par rapport aux Chlorelles (Tableau 3-3). Les concentrations en IHg naturel dans les microalgues contrôle, pouvant être considérées comme un bruit de fond en Hg présent dans les cultures, sont similaires entre les Chlorelles et les Diatomées.

Tableau 3-3. Concentrations en IHg naturel (fg/cell) chez les microalgues contrôle et en ^{201}MeHg et ^{199}IHg (fg/cell) chez les microalgues exposées (moyenne ± SD des trois réplicats d'injection).

	Contrôle	**Exposés**	
	IHg naturel	^{201}MeHg	^{199}IHg
Chlorelles	0,51 ± 0,0	0,62 ±0,1	3,73 ±1,0
Diatomées	0,59 ± 0,1	0,16 ±0,0	1,15 ±0,2
Chlorelles$_{non-ext}$	0,51 ± 0,0	0,39 ±0,0	1,97 ±0,2
Diatomées$_{non-ext}$	0,43 ± 0,0	0,05 ± 0,0	0,61 ± 0,3

De plus, le ^{201}MeHg et ^{199}IHg sont répartis de manière égale entre la fraction non-extractible et la fraction extractible chez les Chlorelles alors que chez les Diatomées, le ^{201}MeHg est répartit à 61% dans la fraction extractible et le ^{199}IHg, à l'inverse, à 65% dans la fraction non-extractible (Figure 3-4). Toutefois, en raison de la faible biomasse obtenue dans les aliquots de microalgues, limitant ainsi la précision des pesées, il sera nécessaire de reproduire ces mesures avec des volumes de culture plus importants afin d'accroître la biomasse collectée et améliorer la fiabilité des analyses.

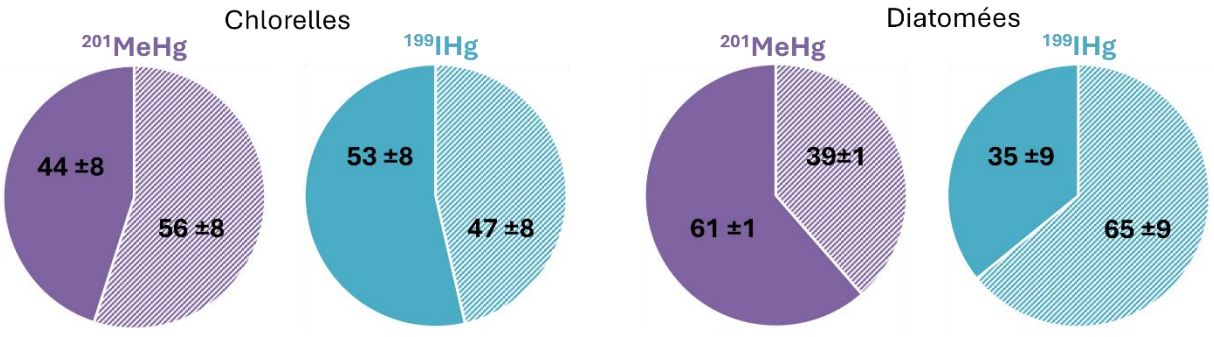

Figure 3-4. Répartition du ^{201}MeHg et ^{199}IHg chez les Chlorelles et les Diatomées. Couleur hachurée : fraction non extractible et couleur pleine : fraction extractible.

3.2. Bioaccumulation du Hg chez *D. bugensis*

3.2.1. Exposition par l'eau vs par l'alimentation

Dans les branchies de *D. bugensis*, l'exposition par l'eau au ^{201}MeHg et au ^{199}IHg a entraîné des concentrations respectivement 4,1 et 6,5 fois plus élevées que celles observées après

exposition aux Chlorelles (Figure 3-5). Dans la glande digestive, l'exposition aux Chlorelles contaminées au ^{201}MeHg a induit une concentration 3,4 fois supérieure à celle de l'exposition par l'eau. Une tendance similaire a été observée pour le ^{199}IHg dans la glande digestive, bien qu'elle ne soit pas statistiquement significative. L'exposition à ^{199}IHg, par l'eau et les Chlorelles, a entrainé des BAF respectivement 10,5 x et 40 x supérieurs dans la glande digestive par rapport aux branchies (Tableau 3-4). En revanche, l'exposition à ^{201}MeHg par l'eau a entrainé un BAF 2,9 x supérieur dans les branchies que dans la glande digestive. A l'inverse, une exposition aux Chlorelles a entrainé un BAF 2 x inférieur dans les branchies que dans la glande digestive. Ces résultats indiquent alors, que le IHg est bioaccumulé préférentiellement dans la glande digestive et le MeHg dans les branchies après une exposition par l'eau. L'exposition au Hg par ingestion de Chlorelles entraîne une bioaccumulation préférentielle de IHg et MeHg dans la glande digestive.

Les concentrations en ^{201}MeHg et ^{199}IHg mesurées dans les coquilles de *D. bugensis* exposées et non exposées par l'eau sont en-dessous des limites de détection analytiques et expérimentales.

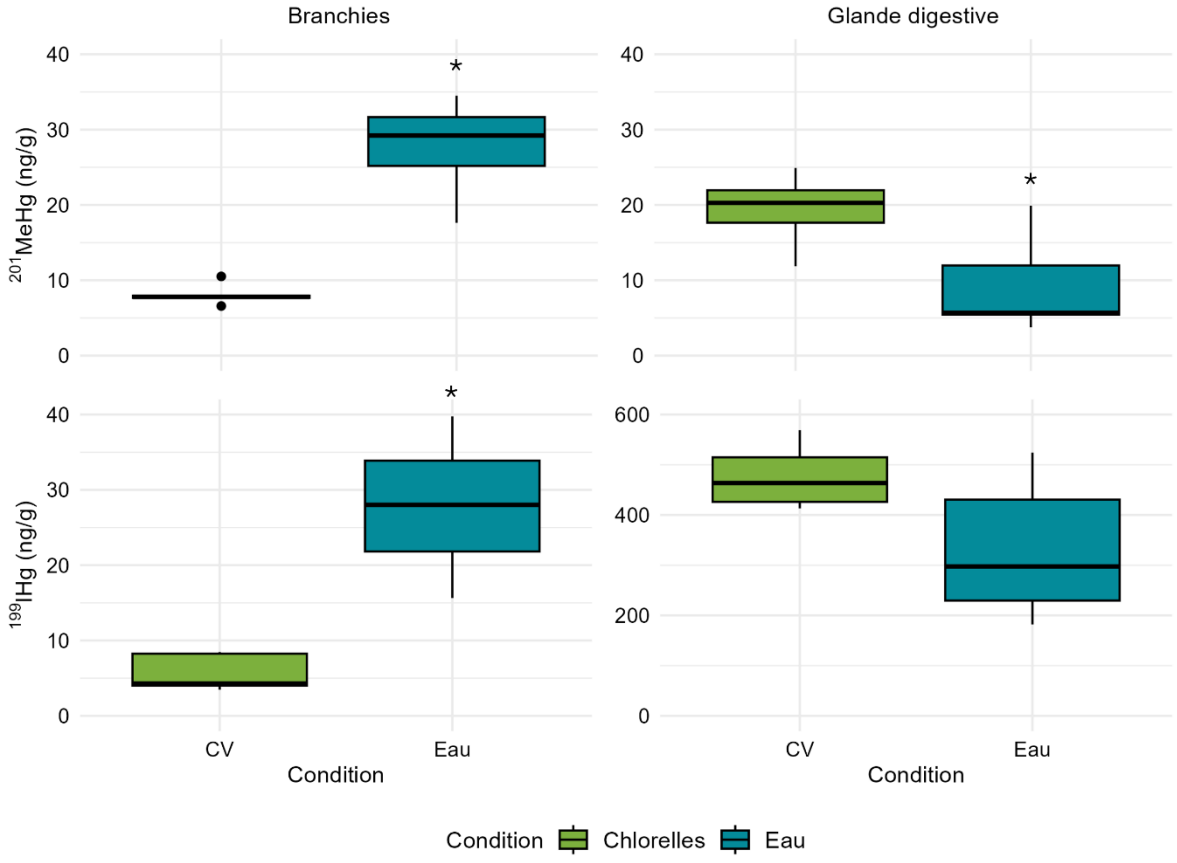

Figure 3-5. Concentrations en ^{199}IHg et ^{201}MeHg dans les branchies et la glande digestive de *D. bugensis* après exposition par l'eau et aux Chlorelles (CV) contaminées (* = $p < 0.05$, n=4 à 5).

3.2.2. Exposition par l'alimentation : comparaison entre deux espèces de microalgues

Dans les branchies de *D. bugensis*, l'exposition au ^{201}MeHg aux Chlorelles a induit une bioaccumulation 2.3 x plus forte qu'une exposition aux Diatomées (Figure 3-6). Cependant, cette différence n'est pas retrouvée pour ^{199}IHg par Chlorelles et Diatomées. Dans la glande digestive de *D. bugensis,* la bioaccumulation au ^{201}MeHg et ^{199}IHg n'est pas statistiquement différente après exposition avec des Chlorelles et Diatomées contaminées. En revanche, comme pour la

bioaccumulation par l'eau, les concentrations en ^{199}IHg dans la glande digestive sont 83 x et 94 x supérieures à celles des branchies.

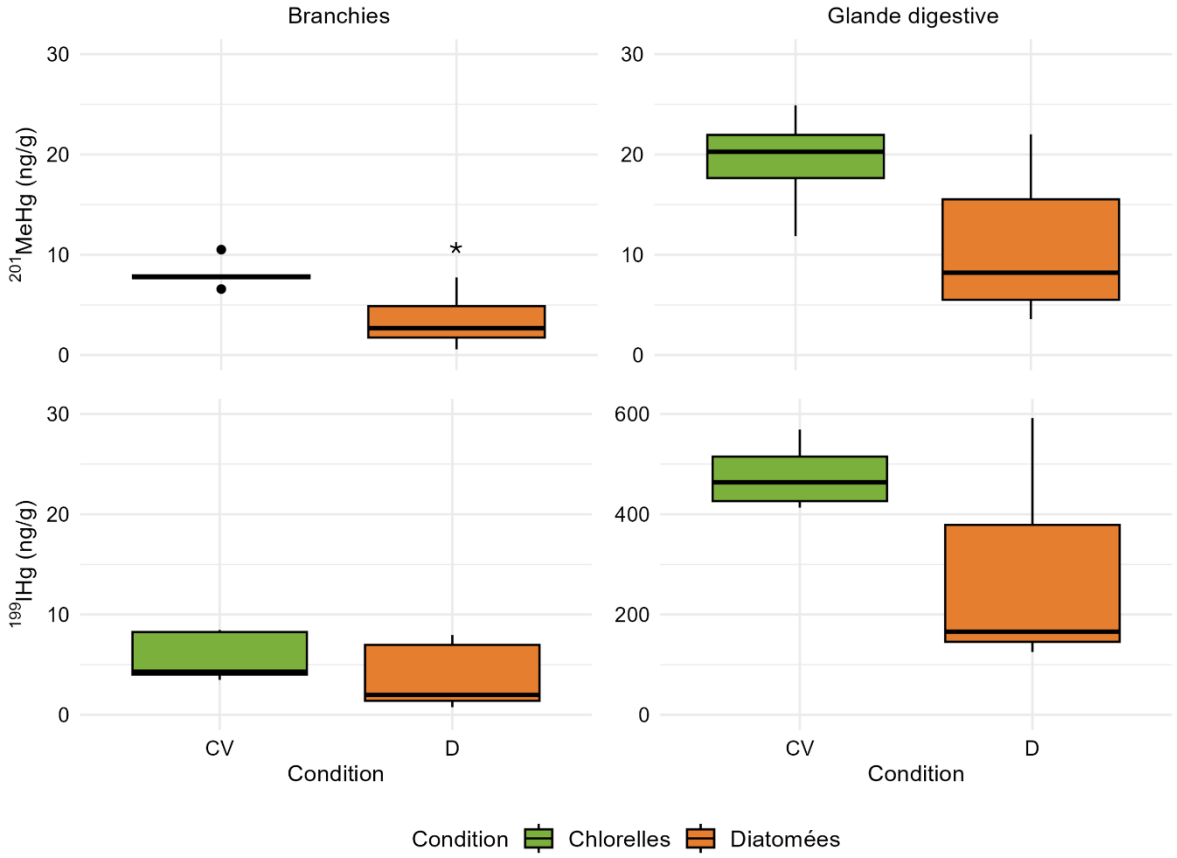

Figure 3-6. Concentrations en ^{199}IHg et ^{201}MeHg dans les branchies et la glande digestive de *D. bugensis* après une exposition par Chlorelles (CV) et Diatomées (D) (* = $p < 0.05$, n=4 à 5).

3.2.3. Exposition par l'alimentation : transfert du Hg_{nonext}

Pour cette exposition, les $Chlorelles_{nonext}$ et les $Diatomées_{nonext}$ représentent les microalgues contenant la fraction non extractible du **^{201}MeHg** et **^{199}IHg**, utilisé comme proxy de la fraction intracellulaire.

L'exposition à des Chlorelles contaminées au Hg a entrainé des concentrations en ^{201}MeHg respectivement 2,0 et 5,1 x supérieures dans les branchies et la glande digestive par rapport aux $Chlorelles_{nonext}$ (Figure 3-7), suggérant que la fraction extractible du MeHg joue un rôle dans le transfert du MeHg au consommateur primaire. Cette observation est confirmée par les BAF, la différence étant plus importante dans la glande digestive (Tableau 3-4). L'exposition aux Chlorelles et aux Diatomées a induit des concentrations en **^{201}MeHg** et **^{199}IHg** similaires dans les tissus de *D. bugensis* alors que les BAF sont 2,3 x plus élevés pour les Diatomées que pour les Chlorelles (Tableau 3-4). Cependant, les concentrations mesurées dans les tissus des quaggas exposées aux Diatomées sont plus hétérogènes entre les individus. Aucune différence de bioaccumulation du Hg n'est observée entre *D. bugensis* exposée aux Diatomées et aux $Diatomées_{nonext}$ contaminées au Hg, ce qui est confirmé par les BAF calculés.

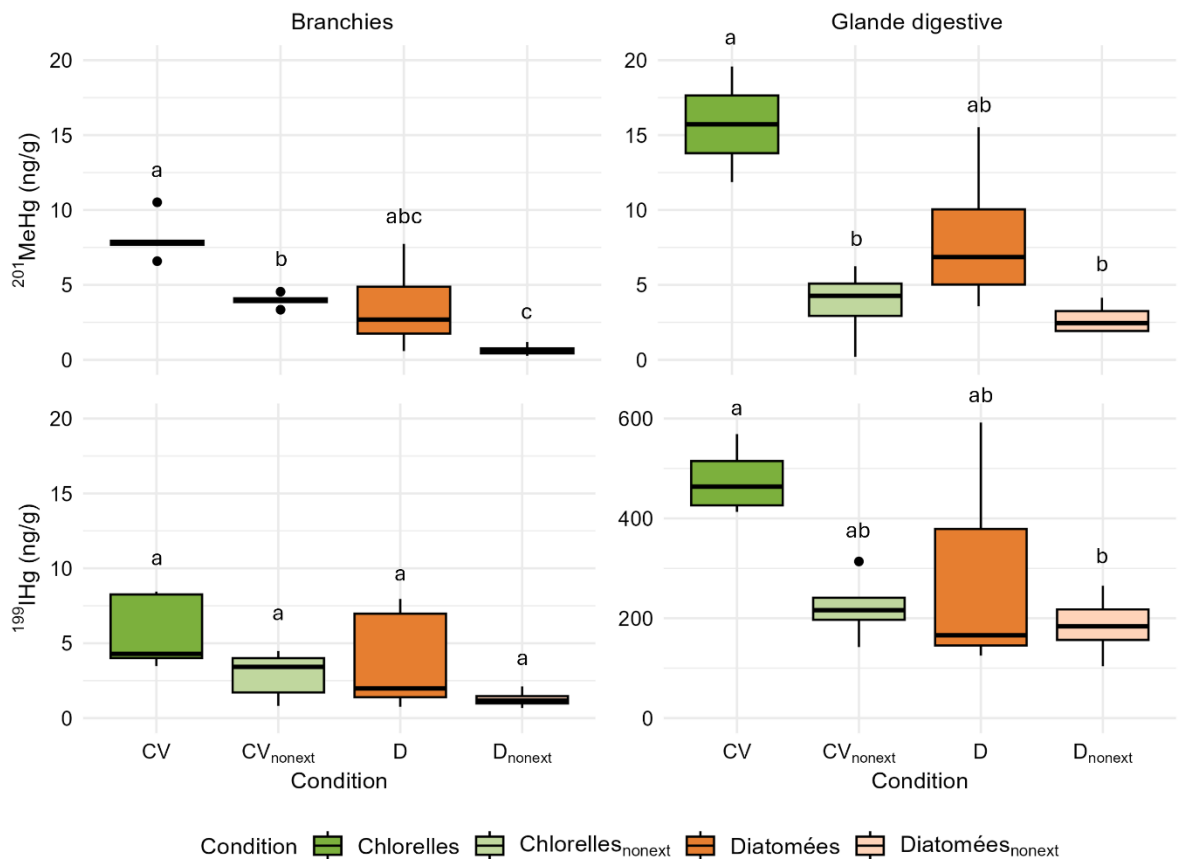

Figure 3-7. Concentrations en ^{201}MeHg et ^{199}IHg dans les branchies et la glande digestive de *D. bugensis* après une exposition par microalgues contaminées : Chlorelles (CV), Chlorelles$_{nonext}$ (CV$_{nonext}$), Diatomées (D) et Diatomées$_{nonext}$ (D$_{nonext}$). Les lettres représentent les différences significatives ($p < 0.05$, n=4 à 5).

Tableau 3-4. Facteurs de bioaccumulation (BAF, g^{-1}) après exposition aux Chlorelles et aux Diatomées contaminées et de bioconcentration (BCF) après exposition par l'eau chez *D. bugensis* (n = 4 à 5).

	Branchies		**Glande digestive**	
	^{201}MeHg	^{199}IHg	^{201}MeHg	^{199}IHg
Chlorelles	14,7 ± 2,6	5,7 ± 2,4	30,8 ± 12,9	156,8 ± 23,3
Chlorelles$_{nonext}$	10,4 ± 1,1	2,9 ± 1,6	9,8 ± 6,7	120,0 ± 38,0
Diatomées	27,2 ± 17,0	3,8 ±3,4	69,9 ± 48,8	363,1 ± 257,8
Diatomées$_{nonext}$	12,6 ±7,8	1,3 ± 0,6	54,0 ± 21,0	272,3 ± 79,1
Eau	7708 ± 2016	656 ± 256	2609 ± 1861	6941 ± 2964

3.3. Effets du Hg par l'alimentation sur la filtration de *D. bugensis*

Les taux de filtration modélisés sur 90 minutes ainsi que les FR50 pour 4 individus *D. bugensis* exposés aux Chlorelles et aux Diatomées contaminées à IHg, MeHg ou non contaminées (Ctrl) pendant 4 jours sont montrés en annexe (Figure S3-1; Figure S3-2). Globalement, les individus *D. bugensis* exposés aux Diatomées ont des FR50 inférieurs à ceux exposés aux Chlorelles, notamment les individus Ctrl, suggérant que les Diatomées sont filtrées plus rapidement que les Chlorelles (Figure 3-8). Les quaggas exposées aux Diatomées préalablement contaminées au MeHg ont un FR50 supérieur aux moules quaggas exposées aux Diatomées Ctrl. De même, les FR50 des quaggas exposées aux Chlorelles contaminées au MeHg sont supérieurs à ceux des moules exposées aux Chlorelles Ctrl.

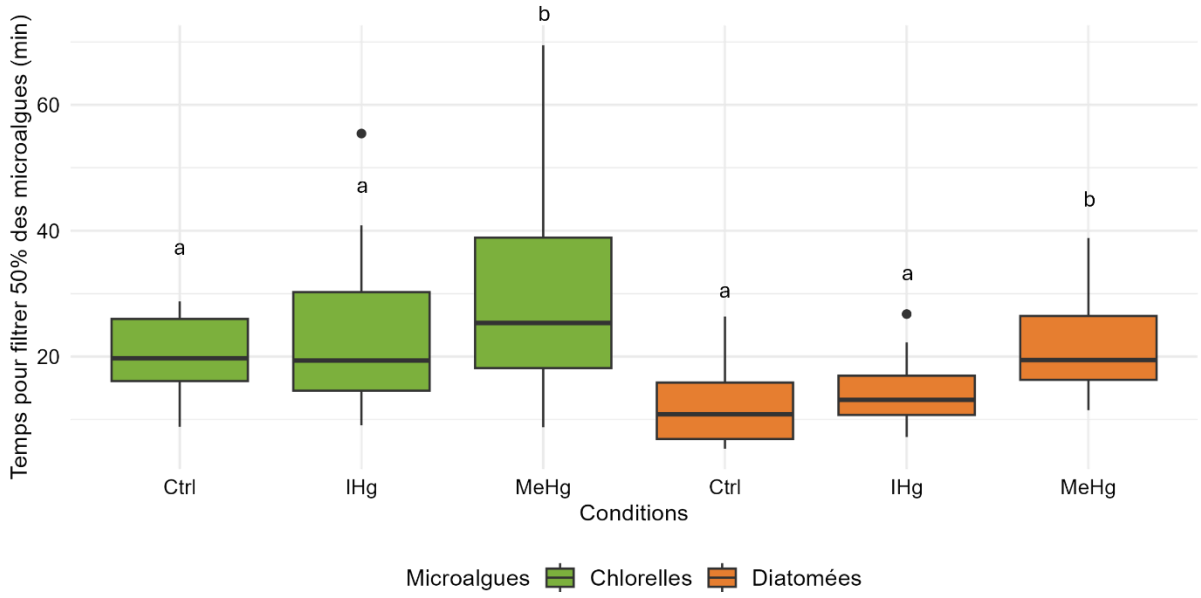

Figure 3-8. Temps moyen nécessaire à *D. bugensis* pour atteindre une filtration de 50 % des microalgues (FR50, en minutes) après exposition à des microalgues contaminées à IHg et MeHg ou contrôle (n = 4, * : p-valeur < 0.05).

4. Discussion

4.1. Exposition par l'eau *vs* par voie alimentaire

La voie alimentaire a été reconnue comme source de bioaccumulation du Hg, principalement le MeHg, connu pour se bioamplifier le long des chaînes trophiques aquatiques (Beauvais-Flück et al., 2016; Mao et al., 2021; van Rooyen et al., 2023; S. Wang et al., 2012). Pourtant, la majorité des études réalisées en conditions contrôlées chez les bivalves se concentrent sur des expositions par contamination dans l'eau (Baratange et al., 2022, 2023; Oliveira et al., 2018; Zhang et al., 2022), pouvant ainsi limiter la représentativité écologique des résultats. Dans ce contexte, nous avons comparé la bioaccumulation de l'IHg et du MeHg dans les tissus de *D. bugensis* selon deux voies d'exposition : par l'eau ou par voie alimentaire (Chlorelles contaminées). Nos résultats montrent que l'exposition par l'eau a induit des concentrations supérieures en IHg et MeHg dans les branchies tandis que l'exposition aux Chlorelles a entrainé des concentrations plus élevées dans la glande digestive. Cette spécificité tissulaire a également été rapportée chez d'autres bivalves. Par exemple, une étude menée chez le pétoncle *Chlamys varia* exposé 2h par voie alimentaire à *Isochrysis galbana* contaminé au ^{203}Hg puis 30 jours dans de l'eau non contaminée pour suivre les cinétiques de dépuration (Metian et al., 2009). Il a été montré que le Hg était principalement présent dans les branchies lors de l'exposition à l'eau alors qu'après une exposition par la nourriture, il était principalement distribué dans la glande digestive. Chez *Scrobicularia plana* collectée dans le bassin de Laranjo (Ria de Aveiro au Portugal), zone fortement contaminée par des rejets d'usines de production de chlore et de soude pendant plusieurs décennies, les analyses ciblant les branchies et la glande digestive ont révélé que ces deux tissus reflétaient les niveaux de contamination externes de THg et MeHg. Toutefois, les branchies ont montré un potentiel plus élevé dans l'accumulation de MeHg (Ahmad et al., 2011). De même, chez la moule *M. galloprovincialis*, une exposition au Hg par l'eau a entrainé une accumulation plus marquée dans les branchies que dans la glande digestive (Domouhtsidou & Dimitriadis, 2000). Cette différence de distribution reflète potentiellement la

fonction des tissus : les branchies, en contact direct avec l'eau, bioaccumulent le Hg dissous dans l'eau alors que la glande digestive, impliquée dans la digestion de son alimentation, bioaccumule le Hg provenant des Chlorelles. Dans notre étude, *D.* bugensis exposée par l'eau à 4 ng/L de MeHg a entrainé des BAF 6 et 2 x supérieurs dans les branchies et la glande digestive par rapport à ceux mesurés dans les tissus entiers de *D. polymorpha* exposée à 430 ng/L de MeHg par l'eau pendant 72h (Baratange et al., 2023), suggérant une capacité de bioaccumulation potentiellement élevée du MeHg chez *D. bugensis* à de faibles concentrations environnementales, bien que les différences de tissus analysés et de conditions d'exposition limitent la portée de cette comparaison. Cependant, les BAF calculés après exposition aux Chlorelles contaminées sont inférieurs à ceux mesurés après exposition par l'eau, malgré des quantités de Hg similaires par l'eau et les microalgues, suggérant que tout le Hg contenu dans les microalgues n'est pas assimilé par *D. bugensis,* ce qui pourrait traduire une biodisponibilité ou une digestibilité partielle du Hg associé aux microalgues. Il est donc essentiel de mieux comprendre comment l'IHg et le MeHg sont transférés depuis le producteur primaire vers le consommateur primaire.

4.2. Exposition par voie alimentaire : Chlorelles *vs* Diatomées

Nous avons comparé la prise alimentaire et la bioaccumulation du Hg par voie alimentaire chez *D. bugensis* en utilisant deux espèces de microalgues dont les compositions cellulaires diffèrent : les Chlorelles et les Diatomées. Une étude de Mason et al. (1996) a suggéré que seul le MeHg intracellulaire est transféré aux consommateurs. Pourtant, chez *G. fossarum*, la bioaccumulation était environ 2,5 fois plus élevés lorsque les individus étaient nourris uniquement avec la paroi cellulaire qu'avec le compartiment intracellulaire du macrophyte *Elodea nuttallii*. A l'inverse, l'IHg issu des deux compartiments a été transféré de manière similaire à *G. fossarum* (Beauvais-Flück et al., 2016).

Dans notre étude, l'exposition des quaggas aux Chlorelles$_{nonext}$ (proxy du Hg intracellulaire) a entraîné des concentrations en MeHg inférieures dans les branchies et la glande digestive, comparé à l'exposition aux Chlorelles. Cela suggère un rôle important de la fraction adsorbée dans la bioaccumulation du MeHg chez le consommateur bien que, IHg et MeHg soient répartis de manière similaire entre la fraction extractible (proxy de la fraction adsorbée) et la fraction non-extractible (proxy de la fraction assimilée). Au contraire, chez les Diatomées, la majorité du MeHg est localisée dans la fraction non-extractible (61%) et la majorité de l'IHg est localisée dans la fraction extractible (64 %). Cette répartition a déjà été observée chez la diatomée marine *Thalassiosira weissflogii* (Mason et al., 1996) avec le MeHg, principalement localisé dans le cytoplasme (63 %), transféré plus efficacement vers les copépodes que l'IHg, localisé majoritairement dans les parois (9 %). Lawson & Mason (1998) ont montré qu'une augmentation de la concentration en MeHg dans le milieu d'exposition entraînait une accumulation accrue dans le cytoplasme des cellules de de la diatomée *T. weissflogii*, se traduisant par une concentration plus élevée chez les copépodes. Ces résultats renforcent l'idée que la localisation cellulaire du MeHg dans les microalgues, en interaction avec leur structure cellulaire et la concentration d'exposition, influence sa biodisponibilité et son transfert au sein des réseaux trophiques. Il est important de noter que les diatomées, bien qu'abondantes dans le milieu marin, notamment dans les zones côtières et polaires riches en nutriments, sont beaucoup moins dominantes dans les environnement d'eau douce ou saumâtres, comme les rivières et les lacs (Malviya et al. 2016 ; Tadonléké et al. 2009 ; Descy et al. 2012). Par conséquent, les données

issues d'études en milieu marin ne peuvent pas être extrapolées directement aux environnements d'eau douce. Ainsi, les connaissances actuelles sur l'implication des parois cellulaires dans le transfert du Hg restent encore limitées et mériteraient d'être approfondies, en particulier chez des consommateurs primaires aux modes d'alimentation variés, afin de comprendre leur rôle dans le cycle biogéochimique global du Hg.

De plus, l'analyse de la filtration utilisée comme proxy de l'alimentation suggère que les Diatomées sont filtrées plus rapidement que les Chlorelles par *D. bugensis*, bien que toutes les algues soient consommées sur 24h. Ainsi, ces différences proviennent vraisemblablement de la spéciation du Hg dans les parois de chaque espèce. *C. vulgaris* a une paroi cellulaire organique, principalement composée de cellulose, glucosamine, protéines et lipides. De nombreux groupements fonctionnels sont présents tels que les carboxyles (-COOH), les hydroxyles (-OH), les amidés (-NH2) et les thiols (SH) qui favorisent des liaisons avec l'IHg ou le MeHg permettant une adsorption sur la paroi et une absorption en intracellulaire avec potentiellement plus de sites de liaison possible et des formes de Hg plus biodisponibles (Blumreisinger et al., 1983; Kapaun & Reisser, 1995; Takeda, 1993). En revanche, les diatomées, dont *C. meneghiniana*, ont une paroi cellulaire composée de dioxyde de silicium (SiO2), appelée « frustule » (Wehr et al., 2015), mais aussi de certains composants organiques comme les silaffines, les silacidines ou encore des polysaccharides (Richthammer et al., 2011). Bien que leur paroi siliceuse permette l'adsorption du Hg, celle-ci limite la biodisponibilité du Hg pour les consommateurs primaires et le Hg transféré provient principalement du compartiment intracellulaire (Mason et al., 1996). Les mécanismes de digestion à l'origine de ces différences restent à identifier.

Ces résultats contrastent avec ceux rapportés par Millet et al. (2024), qui ont comparé l'accumulation d'IHg et sa distribution subcellulaire chez la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii* et la diatomée *C. meneghiniana*. Leur étude a montré que la diatomée accumulait environ 5 x plus de THg que la microalgue verte, aux deux concentrations nominales testées (2 et 20 ng/mL, soit 0,2 à 13 fg/cellule). Cependant cette différence pourrait s'expliquer par un nombre de cellule 6,6 x plus faible pour la diatomée dans leur étude. Dans notre étude, les deux espèces ont été exposées à des concentrations identiques de IHg et MeHg pour un même nombre de cellules. De plus, la distribution subcellulaire a montré chez les deux espèces, une accumulation intracellulaire comprise entre 60 et 75% par centrifugation différentielle. Nos résultats se situent dans la fourchette basse de ces valeurs, mais il convient de rappeler que la part « extractible » du Hg est définie opérationnellement sur la capacité de la solution d'EDTA/cystéine à extraire le Hg lié aux cellules (Larras et al., 2013; Le Faucheur et al., 2011). La distribution subcellulaire obtenue est globalement cohérente avec les travaux de Wu & Wang (2011), qui ont observé que le Hg intracellulaire prédominait chez les diatomées. En revanche, elle diverge des résultats de Le Faucheur et al. (2011) chez *C. reinhardtii*, où la majorité du THg était adsorbé sur la surface des cellules, pour des conditions d'exposition avec des concentrations environ 10 x plus élevée (25 fg/cell). Ces différences peuvent s'expliquer par des protocoles expérimentaux, des espèces étudiées ou des conditions de culture des microalgues différentes, qui limitent la comparaison stricte entre les études.

Pour aller plus loin, il serait pertinent de caractériser la distribution subcellulaire du Hg chez *D. polymorpha*, afin de mieux comprendre les mécanismes de transfert du phytoplancton vers le consommateur. Le transfert trophique des métaux dépend en partie de leur forme chimique et de leur localisation dans les cellules des proies, et la distribution subcellulaire reflète ces

phénomènes (Wallace et Luoma, 2003 ; Vijver et al., 2004 ; Rainbow et al., 2006). Appliquée à *D. polymorpha*, cette approche permettrait de déterminer quelle fraction subcellulaire de la microalgue contaminée est transférée et stockée, comme cela a récemment été étudié chez le gammare (Cosio et al., 2021).

5. Conclusion

En conclusion, notre étude met en lumière l'importance cruciale de la voie alimentaire dans la bioaccumulation du Hg, notamment du MeHg, chez *D. bugensis*. Nos résultats démontrent que la biodisponibilité et le transfert du Hg dépendent fortement de la concentration et la forme chimique du Hg, de la nature des microalgues consommées et de la structure cellulaire de ces dernières. Ces mécanismes complexes soulignent la nécessité d'intégrer des scénarios d'exposition réalistes pour mieux comprendre les risques écotoxicologiques liés au Hg dans les écosystèmes aquatiques. L'exposition par l'eau cause une accumulation préférentielle dans les branchies, premier tissu en contact avec le milieu, tandis que l'exposition par voie alimentaire entraîne une accumulation préférentielle dans la glande digestive, suggérant une digestion des microalgues et un transfert du Hg intracellulaire vers ce tissu. Par ailleurs, la répartition cellulaire du Hg entre les fractions intracellulaire et de la paroi dans les microalgues, apparaît comme essentielle dans sa biodisponibilité et son transfert trophique. En effet, une bioaccumulation plus élevée du MeHg a été mesurée dans les branchies des quaggas exposées aux Chlorelles comparé aux Diatomées. Ainsi, la biodiversité du phytoplancton pourrait aussi exercer une influence sur le transfert du Hg dans les réseaux trophiques.

6. Références

Ahmad, I., Mohmood, I., Mieiro, C. L., Coelho, J. P., Pacheco, M., Santos, M. A., Duarte, A. C., & Pereira, E. (2011). Lipid peroxidation vs. Antioxidant modulation in the bivalve *Scrobicularia plana* in response to environmental mercury—Organ specificities and age effect. *Aquatic Toxicology*, *103*(3), 150-158. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.02.017

Baldwin, B., Mayer, M., Dayton, J., Pau, N., Mendilla, J., Sullivan, M., Moore, A., Ma, A., & Mills, E. (2002). Comparative growth and feeding in zebra and quagga mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): Implications for North American lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences - CAN J FISHERIES AQUAT SCI*, *59*, 680-694. https://doi.org/10.1139/f02-043

Baratange, C., Baali, H., Gaillet, V., Bonnard, I., Delahaut, L., Gaillard, J.-C., Grandjean, D., Sayen, S., Gallorini, A., Le Bris, N., Renault, D., Breider, F., Loizeau, J.-L., Armengaud, J., & Cosio, C. (2023). Bioaccumulation and molecular effects of carbamazepine and methylmercury co-exposure in males of *Dreissena polymorpha*. *Science of The Total Environment*, *897*, 165379. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165379

Baratange, C., Paris-Palacios, S., Bonnard, I., Delahaut, L., Grandjean, D., Wortham, L., Sayen, S., Gallorini, A., Michel, J., Renault, D., Breider, F., Loizeau, J.-L., & Cosio, C. (2022). Metabolic, cellular and defense responses to single and co-exposure to carbamazepine and methylmercury in Dreissena polymorpha. *Environmental Pollution*, *300*, 118933. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.118933

Beauvais-Flück, R., Chaumot, A., Gimbert, F., Quéau, H., Geffard, O., Slaveykova, V. I., & Cosio, C. (2016). Role of cellular compartmentalization in the trophic transfer of mercury species in a freshwater plant-crustacean food chain. *Journal of Hazardous Materials*, *320*, 401-407. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.08.055

Beauvais-Flück, R., Gimbert, F., Méhault, O., & Cosio, C. (2017). Trophic fate of inorganic and methyl-mercury in a macrophyte-chironomid food chain. *Journal of Hazardous Materials*, *338*, 140-147. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.05.028

Berezina, N. A., Sharov, A. N., Kholodkevich, S. V., & Kukhareva, G. I. (2024). Influence of Water Pollution with Copper and Tributyltin on the Physiological Indicators of Two Dreissenids (Dreissena polymorpha and D. bugensis). *Russian Journal of Biological Invasions*, *15*(4), 491-500. https://doi.org/10.1134/S2075111724700371

Blumreisinger, M., Meindl, D., & Loos, E. (1983). Cell wall composition of chlorococcal algae. *Phytochemistry*, *22*(7), 1603-1604. https://doi.org/10.1016/0031-9422(83)80096-X

Boening, D. W. (2000). Ecological effects, transport, and fate of mercury: A general review. *Chemosphere*, *40*(12), 1335-1351. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00283-0

Bravo, A. G., Cosio, C., Amouroux, D., Zopfi, J., Chevalley, P.-A., Spangenberg, J. E., Ungureanu, V.-G., & Dominik, J. (2014). Extremely elevated methyl mercury levels in water, sediment and organisms in a Romanian reservoir affected by release of mercury from a chlor-alkali plant. *Water Research*, *49*, 391-405. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.024

Bridou, R., Monperrus, M., Gonzalez, P. R., Guyoneaud, R., & Amouroux, D. (2011). Simultaneous determination of mercury methylation and demethylation capacities of various sulfate-reducing bacteria using species-specific isotopic tracers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *30*(2), 337-344. https://doi.org/10.1002/etc.395

Clarkson, T. W., Magos, L., & Myers, G. J. (2003). The Toxicology of Mercury—Current Exposures and Clinical Manifestations. *New England Journal of Medicine*, *349*(18), 1731-1737. https://doi.org/10.1056/NEJMra022471

Descy, J.-P., Leitao, M., Everbecq, E., Smitz, J. S., & Deliège, J.-F. (2012). Phytoplankton of the River Loire, France: A biodiversity and modelling study. *Journal of Plankton Research*, *34*(2), 120-135. https://doi.org/10.1093/plankt/fbr085

Domouhtsidou, G. P., & Dimitriadis, V. K. (2000). Ultrastructural Localization of Heavy Metals (Hg, Ag, Pb, and Cu) in Gills and Digestive Gland of Mussels, Mytilus galloprovincialis (L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *38*(4), 472-478. https://doi.org/10.1007/s002449910062

Dranguet, P., Flück, R., Regier, N., Cosio, C., Le Faucheur, S., & Slaveykova, V. I. (2014). Towards Mechanistic Understanding of Mercury Availability and Toxicity to Aquatic Primary Producers. *Chimia*, *68*(11), 799-805. https://doi.org/10.2533/chimia.2014.799

Garcia-Calleja, J., Cossart, T., Pedrero, Z., Santos, J. P., Ouerdane, L., Tessier, E., Slaveykova, V. I., & Amouroux, D. (2021). Determination of the Intracellular Complexation of Inorganic and Methylmercury in Cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. *Environmental Science & Technology*, *55*(20), 13971-13979. https://doi.org/10.1021/acs.est.1c01732

Gilmour, C. C., & Henry, E. A. (1991). Mercury methylation in aquatic systems affected by acid deposition. *Environmental Pollution*, *71*(2), 131-169. https://doi.org/10.1016/0269-7491(91)90031-Q

Gojkovic, Z., Skrobonja, A., Funk, C., Garbayo, I., & Vílchez, C. (2022). The Role of Microalgae in the Biogeochemical Cycling of Methylmercury (MeHg) in Aquatic Environments. *Phycology*, *2*(3), Article 3. https://doi.org/10.3390/phycology2030019

Grégoire, D. S., & Poulain, A. J. (2018). Shining light on recent advances in microbial mercury cycling. *FACETS*, *3*(1), 858-879. https://doi.org/10.1139/facets-2018-0015

Hassler, C. S., Slaveykova, V. I., & Wilkinson, K. J. (2004). Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions. *Limnology and Oceanography: Methods*, *2*(7), 237-247. https://doi.org/10.4319/lom.2004.2.237

Higgins, S. N., & Zanden, M. J. V. (2010). What a difference a species makes: A meta–analysis of dreissenid mussel impacts on freshwater ecosystems. *Ecological Monographs*, *80*(2), 179-196. https://doi.org/10.1890/09-1249.1

Kapaun, E., & Reisser, W. (1995). A chitin-like glycan in the cell wall of a *Chlorella sp*. (Chlorococcales, Chlorophyceae). *Planta*, *197*(4), 577-582. https://doi.org/10.1007/BF00191563

Karatayev, A. Y., & Burlakova, L. E. (2025). What we know and don't know about the invasive zebra (*Dreissena polymorpha*) and quagga (*Dreissena rostriformis bugensis*) mussels. *Hydrobiologia*, *852*(5), 1029-1102. https://doi.org/10.1007/s10750-022-04950-5

Larras, F., Regier, N., Planchon, S., Poté, J., Renaut, J., & Cosio, C. (2013). Physiological and proteomic changes suggest an important role of cell walls in the high tolerance to metals of *Elodea nuttallii*. *Journal of Hazardous Materials*, *263*, 575-583. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.10.016

Lawson, N. M., & Mason, R. P. (1998). Accumulation of mercury in estuarine food chains. *Biogeochemistry*, *40*(2), 235-247. https://doi.org/10.1023/A:1005959211768

Le Faucheur, S., Campbell, P. G. C., Fortin, C., & Slaveykova, V. I. (2014). Interactions between mercury and phytoplankton: Speciation, bioavailability, and internal handling. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *33*(6), 1211-1224. https://doi.org/10.1002/etc.2424

Le Faucheur, S., Tremblay, Y., Fortin, C., & Campbell, P. G. C. (2011). Acidification increases mercury uptake by a freshwater alga, Chlamydomonas reinhardtii. *Environmental Chemistry*, *8*(6), 612-622. https://doi.org/10.1071/EN11006

Le, T. T. Y., Leuven, R. S. E. W., & Hendriks, A. J. (2011). Modeling metal bioaccumulation in the invasive mussels Dreissena polymorpha and Dreissena rostriformis bugensis in the rivers Rhine and Meuse. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *30*(12), 2825-2830. https://doi.org/10.1002/etc.685

Lee, C.-S., & Fisher, N. S. (2017). Bioaccumulation of methylmercury in a marine copepod. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *36*(5), 1287-1293. https://doi.org/10.1002/etc.3660

Malviya, S., Scalco, E., Audic, S., Vincent, F., Veluchamy, A., Poulain, J., Wincker, P., Iudicone, D., de Vargas, C., Bittner, L., Zingone, A., & Bowler, C. (2016). Insights into global diatom distribution and diversity in the world's ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(11), E1516-E1525. https://doi.org/10.1073/pnas.1509523113

Mangiafico, S. (2024). rcompanion: Functions to Support Extension Education Program Evaluation. R package version 2.4.30. https://CRAN.R-project.org/package=rcompanion

Mao, L., Liu, X., Wang, Z., Wang, B., Lin, C., Xin, M., Zhang, B.-T., Wu, T., He, M., & Ouyang, W. (2021). Trophic transfer and dietary exposure risk of mercury in aquatic organisms from urbanized coastal ecosystems. *Chemosphere*, *281*, 130836. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130836

Mason, R. P., Reinfelder, J. R., & Morel, F. M. M. (1996). Uptake, Toxicity, and Trophic Transfer of Mercury in a Coastal Diatom. *Environmental Science & Technology*, *30*(6), 1835-1845. https://doi.org/10.1021/es950373d

Mathews, T., & Fisher, N. S. (2008). Evaluating the trophic transfer of cadmium, polonium, and methylmercury in an estuarine food chain. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *27*(5), 1093-1101. https://doi.org/10.1897/07-318.1

Metian, M., Bustamante, P., Hédouin, L., Oberhänsli, F., & Warnau, M. (2009). Delineation of heavy metal uptake pathways (seawater and food) in the variegated scallop *Chlamys varia*, using radiotracer techniques. *Marine Ecology Progress Series*, *375*, 161-171. https://doi.org/10.3354/meps07766

Millet, R. T., Santos, J., & Slaveykova, V. I. (2024). Exploring the subcellular distribution of mercury in green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and diatom *Cyclotella meneghiniana*: A comparative study. *Aquatic Toxicology*, *267*. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2024.106836

Monperrus, M., Rodriguez Gonzalez, P., Amouroux, D., Garcia Alonso, J. I., & Donard, O. F. X. (2008). Evaluating the potential and limitations of double-spiking species-specific isotope dilution analysis for the accurate quantification of mercury species in different environmental matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *390*(2), 655-666. https://doi.org/10.1007/s00216-007-1598-z

Mueting, S. A., & Gerstenberger, S. L. (2010). Mercury Concentrations in Quagga Mussels, Dreissena bugensis, from Lakes Mead, Mohave and Havasu. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *84*(4), 497-501. https://doi.org/10.1007/s00128-010-9953-8

Oliveira, P., Barboza, L. G. A., Branco, V., Figueiredo, N., Carvalho, C., & Guilhermino, L. (2018). Effects of microplastics and mercury in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774): Filtration rate, biochemical biomarkers and mercury bioconcentration. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *164*, 155-163. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.062

Parks, J. M., Johs, A., Podar, M., Bridou, R., Hurt, R. A., Smith, S. D., Tomanicek, S. J., Qian, Y., Brown, S. D., Brandt, C. C., Palumbo, A. V., Smith, J. C., Wall, J. D., Elias, D. A., & Liang, L. (2013). The Genetic Basis for Bacterial Mercury Methylation. *Science*, *339*(6125), 1332-1335. https://doi.org/10.1126/science.1230667

Rainbow, P. S., Poirier, L., Smith, B. D., Brix, K. V., & Luoma, S. N. (2006). Trophic transfer of trace metals: Subcellular compartmentalization in a polychaete and assimilation by a decapod crustacean. *Marine Ecology Progress Series*, *308*, 91-100. https://doi.org/10.3354/meps308091

Regier, N., Larras, F., Bravo, A. G., Ungureanu, V.-G., Amouroux, D., & Cosio, C. (2013). Mercury bioaccumulation in the aquatic plant *Elodea nuttallii* in the field and in microcosm: Accumulation in shoots from the water might involve copper transporters. *Chemosphere*, *90*(2), 595-602. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.08.043

Richthammer, P., Börmel, M., Brunner, E., & van Pée, K.-H. (2011). Biomineralization in Diatoms: The Role of Silacidins. *ChemBioChem*, *12*(9), 1362-1366. https://doi.org/10.1002/cbic.201000775

Riva-Murray, K., Bradley, P. M., Chasar, L. C., Button, D. T., Brigham, M. E., Scudder Eikenberry, B. C., Journey, C. A., & Lutz, M. A. (2013). Influence of dietary carbon on mercury bioaccumulation in streams of the Adirondack Mountains of New York and the Coastal Plain of South Carolina, USA. *Ecotoxicology*, *22*(1), 60-71. https://doi.org/10.1007/s10646-012-1003-3

Rodriguez-Gonzalez, P., Bouchet, S., Monperrus, M., Tessier, E., & Amouroux, D. (2013). In situ experiments for element species-specific environmental reactivity of tin and mercury compounds using isotopic tracers and multiple linear regression. *Environmental Science and Pollution Research*, *20*(3), 1269-1280. https://doi.org/10.1007/s11356-012-1019-5

Seguin, C., Marant, A., Palacios-Paris, S., Bonnard, I., Loizeau, J.-L., David, E., Rioult, D., & Cosio, C. (2025). Unveiling the hidden threat: Molecular, cellular and behavioral effects of dietborne inorganic mercury and methylmercury in *Dreissena polymorpha*. *Chemosphere*, *376*, 144306. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2025.144306

Srikhaow, A., Butburee, T., Pon-On, W., Srikhirin, T., Uraisin, K., Suttiponpanit, K., Chaveanghong, S., & Smith, S. M. (2020). Efficient Mercury Removal at Ultralow Metal Concentrations by Cysteine Functionalized Carbon-Coated Magnetite. *Applied Sciences*, *10*(22), Article 22. https://doi.org/10.3390/app10228262

Tadonléké, R. D., Lazzarotto, J., Anneville, O., & Druart, J.-C. (2009). Phytoplankton productivity increased in Lake Geneva despite phosphorus loading reduction. *Journal of Plankton Research*, *31*(10), 1179-1194. https://doi.org/10.1093/plankt/fbp063

Takeda, H. (1993). Taxonomical assignment of chlorococal algae from their cell wall composition. *Phytochemistry*, *34*(4), 1053-1055. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90712-X

UNEP. (2019). *Global Mercury Assessment 2018*. United Nation Environment Programme, Chemicals and Health Branch Geneva, Switzerland.

van Rooyen, D., Erasmus, J. H., Gerber, R., Nachev, M., Sures, B., Wepener, V., & Smit, N. J. (2023). Bioaccumulation and trophic transfer of total mercury through the aquatic food webs of an African sub-tropical wetland system. *Science of The Total Environment*, *889*, 164210. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164210

Vijver, M. G., van Gestel, C. A. M., Lanno, R. P., van Straalen, N. M., & Peijnenburg, W. J. G. M. (2004). Internal Metal Sequestration and Its Ecotoxicological Relevance : A Review. *Environmental Science & Technology*, *38*(18), 4705-4712. https://doi.org/10.1021/es040354g

Wallace, W. G., & Luoma, S. N. (2003). Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). *Marine Ecology Progress Series*, *257*, 125-137. https://doi.org/10.3354/meps257125

Wang, S., Li, B., Zhang, M., Xing, D., Jia, Y., & Wei, C. (2012). Bioaccumulation and trophic transfer of mercury in a food web from a large, shallow, hypereutrophic lake (Lake Taihu) in China. *Environmental Science and Pollution Research*, *19*(7), 2820-2831. https://doi.org/10.1007/s11356-012-0787-2

Wehr, J., Sheath, R., & Kociolek, P. (2015). *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*.

Wheeler, B. (2010). lmPerm: Permutation Tests for Linear Models. R package version 2.1.0. https://CRAN.R-project.org/package=lmPerm

Wu, Y., & Wang, W.-X. (2011). Accumulation, subcellular distribution and toxicity of inorganic mercury and methylmercury in marine phytoplankton. *Environmental Pollution*, *159*(10), 3097-3105. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.04.012

Zhang, L., Zhou, Y., Song, Z., Liang, H., Zhong, S., Yu, Y., Liu, T., Sha, H., He, L., & Gan, J. (2022). Mercury Induced Tissue Damage, Redox Metabolism, Ion Transport, Apoptosis, and Intestinal Microbiota Change in Red Swamp Crayfish (*Procambarus clarkii*): Application of Multi-Omics Analysis in Risk Assessment of Hg. *Antioxidants*, *11*(10), 1944. https://doi.org/10.3390/antiox11101944

Zhulidov, A. V., Pavlov, D. F., Nalepa, T. F., Scherbina, G. H., Zhulidov, D. A., & Gurtovaya, T. Yu. (2004). Relative distributions of *Dreissena bugensis* and *Dreissena polymorpha* in the lower don

river system, Russia. *International Review of Hydrobiology*, *89*(3), 326-333. https://doi.org/10.1002/iroh.200310727

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & van 't Riet, K. (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*, *56*(6), 1875-1881. https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1875-1881.1990

7. Annexes

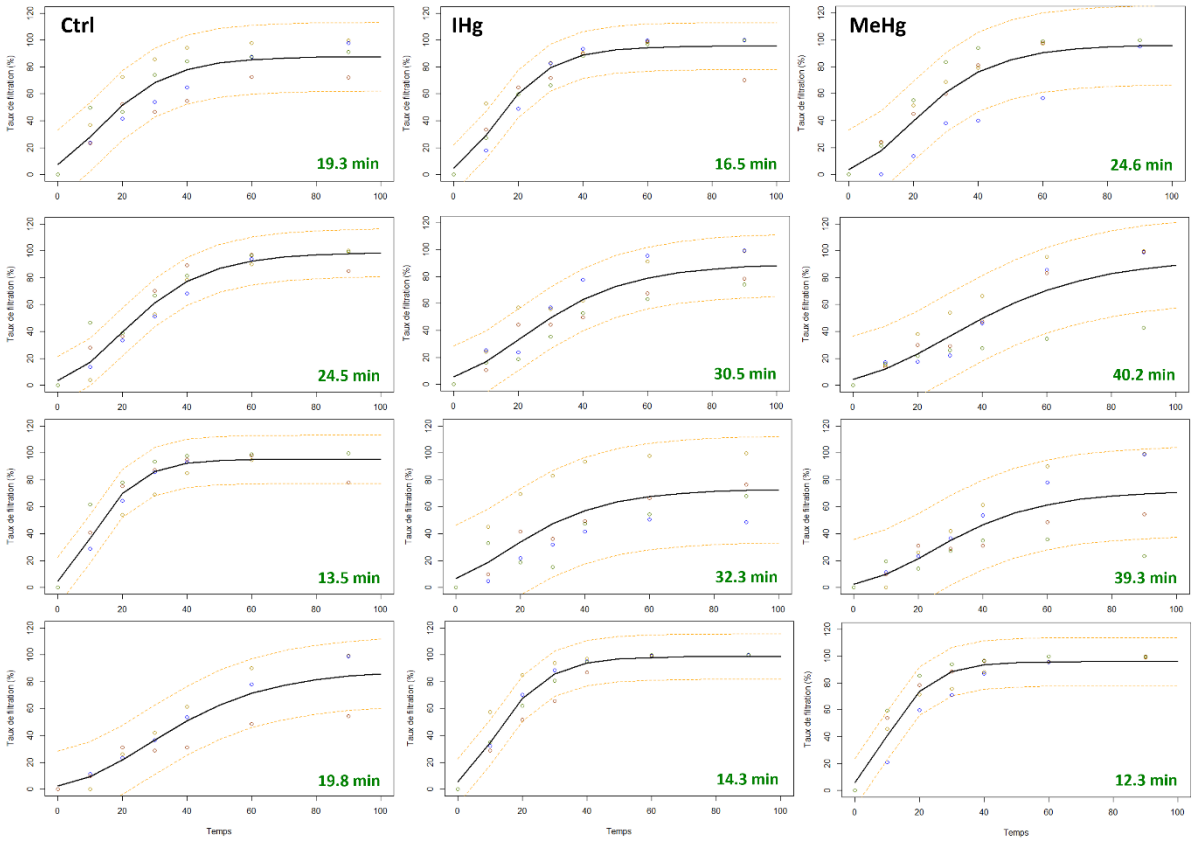

Figure S3-1. Taux de filtration modélisés sur 90 minutes à partir de la fonction du modèle de Gompertz pour 4 individus *D. bugensis* exposés aux Chlorelles contaminées à IHg, MeHg ou non contaminées (Ctrl) pendant 4 jours. Les FR50 calculés à partir de la fonction $y = a \cdot \exp(-b \cdot \exp(-c \cdot x))$ pour les 4 jours sont indiqués en vert.

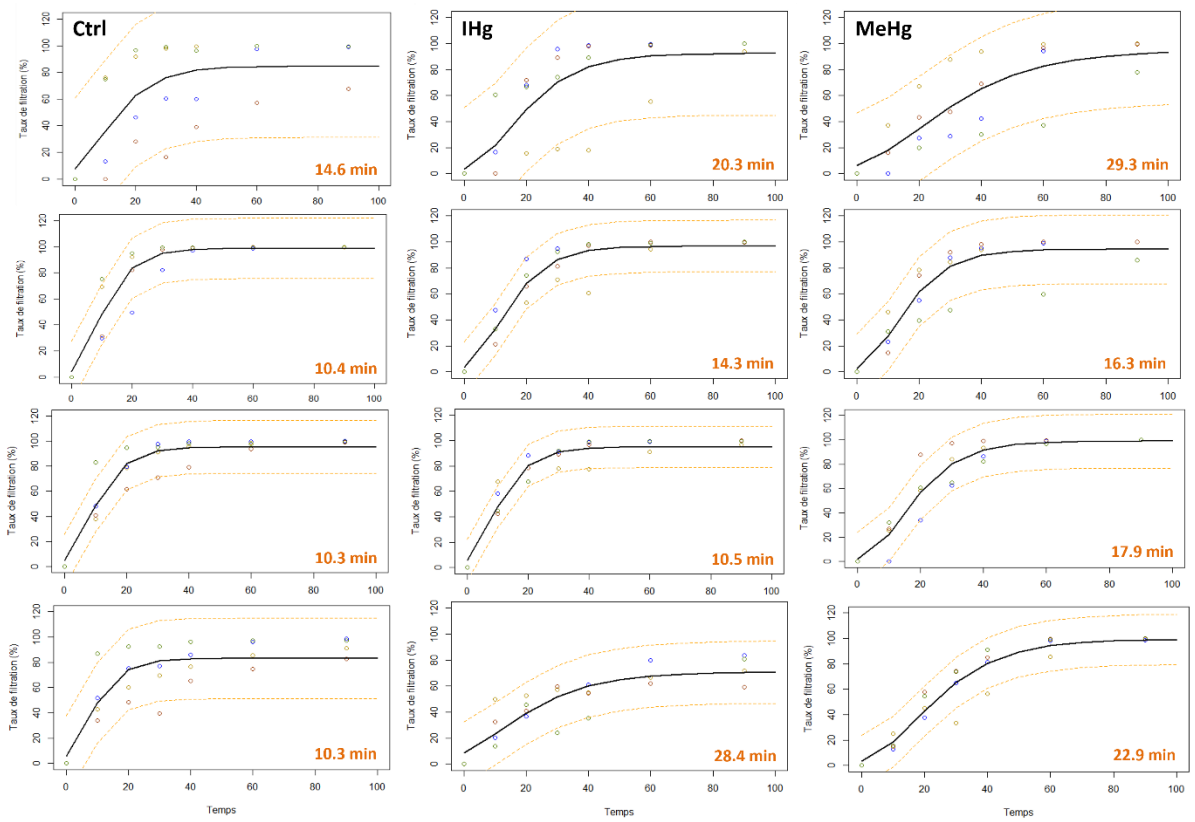

Figure S3-2. Taux de filtration modélisés à partir de la fonction du modèle de Gompertz pour 4 individus *D. bugensis* exposés aux Diatomées contaminées à IHg, MeHg ou non contaminées (Ctrl) pendant 4 jours. Les FR50 calculés à partir de la fonction $y = a \cdot \exp(-b \cdot \exp(-c \cdot x))$ pour les 4 jours sont indiqués en orange.

Tableau S3-1. Composition du milieu commercial BG11 (Cyanobacteria BG-11 Freshwater Solution, Sigma-Aldrich) utilisé pour les cultures de *C. vulgaris*.

Composant (mg/L)	
Boric acid	2.86
Calcium chloride dihydrate	36.0
Citric acid	6.0
Cobalt nitrate • $6H_2O$	0.0494
Cupric sulfate • $5H_2O$	0.079
EDTA disodium magnesium	1.0
Ferric ammonium citrate	6.0
Magnesium sulfate • $7H_2O$	75
Manganese chloride • $4H_2O$	1.81
Potassium phosphate dibasic	40.0
Sodium carbonate	20.0
Sodium molybdate • $2H_2O$	0.39
Sodium nitrate	1500.0
Zinc sulfate • $7H_2O$	0.222

Tableau S3-2. Composition du milieu commercial de diatomées (CCAP FADM-C Diatom Medium) utilisé pour les cultures de *C. meneghiniana*.

Composant (g/200mL)	
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	4.00
KH_2PO_4	2.48
$MgSO_4.7H_2O$	5.00
FeNaEDTA	3.18
Na_2EDTA	0.45
H_3BO_3	0.45
$MnCl_2.4H_2O$	0.496
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0.278
Cyanocobalamin	0.20
Thiamine HCl	0.008
Biotin	0.008
$Na_2SiO_3.9H_2O$	11.4

CHAPITRE 4 : Bioaccumulation et effets du Hg par voie alimentaire chez *D. polymorpha* exposé en milieu naturel

Résumé

Ce chapitre examine la bioaccumulation et les effets du Hg chez *Dreissena polymorpha* dans des environnements naturels, en utilisant une approche méthodologique intégrée et progressive. L'étude combine des analyses chimiques, des biomarqueurs biologiques, et plusieurs techniques omiques pour évaluer la bioaccumulation de Hg, les réponses biologiques et celles prometteuses pour la biosurveillance.

Dans la première partie, l'étude se concentre sur la bioaccumulation du Hg chez *D. polymorpha* dans un environnement naturel, la Seine, et compare ces résultats avec des expositions en conditions contrôlées. Les concentrations de Hg dans les tissus des moules sont quantifiées, et les facteurs de bioaccumulation (BAF) sont calculés pour évaluer la capacité des moules à accumuler le Hg à partir de leur environnement. Les résultats montrent une diminution globale des concentrations en IHg et une augmentation du MeHg au fil du temps, suggérant une dépuration de l'IHg et une accumulation du MeHg. Les activités enzymatiques et les profils métabolomiques sont également analysés pour comprendre les effets de l'exposition sur les organismes, révélant un stress oxydatif et des perturbations métaboliques.

La deuxième partie examine l'impact des rejets urbains et industriels sur la bioaccumulation du Hg chez *D. polymorpha*. Les concentrations de Hg dans les dreissènes exposées dans la Seine et la Deûle, deux rivières avec des sources de contamination contrastées, sont comparées. Les résultats montrent des concentrations en Hg légèrement supérieures dans la Deûle, reflétant son héritage industriel. Les réponses biologiques des dreissènes, telles que les activités enzymatiques et les profils métabolomiques, indiquent un niveau de stress oxydatif et des perturbations métaboliques plus marqués dans la Deûle. Les isotopes stables du carbone et de l'azote sont également analysés pour comprendre les relations trophiques et les sources de contamination.

La troisième partie explore l'influence de la saisonnalité sur la bioaccumulation du Hg chez *D. polymorpha*. Les concentrations de Hg dans les moules exposées en hiver et en été dans la Seine et la Deûle sont comparées. Les résultats montrent que la saison n'a pas d'effet significatif sur les niveaux de bioaccumulation en THg et MeHg, mais les concentrations en THg semblent légèrement supérieures dans la Deûle, suggérant une biodisponibilité plus élevée du IHg dans ce milieu. Les activités enzymatiques, les profils métabolomiques et protéomiques sont analysés pour comprendre les effets saisonniers sur la bioaccumulation et les mécanismes de défense des moules, révélant des perturbations du métabolisme énergétique et des réponses corrélées à chaque forme de Hg.

En conclusion, cette étude fournit des informations précieuses sur les mécanismes de bioaccumulation du Hg et ses effets sur *D. polymorpha* dans des conditions naturelles et contrôlées. Les approches intégrées, combinant des analyses chimiques, des biomarqueurs biologiques et des techniques omiques, soulignent l'importance cruciale de la biosurveillance environnementale pour évaluer les risques écotoxicologiques. Les résultats obtenus contribuent non seulement à une meilleure compréhension des dynamiques du Hg dans les écosystèmes aquatiques, mais ils identifient également des profils de réponses biologiques prometteurs. Ces profils pourraient être développés et testés comme potentiels biomarqueurs dans le cadre de futurs programmes de biosurveillance, offrant ainsi des outils plus sensibles et spécifiques pour la gestion et la protection des écosystèmes aquatiques. Cette étude ouvre la voie à des

recherches futures visant à affiner ces biomarqueurs et à intégrer ces connaissances dans des stratégies de gestion environnementale plus efficaces.

1. Introduction

La contamination des écosystèmes aquatiques par les métaux toxiques, en particulier le Hg, représente une préoccupation environnementale majeure en raison de sa persistance, de sa bioaccumulation et de ses effets toxiques sur les organismes vivants. Le Hg existe sous différentes formes chimiques dans l'environnement, notamment le IHg et le MeHg, ce dernier étant particulièrement préoccupant en raison de sa capacité à s'accumuler dans les chaînes alimentaires et à provoquer des effets néfastes sur la santé des organismes, y compris les humains (Driscoll et al., 2013). Les sources de contamination par le Hg sont variées et incluent les rejets industriels, et les déchets urbains (UNEP, 2019).

Dans ce contexte, l'étude de la bioaccumulation du Hg et de ses effets sur les organismes aquatiques est cruciale pour évaluer les risques écotoxicologiques et développer des stratégies de gestion environnementale efficaces. Les bivalves, tels que *Dreissena polymorpha*, sont souvent utilisés comme organismes sentinelles pour surveiller la qualité de l'eau en raison de leur capacité à accumuler les contaminants et de leur sensibilité aux changements environnementaux (Ladeiro et al., 2017). Ces organismes jouent un rôle clé dans les écosystèmes aquatiques et leur étude permet de mieux comprendre les dynamiques de contamination et les mécanismes de bioaccumulation des polluants (Khan et al., 2020).

Ce chapitre de thèse s'inscrit dans un cadre scientifique global visant à élucider les mécanismes de bioaccumulation du Hg et à évaluer ses effets sur les organismes aquatiques dans des milieux naturels et contrôlés. En utilisant une approche intégrée combinant des analyses chimiques, des biomarqueurs biologiques et des techniques omiques, cette étude vise à fournir des informations utiles sur les processus de bioaccumulation et les réponses biologiques des organismes exposés. Les résultats obtenus contribueront à une meilleure compréhension des risques écotoxicologiques associés au Hg et à l'élaboration de stratégies de gestion environnementale pour protéger les écosystèmes aquatiques et la santé humaine.

Les défis associés à l'étude de la bioaccumulation du Hg et de ses effets sur les organismes aquatiques en conditions naturelles ont conduit à une complexification graduelle des approches utilisées. Après avoir validé la faisabilité des méthodes initiales, les approches ont été affinées et élargies pour inclure des analyses plus détaillées et des techniques plus avancées. Ainsi, ce chapitre est structuré en trois parties distinctes, chacune représentant une étape de progression dans l'évolution des méthodes et des analyses utilisées pour étudier la bioaccumulation du Hg et ses effets sur *Dreissena polymorpha*.

Dans ce chapitre, nous examinons les concentrations de Hg dans les tissus des dreissènes exposées dans différents environnements, ainsi que les réponses biologiques. Les objectifs spécifiques de ce chapitre sont de 1) quantifier les concentrations de Hg dans les tissus des moules, 2) évaluer les facteurs de bioaccumulation, 3) analyser les réponses biologiques et métaboliques, et 4) identifier des profils de biomarqueurs prometteurs. Les résultats de cette étude fourniront des informations essentielles pour évaluer les risques écotoxicologiques associés au Hg et pour développer des stratégies de gestion environnementale plus précoces et sensibles.

2. Matériel et méthodes

2.1. Description des sites

Toute la verrerie ainsi que les filtres utilisés pour les analyses sur la Seine et la Deûle ont été préalablement pyrolysés pour éliminer les éventuelles traces de Hg.

2.1.1. La Seine et la Deûle – site aval (Partie 1, 2 et 3)

La Seine est dominée par la mégalopole de Paris et représente un exemple important de territoire régional fortement affecté par l'activité anthropique et les zones urbaines. La Seine est l'une des rivières les plus contaminées par les métaux en Europe, mais également par d'autres polluants tels que les PCB et les pesticides. La concentration en Hg dans le muscle des poissons était d'environ 0,3 mg kg^{-1} w.w. en aval et de 0,1 mg kg^{-1} w.w. en amont de Paris (Azimi & Rocher, 2016), ces valeurs étant supérieures à la NQE_{biote} européenne de 0,02 mg/kg w.w. dans les tissus des poissons. Le site d'étude de la Seine est localisé sur la commune de Bougival (78380), dans le département des Yvelines, en Île-de-France, en aval de la station d'épuration Seine Centre (48°52'11.2"N 2°07'48.5"E ; Figure 4-1). Le site appartient au Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne (SIAAP) et des sondes permettent la mesure en continu des paramètres physico-chimiques suivants : la température (°C), le pH, la conductivité (mS/m), l'oxygène dissous (mg/L), les matières en suspension (MES, mg/L) et le débit (m^3/s).

La Deûle est située dans une zone fortement industrialisée de la métropole lilloise, qui reste aujourd'hui lourdement contaminée par des fonderies de plomb et de zinc, des ateliers de traitement de surface et des industries automobiles. La concentration en Hg dans les poissons étaient de 0,03 µg THg/g w.w. entre 1994 et 1995 (Noppe, 1996), excédant aussi la NQE_{biote}. Le site d'étude de la Deûle est localisé sur la commune de Noyelles-Godault (62950), dans le département du Pas-de-Calais dans les Hauts-de-France (50°26'00.7"N 3°00'33.5"E ; Figure 4-1). Le site est situé directement à hauteur de l'ancien emplacement de la fonderie Metaleurop, spécialisé dans la production, la transformation et la valorisation des métaux non ferreux et spéciaux.

2.1.2. La Seine et la Deûle – site amont (Partie 3)

Le site d'étude amont de la Seine est localisé sur la commune d'Alfortville (94140), dans le département du Val-de-Marne en Île-de-France, en amont de la station d'épuration Seine Centre (48°47'50.2"N 2°25'15.3"E ; Figure 4-1). Le site appartient également au SIAAP et des sondes permettent de mesurer en continu la température (°C) et l'oxygène dissous (mg/L).

Le site d'étude amont de la Deûle est localisé sur la commune de Flers-en-Escrebieux (59128), dans le département du Nord dans les Hauts-de-France (50°24'01.5"N 3°04'47.3"E ; Figure 4-1). Le site est situé à 6 km en amont de l'ancien emplacement de la fonderie Metaleurop.

Des paramètres physico-chimiques supplémentaires ont été fournis par le SIAAP pour la Seine et par l'Agence de l'Eau Artois-Picardie pour la Deûle (moyennes des échantillonnages du 07/06 et 01/08/2023). Les données de débit pour la Deûle sont disponibles sur www.hydro.eaufrance.fr, station « E310 2110 : Le canal de la Deûle à Don ».

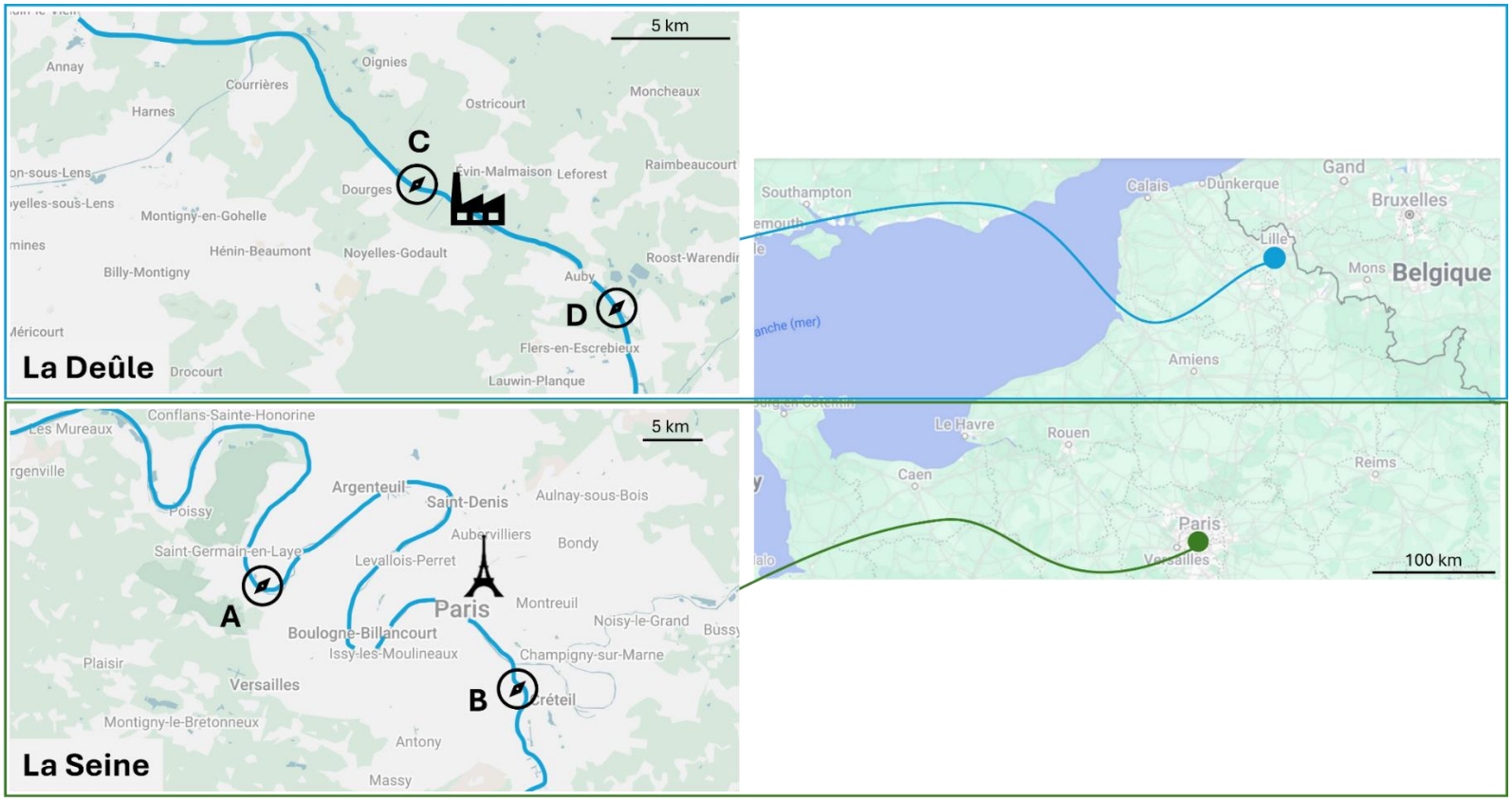

Figure 4-1. Sites d'encagement sur la Seine, en amont et en aval de Paris (A : amont et B : aval) et la Deûle, en amont et aval de l'ancienne fonderie Metaleurop (C : amont et D : aval).

2.2. Encagements de *D. polymorpha*

Les individus *D. polymorpha* utilisés au cours de cette thèse ont été collectés, au lac du Der-Chantecoq (48◦36'22.02"N,4°46'34.0"E), situé dans la région Grand Est, à la limite des départements de la Marne et de la Haute-Marne (France). Le site est considéré comme un site de référence par le laboratoire SEBIO (Catteau et al., 2022, 2023). Les dreissènes sont sélectionnées par leur taille (18 à 20 mm) puis maintenues en stabulation au laboratoire pendant plusieurs semaines à la température du lac avec bullage constant. Pour les encagements en été, la température a progressivement été augmentée pour atteindre celle des sites. Les dreissènes sont nourries deux fois par semaine avec 4×10^6 cellules/individu/jour de *Nannochloropsis sp*. (Nanno 3600 1L, Reed Mariculture, Planktovie). Pour les encagements, trois cages contenant 50 dreissènes ont été déposées par site dans les différents cours d'eau en janvier et juillet 2023 puis en janvier et juin 2024. Une cage et des échantillons d'eau ont ensuite été prélevés après 1, 2 et 3 semaines (T1, T2 et T3). Des dreissènes non exposées sur les sites ont également été prélevées en tant qu'individus contrôle (T0). Les conditions d'acclimatation et d'encagement pour chaque campagne, correspondant à une sous-partie dans le chapitre 4 sont résumées dans le Tableau 4-1.

Tableau 4-1. Résumé des conditions d'acclimatation et d'encagement de *D. polymorpha* par sous-partie du Chapitre 4.

	Saison	Date de prélèvement de *D. polymorpha* dans le lac du Der	Température d'acclimatation	Sites d'encagements	Date du début des encagements
Partie 1	Hiver	Décembre 2022	10,5°C	Seine aval	13/01/2023
Partie 2	Eté	Mai 2023	14°C puis 22°C	Seine aval Deûle aval	5/07/2023
Partie 3	Hiver Eté	Mai 2023 Avril 2024	10,5°C 12°C puis 22°C	Seine aval/amont Deûle aval/amont	09/01/2024 04/06/2024

2.3. Prélèvements et analyses d'eau

Les échantillons d'eau ont été prélevés avec une pompe péristaltique puis filtrés séquentiellement sur deux filtres de tailles différentes : GFD à 2,7 µm et GFF à 0.7 µm, pour déterminer les concentrations en IHg et MeHg particulaire (IHg_p et $MeHg_p$) dans deux gammes de taille de particules différentes. Les filtres ont été lyophilisés puis analysés à l'AMA pour IHg_p au Merx-M pour $MeHg_p$. Les concentrations en IHg et MeHg dissous dans l'eau filtrée (IHg_d et $MeHg_d$) ont également été mesurées par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de fluorescence atomique (GC-CV-AFS, Brooks Rand Merx-T et Merx-M).

500 µL d'eau ont été prélevés puis filtrés avec un filtre en nylon de 50µm et immédiatement analysés par cytométrie en flux (NovoCyte Quanteon V6Y4B5, Agilent®) afin de connaître la densité et la composition algale, qui ont une importance dans la bioaccumulation du Hg (Pickhardt et al., 2002). La discrimination du pico- et nanophytoplancton a été effectuée sur les critères morphologiques (FSC/SSC) grâce à l'utilisation de billes Fluoresbrite™ de 2µm (YG Polysciences) et sur la fluorescence des pigments photosynthétiques (514-576 nm (EYFP), 605-625 nm (PI) et 652-682 nm (PerCP).

Des prélèvements de sédiments ont également été réalisés à l'aide d'un tube en plastique en général, le prélèvement de janvier 2024 a été réalisé avec une benne à sédiments.

2.4. Concentrations en Hg chez *D. polymorpha*

Afin de mesurer le Hg présent dans les dreissènes, les tissus mous ont été retirés de la coquille, lyophilisés puis broyés mécaniquement (400 MM de Restch®, Eragny, Luxembourg) avec une bille en inox (8 mm) pendant 8 min à 30 Hz. Les concentrations en THg ont ensuite été analysées par spectrométrie d'absorption atomique (CV-AAS) sur un analyseur automatique de mercure (AMA ; Leco AMA254) et les concentrations en MeHg par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de fluorescence atomique (GC-CV-AFS, Brooks Rand Merx-M). Les facteurs de bioaccumulation (BAF) ont été calculés en utilisant le nombre de cellules donné aux moules dans les expérimentations en laboratoire. La formule du BAF est la suivante :

$$BAF\ (g^{-1}) = \frac{[THg]_{moule}}{[THg]_p \times 10^6 cellules/jour \times nombre\ de\ jours}$$

Avec $[THg]_{moule}$ la concentration en THg dans les tissus des moules individuellement (ng/g), $[THg]_p$ la concentration en THg dans les particules (ng/cellules), 10^6 le nombre de cellules donné aux moules chaque jour dans les expérimentations en laboratoire et le nombre de jours d'encagement dans la Seine (7 pour T1, 14 pour T2 et 21 pour T3).

2.5. Isotopes stables du carbone ($\delta^{13}C$) et de l'azote ($\delta^{15}N$)

Dans les parties 2 et 3, des analyses des rapports des isotopes stables du carbone et de l'azote ont été réalisées afin d'étudier les relations trophiques entre *D. polymorpha* et le seston présent sur les filtres issus des prélèvements d'eau. Les échantillons de dreissènes et les filtres ont été lyophilisés, broyés et placés dans des capsules d'étain puis pressés pour l'analyse. Le carbone inorganique (carbonates) a été éliminé par acidification avec une solution d'HCl 1M avant l'encapsulation, afin de permettre l'analyse du carbone organique particulaire. Les rapports isotopiques $\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$ ont été mesurés à l'aide d'un spectromètre de masse à rapport isotopique (EA-IRMS, Integra2 SERCON) calibré avec les normes de l'AIEA (AIEA-600, caféine). Les limites de quantification étaient de 3 µg pour l'azote et de 6 µg pour le carbone.

2.6. Activité des enzymes du système antioxydant et péroxydation lipidique

Les branchies, glande digestive et le reste des tissus mous ont été pesés puis placés individuellement dans 8 µL par mg de tissus de tampon phosphate (50 mM, pH = 7.4) contenant 1 mM de Phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF) et 1 mM de L-Sérine borate. Ensuite, ils ont été broyés avec une bille en inox (8 mm) 3x 30 sec à 30 Hz (400 MM de Restch®, Eragny, Luxembourg) puis centrifugés à 3000 g pendant 15 min à 4°C. Les surnageants ont ensuite été prélevés puis conservés à -80°C en attente des analyses.

Les analyses de concentration en protéines, l'activité de la GST (Garaud et al., 2016) et LOOH (Arab & Steghens, 2004) ont été mesurées à l'aide du spectromètre Gallery® (ThermoFisher Scientific). La concentration en protéines a été mesurée à 600 nm avec du pyrogallol rouge, en utilisant une courbe de calibration réalisée avec du sérum bovin sCal (66,7 µg/L ; ThermoScientific). L'activité de la GST a été évaluée à 340 nm avec du 1-chloro-2, 4-dinitrobenzène (0,9 mM) et du glutathion réduit (1 mM) dans un tampon de phosphate acidifié (0,1 M, pH 6,5). Les niveaux d'hydroperoxyde lipidique (LOOH) ont été mesurés à 620 nm à l'aide de la méthode Fox, après une réaction de 30 minutes sur 1/46 (v/v) de l'homogénat, du Fe II D-gluconate dihydraté (139 mM) et du xylénol orange (240 mM) en solution acide (H2SO4 40 mM, glycérol 1,37 M, acide formique 20 mM et NaCl 0,9%), en utilisant la courbe d'étalonnage avec

l'hydroperoxyde de tert-butyle (TBH, 0,125 à 16 µM). L'activité de la catalase (CAT ; Beers & Sizer, 1952) a été évaluée à 240 nm avec un spectrophotomètre Cary 50 (Agilent) après une réaction de 120 s de 20 µL pour les branchies, 10 µL pour la glande digestive et 60 µL pour les restes de l'homogénat et du peroxyde d'hydrogène (14 mM) dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7,4), en utilisant la plage linéaire de la réaction et une courbe d'étalonnage du CAT purifié (Sigma Aldrich) à 1,25 à 20 U/mL. Enfin, l'activité de la SuperOxyde Dismutase a été mesurée avec le spectrophotomètre Spark 10M (TECAN) à 340 nm après une réaction de 30 min avec 10 µL d'échantillon, préalablement dilués (1/4 pour les branchies, 1/8 pour la glande digestive et 1/12 pour les restes), de l'EDTA (0.1 M), MnCl2 (0.05 M), du NADH (7.5 mM) et du ß-mercaptoethanol (7.5 mM) (Paoletti et al., 1986), en utilisant la plage linéaire de la réaction et une courbe d'étalonnage de SOD purifiée (Sigma-Aldrich) de 0,125 à 0,7 U/mL.

2.7. Expression relative du niveau des gènes du système antioxydant et de défense

Dans la partie 1, l'ARN total des branchies, de la glande digestive et des restes ont été extrait avec du TRI Reagent selon les recommandations du fournisseur. Le niveau d'expression des gènes est ensuite analysé via RT-qPCR. Les ARN totaux (400 ng) sont rétrotranscrits en ADNc à l'aide du kit Verso cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific) et d'amorces oligodT, selon le protocole du fabricant, par incubation à 42 °C pendant 30 minutes, suivie d'une inactivation à 95 °C pendant 2 minutes. L'ADNc est ensuite amplifié par qPCR (CFX96 Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad) selon le programme suivant : une dénaturation initiale de 15 minutes à 95 °C, suivie de 40 cycles pendant 10 secondes à 95 °C et 1 minute à 60 °C ou 65 °C, selon la température d'hybridation des amorces. Chaque réaction qPCR est réalisée dans un volume final de 5 µL, incluant 4 µL de mélange réactionnel (Absolute Blue qPCR SYBR Green ROX 1X et amorces, Tableau 4-2) et 1 µL d'ADNc dilué au 1/10. Des contrôles négatifs, incluant des échantillons sans transcription inverse (ARN seuls) et des blancs (eau), sont systématiquement inclus. L'efficacité de chaque jeu d'amorces est vérifiée à l'aide d'une gamme de dilutions. L'expression relative des gènes est ensuite déterminée selon la méthode du ΔΔCT.

Tableau 4-2. Caractéristiques des amorces de gènes utilisées pour la RT-qPCR. L'actine et la protéine ribosomale S3 sont les gènes de référence.

Gène	Séquence 5' - 3'	Amplicon (pb)	Concentration finale (µm)	Température d'hybridation (°C)
actine-F	CTCACCCTCAAGTACCCCAT	153	0,6	65
actine-R	TTGGCCTTTGGGTTGAGTG			
protéine ribosomale S3-F	CACCGACCCGCACTGAGA	172	0,3	65
protéine ribosomale S3-R	ATGGCACACAGACCACGAG			
cat-F	ACGGCTATGGAAGCCACACG	157	0,3	65
cat-R	AGGTCGCGCATCGCATAGTC			
gst-F	TCCGCTATATCTGCCTGGAC	186	0,6	60
gst-R	GCTCCTTCAGACCTGCTTTC			
mt-F	GCGTTGAAACCGGTGATTGC	104	0,6	60
mt-R	GCCACAACAGTTGGGTTTGC			
sod-F	GACAGCATGGCTTCCATGTG	212	0,3	65
sod-R	AGATTCTGGGCCAGTCAGAG			

2.8. Métabolomique ciblée

Dans les parties 2 et 3, le protocole a été précédemment décrit par Baratange et al. (2023). Les tissus mous entiers à T0 et T3 ont été lyophilisés et broyés mécaniquement puis 450 µL de méthanol et 225 µL de chloroforme froid ont été ajoutés pour 20 et 35 mg d'individus puis placé une nuit à -20°C. 450µL d'eau ultra pure froide a ensuite été ajoutée, le mélange vortexé puis centrifugé à 4000 g pendant 10 min à 4°C. 700 µL de la phase supérieure polaire contenant les métabolites ont été transférés dans de nouveaux flacons en verre puis séchés à 32°C (MiVac, Genevac Ltd., Ipswich, England). La dérivation des échantillons a été faite manuellement en ajoutant 30 µL de methoxyamine hydrochloride (25 mg/L) mélangé à de la pyridine placée à 40°C pendant 60min. 30 µL de N,O-Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA, Sigma-Aldrich) ont ensuite été ajouté puis les échantillons ont de nouveau été placés 60 min à 40°C. Enfin, les échantillons ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse (Agilent 7890B) couplée à un spectromètre de masse (Agilent 5977B) par injection d'1 µL d'échantillon (Thiébaut et al., 2021) en mode SIM. Le logiciel MassHunter permet l'analyse des chromatogrammes de chaque pic détecté. Ces pics sont comparés à 62 composés de référence préalablement analysés en réalisant un étalonnage quadratique (5, 7,5, 10, 20, 40, 80, 100, 200, 300, 400, 500 et 1000 µM avec la même quantité d'étalon interne) permettant l'annotation et la quantification de 34 métabolites dans les tissus entiers de la dreissène (Tableau 4-3).

Tableau 4-3. Caractéristiques d'identification des métabolites utilisées dans l'analyseur GC-MS.

Métabolite	Temps de rétention (min)	Fragment quantitatif (m/z)	Fragment qualitatif (m/z)
Lactic acid	6,038	147,0	117,0
Alanine	6,631	116,0	73,0
Valine	8,255	144,0	145,0
Ethanolamine	8,945	174,0	147,0
Glycerol	9,095	205,0	103,0
Phosphoric acid	9,115	299,0	300,0
Isoleucine	9,338	158,0	159,0
Proline	9,380	142,0	143,0
Glycine	9,510	174,0	175,0
Succinic acid	9,584	147,0	148,0
Glyceric acid	9,881	147,0	189,0
Fumaric acid	10,000	245,0	75,0
Serine	10,267	204,0	205,0
Pipecolic acid	10,273	156,0	157,0
Threonine	10,626	218,0	117,0
Malic acid	11,915	245,0	147,0
Methionine	12,253	176,0	128,0
Aspartic acid	12,299	232,0	218,0
Gamma amino acid	12,360	174,0	175,0
Cytosine	12,363	254,0	240,0
Glutamic acid	13,449	246,0	128,0
Phenylalanine	13,534	218,0	192,0
Ornithine	15,621	174,0	142,0
Fructose1	16,345	217,0	103,0

Mannose1	16,488	205,0	160,0
Galactose1	16,548	319,0	205,0
Glucose1	16,641	205,0	147,0
Lysine	16,650	174,0	156,0
Octopamine	17,681	174,0	175,0
Dopamine	18,171	174,0	175,0
Inositol	18,420	217,0	305,0
Fructose-6P	20,429	315,0	217,0
Glucose-6P1	20,539	387,0	299,0
Glucose-6P2	20,689	387,0	299,0

2.9. Protéomique

Dans la partie 3, Le protocole de préparation et d'analyse des échantillons a précédemment été décrit dans le chapitre 2. Brièvement, les tissus mous entiers de *D. polymorpha*, préalablement lyophilisés, broyés et pesés, ont été dissous dans 12,5 µL de LDS1X (Thermo) par mg de poudre. Les échantillons ont été de nouveau broyés pendant 6 cycles de 20 s à 7200 rpm puis passés aux ultrasons 30 s (4 cycles, 90 % d'amplitude, 6500 rpm ; sonicateur Hielscher UP50H). Les échantillons ont été centrifugés individuellement pendant 3 minutes à 10 000g et le surnageant restant a été dilué dans 7 volumes de LDS1X. Après dénaturation, les protéines ont subi une électrophorèse dénaturante sur un gel NuPAGE 4-12% gradient dans un tampon MES (Thermo). Les protéomes de chaque dreissène ont été traités individuellement en utilisant une seule tranche de gel de polyacrylamide et protéolysés avec de la trypsine et 0,01 % de surfactant ProteaseMAX (Promega). Les peptides ont été analysés par spectrométrie de masse (Q-Exactive HF, Thermo) en mode dépendant des données selon des paramètres précédemment décrits (Klein et al., 2016). La résolution des peptides a été réalisée sur un Acclaim PepMap100 C18 (3 µm, 100 Å, 75 µm id x 50 cm) à un débit de 0,2 µL par min le long d'un gradient de 90 min d'acétonitrile dopé à 0,1 % d'acide formique (3,2 %-20 % sur 75 min puis 20 %-32 % sur 15min). Un ensemble de données de 5 342 914 spectres MS/MS haute résolution a été enregistré et interrogé avec le logiciel MASCOT (MatrixScience) contre une base de données dérivée d'ARN-seq nommée Dreissena_HJ1_pep_20170801.fasta, permettant l'identification de 4 518 protéines et aux 300 séquences de protéines de la base de données MS24-067(A)_Dpolymorfa_Cosio300_2025-01-08.fasta. L'abondance des protéines dans chaque condition a été évaluée par leur nombre spectral (nombre de spectres MS/MS attribués par protéine). Les protéines étaient considérées si elles avaient au moins sept comptes spectraux lors de la fusion de toutes les conditions.

2.10. Exposition en laboratoire : bioaccumulation des isotopes stables et enrichis du Hg

Afin de caractériser la biotransformation de l'IHg et du MeHg chez *D. polymorpha*, nous avons réalisé une exposition en condition contrôlée en utilisant des isotopes stables et enrichis du Hg. Toute la verrerie utilisée a été nettoyée par des bains successifs d'acide chlorhydrique (HCl) avec ultrasons pendant 1h.

2.10.1. Exposition de *D. polymorpha* au ^{201}MeHg et ^{199}IHg par voie alimentaire

Pour simuler un bloom algal de $3{,}5\times10^4$ cellules/ml exposé à 70 ng/L de Hg total, concentration correspondant à la NQE dans l'eau, soit environ 2 fg/cellule, nous avons

préalablement exposé des microalgues de l'espèce *C. vulgaris* (CV) pendant 2h à 0,2 fg/cellule de ^{201}MeHg et 2 fg/cellule de ^{199}IHg (ISC Science, Ovedio, Espagne). Cette proportion 1 :10 vise à reproduire le ratio MeHg/IHg pour le phytoplancton présent dans l'environnement (Bravo et al., 2014a; Regier et al., 2013).

Les microalgues sont d'abord centrifugées (1800 g, 10 min), puis rincées avec 50 mL d'eau de source avant d'être centrifugées à nouveau. Cette étape de rinçage est répétée 2 fois. Après le premier rinçage, la moitié des Chlorelles est collectée (CV) et l'autre rincée à l'EDTA-cystéine (10^{-3} M), afin d'éliminer le Hg labile des parois (Larras et al., 2013), et ainsi conserver la fraction non extractible du Hg ($CV_{non\text{-}ext}$) comme dans le chapitre 3. Les culots obtenus sont ensuite resuspendus dans 5 mL d'eau de source. Le même protocole est appliqué pour les microalgues témoins non exposées (contrôle).

Les dreissènes ont été réparties dans un bécher contenant 45 mL d'eau de source par individu, maintenues sous un bullage continu. Elles ont ensuite été nourries quotidiennement avec 10^6 cellules de CV pendant 4 jours. Les tissus entiers des dreissènes ont été prélevés après 1, 2 et 4 jours (J1, J2 et J4), placés dans de l'azote liquide puis congelés à -80°C. Les microalgues contaminées et témoins utilisées pour l'alimentation ont également été conservées à -80°C. En parallèle, l'eau d'exposition a été prélevée et acidifiée à 0.5% (v/v) avec de l'acide chlorhydrique suprapur (HCl) puis conservée à 4°C.

2.10.2. Mesure des concentrations en ^{201}MeHg et ^{199}IHg par GC-ICP-MS

Le protocole de préparation des échantillons et d'analyse par GC-ICP-MS a déjà été décrit dans le chapitre 3. Les échantillons de dreissènes et de microalgues, préalablement lyophilisés et pesés ont été prédigérés individuellement dans 3 mL de TMAH pour les dreissènes (Monperrus et al., 2008) et dans 3 mL de HNO_3 6N pour les microalgues (Garcia-Calleja et al., 2021). Les échantillons ont été digérés en utilisant un système micro-ondes à 75°C pendant 3 min. 5 mL de tampon acetate à 0.1 M ont été ajoutés dans les échantillons de dreissènes digérés et les échantillons d'eau et le pH ajusté pour atteindre 3.9 (avec HCl ou NH_3). Des volumes connus d'isotopes stables traceurs de quantification du Hg (^{202}MeHg et ^{198}IHg, ISC Sciences, Oviedo Espagne) ont été ajoutés pour quantifier les concentrations en ^{201}MeHg et ^{199}IHg. Les échantillons ont été dérivés avec 80 µL de $NaBEt_4$ et entre 0.4 et 2 ml d'isooctane. Après 20 minutes d'agitation, la phase organique a été transférée dans un flacon d'injection et stockée à -20°C jusqu'à l'analyse.

Les espèces de Hg ont été déterminées par GC-ICP-MS (chromatographie en phase gazeuse couplée à un plasma inductif - spectrométrie de masse ; trace GC et ICP-MS X2 series, Thermo Fisher). Chaque échantillon a été injecté en triplicat et les LD sont répertoriées dans le Tableau 4-4. Pour le ^{201}MeHg chez *C. vulgaris*, les blancs de HNO_3 n'ont pas reçu d'isotope, la limite de détection analytique ne peut donc pas être calculée. La quantification des isotopes stables enrichis ^{201}MeHg et ^{199}IHg a été calculée en utilisant une méthode de dilution isotopiques spécifique des composés du mercure utilisant la déconvolution des profils isotopiques (Garcia-Calleja et al., 2021; Rodriguez-Gonzalez et al., 2013).

Tableau 4-4. Limites de détection analytique et expérimentale du ^{199}IHg et ^{201}MeHg pour l'eau d'exposition brute et filtrée (ng/L), les microalgues (ng/g, poids sec) et les tissus des dreissènes (ng/g, poids sec).

	LD analytique		**LD expérimentale**	
	^{201}MeHg	^{199}IHg	^{201}MeHg	^{199}IHg
Eau			0,01	0,09
C. vulgaris		0,05	1,01	17,16
D. polymorpha	0,24	0,12	0,06	0,23

Les BAF ont été calculés en utilisant le nombre de cellules théorique donné aux dreissènes chaque jour. La formule du BAF est la suivante :

$$BAF\ (g^{-1}) = \frac{[THg]_{moule}}{[THg]_{microalgues} \times 10^6 cellules/jour \times nombre\ de\ jours}$$

Avec $[THg]_{moule}$ la concentration en THg dans les tissus d'une moule (ng/g), $[THg]_{microalgues}$ la concentration en THg dans les microalgues (ng/cellules), 10^6 le nombre de cellules théorique donné aux moules chaque jour dans les expérimentations en laboratoire et le nombre de jours d'exposition (1 pour J1, 2 pour J2, 4 pour J4, J5 et J8). La concentration en Hg par cellule dans les microalgues a été estimée en rapportant la masse de Hg mesurée dans le culot au nombre de cellules initialement présentes dans 2 ml avant centrifugation.

Une modélisation toxicocinétique des concentrations en ^{199}IHg et ^{201}MeHg dans les tissus entiers de *D. polymorpha* a été réalisée à l'aide de l'outil en ligne $MOSAIC_{bioacc}$ (https://mosaic.univ-lyon1.fr/ ; Charles et al., 2018). La demi-vie ($t_1/_2$), définie comme le temps nécessaire pour que la concentration de la substance dans l'organisme diminue de 50 % après l'arrêt de l'exposition, a été calculée à partir de la constante d'élimination (k_e) estimée par le modèle selon une cinétique du premier ordre ($t_1/_2 = \ln(2)/k_e$). L'incertitude associée à k_e a été propagée en calculant $t_1/_2$ à partir des quantiles 2,5 %, 50 % et 97,5 %.

2.11. Analyses statistiques

2.11.1. Partie 1

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R version 4.0.3. Pour la bioaccumulation de IHg et MeHg dans la Seine et en laboratoire, les activités enzymatiques et la péroxydation lipidique ainsi que les niveaux d'expression des gènes, la normalité des résidus (test de Shapiro-Wilk, α =0,01) et l'homoscédasticité (test de Levène, α =0,05) ont été évaluées avant d'effectuer l'ANOVA. Une ANOVA à 1 facteur a ensuite été réalisée pour comparer IHg et MeHg en fonction du temps (T0, T1, T2 et T3), suivie du test post-hoc de Tukey (α =0,05). Si nécessaire, une transformation logarithmique a été appliquée pour répondre aux critères d'éligibilité. Si seul le critère d'homoscédasticité n'était pas rempli, une ANOVA de Welch à 1 facteur a été réalisée (α =0,05), suivie du test post-hoc de Games Howell (α =0,05). Si aucun des deux critères n'était rempli, un test non paramétrique à 1 facteur de Kruskall-Wallis a été effectué (α =0,05), suivi du test post-hoc de Wilcoxon pour les échantillons indépendants avec ajustement de la valeur p de Hochberg (α =0,05) pour les comparaisons multiples.

Pour les analyses de métabolomique, une analyse discriminante par moindres carrés partiels (PLS-DA) a été réalisée dans R Studio à l'aide du package mixOmics (Rohart et al., 2017). La distance de Mahalanobis a été utilisée pour évaluer la performance de la classification, donnant un taux d'erreur de 10% pour les trois premières composantes de l'ensemble des données

métabolomiques. Pour évaluer l'effet global d'une exposition dans la Seine sur le métabolome de *D. polymorpha*, une PERMANOVA (α =0,05) a été réalisée à l'aide des indices de dissimilarité de Bray-Curtis (999 permutations) en utilisant le package R *vegan* (vegan : community ecology package ; https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html). Les concentrations en métabolites pour le T0 et T3 ont été évaluées à l'aide de MetaboAnalyst 5 (www.metaboanalyst.ca consulté le 2 avril 2025) avec une normalisation de Pareto, puis des t-test avec calcul de la FDR de Benjamini-Hochberg et une représentation des données par heatmap avec regroupement hiérarchique basé sur les distances euclidiennes.

2.11.2. Partie 2

Afin de tester les différences de bioaccumulation et d'effets biologiques en fonction du site d'exposition, une ANOVA 2 facteurs a été réalisée comprenant les 3 temps (T1, T2 et T3) et les deux rivières (Seine et Deûle) pour chaque espèce de Hg (THg ou MeHg). Pour chaque comparaison, la normalité des résidus (test de Shapiro-Wilk, α =0,01) et l'homoscédasticité (test de Brown Forsythe, α =0,05) ont été évalués avant d'interpréter les résultats de l'ANOVA. Une ANOVA 2 facteurs a ensuite été réalisée suivie du test post-hoc de Tukey (α =0,05). Si nécessaire, une transformation logarithmique ou 1/x a été appliquée pour répondre à ces critères.

Pour la métabolomique, une PLSDA a été réalisée sous R Studio à l'aide du package *mixOmics* (Rohart et al., 2017) afin de discriminer les métabolites en fonction du sexe et du site d'encagement. La performance du modèle a été évaluée à l'aide de la distance de Mahalanobis, avec un taux d'erreur moyen de 23,8 % pour les cinq premières composantes. En complément, une ANOVA à un facteur a été réalisée pour comparer l'abondance des métabolites entre les individus non encagés (T0) et les individus encagés sur la Seine et la Deûle. Une seconde ANOVA à un facteur a été réalisée pour comparer spécifiquement les deux sites d'encagements. Les conditions de normalité et d'homoscédasticité ont été vérifiées et les p-valeurs obtenues ont été ajustées selon la méthode de Benjamini-Hochberg.

2.11.3. Partie 3

Afin de tester les différences de bioaccumulation et d'activités enzymatiques et de défense en fonction du site d'exposition, une ANOVA 2 facteurs a été réalisée comprenant les 3 temps (T1, T2 et T3) et la Seine amont et aval (SAM, SAV) et la Deûle amont et aval (DAM, DAV) pour chaque espèce de Hg (THg et MeHg). Pour chaque comparaison, la normalité des résidus (test de Shapiro-Wilk, α =0,01) et l'homoscédasticité (test de Brown Forsythe, α =0,05) ont été évalués avant d'interpréter les résultats de l'ANOVA. Une ANOVA 2 facteurs a ensuite été réalisée suivie du test post-hoc de Tukey (α =0,05). Ces analyses ont été réalisées indépendamment pour l'hiver puis l'été.

Pour la métabolomique, une ANOVA 1 facteur avec ajustement des p-valeurs selon la méthode de Benjamini-Hochberg a été réalisée afin d'identifier les métabolites dont les concentrations diffèrent significativement chez les dreissènes encagées (Condition : SAM, SAV, DAM et DAV) par rapport à l'état initial (T0). L'ANOVA a été suivi d'un test post-hoc de Dunnett pour comparer chaque condition au T0. Ensuite, une PLS-DA a été réalisée sur les concentrations en métabolites pour identifier les métabolites permettant de discriminer les sites d'encagements, donc l'effet du milieu (Seine vs Deûle) et potentiellement de la verticalité du cours d'eau (amont vs aval). Pour cela, les métabolites dont les VIP score étaient supérieurs à 1 ont été retenus.

Pour la protéomique, une ANOVA 1 facteur avec ajustement des p-valeurs selon la méthode de Benjamini-Hochberg a été réalisée afin d'identifier les protéines dont les spectral count diffèrent significativement chez les dreissènes encagés (Condition : SAM, SAV, DAM et DAV) par rapport à l'état initial (T0). L'ANOVA a été suivi d'un test post-hoc de Dunnett pour comparer chaque condition au T0. Ces résultats sont présentés sous la forme d'un diagramme de Venn réalisé sur R Studio avec le package *VennDiagram*. Une PLS-DA a ensuite été réalisée sur les protéines dont les spectral count étaient supérieurs à 6 puis les protéines dont les VIP étaient score supérieurs à 1 ont été retenues pour les analyses suivantes.

Dans le but d'essayer d'expliquer les réponses biologiques mesurées par la bioaccumulation dans les tissus entiers des dreissènes, une ACP a été réalisée en utilisant les concentrations en THg et MeHg dans les dreissènes et les différentes réponses biologiques et cellulaires décrites précédemment. Pour la protéomique, au vu du grand nombre de protéines modulées, seules les protéines dont les VIP score étaient supérieurs à 1 ont été considérées pour l'ACP. Des corrélations entre la bioaccumulation en THg et en MeHg ont été réalisées avec le package corrplot sur R Studio et les résultats sont présentés sous la forme d'un diagramme de Venn. Les protéines dont les p-valeurs des corrélations étaient supérieures à 0,05 ont été annotées par homologie avec le logiciel EggNOG v5.0 (http://eggnog5.embl.de) en utilisant les paramètres par défaut du logiciel. L'analyse d'enrichissement a été réalisée en utilisant la base de données des voies KEGG via le logiciel WebGestalt en utilisant notre ensemble de données de 3992 protéines comme liste de base.

Partie 1 : Du terrain au laboratoire

Cette partie vise à évaluer la bioaccumulation du Hg chez *Dreissena polymorpha* dans un environnement naturel, la Seine, et à comparer ces résultats avec des expositions en laboratoire. L'objectif est de quantifier les concentrations de Hg dans les tissus des dreissènes et de calculer les facteurs de bioaccumulation pour évaluer la capacité des dreissènes à accumuler le MeHg à partir de leur environnement, et ainsi, confirmer la faisabilité de ce type de mesure en conditions naturelles. Les réponses biologiques, telles que les activités enzymatiques et les profils métabolomiques, sont également analysées pour comprendre les effets du Hg sur les organismes.

Cette partie du chapitre est en collaboration avec : Mariia Petrova[1], Evan Bossard[1], Emmanuel Tessier[2], Nathalie Le Bris[3], David Renault[3], David Amouroux[2] et Lars-Eric Heimbürger-Boavida[4]

[1] UMR-I 02 SEBIO, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France ;
[2] Université de Pau et des Pays de l'Adour, E2S UPPA, CNRS, Institut des Sciences Analytiques et des Physico-Chimie pour l'Environnement et les Matériaux (IPREM), Pau, France ;
[3] UMR CNRS 6553 EcoBio, Université de Rennes, Rennes, France ;
[4] CNRS/INSU, Aix Marseille Université, Université de Toulon, Mediterranean Institute of Oceanography (MIO), Marseille, France

1. Résultats et discussion

1.1. Exposition en milieu naturel

1.1.1. Paramètres physico-chimiques et concentrations en Hg dans l'eau

Le débit et la concentration en MES augmentent à T1 et T2 par rapport au T0 (Tableau 4-2). Une hausse de la concentration en IHg_p est également mesurée à T1. Le prélèvement d'eau et de particules à T2 a été infructueux car les filtres se sont cassés à cause de la charge particulaire trop importante dans l'eau. Cependant, globalement, les concentrations en IHg_d et $MeHg_d$ sont stables au cours du temps. Le $\%MeHg_d$ moyen est de 14 ± 3. La concentration en phytoplancton est constante au cours du temps. De plus, les proportions de pico et nanophytoplancton sont similaires au cours du temps, avec 6 ± 4% de picophytoplancton et 94 ± 4% de nanophytoplancton.

Figure 4-2. Paramètres physico-chimiques et concentrations en Hg hebdomadaires de la Seine sur les 3 semaines d'encagements (X : pas de valeur). Les valeurs des paramètres de l'eau sont fournies par le SIAAP.

Paramètres	**T0**	**T1**	**T2**	**T3**
pH	7,98	8,01	8,06	8,02
Température (°C)	9,71	7,41	4,80	6,40
Conductivité (mS/m)	534	504	544	574
O_2 (mg/L)	11,55	11,75	13,11	13,11
COD (mg/L)	2,40	2,60	3,20	2,30
PO_4 (mg/L)	0,25	0,21	0,16	0,17
MES (mg/L)	10	37	64	14
Débit (m^3/s)	281	429	346	269
Phytoplancton (cellules/mL)	$5.9x10^4$	$3.6x10^4$	$3.1x10^5$	$1.1x10^5$
IHg_d (ng/L)	3,1	2,0	0,7	1,7
$MeHg_d$ (%)	13,6	17,8	X	11,6
IHg_p (µg/g)	0,5	0,3	0,1	0,4
$MeHg_p$ (%)	1,7	2,1	X	9,5
THg sédiments (µg/g)	X	X	X	0,27

1.1.2. Concentrations en IHg et MeHg chez *D. polymorpha*

Dans cette étude, nous avons mesuré d'une part les concentrations absolues en Hg dans les moules (exprimées en ng/g de tissu) afin de quantifier directement la contamination des organismes. D'autre part, nous avons calculé un facteur de bioaccumulation (BAF) pour comparer l'accumulation de Hg chez les moules en fonction de la concentration de Hg présente dans les microalgues ingérées ou les particules présentes dans le milieu naturel (la Seine). Le BAF reflète donc la capacité des moules à bioaccumuler le Hg par rapport à sa source d'exposition. Les concentrations en THg chez *D. polymorpha* sont de 102,2 ±15,8, 85,2 ±3,9, 96,32 ±13,7 et 77,2 ±19,3 ng/g à T0, T1, T2 et T3 respectivement, suggérant globalement une diminution de 20% au cours de l'expérimentation. Les concentrations en IHg mesurées dans les tissus mous de *D. polymorpha* sont 5.7 x inférieurs à T3 par rapport à T0 pouvant expliquer la diminution des concentrations en THg (Figure 4-3). Le BAF, quant à lui, est 9 x plus élevé à T2 par rapport à T1 et diminue de 5 x à T3 par rapport à T2 (Tableau 4-6). A l'inverse, les concentrations de MeHg augmentent de façon non significative à T3 comparé à T0. Ces différences entraînent

une augmentation du %MeHg au cours du temps. Cependant, le BAF de MeHg diminue au cours du temps mais sont tout de même 212, 13 et 47 x plus élevés que ceux de IHg.

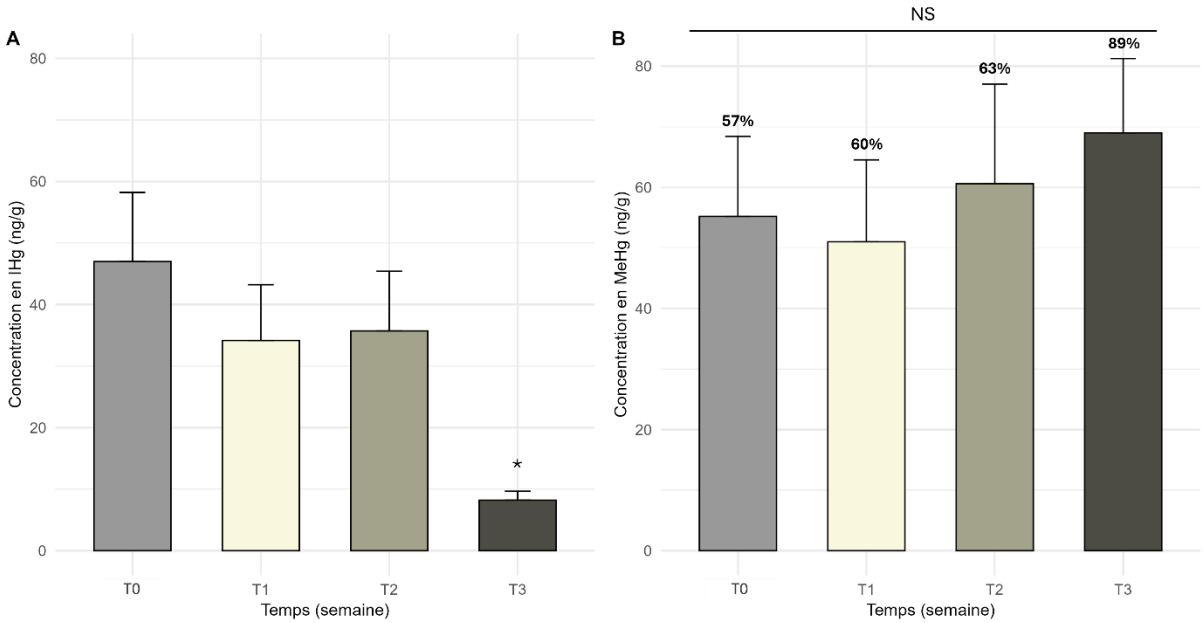

Figure 4-3. Concentrations en IHg (A) et MeHg (B, ng/g) et %MeHg dans les tissus entiers de *D. polymorpha* contrôle et exposée 3 semaines dans la Seine (moyenne ± écart-type ; n=4 à 5, * = p <0.05 vs contrôle, NS = non significatif).

L'exposition de *D. polymorpha* pendant 3 semaines dans la Seine a révélé une diminution globale des concentrations en THg et IHg dans ses tissus entre T0 et T3, suggérant un processus de dépuration de IHg. En revanche, les concentrations en MeHg et %MeHg dans les tissus augmentent de façon progressive et non significative, ce qui pourrait traduire une accumulation de MeHg. Enfin, la diminution simultanée de IHg_d et $MeHg_d$ au cours du temps pourrait indiquer que la principale voie d'exposition au Hg pour *D. polymorpha* est liée à la consommation de particules. Les analyses de corrélation montrent une tendance à une bioaccumulation du MeHg corrélée positivement à $MeHg_p$ (R = 0.95) et négativement à $MeHg_d$ (R = -0.85). Toutefois, ces corrélations ne sont pas statistiquement significatives, probablement en raison du faible nombre de réplicats (Figure S 4-1). Les concentrations en $MeHg_p$ et $MeHg_d$ sont négativement corrélées de manière significative (R = -0.97 ; p-value = 0.03). Des mesures supplémentaires seront nécessaires pour consolider ces hypothèses. Il serait intéressant de réaliser une filtration séquentielle du phytoplancton afin d'obtenir différentes fourchettes de tailles, connaître les concentrations en Hg et les relier à la bioaccumulation dans les dreissènes, dans un contexte de transfert trophique.

Les concentrations en THg mesurées dans les dreissènes dans notre étude (8 à 47 ng/g de poids sec) sont globalement plus faibles que celles mesurées chez des bivalves encagés sur des sites contaminés au Hg. Berezina et al. (2023) ont mesurés des concentrations comprises entre 0.1 et 140 ng THg/g poids sec chez *D. polymorpha* encagé 1 mois dans l'estuaire Neva de la mer Baltique. Neufeld, 2010 a rapporté une concentration de 1000 ng THg/g de poids sec chez *Corbicula fluminea,* encagé 38 jours sur un site contaminé au Hg à South River en Virginie (USA).

Peu d'études sont réalisées avec des bivalves encagés, on trouve principalement des mesures de concentrations en THg chez des bivalves natifs. Les concentrations sont

généralement élevées car proches de sites contaminés au Hg. C'est le cas de Vasile et al., 2019, qui ont mesuré des concentrations allant de 200 à 500 ng THg/g de poids sec avec 50 à 80% de MeHg dans les tissus entiers de *Dreissena sp*. prélevées dans la Rivière Olt (Roumanie), à proximité d'une usine d'électrochimie. De même, Carrasco et al., (2008), ont mesuré entre 80 (site de référence) et 400 (hot spot) ng THg/g de poids sec chez *D. polymorpha* collectées dans la rivière Ebro (Espagne), près d'une usine de production de chlore et de soude. Nos résultats sont alors proches de leur site de référence, pour des dreissènes natives. Aucune mesure de MeHg dans des bivalves encagés n'est publiée dans la littérature scientifique, limitant ainsi la comparaison stricte avec nos résultats. Les concentrations en MeHg mesurées dans les dreissènes dans notre étude (51 à 69 ng/g de poids sec, correspondant à un %MeHg allant de 57 à 89) sont globalement dans les intervalles de concentrations mesurées chez des bivalves endémiques. Par exemple, chez l'huître (*Crassostrea gigas*) et la moule (*Mytilus* spp) en provenance de plusieurs sites le long des côtes françaises, des concentrations en MeHg comprises entre 8 et 238 ng MeHg /g de poids sec, avec un %MeHg de 11 à 88 % ont été mesurées (Claisse et al., 2001). Dans l'estuaire de la Seine, les concentrations dans ces deux bivalves sont de 73 ± 38 ng MeHg/g, pour un %MeHg de 45 ± 23 % (Claisse et al., 2001).

1.1.3. Activité des enzymes du système antioxydant et péroxydation lipidique

La concentration en LOOH augmente significativement de 2 x dans les branchies, la glande digestive et les restes de *D. polymorpha* à T2 et T3 comparé à T0 suggérant un stress oxydatif observé après 2 semaines d'encagement dans la Seine (Figure 4-4). Une augmentation significative des activités des protéines CAT à T3 et SOD à T1 sont également observées dans les restes, mais pas dans les branchies et la glande digestive (Figure 3). En effet, l'activité enzymatique des CAT est augmentée à T3 comparé à T0, de même que l'activité des SOD, également augmentée à T1 (Figure 3). Les niveaux basaux des CAT et GST sont 2.8 x et 3.4 x plus élevés dans la glande digestive (181.8 ± 44.1 et 443.6 ± 124.7) que dans les branchies (65.4 ± 11.9 et 129.3 ± 28.8) et les restes (52.9 ± 8.9 µmol/min/g prot et 186.2 ± 49.1 µmol de CDNB/min/g prot) respectivement.

Les expositions de *D. polymorpha* dans la Seine ont augmenté la production de péroxydation lipidique, traduisant un dépassement des capacités de défense de l'animal et constituant un marqueur de stress oxydatif. Chez la palourde *R. decussatus* encagée 22 jours dans le lagon Mar Menor, des niveaux de péroxydation lipidique 2 x supérieurs au niveau initial ont été mesurés (Campillo et al., 2013). C'est un effet attendu lors d'une exposition au Hg car celui-ci favorise la production de ROS qui réagissent avec les acides gras polyinsaturés des membranes et perturbent les défenses antioxydantes (Manduzio et al., 2005), induisant de la péroxydation lipidique chez les bivalves (Géret et al., 2002; Oliveira et al., 2018; Seguin et al., 2025).

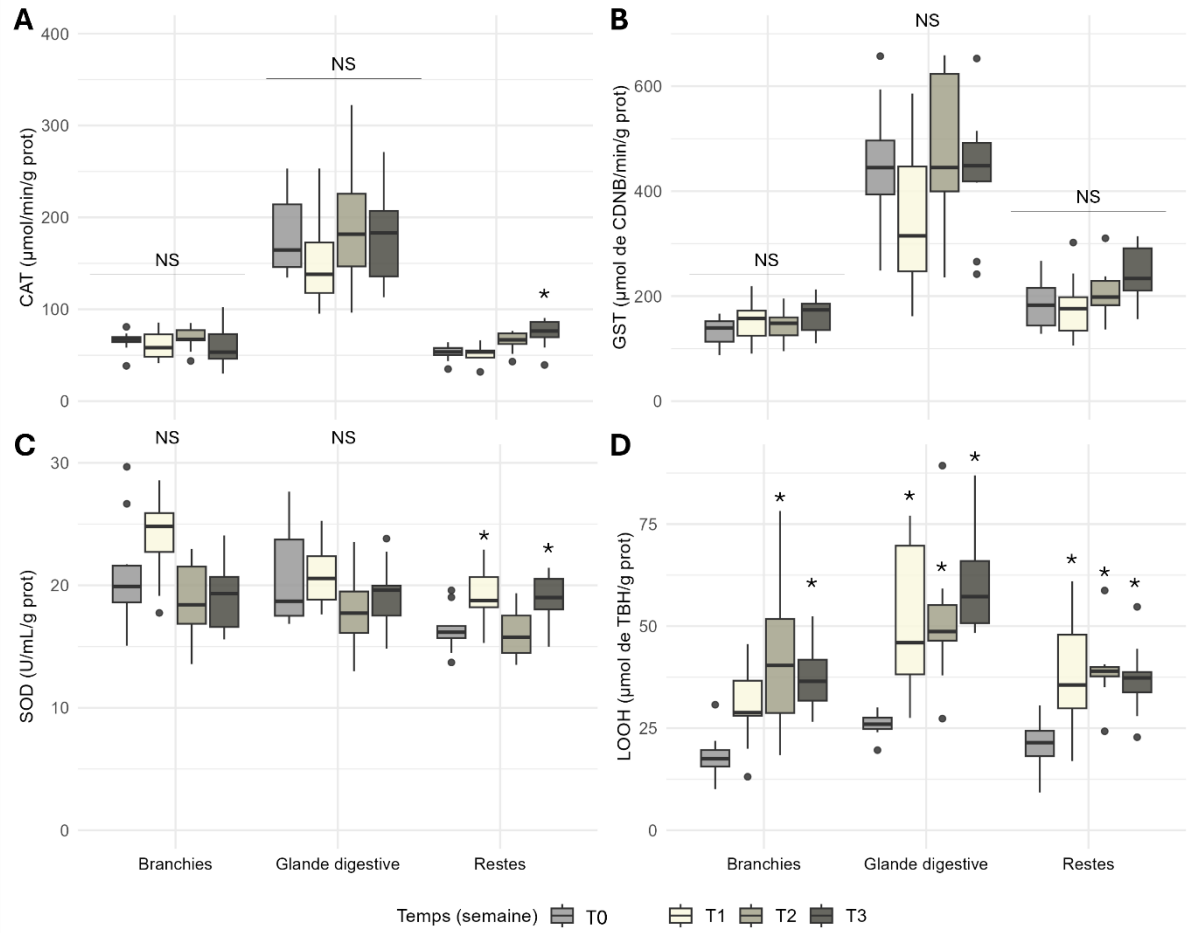

Figure 4-4. Activités enzymatiques des protéines du système antioxydant (A : CAT, B : GST et C : SOD) et peroxydation des lipides (D : LOOH) chez *D. polymorpha* exposées 3 semaines dans la Seine (* = p<0,05 vs contrôle, n=10).

1.1.4. Expression relative du niveau des gènes du système antioxydant

Le niveau d'expression du gène *sod* augmente significativement dans la glande digestive à T1 puis semble revenir au niveau basal du T0 (Figure 4-5). Cette augmentation est également observée pour les gènes *cat* et *gst* mais sans être statistiquement significative. Globalement, le niveau d'expression des gène *cat* et *gst* semble augmenter sans être statistiquement significatif dans les branchies, la glande digestive et les restes au cours du temps. Le niveau d'expression du gène *mt* ne semble pas modulé au cours du temps dans les organes étudiés.

Le stress oxydatif observé chez *D. polymorpha* ne peut être attribué seulement au Hg, car il peut provenir d'autres sources de stress telles que des métaux (Bouskill et al., 2006; Faria et al., 2009; Osman et al., 2007), des pesticides (Serdar et al., 2023; Yildirim et al., 2024) ou encore des médicaments (Baratange et al., 2022, 2023; Parolini et al., 2015). La Seine contient divers polluants susceptibles de provoquer un stress oxydatif et de perturber le métabolisme de *D. polymorpha*, comme les métaux (Hamzeh et al., 2014; Le Gall et al., 2018; Thévenot et al., 2002), des pesticides (Azimi & Rocher, 2016), ainsi que des PCB et des HAP (Minier et al., 2006). Une caractérisation plus complète des polluants présents dans la Seine serait nécessaire, afin de mieux définir l'exposome de *D. polymorpha*. Cependant, ces réponses sont utiles pour estimer le niveau de stress global de *D. polymorpha* lors de ces encagements.

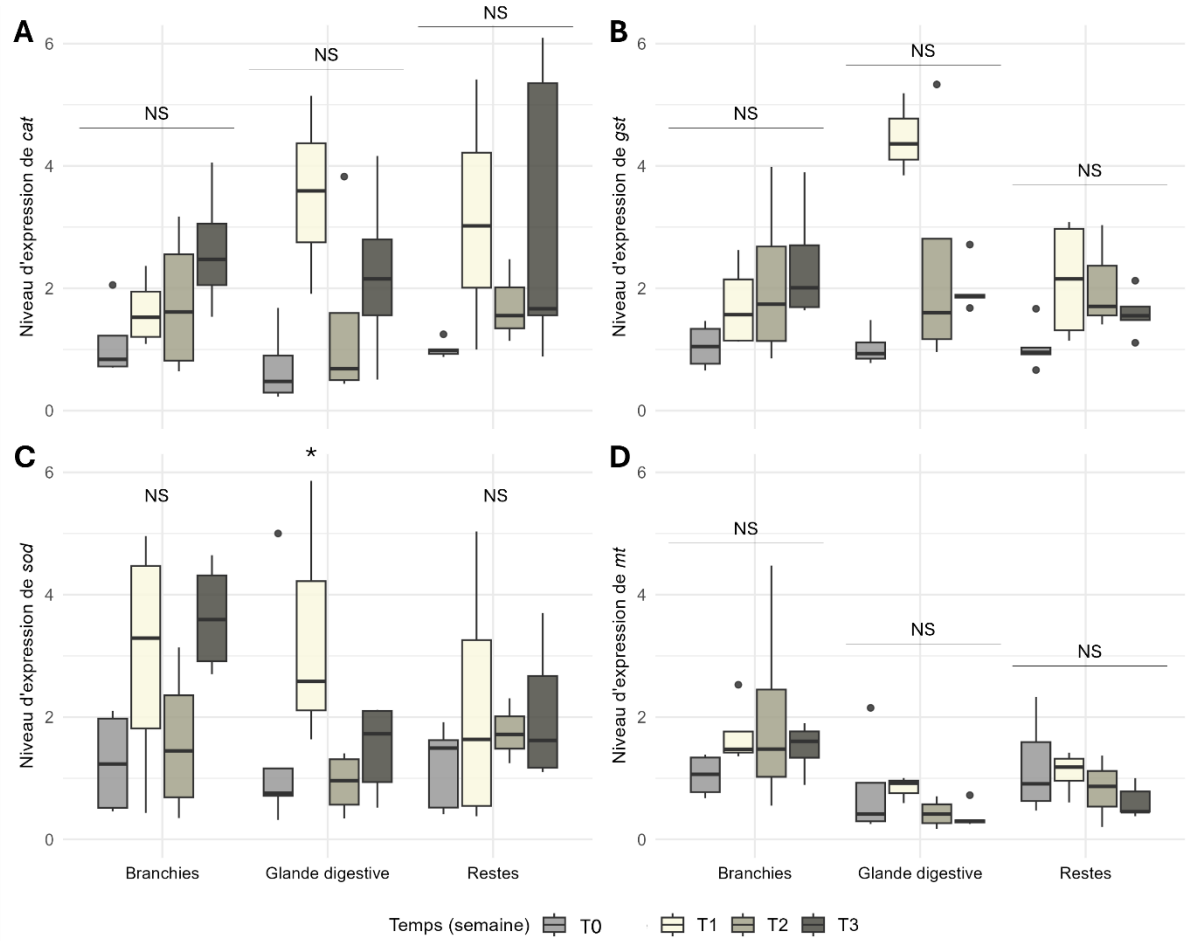

Figure 4-5. Expression relative des gènes du système antioxydant (A : *cat*, B : *gst*, C : *sod* et D : *mt*) chez *D. polymorpha* exposées 3 semaines dans la Seine (* = p<0,05 vs contrôle, n=10).

1.1.5. Métabolomique ciblée

Sur les 62 métabolites analysés par GC-MS, 34 ont été quantifiés dans les tissus mous de la dreissène (Figure S4-2). L'analyse PLS-DA révèle une discrimination claire entre les individus des groupes T0 et T3 (Figure 5). L'exposition dans la Seine a significativement modifié le métabolome de *D. polymorpha* à T3 par rapport à T0 (PERMANOVA : p = 0.006). Les analyses univariées comparées à T0 ont révélé une diminution significative de 13 métabolites à T3 (Figure 4-6, Tableau 4-5). Ces métabolites sont impliqués dans 7 voies métaboliques associées aux acides aminés (proline, isoleucine-valine, alanine, phénylalanine, sérine, glycine et thréonine) et participent au métabolisme énergétique cellulaire (acide malique, acide lactique et glucose-galactose). Une réduction de la concentration en éthanolamine est également observée à T3.

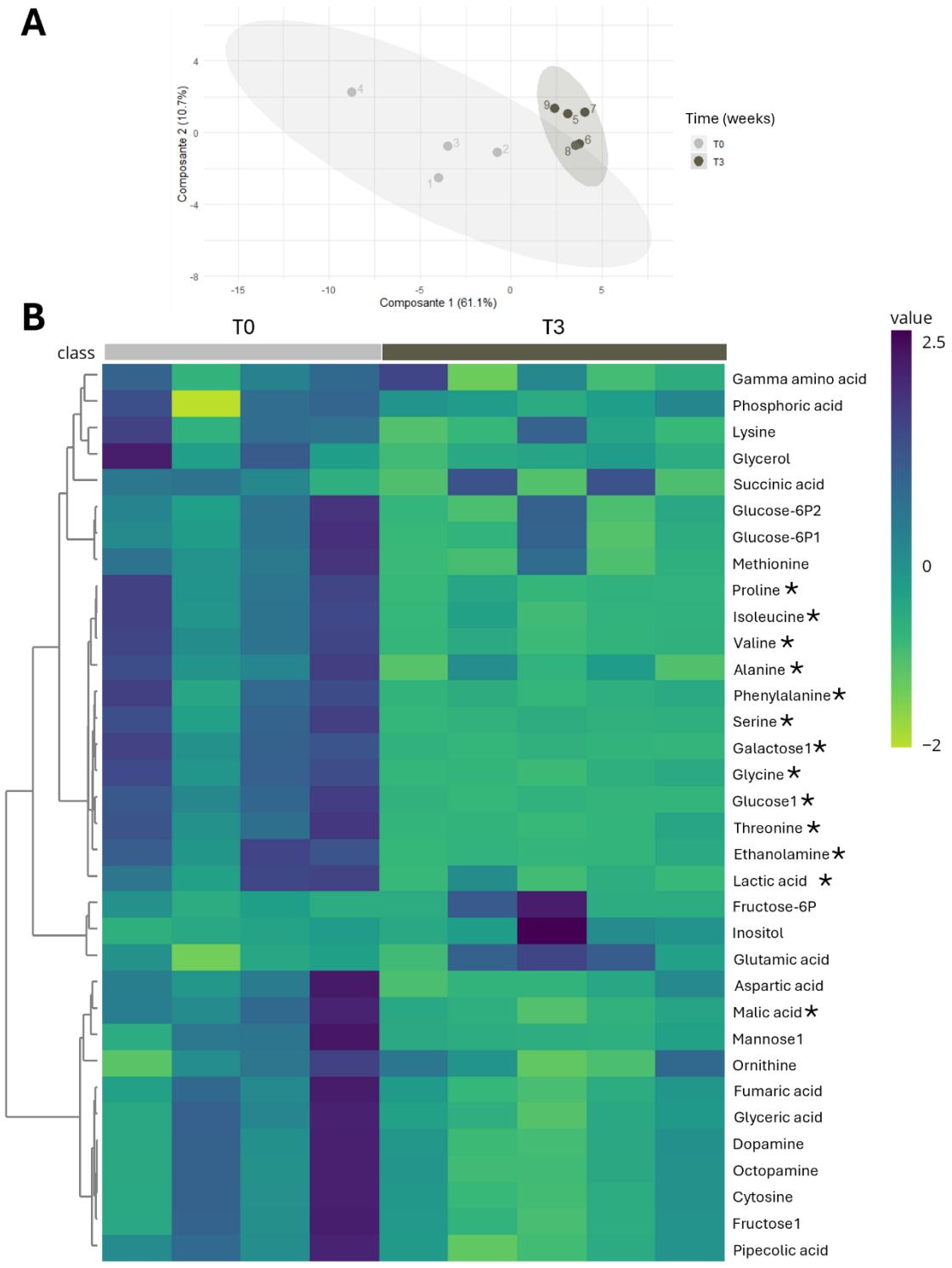

Figure 4-6. Concentrations de métabolites ciblés dans les tissus entiers de *D. polymorpha* non exposée (T0) et exposée 3 semaines dans la Seine (T3). A) PLS-DA, B) Heatmap des concentrations en métabolite (* = p < 0,05).

Tableau 4-5. Valeurs statistiques des 13 métabolites significativement modulés dans les tissus entiers de *D. polymorpha* après 3 semaines d'encagements comparés à des individus contrôle (p<0.05, MetaboAnalyst).

Métabolites	VIP score PLS-DA	p.value (T-test)	FDR (Hochberg)	log2(FC)
Glucose1	1,3464	0,000	0,009	-3,554
Galactose1	1,3115	0,001	0,009	-4,4171
Valine	1,2989	0,001	0,009	-2,4577
Glycine	1,2952	0,001	0,009	-2,0434
Ethanolamine	1,2925	0,001	0,009	-2,0224
Threonine	1,2713	0,002	0,011	-1,7145
Proline	1,2524	0,003	0,013	-2,3397
Isoleucine	1,2495	0,003	0,013	-2,2012
Serine	1,2268	0,004	0,016	-1,7832
Malic acid	1,1909	0,007	0,023	-1,4306
Phenylalanine	1,1809	0,008	0,024	-2,1668
lactic acid	1,1241	0,014	0,040	-2,289
Alanine	1,1132	0,016	0,043	-1,1727

1.2. Exposition en laboratoire : bioaccumulation des isotopes stables et enrichis du Hg

1.2.1. Concentrations en ^{201}MeHg et ^{199}IHg dans les microalgues et l'eau d'exposition

Pour évaluer les processus de biotransformation du Hg chez *D. polymorpha* et émettre une hypothèse sur la source de MeHg bioaccumulé dans la Seine, une exposition en laboratoire avec les isotopes stables et enrichis du Hg a été menée en conditions contrôlées. Les concentrations en ^{201}MeHg et ^{199}IHg mesurées chez les Chlorelles sont de 0.08 ± 0.02 et 0.46 ± 0.11 ng/g et chez les Chlorelles$_{non\text{-}ext}$ de 0.04 ± 0.04 et 0.22 ± 0.15, suggérant que le Hg présent sur la paroi représente la moitié du Hg. Plus précisément, le ^{201}MeHg chez les Chlorelles se réparti à 46,1% dans la fraction non-extractible et 53,9% dans la paroi et pour ^{199}IHg, 54,0% dans la fraction non-extractible et 46,0% dans la paroi. Aucune biotransformation – ni méthylation, ni déméthylation – n'a été observée chez les Chlorelles. Les concentrations en ^{119}IHg et ^{201}MeHg chez les dreissènes exposées à des microalgues contrôle sont en-dessous des limites de quantification sur les 8 jours d'expérimentation (< 1.01 ng/g pour ^{201}MeHg et < 17.16 ng/g pour ^{199}IHg).

Les concentrations en ^{201}MeHg mesurées dans les eaux brutes sont de 0.18 ±0.06 et dans les eaux filtrées de 0.19 ± 0.10 ng/L pour les moules nourries avec des microalgues contaminées au Hg. Les concentrations en ^{199}IHg dans les eaux brutes et filtrées sont en-dessous des LD (< 0.23 ng/L). Pour les moules nourries avec des microalgues contrôle, les concentrations en ^{201}MeHg et ^{199}IHg dans les eaux brutes et filtrées sont également en-dessous des LD (< 0.06 ng/L pour ^{201}MeHg et < 0.23 ng/L pour ^{199}IHg). Les concentrations en Hg dans l'eau étant faible voire en-dessous des LD, celles-ci nous permettent de valider que l'exposition de *D. polymorpha* s'est faite uniquement par l'alimentation.

1.2.2. Bioaccumulation du ^{201}MeHg et ^{199}IHg chez *D. polymorpha* par l'alimentation

Les dreissènes ont été nourries pendant 4 jours, puis soumises à une dépuration de 4 jours. Les concentrations en ^{119}IHg augmentent significativement après 2 jours d'exposition et se

stabilisent ensuite, ce qui se reflète également dans les BAF. Les concentrations en ^{201}MeHg augmentent significativement après 4 jours d'exposition et en phase de dépuration à J8 comparé à J1, suggérant que le ^{201}MeHg continu d'être accumulé, même lorsqu'il n'est plus présent dans la nourriture (Figure 4-7). Cependant, la proportion de % ^{201}MeHg est stable au cours du temps (environ 10%). Aucune biotransformation – ni méthylation, ni déméthylation – n'a été observée chez *D. polymorpha* sur les 8 jours d'exposition. Les BAF pour MeHg et IHg sont relativement constants au cours des 4 jours d'exposition et des 4 jours de dépuration avec le BAF le plus élevé à J2 pour IHg et à J8 (phase de dépuration) pour MeHg (Tableau 4-6). Ces résultats contrastent avec ceux obtenus chez d'autres organismes aquatiques dans des conditions expérimentales similaires avec des isotopes stables enrichis. Par exemple, chez la seiche *Sepia officinalis* nourrie avec des crevettes vivantes contaminées au ^{202}MeHg et ^{199}IHg à des concentrations environnementales, la glande digestive a été identifiée comme l'organe clé de la déméthylation *in vivo* du MeHg, bien que les mécanismes précis restent à élucider (Gentès et al., 2023). De même, chez la diatomée *C. meneghiniana*, l'utilisation d'isotopes stables enrichis a mis en évidence une déméthylation cellulaire rapide du MeHg en IHg, localisée principalement dans les débris cellulaires (Santos et al., 2025). Une déméthylation du MeHg a également été observée lors du transfert trophique chez des organismes benthiques tels que *Chironomus riparius* (Beauvais-Flück et al., 2017) et *Gammarus fossarum* (Beauvais-Flück et al., 2016), soulignant l'importance de cette biotransformation à différents niveaux du réseau trophique. Ainsi, alors que *Sepia officinalis*, *C. meneghiniana* et ces invertébrés benthiques présentent des capacités marquées de déméthylation en conditions contrôlées, *D. polymorpha* ne montre aucune biotransformation mesurable du Hg sur la durée de l'expérience.

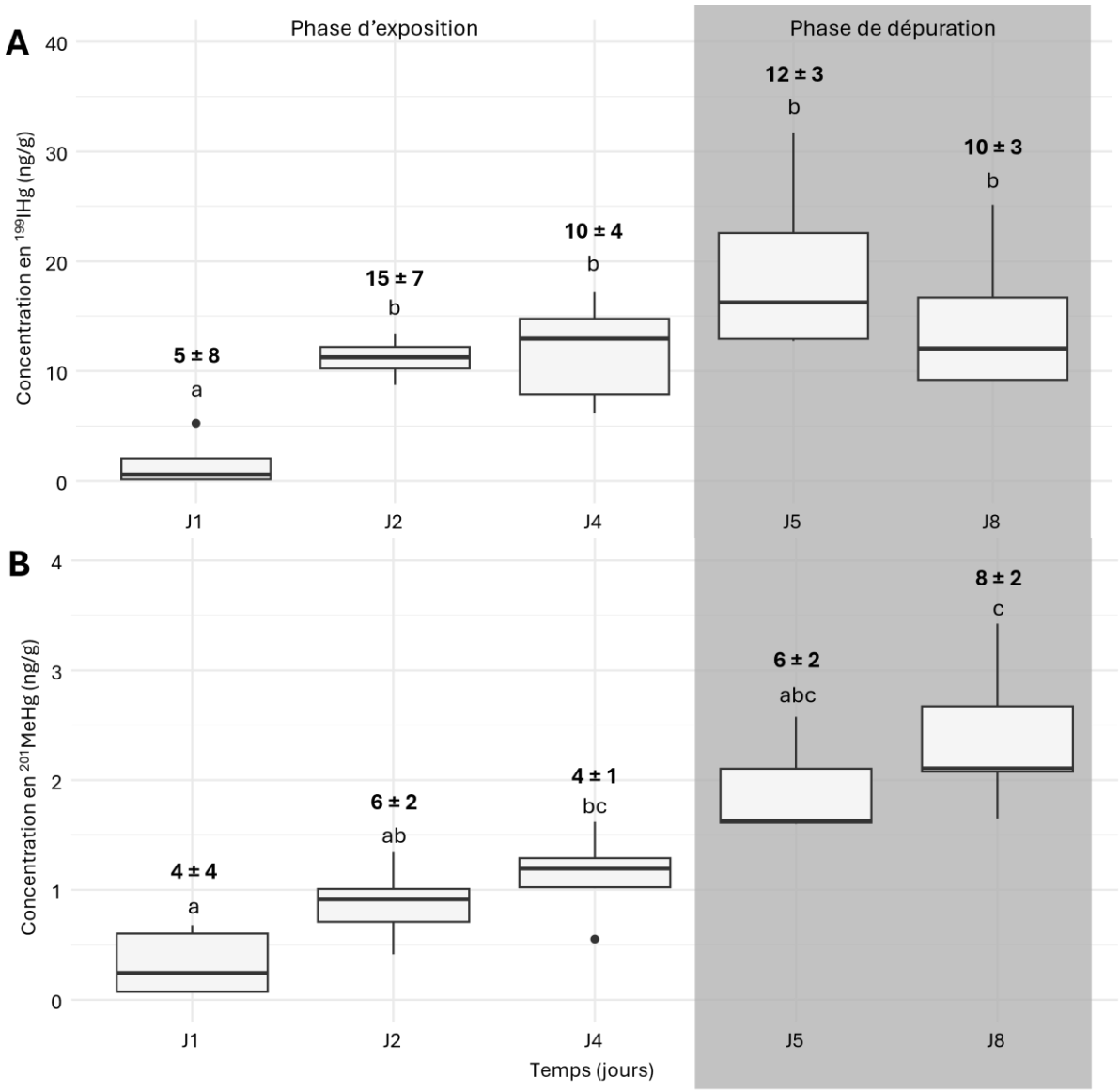

Figure 4-7. Concentrations (ng/g) en ^{199}IHg (A) et ^{201}MeHg (B) %MeHg (en gras) dans les tissus entiers de *D. polymorpha* exposée pendant 4 jours par l'alimentation suivi de 4 jours de dépuration (n=4 à 5, p <0.05).

Tableau 4-6. Facteurs de bioaccumulation (BAF, g^{-1} ; moyenne ± SD) chez *D. polymorpha* exposées dans la Seine et en conditions contrôlées (n = 5).

Exposition	Temps	IHg	MeHg
Seine	T1	19 ± 6	4113 ± 1091
	T2	178 ± 84	2444 ± 663
	T3	35 ± 16	1649 ± 232
Conditions contrôlées	J1	5 ± 8	4 ± 4
	J2	15 ± 7	6 ± 2
	J4	10 ± 4	4 ± 1
	J5	12 ± 3	6 ± 2
	J8	10 ± 3	8 ± 2

Les isotopes stables et enrichis du IHg et MeHg en faibles concentrations pour simuler un site faiblement contaminé, nous ont permis de quantifier en conditions contrôlées la bioaccumulation avec des expositions par voie alimentaire. Dans nos conditions expérimentales, ^{199}IHg est assimilé plus rapidement par *D. polymorpha* avec des BAF 2 x plus

élevés que ^{201}MeHg, bien que la distribution subcellulaire dans les microalgues soit similaire. Jusqu'à présent, il est admis que le phytoplancton accumule préférentiellement le MeHg dans la fraction intracellulaire, tandis que le IHg est principalement attaché à la membrane, la fraction intracellulaire étant la seule transférable au maillon supérieur (Mason et al., 1996). Or, les expérimentations du précédent chapitre montrent que Hg accumulé dans la paroi l'est aussi. C'est également ce qui a été démontré avec une expérimentation menée sur le transfert du IHg et MeHg d'une plante aquatique vers le gammare, montrant alors que le Hg cytosolique et dans la paroi est transféré aux gammares mais que le MeHg de la paroi l'est 2.5 x plus que l'IHg (Beauvais-Flück et al., 2016).

1.2.3. Modélisation toxicocinétique

Pour estimer les constantes d'accumulation et d'élimination du Hg chez *D. polymorpha,* l'outil MOSAIC$_{bioacc}$ a permis de modéliser la toxicocinétique des deux formes de Hg dans le temps (Figure 4-8). La constante d'accumulation *ku* et le BMF sont plus élevés pour l'IHg par rapport au MeHg, indiquant que celui-ci est assimilé plus rapidement par les dreissènes. En revanche, la constante d'élimination et l'estimation des demi-vies ($T_{1/2}$) révèlent une élimination plus lente du MeHg par rapport à l'IHg, avec une demi-vie médiane de 2408 jours pour le MeHg contre 1531 jours pour l'IHg.

La bioaccumulation plus rapide de ^{199}IHg par *D. polymorpha* semble contraire aux nombreuses observations montrant une bioamplification du MeHg le long de la chaîne alimentaire (Bravo & Cosio, 2020; Cosio et al., 2021). Cependant, les résultats indiquent que le MeHg continue de s'accumuler durant la phase de dépuration, alors que les concentrations en IHg sont stabilisées et atteignent un plateau dès J2. La modélisation toxicocinétique révèle que l'IHg est accumulé plus rapidement que le MeHg. Toutefois, bien que l'exposition au MeHg ait été 10 x moins concentrée que celle à l'IHg, le MeHg est éliminé plus lentement, indiquant une persistance plus importante dans l'organisme. Ainsi, la bioaccumulation du MeHg pourrait résulter d'un mécanisme lent mais prolongé, associé à une dépuration limitée, contrairement à ce qui est observé pour l'IHg. En effet, aucune bioamplification du MeHg n'a été observée en conditions contrôlées dans des chaînes alimentaires simplifiées (Cardoso et al. 2012 ; Gentès et al. 2015 ; Beauvais-Flück et al. 2016 ; 2017), ce qui suggère que ce phénomène, bien que souvent observé en milieu naturel, est difficile à reproduire expérimentalement malgré la présence d'une accumulation mesurable. Les expériences publiées se limitent généralement au transfert entre deux et trois niveaux trophiques, sans démontrer la bioamplification sur plusieurs maillons successifs. Il est donc essentiel de poursuivre les recherches en conditions contrôlées afin de mieux reproduire et comprendre les mécanismes complexes à l'origine de la bioamplification du MeHg, phénomène majeur mais encore difficile à élucider expérimentalement.

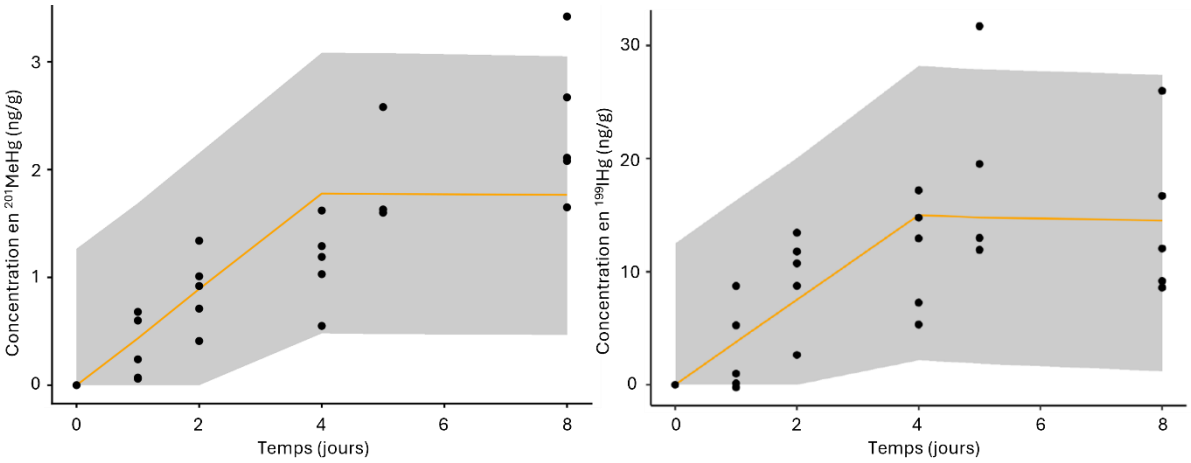

Figure 4-8. Modélisation toxicocinétique des concentrations (ng/g) en ^{199}IHg (A) et ^{201}MeHg (B) dans les tissus entiers de *D. polymorpha* exposée pendant 4 jours par l'alimentation suivi de 4 jours de dépuration (n=4 à 5).

Tableau 4-7. Paramètres médians (50%) et intervalle de crédibilité à 95% (2.5% - 97.5% quantiles) du modèle toxicocinétique ajusté aux données d'accumulation et de dépuration en utilisant l'application $MOSAIC_{bioacc}$ pour ^{201}MeHg et ^{199}IHg. ku : constante d'accumulation, ke : constante d'élimination, BMF : facteur de biomagnification, $T_{1/2}$: temps nécessaire pour que la concentration dans l'organisme diminue de 50 %.

Constantes	**MeHg**			**IHg**		
	2,5%	50%	97,5%	2,5%	50%	97,5%
ku	0,168	0,208	0,247	0,333	0,499	0,660
ke	0,00001	0,00029	0,01820	0,00001	0,00045	0,03237
BMF	11,8	714,1	17360,2	16,0	1072,4	40351,3
$T_{1/2}$ (jours)	58741	2408	38	57285	1531	21

L'exposition en conditions contrôlées a montré que *D. polymorpha* bioaccumule à la fois l'IHg et le MeHg par voie alimentaire, sans biotransformation détectable, mais avec des taux d'élimination différenciés. Les concentrations en Hg mesurées chez les dreissènes exposées dans la Seine étaient supérieures à celles mesurées en laboratoire. Il serait pertinent de reproduire en conditions contrôlées les niveaux de concentration mesurés en milieu naturel afin d'évaluer si la concentration en Hg influence la cinétique et provoque réellement de la dépuration sur ces durées d'exposition. Concernant la biotransformation, aucune déméthylation du MeHg n'a été mise en évidence en laboratoire alors que chez d'autres organismes aquatiques, des concentrations en MeHg plus élevées peuvent s'accompagner d'une déméthylation. Toutefois, à ce stade, l'absence de ce processus chez *D. polymorpha* suggère que le MeHg accumulé dans la Seine provient directement de l'alimentation. L'utilisation des isotopes stables du carbone et de l'azote permettrait de confirmer le lien trophique entre les particules récoltées par filtration et les dreissènes. Enfin, les BAF pour l'IHg et le MeHg étaient relativement constants durant les 8 jours d'expérimentation, suggérant une assimilation limitée, tandis que ceux mesurés dans la Seine étaient plus variables. Cette variabilité pourrait être liée aux fluctuations de la densité du phytoplancton (Pickhardt et al., 2005) et des particules en milieu naturel, notamment la quantité de matière organique, qui influence la biodisponibilité du Hg (Ravichandran, 2004). Cependant, en milieu naturel, il est encore techniquement difficile de séparer précisément le phytoplancton des autres particules organiques et inorganiques, complexifiant alors l'interprétation des processus de bioaccumulation.

2. Conclusion

L'étude d'organismes encagés en milieu naturel nous a permis de mettre en évidence que *D. polymorpha* peut accumuler des concentrations en IHg et MeHg de son environnement avec des modifications des mécanismes de défense, du métabolome et un stress oxydatif. Les expositions en conditions contrôlées par voie alimentaire ont montré que *D. polymorpha* bioaccumule autant IHg que MeHg avec cependant, la mise en place d'un mécanisme de dépuration pour l'IHg. Cette étude participe à combler le manque de connaissances sur la bioaccumulation du MeHg en concentrations réalistes. Elle confirme la faisabilité de l'encagement des bivalves et de l'utilisation des isotopes stables enrichis, pour étudier l'accumulation et les effets biologiques des contaminants en conditions réalistes. Approfondir la compréhension des processus de biotransformation et de transfert de l'IHg et du MeHg dans les réseaux trophiques aquatiques est fondamental pour évaluer les risques de bioaccumulation chez les prédateurs supérieurs et, par conséquent, la santé humaine, en particulier celle des populations qui consomment régulièrement du poisson issu de milieux contaminés.

3. Références

Arab, K., & Steghens, J.-P. (2004). Plasma lipid hydroperoxides measurement by an automated xylenol orange method. *Analytical Biochemistry*, *325*(1), 158-163. https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.10.022

Azimi, S., & Rocher, V. (2016). Influence of the water quality improvement on fish population in the Seine River (Paris, France) over the 1990-2013 period. *The Science of the Total Environment*, *542*(Pt A), 955-964. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.094

Baratange, C., Baali, H., Gaillet, V., Bonnard, I., Delahaut, L., Gaillard, J.-C., Grandjean, D., Sayen, S., Gallorini, A., Le Bris, N., Renault, D., Breider, F., Loizeau, J.-L., Armengaud, J., & Cosio, C. (2023). Bioaccumulation and molecular effects of carbamazepine and methylmercury co-exposure in males of *Dreissena polymorpha*. *Science of The Total Environment*, *897*, 165379. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165379

Baratange, C., Paris-Palacios, S., Bonnard, I., Delahaut, L., Grandjean, D., Wortham, L., Sayen, S., Gallorini, A., Michel, J., Renault, D., Breider, F., Loizeau, J.-L., & Cosio, C. (2022). Metabolic, cellular and defense responses to single and co-exposure to carbamazepine and methylmercury in Dreissena polymorpha. *Environmental Pollution*, *300*, 118933. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.118933

Beauvais-Flück, R., Chaumot, A., Gimbert, F., Quéau, H., Geffard, O., Slaveykova, V. I., & Cosio, C. (2016). Role of cellular compartmentalization in the trophic transfer of mercury species in a freshwater plant-crustacean food chain. *Journal of Hazardous Materials*, *320*, 401-407. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.08.055

Beauvais-Flück, R., Gimbert, F., Méhault, O., & Cosio, C. (2017). Trophic fate of inorganic and methyl-mercury in a macrophyte-chironomid food chain. *Journal of Hazardous Materials*, *338*, 140-147. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.05.028

Beers, R. F., & Sizer, I. W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, *195*(1), 133-140.

Berezina, N., Maximov, A., Sharov, A., Gubelit, Y., & Kholodkevich, S. (2023). Environmental Assessment with Cage Exposure in the Neva Estuary, Baltic Sea: Metal Bioaccumulation and Physiologic Activity of Bivalve Molluscs. *Journal of Marine Science and Engineering*, *11*(9), Article 9. https://doi.org/10.3390/jmse11091756

Bouskill, N. J., Handy, R. D., Ford, T. E., & Galloway, T. S. (2006). Differentiating copper and arsenic toxicity using biochemical biomarkers in *Asellus aquaticus* and *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *65*(3), 342-349. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.07.027

Bravo, A. G., & Cosio, C. (2020). Biotic formation of methylmercury: A bio–physico–chemical conundrum. *Limnology and Oceanography*, *65*(5), 1010-1027. https://doi.org/10.1002/lno.11366

Bravo, A. G., Cosio, C., Amouroux, D., Zopfi, J., Chevalley, P.-A., Spangenberg, J. E., Ungureanu, V.-G., & Dominik, J. (2014). Extremely elevated methyl mercury levels in water, sediment and organisms in a Romanian reservoir affected by release of mercury from a chlor-alkali plant. *Water Research*, *49*, 391-405. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.024

Campillo, J. A., Albentosa, M., Valdés, N. J., Moreno-González, R., & León, V. M. (2013). Impact assessment of agricultural inputs into a Mediterranean coastal lagoon (Mar Menor, SE Spain) on transplanted clams (*Ruditapes decussatus*) by biochemical and physiological responses. *Aquatic Toxicology*, *142-143*, 365-379. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.09.012

Campillo, J. A., Sevilla, A., Albentosa, M., Bernal, C., Lozano, A. B., Cánovas, M., & León, V. M. (2015). Metabolomic responses in caged clams, *Ruditapes decussatus*, exposed to agricultural and urban inputs in a Mediterranean coastal lagoon (Mar Menor, SE Spain). *Science of The Total Environment*, *524-525*, 136-147. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.136

Cao, C., & Wang, W.-X. (2016). Bioaccumulation and metabolomics responses in oysters *Crassostrea hongkongensis* impacted by different levels of metal pollution. *Environmental Pollution*, *216*, 156-165. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.047

Cardoso, P. G., Pereira, E., Grilo, T. F., Duarte, A. C., & Pardal, M. A. (2012). Kinetics of Mercury Bioaccumulation in the Polychaete Hediste diversicolor and in the Bivalve Scrobicularia plana, Through a Dietary Exposure Pathway. *Water, Air, & Soil Pollution*, *223*(1), 421-428. https://doi.org/10.1007/s11270-011-0870-1

Carrasco, L., Díez, S., Soto, D. X., Catalan, J., & Bayona, J. M. (2008). Assessment of mercury and methylmercury pollution with zebra mussel (Dreissena polymorpha) in the Ebro River (NE Spain) impacted by industrial hazardous dumps. *Science of The Total Environment*, *407*(1), 178-184. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.07.031

Catteau, A., Le Guernic, A., Palos Ladeiro, M., Dedourge-Geffard, O., Bonnard, M., Bonnard, I., Delahaut, L., Bado-Nilles, A., Porcher, J.-M., Lopes, C., Geffard, O., & Geffard, A. (2023). Integrative biomarker response - Threshold (IBR-T): Refinement of IBRv2 to consider the reference and threshold values of biomarkers. *Journal of Environmental Management*, *341*, 118049. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118049

Catteau, A., Porcher, J.-M., Bado-Nilles, A., Bonnard, I., Bonnard, M., Chaumot, A., David, E., Dedourge-Geffard, O., Delahaut, L., Delorme, N., François, A., Garnero, L., Lopes, C., Nott, K., Noury, P., Palluel, O., Palos-Ladeiro, M., Quéau, H., Ronkart, S., … Geffard, A. (2022). Interest of

a multispecies approach in active biomonitoring: Application in the Meuse watershed. *Science of The Total Environment*, *808*, 152148. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152148

Charles, S., Veber, P., & Delignette-Muller, M. L. (2018). MOSAIC: A web-interface for statistical analyses in ecotoxicology. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(12), 11295-11302. https://doi.org/10.1007/s11356-017-9809-4

Claisse, D., Cossa, D., Bretaudeau-Sanjuan, J., Touchard, G., & Bombled, B. (2001). Methylmercury in Molluscs Along the French Coast. *Marine Pollution Bulletin*, *42*(4), 329-332. https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00036-4

Cosio, C., Degli-Esposti, D., Almunia, C., Gaillet, V., Sartelet, H., Armengaud, J., Chaumot, A., Geffard, O., & Geffard, A. (2021). Subcellular Distribution of Dietary Methyl-Mercury in Gammarus fossarum and Its Impact on the Amphipod Proteome. *Environmental Science & Technology*, *55*(15), 10514-10523. https://doi.org/10.1021/acs.est.1c02385

Driscoll, C. T., Mason, R. P., Chan, H. M., Jacob, D. J., & Pirrone, N. (2013). Mercury as a Global Pollutant: Sources, Pathways, and Effects. *Environmental Science & Technology*, *47*(10), 4967-4983. https://doi.org/10.1021/es305071v

Faria, M., Carrasco, L., Diez, S., Riva, M. C., Bayona, J. M., & Barata, C. (2009). Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *149*(3), 281-288. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.07.012

Garaud, M., Auffan, M, Devin, S., Felten, V., Pagnout, C., Pain-Devin, S., Proux, O., Rodius, F., Sohm, B., & and Giamberini, L. (2016). Integrated assessment of ceria nanoparticle impacts on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Nanotoxicology*, *10*(7), 935-944. https://doi.org/10.3109/17435390.2016.1146363

Garcia-Calleja, J., Cossart, T., Pedrero, Z., Santos, J. P., Ouerdane, L., Tessier, E., Slaveykova, V. I., & Amouroux, D. (2021). Determination of the Intracellular Complexation of Inorganic and Methylmercury in Cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. *Environmental Science & Technology*, *55*(20), 13971-13979. https://doi.org/10.1021/acs.est.1c01732

Gentès, S., Maury-Brachet, R., Feng, C., Pedrero, Z., Tessier, E., Legeay, A., Mesmer-Dudons, N., Baudrimont, M., Maurice, L., Amouroux, D., & Gonzalez, P. (2015). Specific Effects of Dietary Methylmercury and Inorganic Mercury in Zebrafish (*Danio rerio*) Determined by Genetic, Histological, and Metallothionein Responses. *Environmental Science & Technology*, *49*(24), 14560-14569. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03586

Gentès, S., Minet, A., Lopes, C., Tessier, E., Gassie, C., Guyoneaud, R., Swarzenski, P. W., Bustamante, P., Metian, M., Amouroux, D., & Lacoue-Labarthe, T. (2023). In Vivo Mercury (De)Methylation Metabolism in Cephalopods under Different pCO2 Scenarios. *Environmental Science & Technology*, *57*(14), 5761-5770. https://doi.org/10.1021/acs.est.2c08513

Géret, F., Jouan, A., Turpin, V., Bebianno, M. J., & Cosson, R. P. (2002). Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: The oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquatic Living Resources*, *15*(1), Article 1. https://doi.org/10.1016/S0990-7440(01)01147-0

Hamzeh, M., Ouddane, B., Daye, M., & Halwani, J. (2014). Trace Metal Mobilization from Surficial Sediments of the Seine River Estuary. *Water, Air, & Soil Pollution*, *225*(3), 1878. https://doi.org/10.1007/s11270-014-1878-0

Khan, B., Ho, K. T., & Burgess, R. M. (2020). Application of Biomarker Tools Using Bivalve Models Toward the Development of Adverse Outcome Pathways for Contaminants of Emerging Concern. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *39*(8), 1472-1484. https://doi.org/10.1002/etc.4757

Klein, G., Mathé, C., Biola-Clier, M., Devineau, S., Drouineau, E., Hatem, E., Marichal, L., Alonso, B., Gaillard, J.-C., Lagniel, G., Armengaud, J., Carrière, M., Chédin, S., Boulard, Y., Pin, S., Renault, J.-P., Aude, J.-C., & Labarre, J. (2016). RNA-binding proteins are a major target of silica nanoparticles in cell extracts. *Nanotoxicology*, *10*(10), 1555-1564. https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1244299

Ladeiro, M. P., Barjhoux, I., Bigot-Clivot, A., Bonnard, M., David, E., Dedourge-Geffard, O., Geba, E., Lance, E., Lepretre, M., Magniez, G., Rioult, D., Aubert, D., Villena, I., Daniele, G., Salvador, A., Vulliet, E., Armengaud, J., Geffard, A., Ladeiro, M. P., … Geffard, A. (2017). Mussel as a Tool to Define Continental Watershed Quality. In *Organismal and Molecular Malacology*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/67995

Larras, F., Regier, N., Planchon, S., Poté, J., Renaut, J., & Cosio, C. (2013). Physiological and proteomic changes suggest an important role of cell walls in the high tolerance to metals of *Elodea nuttallii*. *Journal of Hazardous Materials*, *263*, 575-583. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.10.016

Le Gall, M., Ayrault, S., Evrard, O., Laceby, J. P., Gateuille, D., Lefèvre, I., Mouchel, J.-M., & Meybeck, M. (2018). Investigating the metal contamination of sediment transported by the 2016 Seine River flood (Paris, France). *Environmental Pollution*, *240*, 125-139. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.082

Manduzio, H., Rocher, B., Durand, F., Galap, C., & Leboulenger, F. (2005). The point about oxidative stress in molluscs. *Invertebrate Survival Journal*, *2*(2), Article 2.

Mason, R. P., Reinfelder, J. R., & Morel, F. M. M. (1996). Uptake, Toxicity, and Trophic Transfer of Mercury in a Coastal Diatom. *Environmental Science & Technology*, *30*(6), 1835-1845. https://doi.org/10.1021/es950373d

Minier, C., Abarnou, A., Jaouen-Madoulet, A., Le Guellec, A., Tutundjian, R., Bocquené, G., & Leboulenger, F. (2006). A pollution-monitoring pilot study involving contaminant and biomarker measurements in the Seine Estuary, France, using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, *25*(1), 112-119. https://doi.org/10.1897/05-161R.1

Monperrus, M., Rodriguez Gonzalez, P., Amouroux, D., Garcia Alonso, J. I., & Donard, O. F. X. (2008). Evaluating the potential and limitations of double-spiking species-specific isotope dilution analysis for the accurate quantification of mercury species in different environmental matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *390*(2), 655-666. https://doi.org/10.1007/s00216-007-1598-z

Neufeld, D. S. G. (2010). Mercury accumulation in caged Corbicula: Rate of uptake and seasonal variation. *Environmental Monitoring and Assessment*, *168*(1), 385-396. https://doi.org/10.1007/s10661-009-1121-4

Noppe K (1996) Contamination métallique des sédiments des cours d'eau d'Artois-Picardie et son impact sur la contamination des chairs et des foies des poissons. Mémoire DEA Hydrologie, Univ. Paris 6, 39 pp.

Oliveira, P., Barboza, L. G. A., Branco, V., Figueiredo, N., Carvalho, C., & Guilhermino, L. (2018). Effects of microplastics and mercury in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774): Filtration rate, biochemical biomarkers and mercury bioconcentration. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *164*, 155-163. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.062

Osman, A. M., Heuvel, H. van den, & Noort, P. C. M. van. (2007). Differential responses of biomarkers in tissues of a freshwater mussel, Dreissena polymorpha, to the exposure of sediment extracts with different levels of contamination. *Journal of Applied Toxicology*, *27*(1), 51-59. https://doi.org/10.1002/jat.1183

Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A., & Caparrini, A. (1986). A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry*, *154*(2), 536-541. https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90026-6

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

Pickhardt, P. C., Folt, C. L., Chen, C. Y., Klaue, B., & Blum, J. D. (2002). Algal Blooms Reduce the Uptake of Toxic Methylmercury in Freshwater Food Webs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(7), 4419-4423.

Pickhardt, P. C., Folt, C. L., Chen, C. Y., Klaue, B., & Blum, J. D. (2005). Impacts of zooplankton composition and algal enrichment on the accumulation of mercury in an experimental freshwater food web. *Science of The Total Environment*, *339*(1), 89-101. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.07.025

Ravichandran, M. (2004). Interactions between mercury and dissolved organic matter—a review. *Chemosphere*, *55*(3), 319-331. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.11.011

Regier, N., Larras, F., Bravo, A. G., Ungureanu, V.-G., Amouroux, D., & Cosio, C. (2013). Mercury bioaccumulation in the aquatic plant *Elodea nuttallii* in the field and in microcosm: Accumulation in shoots from the water might involve copper transporters. *Chemosphere*, *90*(2), 595-602. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.08.043

Rodriguez-Gonzalez, P., Bouchet, S., Monperrus, M., Tessier, E., & Amouroux, D. (2013). In situ experiments for element species-specific environmental reactivity of tin and mercury compounds using isotopic tracers and multiple linear regression. *Environmental Science and Pollution Research*, *20*(3), 1269-1280. https://doi.org/10.1007/s11356-012-1019-5

Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., & Cao, K.-A. L. (2017). mixOmics : An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLOS Computational Biology*, *13*(11), e1005752. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005752

Santos, J. P., Garcia-Calleja, J., Tessier, E., Le Faucheur, S., Pedrero, Z., Amouroux, D., & Slaveykova, V. I. (2025). Transformations of aquatic mercury species by the diatom *Cyclotella meneghiniana*. *Environmental Pollution*, *374*, 126248. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2025.126248

Seguin, C., Marant, A., Palacios-Paris, S., Bonnard, I., Loizeau, J.-L., David, E., Rioult, D., & Cosio, C. (2025). Unveiling the hidden threat: Molecular, cellular and behavioral effects of dietborne inorganic mercury and methylmercury in *Dreissena polymorpha*. *Chemosphere*, *376*, 144306. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2025.144306

Serdar, O., Yildirim, N., & Yildirim, N. C. (2023). Single and combined effects of dimethoate and malathion on oxidative stress biomarkers in the non-target freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, *52*(3), 333-342. https://doi.org/10.26881/oahs-2023.3.07

Thévenot, D. R., Meybeck, M., & Lestel, L. (2002). *Métaux lourds : Des bilans en mutation | Piren-Seine*. https://piren-seine.fr/rapports/les_archives/metaux_lourds_des_bilans_en_mutation

Thiébaut, G., Tarayre, M., Jambon, O., Le Bris, N., Colinet, H., & Renault, D. (2021). Variation of thermal plasticity for functional traits between populations of an invasive aquatic plant from two climatic regions. *Hydrobiologia*, *848*(9), 2077-2091. https://doi.org/10.1007/s10750-020-04452-2

UNEP. (2019). *Global Mercury Assessment 2018*. United Nation Environment Programme, Chemicals and Health Branch Geneva, Switzerland.

Vasile, G. G., Gheorghe, S., Ene, C., Serban, E. A., & Stoica, C. (2019). Total mercury in fish and benthic invertebrates collected from Olt river, Romania. *Revista de Chimie*, *70*(1), 263-268. Scopus. https://doi.org/10.37358/rc.19.1.6896

Yildirim, N. C., Serdar, O., & Ketenalp, Z. (2024). Evaluation of the effect of temperature on the toxicity of lambda-cyhalothrin in *Dreissena polymorpha* USING SOME BIOCHEMICAL BIOMARKERS. *Slovenian Veterinary Research*, *61*(2), Article 2. https://doi.org/10.26873/SVR-1714-2023

4. Annexes

Figure S 4-1. Coefficients de corrélation par la méthode Pearson des concentrations en IHg et MeHg dissout (IHg_d et $MeHg_d$), particulaire (IHg_p et $MeHg_p$) et dans les tissus des dreissènes ($IHg_{_moules}$ et $MeHg_{_moules}$) (* = p-value < 0,05.



Figure S 4-2. Concentration des métabolites (nmoles/mg dw, moyenne ± SD) dans les tissus mous entiers de *D. polymorpha* non exposée (T0) et exposée 3 semaines dans la Seine (T3). Les différences significatives sont indiquées en gras ($p < 0,05$; $n = 4$ à 5).

	T0	**T3**
Lactic acid	1,51 ±0,74	0,31 ±0,36
Alanine	5,25 ±1,72	2,33 ±1,06
Valine	1,25 ±0,43	0,23 ±0,08
Ethanolamine	0,97 ±0,32	0,24 ±0,05
Glycerol	4,98 ±2,52	2,44 ±0,56
Phosphoric acid	3,22 ±1,29	2,86 ±0,23
Isoleucine	1,00 ±0,38	0,22 ±0,10
Proline	1,23 ±0,49	0,24 ±0,10
Glycine	2,77 ±0,90	0,67 ±0,18
Succinic acid	3,21 ±1,34	2,50 ±3,02
Glyceric acid	0,49 ±0,21	0,25 ±0,07
Fumaric acid	0,62 ±0,29	0,29 ±0,10
Serine	1,95 ±0,75	0,57 ±0,08
Pipecolic acid	0,86 ±0,33	0,37 ±0,18
Threonine	1,75 ±0,56	0,53 ±0,12
Malic acid	1,14 ±0,41	0,42 ±0,12
Methionine	1,09 ±0,33	0,55 ±0,32
Aspartic acid	0,65 ±0,19	0,42 ±0,08
Gamma amino acid	0,67 ±0,15	0,56 ±0,22
Cytosine	0,71 ±0,36	0,35 ±0,13
Glutamic acid	1,76 ±0,82	3,14 ±1,40
Phenylalanine	2,09 ±0,99	0,47 ±0,13
Ornithine	0,82 ±0,39	0,66 ±0,32
Fructose1	0,56 ±0,28	0,28 ±0,10
Mannose1	0,84 ±0,45	0,38 ±0,04
Galactose1	15,42 ±6,03	0,72 ±0,44
Glucose1	40,26 ±12,84	3,43 ±1,23
Lysine	1,42 ±0,61	0,77 ±0,53
Octopamine	0,27 ±0,14	0,13 ±0,05
Dopamine	0,36 ±0,18	0,18 ±0,07
Inositol	0,43 ±0,10	0,84 ±0,64
Fructose-6P	0,03 ±0,04	0,10 ±0,15
Glucose-6P1	0,61 ±0,23	0,36 ±0,20
Glucose-6P2	0,42 ±0,16	0,23 ±0,15

Partie 2 : Influence des rejets urbains et industriels

Cette partie examine l'impact des rejets urbains et industriels sur la bioaccumulation du Hg chez *D. polymorpha*. Les objectifs spécifiques sont de comparer les concentrations de Hg dans les dreissènes exposées dans la Seine et la Deûle, deux rivières avec des niveaux et des sources de contamination contrastés, afin d'évaluer les réponses biologiques des dreissènes à ces expositions. Les paramètres physico-chimiques des cours d'eau et les isotopes stables du carbone et de l'azote sont également analysés pour comprendre les relations trophiques et les sources de contamination.

Cette partie du chapitre est en collaboration avec : Mariia Petrova[1], Evan Bossard[1], Isabelle Bonnard[1], Laurence Delahaut[1], Nathalie Le Bris[2], Olivier Grosso[3], David Renault[2] et Lars-Eric Heimbürger-Boavida[4]

[1] UMR-I 02 SEBIO, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France ;
[2] UMR CNRS 6553 EcoBio, Université de Rennes, Rennes, France ;
[3] CNRS, UM 110, Aix Marseille Université, Université de Toulon, Mediterranean Institute of Oceanography (MIO), Marseille, France
[4]CNRS/INSU, Aix Marseille Université, Université de Toulon, Mediterranean Institute of Oceanography (MIO), Marseille, France

1. Résultats et discussion

1.1. Paramètres physico-chimiques des cours d'eau

Les paramètres physico-chimiques sont stables pendant la période d'encagement pour chaque site. Les concentrations en chlorophylle *a* et en matières en suspension (MES) dans la Deûle sont 5 x et 3 x supérieures à celles mesurées dans la Seine (Tableau 4-8). Avec un débit 20 x plus élevé dans la Seine que dans la Deûle, ces différences indiquent une concentration particulaire plus importante dans la Deûle. Les concentrations en phytoplancton dans la Deûle sont 4 et 11 x supérieures à celles dans la Seine à T0 et T3 respectivement. Concernant la répartition du pico- et nanophytoplancton, la Seine contient 34 % de pico- et 66% de nanophytoplancton contre 70% de pico- et 30% de nanophytoplancton dans la Deûle (Figure S 4-3). Dans la Seine, THg_d diminue de 1,4, 1,8 et 2,2 x à T1, T2 et T3 respectivement et 1,2 et 2,6 x à T2 et T3 dans la Deûle. Quant au $\%MeHg_d$, celui-ci reste stable au cours du temps pour chaque rivière. THg_p dans la Deûle est 12 à 3 x supérieur que dans la Seine alors que les $\%MeHg_p$ sont 4.5, 28, 22 et 5.5 x supérieurs à T0, T1, T2 et T3 dans la Seine par rapport à la Deûle.

Tableau 4-8. Paramètres physico-chimiques, concentrations en THg et %MeHg dans l'eau et les particules de la Seine et de la Deûle sur la période d'encagement (5 au 26 juillet 2023). X : pas de donnée.

Paramètres	**Seine**				**Deûle**			
	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3
pH	8,2	8,0	8,1	8,0	8,3	8,0	8,0	8,2
Température (°C)	23,3	25,0	24,1	22,7	21,0	22,5	22,5	22,0
Conductivité (mS/m)	580	547	564	549	NA	360	368	363
O_2 (mg/L)	6,5	6,8	7,3	7,7	9,6	10,7	8,0	7,3
COD (mg/L)	2,8	3,1	3,1	2,8	2,5 ± 0,3			
COT (mg/L)	3,2	3,2	3,1	2,8	X			
PO_4 (mg/L)	0,6	0,7	0,5	0,5	0,2			
Chlorophylle a (µg/L)	2	2	2	2	10			
MES (mg/L)	5	4	4	4	13 ± 1,4*			
Débit (m^3/s)	97,2	90,8	82,9	96,3	6,0	5,5	4,4	5,7
Phytoplancton (cellules/mL)	$4.1x10^5$	$8.1x10^5$	$1.4x10^6$	$3.3x10^5$	$1.5x10^6$	$1.4x10^6$	$9.3x10^5$	$3.5x10^6$
THg_d (ng/L)	9,6	6,9	3,7	1,7	X	5,8	4,9	1,9
$MeHg_d$ (%)	1,3	1,7	2,4	5,0	X	2,0	2,2	5,6
THg_p (µg/g)	1,0	0,9	1,1	0,9	11,8	3,6	4,1	3,3
$MeHg_p$ (%)	0,9	5,6	2,2	1,1	0,2	0,2	0,1	0,2
THg sédiments (µg/g)	0,51	0,59	0,38	0,96	X	X	X	X

Les concentrations mesurées dans cette étude dans la Seine sont comparables avec une étude menée dans la rivière Haihe (Tianjin, Chine), la seconde plus grande ville industrielle et commerciale du nord de la Chine : 3,6 à 12,8 ng/L dont 3% de MeHg en moyenne (Tong et al., 2013). Elles sont également comparables avec la concentration moyenne en THg_d de 5 ng/L reportée dans la rivière Main, qui traverse la ville de Francfort-sur-le-Main (Allemagne) influencée par une densité de population et une activité industrielle importante (Fricke et al., 2015). Pour les concentrations en Hg dans les particules, peu de données sont disponibles. Les concentrations de THg dans les particules de la Seine à Poses (à 80 km en aval de Paris) étaient de 1,2 µg/g de 1990 à 1992 (Idlafkih et al., 1995) et 1,1 µg/g dans l'estuaire de la Seine entre 1991 et 1993

(Coquery et al., 1997). Ces concentrations sont comparables à celles mesurées dans cette étude (0,9 et 1,1 µg/g), suggérant une persistance des niveaux de contamination particulaire au cours du temps.

Les concentrations en THg_d mesurées dans la Deûle dans notre étude sont globalement inférieures à celle mesurée en mars 2010 (20,8 ng/L ; Daye et al., 2015). (Fricke et al., 2015) ont reporté des concentrations maximales en THg dans la rivière Main (Francfort-sur-le-Main, Allemagne) de 26,62 ng/L attribuée à l'influence d'un grand parc industriel, où une usine d'électrolyse de chlore alcalin fonctionnait encore au moment de l'échantillonnage, montrant ainsi les émissions d'une usine en fonctionnement sur le milieu aquatique. A titre de comparaison, une étude menée sur le réservoir de Babeni dans la rivière Olt (Roumanie), près de la plus grande usine de production de chlore-alcalin en Europe centrale et orientale, a mesuré des concentrations en THg_d de 5,8 ± 2,5 ng/L et un $\%MeHg_d$ de 5,67 ± 3,25 % (Bravo et al., 2014a), dans le même ordre de grandeur que notre étude. Les concentrations en THg_p de notre étude sont comparables à celles mesurées en 2009 et 2010 (6,2 ±0,6 µg/g, Diviš et al., 2016 ; 3,8 ±0,3 µg/g, Daye et al., 2015) suggérant une persistance de la contamination au Hg dans l'eau et les particules plus d'une décennie après.

Les deux sites, Seine et Deûle, montrent des concentrations dans la fourchette haute des données disponibles dans la littérature, en cohérence avec un site très urbanisé et un ancien site industriel. Cependant, les concentrations en THg_d dans l'eau de la Seine et de la Deûle sont inférieures à la NQE, d'une concentration maximale admissible de 70 ng/L pour le Hg dissous dans l'eau douce de la directive-cadre européenne sur l'eau (DCE, directive 2008/105/CE).

1.2. Isotopes stables du carbone (^{13}C) et de l'azote (^{15}N)

Les valeurs des isotopes stables du carbone ($\delta^{13}C$) et de l'azote ($\delta^{15}N$) chez *D. polymorpha* et le seston collecté sur filtres ont été mesurées pour chaque cours d'eau afin de vérifier les relations trophiques entre les deux compartiments (Figure 4-9). Un décalage du $\delta^{13}C$ est observé entre T0 et T3, cohérent avec un changement d'environnement et donc de régime alimentaire. Toutefois, les différences de signatures isotopiques entre les dreissènes et le seston indiquent que *Dreissena* ne se nourrit pas exclusivement du seston prélevé, ou que celui-ci ne reflète pas fidèlement l'ensemble des ressources réellement exploitées. En effet, *D. polymorpha* est capable de trier les particules alimentaires, ce qui signifie qu'elle pourrait ne consommer qu'une partie du seston présent sur les filtres (Schneider et al., 1998). Il est bien établi que les bivalves sélectionnent leur nourriture (Rosa et al., 2018), en particulier *D. polymorpha*, dont la sélection des particules est notamment basée sur la taille et la nature chimique des particules. Cette capacité lui permet de privilégier les particules riches en matière organique telles que les algues phytoplanctoniques, tout en rejetant les particules inorganiques sous forme de pseudofèces. Une étude menée dans le lac Trasimeno (Italie) a montré que *D. polymorpha* se nourrit préférentiellement de phytoplancton plutôt que de matière organique d'origine sédimentaire (Ludovisi et al., 2022). Cependant, d'autres travaux ont mis en évidence sa capacité à absorber directement du carbone organique dissous (DOC), pouvant couvrir jusqu'à 50% de ses besoins en carbone (Roditi et al., 2000). Cette diversité trophique peut induire une signature isotopique différente de celle du seston, dans la mesure où une partie du carbone assimilé provient de sources non représentées dans les échantillons collectés.

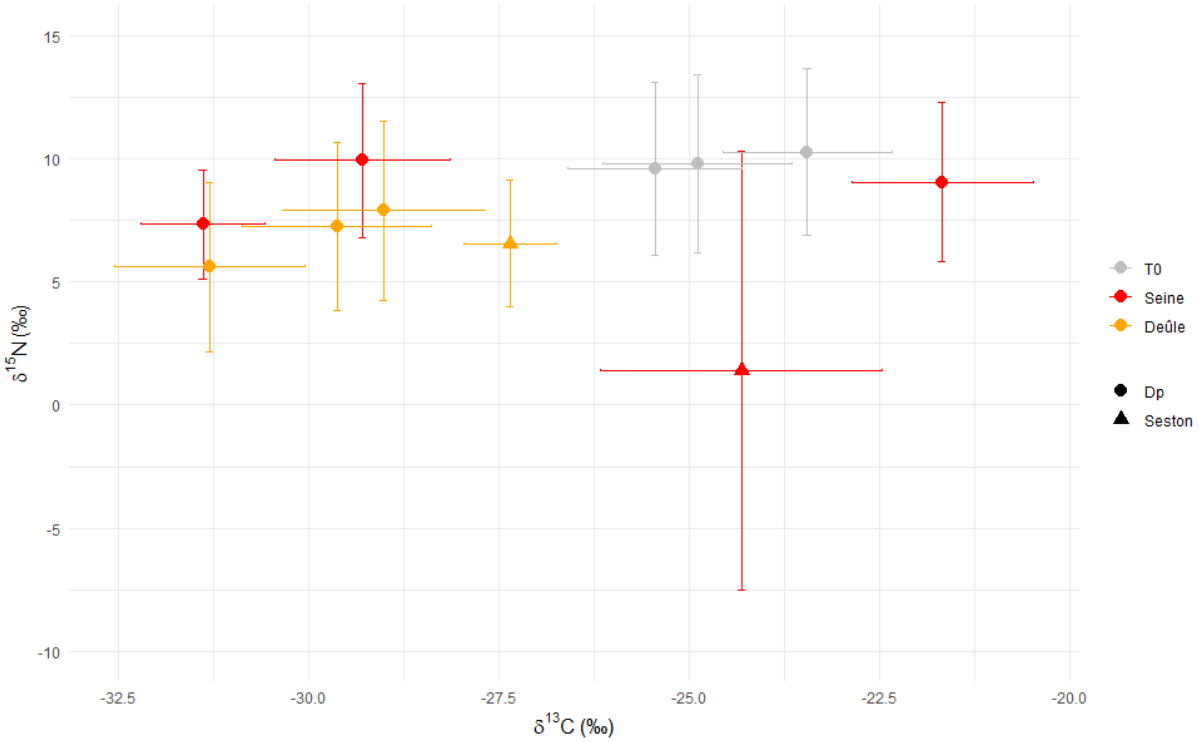

Figure 4-9. Valeurs moyennes de $\delta^{15}N$ et $\delta^{13}C$ (‰) de *D. polymorpha* (n = 3) et du seston filtré (n = 1) en juillet 2023.

1.3. Bioaccumulation chez *D. polymorpha*

Les concentrations en MeHg chez *D. polymorpha* augmentent de façon non significative à T3 comparé à T1 dans la Seine tandis que dans la Deûle, celles-ci augmentent significativement à T2 comparé à T1 (Figure 4-10). Ces concentrations ne sont cependant pas statistiquement différentes entre les deux cours d'eau, ce qui est cohérent avec les BAF (Tableau 4-9). Dans la Seine, les concentrations en THg diminuent à T3 comparé à T1 et T2, les BAF également. Cependant, celles-ci sont 1,8, 2,6 et 1,6 x inférieures à celles des moules exposées dans la Deûle à T1, T2 et T3, ce qui ne se reflète pas dans les BAF, puisque ceux-ci sont, à l'inverse, 18, 27 et 2 x supérieurs à ceux observés dans la Deûle.

Globalement, dans la Seine, la bioaccumulation en THg diminue au cours du temps, tandis que la bioaccumulation du MeHg à tendance à augmenter à T3 par rapport à T1. En revanche, les BAF THg et MeHg diminuent au cours du temps. Comme dans la partie précédente, ces résultats suggèrent une dépuration du THg pendant l'encagement. Concernant les encagements de dreissènes réalisés dans la Deûle, on observe une dynamique différente de la Seine. En effet, ils révèlent une augmentation de la bioaccumulation de THg et MeHg chez les dreissènes à T2 comparé à T1 et à T3. Les analyses des paramètres physico-chimiques réalisées ainsi que les mesures de THg dissout et particulaire ne nous permettent pas d'expliquer cette augmentation de la bioaccumulation à T2. La navigation est fréquente sur cette rivière et pourrait causer la remise en suspension de sédiments. Des analyses de corrélation examinant les relations entre les concentrations en Hg mesurées dans l'eau et les particules et la bioaccumulation mesurées dans les tissus des dreissènes (Figure S4-4) ne montrent aucun lien statistiquement significatif pour la Deûle. Cependant, pour la Seine, une corrélation négative entre THg_d et bioaccumulation du MeHg est observée, suggérant qu'une augmentation du THg_d s'accompagne d'une diminution

du MeHg biodisponible. Chez la palourde asiatique *C. fluminea* exposée *in situ* dans des sites contaminés, la bioaccumulation du THg était principalement liée aux phases dissoutes de Hg dans la colonne d'eau, issues soit de la diffusion à partir des sédiments soit d'apports externes, soulignant que ces phases dissoutes constituent une voie importante d'exposition, plus que le THg présent dans les sédiments (Kim et al., 2024). D'autres facteurs pourraient influencer la bioaccumulation du Hg chez *D. polymorpha*. Un facteur intéressant à intégrer dans nos prochaines analyses serait le comportement valvaire de *D. polymorpha*. En effet, ce comportement influe directement sur l'exposition de l'organisme aux contaminants et à la disponibilité des ressources alimentaires, et il peut moduler la bioaccumulation en limitant ou facilitant la filtration de l'eau.

Dû à son héritage industriel, la contamination des sédiments de la Deûle au THg (Daye et al., 2015; Diviš et al., 2016; Kadlecová et al., 2012) est aujourd'hui reconnue. Nous avons donc émis l'hypothèse que la Deûle entraînerait une bioaccumulation plus élevée de THg et de MeHg dans les tissus de *D. polymorpha* que la Seine. Les concentrations en THg dans les dreissènes sont légèrement supérieures dans la Deûle par rapport à la Seine tandis que les BAF sont plus élevés dans la Seine que dans la Deûle. Cela peut s'expliquer par la concentration en THg_p environ 6 x supérieure dans la Deûle par rapport à la Seine. A titre de comparaison, des concentrations de 0,03 µg THg/g (d.w.) ont été mesurées dans des poissons en provenance de la Deûle entre 1994 et 1995 (Noppe et al., 1996), excédant la NQE_{biote} de 0,02 µg/g (d.w.). Les concentrations en THg dans les dreissènes mesurées dans cette étude et rapportées en masse humide excèdent également la NQE_{biote} pour la Deûle (0,015 à 0,028 µg/g) mais pas pour la Seine (0,010 à 0,014 µg/g). Des publications d'étude de contamination au Hg dans la chaire de poissons de la Seine ont montré des concentrations allant de 0,02 à 0,04 µg THg/g (Azimi & Rocher, 2016). Sur les deux sites, bien que la NQE pour le Hg dans l'eau soit respectée, celle relative au biote est dépassée dans les poissons, soulignant un risque potentiel de bioaccumulation malgré des concentrations dissoutes conformes. L'encagement de *D. polymorpha* permet d'évaluer, en quelques semaines seulement, la bioaccumulation de l'IHg et du MeHg dans les tissus. Cette approche constitue donc un outil de biosurveillance précoce intéressant.

Concernant le MeHg, les BAF sont similaires entre les deux cours d'eau, avec toutefois, un $\%MeHg_p$ plus élevé dans la Seine que dans la Deûle, ce qui pourrait refléter des conditions environnementales plus propices à la méthylation du Hg dans la Seine. En particulier, la présence de plusieurs stations d'épuration dans la région parisienne pourrait créer des conditions favorables à la méthylation du Hg, comme le suggèrent les travaux de Bravo et al. (2014). Dans la Deûle, une étude sur les sédiments a pourtant montré qu'environ 30 % du THg_d présent dans l'eau interstitielle se trouvait sous forme labile, potentiellement disponible pour le biote et que le THg_p des sédiments était transformé en MeHg par des bactéries, principalement dans la couche superficielle (0 à 2 cm) (Diviš et al., 2016), susceptible d'être remise en suspension. Or, comme le débit de la Deûle est relativement faible, cette remise en suspension, et donc la mobilisation du MeHg vers la colonne d'eau, pourrait être limitée, réduisant ainsi la biodisponibilité du MeHg pour les moules exposées dans la Deûle, par rapport à la Seine, dont le débit est en moyenne 17 x plus élevé. Cependant, la Deûle est concernée par une importante navigation qui peut mener à une dispersion de la pollution au Hg par la remise en suspension et l'érosion des sédiments du fond des rivières, ce qui n'est pas le cas du site d'étude de la Seine. La suspension de sédiments contaminés peut entraîner leur oxydation et la mobilisation des métaux traces séquestrés

contenus dans diverses phases solides (Hamzeh et al., 2014). Par ailleurs, des concentrations élevées de matière organique dissoute (COD) peuvent réduire la biodisponibilité de IHg et de MeHg pour le phytoplancton d'eau douce, la bioconcentration du Hg par les algues étant inhibée lorsque les concentrations de COD dépassent environ 5 mg/L (Gorski et al., 2008). Or, dans notre étude, les concentrations en COD sont faibles à la fois pour la Seine et pour la Deûle (~ 2 mg/L) mais sont 10^5 x plus concentrées que les concentrations de THg_d, pouvant ainsi limiter la bioconcentration. D'après une étude menée sur la rivière Haihe (Tianjin, Chine), une corrélation positive a été établie entre $MeHg_d$ et les concentrations en MeHg dans les tiges de la plante aquatique *Myriophyllum spicatum L.*, illustrant le rôle majeur de la fraction dissoute (Tong et al., 2013). De plus, dans certains systèmes à faible COD, la dominance d'espèces inorganiques qui ne sont pas facilement transportées dans les cellules algales peut d'autant plus limiter la bioconcentration (Gorski et al., 2008).

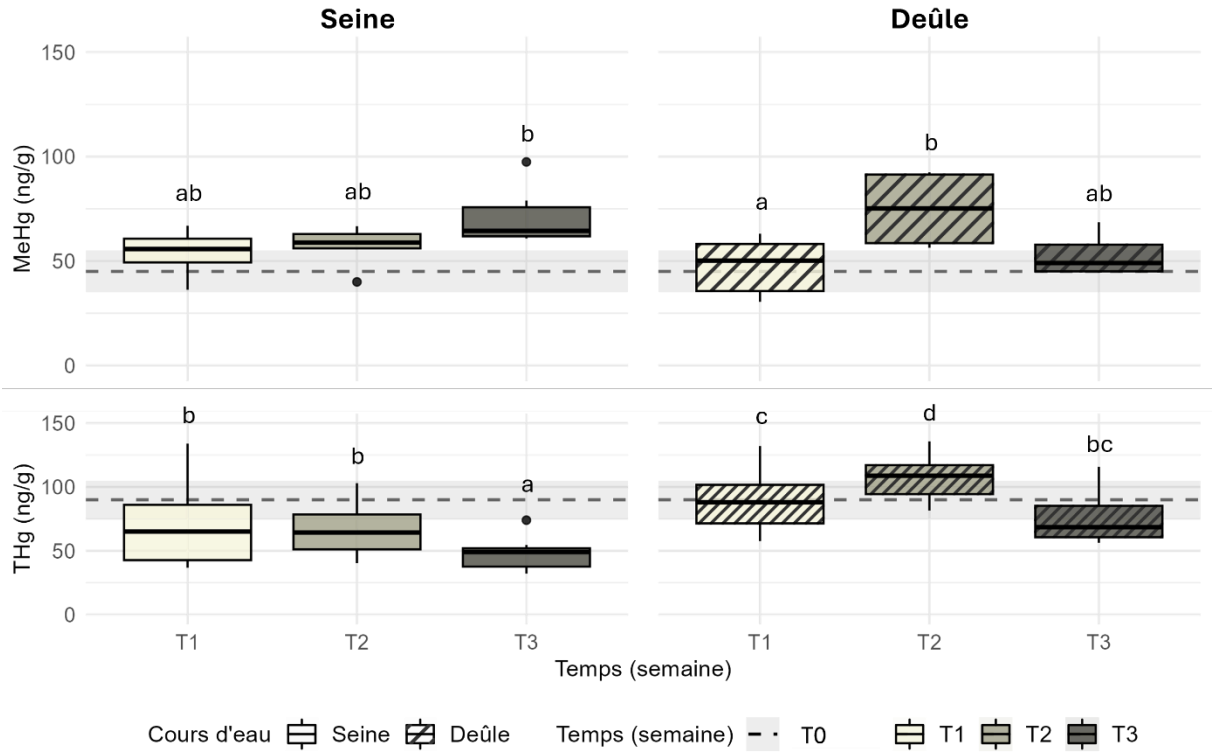

Figure 4-10. Concentrations en THg et MeHg (ng/g) dans les tissus entiers de *D. polymorpha* exposées 1 à 3 semaines dans la Seine et la Deûle (n = 14 à 20 pour THg et n = 5 pour MeHg). La ligne grise représente les concentrations pour les individus T0 (moyenne ± SD).

Tableau 4-9. Facteurs de bioaccumulation (BAF, moyenne ± SD) chez *D. polymorpha* exposées 1 à 3 semaines dans la Seine et la Deûle (n = 14 à 20 pour THg et n = 5 pour MeHg).

	Seine	**Deûle**	**Seine**	**Deûle**
Temps	THg		MeHg	
T1	172 ± 68	11 ± 3	2756 ± 559	2583 ± 767
T2	109 ± 28	4 ± 1	4199 ± 690	2333 ± 772
T3	16 ± 4	1 ± 0	1531 ± 311	2490 ± 463

1.4. Réponses enzymatiques et de défense chez *D. polymorpha*

Dans les branchies des moules exposées dans la Deûle, l'activité enzymatique des CAT à T1 est 2 x supérieure qu'à T2 et T3, suggérant une réponse au changement de milieu (Figure 4-11). Le niveau basal est retrouvé après 2 et 3 semaines d'encagement suggérant une adaptation au stress du milieu. Dans la glande digestive, l'activité enzymatique des CAT dans la Deûle est 2 x supérieure à celle de la Seine à T1. Dans les branchies des moules exposées dans la Deûle, la concentration en LOOH est 1,7 x supérieure à T2 comparé à T1, pouvant suggérer un dommage oxydatif survenu après un dépassement des défenses antioxydantes. Celle-ci est également 1,8 x supérieure dans les restes des moules exposées dans la Deûle à T3 comparé à T1. Dans la Seine, les réponses enzymatiques et de défense chez *D. polymorpha* n'ont pas montré de différences significatives. Globalement, les niveaux de LOOH sont plus élevés dans la Deûle que dans la Seine avec des différences significatives dans les branchies et les restes, suggérant un niveau de stress basal supérieur dans la Deûle. Comme observé précédemment, les niveaux basaux d'activité des CAT et GST sont supérieurs dans la glande digestive par rapport aux branchies, constat également fait chez *Scrobicularia plana* collectées dans le bassin de Laranjo, zone la plus contaminée par le Hg dans la Ria de Aveiro (Portugal) qui a reçu des rejets d'usines de chlore-alcali en continu pendant cinq décennies (Ahmad et al., 2011).

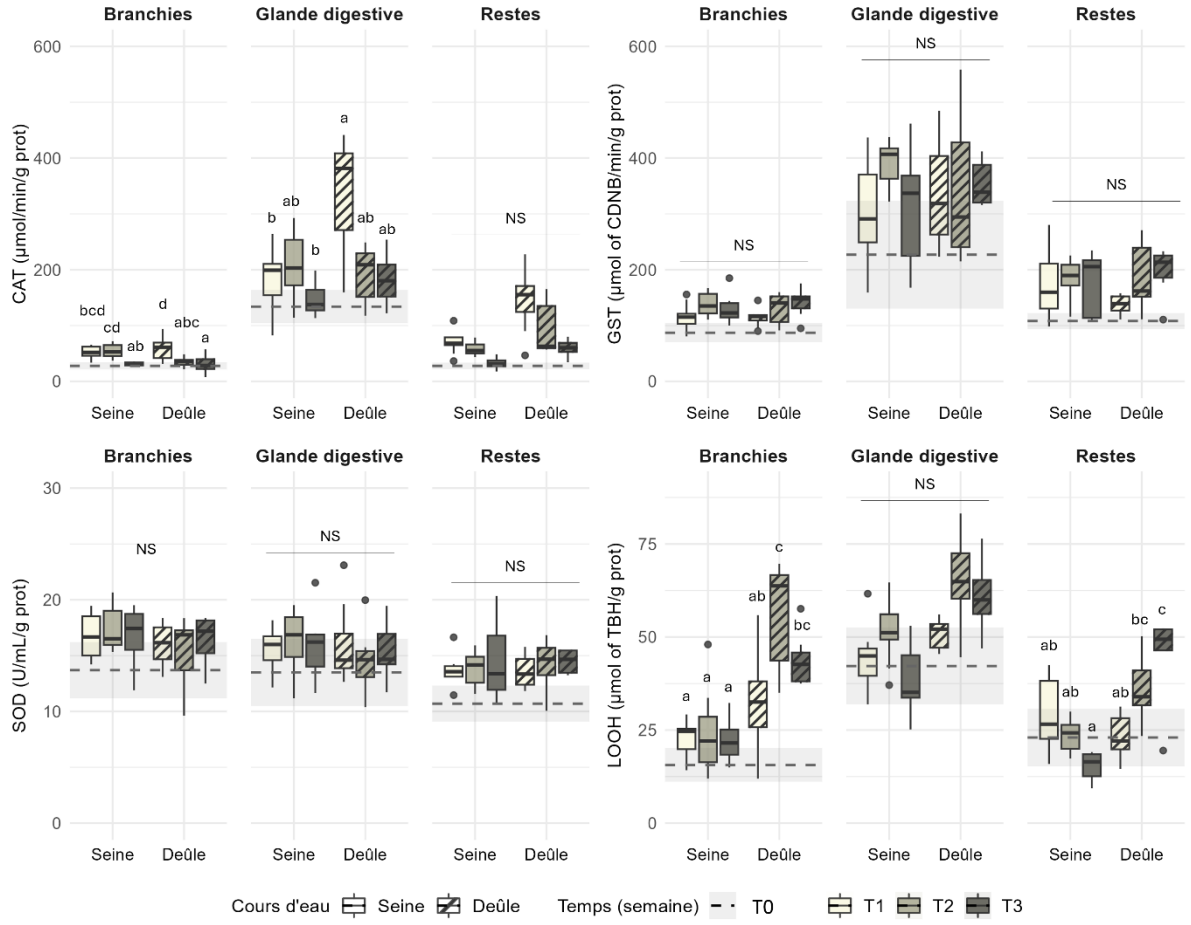

Figure 4-11. Activités enzymatiques des CAT, GST, SOD et péroxydation des lipides (LOOH) dans les tissus de *D. polymorpha* exposées 3 semaines dans la Seine ou dans la Deûle ($p<0,05$ vs contrôle, n = 6 à 10). La ligne grise représente les activités enzymatiques et la péroxydation lipidique des individus contrôle (moyenne ± SD).

1.5. Niveau relatif des gènes du système antioxydant chez *D. polymorpha*

Dans les branchies des dreissènes exposées dans la Seine, le gène *gst* est 3,3 x sous-exprimé à T3 qu'à T1 (Figure 4-12). Les encagements dans la Seine et la Deûle n'ont pas d'effet significatif sur les niveaux d'expression des autres gènes étudiés. En effet, ces niveaux sont globalement situés dans l'intervalle des individus contrôle (T0) et montrent une grande variabilité entre le temps, les sites mais aussi les tissus étudiés. Cette variabilité entre les individus et les sites a déjà été rapportée par Kerambrun et al. (2016), lors d'une étude menée au printemps et en automne sur des dreissènes collectées dans 4 rivières françaises (Meuse, Moselle, Oise and Vilaine). L'expression des gènes *sod* et *cat* variait selon les sites tandis qu'aucune modulation de *gst* n'a été observée par rapport au site contrôle. De plus, la variabilité des niveaux d'expression de gènes du système antioxydant et de défense (*gst*, *cat*, *sod* et *mt*) entre les branchies et la glande digestive a également été mise en évidence lors d'encagements de *D. polymorpha* pendant 1 à 2 mois sur plusieurs sites de la Seine (Châtel et al., 2015). Ces résultats témoignent d'une forte variabilité des niveaux d'expression des gènes étudiés, difficile à relier exclusivement aux sites d'exposition. Ce type de réponse transcriptionnelle reflète plutôt un niveau de stress global de l'organisme, qui semble ici relativement faible, en cohérence avec l'absence d'induction marquée des gènes de défense oxydative et de détoxication.

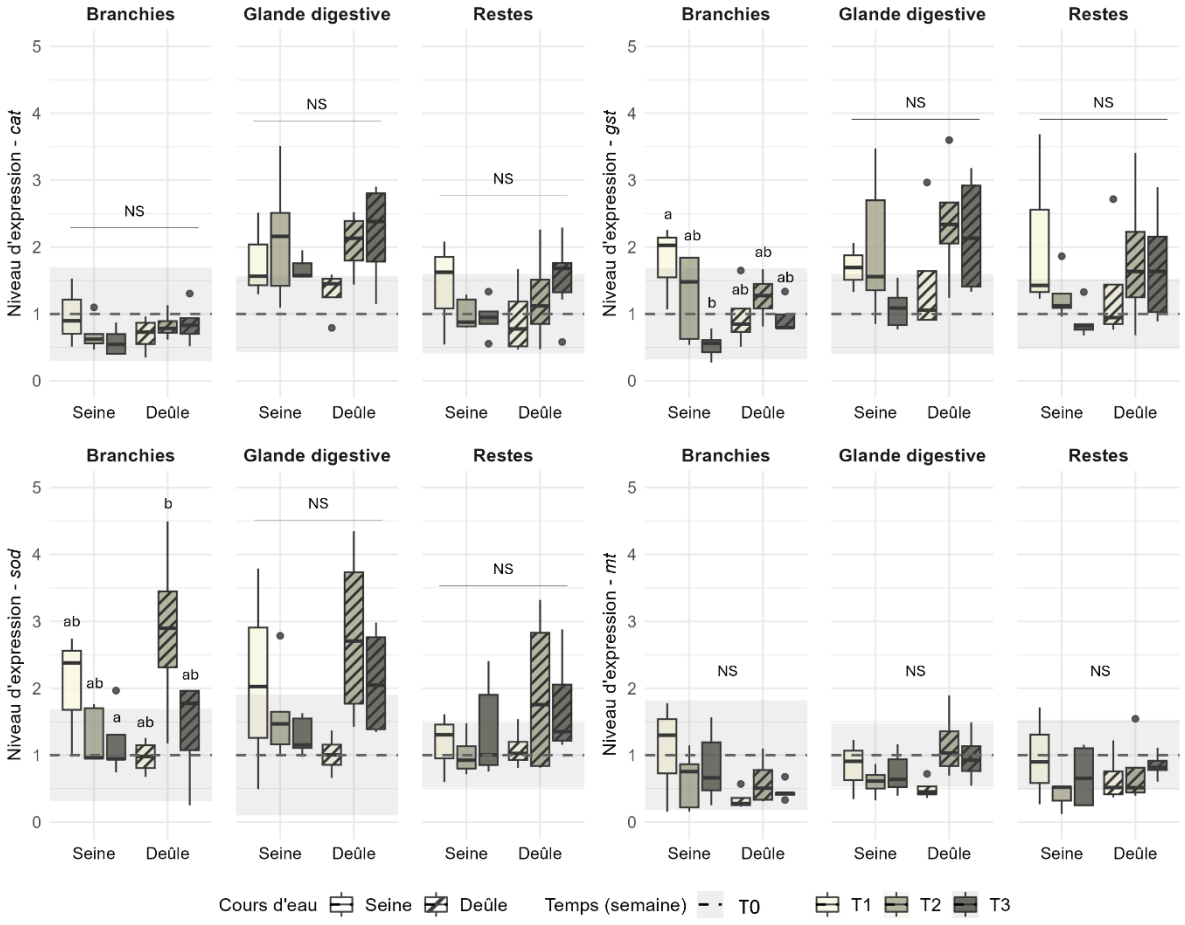

Figure 4-12. Niveau d'expression relatif des gènes *cat*, *gst*, *sod* et *mt* dans les tissus de *D. polymorpha* exposées 3 semaines dans la Seine ou dans la Deûle ($p<0,05$ vs contrôle, n = 5 à 6). La ligne grise représente les niveaux d'expression des gènes des individus contrôle (moyenne ± SD).

1.6. Métabolomique

La PLSDA discrimine les individus encagés dans la Seine de ceux exposés dans la Deûle mais aussi des individus non exposés (T0 ; Figure 4-13). En revanche, aucune séparation nette entre les mâles et les femelles n'est observée, ce qui suggère l'absence de différences métabolomiques liées au sexe dans nos conditions expérimentales. Par conséquent, cette variable n'a pas été prise en compte dans les analyses ultérieures.

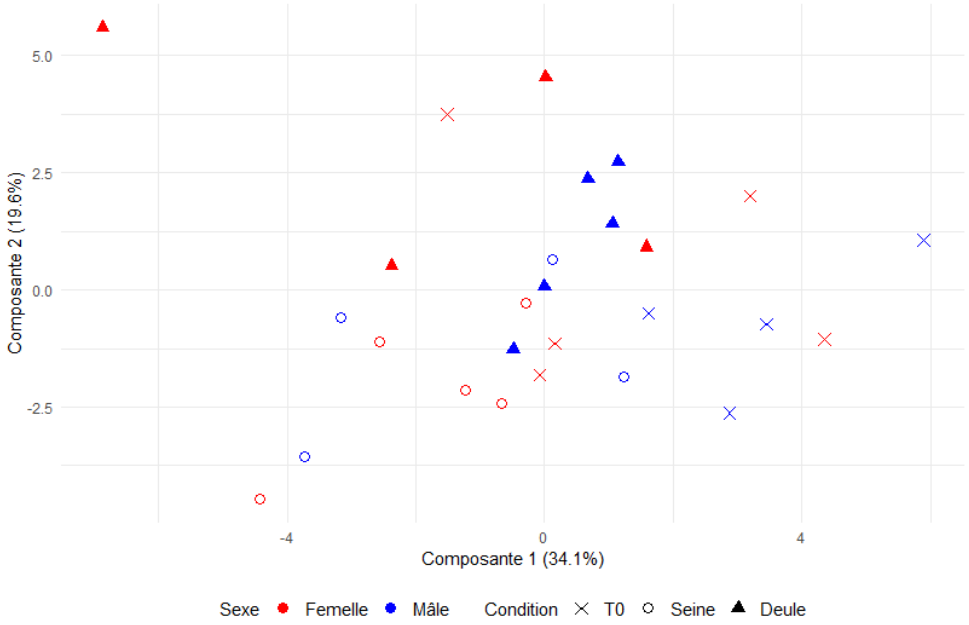

Figure 4-13. PLSDA des concentrations de métabolites dans les tissus entiers de *D. polymorpha* exposée 3 semaines dans la Seine ou la Deûle selon le site d'exposition et le sexe (n = 4 à 5).

Les comparaisons avec le T0 montrent un seul métabolite dont l'abondance est significativement augmentée dans la Deûle : l'acide lactique (Figure 4-14). Les comparaisons des métabolomes des dreissènes encagées dans la Deûle et dans la Seine ont révélé que la concentration en acide phosphorique est 1,6 x supérieure dans la Deûle par rapport à la Seine. Pour les autres métabolites, aucune différence significative n'est observée (Tableau 4-10).

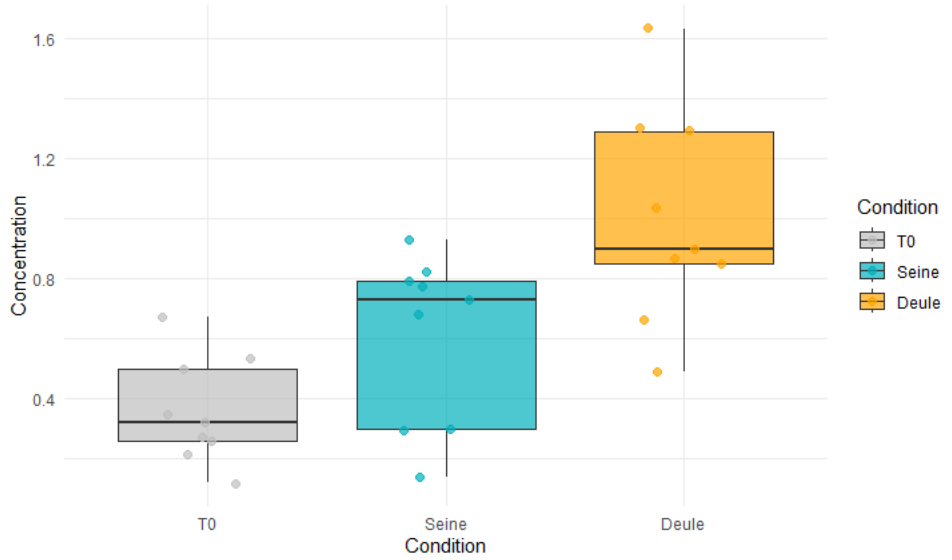

Figure 4-14. Concentrations en acide lactique (nmoles/mg poids sec) chez *D. polymorpha* non exposée (T0) et exposée 3 semaines dans la Seine et la Deûle (n = 9, $p < 0.05$).

Tableau 4-10. Concentrations de métabolites (nmoles/mg poids sec, moyenne ± SD) dans les tissus entiers de *D. polymorpha* exposée 3 semaines dans la Seine ou la Deûle (T3), p-valeurs de l'ANOVA et p-valeurs ajustées (Benjamin Hochberg, ***** = $p < 0,05$, n = 9).

Métabolites	Seine	Deûle	p-valeur	p-valeur ajustée
Alanine	3,12 ± 1,28	4,27 ± 1,72	0,127	0,388
Aspartic acid	0,83 ± 0,24	0,78 ± 0,34	0,727	0,862
Cytosine	0,36 ± 0,12	0,28 ± 0,09	0,094	0,381
Dopamine	0,19 ± 0,06	0,16 ± 0,05	0,308	0,524
Ethanolamine	0,22 ± 0,10	0,20 ± 0,08	0,757	0,862
Fructose1	0,28 ± 0,09	0,22 ± 0,06	0,126	0,388
Fructose-6P	0,03 ± 0,07	0,04 ± 0,08	0,951	0,979
Fumaric acid	0,30 ± 0,10	0,24 ± 0,07	0,162	0,407
Galactose1	0,98 ± 0,77	0,39 ± 0,32	0,052	0,356
Gamma amino acid	0,42 ± 0,19	0,46 ± 0,34	0,760	0,862
Glucose1	4,12 ± 2,60	2,76 ± 1,39	0,184	0,407
Glucose-6P1	0,25 ± 0,08	0,22 ± 0,06	0,384	0,607
Glucose-6P2	0,16 ± 0,06	0,14 ± 0,03	0,448	0,638
Glutamic acid	3,17 ± 0,81	3,14 ± 0,83	0,937	0,979
Glyceric acid	0,25 ± 0,09	0,25 ± 0,05	0,876	0,960
Glycerol	1,95 ± 0,67	2,10 ± 0,66	0,656	0,853
Glycine	1,32 ± 0,37	1,67 ± 0,64	0,170	0,407
Inositol	0,68 ± 0,68	0,49 ± 0,28	0,451	0,638
Isoleucine	0,26 ± 0,09	0,39 ± 0,19	0,081	0,381
Lactic acid	0,61 ± 0,28	1,00 ± 0,35	0,018	0,298
Lysine	1,78 ± 0,95	2,41 ± 1,93	0,393	0,607
Malic acid	0,47 ± 0,14	0,40 ± 0,10	0,231	0,461
Mannose1	0,40 ± 0,10	0,33 ± 0,16	0,305	0,524
Methionine	0,43 ± 0,11	0,41 ± 0,12	0,673	0,853
Octopamine	0,14 ± 0,05	0,10 ± 0,03	0,137	0,388
Ornithine	0,45 ± 0,16	0,48 ± 0,15	0,678	0,853
Phenylalanine	0,77 ± 0,16	0,99 ± 0,34	0,101	0,381
Phosphoric acid	**2,90 ± 0,94**	**4,56 ± 0,38**	**0,000**	**0,006 ***
Pipecolic acid	0,39 ± 0,16	0,30 ± 0,11	0,192	0,407
Proline	0,33 ± 0,10	0,47 ± 0,19	0,083	0,381
Serine	0,62 ± 0,11	0,81 ± 0,22	0,026	0,298
Succinic acid	8,99 ± 5,61	8,99 ± 4,68	0,999	0,999
Threonine	0,69 ± 0,18	0,86 ± 0,40	0,267	0,504
Valine	0,28 ± 0,09	0,44 ± 0,20	0,051	0,356

La réponse métabolomique ciblée permet une discrimination nette des deux sites étudiés montrant l'intérêt de ce type de réponse dans un contexte de biosurveillance. Contrairement à d'autres biomarqueurs pour lesquels le sexe constitue un facteur majeur de variabilité (Louis et al., 2021; Palais et al., 2011), il n'interfère ici pas avec la capacité de discrimination entre sites. Cette stabilité est particulièrement intéressante, sachant que le métabolome non ciblé de *D. polymorpha* présente, par ailleurs, un fort dimorphisme sexuel (Lance et al., 2023).

Parmi les métabolites discriminants, l'abondance de l'acide lactique est significativement augmentée chez les individus exposés dans la Deûle comparé au T0 et à la

Seine. Une telle élévation a déjà été observée chez *D. polymorpha* encagés 2 mois à Charleroi (Est de la France) près d'une station d'épuration, et a été interprétée comme le signe d'un recours accru à la voie anaérobie, possiblement induit par une fermeture prolongée des valves en réponse à un environnement perturbé (Hani et al., 2021).

Toutefois, lorsque l'on compare les métabolomes des dreissènes exposées dans la Seine et la Deûle, c'est l'acide phosphorique qui apparaît significativement augmenté dans la Deûle. Ce métabolite peut refléter un état de forte activité métabolique ou de stress énergétique. En effet, c'est un intermédiaire important du métabolisme énergétique et sa forme dissoute, le phosphate inorganique (Pi), est libéré lors de l'hydrolyse de l'ATP et intervient également dans certaines voies de signalisation cellulaires via l'activation de protéines kinases (Zhao et al., 2020). Dans une étude menée sur l'huître *Crassostrea virginica*, l'exposition au cadmium a entrainé son accumulation dans les mitochondries des huîtres *in vivo* affectant la capacité de synthèse d'ATP, même à de faibles concentrations (Sokolova et al., 2005). Les auteurs ont suggéré que les conditions de stress énergétique élevé pouvaient altérer les mécanismes permettant le maintien des niveaux nécessaires d'ATP entraînant une carence énergétique chez les huîtres exposées au cadmium. Deux hypothèses peuvent donc être envisagées pour expliquer l'augmentation de l'acide phosphorique chez les dreissènes exposées dans la Deûle : 1/ une augmentation de la demande énergétique nécessitant une production accrue d'ATP, impliquant une mobilisation de Pi, 2/ une dégradation accélérée de l'ATP consécutive à une altération du métabolisme énergétique par un stress environnemental, entraînant une libération de Pi dans les tissus. Ces observations sont cohérentes avec les autres marqueurs mesurés, notamment la péroxydation lipidique, qui indiquent un niveau de stress global plus élevé chez les dreissènes exposées dans la Deûle.

2. Conclusion

Les résultats de notre étude montrent que la source de contamination des cours d'eau influence la bioaccumulation de Hg chez *D. polymorpha*, sans que les paramètres mesurés ne permettent à eux seuls d'expliquer pleinement les différences observées. Comme attendu, les dreissènes encagées dans la Deûle, dont les sédiments témoignent d'un fort héritage industriel, présentent des concentrations en THg légèrement supérieures à celles observées dans la Seine. Par ailleurs, la péroxydation lipidique et les différences de concentrations en métabolites observées chez les dreissènes exposées dans la Deûle par rapport à la Seine suggèrent un déséquilibre énergétique et oxydatif plus marqué, probablement lié à des concentrations en THg dépassant la NQE_{biote}. Ainsi, cette étude confirme l'intérêt des encagements de *D. polymorpha* pour déterminer la biodisponibilité du Hg en milieu naturel dans un contexte de biosurveillance. L'approche intégrée mobilisée ici, combinant bioaccumulation, biomarqueurs et métabolomique, permet une évaluation fine du stress physiologique des bivalves en conditions naturelles, et s'avère complémentaire des méthodes classiques. Enfin, elle met en évidence que le Hg, bien que souvent associé à des sources directes, est omniprésent dans les milieux aquatiques. Elle souligne la nécessité de maintenir ce contaminant parmi les polluants prioritaires dans les stratégies de surveillance environnementale, tout en promouvant l'intégration d'approches innovantes comme la métabolomique pour détecter des effets précoces et sublétaux qui échappent aux outils plus classiques.

3. Références

Ahmad, I., Mohmood, I., Mieiro, C. L., Coelho, J. P., Pacheco, M., Santos, M. A., Duarte, A. C., & Pereira, E. (2011). Lipid peroxidation vs. Antioxidant modulation in the bivalve *Scrobicularia plana* in response to environmental mercury—Organ specificities and age effect. *Aquatic Toxicology*, *103*(3), 150-158. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.02.017

Azimi, S., & Rocher, V. (2016). Influence of the water quality improvement on fish population in the Seine River (Paris, France) over the 1990-2013 period. *The Science of the Total Environment*, *542*(Pt A), 955-964. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.094

Bravo, A. G., Cosio, C., Amouroux, D., Zopfi, J., Chevalley, P.-A., Spangenberg, J. E., Ungureanu, V.-G., & Dominik, J. (2014). Extremely elevated methyl mercury levels in water, sediment and organisms in a Romanian reservoir affected by release of mercury from a chlor-alkali plant. *Water Research*, *49*, 391-405. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.024

Châtel, A., Faucet-Marquis, V., Gourlay-Francé, C., Pfohl-Leszkowicz, A., & Vincent-Hubert, F. (2015). Genotoxicity and activation of cellular defenses in transplanted zebra mussels *Dreissena polymorpha* along the Seine river. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *114*, 241-249. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.023

Coquery, M., Cossa, D., & Sanjuan, J. (1997). Speciation and sorption of mercury in two macro-tidal estuaries. *Marine Chemistry*, *58*(1), 213-227. https://doi.org/10.1016/S0304-4203(97)00036-4

Daye, M., Kadlecova, M., & Ouddane, B. (2015). Biogeochemical factors affecting the distribution, speciation, and transport of Hg species in the Deûle and Lys Rivers (Northern France). *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(4), 2708-2720. https://doi.org/10.1007/s11356-014-3528-x

Diviš, P., Kadlecová, M., & Ouddane, B. (2016). Mercury Distribution in the Deûle River (Northern France) Measured by the Diffusive Gradients in Thin Films Technique and Conventional Methods. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *70*(4), 700-709. https://doi.org/10.1007/s00244-015-0231-y

Fricke, I., Götz, R., Schleyer, R., & Püttmann, W. (2015). Analysis of Sources and Sinks of Mercury in the Urban Water Cycle of Frankfurt am Main, Germany. *Water*, *7*(11), Article 11. https://doi.org/10.3390/w7116097

Gorski, P. R., Armstrong, D. E., Hurley, J. P., & Krabbenhoft, D. P. (2008). Influence of natural dissolved organic carbon on the bioavailability of mercury to a freshwater alga. *Environmental Pollution*, *154*(1), 116-123. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.12.004

Hamzeh, M., Ouddane, B., Daye, M., & Halwani, J. (2014). Trace Metal Mobilization from Surficial Sediments of the Seine River Estuary. *Water, Air, & Soil Pollution*, *225*(3), 1878. https://doi.org/10.1007/s11270-014-1878-0

Hani, Y. M. I., Prud'Homme, S. M., Nuzillard, J.-M., Bonnard, I., Robert, C., Nott, K., Ronkart, S., Dedourge-Geffard, O., & Geffard, A. (2021). 1H-NMR metabolomics profiling of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): A field-scale monitoring tool in ecotoxicological studies. *Environmental Pollution*, *270*, 116048. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116048

Idlafkih, Z., Cossa, D., & Meybeck, M. (1995). Comportements des contaminants en trace dissous et particulaires (As, Cd, Cu, Hg, Pb, Zn) dans la Seine. *Hydroécologie Appliquée*, *7*, 127-150. https://doi.org/10.1051/hydro:1995008

Kadlecová, M., Ouddane, B., & Dočekalová, H. (2012). Speciation of mercury in the strongly polluted sediments of the Deûle River (France). *Journal of Environmental Monitoring*, *14*(3), 961-967. https://doi.org/10.1039/C2EM10561F

Kerambrun, E., Rioult, D., Delahaut, L., Evariste, L., Pain-Devin, S., Auffret, M., Geffard, A., & David, E. (2016). Variations in gene expression levels in four European zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, populations in relation to metal bioaccumulation: A field study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *134*, 53-63. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.08.018

Kim, Y. G., Kwon, S. Y., Washburn, S. J., Brooks, S. C., Yoon, J. W., & Besnard, L. (2024). Reconsidering mercury sources and exposure pathways to bivalves: Insights from mercury stable isotopes. *Water Research*, *248*, 120843. https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120843

Lance, E., Sartor, L., Foucault, P., Geffard, A., & Marie, B. (2023). Insights on the Organ-Dependent, Molecular Sexual Dimorphism in the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*, Revealed by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Metabolomics. *Metabolites*, *13*(10), Article 10. https://doi.org/10.3390/metabo13101046

Louis, F., Delahaut, L., Gaillet, V., Bonnard, I., Paris-Palacios, S., & David, E. (2021). Effect of reproduction cycle stage on energy metabolism responses in a sentinel species (*Dreissena polymorpha*) exposed to cadmium: What consequences for biomonitoring? *Aquatic Toxicology*, *230*, 105699. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105699

Ludovisi, A., Goretti, E., Pallottini, M., Lucentini, L., Pizzirani, C., Vizzini, S., & Mancinelli, G. (2022). Stable isotope analysis reveals trophic segregation between the invasive zebra mussel *Dreissena polymorpha* and the native duck mussel *Anodonta anatina* in Lake Trasimeno (Italy). *Hydrobiologia*, *849*(9), 2091-2108. https://doi.org/10.1007/s10750-022-04846-4

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. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.060

Roditi, H. A., Fisher, N. S., & Sañudo-Wilhelmy, S. A. (2000). Uptake of dissolved organic carbon and trace elements by zebra mussels. *Nature*, *407*(6800), Article 6800. https://doi.org/10.1038/35024069

Rosa, M., Ward, J. E., & Shumway, S. E. (2018). Selective Capture and Ingestion of Particles by Suspension-Feeding Bivalve Molluscs: A Review. *Journal of Shellfish Research*, *37*(4), 727-746. https://doi.org/10.2983/035.037.0405

Schneider, D. W., Madon, S. P., Stoeckel, J. A., & Sparks, R. E. (1998). Seston quality controls zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) energetics in turbid rivers. *Oecologia*, *117*(3), 331-341. https://doi.org/10.1007/s004420050666

Sokolova, I. M., Sokolov, E. P., & Ponnappa, K. M. (2005). Cadmium exposure affects mitochondrial bioenergetics and gene expression of key mitochondrial proteins in the eastern

oyster *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Aquatic Toxicology*, *73*(3), 242-255. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.03.016

Tong, Y., Zhang, W., Hu, D., Ou, L., Hu, X., Yang, T., Wei, W., Ju, L., & Wang, X. (2013). Behavior of mercury in an urban river and its accumulation in aquatic plants. *Environmental Earth Sciences*, *68*(4), 1089-1097. https://doi.org/10.1007/s12665-012-1810-0

Zhao, W.-W., Zhu, G., Daugulis, A. J., Chen, Q., Ma, H.-Y., Zheng, P., Liang, J., & Ma, X. (2020). Removal and biomineralization of Pb2+ in water by fungus *Phanerochaete chrysoporium*. *Journal of Cleaner Production*, *260*, 120980. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120980

4. Annexes

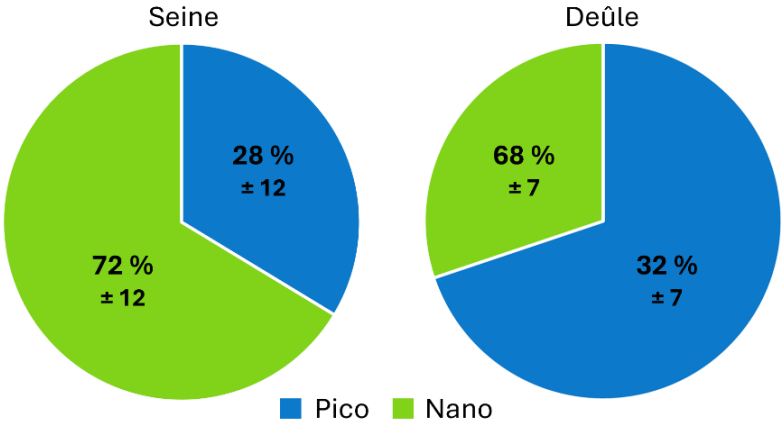

Figure S 4-3. Proportions moyennes en pico- et nanophytoplancton sur les 3 semaines d'encagement dans la Seine et la Deûle (moyenne ± SD, n = 4).

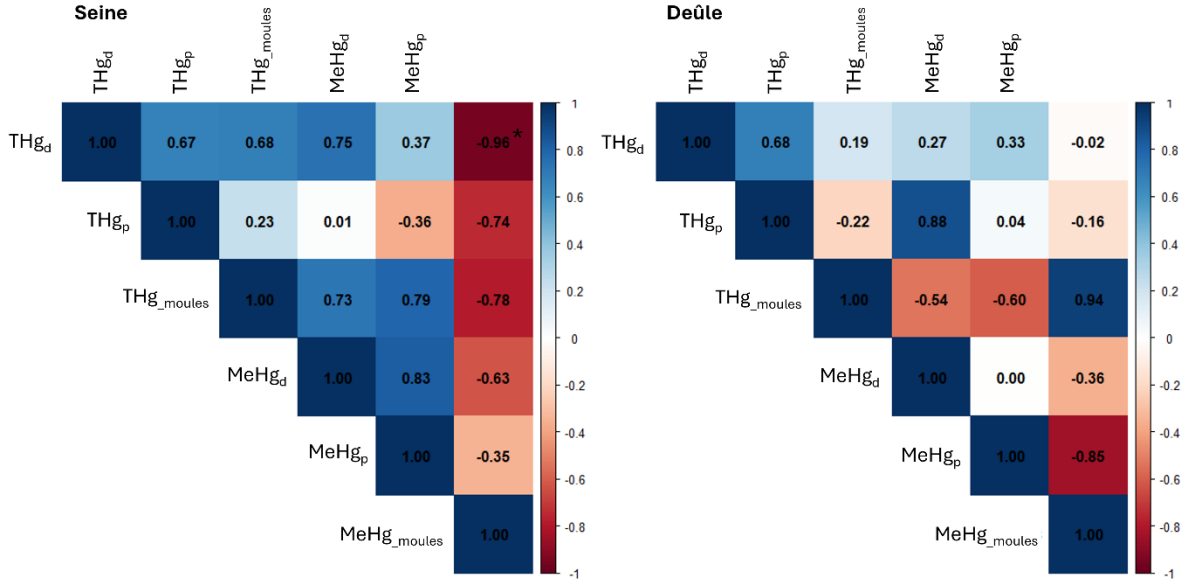

Figure S4-4. Coefficients de corrélation entre Hg dissout (THg_d, $MeHg_d$), Hg particulaire (THg_p, $MeHg_p$) et Hg bioaccumulé dans les tissus de *D. polymorpha* (THg_{moules}, $MeHg_{moules}$) exposée dans la Seine et dans la Deûle (n = 4, moyennes des 3 temps d'exposition et le T0 ; * = p-value < 0,05).

Tableau S 4-1. Concentrations de métabolites ciblés dans les tissus entiers de *D. polymorpha* exposée 3 semaines dans la Seine ou la Deûle (T3) (n = 4 à 5).

Métabolites	**T0**		**Seine**		**Deûle**	
	Femelle	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle	Mâle
Lactic acid	0,41 ± 0,18	0,29 ± 0,17	0,57 ± 0,33	0,65 ± 0,25	1,13 ± 0,20	0,90 ± 0,44
Alanine	2,81 ± 1,46	1,42 ± 1,05	2,70 ± 1,12	3,64 ± 1,43	5,46 ± 2,05	3,31 ± 0,45
Valine	0,44 ± 0,25	0,35 ± 0,14	0,26 ±0,07	0,32 ± 0,12	0,57 ± 0,24	0,33 ± 0,07
Ethanolamine	0,17 ± 0,09	0,15 ± 0,07	0,22 ± 0,12	0,22 ± 0,08	0,25 ± 0,10	0,16 ± 0,03
Glycerol	1,91 ± 1,04	1,03 ± 0,51	1,90 ±0,72	2,02 ± 0,70	2,41 ± 0,63	1,85 ± 0,64
Phosphoric acid	5,21 ± 1,88	3,56 ± 0,94	2,73 ± 1,08	3,12 ± 0,83	4,43 ± 0,56	4,66 ± 0,14
Isoleucine	0,40 ± 0,19	0,34 ± 0,14	0,24 ± 0,05	0,30 ± 0,12	0,51 ± 0,23	0,29 ± 0,05
Proline	0,44 ± 0,25	0,43 ± 0,06	0,32 ± 0,11	0,35 ± 0,10	0,59 ± 0,24	0,36 ± 0,06
Glycine	1,11 ± 0,61	0,83 ± 0,32	1,30 ± 0,44	1,33 ± 0,32	2,07 ± 0,80	1,34 ± 0,19
Succinic acid	6,33 ± 4,17	3,46 ± 5,20	8,03 ± 2,92	10,20 ± 8,31	10,22 ± 7,16	8,00 ± 1,60
Glyceric acid	0,20 ± 0,08	0,16 ± 0,04	0,26 ± 0,11	0,24 ± 0,07	0,29 ± 0,03	0,21 ± 0,04
Fumaric acid	0,26 ± 0,09	0,21 ± 0,06	0,31 ± 0,13	0,29 ± 0,07	0,26 ± 0,08	0,22 ±0,05
Serine	0,74 ± 0,37	0,54 ± 0,10	0,60 ± 0,13	0,63 ± 0,10	0,90 ± 0,30	0,74 ± 0,11
Pipecolic acid	0,31 ± 0,21	0,26 ± 0,12	0,42 ± 0,17	0,35 ± 0,18	0,31 ± 0,16	0,29 ± 0,07
Threonine	0,87 ± 0,31	0,60 ± 0,18	0,69 ± 0,18	0,69 ± 0,20	1,15 ± 0,46	0,62 ± 0,09
Malic acid	0,35 ± 0,07	0,29 ± 0,06	0,47 ± 0,18	0,47 ± 0,10	0,47 ± 0,10	0,34 ±0,05
Methionine	0,45 ± 0,12	0,33 ± 0,09	0,44 ± 0,13	0,42 ± 0,08	0,48 ± 0,16	0,35 ± 0,05
Aspartic acid	0,60 ± 0,25	0,38 ± 0,11	0,97 ± 0,20	0,64 ±0,14	0,75 ± 0,50	0,80 ± 0,20
Gamma amino acid	0,30 ± 0,12	0,22 ± 0,02	0,38 ± 0,21	0,46 ± 0,18	0,58 ± 0,50	0,36 ± 0,08
Cytosine	0,33 ± 0,12	0,26 ± 0,09	0,38 ± 0,15	0,35 ± 0,09	0,31 ± 0,10	0,25 ± 0,07
Glutamic acid	2,68 ± 1,03	1,87 ± 0,32	3,58 ± 0,85	2,65 ± 0,33	3,53 ± 1,19	2,83 ± 0,22
Phenylalanine	0,91 ± 0,39	0,57 ± 0,18	0,80 ± 0,15	0,73 ± 0,18	1,14 ± 0,44	0,87 ± 0,21
Ornithine	0,70 ± 0,16	1,55 ± 2,07	0,41 ± 0,17	0,49 ± 0,16	0,58 ± 0,18	0,39 ± 0,05
Fructose1	0,25 ± 0,07	0,21 ± 0,05	0,29 ± 0,12	0,27 ± 0,05	0,25 ± 0,07	0,20 ± 0,06
Mannose1	0,35 ± 0,11	0,31 ± 0,07	0,42 ± 0,11	0,38 ± 0,09	0,41 ± 0,21	0,26 ± 0,08
Galactose1	0,73 ± 0,60	0,52 ± 0,35	1,11 ± 0,74	0,80 ± 0,88	0,40 ± 0,36	0,38 ± 0,33
Glucose1	4,11 ± 1,93	3,05 ± 1,13	4,57 ±2,37	3,55 ± 3,13	3,27 ± 1,55	2,34 ± 1,26
Lysine	1,45 ± 0,80	0,93 ± 0,53	1,91 ± 0,59	1,62 ± 1,38	2,95 ±2,73	1,98 ± 1,17
Octopamine	0,12 ± 0,05	0,09 ± 0,03	0,14 ± 0,06	0,13 ± 0,04	0,11 ± 0,04	0,10 ± 0,03
Dopamine	0,17 ± 0,06	0,13 ± 0,04	0,19 ± 0,08	0,18 ± 0,04	0,18 ± 0,06	0,14 ± 0,04
Inositol	0,35 ± 0,15	0,28 ± 0,05	0,48 ± 0,18	0,93 ± 1,01	0,64 ± 0,37	0,38 ± 0,14
Fructose-6P	0,07 ± 0,09	0,09 ± 0,11	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,10	0,06 ± 0,12	0,02 ± 0,02
Glucose-6P1	0,23 ± 0,04	0,21 ± 0,08	0,22 ± 0,09	0,30 ± 0,06	0,25 ± 0,08	0,20 ± 0,03
Glucose-6P2	0,13 ± 0,04	0,11 ± 0,03	0,14 ± 0,06	0,18 ± 0,06	0,15 ± 0,04	0,13 ± 0,02

Partie 3 : Pollution et saisonnalité

Cette partie explore l'influence de la saisonnalité sur la bioaccumulation du Hg chez *D. polymorpha*. Les objectifs sont de comparer les concentrations de Hg dans les dreissènes exposées en hiver et en été dans la Seine et la Deûle, et d'évaluer les réponses biologiques des dreissènes à ces expositions saisonnières. Les activités enzymatiques, les profils métabolomiques et protéomiques sont analysés.

Cette partie du chapitre est en collaboration avec : Mariia Petrova[1], Isabelle Bonnard[1], Laurence Delahaut[1], Véronique Gaillet[1], Nathalie Le Bris[2], Olivier Grosso[3], David Renault[2], Jean Armengaud[4] et Lars-Eric Heimbürger-Boavida[5]

[1] UMR-I 02 SEBIO, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France ;
[2] UMR CNRS 6553 EcoBio, Université de Rennes, Rennes, France ;
[3] CNRS, UM 110, Aix Marseille Université, Université de Toulon, Mediterranean Institute of Oceanography (MIO), Marseille, France
[4] Laboratory « Innovative technologies for Detection and Diagnostics », CEA-Marcoule, 30200 Bagnols-sur-Cèze ;
[5]CNRS/INSU, Aix Marseille Université, Université de Toulon, Mediterranean Institute of Oceanography (MIO), Marseille, France

1. Résultats et discussion

1.1. Encagements en hiver

Les paramètres physico-chimiques ainsi que les concentrations en Hg dans l'eau et les sédiments sont disponibles dans le Tableau S 4-2.

1.1.1. Bioaccumulation chez *D. polymorpha*

Les concentrations en THg chez *D. polymorpha* exposée dans la Seine amont et aval ont tendance à décroître de T1 à T3, jusqu'à atteindre des concentrations inférieures à celles du T0, comme dans la partie 2, suggérant une possible dépuration (Figure 4-15). A l'inverse, les concentrations dans les dreissènes exposées dans la Deûle aval semblent augmenter au cours du temps. Pour les dreissènes exposées dans la Deûle amont, les concentrations sont stables au cours du temps, globalement comprises dans l'intervalle du T0. Les concentrations en MeHg mesurées sont stables au cours du temps, avec des valeurs comparables à celles du T0, bien que légèrement plus élevées chez les dreissènes exposées dans la Seine aval par rapport aux autres sites. Ces tendances sont non significatives.

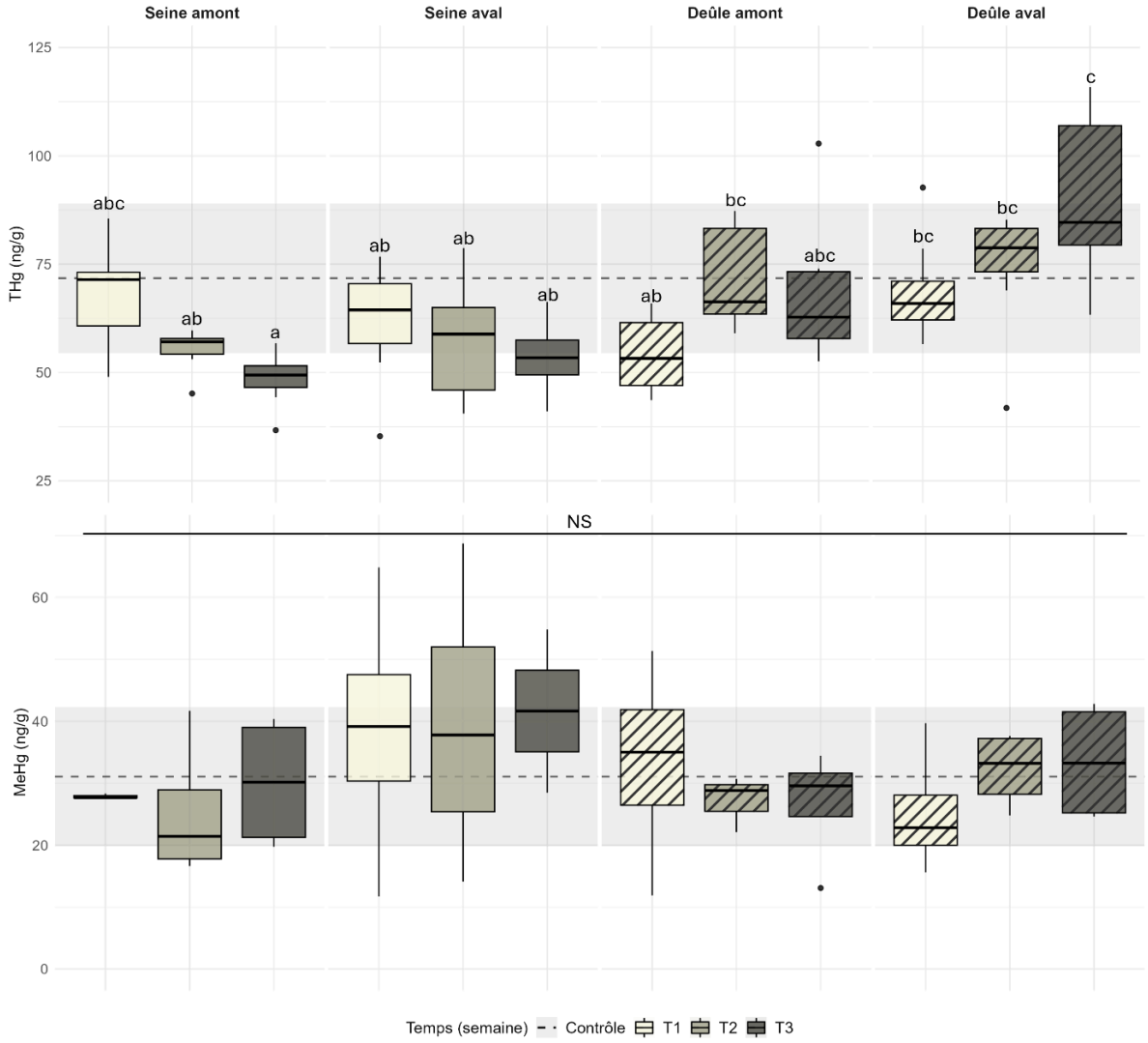

Figure 4-15. Concentrations en THg et MeHg chez *D. polymorpha* exposée 1, 2 et 3 semaines (T1, T2, T3) en hiver en amont (SAM) et en aval (SAV) de la Seine ou en amont (DAM) et en aval (DAV) de la Deûle (n = 3 à 4, $p < 0.05$, NS = Non Significatif).

1.1.2. Isotopes stables du carbone ($\delta^{13}C$) et de l'azote ($\delta^{15}N$)

Comme dans la *partie 2 – 1.2.*, les différences de signatures isotopiques entre les dreissènes et le seston suggèrent que les dreissènes ne se nourrissent pas intégralement du seston collecté par filtration, ou que celui-ci ne représente pas l'ensemble des ressources assimilées (Figure 4-16). Contrairement au premier essai dans la partie *partie 2 – 1.2.*, les différences de signatures isotopiques des dreissènes à T0 et T3 sont faibles, bien que les individus aient été exposés à un changement d'environnement, impliquant une modification de leur régime alimentaire. Cette observation implique peut-être un faible niveau d'alimentation sur cette période plus froide.

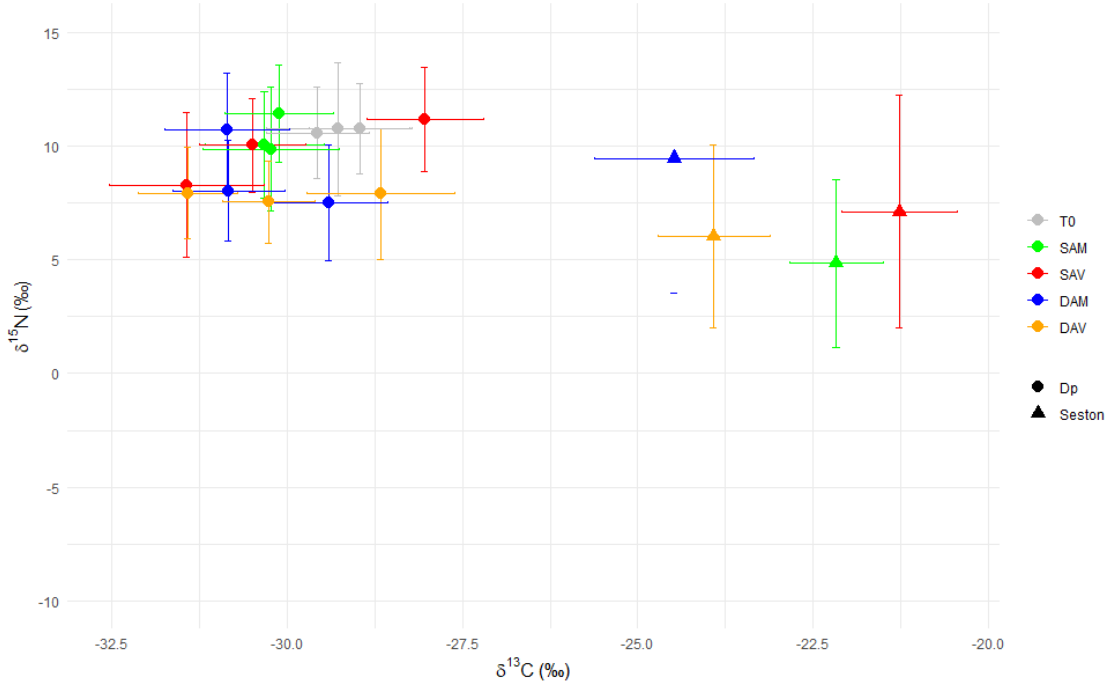

Figure 4-16. Valeurs moyennes de $\delta^{15}N$ et $^{\delta}13C$ (‰) de *D. polymorpha* (n = 3) et du seston filtré (n = 1) en janvier 2024.

1.1.3. Activités enzymatiques et de défense chez *D. polymorpha*

1.1.3.1. Comparaison avec T0 et entre sites

La comparaison univariée des activités enzymatiques des CAT, GST et SOD ainsi que les niveaux de LOOH ne montre aucune différence significative entre les 4 sites (Tableau S 4-3).

1.1.3.2. Lien avec la bioaccumulation

L'ACP discrimine les individus entre les sites de la Seine (SAM et SAV) et les sites de la Deûle (DAM et DAV) sur la dimension 1 (Figure 4-17). La concentration en THg est associée aux sites de la Deûle, en cohérence avec la bioaccumulation plus élevée de THg chez les dreissènes encagées dans cette rivière par rapport à celles de la Seine. Par ailleurs, des corrélations positives apparaissent entre la concentration en LOOH dans les différents tissus (LOOH_B, LOOH_G et LOOH_R) et la concentration en THg. En revanche, aucune corrélation n'est observée entre la bioaccumulation en MeHg et celle en THg. Ces résultats indiquent que l'effet du site (Seine vs Deûle) prédomine largement sur la distinction amont/aval dans la structuration des profils de stress oxydatif, incluant les réponses enzymatiques antioxydantes et la peroxydation lipidique, et les profils de bioaccumulation de THg et MeHg des dreissènes.

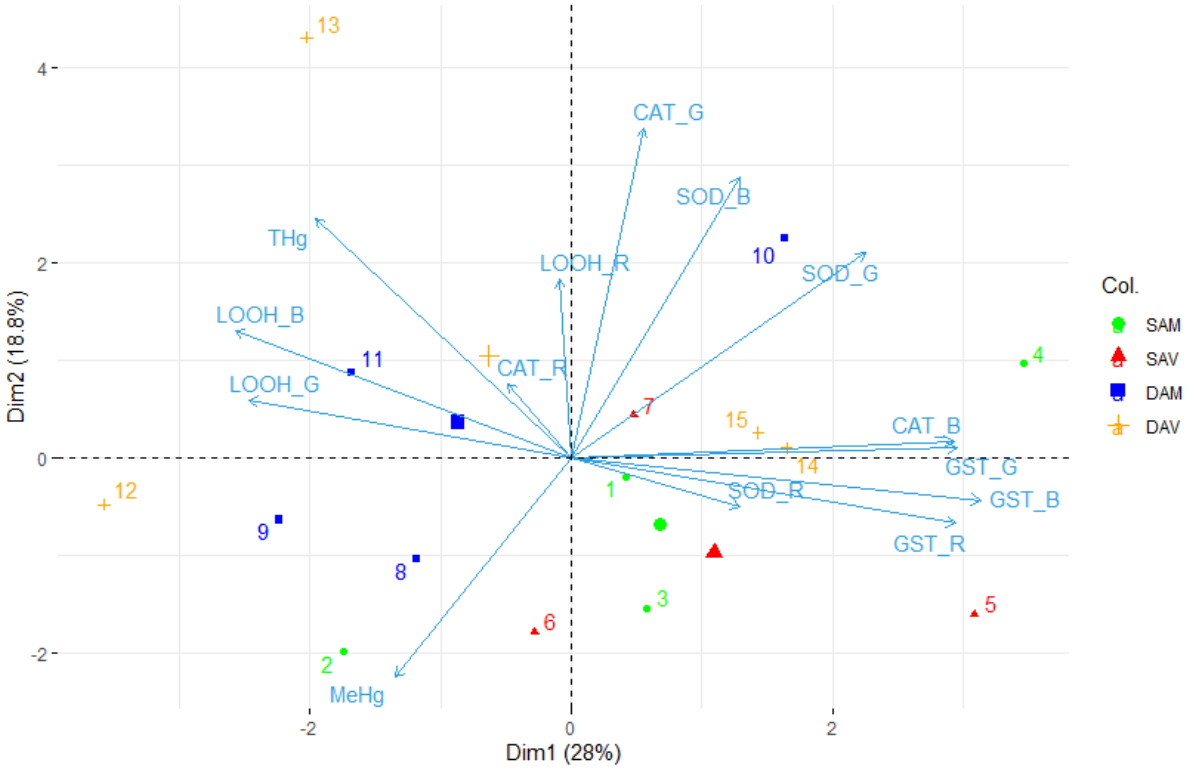

Figure 4-17. ACP représentant les concentrations en THg et MeHg et les réponses enzymatiques et de défense (CAT, GST, SOD, LOOH) chez *D. polymorpha* exposée 3 semaines en hiver en amont (SAM) et en aval (SAV) de la Seine ou en amont (DAM) et en aval (DAV) de la Deûle (n = 3 à 4).

1.1.4. Métabolomique

1.1.4.1. Comparaison avec T0 et entre les sites

Les comparaisons univariées des concentrations en métabolites chez les dreissènes non exposées (T0) et exposées dans la Seine et la Deûle montrent que l'abondance du glycérol est significativement augmentée dans DAM et DAV par rapport à SAM, SAV et T0 (Tableau 4-11, Figure 4-18).

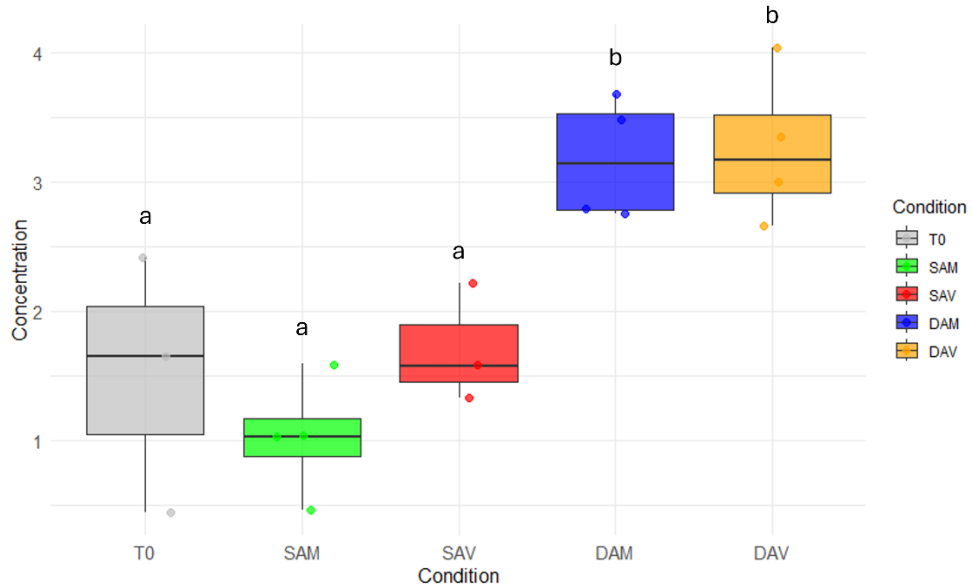

Figure 4-18. Concentrations en glycérol (nmoles/mg poids sec) chez *D. polymorpha* non exposée (T0) et exposée 3 semaines en amont et aval de la Seine (SAM, SAV) et de la Deûle (DAM, DAV) (n =3 à 5, $p < 0.05$).

Tableau 4-11. Concentrations en métabolites (nmoles/mg poids sec, moyenne ± SD) dans les tissus entiers de *D. polymorpha* exposée 3 semaines en hiver en amont (SAM) et en aval (SAV) de la Seine ou en amont (DAM) et en aval (DAV) de la Deûle (n = 3 à 4, $p < 0.05$).

Condition	T0	SAM	SAV	DAM	DAV
Lactic acid	0,52 ± 0,10	0,17 ± 0,11	0,48 ± 0,17	0,29 ± 0,07	0,20 ± 0,11
Alanine	3,20 ± 0,73	1,46 ± 0,47	2,55 ± 0,97	3,11 ± 2,60	1,81 ± 0,56
Valine	0,38 ± 0,05	0,25 ± 0,09	0,41 ± 0,19	0,33 ± 0,13	0,36 ± 0,11
Ethanolamine	0,15 ± 0,03	0,15 ± 0,04	0,16 ± 0,05	0,16 ± 0,05	0,12 ± 0,03
Glycerol	**1,50 ± 1,00**	**1,02 ± 0,46**	**1,71 ± 0,46**	**3,18 ± 0,47**	**3,26 ± 0,59**
Phosphoric acid	2,60 ± 0,56	2,27 ± 0,39	2,25 ± 0,78	2,68 ± 0,45	3,02 ± 0,62
Isoleucine	0,32 ± 0,07	0,24 ± 0,11	0,39 ± 0,19	0,28 ± 0,12	0,31 ± 0,11
Proline	0,52 ± 0,04	0,28 ± 0,10	0,37 ± 0,16	0,28 ± 0,07	0,33 ± 0,07
Glycine	0,78 ± 0,07	0,59 ± 0,18	0,64 ± 0,06	0,80 ± 0,20	1,02 ± 0,24
Succinic acid	0,74 ± 0,68	0,30 ± 0,06	7,20 ± 6,18	0,53 ± 0,27	0,32 ± 0,07
Glyceric acid	0,26 ± 0,05	0,26 ± 0,11	0,29 ± 0,15	0,30 ± 0,08	0,21 ± 0,04
Fumaric acid	0,35 ± 0,06	0,35 ± 0,14	0,39 ± 0,20	0,41 ± 0,10	0,29 ± 0,05
Serine	0,87 ± 0,17	0,58 ± 0,04	0,68 ± 0,24	0,89 ± 0,31	0,84 ± 0,16
Pipecolic acid	0,53 ± 0,07	0,49 ± 0,30	0,54 ± 0,27	0,55 ± 0,15	0,34 ± 0,15
Threonine	0,81 ± 0,11	0,58 ± 0,03	0,74 ± 0,28	0,81 ± 0,12	0,75 ± 0,08
Malic acid	0,53 ± 0,04	0,47 ± 0,09	0,51 ± 0,23	0,53 ± 0,09	0,44 ± 0,05
Methionine	0,47 ± 0,11	0,45 ± 0,12	0,52 ± 0,27	0,49 ± 0,11	0,43 ± 0,05
Aspartic acid	0,59 ± 0,07	0,57 ± 0,16	0,57 ± 0,26	0,74 ± 0,15	0,81 ± 0,13
Gamma amino acid	0,41 ± 0,15	0,23 ± 0,03	0,25 ± 0,07	0,39 ± 0,11	0,38 ± 0,21
Cytosine	0,42 ± 0,09	0,44 ± 0,19	0,49 ± 0,25	0,50 ± 0,14	0,34 ± 0,07
Glutamic acid	2,82 ± 0,17	1,71 ± 0,79	1,78 ± 0,48	3,21 ± 2,44	3,08 ± 0,52
Phenylalanine	0,73 ± 0,27	0,55 ± 0,07	0,82 ± 0,44	0,74 ± 0,17	0,85 ± 0,18
Ornithine	0,64 ± 0,30	0,90 ± 0,31	0,55 ± 0,20	0,78 ± 0,45	0,70 ± 0,65
Fructose1	0,33 ± 0,07	0,35 ± 0,13	0,37 ± 0,19	0,38 ± 0,11	0,27 ± 0,04
Mannose1	0,66 ± 0,29	0,41 ± 0,10	0,52 ± 0,27	0,51 ± 0,11	0,34 ± 0,09
Galactose1	2,30 ± 1,30	0,59 ± 0,45	0,80 ± 0,33	0,83 ± 0,58	0,35 ± 0,18
Glucose1	8,72 ± 4,15	2,59 ± 1,54	3,02 ± 1,46	4,10 ± 1,89	2,08 ± 0,75
Lysine	1,49 ± 1,14	0,60 ± 0,22	0,90 ± 0,09	1,22 ± 0,91	0,99 ± 0,34
Octopamine	0,16 ± 0,04	0,17 ± 0,08	0,18 ± 0,10	0,19 ± 0,05	0,13 ± 0,03
Dopamine	0,24 ± 0,06	0,23 ± 0,09	0,25 ± 0,13	0,26 ± 0,07	0,17 ± 0,04
Inositol	0,42 ± 0,12	0,24 ± 0,03	0,28 ± 0,05	0,27 ± 0,06	0,23 ± 0,09
Glucose-6P1	0,44 ± 0,13	0,29 ± 0,05	0,26 ± 0,10	0,32 ± 0,04	0,29 ± 0,08
Glucose-6P2	0,30 ± 0,09	0,17 ± 0,04	0,17 ± 0,07	0,21 ± 0,03	0,18 ± 0,04

1.1.4.2. Lien avec la bioaccumulation

Comme pour les réponses enzymatiques du stress oxydant et de défense, l'ACP montre une séparation claire des individus entre les sites de la Seine et de la Deûle sur la dimension 1 (Figure 4-19 ; Tableau S4-4). Les concentrations en THg et en MeHg apparaissent corrélées négativement sur l'ACP, suggérant un effet sur les voies métabolomiques, distinct selon la forme de Hg. De plus, comme pour les activités enzymatiques, THg est associés aux sites de la Deûle tandis que

le MeHg, bien que faiblement représenté, est associé aux sites de la Seine. Enfin, les concentrations en THg semblent corrélées positivement aux concentrations d'acide gamma-aminobutyrique (gamma amino acid, ou GABA), glycérol et glycine alors que les concentrations en MeHg semblent corrélées positivement aux concentrations en acide succinique. Ces différences métabolomiques pourraient refléter des mécanismes de réponse spécifiques à chaque forme de Hg, avec une modulation des neurotransmetteurs et du métabolisme énergétique adaptée aux conditions de contamination locale.

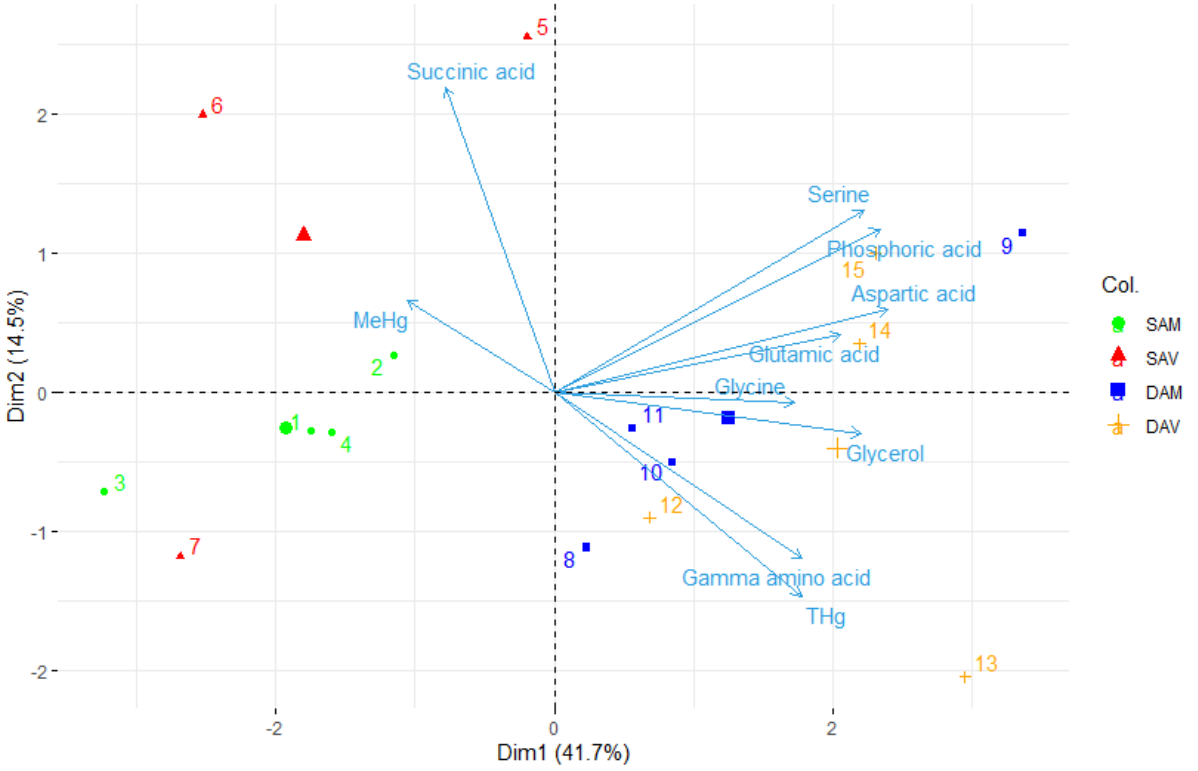

Figure 4-19. ACP représentant les concentrations en THg et MeHg et les concentrations en métabolites chez *D. polymorpha* exposée 3 semaines en hiver en amont (SAM) et en aval (SAV) de la Seine ou en amont (DAM) et en aval (DAV) de la Deûle (n = 3 à 4).

1.2. Encagements en été

Les paramètres physico-chimiques ainsi que les concentrations en Hg dans l'eau et les sédiments sont disponibles dans le Tableau S 4-5.

1.2.1. Bioaccumulation chez *D. polymorpha*

Les concentrations en THg chez les dreissènes exposées dans la Deûle sont supérieures à celles mesurées chez les dreissènes exposées dans la Seine, excepté pour Deûle amont à T2 (Figure 4-20). Les concentrations en THg dans les dreissènes exposées dans la Seine ne diffèrent pas à l'amont et à l'aval et sont globalement comprises dans l'intervalle du T0. Les concentrations en MeHg sont légèrement plus élevées à Seine aval et Deûle amont à T3. Pour les autres sites, les concentrations se maintiennent dans l'intervalle observé à T0. Dans la Deûle, une autre source de Hg pourrait être l'usine métallurgique Nyrstar (http://www.safir-network.com/site-de-metaleurop/), qui est toujours en activité et située 3 km en amont du site Métaleurop. Nyrstar est connue pour ses rejets principalement de plomb, cadmium et zinc, ainsi que, dans une moindre mesure, d'arsenic, chrome, cobalt, cuivre, nickel et Hg.

En comparaison avec les concentrations en THg mesurées en hiver dans les tissus entiers des dreissènes exposées dans la Seine, celles mesurées en été se situent dans la même gamme que celles des individus T0. En hiver, les concentrations semblent diminuer entre T1 et T3, atteignant finalement des niveaux comparables à ceux observés lors des encagements d'été. Les dreissènes utilisées pour les encagements en hiver et en été présentent des différences de bruit de fond en THg entre les individus T0. Ces individus ont été prélevés à des emplacements et périodes différentes autour du lac du Der, avec des durées de stabulation également distinctes, qui pourrait expliquer en partie les différences entre les individus T0. En revanche, les concentrations en MeHg chez les individus T0 sont similaires entre les deux campagnes d'encagement, et celles mesurées dans les tissus des individus encagés ne dépassent que légèrement cette gamme, notamment pour certains individus de Seine Aval et Deûle amont à T3 sans que cette différence soit significative. Une forte variabilité interindividuelle a été observée chez les dreissènes, ce qui, combiné à une faible amplitude des différences de bioaccumulation et à un nombre limité de réplicats, explique l'absence de différences significatives statistiques des tendances observées. Pour renforcer la puissance statistique des analyses, l'augmentation du nombre de réplicats constitue une solution privilégiée. Cependant, afin de limiter les coûts, le recours au poolage des échantillons peut également être envisagé.

La durée des encagements de trois semaines s'avère généralement suffisant pour observer chez *D. polymorpha* une bioaccumulation de Hg, mais pas toujours significative. Ce laps de temps permet le contact effectif avec le milieu contaminé et la détection de modulations dans le métabolisme des individus. Cependant, il serait judicieux de prolonger la durée d'exposition lors de prochains travaux, afin d'étudier la dynamique à plus long terme de la bioaccumulation. Des encagements de plusieurs mois offriraient la possibilité de suivre les processus chroniques et de mieux appréhender la stabilité ou la variabilité de la bioaccumulation et des réponses biologiques en lien avec les fluctuations saisonnières et les variations du régime alimentaire.

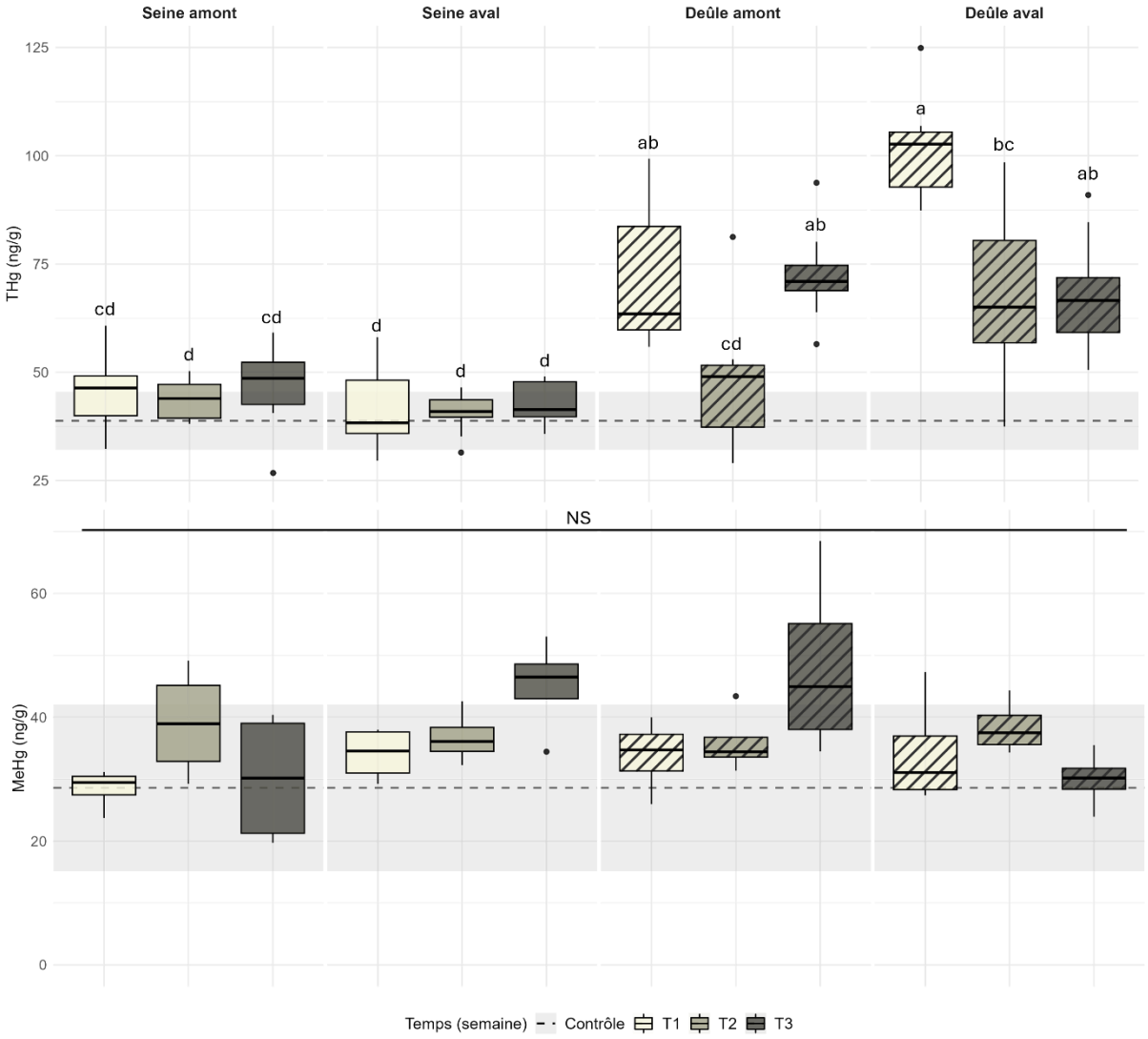

Figure 4-20. Concentrations en THg et MeHg chez *D. polymorpha* exposée 1, 2 et 3 semaines (T1, T2, T3) en été en amont (SAM) et en aval (SAV) de la Seine ou en amont (DAM) et en aval (DAV) de la Deûle (n = 3 à 4, $p < 0.05$, NS = Non Significatif).

1.2.2. Isotopes stables du carbone ($\delta^{13}C$) et de l'azote ($\delta^{15}N$)

Contrairement à l'encagement réalisé en hiver, les signatures isotopiques du $\delta^{13}C$ des dreissènes à T0 et T3 sont différentes, en cohérence avec le changement d'environnement et de régime alimentaire pendant l'encagement (Figure 4-21). Comme observé en hiver et en été en 2023 (*partie 2 – 1.2.*), les écarts entre les signatures isotopiques des dreissènes et du seston suggèrent que les dreissènes ne se nourrissent pas intégralement du seston prélevé ou que ce dernier ne reflète pas parfaitement la diversité des ressources alimentaires ingérées. *D. polymorpha* étant capable de trier préférentiellement certaines particules alimentaires, elle ne consomme vraisemblablement qu'une fraction du seston prélevé par filtration. En effet, le seston filtré est une matrice hétérogène composées de fractions distinctes telles que la matière organique particulaire (POM), le seston vivant (principalement du plancton), et le seston non vivant (débris organiques ou particules inorganiques comme les sédiments). De plus, la composition de ces fractions varie dans l'espace et le temps. Ainsi, des échantillonnages ponctuels ne reflètent pas nécessairement les ressources assimilées par *D. polymorpha*

pendant la période d'encagement. Dans le cas de la Seine, les méthodes classiques de collecte (filets à plancton, prélèvement d'eau brute, tamisage) n'ont pas permis d'obtenir un volume suffisant pour les analyses. Pour affiner la caractérisation des sources alimentaires de *D. polymorpha*, il serait intéressant de fractionner le seston par classes de taille, ce qui a été tenté ici mais qui n'a pas été concluant en raison de fuites importantes dans le système. L'utilisation d'un système de filtration séquentielle par la taille permettrait également de mieux dissocier le phytoplancton des particules minérales. Il serait également intéressant d'inclure l'analyse isotopique du DOC et une analyse du contenu stomacal pour d'identifier la nourriture ingérée.

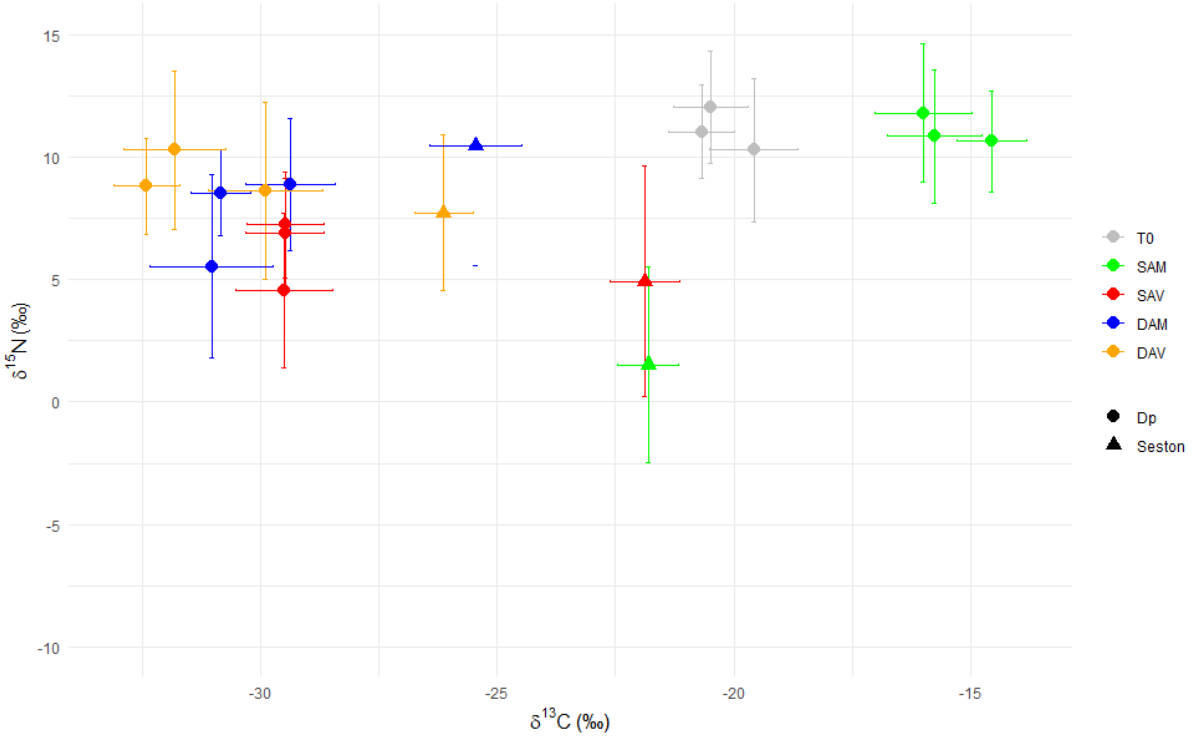

Figure 4-21. Valeurs moyennes de $\delta^{15}N$ et $^{\delta}13C$ (‰) de *D. polymorpha* (n = 3) et du seston filtré (n = 1) en juin 2024.

1.2.3. Activités enzymatiques et de défense chez *D. polymorpha*

1.2.3.1. Comparaison avec T0 et entre sites

Comme pour les encagements en hiver, la comparaison univariée des activités enzymatiques des CAT, GST et SOD ainsi que les niveaux de LOOH ne montre pas de différence significative entre les 4 sites (Tableau S4-6).

1.2.3.2. Lien avec la bioaccumulation

Contrairement aux réponses mesurées en hiver, l'ACP ne montre pas de séparation claire des individus entre les sites de la Seine et les sites de la Deûle, ni entre l'amont et l'aval. De plus, THg est faiblement représenté alors que le MeHg est orienté vers Seine aval et Deûle amont, en cohérence avec la bioaccumulation du MeHg (Figure 4-22). De plus, la bioaccumulation du MeHg est proche de la péroxydation lipidique dans les restes (LOOH_R), ce qui rappelle les résultats présentés dans le chapitre 1. Ces réponses reflètent aussi le niveau de tolérance et la capacité d'adaptation des dreissènes à différentes périodes. En effet, une étude récente a montré moins de sensibilité de ce type de réponse chez les dreissènes en été, , résultant d'un effet confondant du stade de reproduction (Baratange et al., 2025).

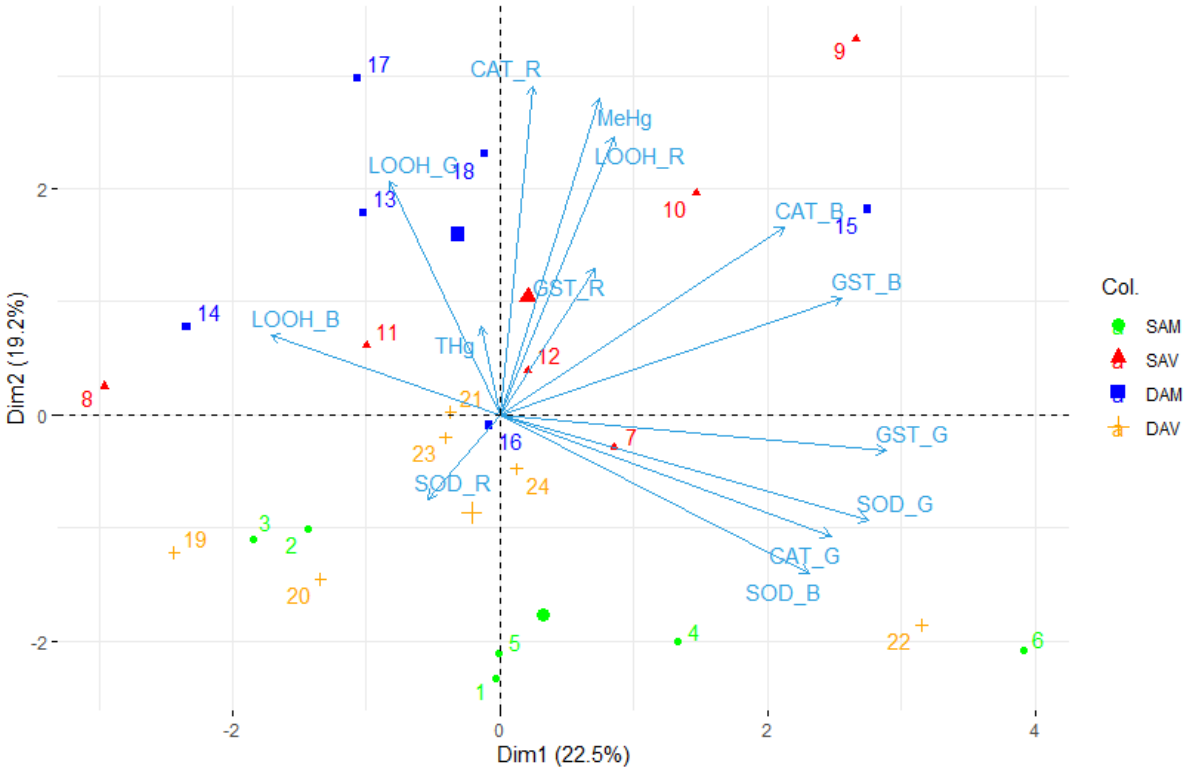

Figure 4-22. ACP représentant les concentrations en THg et MeHg et les réponses enzymatiques et de défense (CAT, GST, SOD, LOOH) dans les tissus entiers de *D. polymorpha* exposée 3 semaines en été en amont (SAM) et en aval (SAV) de la Seine ou en amont (DAM) et en aval (DAV) de la Deûle (n = 3 à 4).

1.2.4. Métabolomique

1.2.4.1. Comparaison avec T0 et entre sites

Les analyses univariées par rapport au T0 révèlent que l'encagement dans la Deûle entraîne plus de modulations d'abondance des métabolites que dans la Seine (Tableau 4-12). Ces résultats sont en cohérence avec ceux observés en hiver. Seuls l'acide malique et la méthionine sont modulés dans toutes les conditions par rapport au T0.

Tableau 4-12. Concentrations en métabolites (nmoles/mg poids sec, moyenne ± SD) dans les tissus entiers de *D. polymorpha* exposée 3 semaines en été en amont (SAM) et en aval (SAV) de la Seine ou en amont (DAM) et en aval (DAV) de la Deûle (n = 3 à 4, $p < 0.05$).

Métabolites	**T0**	**SAM**	**SAV**	**DAM**	**DAV**
Lactic acid	0,28 ± 0,18	0,36 ± 0,12	0,31 ± 0,24	0,69 ± 0,31	0,77 ± 0,16
Alanine	2,25 ± 1,03	2,72 ± 1,39	1,94 ± 1,56	3,88 ± 0,84	3,50 ± 0,41
Valine	0,24 ± 0,08	0,34 ± 0,12	0,29 ± 0,13	0,46 ± 0,08	0,45 ± 0,09
Ethanolamine	0,06 ± 0,01	0,10 ± 0,03	0,09 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01
Glycerol	0,39 ± 0,16	0,64 ± 0,56	0,81 ± 1,52	3,66 ± 0,94	2,50 ± 0,17
Phosphoric acid	6,14 ± 1,89	3,88 ± 1,32	3,68 ± 1,22	6,00 ± 1,66	6,74 ± 1,80
Isoleucine	0,24 ± 0,09	0,32 ± 0,14	0,28 ± 0,11	0,39 ± 0,07	0,40 ± 0,09
Proline	0,29 ± 0,09	0,32 ± 0,12	0,28 ± 0,12	0,39 ± 0,08	0,41 ± 0,09
Glycine	0,45 ± 0,10	0,66 ± 0,16	0,71 ± 0,37	1,36 ± 0,28	1,27 ± 0,26
Succinic acid	2,40 ± 1,96	6,97 ± 5,29	6,35 ± 2,12	5,49 ± 1,42	6,21 ± 0,05
Glyceric acid	0,13 ± 0,04	0,18 ± 0,05	0,18 ± 0,04	0,18 ± 0,04	0,19 ± 0,03
Fumaric acid	0,17 ± 0,05	0,23 ± 0,06	0,23 ± 0,05	0,22 ± 0,08	0,23 ± 0,04
Serine	0,53 ± 0,13	0,49 ± 0,10	0,43 ± 0,18	0,61 ± 0,19	0,65 ± 0,16
Pipecolic acid	0,19 ± 0,12	0,26 ± 0,16	0,25 ± 0,13	0,19 ± 0,17	0,20 ± 0,13
Threonine	0,46 ± 0,18	0,64 ± 0,15	0,54 ± 0,27	0,86 ± 0,27	0,91 ± 0,30
Malic acid	0,24 ± 0,04	0,36 ± 0,07	0,35 ± 0,11	0,51 ± 0,12	0,49 ± 0,11
Methionine	0,27 ± 0,04	0,40 ± 0,09	0,38 ± 0,05	0,36 ± 0,07	0,40 ± 0,11
Aspartic acid	0,52 ± 0,25	0,48 ± 0,10	0,36 ± 0,13	0,41 ± 0,21	0,57 ± 0,25
Gamma amino acid	0,40 ± 0,14	0,30 ± 0,11	0,18 ± 0,12	0,34 ± 0,16	0,32 ± 0,16
Cytosine	0,21 ± 0,06	0,42 ± 0,07	0,28 ± 0,07	0,23 ± 0,10	0,24 ± 0,06
Glutamic acid	2,68 ± 0,82	2,09 ± 0,66	1,51 ± 0,69	2,09 ± 0,50	2,41 ± 0,67
Phenylalanine	0,40 ± 0,14	0,66 ± 0,25	0,62 ± 0,20	0,77 ± 0,29	0,79 ± 0,23
Ornithine	0,53 ± 0,38	0,68 ± 0,32	0,47 ± 0,30	0,69 ± 0,34	0,64 ± 0,33
Fructose1	0,18 ± 0,06	0,22 ± 0,04	0,22 ± 0,05	0,19 ± 0,06	0,21 ± 0,04
Mannose1	0,28 ± 0,05	0,31 ± 0,07	0,27 ± 0,04	0,26 ± 0,07	0,27 ± 0,06
Galactose1	0,72 ± 0,61	0,43 ± 0,17	0,37 ± 0,06	0,20 ± 0,05	0,25 ± 0,21
Glucose1	3,58 ± 1,70	2,62 ± 1,00	1,57 ± 0,47	1,22 ± 0,62	1,55 ± 0,69
Lysine	0,46 ± 0,28	0,85 ± 0,50	0,60 ± 0,55	0,92 ± 0,47	0,71 ± 0,40
Octopamine	0,08 ± 0,03	0,11 ± 0,03	0,10 ± 0,03	0,08 ± 0,04	0,09 ± 0,02
Dopamine	0,12 ± 0,03	0,15 ± 0,04	0,15 ± 0,04	0,12 ± 0,05	0,13 ± 0,03
Inositol	0,19 ± 0,05	0,23 ± 0,04	0,20 ± 0,02	0,18 ± 0,06	0,22 ± 0,13
Glucose-6P1	0,30 ± 0,19	0,26 ± 0,07	0,28 ± 0,07	0,30 ± 0,07	0,34 ± 0,17
Glucose-6P2	0,22 ± 0,19	0,17 ± 0,05	0,18 ± 0,05	0,20 ± 0,05	0,24 ± 0,11

1.2.4.2. Lien avec la bioaccumulation

L'importance du sexe dans la discrimination des individus au sein des sites a été évaluée en réalisant une PLS-DA (Figure 4-23 ; Tableau S4-7). Celle-ci nous montre que la discrimination des individus se fait principalement en fonction des sites et que le sexe n'est pas un facteur discriminant. Le sexe n'a, de ce fait, pas été considéré pour les analyses de corrélation.

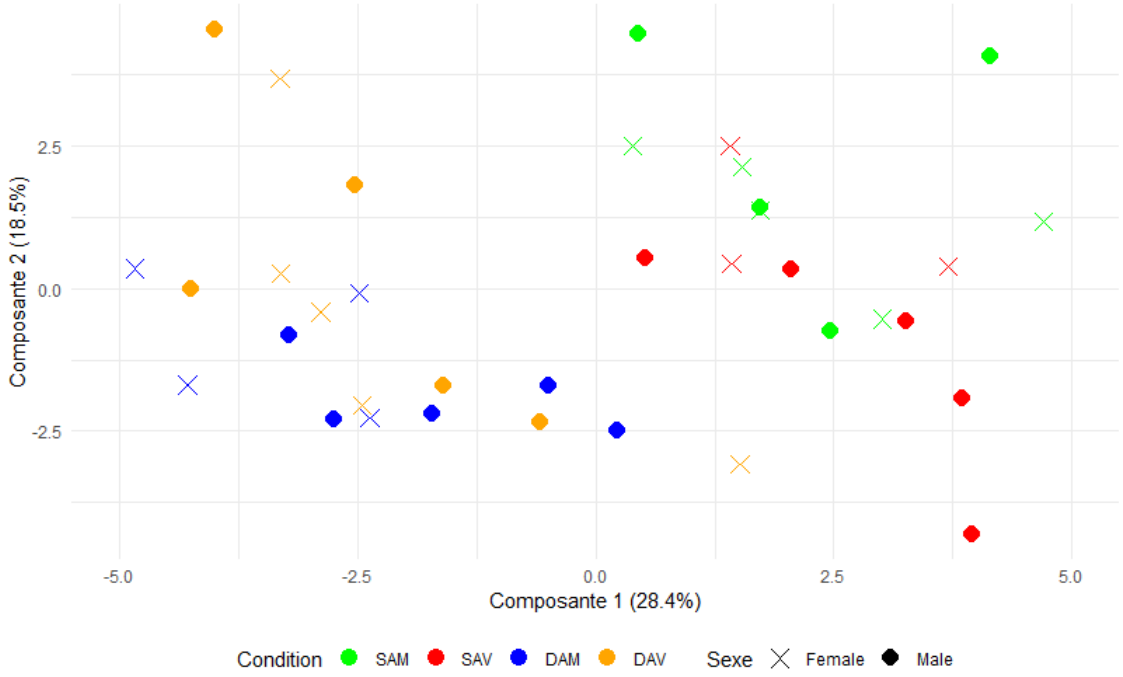

Figure 4-23. PLS-DA des concentrations de métabolites dans les tissus entiers de *D. polymorpha* femelle et mâle exposée 3 semaines en été en amont (SAM) et en aval (SAV) de la Seine et en amont (DAM) et en aval (DAV) de la Deûle (n = 3 à 4).

Comme en hiver, l'ACP montre une séparation claire des individus entre les sites de la Seine et les sites de la Deûle sur la dimension 1 (Figure 4-24). Les concentrations en THg semblent corrélées positivement avec les concentrations en glycérol, glycine, acide malique et lactique, toutes ses corrélations étant orientées vers les dreissènes exposées dans la Deûle. La glycine et le glycérol, qui peuvent indiquer une mobilisation accrue des mécanismes antioxydants et énergétiques, étaient également modulés lors de l'encagement en hiver dans la Deûle. Cette récurrence pourrait refléter une adaptation métabolique spécifique liée au stress oxydatif ou à la détoxication induite par l'exposition dans ce milieu. A l'inverse, les concentrations en glucose et galactose, orientés vers les dreissènes exposées dans la Seine, sont négativement corrélés à ces mêmes métabolites et aux concentrations en THg, suggérant une réorientation du métabolisme énergétique, possiblement liée à des conditions de contamination différentes. Comme discuté dans la partie 1, une augmentation de la demande énergétique associée à une capacité d'acquisition énergétique limitée pourrait entrainer une mobilisation du glucose et du galactose pour répondre aux besoins énergétiques des bivalves soumis à un stress (Campillo et al. 2015 ; Cao et Wang 2016). En revanche, l'association marquée de l'acide lactique et de la Deûle, suggère une mobilisation du métabolisme anaérobie (Hani et al., 2021). L'acide lactique est en effet associé à une réduction de l'utilisation du cycle de Krebs qui engendre une activation du métabolisme énergétique anaérobie. Ce phénomène se déclenche notamment lorsque la glycolyse devient plus active que la phosphorylation oxydative, entrainant l'accumulation

d'acide lactique. Par ailleurs, une activité valvaire intense, exigeant plus d'énergie que celle fournie par le métabolisme aérobie, peut également favoriser cette accumulation. Elle peut également résulter de la fermeture prolongée des valves, en réponse à des contaminants présents dans son environnement, limitant l'apport en oxygène, contraignant l'organisme à passer en métabolisme anaérobie (Hani et al., 2021).

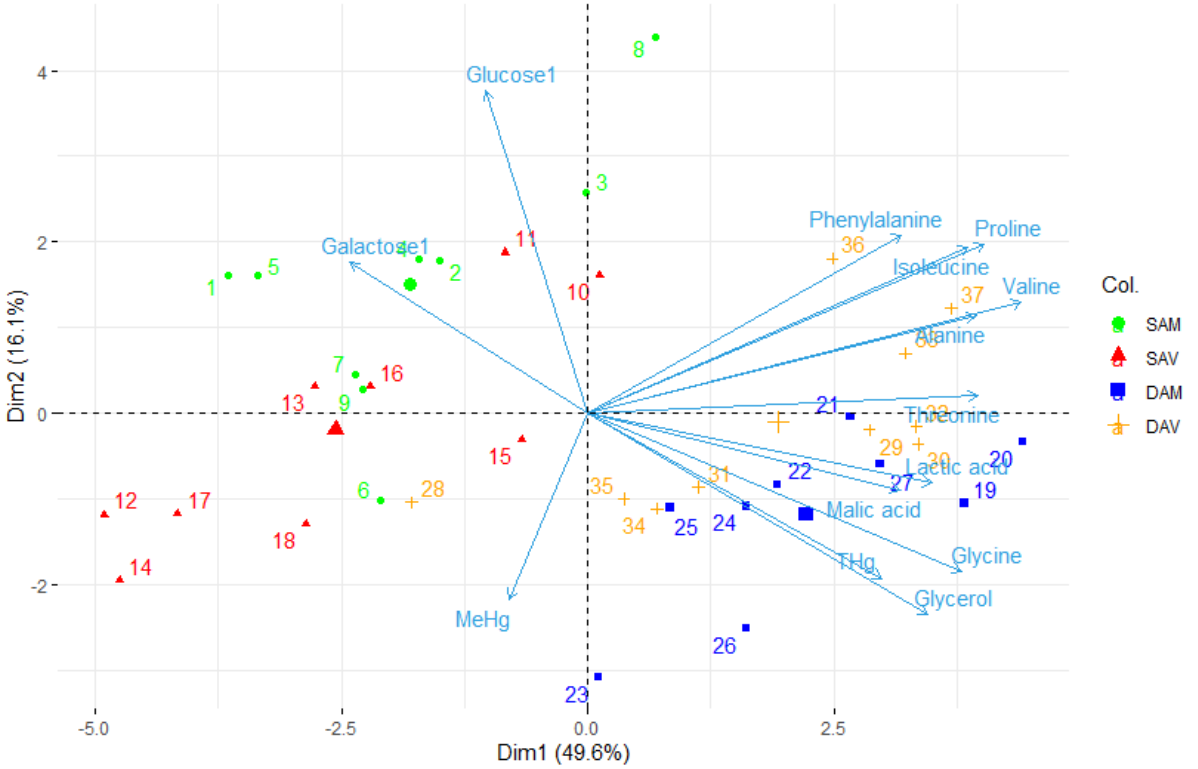

Figure 4-24. ACP représentant les concentrations en THg et MeHg et les concentrations en métabolites chez *D. polymorpha* exposée 3 semaines en été en amont (SAM) et en aval (SAV) de la Seine ou en amont (DAM) et en aval (DAV) de la Deûle (n = 3 à 4).

1.2.5. Protéomique

1.2.5.1. Comparaison avec T0 et entre sites

Sur les 2332 protéines extraites, 614 sont modulées significativement à DAM, 488 à DAV, 382 à SAM et 460 à SAV par rapport au T0. Parmi ces protéines modulées, Dans DAM et DAV, 2 x plus de protéines spécifiques sont observées à DAM et DAV par rapport à SAM et SAV (Figure 4-25). Ces résultats suggèrent qu'un encagement dans la Deûle cause une modulation de protéines plus marquée chez *D. polymorpha* qu'une exposition dans la Seine. Cette tendance est cohérente avec les résultats de métabolomique, qui montrent également une modulation plus marquée des métabolites lors d'un encagement dans la Deûle par rapport au T0.

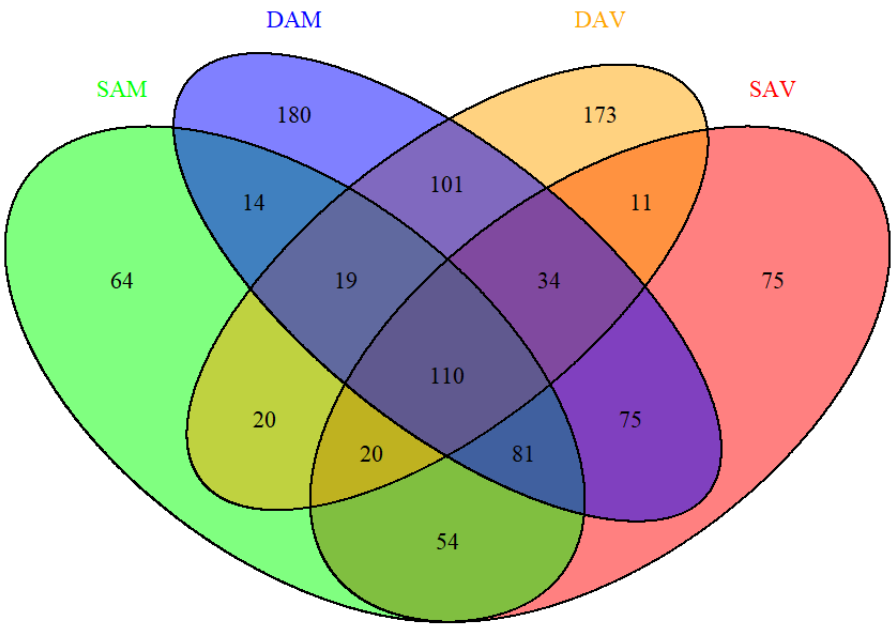

Figure 4-25. Diagramme de Venn des protéines significativement modulées par rapport au T0 en fonction des sites d'encagement (SAM : Seine amont, SAV : Seine aval, DAM : Deûle amont et DAV : Deûle aval).

1.2.5.2. Lien avec la bioaccumulation

La PLS-DA permet une discrimination nette entre les sites mais pas entre les sexes (Figure 4-26). Comme lors de l'encagement en juillet 2023 (partie 2), le sexe ne sera pas considéré pour les analyses suivantes. La PLS-DA nous a également servis à sélectionner 758 protéines dont les VIP score étaient supérieurs à 1.

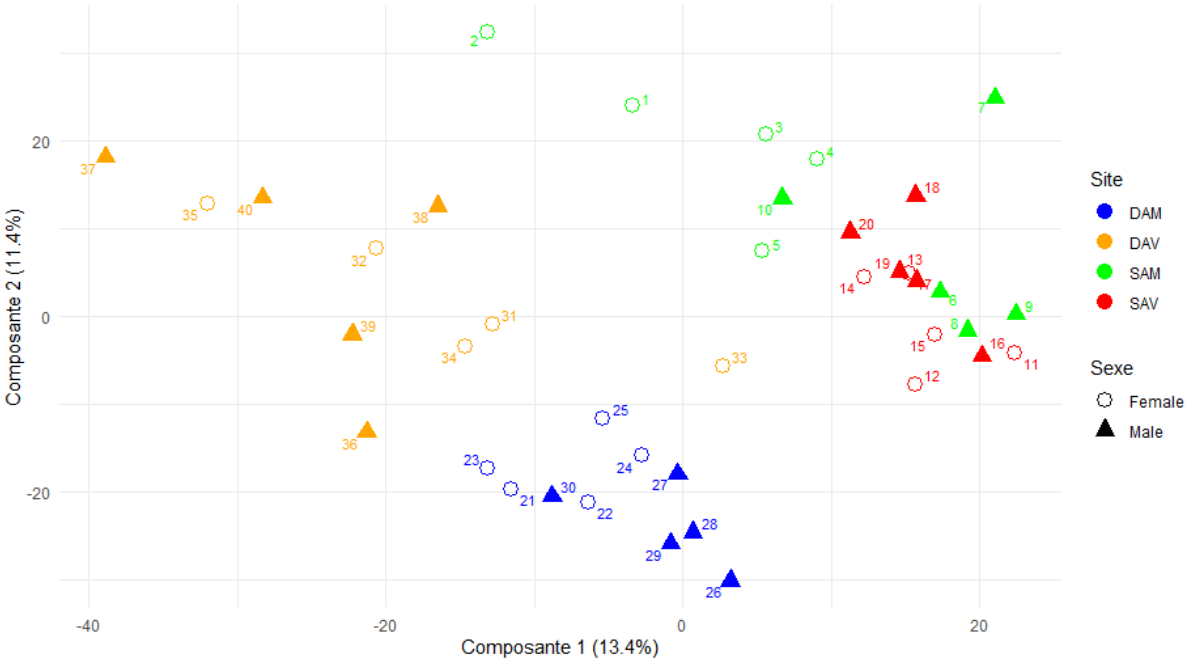

Figure 4-26. PLS-DA des spectral count des protéines dans les tissus entiers de *D. polymorpha* exposée 3 semaines en été en amont (SAM) et en aval (SAV) de la Seine ou en amont (DAM) et en aval (DAV) de la Deûle selon le site d'exposition et le sexe (n = 4 à 5).

Le diagramme de Venn révèle que parmi les 758 protéines les plus discriminantes entre les sites, la bioaccumulation du THg et du MeHg sont corrélées avec des ensembles de protéines distincts, sans aucune protéine commune entre les deux formes de Hg (Figure 4-27).

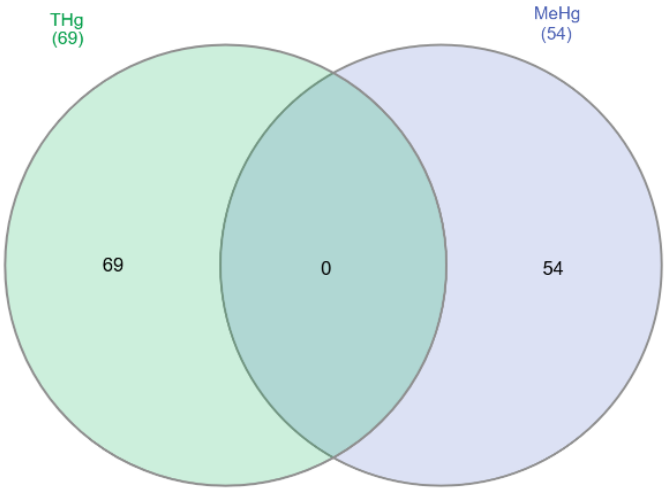

Figure 4-27. Diagramme de Venn des protéines modulées (VIP score > 1, issu d'une PLS-DA) par une exposition en milieu naturel chez *D. polymorpha* et corrélées à la bioaccumulation de THg ou MeHg (p-value < 0.05).

Les enrichissements réalisés sur les 69 protéines modulées par THg (Tableau 4-13) et les 54 protéines modulées par MeHg (Tableau 4-14) montrent que les voies métaboliques enrichies corrélées à la présence de THg sont principalement liées à la respiration cellulaire avec la glycolyse et néoglucogénèse (ko0010), le métabolisme du pyruvate (ko00620), le cycle de l'acide citrique, ou cycle de Krebs (ko00020), la fixation du carbone et son métabolisme (ko01200 et ko00710) ou encore le cycle du glyoxylate (ko00630). Les voies métaboliques enrichies corrélées à la bioaccumulation du MeHg sont principalement liées à la dégradation des cellules (ko04142 et ko04666), à la synthèse (ko00510, ko00513 et ko00520) et à la dégradation (ko00511) des glycanes ou encore la régulation du cytosquelette des cellules (ko04810).

Ces résultats montrent que la bioaccumulation de THg en milieu naturel est corrélée avec le métabolisme énergétique aérobie dans la Seine. En revanche, la bioaccumulation du MeHg montre une corrélation avec la régulation du cytosquelette, un effet déjà documenté lors d'expositions au MeHg (Miura et al. 1987 ; Pierozan et al. 2017 ; Ding et al. 2024). Cette capacité à différencier les réponses biologiques induites par le THg et le MeHg est essentielle, car ces deux formes présentent des toxicités et des mécanismes d'action distincts. L'identification de profils spécifiques, ou signatures multi-omiques, pourrait ainsi servir de base pour le développement de biomarqueurs sensibles en conditions chroniques réalistes. Ces biomarqueurs permettraient d'établir des diagnostics plus précis et des suivis personnalisés dans le cadre de programmes de biosurveillance environnementale. En pratique, ces profils moléculaires distincts pourraient faciliter la discrimination des expositions à THg et MeHg très précocement, améliorant ainsi la gestion des risques sanitaires et environnementaux liés au Hg. L'intégration multi-omique ouvre ainsi la voie à une nouvelle génération d'outils de surveillance plus sensibles, spécifiques et prédictifs.

Tableau 4-13. Résultats d'enrichissement KEGG (WebGestalt) des protéines corrélées avec la bioaccumulation du THg.

Identifiant	Nom	Ratio d'enrichissement	p-value
ko01120	Microbial metabolism in diverse environments	4,35	1,79E-06
ko01200	Carbon metabolism	5,16	5,40E-06
ko00010	Glycolysis / Gluconeogenesis	7,50	7,50E-06
ko00710	Carbon fixation in photosynthetic organisms	10,40	4,85E-04
ko01130	Biosynthesis of antibiotics	2,90	0,001
ko00620	Pyruvate metabolism	5,84	0,001
ko04964	Proximal tubule bicarbonate reclamation	9,54	0,003
ko04014	Ras signaling pathway	6,02	0,004
ko00020	Citrate cycle (TCA cycle)	5,87	0,004
ko00280	Valine, leucine and isoleucine degradation	4,15	0,007
ko04922	Glucagon signaling pathway	4,87	0,009
ko05164	Influenza A	4,77	0,009
ko01110	Biosynthesis of secondary metabolites	2,23	0,012
ko04810	Regulation of actin cytoskeleton	3,49	0,013
ko04068	FoxO signaling pathway	5,92	0,013
ko04015	Rap1 signaling pathway	4,16	0,015
ko00640	Propanoate metabolism	5,20	0,019
ko00630	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	4,90	0,022
ko05212	Pancreatic cancer	7,63	0,027
ko01230	Biosynthesis of amino acids	3,32	0,031

Tableau 4-14. Résultats d'enrichissement KEGG (WebGestalt) des protéines corrélées avec la bioaccumulation du MeHg.

Identifiant	Nom	Ratio d'enrichissement	p-value
ko04142	Lysosome	4,720	0,001
ko00513	Various types of N-glycan biosynthesis	16,688	0,001
ko00520	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	6,846	0,002
ko00511	Other glycan degradation	9,536	0,003
ko04666	Fc gamma R-mediated phagocytosis	6,209	0,004
ko00603	Glycosphingolipid biosynthesis - globo series	19,071	0,004
ko01100	Metabolic pathways	1,840	0,004
ko00190	Oxidative phosphorylation	4,450	0,012
ko00510	N-Glycan biosynthesis	7,853	0,026
ko05131	Shigellosis	4,261	0,032
ko04810	Regulation of actin cytoskeleton	3,256	0,033
ko00350	Tyrosine metabolism	6,675	0,035
ko05100	Bacterial invasion of epithelial cells	4,005	0,038
ko04721	Synaptic vesicle cycle	6,068	0,042

2. Conclusion

Cette étude visait à élargir la partie 2 en confrontant la bioaccumulation et les effets chez *D. polymorpha* à la saisonnalité pour deux sites naturels dont les sources de pollution diffèrent. Globalement, la saison n'a pas d'effet significatif marqué, les niveaux de bioaccumulation en MeHg et THg étant comparables entre l'hiver et l'été après 3 semaines d'encagement. Toutefois, les concentrations en THg semblent légèrement supérieures dans la Deûle par rapport à la Seine, ce qui pourrait refléter une plus grande biodisponibilité de l'IHg dans ce milieu, en lien avec son héritage industriel et la présence de sources locales ponctuelles. Afin d'approfondir la compréhension des mécanismes de bioaccumulation chez *D. polymorpha* et d'affiner l'interprétation des réponses omiques observées, il serait pertinent de mener des études complémentaires basées sur des suivis saisonniers et une diversification des sites d'échantillonnage. Par exemple, la mise en place de suivis à différentes saisons sur un éventail plus large de sites disposant d'un gradient de contamination en Hg, tant spatial (amont/aval, différents systèmes hydrologiques) que temporel (printemps, été, automne, hiver), permettrait d'identifier plus précisément l'influence des conditions environnementales et des régimes alimentaires sur la bioaccumulation et la modulation des voies métaboliques. En effet, élargir la diversité des suivis ainsi que le nombre de sites échantillonnés permettrait de renforcer la robustesse des conclusions et de mieux cerner les facteurs influençant la bioaccumulation et les réponses biologiques chez *D. polymorpha*.

Contrairement aux campagnes d'encagements de janvier et juillet 2023, les activités enzymatiques sont restées stables, suggérant une tolérance de *D. polymorpha* dans nos conditions expérimentales. L'approche ciblée de métabolomique confirme les observations précédentes, montrant des perturbations du métabolisme énergétique de *D. polymorpha*, plus marquées dans la Deûle. Ces observations indiquent l'activation probable du métabolisme anaérobie, dont les mécanismes précis restent encore à déterminer. L'approche protéomique corrobore ces observations en identifiant des voies métaboliques spécifiquement modulées, différenciant nettement les réponses corrélées à la bioaccumulation du THg et du MeHg. Les analyses multivariées indiquent par ailleurs que le sexe ne constitue pas un facteur confondant majeur pour les réponses métabolomiques et protéomiques, ce qui renforce la robustesse et la versatilité de l'interprétation des données. Dans l'ensemble, ces données soulignent l'intérêt de recourir à des approches intégrées pour caractériser plus finement les effets du Hg en conditions naturelles. Elles rappellent également la pertinence de la biosurveillance active, tout en soulignant la nécessité de prendre en compte la complexité des milieux contaminés, dans lesquels les effets observés ne peuvent être imputés uniquement au Hg. Cependant, la combinaison des données métabolomiques et protéomiques a mis en évidence des ensembles cohérents de métabolites et de protéines spécifiquement modulés selon la bioaccumulation des deux formes chimiques du Hg et le contexte d'exposition. En intégrant la biodisponibilité et la toxicité dans l'évaluation des risques, ces profils de biomarqueurs pourraient devenir des outils utiles pour distinguer, avec précision, l'empreinte des polluants dans des environnements complexes. Il faudrait, à l'avenir, établir le lien entre ces profils, leur niveau de réponse et un effet toxique.

3. Références

Baratange, C., Rocha de Almeida, T., Armengaud, J., Bonnard, I., David, E., Delahaut, L., Gaillet, V., Guillon, E., Kielbasa, M., Loizeau, J.-L., Maurin, N., Sayen, S., & Cosio, C. (2025). Molecular and genotoxic effects of carbamazepine and methylmercury on the gonads of *Dreissena polymorpha*. Aquatic Toxicology, 287, 107493. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2025.107493

Campillo, J. A., Sevilla, A., Albentosa, M., Bernal, C., Lozano, A. B., Cánovas, M., & León, V. M. (2015). Metabolomic responses in caged clams, *Ruditapes decussatus*, exposed to agricultural and urban inputs in a Mediterranean coastal lagoon (Mar Menor, SE Spain). Science of The Total Environment, 524-525, 136-147. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.136

Cao, C., & Wang, W.-X. (2016). Bioaccumulation and metabolomics responses in oysters *Crassostrea hongkongensis* impacted by different levels of metal pollution. Environmental Pollution, 216, 156-165. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.047

Ding, Z., Sun, Y., Wu, C., Ma, C., Ruan, H., Zhang, Y., Xu, Y., Zhou, P., Cao, Y., Xu, Z., & Xiang, H. (2024). Methylmercury chloride inhibits meiotic maturation of mouse oocytes in vitro by disrupting the cytoskeleton. Food and Chemical Toxicology, 193, 115024. https://doi.org/10.1016/j.fct.2024.115024

Hani, Y. M. I., Prud'Homme, S. M., Nuzillard, J.-M., Bonnard, I., Robert, C., Nott, K., Ronkart, S., Dedourge-Geffard, O., & Geffard, A. (2021). 1H-NMR metabolomics profiling of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): A field-scale monitoring tool in ecotoxicological studies. Environmental Pollution, 270, 116048. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116048

Miura, K., Imura, N., & Clarkson, T. W. (1987). Mechanism of Methylmercury Cytotoxicity. CRC Critical Reviews in Toxicology. https://doi.org/10.3109/10408448709089860

Pierozan, P., Biasibetti, H., Schmitz, F., Ávila, H., Fernandes, C. G., Pessoa-Pureur, R., & Wyse, A. T. S. (2017). Neurotoxicity of Methylmercury in Isolated Astrocytes and Neurons: The Cytoskeleton as a Main Target. Molecular Neurobiology, 54(8), 5752-5767. https://doi.org/10.1007/s12035-016-0101-2

4. Annexes

Tableau S 4-2. Paramètres physico-chimiques, concentrations en THg et %MeHg dans l'eau, les particules et les sédiments de la Seine et de la Deûle sur la période d'encagement en hiver (9 au 31 janvier 2024). X : pas de donnée.

Paramètres	**Seine amont**				**Seine aval**				**Deûle amont**				**Deûle aval**			
	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3
pH	8,0	8,2	7,9	8,1	7,9	8,3	7,7	8,1	7,9	8,0	8,0	7,9	7,7	7,9	8,0	8,1
Température (°C)	8,3	4,4	7,1	8,6	8,1	3,8	6,3	8,3	4,0	3,0	5,6	9,0	3,0	3,5	5,7	9,0
Conductivité (mS/m)	57,3	59,1	53,1	56,2	47,6	54,7	52,4	52,2	76,1	77,3	77,7	77,2	88,1	82,9	81,9	81,5
O_2 (mg/L)	11,8	13,6	12,9	12,2	11,9	13,7	13,1	12,4	6,7	9,4	7,8	8,7	6,3	8,8	9,0	8,7
COD (mg/L)	3,9	2,4	3,3	2,7	3,2	2,2	2,8	2,4	X	X	X	X	X	X	X	X
Débit (m^3/s)	396,3	416,4	409,9	338,5	679,1	584,1	586,3	479,9	13,2	11,1	11,0	10,6	13,2	11,1	11,0	10,6
Phytoplancton (cellules/mL)	$8x10^5$	$9x10^5$	$1x10^6$	$7x10^5$	$1x10^6$	$1x10^6$	$2x10^6$	$4x10^6$	$3x10^5$	$5x10^5$	$6x10^5$	$6x10^5$	$3x10^5$	$4x10^5$	$6x10^5$	$1x10^6$
THg_d (ng/L)	1,6	3,0	0,9	1,0	1,9	1,1	0,7	0,9	3,4	0,0	1,5	0,9	2,7	1,8	1,2	1,1
$MeHg_d$ (%)	2,7	4,6	8,8	5,6	4,7	6,0	10,7	6,0	5,1		5,3	6,7	3,1	3,9	5,1	5,0
THg_p (µg/g)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
$MeHg_p$ (%)	4,2	5,2	11,9	2,1	8,3	3,9	3,6	3,1	2,2	1,3	2,7	0,4	0,7	0,4	0,0	0,1
THg sédiments (µg/g)	X	X	X	0,1	X	X	X	0,3	X	X	X	0,1	X	X	X	0,2

Tableau S 4-3. Activité des CAT, GST et SOD et LOOH dans les tissus de *D. polymorpha* exposée 3 semaines dans SAM, SAV, DAM et DAV en hiver (n = 3 à 6, p < 0.05).

Tissu	Condition	CAT	GST	SOD	LOOH
Branchies	T0	65,96 ± 32,19	201,99 ±149,51	96,77 ± 85,37	29,12 ± 6,58
	SAM	64,38 ± 18,81	246,60 ± 113,34	91,46 ± 106,95	18,41 ± 10,03
	SAV	87,65 ± 32,25	245,16 ± 103,97	61,60 ± 21,34	14,34 ± 6,99
	DAM	84,44 ± 52,20	279,11 ± 123,77	95,26 ± 73,53	20,85 ± 6,44
	DAV	93,31 ± 12,63	204,76 ± 44,05	54,88 ± 12,77	11,36 ± 3,27
Glande digestive	T0	361,34 ± 117,60	684,97 ± 241,77	216,25 ± 96,05	20,91 ± 10,19
	SAM	289,03 ±88,52	687,56 ± 227,01	164,08 ± 65,54	24,26 ± 12,47
	SAV	385,33 ± 62,06	748,52 ± 375,13	193,20 ± 142,64	28,88 ± 10,91
	DAM	373,66 ± 128,97	698,46 ± 380,12	280,15 ± 158,68	47,29 ± 14,71
	DAV	338,16 ± 119,38	761,28 ± 321,60	115,38 ± 47,16	39,03 ± 21,28
Restes	T0	89,91 ± 28,85	289,02 ± 64,11	55,75 ± 12,14	3,60 ± 1,87
	SAM	105,80 ± 32,38	255,22 ± 20,91	68,46 ± 10,96	4,94 ± 2,40
	SAV	99,61 ± 27,07	290,22 ± 71,84	55,27 ± 13,71	5,50 ± 2,19
	DAM	98,98 ± 31,72	264,83 ± 64,66	66,47 ± 21,60	6,44 ± 1,81
	DAV	124,95 ± 36,61	268,07 ± 58,23	61,30 ± 23,91	4,96 ± 0,77

Tableau S 4-4. VIP score des métabolites dans les tissus entiers de *D. polymorpha* exposée 3 semaines en hiver en amont (SAM) et en aval (SAV) de la Seine ou en amont (DAM) et en aval (DAV) de la Deûle (n = 4 à 5). Les métabolites dont les VIP score sont supérieurs à 1 sont indiqués en gras.

Métabolite	VIP score
Glycerol	**2,361**
Glycine	**2,088**
Aspartic acid	**1,647**
Phosphoric acid	**1,604**
Gamma amino acid	**1,389**
Serine	**1,336**
Glutamic acid	**1,297**
Succinic acid	**1,115**
Threonine	0,983
Ethanolamine	0,955
Phenylalanine	0,929
Pipecolic acid	0,872
Dopamine	0,868
lactic acid	0,854
Cytosine	0,834
Mannose1	0,827
Galactose1	0,813
Octopamine	0,799
Fructose1	0,778
Lysine	0,763
Fumaric acid	0,721
Glyceric acid	0,696
Glucose-6P2	0,526
Methionine	0,472
Inositol	0,416
Malic acid	0,406
Glucose-6P1	0,405
Valine	0,383
Glucose1	0,339
Ornithine	0,109
Alanine	0,070
Isoleucine	0,058
Proline	0,043

Tableau S 4-5. Paramètres physico-chimiques, concentrations en THg et %MeHg dans l'eau, les particules et les sédiments de la Seine et de la Deûle sur la période d'encagement en été (5 au 27 juin 2024). X : pas de donnée.

Paramètres	**Seine amont**				**Seine aval**				**Deûle amont**				**Deûle aval**			
	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3
pH	7,9	8,0	7,9	7,9	8,0	8,0	7,9	7,9	7,9	8,0	7,9	8,0	7,8	7,8	7,8	7,8
Température (°C)	17,6	18,7	18,9	21,0	17,4	19,1	19,3	21,3	17,0	16,0	17,2	20,7	17,2	17,5	17,1	20,7
Conductivité (mS/m)	55,4	56,4	54,6	46,7	54,9	56,1	57,5	46,1	74,5	71,4	71,2	71,3	78,0	75,7	76,6	74,5
O_2 (mg/L)	9,4	9,4	9,3	8,9	9,7	8,9	8,5	8,5	8,1	7,5	7,1	7,7	7,3	7,0	8,1	7,4
COD (mg/L)	3,9	3,2	2,6	7,3	2,6	2,9	2,1	5,8	X							
COT (mg/L)	3,9	3,2	2,6	7,9	4,0	3,3	2,7	8,1	X							
Débit (m^3/s)	267,7	205,1	359,6	411,6	378,1	284,6	421,0	478,7	12,24	13,43	12,93	10,18	12,24	13,43	12,93	10,18
Phytoplancton (cellules/mL)	$1x10^6$	$1x10^6$	$1x10^6$	$3x10^6$	$4x10^6$	$1x10^6$	$1x10^6$	$4x10^6$	$2x10^6$	$1x10^6$	$1x10^6$	$2x10^6$	$1x10^6$	$1x10^6$	$7x10^5$	$8x10^5$
THg_d (ng/L)	2,6	2,0	1,1	2,2	1,5	1,9	1,4	2,2	3,2	1,8	1,5	2,0	2,3	1,8	1,6	1,6
$MeHg_d$ (%)	2,1	8,0	9,8	3,0	10,3	8,8	8,9	X	6,9	10,6	12,6	9,5	9,5	10,2	11,3	6,4
THg_p (µg/g)	0,2	0,2	0,2	0,3	0,5	0,5	0,3	0,4	6,8	1,4	3,6	3,4	4,4	5,1	2,7	1,6
$MeHg_p$ (%)	3,6	1,2	4,5	3,9	2,3	3,6	1,3	0,6	0,3	0,4	0,1	0,4	0,1	0,1	0,0	0,4
THg sédiments (µg/g)	X	X	X	0,1	X	X	X	0,2	X	X	X	1,8	X	X	X	2,6

Tableau S4-6. Activité des CAT, GST et SOD et LOOH dans les tissus de *D. polymorpha* exposée 3 semaines dans SAM, SAV, DAM et DAV en été (n = 3 à 6, p < 0.05).

Tissu	Condition	CAT	GST	SOD	LOOH
Branchies	T0	16,26 ± 2,41	145,39 ± 31,27	11,50 ± 2,09	23,77 ± 12,07
	SAM	19,72 ± 3,28	190,42 ± 71,47	14,80 ± 2,49	15,53 ± 8,20
	SAV	26,38 ± 8,25	209,89 ± 60,59	12,56 ± 4,78	18,30 ± 17,86
	DAM	23,59 ± 4,37	193,29 ± 39,01	13,13 ± 1,72	17,60 ± 3,48
	DAV	22,25 ± 6,70	148,52 ± 36,12	14,97 ± 3,20	19,83 ± 8,53
Glande digestive	T0	161,75 ± 37,19	265,72 ± 63,46	8,61 ± 1,74	37,13 ± 15,38
	SAM	215,04 ± 65,83	430,26 ± 170,18	9,67 ± 2,35	26,30 ± 2,43
	SAV	184,09 ± 46,59	367,51 ± 129,47	8,68 ± 1,48	32,23 ± 8,14
	DAM	192,91 ± 53,03	334,43 ± 124,73	7,59 ± 2,27	41,69 ± 18,30
	DAV	225,03 ± 75,74	336,67 ± 122,42	9,00 ± 2,79	26,89 ± 7,76
Restes	T0	5,41 ± 0,87	194,13 ± 27,94	8,10 ± 2,36	11,13 ± 4,49
	SAM	5,03 ± 0,18 ^{b}	221,20 ± 27,42	10,41 ± 3,28	2,83 ± 0,98
	SAV	7,28 ± 1,38 ^{ab}	204,64 ± 17,34	8,74 ± 1,31	5,75 ± 2,95
	DAM	7,89 ± 1,92 ^{a}	225,43 ± 63,43	7,80 ± 0,77	6,09 ± 2,82
	DAV	6,21 ± 0,96 ^{ab}	172,57 ± 28,76	7,88 ± 1,38	5,50 ± 1,86

Tableau S4-7. VIP score des métabolites dans les tissus entiers de *D. polymorpha* exposée 3 semaines en été en amont (SAM) et en aval (SAV) de la Seine ou en amont (DAM) et en aval (DAV) de la Deûle (n = 4 à 5). Les métabolites dont les VIP score sont supérieurs à 1 sont indiqués en gras.

Métabolite	VIP score
Glycine	**1,911**
Glycerol	**1,895**
lactic acid	**1,661**
Phosphoric acid	**1,629**
Malic acid	**1,498**
Valine	**1,424**
Threonine	**1,414**
Alanine	**1,317**
Serine	**1,223**
Galactose1	**1,183**
Proline	**1,122**
Isoleucine	**1,063**
Glutamic acid	0,919
Glucose-6P2	0,909
Glucose1	0,907
Gamma amino acid	0,828
Glucose-6P1	0,730
Dopamine	0,719
Phenylalanine	0,687
Octopamine	0,608
Aspartic acid	0,580
Fructose1	0,575
Cytosine	0,498
Pipecolic acid	0,498
Mannose1	0,466
Ornithine	0,400
Ethanolamine	0,361
Inositol	0,308
Succinic acid	0,277
Lysine	0,240
Fumaric acid	0,194
Glyceric acid	0,158
Methionine	0,146

DISCUSSION GÉNÉRALE

Le Hg demeure un contaminant sujet à préoccupation en milieu aquatique, en raison de sa persistance, de la méthylation de l'IHg et de la bioamplification du MeHg le long des réseaux trophiques. Dans la littérature, le cycle biogéochimique du Hg est majoritairement étudié en milieu marin, pourtant les mêmes phénomènes sont observés en milieu dulcicole. Cependant, en raison d'une diversité et d'une complexité moindres, ainsi que de contraintes spatiales et saisonnières plus marquées, les réseaux trophiques d'eau douce tendent généralement à être plus courts que ceux du milieu marin, pouvant limiter les concentrations en MeHg retrouvées chez les super-prédateurs. Comprendre les mécanismes de transfert du Hg, en particulier sur les premiers maillons de la chaine trophique, est essentiel pour mieux évaluer son devenir et ses effets dans les écosystèmes d'eau douce. Dans ce contexte, *D. polymorpha* constitue un modèle d'étude pertinent en raison de sa capacité à bioaccumuler les contaminants, notamment le Hg. Ce travail de thèse avait pour ambition d'apporter de nouvelles connaissances sur le transfert trophique du Hg du phytoplancton vers *D. polymorpha* en combinant des expérimentations en conditions contrôlées et en milieu naturel. Ainsi, dans la suite de cette discussion, nous aborderons des points plus transversaux, qui n'ont pas été traités dans les chapitres plus ciblés. L'objectif est d'aller au-delà de l'analyse des résultats spécifiques pour explorer leurs implications plus larges et leur cohérence dans un contexte écotoxicologique et mécanistique.

1. Bioaccumulation et effets biologiques du Hg par l'alimentation chez *D. polymorpha*

L'approche intégrée combinant des expérimentations en conditions contrôlées et en milieu naturel, et associant bioaccumulation, biomarqueurs de défense et analyses omiques, visait à identifier des voies de toxicité distinctes entre l'IHg et le MeHg. Les expérimentations en conditions contrôlées ont permis de confirmer la capacité de *D. polymorpha* à bioaccumuler rapidement le Hg issu du phytoplancton, permettant ainsi de valider son rôle potentiel comme maillon du transfert trophique du MeHg en eau douce. Ces résultats ont ensuite été complétés par des suivis en milieu naturel, réalisés sur deux rivières aux profils de contamination contrastés (Seine et Deûle), afin de mettre en évidence les différences de bioaccumulation susceptibles de causer des effets physiologiques et moléculaires variés chez *D. polymorpha*. L'influence de la distance à la source principale ainsi que la saisonnalité ont également été explorés. La combinaison d'expérimentations en conditions contrôlées et en milieu naturel a ainsi permis d'identifier des voies de toxicité distinctes de l'IHg et du MeHg chez *D. polymorpha*.

Dans le chapitre 1, les concentrations en Hg mesurées dans les différents tissus augmentaient au cours du temps sur 4 jours d'exposition. Dans les chapitres 3 et 4 – partie 1, nous avons utilisé les isotopes stables et enrichis du Hg, ce qui nous a permis de mettre en évidence une accumulation du MeHg et de l'IHg à très basse concentration après 4 jours d'exposition, suivi d'une possible dépuration pour l'IHg en phase de dépuration, alors que le MeHg continue d'augmenter. Cependant, ces différences ne se sont pas révélées significatives dans nos conditions expérimentales et devront être confirmées par des expérimentations complémentaires. Cette expérimentation nous a également permis de mettre en évidence des différences de bioaccumulation entre le Hg provenant de l'eau et de l'alimentation, notamment au niveau des tissus étudiés. Nous avons aussi montré que le MeHg présent dans les microalgues peut impacter, sur un temps court, le comportement de filtration de la dreissène. Les encagements en milieu naturel (chapitre 4) ont également montré la capacité de *D. polymorpha* à accumuler le Hg présent dans son environnement, soulignant ainsi sa pertinence en tant

qu'espèce pour la biosurveillance dans le contexte de la pollution environnementale au Hg. Des effets sur le métabolome et le protéome de la dreissène ont été observés, dont la mise au regard avec la bioaccumulation du Hg est encore prématurée. Ce travail de thèse a également permis, dans son ensemble, de soulever de nouvelles questions liées à la bioaccumulation et aux effets du Hg par voie trophique chez *D. polymorpha* que nous abordons ci-dessous.

1.1. Des différences marquées entre les branchies et la glande digestive

Des différences marquées de bioaccumulation et d'activité des enzymes du stress antioxydant ont été mises en évidence entre les tissus étudiés. Pour la bioaccumulation, dans le chapitre 3, une exposition à l'IHg et au MeHg via l'eau a entrainé des concentrations plus élevées dans les branchies tandis qu'une exposition via l'ingestion de Chlorelles a causé une bioaccumulation plus élevée dans la glande digestive. Ces résultats suggèrent que la voie d'exposition au Hg pour *D. polymorpha* détermine la répartition du Hg dans les tissus. Plusieurs études ont montré que la distribution des métaux chez les bivalves varie selon la voie d'exposition, les branchies accumulant préférentiellement les métaux dissous et la glande digestive ceux issus de l'alimentation (Ahmad et al., 2011; Domouhtsidou & Dimitriadis, 2000; Metian et al., 2009; Yap et al., 2004). Cependant, cette différence entre tissus n'était pas aussi marquée dans le chapitre 1, quand les microalgues ont été contaminées avec des solutions standards de IHg et MeHg, probablement en raison du Hg présent naturellement dans les biotes. L'utilisation des isotopes stables et enrichis du Hg a été essentielle car elle a permis de mettre en évidence avec plus de précision ces différences tissulaires. Dans notre étude, la glande digestive apparaît donc comme le tissu cible lors d'une exposition par voie alimentaire, en cohérence avec son rôle central dans la digestion des microalgues et la détoxication chez les bivalves (Faggio et al., 2018). La glande digestive des moules fait partie des tissus couramment utilisés pour estimer l'impact des xénobiotiques sur leur santé. En effet, les lysosomes des cellules digestives sont responsables de la digestion intracellulaire des nutriments et de la défense antioxydante (Faggio et al., 2016), et également considérés comme les principaux organites de la séquestration et de la détoxication des métaux toxiques et des polluants organiques (Marigómez et al., 2002). Cependant, notre étude a également montré pour la première fois que le MeHg présent dans les microalgues est également bioaccumulé par contact direct avec les branchies, entraînant une toxicité spécifique à ce tissu.

Une autre différence entre les tissus concerne les niveaux basaux des activités enzymatiques. Dans les trois parties du chapitre 4, les niveaux basaux d'activité enzymatique des CAT et GST étaient plus élevés dans la glande digestive que dans les branchies et les restes. Les niveaux de péroxydation lipidique (LOOH) étaient également supérieurs dans la glande digestive lors des encagements réalisés en été (parties 2 et 3). Cette spécificité tissulaire a également été rapportée chez la moule d'eau douce *Unio pictorum* collectée dans une rivière impactée par des intrants urbains, où les activités des CAT, SOD et GST plus élevées dans la glande digestive que dans les branchies (Borković-Mitić et al., 2024). De même, chez le bivalve *Unio tumidus* encagé dans la rivière Fensch (Moselle, France), les activités enzymatiques étaient supérieures dans la glande digestive comparé aux branchies (Cossu et al., 1997). Les auteurs ont alors suggéré que la sensibilité des branchies provenait de niveaux basaux inférieurs sur le site référence, entraînant des défenses moindres et des effets plus rapides en cas d'exposition aux contaminants. Chez *Scrobicularia plana* collecté sur un site contaminé au Hg au Portugal, une augmentation significative de la péroxydation lipidique a été observée dans les branchies, tandis

que la glande digestive montrait une diminution (Ahmad et al., 2011). Dans l'ensemble, ces travaux suggèrent que l'activité des enzymes antioxydantes est plus élevée dans la glande digestive, en lien avec un métabolisme plus intense (digestion) et son rôle central dans la bustal (Bustamante et al., 2002; Raftopoulou & Dimitriadis, 2011). Les branchies, quant à elles, sont directement exposées au milieu et à l'oxygène pendant la respiration et la filtration, ce qui pourrait accroître leur exposition à divers polluants et une pression d'oxygène dissous plus élevée, entrainant du stress oxydatif. Néanmoins, dans ce travail de thèse, la forte variabilité observée dans les réponses enzymatiques n'a pas permis de dégager un profil récurrent entre les différentes expérimentations. Ces observations soulignent l'importance de considérer la spécificité tissulaire dans l'évaluation de la toxicité du Hg chez *D. polymorpha* et ouvrent la voie à des études futures visant à mieux comprendre comment les différences de bioaccumulation et de réponses enzymatiques entre tissus influencent les effets physiologiques et moléculaires à l'échelle de l'organisme. Ainsi, ce type de réponse semble particulièrement pertinent pour relier les résultats omiques à un phénotype observable, notamment la peroxydation lipidique, qui constitue un marqueur clair de stress.

1.2. La variabilité inter-individuelle chez *D. polymorpha*

Une des limites rencontrées au cours de ce travail de thèse concerne la variabilité des réponses mesurées chez *D. polymorpha*. Cette variabilité combinée à un nombre de réplicats limité par les contraintes expérimentales en laboratoire (en moyenne, n = 5), a souvent conduit à peu d'effets significatifs, même lorsque la bioaccumulation et les réponses biologiques semblaient modulées. Les dreissènes provenaient de populations sauvages, et présentaient des comportements et réponses biologiques plutôt variables, même issues d'une même pêche. Dans les populations naturelles, ces différences peuvent s'expliquer par des facteurs intrinsèques, liés au patrimoine génétique des individus, permettant de conserver une diversité génétique, ou à des facteurs extrinsèques, tels que les conditions abiotiques et biotiques du milieu (Devin et al., 2014). Deux stratégies peuvent être envisagées pour mieux détecter des effets significatifs : analyser un plus grand nombre d'individus séparément, ce qui augmente la puissance statistique mais à l'inconvénient d'être plus coûteux et chronophage, ou travailler sur des pools d'individus, permettant de réduire le poids de la variabilité individuelle tout en conservant une représentation fiable des réponses biologiques moyennes pour un coût équivalent (Barjhoux et al., 2020).

Cette variabilité naturelle souligne aussi l'importance d'acquérir des données à long terme sur les populations étudiées, ainsi que d'intégrer les paramètres environnementaux et le niveau de contamination dans l'interprétation des réponses biologiques (Devin et al., 2025). Elle conditionne également la définition des niveaux de référence, qui doivent être établis dans des écosystèmes témoins et pour des populations considérées non impactées (Coulaud et al. 2011 ; Jubeaux et al. 2012 ; Xuereb et al. 2009). Dans le cas de *D. polymorpha*, et dans les conditions spécifiques de nos expérimentations, qu'elles soient menées en conditions contrôlées ou en milieu naturel, ces données de référence restent à étoffer. Cette absence ne traduit pas un manque de rigueur méthodologique mais reflète les limites des connaissances actuelles, restreignant notre capacité à distinguer avec certitude les effets imputables au Hg de la variabilité naturelle propre à l'espèce. Cependant, cette variabilité n'est pas uniquement un obstacle : il est intéressant de noter que la variabilité interindividuelle tend à diminuer sous l'effet d'un stress, offrant une signature potentiellement exploitable comme marqueur sensible de perturbation

environnementale. Bien que cette réduction de variabilité soit déjà utilisée comme indicateur de stress dans des modèles de biométrie comportementale (Crasson et al., 2001), sa généralisation comme réponse mesurable nécessite une standardisation expérimentale difficilement compatible avec l'hétérogénéité naturelle des populations sauvages. Néanmoins, ce qui constitue aujourd'hui une limite expérimentale pourrait, si ce verrou était levé, ouvrir la voie à de nouveaux indicateurs de perturbation dû au stress environnemental.

1.3. Les approches omiques : vers une intégration dans les programmes de biosurveillance ?

Les biomarqueurs d'exposition à la pollution ont été largement utilisés au cours des dernières décennies pour surveiller la santé des organismes et donc évaluer l'état de l'environnement. Cependant, l'utilisation de biomarqueurs classiques contre les facteurs de stress biotiques ou abiotiques peut être limitée par leur manque de sensibilité et de spécificité. Par conséquent, depuis une dizaine d'années, la recherche de nouveaux biomarqueurs s'est intéressée aux méthodes « omiques » (Campos et al., 2012). Les méthodes omiques les plus largement utilisées sont la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique. Par exemple, la transcriptomique a mis en évidence une signature de réponse à la biodisponibilité du Hg chez *Elodea nuttallii* (Regier et al., 2013), tandis que la protéomique a révélé le mode d'action de l'hépatotoxicité chronique du Hg chez le poisson medaka (Wang et al., 2013). De son côté, la métabolomique appliquée à *M. edulis* a révélé des signatures moléculaires liées au développement gonadique, au sexe et au site d'exposition (Kronberg et al., 2021).

Les approches omiques utilisées dans ce travail de thèse ont permis de mettre en évidence des profils métaboliques distincts entre les branchies et la glande digestive lors d'exposition à l'IHg et au MeHg par rapport aux individus témoins. En conditions contrôlées, les DEGs et DAPs modulés diffèrent globalement selon l'exposition à l'IHg ou au MeHg, tandis que les DAMs sont surtout modulés par une exposition au MeHg (Chapitre 2). Le principal inconvénient de la transcriptomique et de la protéomique, est que, bien qu'elle fournisse des informations importantes sur les changements au niveau de l'ARNm et de l'abondance des protéines, celles-ci pourraient ne pas être corrélées avec l'activité métaboliques des protéines. Aussi bien que les résultats ouvrent des perspectives intéressantes, leur interprétation demeure limitée par le fait que l'annotation fonctionnelle repose sur l'homologie de séquence ; seule une validation expérimentale permet de confirmer le rôle effectif des gènes et protéines identifiés. Toutefois, de telles études fonctionnelles ne sont pas réalisables chez *D. polymorpha*, dont le cycle de vie complet n'est pas maîtrisé en conditions de laboratoire.

Malgré ces limites inhérentes à ces méthodes, les enrichissements ont révélé des voies modulées associées aux systèmes immunitaire, digestif et endocrinien, dont les effets sont déjà documentés, notamment chez l'Homme (Afzal et al., 2025; Pollard et al., 2019; Tan et al., 2009). On identifie également différentes voies liées aux métabolismes des vitamines, des acides aminés, des lipides ou encore au métabolisme énergétique, souvent identifiés lors d'une exposition au Hg (Baratange et al., 2023, 2025; Cosio et al., 2021). Ces enrichissements sont également observés chez *D. polymorpha* en milieu naturel, avec une tendance pour une corrélation entre la bioaccumulation du THg, le métabolisme énergétique et la respiration cellulaire, et entre la bioaccumulation du MeHg, le métabolisme des sucres et la régulation du cytosquelette (chapitre 4 – partie 3). Contrairement à la transcriptomique et à la protéomique,

qui reflètent des niveaux intermédiaires de régulation, la métabolomique apporte une lecture plus directe du phénotype cellulaire, car les métabolites sont les produits finaux des processus biologiques (Xu et al., 2015).

Dans ce travail de thèse, deux approches métabolomiques ont été utilisées. Deux stratégies sont distinguées : les approches « ciblées » qui impliquent l'analyse de métabolites connus, et les approches « non ciblées », qui visent à détecter autant de caractéristiques distinctes que possible et qui, combinées à des statistiques multivariées, identifier les biomarqueurs discriminants, entre individus témoins et exposés par exemple (Xu et al., 2015). Cette dernière est vue comme particulièrement pertinente pour la découverte de nouveaux biomarqueurs associés aux contaminations métalliques (Hines et al., 2010; Xu et al., 2015). Dans un premier temps, une méthode non ciblée a permis de discriminer les DAMs modulés par une exposition à l'IHg et au MeHg par rapport aux témoins en conditions contrôlées (Chapitre 2). Cependant, le manque d'annotations disponibles chez la dreissène a fortement limité l'interprétation des résultats. C'est pourquoi, une approche ciblée a été privilégiée par la suite, afin d'établir les niveaux de référence de certains métabolites et de comparer les individus témoins et encagés. Cette approche ciblée a révélé des différences de concentrations de métabolites liés au métabolisme des acides aminés et énergétique chez les organismes exposés dans la Seine et la Deûle, comme cela a déjà été observé chez d'autres bivalves en métabolomique non ciblée (Liu et al., 2011). Le principal inconvénient des approches ciblées est une couverture limitée du métabolome, ce qui augmente le risque de manquer des réponses métabolomiques d'intérêt. Ce contraste souligne à la fois le potentiel de la métabolomique pour explorer les réponses physiologiques de *D. polymorpha* et, en même temps, le manque de connaissances de base sur son métabolisme, qui constitue encore un frein majeur à l'interprétation fine des résultats. Le développement de bases de données métabolomiques spécifiques à cette espèce représenterait ainsi une avancée méthodologique importante, permettant d'améliorer l'annotation et l'interprétation des données. Par ailleurs, renforcer ces connaissances contribuerait aussi à consolider l'usage de *D. polymorpha* comme bioindicateur pertinent de la contamination en Hg et d'autres stress environnementaux en milieu dulcicole. En effet, la métabolomique est devenue un outil puissant en sciences de l'environnement et du vivant pour élucider les perturbations biologiques en réponse à des stimuli internes ou externes (Lenski et al., 2023). Cette approche est particulièrement pertinente pour la découverte de nouveaux biomarqueurs associés aux contaminations métalliques (Hines et al., 2010; Xu et al., 2015).

Dans ce contexte, le métabolome pourrait servir de proxy pour la santé de l'écosystème. Néanmoins, l'analyse métabolomique reste un défi en raison de la sensibilité du métabolome aux variations environnementales et physiologiques, telles que la température, la saison, le stade gonadique ou le site d'exposition (Bundy et al., 2009; Kronberg et al., 2021). Ainsi, il est difficile de définir un « métabolisme normal », celui-ci fluctuant en permanence au cours du cycle annuel (Bundy et al., 2009; Kronberg et al., 2021). Dans ce contexte, il est intéressant de noter que, dans les approches ciblées employées, aucun effet confondant du sexe n'a été observé dans nos conditions d'exposition et pour les périodes étudiées, simplifiant l'interprétation des résultats. Ainsi, la métabolomique environnementale utilisant *D. polymorpha* se révèle prometteuse pour les évaluations écotoxicologiques en eau douce (Legrand et al., 2023; Prud'homme et al., 2020; Watanabe et al., 2015).

Pour aller plus loin dans l'utilisation des approches omiques, il serait pertinent de combiner les analyses omiques sur les mêmes échantillons pour mettre en place une approche statistique intégrative des omiques (Adossa et al., 2021; Argelaguet et al., 2021). La plupart des réponses de biomarqueurs obtenues dans ce travail sont issues d'individus distincts, en raison de la petite taille des individus et de leurs organes, constituant alors une limite technique pour la réalisation d'analyses multi-omiques intégrées sur un même échantillon. Cette contrainte a limité l'utilisation des outils statistiques récents de multi-omiques capables de capturer la complexité des systèmes biologiques. À l'avenir, le poolage d'individus pourrait constituer une solution efficace, permettant de disposer de quantités suffisantes de matériel tout en conservant une représentation fiable des réponses biologiques. L'intégration multi-omiques permettrait ainsi de combiner les informations complémentaires issues de chaque approche et de reconstruire une image plus complète des phénotypes étudiés (Yan et al., 2018). De telles analyses ont été réalisées chez des bivalves pour évaluer la réponse au stress salin et les mécanismes de tolérance de l'huître *C. gigas* (Chen et al., 2023), pour étudier les interactions métabolites et protéiques associées à la mortalité estivale chez la moule *Perna canaliculus* (Li et al., 2020) ou encore pour explorer l'impact des conditions environnementales sur les transcriptomes et protéomes de *Mytilus californianus* (Gleason et al., 2023).

Bien qu'encore peu intégrées dans les programmes de surveillance, les technologies omiques à haut débit offrent un potentiel considérable pour caractériser et quantifier la fitness des organismes à l'échelle moléculaire. Pour les espèces non modèles, il est cependant crucial de relier les données omiques au phénotype et au mode de vie de l'organisme (cycle de vie, reproduction, sexe, âge, état physiologique) afin d'interpréter correctement les variations métaboliques observées (Hines et al., 2007a, b). Chez *D. polymorpha*, des recherches approfondies sur le cycle métabolique naturel et sur les réponses aux stress anthropiques sont donc nécessaires pour asseoir l'utilisation des approches omiques dans les programmes de biosurveillance. Dans ce contexte, de futures perspectives incluent l'étude d'un plus grand nombre de sites afin de mieux représenter la variabilité environnementale, la réalisation de mesures répétées tout au long de l'année pour tenir compte des fluctuations saisonnières du métabolome et des paramètres physiologiques, ainsi que l'acquisition de données sur d'autres contaminants pour compléter l'évaluation des pressions chimiques. Ces améliorations permettraient de consolider l'usage des approches omiques et d'identifier des biomarqueurs plus robustes et représentatifs de l'état de santé de *D. polymorpha*.

1.4. Du laboratoire au terrain : une méthode innovante pour étudier le transfert et les effets du Hg

La voie de contamination du biote et donc de l'Homme, est alimentaire, le MeHg se bioamplifiant le long des réseaux trophiques. Pourtant, les études expérimentales sur la contamination au Hg dans le biote restent majoritairement basées sur une exposition par l'eau, limitant ainsi la représentativité des scénarios naturels. Des études précédentes ont montré le transfert alimentaire de l'IHg chez divers organismes, du polychète *H. diversicolor* au bivalve *S. plana* (Cardoso et al., 2012), chez le pétoncle *C. varia* (Metian et al., 2009) ou encore le saumon *Salmo salar* (Berntssen et al., 2003). Pour le MeHg, bien que quelques travaux aient étudié des consommateurs comme les gammares ou poissons (Berntssen et al., 2003; Cosio et al., 2021; Gentès et al., 2015; Sandheinrich & Miller, 2006), très peu se sont intéressés aux consommateurs primaires de bas niveau trophique à des concentrations réalistes. Nos expériences basées sur

l'utilisation des isotopes stables montrent que *D. polymorpha* bioaccumule le MeHg et l'IHg des microalgues, le MeHg passant principalement par la voie alimentaire. Les expérimentations de cette thèse constituent donc, à notre connaissance, les premières à démontrer chez *D. polymorpha* en conditions contrôlées un transfert trophique par voie alimentaire pour le MeHg. La méthode développée dans cette thèse, combinant microalgues contaminées et isotopes stables, offre une approche expérimentale réaliste du transfert trophique, mimant les conditions naturelles. Elle constitue un outil robuste pour étudier le transfert du Hg dans d'autres modèles aquatiques au laboratoire. Son application à différentes espèces, représentatives de divers niveaux trophiques, permettrait de mieux couvrir l'ensemble des réseaux trophiques et d'affiner les prédictions de bioaccumulation et de bioamplification. Pour l'étude des effets biologiques, l'utilisation des mêmes réponses menées en laboratoire et sur le terrain permet de confronter directement les résultats expérimentaux et observations environnementales, renforçant la pertinence et la fiabilité des conclusions. A l'inverse, en conditions naturelles, la bioaccumulation est généralement mesurée, sans information sur les effets. Il serait toutefois essentiel d'étendre ces études à l'analyse des effets biologiques, et aux approches omiques qui, par leur grande sensibilité, constituent un outil de choix pour relier bioaccumulation et réponses physiologiques dans des environnements réalistes. Cette approche intégrée ouvre la voie à une meilleure prédiction des risques écotoxicologiques et pourrait servir de modèle pour évaluer le transfert et les effets des contaminants à concentration réaliste dans les réseaux trophiques.

2. Importance des caractéristiques du phytoplancton pour le transfert trophique du Hg vers le consommateur

2.1. En laboratoire

Les producteurs primaires assurent la liaison entre les flux de métaux abiotiques et biotiques des écosystèmes, jouant ainsi un rôle important dans le transfert trophique des métaux (Ali & Khan, 2019). Les micro-organismes phototrophes tels que les diatomées et les microalgues vertes bioconcentrent le Hg, qui est ensuite transféré tout au long du réseau trophique (Gojkovic et al., 2022). Cependant, la capacité du phytoplancton à accumuler le Hg présent dans l'eau varie d'une espèce à l'autre, notamment en fonction de leur structure cellulaire et de l'espèce de Hg accumulée (Millet et al., 2024). Dans le chapitre 3, l'utilisation de deux espèces de microalgues présentant des structures de parois contrastées, la chlorelle *C. vulgaris* et la diatomée *C. meneghiniana*, a permis de mieux comprendre la distribution du Hg dans le phytoplancton et son influence sur la biodisponibilité pour le consommateur. Chez les Chlorelles, l'IHg et le MeHg sont répartis entre paroi et compartiment intracellulaire, ce qui réduit de moitié la bioaccumulation chez les dreissènes lors d'une exposition au compartiment intracellulaire. Chez les Diatomées, le MeHg est majoritairement intracellulaire et l'IHg dans la paroi, mais la bioaccumulation chez les dreissènes est similaire, probablement en raison de la variabilité individuelle. Ces résultats montrent que la distribution du Hg et la structure cellulaire des microalgues influencent le transfert trophique, tandis que les différences entre espèces et protocoles expliquent les divergences avec d'autres études.

Nos travaux montrent également que la densité du phytoplancton influence l'accumulation de Hg par les consommateurs primaires. Dans nos expérimentations, les dreissènes du chapitre 1 ont reçu 1×10^{8} cellules/individu/jour, celles du chapitre 2, 1×10^{7} et celles du chapitre 3 et 4 1×10^{6}. Les niveaux de bioaccumulation sont plus élevés chez les dreissènes du chapitre 1,

suggérant un rôle direct de la densité algale. Des études en mésocosme confirment que la densité de phytoplancton module le transfert trophique de MeHg vers le zooplancton : un enrichissement en nutriments stimule la croissance algale et réduit les concentrations de Hg dans le phytoplancton (effet de biodilution) et par conséquent, l'accumulation dans le zooplancton (Pickhardt et al. 2002 ; 2005). En milieu naturel, une forte densité de seston était aussi corrélée à une diminution de l'accumulation de Hg dans les fractions de taille pico-, nano- et macroseston (Adams et al., 2009). Ainsi, les consommateurs primaires des systèmes très productifs accumulent généralement moins d'IHg et de MeHg que des systèmes moins productifs (Chen et al., 2012). Cependant, cet effet dépend fortement du consommateur et de ses stratégies alimentaires. Dans notre cas, la quantité de Hg étant normalisée par le nombre de cellules algales, l'effet de biodilution est absent. De plus, *D. polymorpha* étant capable de filtrer plus de 1×10^8 cellule/individu/jour, le seuil de saturation de filtration n'a probablement pas été atteint et l'ensemble des algues a été consommé. Une densité plus élevée de phytoplancton a donc conduit à une bioaccumulation plus importante. Ces observations soulignent que la bioaccumulation du Hg chez les consommateurs primaires dépend à la fois de la localisation cellulaire du Hg dans les microalgues, de leur digestibilité par le consommateur, de la structure cellulaire des espèces et de la densité du phytoplancton, et suggèrent que des études futures devraient explorer comment ces facteurs interagissent dans des communautés algales mixtes afin de mieux prédire le transfert trophique du Hg par l'alimentation.

2.2. En milieu naturel

La quantification précise du Hg dans les communautés algales naturelles demeure un défi, en raison de la complexité de leur composition et des limites des méthodes d'échantillonnage employées. Le phytoplancton est collecté dans les eaux naturelles par filtration directe de l'eau (Griboff et al., 2018) ou à l'aide de filtres spécifiques depuis des embarcations (Chernova & Lysenko, 2019). Ces méthodes peuvent également retenir d'autres micro-organismes, des particules abiotiques ou des débris cellulaires, ce qui peut fausser les concentrations en Hg mesurées, par adsorption ou absorption non spécifique (Le Faucheur et al., 2014). De plus, *D. polymorpha* trie sa nourriture, ne consommant pas l'intégralité du seston, limitant la représentativité des échantillons de seston filtrés par rapport à la nourriture réellement ingérée. Néanmoins, ces prélèvements fournissent malgré tout une indication essentielle sur le Hg présent dans le seston, et donc potentiellement disponible pour l'ingestion par *D. polymorpha*. Lors de ce travail, la méthode de filtration employée n'a toutefois pas fourni une biomasse suffisante pour des analyses de signatures isotopiques du carbone ($\delta^{13}C$) et de l'azote ($\delta^{15}N$) robustes, laissant certains échantillons à la limite de la fiabilité. Ces contraintes méthodologiques soulignent l'importance de développer des approches plus sensibles et représentatives pour relier la composition du phytoplancton à la bioaccumulation de Hg chez les consommateurs primaires, ouvrant la voie à des évaluations plus précises du transfert trophique en conditions naturelles.

Dans le but de caractériser l'hétérogénéité des communautés phytoplanctoniques, des analyses en cytométrie de l'eau collectée sur la Seine et la Deûle ont déjà été réalisées (Figure 5-1). Les populations de pico- et de nanophytoplancton sont discriminées en fonction de la taille et de la fluorescence de la chlorophylle. Dans la Deûle, 2 populations de pico- et 7 de nanophytoplancton ont été identifiées, contre 3 et 6 dans la Seine. La concentration totale de phytoplancton semble comparable entre les sites mais aussi entre les saisons. Seules les

abondances dans les différentes classes de pico- et nanophytoplancton varient, surtout en fonction de la saison, avec à priori, plus de picophytoplancton en été qu'en hiver. En milieu marin, l'abondance de plancton a été corrélé à une plus grande concentration de MeHg dans la couche euphotique suggérant que la méthylation du Hg dans l'océan ouvert était favorisée par la présence de phytoplancton de petite taille (Heimbürger et al., 2010). L'interprétation de ces données reste cependant limitée par le caractère ponctuel des échantillonnages. Un suivi continu par cytométrie en flux combiné à une identification au microscope et/ou une analyse génétique pour identifier des taxons dans les différents groupes phytoplanctoniques définis par cytométrie en flux serait particulièrement intéressant. Néanmoins, ces techniques ne sont pas facilement applicables à un grand nombre d'échantillons contrairement à la cytométrie en flux automatisée, ce qui signifie qu'une sélection minutieuse des échantillons sera nécessaire. Ce type d'analyse est régulièrement fait en milieu marin pour comprendre les facteurs qui régissent l'abondance et la diversité du phytoplancton (Tzortzis et al., 2023). Dans les environnements d'eau douces, la cytométrie en flux n'a pas encore été utilisée de façon continue et à large échelle pour étudier les populations dans les systèmes naturels. Pourtant, l'analyse par cytométrie en flux du phytoplancton d'eau douce pourrait être un outil pertinent pour les gestionnaires de l'eau (Cellamare et al., 2010; Crosbie et al., 2003).

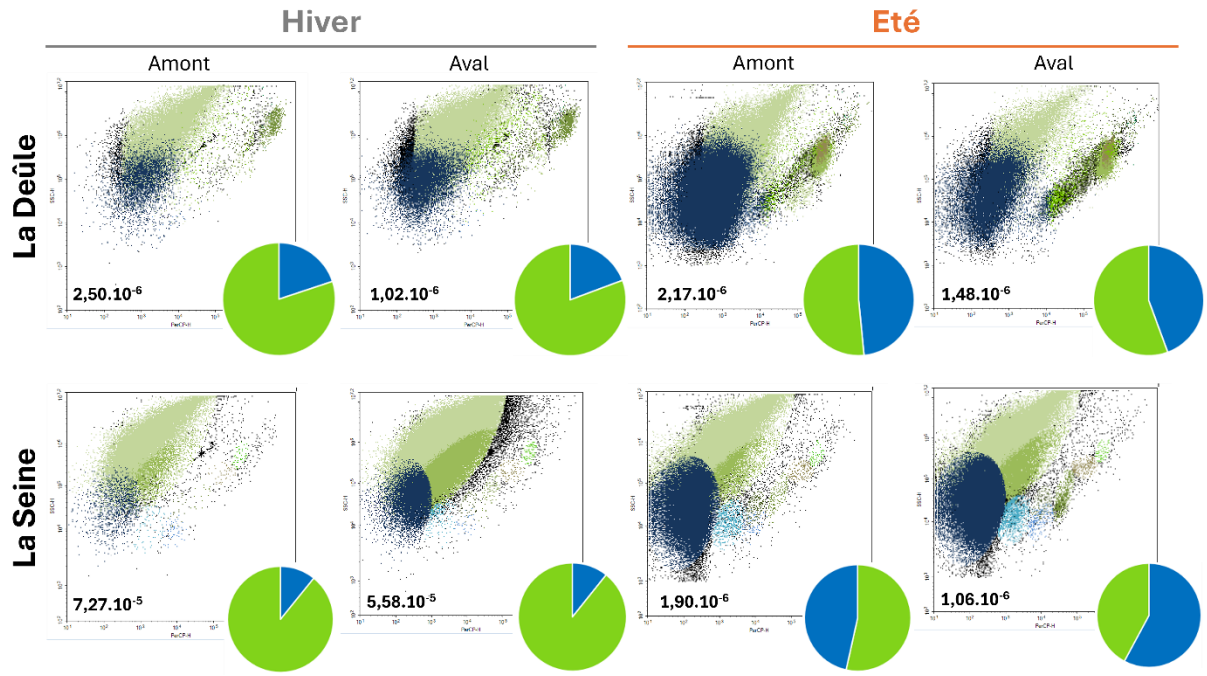

Figure 5-1. Cytogrammes des populations de pico- (**bleu**) et nanophytoplancton (**vert**) dans l'eau prélevée à T3 en amont et aval de la Seine et de la Deûle en 2024. Les concentrations totales de cellules/mL sont indiquées en gras.

Malgré ces défis, les données de terrain restent indispensables pour mieux comprendre les interactions entre le Hg et le phytoplancton, en intégrant la variabilité saisonnière et géographique. Pour cela, il est nécessaire de disposer d'informations détaillées sur la communauté phytoplanctonique, densité, composition en espèces, teneur en chlorophylle-a par rapport au poids sec, ainsi que sur la spéciation du Hg dans la colonne d'eau, ce qui reste un enjeu méthodologique majeur (Le Faucheur et al., 2014).

3. Influence des sources de pollution au Hg sur la bioaccumulation et les effets biologiques chez *D. polymorpha* : perspectives pour les encagements

L'encagement de *D. polymorpha* en milieu naturel a confirmé la capacité de cette espèce à bioaccumuler l'IHg et le MeHg présents dans son environnement, avec des répercussions mesurables sur les mécanismes de défense, le métabolome et le stress oxydatif. Nos résultats mettent en évidence que le source de contamination des cours d'eau joue un rôle dans la bioaccumulation du Hg, même si les paramètres physico-chimiques mesurés ne suffisent pas à expliquer l'ensemble des différences observées. Les deux campagnes menées en 2023 et 2024 montrent que les dreissènes encagées dans la Deûle, dont les sédiments témoignent d'un fort héritage industriel, présentent des concentrations en THg légèrement supérieures à celles observées dans la Seine. Cette différence d'accumulation s'accompagne de niveaux parfois plus élevés de péroxydation lipidique et de modifications métaboliques, indiquant un déséquilibre énergétique et oxydatif. Ces perturbations peuvent être en lien avec des concentrations en THg dépassant la NQE_{biote} ou les facteurs environnementaux du milieu. En revanche, la saison ne semble pas constituer un facteur déterminant. En effet, après 3 semaines d'encagement, les niveaux de bioaccumulation en THg et MeHg restent comparables entre l'hiver et l'été. Néanmoins, l'approche ciblée de métabolomique met en évidence des perturbations du métabolisme énergétique, à la fois en hiver et en été, plus marquées dans la Deûle que dans la Seine, suggérant une activation probable du métabolisme anaérobie, dont les mécanismes restent encore à préciser. Ces observations sont renforcées par l'approche protéomique, qui révèle la modulation de voies métaboliques différenciant les réponses associées à la bioaccumulation du THg et du MeHg. Enfin, les analyses multivariées indiquent que le sexe ne constitue pas un facteur confondant majeur pour les réponses métabolomiques et protéomiques.

Les résultats de la campagne terrain de 2024, intégrant à la fois la saison et la verticalité du cours d'eau, n'ont pas révélé de différences marquées chez *D. polymorpha*, que ce soit en termes de bioaccumulation, de biomarqueurs ou de réponses omiques. Afin d'approfondir la compréhension des mécanismes de bioaccumulation chez *D. polymorpha* et d'affiner l'interprétation des réponses biologiques observées, plusieurs pistes méthodologiques peuvent être envisagées.

3.1. Les approches temporelles

La mise en place de suivis saisonniers apparaît particulièrement pertinente. Une étude de biosurveillance passive chez *M. edulis* collectés mensuellement pendant un an a montré que les variations métaboliques sont liées à la température de l'eau et au développement gonadique (Kronberg et al., 2021). Une approche similaire pourrait être réalisée en biosurveillance active grâce à l'encagement d'individus en début d'année puis au prélèvement régulier d'échantillons (1 à 2 fois par mois), afin d'évaluer conjointement bioaccumulation, biomarqueurs de stress oxydatif et réponses omiques. Par ailleurs, prolonger la durée d'encagement permettrait de mieux saisir les effets cumulatifs. Chez *C. hongkongensis*, une exposition de 6 mois a révélé des perturbations métaboliques liées à l'accumulation de métaux (Cao & Wang, 2016), et des encagements de *M. galloprovincialis* de 30 à 60 jours dans l'estuaire de San Francisco ont montré une réduction du taux de filtration, des modifications enzymatiques et une bioaccumulation accrue de métaux (Gunther et al., 1999).

En parallèle, une attention particulière doit être portée aux conditions et à la durée de stabulation des dreissènes entre leur collecte sur le site de référence et leur utilisation pour les expérimentations. Nos résultats montrent des différences de concentrations en THg pour les T0 de janvier 2024, restés 8 mois en stabulation avant encagement, dont les concentrations sont plus élevées que ceux de juin 2024, maintenus seulement un mois. Ces observations soulignent que la stabulation peut constituer un facteur confondant non négligeable, susceptible d'influencer les niveaux basaux de contamination, et par conséquent, l'interprétation des réponses biologiques mesurées en conditions contrôlées et en milieu naturel. Ainsi, combiner suivis saisonniers et contrôle rigoureux des conditions expérimentales apparaît indispensable pour relier de manière fiable bioaccumulation et réponses biologiques chez les consommateurs primaires.

Une difficulté majeure de ce travail de thèse, à l'origine des variations dans les durées de stabulation, a été la disponibilité irrégulière des organismes dans le lac du Der. Par moments, seuls quelques individus vivants étaient recensés, et des épisodes de mortalité liés aux canicules sont fortement suspectés. Cette contrainte, accentuée par la surface de prélèvement limitée, a entravé la continuité de l'approvisionnement en matériel biologique. Pour y pallier, nous avons ponctuellement utilisé des lots issus de pêches antérieures ainsi que des Quagga prélevées dans le lac Léman, une espèce très proche de *D. polymorpha* en termes d'alimentation et de traits de vie. Malgré ces difficultés, imprévues pour une espèce invasive, cette stratégie a permis de mener à bien l'ensemble des travaux nécessaires à la réalisation de ce travail de thèse.

3.2. Approches spatiales

Il serait également intéressant de multiplier les sites d'encagement le long d'un même cours d'eau afin d'intégrer la variabilité spatiale de la contamination. Ce type de démarche a été menée dans le Golfe de Finlande avec des encagements de *U. pictorum* et *D. polymorpha* sur 6 sites, (N. Berezina et al., 2023), chez *S. plana* sur 3 sites menée dans la lagune côtière de Ria de Aveiro au Portugal (Cardoso et al., 2015), ou encore le long de la Seine avec *D. polymorpha* (Châtel et al., 2015) et plus récemment sur 33 sites répartis sur la Seine et la Moselle (Lortholarie et al., 2024). Des gradients de concentration de Hg ont également été mis en évidence lors d'expérimentations en biosurveillance passive (Graves et al., 2017). La mise en place de suivis à différentes saisons sur un éventail plus large de sites disposant d'un gradient de contamination en Hg, tant spatial (amont/aval, différents systèmes hydrologiques) que temporel (printemps, été, automne, hiver), permettrait d'identifier plus précisément l'influence conjointe des conditions environnementales et du régime alimentaire sur la bioaccumulation et les perturbations métaboliques chez *D. polymorpha*. Cette approche offrirait une vision plus intégrée et dynamique du transfert du Hg et de ses impacts écotoxicologiques, ouvrant la voie à des stratégies de suivi et de gestion environnementale plus efficaces.

3.3. Approches tissulaires

Enfin, l'analyse séparée des branchies et de la glande digestive représenteraient un progrès significatif par rapport aux mesures réalisées sur les tissus entiers. Les expérimentations menées dans ce travail de thèse en laboratoire, comme celles rapportées chez *S. plana* (Cardoso et al., 2015), indiquent que la glande digestible atteint les concentrations de métaux les plus élevées et présente des réponses enzymatiques distinctes des branchies. Adopter cette approche par organe permettrait une meilleure résolution dans l'interprétation des processus de

bioaccumulation et des mécanismes de défense, offrant ainsi un outil plus précis pour évaluer l'impact des contaminants sur les consommateurs primaires.

3.4. Caractérisation de la biodisponibilité du Hg dans l'eau

En parallèle des suivis sur le biote, il serait pertinent de mieux caractériser les différentes formes de Hg présentes dans la colonne d'eau, afin d'identifier les fractions disponibles pour *D. polymorpha*. Des systèmes de filtration séquentielle ont été testés mais nécessitent encore des optimisations pour devenir pleinement opérationnels. Par ailleurs, des échantillonnages passifs par la méthode des DGTs (Diffusive Gradient in Thin) et des centrifugations ultrarapides ont été déployés pour récupérer le Hg labile et les colloïdes, dans le cadre du travail post-doctoral de Dr Mariia Petrova à SEBIO. Ces approches, en cours d'analyse, permettraient de mieux relier les concentrations environnementales aux réponses biologiques mesurées chez *D. polymorpha*.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus en milieu naturel soulignent l'intérêt de recourir à des approches intégrées pour caractériser plus finement les effets du Hg dans les écosystèmes aquatiques. Ils confirment l'intérêt des encagements de *D. polymorpha* pour déterminer la biodisponibilité du Hg en milieu naturel, rappelant ainsi la pertinence de la biosurveillance active. Enfin, ils mettent en évidence que le Hg, bien que souvent lié à des sources directes, demeure omniprésent dans les milieux aquatiques, justifiant son maintien parmi les polluants prioritaires dans les stratégies de surveillance environnementale. Cependant, la complexité des milieux contaminés impose de considérer que les effets observés ne peuvent être attribués uniquement au Hg. L'approche intégrée mobilisée dans ce travail permet une évaluation complexe du stress physiologique de *D. polymorpha* en conditions naturelles. En intégrant à la fois biodisponibilité et toxicité, ces biomarqueurs offrent un potentiel considérable pour détecter des effets précoces et sublétaux qui échappent aux outils traditionnels, et pourraient à terme, devenir des outils clés pour la biosurveillance des polluants dans les milieux aquatiques.

4. Conclusion

En conclusion, ce travail de thèse apporte une contribution significative à la compréhension du transfert trophique et des effets biologiques du Hg en milieu d'eau douce, à travers l'étude du phytoplancton et de *Dreissena polymorpha*. Il met en lumière la complexité des mécanismes d'absorption et de bioaccumulation, ainsi que la diversité des voies de toxicité différenciées entre l'IHg et le MeHg, bien qu'encore partiellement élucidés. L'approche intégrée combinant expérimentations en laboratoire et observations en milieu naturel a permis de valider la pertinence de *D. polymorpha* comme organisme sentinelle et acteur clé du transfert trophique du Hg. Les résultats soulignent l'importance de la spécificité tissulaire dans la réponse au Hg, entre glande digestive et branchies, ouvrant ainsi des pistes pour mieux comprendre les liens entre bioaccumulation, effets moléculaires et conséquences physiologiques. Ces connaissances nourrissent une meilleure appréciation de la dynamique du Hg au sein des réseaux trophiques d'eau douce et appellent à approfondir les recherches sur les interactions physico-chimiques et biologiques régulant son devenir et sa toxicité, dans une optique de gestion durable et de réduction des risques environnementaux.

5. Références

Adams, R. M., Twiss, M. R., & Driscoll, C. T. (2009). Patterns of Mercury Accumulation among Seston in Lakes of the Adirondack Mountains, New York. *Environmental Science & Technology*, *43*(13), 4836-4842. https://doi.org/10.1021/es900409b

Adossa, N., Khan, S., Rytkönen, K. T., & Elo, L. L. (2021). Computational strategies for single-cell multi-omics integration. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *19*, 2588-2596. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.04.060

Afzal, M., Altyar, A. E., Ghaboura, N., Alenezi, S. K., Alharbi, K. S., Kazmi, I., Mantargi, M. J. S., Alqarni, S. S., & Alshehri, S. (2025). Effect of Mercury on Gut Microbiome. In *Gut Microbiome and Environmental Toxicants*. CRC Press.

Ahmad, I., Mohmood, I., Mieiro, C. L., Coelho, J. P., Pacheco, M., Santos, M. A., Duarte, A. C., & Pereira, E. (2011). Lipid peroxidation vs. Antioxidant modulation in the bivalve *Scrobicularia plana* in response to environmental mercury—Organ specificities and age effect. *Aquatic Toxicology*, *103*(3), 150-158. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.02.017

Ali, H., & Khan, E. (2019). Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs—Concepts and implications for wildlife and human health. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, *25*(6), 1353-1376. https://doi.org/10.1080/10807039.2018.1469398

Argelaguet, R., Cuomo, A. S. E., Stegle, O., & Marioni, J. C. (2021). Computational principles and challenges in single-cell data integration. *Nature Biotechnology*, *39*(10), 1202-1215. https://doi.org/10.1038/s41587-021-00895-7

Baratange, C., Baali, H., Gaillet, V., Bonnard, I., Delahaut, L., Gaillard, J.-C., Grandjean, D., Sayen, S., Gallorini, A., Le Bris, N., Renault, D., Breider, F., Loizeau, J.-L., Armengaud, J., & Cosio, C. (2023). Bioaccumulation and molecular effects of carbamazepine and methylmercury co-exposure in males of *Dreissena polymorpha*. *Science of The Total Environment*, *897*, 165379. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165379

Baratange, C., Rocha de Almeida, T., Armengaud, J., Bonnard, I., David, E., Delahaut, L., Gaillet, V., Guillon, E., Kielbasa, M., Loizeau, J.-L., Maurin, N., Sayen, S., & Cosio, C. (2025). Molecular and genotoxic effects of carbamazepine and methylmercury on the gonads of *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology*, *287*, 107493. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2025.107493

Barjhoux, I., Rioult, D., Geffard, A., & Palos Ladeiro, M. (2020). A new protocol for the simultaneous flow cytometric analysis of cytotoxicity and immunotoxicity on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) hemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, *98*, 224-235. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.092

Berezina, N., Maximov, A., Sharov, A., Gubelit, Y., & Kholodkevich, S. (2023). Environmental Assessment with Cage Exposure in the Neva Estuary, Baltic Sea: Metal Bioaccumulation and Physiologic Activity of Bivalve Molluscs. *Journal of Marine Science and Engineering*, *11*(9), Article 9. https://doi.org/10.3390/jmse11091756

Berntssen, M. H. G., Aatland, A., & Handy, R. D. (2003). Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Aquatic Toxicology*, *65*(1), 55-72. https://doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00104-8

Borković-Mitić, S., Mitić, B., Vranković, J. S., Jovičić, K., & Pavlović, S. (2024). Integrated Biomarker Response of Oxidative Stress Parameters in the Digestive Glands and Gills of Autochthonous and Invasive Freshwater Mussels from the Sava River, Serbia. *Toxics*, *12*(10), 756. https://doi.org/10.3390/toxics12100756

Bundy, J. G., Davey, M. P., & Viant, M. R. (2009). Environmental metabolomics: A critical review and future perspectives. *Metabolomics*, *5*(1), 3-21. https://doi.org/10.1007/s11306-008-0152-0

Bustamante, P., Cosson, R. P., Gallien, I., Caurant, F., & Miramand, P. (2002). Cadmium detoxification processes in the digestive gland of cephalopods in relation to accumulated cadmium concentrations. *Marine Environmental Research*, *53*(3), 227-241. https://doi.org/10.1016/S0141-1136(01)00108-8

Campos, A., Tedesco, S., Vasconcelos, V., & Cristobal, S. (2012). Proteomic research in bivalves: Towards the identification of molecular markers of aquatic pollution. *Journal of Proteomics*, *75*(14), 4346-4359. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.027

Cao, C., & Wang, W.-X. (2016). Bioaccumulation and metabolomics responses in oysters *Crassostrea hongkongensis* impacted by different levels of metal pollution. *Environmental Pollution*, *216*, 156-165. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.047

Cardoso, P. G., Pereira, E., Grilo, T. F., Duarte, A. C., & Pardal, M. A. (2012). Kinetics of Mercury Bioaccumulation in the Polychaete Hediste diversicolor and in the Bivalve Scrobicularia plana, Through a Dietary Exposure Pathway. *Water, Air, & Soil Pollution*, *223*(1), 421-428. https://doi.org/10.1007/s11270-011-0870-1

Cellamare, M., Rolland, A., & Jacquet, S. (2010). Flow cytometry sorting of freshwater phytoplankton. *Journal of Applied Phycology*, *22*(1), 87-100. https://doi.org/10.1007/s10811-009-9439-4

Châtel, A., Faucet-Marquis, V., Gourlay-Francé, C., Pfohl-Leszkowicz, A., & Vincent-Hubert, F. (2015). Genotoxicity and activation of cellular defenses in transplanted zebra mussels *Dreissena polymorpha* along the Seine river. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *114*, 241-249. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.023

Chen, C., Kamman, N., Williams, J., Bugge, D., Taylor, V., Jackson, B., & Miller, E. (2012). Spatial and temporal variation in mercury bioaccumulation by zooplankton in Lake Champlain (North America). *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, *161*, 343-349. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.08.048

Chen, L., Zhang, H., Shi, H., Li, Z., & Xue, C. (2023). Application of multi-omics combined with bioinformatics techniques to assess salinity stress response and tolerance mechanisms of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) during depuration. *Fish & Shellfish Immunology*, *137*, 108779. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108779

Chernova, E. N., & Lysenko, E. V. (2019). The content of metals in organisms of various trophic levels in freshwater and brackish lakes on the coast of the sea of Japan. *Environmental Science and Pollution Research*, *26*(20), 20428-20438. https://doi.org/10.1007/s11356-019-05198-8

Cosio, C., Degli-Esposti, D., Almunia, C., Gaillet, V., Sartelet, H., Armengaud, J., Chaumot, A., Geffard, O., & Geffard, A. (2021). Subcellular Distribution of Dietary Methyl-Mercury in *Gammarus*

fossarum and Its Impact on the Amphipod Proteome. *Environmental Science & Technology*, *55*(15), 10514-10523. https://doi.org/10.1021/acs.est.1c02385

Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M. C., Babut, M., Exinger, A., & Vasseur, P. (1997). Glutathione Reductase, Selenium-Dependent Glutathione Peroxidase, Glutathione Levels, and Lipid Peroxidation in Freshwater Bivalves,*Unio tumidus,*as Biomarkers of Aquatic Contamination in Field Studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *38*(2), 122-131. https://doi.org/10.1006/eesa.1997.1582

Coulaud, R., Geffard, O., Xuereb, B., Lacaze, E., Quéau, H., Garric, J., Charles, S., & Chaumot, A. (2011). *In situ* feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): Modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Research*, *45*(19), 6417-6429. https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.035

Crasson, M., Lembreghts, M., El Ahmadi, A., Legros, J. J., & Timsit-Berthier, M. (2001). Étude de la variabilité interindividuelle de la variation contingente négative (VCN). *Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology*, *31*(5), 300-320. https://doi.org/10.1016/S0987-7053(01)00274-X

Crosbie, N. D., Teubner, K., & Weisse, T. (2003). Flow-cytometric mapping provides novel insights into the seasonal and vertical distributions of freshwater autotrophic picoplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, *33*, 53-66. https://doi.org/10.3354/ame033053

Devin, S., Giamberini, L., & Pain-Devin, S. (2014). Variation in variance means more than mean variations: What does variability tell us about population health status? *Environment International*, *73*, 282-287. https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.08.002

Devin, S., Potet, M., Louis, F., Pauly, D., Rocher, B., Wagner, P., Giambérini, L., & Pain-Devin, S. (2025). Spatial and seasonal use of biomarkers in dreissenids : Implications for biomonitoring. *Environmental Science and Pollution Research*, *32*(6), 3314-3327. https://doi.org/10.1007/s11356-023-28126-3

Domouhtsidou, G. P., & Dimitriadis, V. K. (2000). Ultrastructural Localization of Heavy Metals (Hg, Ag, Pb, and Cu) in Gills and Digestive Gland of Mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *38*(4), 472-478. https://doi.org/10.1007/s002449910062

Faggio, C., Pagano, M., Alampi, R., Vazzana, I., & Felice, M. R. (2016). Cytotoxicity, haemolymphatic parameters, and oxidative stress following exposure to sub-lethal concentrations of quaternium-15 in *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, *180*, 258-265. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.10.010

Faggio, C., Tsarpali, V., & Dailianis, S. (2018). Mussel digestive gland as a model tissue for assessing xenobiotics: An overview. *Science of The Total Environment*, *636*, 220-229. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.264

Gentès, S., Maury-Brachet, R., Feng, C., Pedrero, Z., Tessier, E., Legeay, A., Mesmer-Dudons, N., Baudrimont, M., Maurice, L., Amouroux, D., & Gonzalez, P. (2015). Specific Effects of Dietary Methylmercury and Inorganic Mercury in Zebrafish (*Danio rerio*) Determined by Genetic, Histological, and Metallothionein Responses. *Environmental Science & Technology*, *49*(24), 14560-14569. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03586

Gleason, L. U., Fekete, F. J., Tanner, R. L., & Dowd, W. W. (2023). Multi-omics reveals largely distinct transcript- and protein-level responses to the environment in an intertidal mussel. *Journal of Experimental Biology*, *226*(22), jeb245962. https://doi.org/10.1242/jeb.245962

Graves, S. D., Kidd, K. A., Batchelar, K. L., Cowie, A. M., O'Driscoll, N. J., & Martyniuk, C. J. (2017). Response of oxidative stress transcripts in the brain of wild yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to an environmental gradient of methylmercury. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *192*, 50-58. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.12.005

Griboff, J., Horacek, M., Wunderlin, D. A., & Monferran, M. V. (2018). Bioaccumulation and trophic transfer of metals, As and Se through a freshwater food web affected by antrophic pollution in Córdoba, Argentina. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *148*, 275-284. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.028

Gunther, A. J., Davis, J. A., Hardin, D. D., Gold, J., Bell, D., Crick, J. R., Scelfo, G. M., Sericano, J., & Stephenson, M. (1999). Long-term Bioaccumulation Monitoring with Transplanted Bivalves in the San Francisco Estuary. *Marine Pollution Bulletin*, *38*(3), 170-181. https://doi.org/10.1016/S0025-326X(98)00185-4

Heimbürger, L.-E., Cossa, D., Marty, J.-C., Migon, C., Averty, B., Dufour, A., & Ras, J. (2010). Methyl mercury distributions in relation to the presence of nano- and picophytoplankton in an oceanic water column (Ligurian Sea, North-western Mediterranean). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *74*(19), 5549-5559. https://doi.org/10.1016/j.gca.2010.06.036

Hines, A., Oladiran, G. S., Bignell, J. P., Stentiford, G. D., & Viant, M. R. (2007). Direct Sampling of Organisms from the Field and Knowledge of their Phenotype: Key Recommendations for Environmental Metabolomics. *Environmental Science & Technology*, *41*(9), 3375-3381. https://doi.org/10.1021/es062745w

Hines, A., Staff, F. J., Widdows, J., Compton, R. M., Falciani, F., & Viant, M. R. (2010). Discovery of Metabolic Signatures for Predicting Whole Organism Toxicology. *Toxicological Sciences*, *115*(2), 369-378. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq004

Hines, A., Yeung, W. H., Craft, J., Brown, M., Kennedy, J., Bignell, J., Stentiford, G. D., & Viant, M. R. (2007). Comparison of histological, genetic, metabolomics, and lipid-based methods for sex determination in marine mussels. *Analytical Biochemistry*, *369*(2), 175-186. https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.06.008

Jubeaux, G., Simon, R., Salvador, A., Lopes, C., Lacaze, E., Quéau, H., Chaumot, A., & Geffard, O. (2012). Vitellogenin-like protein measurement in caged *Gammarus fossarum* males as a biomarker of endocrine disruptor exposure: Inconclusive experience. *Aquatic Toxicology*, *122-123*, 9-18. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.05.007

Kronberg, J., Byrne, J. J., Jansen, J., Antczak, P., Hines, A., Bignell, J., Katsiadaki, I., Viant, M. R., & Falciani, F. (2021). Modeling the metabolic profile of *Mytilus edulis* reveals molecular signatures linked to gonadal development, sex and environmental site. *Scientific Reports*, *11*(1), 12882. https://doi.org/10.1038/s41598-021-90494-y

Le Faucheur, S., Campbell, P. G. C., Fortin, C., & Slaveykova, V. I. (2014). Interactions between mercury and phytoplankton: Speciation, bioavailability, and internal handling. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *33*(6), 1211-1224. https://doi.org/10.1002/etc.2424

Legrand, E., Bayless, A. L., Bearden, D. W., Casu, F., Edwards, M., Jacob, A., Johnson, W. E., & Schock, T. B. (2023). Untargeted Metabolomics Analyses and Contaminant Chemistry of Dreissenid Mussels at the Maumee River Area of Concern in the Great Lakes. *Environmental Science & Technology*, *57*(48), 19169-19179. https://doi.org/10.1021/acs.est.3c00812

Lenski, M., Bruno, C., Darrouzain, F., & Allorge, D. (2023). Métabolomique : Principes et applications en toxicologie biologique et médicolégale. *Toxicologie Analytique et Clinique*, *35*(2), 96-112. https://doi.org/10.1016/j.toxac.2023.01.002

Li, S., Alfaro, A. C., Nguyen, T. V., Young, T., & Lulijwa, R. (2020). An integrated omics approach to investigate summer mortality of New Zealand Greenshell™ mussels. *Metabolomics*, *16*(9), 100. https://doi.org/10.1007/s11306-020-01722-x

Liu, X., Zhang, L., You, L., Cong, M., Zhao, J., Wu, H., Li, C., Liu, D., & Yu, J. (2011). Toxicological responses to acute mercury exposure for three species of Manila clam *Ruditapes philippinarum* by NMR-based metabolomics. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *31*(2), 323-332. https://doi.org/10.1016/j.etap.2010.12.003

Lortholarie, M., Do Nascimento, J., Bonnard, I., Catteau, A., Le Guernic, A., Boudaud, N., Gantzer, C., Guérin, S., Geffard, A., & Palos-Ladeiro, M. (2024). Assessment of the viral contamination of fecal origin over a wide geographical area using an active approach with *Dreissena polymorpha*. *Journal of Environmental Management*, *368*, 122122. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.122122

Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M. P., Angulo, E., & Giamberini, L. (2002). Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microscopy Research and Technique*, *56*(5), 358-392. https://doi.org/10.1002/jemt.10040

Metian, M., Bustamante, P., Hédouin, L., Oberhänsli, F., & Warnau, M. (2009). Delineation of heavy metal uptake pathways (seawater and food) in the variegated scallop Chlamys varia, using radiotracer techniques. *Marine Ecology Progress Series*, *375*, 161-171. https://doi.org/10.3354/meps07766

Millet, R. T., Santos, J., & Slaveykova, V. I. (2024). Exploring the subcellular distribution of mercury in green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and diatom *Cyclotella meneghiniana*: A comparative study. *Aquatic Toxicology*, *267*. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2024.106836

Pickhardt, P. C., Folt, C. L., Chen, C. Y., Klaue, B., & Blum, J. D. (2002). Algal Blooms Reduce the Uptake of Toxic Methylmercury in Freshwater Food Webs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(7), 4419-4423.

Pickhardt, P. C., Folt, C. L., Chen, C. Y., Klaue, B., & Blum, J. D. (2005). Impacts of zooplankton composition and algal enrichment on the accumulation of mercury in an experimental freshwater food web. *Science of The Total Environment*, *339*(1), 89-101. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.07.025

Pollard, K. M., Cauvi, D. M., Toomey, C. B., Hultman, P., & Kono, D. H. (2019). Mercury-induced inflammation and autoimmunity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1863*(12), 129299. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.02.001

Prud'homme, S. M., Hani, Y. M. I., Cox, N., Lippens, G., Nuzillard, J.-M., & Geffard, A. (2020). The Zebra Mussel (Dreissena polymorpha) as a Model Organism for Ecotoxicological Studies: A Prior 1H NMR Spectrum Interpretation of a Whole Body Extract for Metabolism Monitoring. *Metabolites*, *10*(6), 256. https://doi.org/10.3390/metabo10060256

Raftopoulou, E. K., & Dimitriadis, V. K. (2011). Comparative study of the accumulation and detoxification of Cu (essential metal) and Hg (nonessential metal) in the digestive gland and gills of mussels *Mytilus galloprovincialis*, using analytical and histochemical techniques. *Chemosphere*, *83*(8), 1155-1165. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.003

Regier, N., Larras, F., Bravo, A. G., Ungureanu, V.-G., Amouroux, D., & Cosio, C. (2013). Mercury bioaccumulation in the aquatic plant *Elodea nuttallii* in the field and in microcosm: Accumulation in shoots from the water might involve copper transporters. *Chemosphere*, *90*(2), 595-602. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.08.043

Sandheinrich, M. B., & Miller, K. M. (2006). Effects of dietary methylmercury on reproductive behavior of fathead minnows (Pimephales promelas). *Environmental Toxicology and Chemistry*, *25*(11), 3053-3057. Scopus. https://doi.org/10.1897/05-641R.1

Tan, S. W., Meiller, J. C., & Mahaffey, K. R. (2009). The endocrine effects of mercury in humans and wildlife. *Critical Reviews in Toxicology*, *39*(3), 228-269. https://doi.org/10.1080/10408440802233259

Tzortzis, R., Doglioli, A. M., Messié, M., Barrillon, S., Petrenko, A. A., Izard, L., Zhao, Y., d'Ovidio, F., Dumas, F., & Gregori, G. (2023). The contrasted phytoplankton dynamics across a frontal system in the southwestern Mediterranean Sea. *Biogeosciences*, *20*(16), 3491-3508. https://doi.org/10.5194/bg-20-3491-2023

Wang, M., Wang, Y., Zhang, L., Wang, J., Hong, H., & Wang, D. (2013). Quantitative proteomic analysis reveals the mode-of-action for chronic mercury hepatotoxicity to marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Aquatic Toxicology*, *130-131*, 123-131. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.01.012

Watanabe, M., Meyer, K. A., Jackson, T. M., Schock, T. B., Johnson, W. E., & Bearden, D. W. (2015). Application of NMR-based metabolomics for environmental assessment in the Great Lakes using zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Metabolomics*, *11*(5), 1302-1315. https://doi.org/10.1007/s11306-015-0789-4

Xu, M.-Y., Sun, Y.-J., Wang, P., Xu, H.-Y., Chen, L.-P., Zhu, L., & Wu, Y.-J. (2015). Metabolomics Analysis and Biomarker Identification for Brains of Rats Exposed Subchronically to the Mixtures of Low-Dose Cadmium and Chlorpyrifos. *Chemical Research in Toxicology*, *28*(6), 1216-1223. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00054

Xuereb, B., Chaumot, A., Mons, R., Garric, J., & Geffard, O. (2009). Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda). *Aquatic Toxicology*, *93*(4), 225-233. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.05.006

Yan, J., Risacher, S. L., Shen, L., & Saykin, A. J. (2018). Network approaches to systems biology analysis of complex disease: Integrative methods for multi-omics data. *Briefings in Bioinformatics*, *19*(6), 1370-1381. https://doi.org/10.1093/bib/bbx066

Yap, C., Tan, S., & Ismail, A. (2004). Assessment of Different Soft Tissues of the Green-lipped Mussel *Perna viridis* (Linnaeus) as Biomonitoring Agents of Pb: Field and Laboratory Studies. *Water Air and Soil Pollution*, *153*, 253-268. https://doi.org/10.1023/B:WATE.0000019946.84885.94

Transfert trophique du mercure du phytoplancton à *Dreissena polymorpha* : études en laboratoire et en milieu naturel

Cette thèse porte sur la bioaccumulation et les effets du mercure chez le bivalve *Dreissena polymorpha* par transfert trophique. Le projet combine des expositions contrôlées en laboratoire à des microalgues isolées, et des encagements *in situ*, afin d'évaluer : 1) la bioaccumulation du Hg en conditions réalistes, et 2) les réponses moléculaires, cellulaires et comportementales de *D. polymorpha*. En laboratoire, deux espèces de microalgues aux parois contrastées ont été utilisées : la microalgue verte *Chlorella vulgaris* et la diatomées *Cyclotella meneghiniana*. Ces expérimentations révèlent un rôle du Hg présent dans la paroi dans la bioaccumulation et des différences marquées de bioaccumulation entre les organes selon l'espèce de microalgues, ainsi que des effets sur le comportement de filtration. Les expositions en milieu naturel, par encagements de dreissènes dans deux rivières aux sources de Hg contrastées, la Seine et la Deûle, ont été réalisés en hiver et été. Les résultats montrent que la Deûle induit une bioaccumulation et des réponses moléculaires et cellulaires plus fortes que la Seine, tandis que la saison, la position dans le cours d'eau et le sexe des individus n'influencent pas significativement ces réponses. Ce travail comble un manque de connaissances sur le transfert et les effets du Hg entre producteurs primaires et bivalves, et contribue à une meilleure évaluation des risques liés aux contaminants dans les écosystèmes aquatiques. Ces résultats ont également mis en lumière des manques de connaissance sur le métabolisme du modèle et son exposome, qui orienteront les investigations futures.

Mots-clés : mercure, transfert trophique, *Dreissena polymorpha*, bioaccumulation, omiques

Trophic transfer of mercury from phytoplankton to *Dreissena polymorpha*: laboratory and field studies

This PhD thesis focuses on the bioaccumulation and effects of mercury (Hg) in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*, with particular attention to trophic transfer. The project combines laboratory exposures to isolated microalgae and *in situ* caging to assess: 1) Hg bioaccumulation and its subcellular partitioning under environmentally realistic conditions, and 2) molecular, cellular, and behavioral responses in *D. polymorpha*. In the laboratory, two phytoplankton species with contrasting cell wall compositions were used: the green alga *Chlorella vulgaris* and the diatom *Cyclotella meneghiniana*. These experiments reveal a role of parietal Hg in bioaccumulation and marked differences in bioaccumulation between organs depending on the species of microalgae, as well as effects on filtration behavior. Field experiments with caged individuals in two rivers with contrasting Hg sources, the Seine and the Deûle, were conducted in winter and summer. Results show that mussels caged in the Deûle exhibited higher Hg bioaccumulation and stronger molecular and cellular responses than those in the Seine, whereas season, position along the river, and sex of individuals had no significant influence. This thesis fills a knowledge gap on Hg transfer and toxic effects between primary producers and bivalves, thereby contributing to a better understanding of the bivalve exposome and improving risk assessment of contaminants in aquatic food webs and ecosystems.

Keywords: mercury, trophic transfer, *Dreissena polymorpha*, bioaccumulation, omics

Discipline : PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS - INTERACTIONS

Spécialité : ECOTOXICOLOGIE

UMR-I 02 INERIS-URCA-ULH Stress Environnementaux et BIOsurveillance des milieux aquatiques SEBIO
https://umr-sebio.fr/
Université de Reims Champagne-Ardenne - UFR SEN
Campus Moulin de la Housse - 51687 Reims Cedex 2