



**HAL**  
open science

# Étude de la sensibilité des juvéniles de moule perlière (*Margaritifera margaritifera*) à une contamination métallique, aux nutriments et à la température

Tiaré Belamy

## ► To cite this version:

Tiaré Belamy. Étude de la sensibilité des juvéniles de moule perlière (*Margaritifera margaritifera*) à une contamination métallique, aux nutriments et à la température. Ecotoxicologie. Université de Bordeaux, 2021. Français. NNT : 2021BORD0143 . tel-03910296

**HAL Id: tel-03910296**

**<https://theses.hal.science/tel-03910296v1>**

Submitted on 22 Dec 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE  
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET ENVIRONNEMENT

SPÉCIALITÉ : Géochimie et écotoxicologie

Par Tiare BELAMY

**Étude de la sensibilité des juvéniles de moule perlière  
(*Margaritifera margaritifera*) à une contamination  
métallique, aux nutriments et à la température**

Sous la direction de : Magalie BAUDRIMONT et Alexia LEGEAY

Soutenue le 19 mai 2021

Membres du jury :

Mme AKCHA Farida

M. GEFFARD Alain

Mme MAZOUNI-GAERTNER Nabila

M. CACHOT Jérôme

M. GEIST Jürgen

Mme BAUDRIMONT Magalie

Mme LEGEAY Alexia

Chargée de recherche, IFREMER

Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne

Professeure, Université de la Polynésie Française

Professeur, Université de Bordeaux

Professeur, Université technique de Munich

Professeure, Université de Bordeaux

Maître de conférences, Université de Bordeaux

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Président

Examineur

Directrice de thèse

Co-directrice de thèse



# Étude de la sensibilité des juvéniles de moule perlière *Margaritifera margaritifera*, à une contamination métallique, aux nutriments et à la température

**Résumé :** *Margaritifera margaritifera* ou la moule perlière est un mollusque bivalve d'eau douce aujourd'hui en danger critique d'extinction en Europe. La pollution environnementale est considérée comme l'un des facteurs majeurs impliqués dans la disparition des populations de *M. margaritifera*. Cette thèse vise à étudier l'impact d'une contamination métallique (aluminium Al, arsenic As, cadmium Cd, cuivre Cu et nickel Ni) et des nutriments responsables du processus d'eutrophisation (nitrates  $\text{NO}_3^-$  et ortho-phosphates  $\text{PO}_4^{3-}$ ) sur le stade juvénile de *M. margaritifera*, considéré comme l'un des stades les plus sensibles de l'espèce. Afin d'appréhender les potentiels effets du changement climatique, l'effet de la température a également été étudié. Dans un premier temps, les seuils de toxicité aiguë des différents contaminants et nutriments, ont été déterminés. Les résultats ont montré une grande tolérance des juvéniles à des concentrations en contaminants largement supérieures à celles retrouvées dans l'environnement, et dépendante de l'âge des individus. Les effets des différents facteurs étudiés seuls ou en mélange ont ensuite été évalués lors de tests de toxicité chronique par le biais de plusieurs paramètres : l'expression des gènes, la bioaccumulation des métaux et le comportement des organismes, dont la méthode a été développée dans cette thèse. Au niveau moléculaire, la contamination métallique a révélé un impact sur la modulation des gènes de plusieurs fonctions biologiques comme l'apoptose, la détoxification, la réparation de l'ADN ou encore le métabolisme mitochondrial. De plus, ces travaux ont permis de confirmer la capacité des juvéniles à accumuler ces éléments traces métalliques (ETMs), notamment le Cd, le Cu et l'Al, contrairement à l'As qui s'accumule peu dans les tissus. L'impact des nutriments au niveau moléculaire n'est observé que lorsqu'ils sont étudiés en combinaison et notamment à une température de 22°C, soit 6 degrés de plus que la température moyenne annuelle de la Haute-Dronne. L'effet de la température étudiée seule, a montré un impact sur l'expression des gènes en relation avec le stress oxydant et la réparation de l'ADN lorsque les juvéniles sont exposés à une température de 26°C, alors qu'à 22°C, aucune modification n'a été observée. L'exposition des organismes à plusieurs contaminants en mélange (As, Cu, Al,  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{PO}_4^{3-}$ ) combinés à différentes températures (16, 26 et 30°C) a permis de mettre en évidence l'impact d'une augmentation de la température sur l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial et le stress oxydant. Aucun impact n'a cependant été relevé sur le comportement des juvéniles et sur leur mobilité. Finalement, cette étude a permis d'évaluer la sensibilité des jeunes stades de vie de la moule perlière et d'améliorer nos connaissances sur l'impact de certains ETMs, des nutriments responsables de l'eutrophisation des milieux aquatiques et de la température sur cette espèce, à différentes échelles de l'organisme. Ces travaux suggèrent que l'augmentation de la température causée par le changement climatique, combinée à la présence de contaminants dans les cours d'eau pourrait accentuer le déclin des populations de moule perlière.

**Mots clés :** Juvéniles de moule perlière, éléments traces métalliques, nutriments, seuils de toxicité, réponses génétiques, bioaccumulation, comportement

## **Study the sensitivity of freshwater pearl mussel juveniles *Margaritifera margaritifera* to metallic contamination, nutrients and temperature**

**Abstract:** *Margaritifera margaritifera* or the freshwater pearl mussel (FWPM), is a critically endangered freshwater bivalve mollusk in Europe. Environmental pollution has been suggested to be one of the main factors affecting *M. margaritifera* populations. This work deals with the assessment of the impacts of metallic contamination (aluminum Al, arsenic As, cadmium Cd, copper Cu and nickel Ni) and nutrients responsible for eutrophication process (nitrate  $\text{NO}_3^-$  et ortho-phosphates  $\text{PO}_4^{3-}$ ), on FWPM juveniles which are considered to be one of the most sensitive stage of the species. Moreover, in order to assess the potential effects of climate change, temperature impacts were also studied. Firstly, acute toxicity thresholds for contaminants and nutrients studied in this work, were assessed. Results showed a high tolerance of juveniles to contaminant and nutrient concentrations, largely higher than those found in the natural environment, which was revealed to be age-dependent. The effects of the different factors studied alone or in mixture, were evaluated by chronic toxicity tests using several endpoints: gene expression, trace metals bioaccumulation and organism's behavior, for which the experimental protocol was developed in this thesis. At molecular level, metallic contamination revealed an impact on the expression of gene related to various biological functions such as apoptosis, detoxication, DNA repair or mitochondrial metabolism. Moreover, this study allowed to confirm the capacity of juvenile mussels to accumulate trace metals, notably Cd, Cu and Al, whereas low As levels were accumulated in juvenile tissues. The impact of nutrients at molecular level were revealed only when both nutrients were studied in mixture and notably at temperature of 22°C, corresponding to 6 degrees higher than the mean annual temperature of the Haute-Dronne river (16°C). The effect of temperature studied alone, showed an impact on gene expression related to oxidative stress and DNA repair when juveniles were exposed at 26°C, whereas at 22°C, no modifications in gene expression were observed. Organisms exposure to different contaminants studied in mixture (As, Cu, Al,  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{PO}_4^{3-}$ ) combined to different temperatures (16, 26 and 30°C) allowed to show impacts on the expression of genes related to mitochondrial metabolism and oxidative stress. Nevertheless, no effects were shown on juvenile mussel's behavior and mobility. Overall, this work allowed to evaluate the sensitivity of FWPM juveniles and to improve our knowledges on the impacts of trace metals, nutrients responsible of eutrophication process and temperature, at different levels of organization. These findings suggest that increasing temperature caused by climate change, combined to the presence of contaminants in aquatic ecosystems may accentuate the decline of *M. margaritifera* populations.

**Keywords:** Freshwater pearl mussel juveniles, traces metals, nutrients, toxicity thresholds, genetic responses, bioaccumulation, behavior

**UMR CNRS 5805 EPOC**

**Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux**

Allée Geoffroy Saint-Hilaire – CSS50023 – 33615 Pessac Cedex - France

## **Remerciements**

Après 4 années à vivre cette aventure exceptionnelle qu'est la thèse, je tenais, à travers ces quelques pages, à remercier toutes les personnes que j'ai rencontrées durant cette formation, celles qui m'ont soutenue et celles qui y ont participé de près ou de loin.

Je souhaiterais commencer par remercier Mme Farida Akcha et Mr Alain Geffard, d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse en tant que rapporteurs. Je tiens également à remercier les autres membres du jury, Mme Nabila Gaertner-Mazouni, Mr Jurgen Geist et Mr Jérôme Cachot, président du jury, d'avoir accepté d'être les examinateurs de ce travail.

Mes chères directrices, je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour moi lors de cette thèse. Lorsque je suis arrivée à Arcachon, on me demandait qui étaient mes directeurs de thèse et lorsque je répondais : Magalie et Alexia, on me disait que j'avais de la chance car vous étiez toutes les deux des personnes formidables. Je le pensais déjà en commençant la thèse mais aujourd'hui je peux l'affirmer.

Bien que vos vies en tant qu'enseignantes chercheuses et mères de famille, soient intenses, vous m'avez toujours consacré du temps lorsque j'en avais besoin pour avancer sur la thèse. Vous m'avez toujours fait confiance sur le projet, les manips, les congrès, les missions... Merci pour le temps que vous m'avez accordé et merci d'avoir eu confiance en moi pour mener ce projet. Je vous remercie également pour toutes les connaissances que vous avez partagées avec moi. Grâce à vous j'ai pu acquérir des connaissances tant dans le domaine de l'écotoxicologie que celui de l'écologie. Merci pour vos conseils si précieux, merci pour votre aide et pour votre contribution à ma formation lors de ces 4 années. Vous m'avez toujours accompagnée dans chacune de mes démarches qu'elles soient administratives ou scientifiques. Je ressors de cette thèse, riche d'expériences et surtout prête à débiter ma carrière. Je vous remercie aussi pour votre soutien indéniable au moment où j'en avais le plus besoin pendant la thèse. Vous m'avez laissé le temps qu'il fallait pour me remettre de cette dure épreuve, merci encore d'avoir été là pour moi. Je tenais aussi à vous remercier de m'avoir donné l'opportunité de participer à plusieurs congrès internationaux et par conséquent permis de visiter plusieurs pays d'Europe. Ces expériences enrichissantes m'ont fait découvrir une autre facette de la recherche et différentes cultures.

Si je devais résumer mon ressenti sur ces 4 années de thèse, je dirais que j'ai toujours eu les meilleures conditions en termes de logistique, d'encadrement, de soutien et de confiance, pour réussir, et ça c'est grâce à vous, grâce aux personnes que vous êtes. En effet, la force que j'avais, était de vous avoir toutes les deux, avec chacune un caractère différent mais tellement complémentaire. Merci encore mille fois pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Mon petit Bruno, mon pilier dans cette dure aventure. Bruno, merci, merci pour tout ce que tu m'as apporté durant ces 3 années. Merci de m'avoir aussi bien intégrée au labo, merci pour ton aide, merci pour ton soutien, merci pour tes conseils et merci pour ton savoir. J'ai appris tellement de choses avec toi, je ne te remercierai jamais assez. Nos missions en Dordogne resteront gravées à jamais dans ma mémoire, je ne compte plus les allers-retours effectués entre Arcachon et Firbeix tellement j'ai l'impression d'avoir passé 6 mois dans le Kangoo pour transporter les bébés moules. Merci pour tous ces moments, les pauses café sous 7°C à Périgueux, la réintroduction des mulettes, les longs trajets, la fabrication d'aquarium spécial mulette, la stupéfaction de retrouver toutes les mulettes en forme dans les pompes filtrantes, l'observation des algues au microscope, la fabrication du DAUTA, les systèmes D pour les manip.... Je suis vraiment contente de t'avoir connu et j'espère réellement que l'on aura l'occasion de se recroiser. Merci encore pour tout Bruno.

Mon cher B2, je te dois tellement. Jérôme, Christelle, Bénédicte, Blandine, Pauline, merci à chacun de vous de m'avoir fait découvrir le métier de chercheur lors de mes divers passages au sein de votre laboratoire, en stage de master 1, une partie du master 2 et enfin lors de la thèse. Cela fait plus de 6 ans que je travaille avec vous et à chaque fois j'ai toujours été très bien accueillie. Merci pour vos connaissances, merci pour votre partage, pour les pauses gâteaux et chocolats sur des discussions scientifiques ou sur la vie en général. Merci de m'avoir permis de réaliser une partie de ma thèse au B2, de m'avoir partagé vos connaissances sur le daniovisio et sur le comportement des organismes. Pauline, je tenais à te remercier de m'avoir formée à la recherche. J'ai tellement appris avec toi qu'aujourd'hui encore j'applique tes conseils et tes règles en laboratoire. Merci aussi de m'avoir accompagnée jusqu'à la soutenance de thèse et ce depuis la fin de mon stage avec toi. Je vous remercie d'avoir fait de ma première expérience en tant que chercheuse, un moment qui va finalement concrétiser mes motivations à poursuivre en recherche, et pour cela je ne vous remercierai jamais assez.

Alexis et Florent, je ne sais pas ce qu'aurait été ma thèse sans vous. Merci à tous les deux, pour votre gentillesse, votre bonne humeur et vos accueils chaleureux à Firbeix, merci pour vos expériences et pour votre implication dans le projet LIFE. Je vous remercie aussi pour tout le temps que vous m'avez consacré pendant la thèse, pour votre aide si précieuse et pour votre soutien.

Cerise, Patrice, Adeline, Nathalie, Régine, Pierre, Jean-charles, Mohammedou, Déborah, Émilie, Damien, Laure, Mickael, Fabien, Agnès et Pierre-Yves, un grand merci à vous pour votre accueil au sein de l'équipe EA d'Arcachon, merci pour vos conseils et pour votre expérience. Merci à chacun de vous d'avoir participé de près ou de loin à ma thèse.

Pendant la thèse, on rencontre forcément différentes personnes dotées de compétences que tu es sur le point d'acquérir et sans qui les thèses ne pourraient être réalisées. Je tenais à commencer par remercier Marie-Ange Cordier, avec qui j'ai eu l'opportunité d'apprendre à doser des sels nutritifs à l'aide d'appareils composés d'une quantité impressionnante de tubes !! Marie-Ange, merci pour tout le temps consacré aux dosages de mes échantillons et je sais au combien il nous en a fallu des jours entiers pour doser ces tubes ! Merci pour ta bonne humeur, pour ton partage, j'ai beaucoup apprécié travailler et échanger avec toi. Christelle, merci de m'avoir formée sur le duo Danio+Etho, cette machine des fois capricieuse mais tellement révolutionnaire !! Merci aussi pour les 6 dernières années, merci pour ton accueil toujours chaleureux lorsque je viens au B2, merci pour toute l'aide que tu m'as apportée depuis 2015 ! Je tenais également à remercier Alicia Romero pour les essais préliminaires réalisés sur l'étude du comportement des moules. En ce qui concerne ma formation en BIOMOL, je tiens à remercier Cerise, Patrice, Anthony et Fabien d'avoir contribué à l'enrichissement de mes compétences dans ce domaine qui m'était alors encore inconnu avant de commencer la thèse. Fabien, je tiens également à te remercier de m'avoir formée à l'épigénétique, un domaine émergent et très intéressant. Merci pour ta pédagogie et pour tous tes conseils. PY et Émilie, je vous remercie pour votre aide sur toute la partie dosage de métaux et merci aussi de m'avoir formé sur ces machines complexes et capricieuses.

En quatre ans de thèse, on crée forcément de forts liens avec les personnes qui partagent notre quotidien au laboratoire. Ma thèse n'aurait certainement pas été la même sans chacun de vous. Alison, mon acolyte de labo, merci pour ces années, merci d'avoir été là pour moi. Cela a été un plaisir pour moi de vivre cette aventure avec toi, on a pu partager nos



expériences en tant que doctorantes et partager tellement de moments ensemble : nos interminables pauses clopes et sorbet, la découverte de la Finlande pour la SETAC, nos déjeunés (toujours les mêmes merci Leclerc) à 14h, nos quelques samedis à taffer au labo, nos discussions sur tout et rien. Je suis vraiment contente de t'avoir rencontrée et j'espère que l'on aura un jour l'occasion de se voir à Tahiti, je t'y attends de pied ferme ! Mohcine, mon ptit Mohcine, mon plus grand regret est de t'avoir connu qu'au milieu de ma thèse. Merci pour ton soutien et tes encouragements lorsque la thèse devenait difficile, merci pour ta bonne humeur et merci d'être la belle personne que tu es, bienveillante, généreuse et attentionnée. Ma tata alias Christelle, pareil sans toi ma thèse n'aurait pas été la même ! Merci pour toutes ces pauses qui m'ont beaucoup aidé à me détendre grâce à nos fous rires ! Ma floflo, merci pour ton aide précieuse, merci d'être là pour nous, pour tous les étudiants, comme une maman. Tu m'as tellement apporté pendant cette thèse, merci infiniment pour tout ce que tu as fait pour moi, je ne te remercierai jamais assez. Mon petit Max et mon ptit Ayou ! Je vous ai malheureusement connu que 6 mois avant la fin de ma thèse et pourtant j'ai l'impression de vous connaître depuis toujours. Merci à tous les deux pour votre gentillesse, votre générosité et votre bonne humeur. Merci pour tous ces beaux moments passés ensemble, les afterwork en face du labo sur la plage avec nos ukulélés, les balades dans Arcachon, les discussions sur Tahiti, les plans plage à 19h dans une eau à 15°C, la découverte de la jetée en face du labo après 4 ans de thèse, et bien d'autres encore.... Merci pour votre soutien lors de la rédaction de mon manuscrit, vous avez toujours trouvé les mots pour me booster dans cette phase compliquée. Merci aussi à chacun de vous de m'avoir partagé vos expériences en tant que docteurs.

Lors de ma thèse j'ai également eu l'occasion d'encadrer des stagiaires que je tenais à remercier pour leur investissement dans le projet et pour leur aide précieuse. Thomas, Sarah et Kevin, cela a été un grand plaisir pour moi de vous former à la vie en laboratoire de recherche. J'espère avoir pu à travers ma passion, vous transmettre au mieux mes connaissances.

Plus largement, je souhaiterais remercier le Parc Naturel Régional du Périgord-Limousin, sans qui le projet LIFE – Haute Dronne n'aurait pas vu le jour. Un grand merci à Charlie, Meriem et Nathalie, avec qui j'ai eu l'occasion d'échanger et avec qui j'ai eu la chance de participer à la réintroduction des bébés moules. J'ai vraiment pris plaisir à travailler avec vous et j'ai été très impressionnée par votre investissement et votre implication dans le projet.

Je tenais également à remercier les différentes entités qui financent ce projet : l'union Européenne, l'Agence de l'eau Adour-Garonne, la région Nouvelle-Aquitaine, le département de la Dordogne, le gouvernement Français et l'association « Initiative Biosphere Dordogne ».

Mes études en France m'ont permis de rencontrer de merveilleuses personnes pendant le Master. Bettie, Flo, Sandra et Charlène, merci milles fois les filles pour votre soutien inconditionnel, merci de faire partie de ma vie et d'avoir été présentes pour moi. Je suis tellement contente de vous connaître ! J'espère vous retrouver toutes à Tahiti un jour. Merci encore pour tout, les filles.

Ma chère famille, vous m'avez accompagnée dans cette aventure depuis le début. Avant même de commencer la thèse, vous avez été un pilier important dans ma vie professionnelle, vous m'avez toujours soutenue et encouragée. Vous n'imaginez pas à quel point je vous suis reconnaissante d'avoir été là pour moi. Ma petite sœur, merci pour tout ce que tu as fait pour moi, merci pour ton aide pendant la thèse et ton soutien inégalable, tu partages mon quotidien depuis 29 ans et ta présence dans ma vie contribue fortement à mon bonheur et mon bien être. Ma grande sœur, merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir poussée à aller loin. Merci d'avoir été là pour moi lorsque le monde autour de moi s'est effondré, merci pour tout l'amour que tu nous donnes, pour ta gentillesse et ta générosité. Mes amours, Here, Jess, Vate et Neuh, merci à vous de faire partie de ma vie et de m'avoir encouragé comme vous l'avez fait, votre présence à chaque moment clé de ma vie, m'a permis de garder la tête haute et d'accomplir mes objectifs.

Mes chers amis, les taishs, merci d'avoir été là pour moi pendant la thèse mais aussi depuis mon arrivée en France et cela jusqu'à aujourd'hui. Vous m'avez toujours encouragée et soutenue dans mes projets, je vous en suis très reconnaissante. Un grand merci aussi à toutes les personnes que j'ai rencontrées dans l'AEPP, vous aussi vous faites partie intégrante de ma vie Bordelaise, vous avez su être cette chaleur Polynésienne qui me manquait tant en France et pendant la thèse.

Mes chers parents, vous n'êtes plus là physiquement pour le voir, mais j'espère que de là-haut vous êtes fières de voir votre fille accomplir ses objectifs. Bien que je n'ai pas eu la chance de vous avoir longtemps de ma vie, je vous remercie pour votre éducation. Papa merci pour toutes les choses que tu m'as apprises. Tu as toujours été une figure intellectuelle à mes yeux, et mon objectif de vie a toujours été de te rendre fière. Maman, merci d'avoir toujours tout fait pour que l'on aille loin dans nos études malgré la distance qui nous séparait. Merci

d'avoir été là pour nous, merci de nous avoir inculqué tes si belles valeurs dont je suis aujourd'hui très fière. Merci à tous les deux d'avoir fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. Cette thèse, je vous la dédie car je sais que quelque part sans vous, tout ça n'aurait pas été possible.

# Table des matières

VALORISATION SCIENTIFIQUE .....	14
LISTE DES ABREVIATIONS .....	15
LISTE DES FIGURES .....	18
LISTE DES TABLEAUX .....	21
INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	24
CHAPITRE I. ÉTAT DE L'ART.....	31
1.    GENERALITES .....	32
1.1. <i>Classification et description de l'espèce</i> .....	32
1.2. <i>Traits de vie et exigence écologique</i> .....	34
1.3. <i>Caractéristiques de l'espèce</i> .....	40
2.    REPARTITION GEOGRAPHIQUE DE L'ESPECE .....	41
3.    ÉTATS DES POPULATIONS EN EUROPE ET EN FRANCE .....	43
4.    CAUSES DU DECLIN DES POPULATIONS DE MOULE PERLIERE .....	44
4.1. <i>Surexploitation des perles</i> .....	44
4.2. <i>Disparition du poisson hôte</i> .....	45
4.3. <i>Dégradation, fragmentation et perte des habitats</i> .....	45
4.4. <i>Eutrophisation</i> .....	46
4.5. <i>Pollution</i> .....	47
4.6. <i>Changement climatique</i> .....	47
5.    STATUT ET PROTECTIONS.....	48
5.1. <i>Liste rouge UICN</i> .....	48
5.2. <i>Protections et réglementations</i> .....	48
6.    CONSERVATION DE L'ESPECE .....	49
6.1. <i>Projets mis en place en Europe</i> .....	49
6.2. <i>Projet LIFE13 NAT/FR/000506 Haute Dronne</i> .....	50
7.    ÉTATS DES CONNAISSANCES SUR LA SENSIBILITE DE L'ESPECE .....	52
7.1. <i>Données issues d'observations dans le milieu naturel</i> .....	52
7.2. <i>Données issues d'études en laboratoire</i> .....	53
8.    ÉTUDES ECOTOXICOLOGIQUES .....	56
8.1. <i>Types d'approches en écotoxicologie aquatique</i> .....	56
8.2. <i>Tests de toxicité aiguë et sub-aiguë</i> .....	57
8.3. <i>Test de toxicité chronique</i> .....	58
8.4. <i>Biomarqueurs</i> .....	58
CHAPITRE II. MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	63
1.    SITE D'ETUDE .....	65
1.1. <i>La Haute-Dronne</i> .....	65
1.2. <i>Occupation des sols et pressions sur la Haute-Dronne</i> .....	67
1.3. <i>Caractéristiques physico-chimiques de l'eau de la Haute-Dronne</i> .....	67
1.4. <i>Éléments traces métalliques retrouvés dans la Haute-Dronne</i> .....	68
2.    MODELE BIOLOGIQUE.....	70
2.1. <i>Production et description des juvéniles de moule perlière</i> .....	70
2.2. <i>Transport des organismes</i> .....	72
2.3. <i>Maintien et culture des juvéniles au laboratoire</i> .....	73
3.    FACTEURS ETUDIÉS DANS CE MANUSCRIT .....	74
3.1. <i>Température</i> .....	74
3.2. <i>Contaminants et nutriments</i> .....	74
4.    DEVELOPPEMENT DES PROTOCOLES D'EXPERIMENTATION .....	75
5.    PROTOCOLES D'EXPERIMENTATION MIS EN PLACE.....	78
5.1. <i>Tests de toxicité aiguë</i> .....	78
5.2. <i>Tests de toxicité chronique, subaiguë et effet de la température seule</i> .....	79
6.    PARAMETRES ETUDIÉS .....	80
6.1. <i>Bioaccumulation des métaux</i> .....	80
6.2. <i>Expression génique</i> .....	81
6.3. <i>Analyse comportementale</i> .....	87

7.	DOSAGE DES CONTAMINANTS .....	89
7.1.	<i>Métaux traces</i> .....	89
7.2.	<i>Nutriments</i> .....	90
8.	ANALYSES DES DONNEES ET STATISTIQUES.....	91
9.	EXPERIMENTATIONS MISES EN PLACE DANS CE MANUSCRIT.....	92
<b>CHAPITRE III. TOXICITE AIGÛE DE DIFFERENTS ELEMENTS TRACES METALLIQUES ET DES NUTRIMENTS SUR LES JUVENILES DE MOULE PERLIERE.....</b>		<b>94</b>
1.	ARTICLE 1: SENSITIVITY OF NEWLY TRANSFORMED JUVENILES OF THE FRESHWATER PEARL MUSSEL: <i>MARGARITIFERA MARGARITIFERA</i> (L.1758) TO ACUTE TOXICITY OF A WIDE RANGE OF CONTAMINANTS .....	96
1.1.	<i>Introduction</i> .....	97
1.2.	<i>Materials and methods</i> .....	98
1.3.	<i>Results</i> .....	101
1.4.	<i>Discussion</i> .....	106
1.5.	<i>Conclusion</i> .....	111
1.6.	<i>Acknowledgment</i> .....	111
2.	ARTICLE 2: ACUTE TOXICITY OF SODIUM CHLORIDE, NITRATES, ORTHO-PHOSPHATES, CADMIUM, ARSENIC AND ALUMINUM FOR JUVENILES OF THE FRESHWATER PEARL MUSSEL: <i>MARGARITIFERA MARGARITIFERA</i> (L.1758).....	113
2.1.	<i>Introduction</i> .....	114
2.2.	<i>Materials and Methods</i> .....	116
2.3.	<i>Results</i> .....	120
2.4.	<i>Discussion</i> .....	124
2.5.	<i>Conclusions</i> .....	129
<b>CHAPITRE IV. BIOACCUMULATION ET REPONSES TRANSCRIPTOMIQUES CHEZ LES JUVENILES DE MOULE PERLIERE CHRONIQUEMENT EXPOSES A L'ARSENIC ET AU CADMIUM.....</b>		<b>132</b>
1.	INTRODUCTION .....	134
2.	MATERIELS ET METHODES .....	136
2.1.	<i>Juvéniles de moule perlière</i> .....	136
2.2.	<i>Test de toxicité chronique</i> .....	136
2.3.	<i>Expression génétique</i> .....	138
2.4.	<i>Qualité de l'eau</i> .....	139
2.5.	<i>Dosage des contaminants</i> .....	139
2.6.	<i>Analyses statistiques</i> .....	140
3.	RESULTATS .....	140
3.1.	<i>Qualité de l'eau et concentrations en As et Cd</i> .....	140
3.2.	<i>Mobilité des organismes</i> .....	141
3.3.	<i>Bioaccumulation des métaux</i> .....	142
3.4.	<i>Expression génique</i> .....	143
4.	DISCUSSION.....	146
5.	CONCLUSION .....	149
<b>CHAPITRE V. EFFETS DES NUTRIMENTS EN CONCENTRATIONS ENVIRONNEMENTALES, ETUDIES SEULS OU EN MELANGE, ASSOCIES A LA TEMPERATURE, SUR L'EXPRESSION DES GENES DES JUVENILES DE MOULE PERLIERE.....</b>		<b>151</b>
1.	INTRODUCTION .....	153
2.	MATERIELS ET METHODES .....	155
2.1.	<i>Juvéniles de moule perlière</i> .....	155
2.2.	<i>Test multifactoriel de toxicité subaigüe</i> .....	155
2.3.	<i>Exposition à différentes températures</i> .....	157
2.4.	<i>Test de toxicité chronique aux nitrates et aux phosphates</i> .....	158
2.5.	<i>Analyse génétique</i> .....	159
2.6.	<i>Solutions et dosage des nutriments</i> .....	160
2.7.	<i>Paramètres physico-chimiques de l'eau</i> .....	160
2.8.	<i>Statistiques</i> .....	160
3.	RESULTATS .....	161
3.1.	<i>Test multifactoriel de toxicité subaigüe</i> .....	161
3.2.	<i>Exposition à différentes températures</i> .....	165
3.3.	<i>Test de toxicité chronique aux nutriments</i> .....	166
4.	DISCUSSION.....	168
5.	CONCLUSION .....	171

<b>CHAPITRE VI. ANALYSE COMPORTEMENTALE : UN NOUVEL OUTIL POUR L'ÉVALUATION DE L'EFFET DES POLLUANTS SUR LA MOULE PERLIÈRE.....</b>	<b>174</b>
ARTICLE 3. BEHAVIORAL ASSESSMENT: A NEW TOOL FOR THE EVALUATION OF THE CONTAMINANT EFFECTS ON THE FRESHWATER PEARL MUSSEL <i>MARGARITIFERA MARGARITIFERA</i> (L.1758) .....	176
1. INTRODUCTION .....	177
2. MATERIALS AND METHODS .....	179
2.1. <i>Juvenile mussels</i> .....	179
2.2. <i>Ethovisio behavior measurement</i> .....	179
2.3. <i>Protocol development</i> .....	179
2.4. <i>Standard juvenile mussel's behavior</i> .....	180
2.5. <i>Sodium chloride exposure</i> .....	180
2.6. <i>Data analysis</i> .....	181
3. RESULTS .....	182
3.1. <i>Development of the protocol</i> .....	182
3.2. <i>Standard behavior of juvenile mussels</i> .....	183
3.3. <i>Sodium chloride exposure</i> .....	185
4. DISCUSSION.....	186
5. CONCLUSION .....	189
6. ACKNOWLEDGMENTS.....	189
<b>CHAPITRE VII. EFFETS D'UNE EXPOSITION MULTI-STRESS DANS UN CONTEXTE ENVIRONNEMENTAL SUR LES JUVENILES DE MOULE PERLIÈRE : UNE ETUDE A DIFFERENTES ECHELLES DE L'ORGANISME (DU GENE AU COMPORTEMENT) ET A DIFFERENTES TEMPERATURES .....</b>	<b>191</b>
1. INTRODUCTION .....	193
2. MATERIELS ET METHODES .....	195
2.1. <i>Juveniles</i> .....	195
2.2. <i>Protocole d'expérimentation</i> .....	195
2.3. <i>Bioaccumulation</i> .....	196
2.4. <i>Expression génique</i> .....	196
2.5. <i>Comportement des juvéniles</i> .....	198
2.6. <i>Paramètres physico-chimiques de l'eau</i> .....	198
2.7. <i>Dosage des éléments traces métalliques dans l'eau</i> .....	198
2.8. <i>Dosage des nutriments dans l'eau</i> .....	198
2.9. <i>Analyses statistiques</i> .....	198
3. RESULTATS .....	200
3.1. <i>Paramètres physico-chimiques de l'eau</i> .....	200
3.2. <i>Concentrations réelles en contaminants et en nutriments</i> .....	200
3.3. <i>Bioaccumulation des métaux</i> .....	201
3.4. <i>Expression génique</i> .....	203
3.5. <i>Comportement</i> .....	205
4. DISCUSSION.....	207
5. CONCLUSION .....	212
<b>CHAPITRE VIII. SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>215</b>
1. PRINCIPAUX FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ET DE CONTAMINATION POUVANT AFFECTER LES POPULATIONS DE MOULE PERLIÈRE A L'ÉCHELLE DE LA HAUTE-DROME.....	218
2. QUELLE EST LA SENSIBILITÉ « GÉNÉRALE » DES JUVENILES DE <i>M. MARGARITIFERA</i> AUX FACTEURS DE CONTAMINATION MÉTALLIQUE ET AUX NUTRIMENTS ? .....	221
3. QUELS SONT LES MÉCANISMES DE TOXICITÉ INDUITS PAR LES DIFFÉRENTS FACTEURS DE STRESS ÉTUDIÉS ? .....	223
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>229</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>249</b>
1. ANNEXE 1 : TEST DE TOXICITÉ AIGÛE AU CHLORURE DE SODIUM (48H) – FIGURE S1 ET TABLE S1. ....	250
2. ANNEXE 2 : PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES, POURCENTAGE DE VIABILITÉ DES JUVENILES ET MOYENNES DES CONCENTRATIONS MESURÉES – TABLE S2 ET S3. ....	251

## VALORISATION SCIENTIFIQUE

### Publications scientifiques

**Belamy, T.;** Legeay, A.; Etcheverria, B.; Cordier, M.-A.; Gourves, P.-Y.; Baudrimont, M. Acute Toxicity of Sodium Chloride, Nitrates, Ortho-Phosphates, Cadmium, Arsenic and Aluminum for Juveniles of the Freshwater Pearl Mussel: *Margaritifera margaritifera* (L. 1758). *Environments* **2020**, **7**, 48. doi.org/10.3390/environments7060048 **(IN ENVIRONMENTS)**

**Belamy, T.;** Baudrimont, M.; Dassie, E.; Cordier, M.-A.; Gourves, P.-Y.; Legeay, A. Sensitivity of newly transformed juveniles of the freshwater pearl mussel: *Margaritifera margaritifera* (L. 1758) to acute toxicity of a wide range of contaminants **(IN PREP)**

**Belamy, T.;** Legeay, A.; Cachot, J.; Clerandau, C.; LeBihanic, F.; Baudrimont, M. Behavioral assessment: A new tool for the evaluation of the contaminant effects of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* (L. 1758) **(IN PREP)**

### Congrès internationaux

#### *Communications affichées*

**Belamy, T.;** Legeay, A.; Etcheverria, B.; Baudrimont, M. Sensibility of freshwater pearl mussel juveniles (*Margaritifera margaritifera*) to environmental and contamination factors. Society of Environmental Toxicology And Chemicals (SETAC) Rome, Italie **(2018)**

**Belamy, T.;** Baudrimont, M.; Cordier, M.-A.; Etcheverria, B.; Legeay, A. Sensibilité des juvéniles de moule perlière (*Margaritifera margaritifera*) aux facteurs environnementaux et de contamination. EcoBIM Bordeaux, France **(2018)**

**Belamy, T.;** Baudrimont, M.; Etcheverria, B.; Cordier, M.-A.; Gourves, P.-Y.; Legeay, A. Acute toxicity of different toxicants to freshwater pearl mussel juveniles (*Margaritifera margaritifera*). Society of Environmental Toxicology And Chemicals (SETAC) Helsinki, Finlande **(2019)**

#### *Communications orales*

**Belamy, T.;** Baudrimont, M.; Cordier, M.-A.; Etcheverria, B.; Legeay, A. Ecotoxicological studies on juvenile of the freshwater pearl mussel of *M. margaritifera* for reintroduction of this endangered species. Freshwater Mollusk Conservation Society – International meeting EUROPE Verbania, Italie **(2018)**

**Belamy, T.;** Legeay, A.; Cordier, M.-A.; Etcheverria, B.; Baudrimont, M. Acute toxicity of sodium chloride, nitrates, phosphates, cadmium and arsenic to freshwater pearl mussel juveniles (*Margaritifera margaritifera*). Freshwater mussels: Search for resettlement habitats and evaluation of protection measures WORKSHOP Dresde, Allemagne **(2019)**

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>12s</b>	12 S ribosomal
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>Al</b>	Aluminium
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>As</b>	Arsenic
<b>ASTM</b>	American society for testing and materials
<b>ATP</b>	Adénosine-triphosphate
<b>bak</b>	Bcl-2 antagonist/killer
<b>bcl2</b>	B-cell lymphoma 2
<b>c3</b>	Complement C3
<b>card11</b>	Caspase recruitment domain family member 11
<b>casp</b>	Caspase
<b>CAT</b>	Catalase
<b>Cd</b>	Cadmium
<b>CE50 ou EC50</b>	Concentration effectrice à 50%
<b>CL50 ou LC50</b>	Concentration létale à 50%
<b>Co</b>	Cobalt
<b>coxI</b>	Cytochrome C oxydase subunit 1
<b>Cr</b>	Chrome
<b>Cu</b>	Cuivre
<b>EIF2</b>	Eukaryotic translation initiation factor 2



<b>ERO</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>ETM(s)</b>	Élément(s) trace(s) métallique(s)
<b>Fe</b>	Fer
<b>FWPM</b>	Freshwater pearl mussel
<b>gstpi</b>	Glutathione S-Transferase Pi
<b>ICP-EOS</b>	Spectrométrie d'émission optique à plasma à couplage inductif
<b>LD</b>	Limite de détection
<b>LIFE</b>	Instrument financier pour l'environnement
<b><i>M. margaritifera</i></b>	<i>Margaritifera margaritifera</i>
<b>MDA</b>	Malondialdéhyde
<b>Mn</b>	Manganèse
<b>MT</b>	Métallothionéine
<b>mxr</b>	Multidrug resistance
<b>NaCl</b>	Chlorure de sodium
<b>Ni</b>	Nickel
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Nitrates
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>p53</b>	Tumor Protein 53
<b>Pb</b>	Plomb
<b>PCR</b>	Réaction en chaîne par polymérase
<b>PNEC</b>	Predicted no effect concentration
<b>PNRPL</b>	Parc naturel régional du Périgord-Limousin
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	Ortho-phosphates
<b>rad51</b>	RAD51 Recombinase

<b>rpl7</b>	Ribosomal protein L7
<b>SAA</b>	Spectrométrie d'absorption atomique
<b>SIE-AG</b>	Système d'information sur l'eau Adour-Garonne
<b>SOD</b>	Superoxyde dismutase
<b>UE(s)</b>	Unité(s) d'expérimentation
<b>UEu</b>	Union Européenne
<b>UICN</b>	Union internationale pour la conservation de la nature
<b>xrcc4</b>	X-ray repair cross complementing 4
<b>Zn</b>	Zinc

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. MOULE PERLIERE D'EAU DOUCE <i>MARGARITIFERA MARGARITIFERA</i> (SKINNER ET AL. 2003) .....	32
FIGURE 2. PHOTOGRAPHIES D'UNE MOULE PERLIERE AU STADE ADULTE (A GAUCHE) ET AU STADE JUVENILE (A DROITE), ISSUES DE LA RIVIERE DRONNE (DORDOGNE, FRANCE). .....	33
FIGURE 3. MORPHOLOGIE DE LA MOULE PERLIERE <i>M. MARGARITIFERA</i> (MOTTE 2005). .....	33
FIGURE 4. ILLUSTRATION DE L'ANATOMIE DE LA MOULE PERLIERE <i>MARGARITIFERA MARGARITIFERA</i> (ADAPTEE DE ZIUGANOV ET AL. 1994).....	34
FIGURE 5. CYCLE DE VIE DE LA MOULE PERLIERE <i>MARGARITIFERA MARGARITIFERA</i> (L. 1758) PRESENTANT LES QUATRE STADES DE DEVELOPPEMENT DE L'ESPECE AINSI QUE LA DUREE DE CHACUNE DE CES PHASES (ADAPTEE DE SKINNER ET AL. 2003).....	37
FIGURE 6. REPARTITION GEOGRAPHIQUE DE <i>M. MARGARITIFERA</i> DANS LE MONDE, D'APRES UICN 2020 (A); EN FRANCE, D'APRES COCHET & GOUILLOUX, 2004 (B) ET EN EUROPE, D'APRES GEIST 2010 (C). .....	42
FIGURE 7. A. FERME D'ELEVAGE DE LA MOULE PERLIERE DE FIRBEIX; B. AUGES DE CULTURE DES JUVENILES DE MOULE PERLIERE ; C. LABORATOIRE DE CULTURE D'ALGUES POUR L'ALIMENTATION DES MOULES PERLIERES ; D. BACS ACCUEILLANTS LES TRUITELLES INFESTEES PAR LES LARVES DE MOULE PERLIERE (SOURCE : M. BAUDRIMONT©) .....	51
FIGURE 8. DIFFERENTES APPROCHES EMPLOYEES EN ECOTOXICOLOGIE AQUATIQUE (D'APRES CAQUET ET AL. 1989).....	56
FIGURE 9. COURBE DOSE-REPONSE TYPIQUE .....	57
FIGURE 10. SITUATION GEOGRAPHIQUE DE LA DRONNE DANS SON BASSIN VERSANT (A) ET DE LA HAUTE-DRONNE (B) D'APRES LE PNRPL.....	65
FIGURE 11. COURS D'EAU (HAUTE DRONNE + MANET) AYANT FAIT L'OBJET D'UNE LABELLISATION « SITES RIVIERES SAUVAGES » DANS LE CADRE DU PROJET LIFE13 NAT/FR/0000506. (SOURCES : PNRPL) .....	66
FIGURE 12. DIFFERENTS STADES DE DEVELOPPEMENT DES LARVES DE MOULE PERLIERE (ADAPTE DE PICHLER-SCHEDER ET AL. 2011) 70	
FIGURE 13. PHOTOGRAPHIE D'UNE MOULE PERLIERE APRES EXPULSION DES LARVES SUITE A UN CHOC THERMIQUE (PHOTO : T.BELAMY ©).....	70
FIGURE 14. DISTANCE ENTRE LA FERME D'ELEVAGE (FIRBEIX) ET LE LABORATOIRE (ARCACHON) (SOURCE: GEOPORTAIL) .....	72
FIGURE 15. PHOTOGRAPHIE DU DISPOSITIF DE MAINTIEN DES ORGANISMES AU LABORATOIRE.....	73
FIGURE 16. SCHEMA PRESENTANT LES DIFFERENTES ETAPES DE LA PCR.....	83
FIGURE 17. CHAMBRE D'OBSERVATION DANIOVISION (A), REGULATEUR THERMIQUE HUBER (B), DISPOSITIF DU SYSTEME POUR L'ETUDE DU COMPORTEMENT (C).....	87
FIGURE 18. MICROPLAQUE DE 12 PUICTS (LONGUEUR X LARGEUR : 10.2 X 7 CM) CONTENANT DES JUVENILES DE MOULE PERLIERE (A), DETECTION DES MOULES PAR LE LOGICIEL ETHOVISION XT (B) ET TRACES DES DEPLACEMENTS DES INDIVIDUS A LA FIN D'UN ENREGISTREMENT DE 20 MIN (C) .....	88
FIGURE 19. COPPER MEDIAN LETHAL CONCENTRATIONS OBTAINED IN 96-H ACUTE TOXICITY TEST CONDUCTED ON < 10-DAY OLD JUVENILES OF DIFFERENT FRESHWATER MUSSEL SPECIES FROM THE UNIONIDAE FAMILY (FULL BARS) AND FROM THE MARGARITIFERIDAE FAMILY (HATCHED BARS). (1), (2) OR (3) TWO OR THREE LC50S OBTAINED FOR THE SAME SPECIES IN THE SAME STUDY; (A) (WANG ET AL. 2007); (B) (WANG ET AL. 2017); (C) (WANG ET AL. 2010); (D) THE PRESENT STUDY; (E) (POPP ET AL. 2018); (F) (NAKAMURA ET AL. 2020); (G) (KELLER AND ZAM 1991); .....	105

FIGURE 20. VIABILITY (% $\pm$ STANDARD DEVIATION (SD)) OF 22-MONTH-OLD <i>M. MARGARITIFERA</i> JUVENILES EXPOSED TO SODIUM CHLORIDE IN 96 H ACUTE TOXICITY TESTS CONDUCTED WITH SUBSTRATE (DASHED LINE) OR WITHOUT (SOLID LINE) A SAND SUBSTRATE AT 16 °C. ....	121
FIGURE 21. PROTOCOLES EXPERIMENTAUX MIS EN PLACE POUR L'EXPOSITION CHRONIQUE DES JUVENILES DE MOULE PERLIERE AU CADMIUM ET A L'ARSENIC PENDANT 21 JOURS A 16°C. ....	137
FIGURE 22. CONCENTRATIONS MOYENNES EN CADMIUM ( $\mu\text{G/G}$ , PS) DANS DES JUVENILES DE <i>M. MARGARITIFERA</i> (COQUILLE COMPRISE), AGES DE 16 MOIS APRES 4, 7 ET 21 JOURS D'EXPOSITION A DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN Cd. LES BARRES D'ERREURS CORRESPONDENT AUX ECART-TYPES (N= 3, POOLS DE 5 INDIVIDUS). LES LETTRES MONTRENT LES DIFFERENCES SIGNIFICATIVES (P <0.05). ....	142
FIGURE 23. CONCENTRATIONS MOYENNES EN ARSENIC ( $\mu\text{G/G}$ , PS) DANS DES JUVENILES DE <i>M. MARGARITIFERA</i> (COQUILLE COMPRISE), AGES DE 17 MOIS APRES 4, 7 ET 21 JOURS D'EXPOSITION A DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN As. LES BARRES D'ERREURS CORRESPONDENT AUX ECART-TYPES (N= 3, POOLS DE 5 INDIVIDUS). LES LETTRES MONTRENT LES DIFFERENCES SIGNIFICATIVES (P <0.05) ....	143
FIGURE 24. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL POUR L'EXPOSITION MULTIFACTORIELLE AVEC 5 INDIVIDUS PAR UNITE D'EXPERIMENTATION OU CHAQUE CONDITION EST MISE EN PLACE EN TRIPLICAT (N1, N2 ET N3 : NITRATES A 5, 10 ET 50 MG/L ; P1, P2 ET P3 : ORTHO-PHOSPHATES A 0.05, 0.22 ET 1 MG/L) ....	155
FIGURE 25. PROTOCOLE EXPERIMENTAL MIS EN PLACE POUR L'ETUDE DE L'EFFET DE LA TEMPERATURE .....	157
FIGURE 26. SCHEMA DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL POUR LE TEST DE TOXICITE CHRONIQUE AUX NUTRIMENTS .....	158
FIGURE 27. MEAN DISTANCE TRAVELLED (MM) BY 2-YEAR-OLD JUVENILE MUSSELS (N=12) IN A 50 MIN TRACKING VIDEO WITH A 10 MIN DARK PERIOD FOLLOWING BY 20 MIN LIGHT ON AND 20 MIN DARK PERIODS AT 16°C. DOTS CORRESPOND TO EACH INDIVIDUAL AND MEAN DISTANCE TRAVELLED AT EACH TIME IS REPRESENTED BY THE FULL LINE. LETTERS SHOW SIGNIFICANT DIFFERENCES (P<0.05; KRUSKAL-WALLIS).....	182
FIGURE 28. MEAN DISTANCE TRAVELLED (MM) BY 2-YEAR-OLD <i>M. MARGARITIFERA</i> JUVENILES (N=12) EVERY 10 MIN IN A 40 MIN VIDEO TRACK RECORDING DIVIDED IN 10 MIN DARK PERIOD FOLLOWING BY A 30 MIN LIGHT ON PERIOD. DASHED LINES CORRESPOND TO TWO DIFFERENT RECORDING (REPLICATE 1 AND REPLICATE 2) ASSESSED WITH THE SAME INDIVIDUAL AT ONE HOUR OF INTERVAL. FULL DARK LINE CORRESPONDS TO THE MEAN OF BOTH REPLICATES. ....	183
FIGURE 29. MEAN VELOCITY ( $\mu\text{M/S} \pm \text{SD}$ ) FOR 3-YEAR-OLD <i>M. MARGARITIFERA</i> JUVENILES DURING A "CONTROL" EXPERIMENT AT 16°C FOR 20 MINUTES PERIOD OF LIGHT. EACH BAR CORRESPONDS TO ONE REPLICATE (N=12). NO STATISTICAL DIFFERENCES WERE FOUND BETWEEN THE 3 GROUPS (P > 0.05). ....	184
FIGURE 30. MEAN DISTANCE TRAVELLED (MM $\pm$ SD) FOR 3-YEAR-OLD <i>M. MARGARITIFERA</i> JUVENILES DURING A "CONTROL" EXPERIMENT AT 16°C FOR 20 MINUTES PERIOD OF LIGHT. EACH BAR CORRESPONDS TO ONE REPLICATE (N=12). NO STATISTICAL DIFFERENCES WERE FOUND BETWEEN THE 3 GROUPS (P > 0.05). ....	184
FIGURE 31. RELATIONSHIP BETWEEN THE DISTANCE TRAVELLED (MM) BY JUVENILE MUSSELS OF <i>M. MARGARITIFERA</i> (N=36) FOR 20 MINUTES AND THEIR RESPECTIVE LENGTH (MM). ....	185
FIGURE 32. MEAN DISTANCE TRAVELLED BY 3-YEAR-OLD <i>M. MARGARITIFERA</i> JUVENILES EXPOSED TO NaCl AND TO CONTROL CONDITION AT 16°C, AFTER 24 HOURS EXPOSURE (N=3). LETTERS SHOW SIGNIFICANT DIFFERENCES (P<0.05). ....	186
FIGURE 33. PROTOCOLE EXPERIMENTAL MIS EN PLACE POUR L'EXPOSITION MULTI-STRESS DES JUVENILES DE MOULE PERLIERE AGES DE 38 MOIS A DIFFERENTS FACTEURS DE CONTAMINATION EN MELANGE (Al, As, Cu, NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ET PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ) COMBINES A TROIS TEMPERATURES : 16, 26 ET 30°C. ....	195

FIGURE 34. CONCENTRATIONS MOYENNES EN AL (EN $\mu\text{G/G}$ , PS) DANS LE CORPS MOU DES JUVENILES DE MOULE PERLIERE AGES DE 38 MOIS EN FONCTION DE LA TEMPERATURE D'EXPOSITION ET DU TEMPS DE PRELEVEMENT. LES BARRES D'ERREURS CORRESPONDENT AUX ECART-TYPES (N=3). AUCUNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE N'EST OBSERVEE ENTRE LES DIFFERENTES CONDITIONS ET DIFFERENTS TEMPS D'EXPOSITION ( $P>0.05$ ).....	201
FIGURE 35. CONCENTRATIONS MOYENNES EN AS (EN $\mu\text{G/G}$ , PS) DANS LE CORPS MOU DES JUVENILES DE MOULE PERLIERE AGES DE 38 MOIS EN FONCTION DE LA TEMPERATURE D'EXPOSITION ET DU TEMPS DE PRELEVEMENT. LES BARRES D'ERREURS CORRESPONDENT AUX ECART-TYPES (N=3). LES LETTRES INDIQUENT UNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ( $P<0.05$ ). .....	202
FIGURE 36. CONCENTRATIONS MOYENNES EN CU (EN $\mu\text{G/G}$ , PS) DANS LE CORPS MOU DES JUVENILES DE MOULE PERLIERE AGES DE 38 MOIS EN FONCTION DE LA TEMPERATURE D'EXPOSITION ET DU TEMPS DE PRELEVEMENT. LES BARRES D'ERREURS CORRESPONDENT AUX ECART-TYPES (N=3). AUCUNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE N'EST OBSERVEE ENTRE LES DIFFERENTES CONDITIONS ET LES DIFFERENTS TEMPS D'EXPOSITION ( $P>0.05$ ).....	203
FIGURE 37. DISTANCES MOYENNES PARCOURUES $\pm$ ECART-TYPES (EN MM) PAR LES JUVENILES DE MOULE PERLIERE EXPOSES A LA LUMIERE PENDANT 20 MINUTES, APRES 4 ET 14 JOURS D'EXPOSITION AUX DIFFERENTES CONDITIONS D'EXPOSITION. AUCUNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE N'A ETE OBSERVEE ( $P>0.05$ , KRUSKAL-WALLIS).....	206

## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I. VALEURS-GUIDES DE DIFFERENTS PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES FIXEES PAR (BAUER 1988) ET (MOORKENS 2000; MOORKENS 2006) POUR LA MOULE PERLIERE A PARTIR D'OBSERVATIONS REALISEES DANS LE MILIEU NATUREL .....	35
TABLEAU II. ÉTATS DES POPULATIONS (GEIST 2010) ET STATUT DE CONSERVATION (LOPES-LIMA ET AL. 2016) DE MOULE PERLIERE EN EUROPE .....	43
TABLEAU III. LISTES DES GENES ETUDIES, DES PROTEINES QU'ILS CODENT ET DU MODE D'ACTION DE CES PROTEINES .....	60
TABLEAU IV. VALEURS MOYENNES DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA HAUTE-DRONNE MESUREES ENTRE 2015 ET 2019 DANS DIFFERENTES COMMUNES LE LONG DU COURS D'EAU (N=9) D'APRES LE SITE DU SYSTEME D'INFORMATION SUR L'EAU DE L'ADOUR-GARONNE (SIE-AG).....	68
TABLEAU V. CONCENTRATIONS MOYENNES ± ECART-TYPE, MINIMALES ET MAXIMALES, EN AL, AS, CU, FE, MN ET ZN, MESUREES SUR DIFFERENTS SITES DE PRELEVEMENTS LE LONG DE LA HAUTE-DRONNE EN 2015 ET AU SEIN DE LA FERME AQUACOLE DE FIRBEIX EN 2018.....	69
TABLEAU VI. VALEURS GUIDES (EN µG/L) POUR LA QUALITE DE L'EAU DE CONSOMMATION FIXEES PAR L'OMS ET PAR L'UNION EUROPEENNE, ET PNEC (EN µG/L) FIXES PAR L'INERIS POUR AG, AL, AS, CD, CO, CR, CU, FE, MN, NI, PB ET ZN. ....	69
TABLEAU VII. NOMBRE D'INDIVIDUS REINTRODUITS DANS LA DRONNE EN FONCTION DES DIFFERENTES COHORTES DE MOULE PERLIERE ( <i>MARGARITIFERA MARGARITIFERA</i> ) PRODUITES A LA FERME AQUACOLE DE FIRBEIX ET DE L'AGE DES JUVENILES AU MOMENT DE LA REINTRODUCTION.....	71
TABLEAU VIII. TAILLES APPROXIMATIVES DES JUVENILES (EN MM) DE LA PREMIERE COHORTE (2016) EN FONCTION DE LEUR AGE (EN MOIS), ELEVES EN CAPTIVITE A LA FERME AQUACOLE DE FIRBEIX ET UTILISES LORS DES EXPERIMENTATIONS PRESENTEES DANS CE MANUSCRIT. ....	72
TABLEAU IX. LISTE DES CONTAMINANTS ET DES NUTRIMENTS ETUDIES.....	75
TABLEAU X. CHOIX DES DIFFERENTS FACTEURS (ELEMENTS TRACES METALLIQUES, NUTRIMENTS ET CHLORURE DE SODIUM) DANS LE CADRE DE CETTE ETUDE .....	75
TABLEAU XI. CONDITIONS GENERALES D'EXPERIMENTATION MISES EN PLACE POUR CONDUIRE LES TESTS DE TOXICITE AIGÜE. ....	78
TABLEAU XII. CONDITIONS D'EXPERIMENTATION MISES EN PLACE POUR CONDUIRE LES TESTS DE TOXICITE CHRONIQUE ET SUBAIGÜE .	79
TABLEAU XIII. LISTE DES GENES CIBLES, LEUR FONCTION BIOLOGIQUE ASSOCIEE ET LES COUPLES D'AMORCES UTILISES POUR L'ANALYSE GENETIQUE .....	85
TABLEAU XIV. LISTE DES EXPERIMENTATIONS MISES EN PLACE DANS CETTE ETUDE. ....	93
TABLEAU XV. MEAN (±SD) VALUES FOR WATER QUALITY PARAMETERS (PH, CONDUCTIVITY AND DISSOLVED OXYGEN) IN ACUTE TOXICITY EXPOSURE TO AL, AS, CD, CU, NI, NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> AND PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ON THREE DAYS OLD <i>M. MARGARITIFERA</i> JUVENILES AT 16°C. ....	101
TABLEAU XVI. MEAN MEASURED CONCENTRATIONS ± SD AND PERCENT NOMINAL EXPOSURE CONCENTRATIONS OF AL, AS, CD, CU, NI, NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> AND PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> FOR EACH CONDITION EXPOSURE IN ACUTE TOXICITY TESTS CONDUCTED ON 3 DAYS OLD JUVENILES OF <i>M. MARGARITIFERA</i> .....	102
TABLEAU XVII. MEDIAN LETHAL CONCENTRATIONS AND SUBLETHAL THRESHOLDS (IC95%) FOR SURVIVAL OF 3 DAYS OLD JUVENILES OF <i>M. MARGARITIFERA</i> AND MEAN PERCENTAGE VIABILITY FOR EACH EXPOSURE CONDITIONS IN AL, AS, CD, CU, NI, NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> AND PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> IN 96 HOURS ACUTE TOXICITY TESTS.....	103

TABLEAU XVIII. MEDIAN LETHAL CONCENTRATIONS ( $\pm$ IC95) FOR NICKEL, CADMIUM, ARSENIC, ALUMINUM AND NITRATE OBTAINED IN 96-H ACUTE TOXICITY TEST CONDUCTED ON < 10-DAY OLD JUVENILES OF DIFFERENT FRESHWATER MUSSEL SPECIES ALL FROM THE UNIONIDAE FAMILY EXCEPT FOR MARGARITIFERA GENDER WHICH ARE FROM THE MARGARITIFERIDAE FAMILY.....	104
TABLEAU XIX. MEDIAN EFFECTIVE CONCENTRATIONS (EC50s) IN 96 H ACUTE TOXICITY TESTS WITH SODIUM CHLORIDE, NITRATES, PHOSPHATES, CADMIUM AND ARSENIC FOR <i>M. MARGARITIFERA</i> JUVENILES. (T°C = 16 °C) (N=4). .....	122
TABLEAU XX. MEAN SURVIVAL (%) AND MEDIAN EFFECTIVE CONCENTRATIONS FOR CADMIUM ( $\mu$ G Cd/L) IN ACUTE TOXICITY TESTS WITH A SUBSTRATE FOR 16- AND 22-MONTH-OLD <i>M. MARGARITIFERA</i> JUVENILES, T°C = 16 °C. ....	123
TABLEAU XXI. CONDITIONS D'EXPERIMENTATION RECOMMANDEES PAR LE GUIDE STANDARD (ASTM E2455 2006) ET CELLES EMPLOYEES POUR LES EXPOSITIONS CHRONIQUES DES JUVENILES DE MOULE PERLIERE AU CADMIUM ET A L'ARSENIC.....	136
TABLEAU XXII. LISTE DES GENES ETUDIES, LEUR FONCTION BIOLOGIQUE ET LEURS SEQUENCES D'AMORCES RESPECTIVES. ....	138
TABLEAU XXIII. CONCENTRATIONS NOMINALES ET CONCENTRATIONS MOYENNES ( $\pm$ ECART-TYPE) MESUREES EN CADMIUM ET EN ARSENIC DANS L'EAU EN $\mu$ G/L (N = 17) ET PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES MESURES PENDANT L'EXPERIENCE (N = 6). ....	141
TABLEAU XXIV. POURCENTAGE DE JUVENILES MOBILES (%) EN DEBUT D'EXPERIENCE ET APRES 7, 14 ET 21 JOURS D'EXPOSITION AUX DIFFERENTES CONDITIONS. ....	141
TABLEAU XXV. EXPRESSION DES GENES, EXPRIMEE EN FACTEUR D'INDUCTION PAR RAPPORT AUX TEMOINS, DES JUVENILES DE MOULE PERLIERE AGES DE 16 MOIS, EXPOSES A 2 ET 5 $\mu$ G/L DE CADMIUM APRES 4, 7 ET 21 JOURS D'EXPOSITION A 16°C.....	144
TABLEAU XXVI. EXPRESSION DES GENES, EXPRIMEE EN FACTEUR D'INDUCTION PAR RAPPORT AUX TEMOINS, DES JUVENILES DE MOULE PERLIERE AGES DE 17 MOIS, EXPOSES A 10 ET 35 $\mu$ G/L D'ARSENIC APRES 4, 7 ET 21 JOURS D'EXPOSITION A 16°C.....	145
TABLEAU XXVII. GENES ETUDIES ET LEUR FONCTION BIOLOGIQUE ASSOCIEE. ....	159
TABLEAU XXVIII. MOYENNES ET ECART-TYPES DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'EAU DANS CHAQUE CONDITION, EN DEBUT ET EN FIN D'EXPERIENCE, POUR L'EXPOSITION A 16°C (N=2). ....	161
TABLEAU XXIX. MOYENNES ET ECART-TYPES DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'EAU DANS CHAQUE CONDITION, EN DEBUT ET EN FIN D'EXPERIENCE, POUR L'EXPOSITION A 22°C (N=2). ....	162
TABLEAU XXX. CONCENTRATIONS NOMINALES ET REELLES (MOYENNES $\pm$ ECART-TYPES) EN ORTHO-PHOSPHATES EN MG/L POUR CHAQUE CONDITION DE CONTAMINATION ET DE TEMPERATURE (16 ET 22°C) EN DEBUT D'EXPERIENCE (N=3). ....	163
TABLEAU XXXI. CONCENTRATIONS NOMINALES ET REELLES (MOYENNES $\pm$ ECART-TYPES) EN NITRATES EN MG/L POUR CHAQUE CONDITION DE CONTAMINATION ET DE TEMPERATURE (16 ET 22°C) EN DEBUT D'EXPERIENCE (N=3). ....	163
TABLEAU XXXII. FACTEURS D'INDUCTION PAR RAPPORT AUX TEMOINS, DES JUVENILES EXPOSES AUX DIFFERENTES CONDITIONS DE CONTAMINATION PAR LES NUTRIMENTS ETUDIES SEULS OU EN MELANGE ET A 16°C (N=3). ....	164
TABLEAU XXXIII. FACTEURS D'INDUCTION PAR RAPPORT AUX TEMOINS, DES JUVENILES EXPOSES AUX DIFFERENTES CONDITIONS DE CONTAMINATION PAR LES NUTRIMENTS ETUDIES SEULS OU EN MELANGE ET A 22°C. ....	165
TABLEAU XXXIV. MOYENNES $\pm$ ECART-TYPES DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'EAU POUR CHAQUE CONDITION DE TEMPERATURE. LES « N » REPRESENTENT LE NOMBRE DE VALEURS SUR LESQUELLES LES MOYENNES ONT ETE CALCULEES, SOIT LE NOMBRE DE MESURES EFFECTUEES. ....	165
TABLEAU XXXV. FACTEURS D'INDUCTION DE 15 GENES DE JUVENILES EXPOSES A 22 ET 26°C PENDANT 14 JOURS PAR RAPPORT A L'EXPRESSION DE CES MEMES GENES CHEZ LES JUVENILES TEMOINS EXPOSES A 16°C.....	166
TABLEAU XXXVI. MOYENNES $\pm$ ECART-TYPES (N=3) DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'EAU DANS CHAQUE CONDITION EN FONCTION DU TEMPS. ....	166

TABLEAU XXXVII. CONCENTRATIONS NOMINALES ET REELLES (MOYENNES ± ECART-TYPES) EN ORTHO-PHOSPHATES EN MG/L POUR CHAQUE CONDITION ET A CHAQUE TEMPS DE PRELEVEMENT. ....	167
TABLEAU XXXVIII. CONCENTRATIONS NOMINALES ET REELLES (MOYENNES ± ECART-TYPES) EN NITRATES EN MG/L POUR CHAQUE CONDITION ET A CHAQUE TEMPS DE PRELEVEMENT. ....	167
TABLEAU XXXIX. MEAN LENGTH AND WIDTH (MM ± SD) OF JUVENILE MUSSELS IN EACH OF THE 3 REPLICATES FOR THE ASSESSMENT OF THE STANDARD <i>M. MARGARITIFERA</i> JUVENILE BEHAVIOR. ....	185
TABLEAU XL. GENES ETUDIES, LEUR FONCTION BIOLOGIQUE ASSOCIEE ET LEURS SEQUENCES D'AMORCE. ....	197
TABLEAU XLI. VALEURS MOYENNES ± ECART-TYPES (N=5) DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES MESURES DANS LES UES CONTENANT LES INDIVIDUS TEMOINS ET EXPOSES, EN FONCTION DES CONDITIONS DE TEMPERATURE.....	200
TABLEAU XLII. VALEURS MOYENNES ± ECART-TYPES DES CONCENTRATIONS REELLES (N=4) MESUREES DANS LES UES CONTENANT LES INDIVIDUS TEMOINS ET EXPOSES AUX CONCENTRATIONS NOMINALES DE 100µGAL/L, 15µGAS/L, 2 µGCU/L, 50MGNO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L ET 1MGPO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L, EN FONCTION DES CONDITIONS DE TEMPERATURE. ....	201
TABLEAU XLIII. FACTEURS D'INDUCTION DES GENES CHEZ LES JUVENILES EXPOSES AUX DIFFERENTES CONDITIONS PAR RAPPORT AUX TEMOINS EXPOSES A 16°C, APRES 4 JOURS D'EXPOSITION. ....	204
TABLEAU XLIV. FACTEURS D'INDUCTION DES GENES CHEZ LES JUVENILES EXPOSES AUX DIFFERENTES CONDITIONS PAR RAPPORT AUX TEMOINS EXPOSES A 16°C, APRES 14 JOURS D'EXPOSITION. ....	205
TABLEAU XLV. RESULTATS MAJEURS DES DIFFERENTS TRAVAUX PRESENTES DANS CE MANUSCRIT. LE TYPE DE TEST DE TOXICITE, LA DUREE, LES PARAMETRES ETUDIES, L'AGE DES JUVENILES AINSI QUE LES FACTEURS DE STRESS ETUDIES, SONT EGALEMENT PRESENTES DANS CE TABLEAU. ....	217



---

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les écosystèmes aquatiques d'eau douce ne représentent qu'une infime partie de la surface totale de l'eau présente sur la terre. Pourtant, ces milieux concentrent environ 6% des espèces connues soit plus de 100 000 espèces (Dudgeon et al. 2006). Parmi elles, les invertébrés constituent une part importante de la biodiversité bien qu'ils soient restreints à des efforts de recherche moindre comparés aux vertébrés. Contrairement aux invertébrés marins, les mollusques terrestres et d'eau douce, concernent un groupe très diversifié surtout marqué par un déclin important des espèces qui le constituent (Lydeard et al. 2004). C'est notamment le cas des moules d'eau douce de la superfamille des Unionoidés. Ce groupe est caractérisé par un cycle de vie complexe nécessitant la présence d'un poisson hôte pour le développement des larves en tant qu'ectoparasite et la métamorphose en juvéniles (Skinner et al. 2003). Parmi ces moules, *Margaritifera margaritifera* ou moule perlière, de la famille des margaritiféridés, est considérée comme l'une des espèces les plus menacées en Europe (Bogan 1993; Young et al. 2001; Lopes-Lima et al. 2016). Il a été estimé que 90% et 99% des populations de *M. margaritifera*, en Europe et en France respectivement, ont été décimées. Plusieurs causes sont à l'origine du déclin rapide et drastique des populations européennes de moule perlière. Les menaces auxquelles l'espèce est confrontée concernent la surexploitation des perles, la disparition du poisson hôte, l'altération générale de la qualité de l'eau, la modification et la fragmentation des habitats, l'eutrophisation, la pollution et le changement climatique (Bogan 1993; Young et al. 2001; Strayer et al. 2004; Lopes-Lima et al. 2016; Lopes-Lima et al. 2018).

À des fins de conservation de l'espèce, plusieurs projets LIFE (l'instrument financier pour l'environnement) ont été mis en place dans différents pays de l'Europe. Ces projets visent principalement à renforcer les populations de *M. margaritifera* dans les rivières européennes à partir d'élevages en captivité. En France, un premier projet a été mis en place en 2010 (LIFE09 NAT/FR/000583), porté par l'association Bretagne Vivante, la fédération de pêche du Finistère et le centre permanent d'initiatives pour l'environnement des collines normandes, pour la préservation des populations de moule perlière du Massif armoricain (entre les régions de la Normandie et de la Bretagne). Un second projet LIFE, qui a débuté en 2014 (LIFE13/NAT/FR/000506), a été développé dans le but de préserver l'une des plus grandes populations françaises de *Margaritifera margaritifera* retrouvées dans la rivière Haute-Dronne (Département de la Dordogne en région Nouvelle-aquitaine) et de restaurer la continuité écologique du cours d'eau. Cette rivière concentre environ 15% de l'effectif national qui est estimé à 100 000 individus, d'où l'intérêt majeur de préserver cette

population. Ce programme dont la coordination est gérée par le Parc Naturel Régional Périgord-Limousin (PNRPL) et l'Université de Bordeaux par le biais de l'Unité Mixte de Recherche EPOC CNRS 5805 équipe Écotoxicologie Aquatique, a permis la création d'une ferme aquacole en 2016 dans la commune de Firbeix (Dordogne) pour la production de moules perlières. L'élevage en captivité a été mis en place afin de renforcer les populations de *M. margaritifera* présentes dans la Haute-Dronne mais également pour la réalisation d'études écotoxicologiques sur le stade juvénile de la moule perlière, considéré comme le stade le plus sensible de l'espèce (Geist and Auerswald 2007; Geist 2010). À terme, ces études permettront de préciser les exigences écologiques de *M. margaritifera* qui par conséquent, favoriseront le ciblage des zones de réintroduction. C'est dans le cadre de ce projet que les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés.

Les écosystèmes aquatiques constituent le réceptacle final de toutes pollutions issues des activités anthropiques, conduisant inévitablement à l'exposition des organismes aquatiques aux divers polluants rejetés dans l'environnement. La moule perlière est une espèce sédentaire dont l'activité de filtration lui permet de s'alimenter et de respirer, la rendant ainsi extrêmement sensible aux modifications de son habitat et de la qualité de l'eau. Par ailleurs, la pollution environnementale est considérée comme l'un des facteurs majeurs conduisant à la disparition des populations de *M. margaritifera* (Bauer 1988; Bogan 1993; Young et al. 2001; Strayer et al. 2004; Lopes-Lima et al. 2018). Cependant, à l'heure actuelle, les connaissances sur la sensibilité de l'espèce aux contaminants organiques ou inorganiques comme les pesticides ou les éléments traces métalliques (ETMs), ou aux facteurs environnementaux comme la température ou l'oxygène dissous, sont rares voire inexistantes. En effet, par son statut d'espèce en danger critique d'extinction (UICN 2011), plusieurs réglementations à l'échelle européenne (convention de Berne, directive « Habitat, Faune et Flore ») et à l'échelle nationale (arrêté du 23 avril 2007, fixant les listes des mollusques protégés sur l'ensemble du territoire et les modalités de leur protection) permettent la protection de la moule perlière, mais en même temps compliquent la réalisation d'études en conditions contrôlées de laboratoire. En ce qui concerne l'état des connaissances sur la sensibilité de l'espèce à la pollution environnementale, certaines études réalisées à partir d'observations dans le milieu naturel, laissent penser que les nutriments responsables de l'eutrophisation des milieux aquatiques comme les nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) et les phosphates ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), pourraient impacter le recrutement des populations de moule perlière (Bauer 1988; Moorkens 2000; Moorkens 2006). Aussi, une étude réalisée en laboratoire sur des adultes de *M. margaritifera* provenant

de la Haute-Dronne, a permis de montrer différents impacts toxiques du cadmium en concentrations faibles (2 et 5 µg/L), notamment sur la perturbation du système endocrinien et sur l'induction de gènes du stress oxydant (Baudrimont et al. 2020). Sur les juvéniles de moule perlière, seule une étude écotoxicologique a pu être rapportée dans la littérature (Taskinen et al. 2011). Cette étude réalisée sur une période de 7 jours, a montré un faible impact de l'aluminium et du fer, étudiés seuls ou en mélange dans des conditions acides ou non, sur la survie de juvéniles fraîchement décrochés et a permis de souligner la tolérance des organismes sur une courte période d'exposition. En raison du peu de connaissances sur l'impact de la pollution environnementale sur les juvéniles de *M. margaritifera*, il est aujourd'hui nécessaire d'améliorer nos connaissances sur la sensibilité des jeunes stades de vie de cette espèce face aux stress chimiques et aux facteurs environnementaux, auxquels l'espèce est potentiellement confrontée.

C'est dans ce contexte que les objectifs de cette thèse ont été posés afin **d'évaluer la sensibilité des juvéniles de moule perlière à différents facteurs de contamination (notamment ETMs), ou d'enrichissement du milieu par les nutriments et à la température.** La première approche consiste à déterminer les différents facteurs pouvant affecter l'espèce à l'échelle de la Haute-Dronne (**objectif n°1**). Cette rivière étant relativement épargnée de toute pollution anthropique, le choix des contaminants étudiés dans ce manuscrit s'est porté sur les données retrouvées dans la littérature pour les nutriments, et sur les contaminants d'intérêts dans le contexte de la Haute-Dronne pour les ETMs. La contamination métallique étudiée concerne ainsi :

- **L'arsenic (As)** en raison de la présence relativement élevée de ce contaminant dans la Haute-Dronne (due notamment au fond géochimique du site d'étude) avec une concentration maximale mesurée à 35 µg/L (données non publiées) ;
- **Le cadmium (Cd) dont la toxicité est bien connue** a été choisi à titre de comparaison aux effets induits par l'arsenic (le cadmium étant très peu présent dans la Haute-Dronne) ;
- **L'aluminium (Al)** en raison d'un pic de concentration mesuré à 120 µg/L en 2018 et de son utilisation dans les produits phytosanitaires ;
- **Le cuivre (Cu) et le nickel (Ni)** pour leur utilisation dans les produits phytosanitaires.

Compte-tenu de l'élévation croissante de la température au cours des dernières années et de l'impact avéré de la présence de retenues et barrages le long du cours de la Haute-Dronne sur ce paramètre, la température a été également considérée comme facteur pouvant potentiellement impacter les juvéniles de moule perlière.

Enfin, pour évaluer l'impact de ces divers facteurs de stress, différentes approches ont été mises en place (études des effets létaux et des effets chroniques) à différents niveaux d'organisation (échelles moléculaire, tissulaire et de l'organisme) où les contaminants ont été étudiés seuls ou en mélange, et en combinaison à différentes températures. Ces diverses approches permettront de déterminer la sensibilité générale des juvéniles de *M. margaritifera* aux différents facteurs de stress (**objectif n°2**) et d'évaluer leurs mécanismes de toxicité (**objectif n°3**).

Ce manuscrit comprend 8 chapitres permettant de répondre aux 3 objectifs de la thèse :

1. Dans un premier temps, une étude bibliographique introduira ce manuscrit pour contextualiser les travaux réalisés dans cette thèse (**Chapitre I**). L'état de l'art sur la moule perlière, l'état des connaissances actuelles sur sa sensibilité à la pollution environnementale ainsi que le choix des approches expérimentales mis en place dans ce manuscrit, seront présentés dans ce chapitre.
2. Le site d'étude ainsi que les bases méthodologiques employées pour la mise en place des expérimentations, seront ensuite présentés dans un second chapitre (**Chapitre II**).
3. La détermination des seuils de toxicité (CE50 : concentrations effectrices à 50%) des différents contaminants et nutriments étudiés sera présentée à travers deux études qui se distinguent principalement par l'âge des juvéniles utilisés. L'une de ces études a fait l'objet d'une première publication dans *Environments* (Belamy et al, 2020) et l'autre est actuellement en préparation (**Chapitre III**). Les effets létaux seront essentiellement étudiés à 16°C correspondant à la température moyenne annuelle de notre site étude.

4. Afin d'étudier l'impact d'une contamination métallique chronique à l'échelle moléculaire, l'exposition à l'As ou au Cd a été menée, étudiés isolément à des concentrations environnementales, par la modulation de l'expression de gènes cibles par PCR quantitative. Ces réponses ont été corrélées à la bioaccumulation de ces contaminants mesurée dans les organismes (**Chapitre IV**). L'objectif était ici de déterminer plus précisément les mécanismes de toxicité de ces ETMs.
5. L'impact de la température seule et des nutriments (nitrates et phosphates) seuls ou en mélange a également été évalué à l'échelle moléculaire (**Chapitre V**). Dans ce chapitre trois études seront présentées : 1) Une approche multifactorielle exposant les juvéniles pendant 96 heures à différentes concentrations en nitrates et en phosphates, étudiés seul ou en mélange, à deux températures : 16°C et 22°C ; 2) Une étude sur l'effet de la température (16, 22 et 26°C) sans contamination sur une période de 14 jours ; et 3) Une exposition chronique de 21 jours à 16°C, à différentes concentrations en nitrates et en phosphates étudiés seuls ou en mélange. L'objectif de ces expérimentations est de déceler les potentiels effets synergiques ou antagonistes des nutriments associés à une augmentation de température et d'évaluer les effets de la température seule sur les réponses génétiques des juvéniles.
6. Le développement et la mise au point d'une méthode d'analyse comportementale permettant d'étudier le comportement « normal » des juvéniles de moule perlière sera présenté dans ce chapitre sous forme d'un article scientifique actuellement en préparation (**Chapitre VI**). L'objectif est de mettre au point et de valider la méthode mise en place afin qu'elle puisse être appliquée par la suite pour étudier l'impact des différents facteurs étudiés dans ce manuscrit sur le comportement des juvéniles notamment en termes de distance parcourue. Cette étude a été réalisée à partir d'un système d'acquisition de vidéos permettant de suivre en temps réel le déplacement des organismes.
7. Afin d'englober les différents travaux menés dans ce manuscrit et d'établir un scénario qui se rapproche au mieux du milieu naturel dans le contexte de la Haute-Dronne, une approche multifactorielle a été mise en place (**Chapitre VII**). Les différents

contaminants (arsenic, aluminium, cuivre, nitrate et phosphate) choisis pour leur présence dans la Haute-Dronne, ont été étudiés à des concentrations environnementales. Cette expérimentation a été réalisée à différentes températures (16, 26 et 30°C) pour simuler les potentiels effets du changement climatique. L'impact de ces différents facteurs étudiés en combinaison, ont été évalués à l'aide des différents biomarqueurs et paramètres utilisés dans ce manuscrit : la mobilité, les réponses moléculaires, la bioaccumulation des ETMs ainsi que le comportement des organismes.

8. Une synthèse des résultats majeurs obtenus sera présentée avec une discussion autour des objectifs de la thèse et les différentes perspectives de recherche relatives aux travaux menés dans ce manuscrit (**Chapitre VIII**).

---

# CHAPITRE I. ÉTAT DE L'ART



## 1. Généralités

### 1.1. Classification et description de l'espèce

La classification de *Margaritifera margaritifera* est définie comme suit :

- Embranchement : Mollusques
- Classe : Bivalves
- Ordre : Unionoïdes
- Super-famille : Unionoidés
- Famille : Margaritiferidés
- Genre : Margaritifera
- Sous-genre : margaritifera
- Espèce : *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus, 1758)

La moule perlière *M. margaritifera* (L. 1758) ou mulette perlière (Figure 1), est un mollusque bivalve d'eau douce issu de la famille des Margaritiferidés et appartenant à l'ordre des Unionoïdes que l'on nomme communément « moules d'eau douce » ou « naïades » (Prié 2017). Dans ce groupe, les deux familles les plus représentées sont celles des (i) Unionidés, dans laquelle sont retrouvées les moules d'eau douce appartenant au genre *Anodonta*, *Lampsilis*, *Elliptio*, *Unio* ou encore *Utterbackia*, et (ii) celles des Margaritiferidés comprenant les moules d'eau douce du genre *Margaritifera*. La particularité qui distingue les Margaritiferidés des Unionidés réside dans les caractéristiques de leur trait de vie. Tout d'abord dans la longévité des organismes puisque les Unionidés peuvent vivre jusqu'à 30 ans à l'exception des moules du genre *Unio* (Lopes-Lima et al. 2016) alors que la longévité des moules de la famille des Margaritiferidés dépasse le siècle (Lopes-Lima et al. 2016). Une autre caractéristique qui différencie ces deux familles, concerne la taille de la forme larvaire de l'espèce avec une taille comprise entre 50 et 80  $\mu\text{m}$  pour les Margaritiferidés et entre 200 et 350  $\mu\text{m}$  pour les Unionidés (Ziuganov et al. 1994).

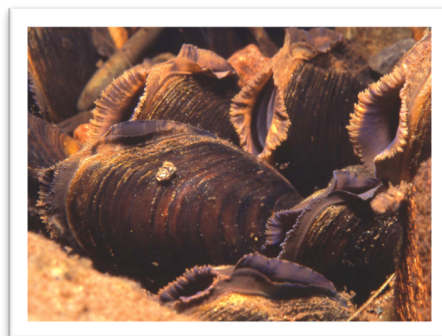
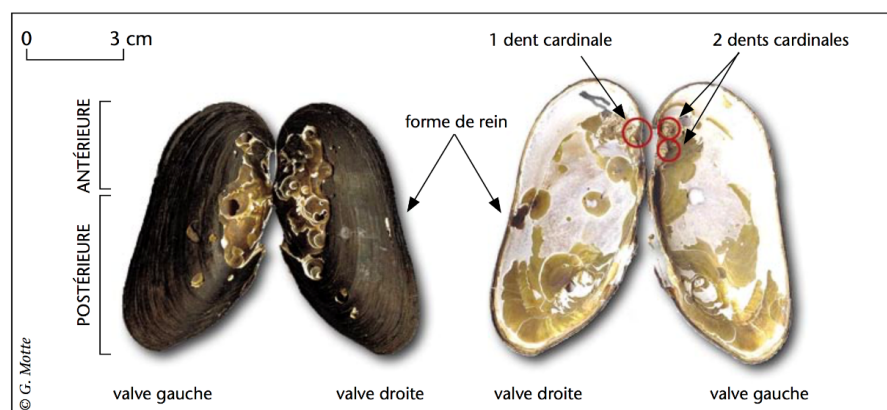


Figure 1. Moule perlière d'eau douce *Margaritifera margaritifera* (Skinner et al. 2003)

D'un point de vue morphologique, la coquille de la moule perlière, réniforme et allongée, peut atteindre une longueur de 160 mm et une largeur comprise entre 40 et 50 mm (Ziuganov et al. 1994). *M. margaritifera* présente une coquille à périoscrautum (épiderme recouvrant les valves) de couleur brune pour les jeunes moules et noires pour les adultes (Figure 2). La nacre de cette espèce est de couleur blanche avec des teintes rosées, lui permettant de produire des perles de la même couleur. La moule perlière est caractérisée par la présence de dents cardinales et l'absence de dents latérales (Figure 3), constituant ainsi un critère de détermination pour la distinguer d'autres espèces de moule d'eau douce. Par exemple lorsque la coquille des moules d'eau douce du genre *Unio* est foncée, la confusion des deux espèces peut avoir lieu (Cochet 2010).



**Figure 2.** Photographies d'une moule perlière au stade adulte (à gauche) et au stade juvénile (à droite), issues de la rivière Dronne (Dordogne, France).



**Figure 3.** Morphologie de la moule perlière *M. margaritifera* (Motte 2005).

Elle possède deux valves très épaisses qui sont maintenues ensemble par une charnière. L'umbo, correspondant au sommet des valves (Figure 3), est généralement endommagé puisqu'il s'agit de la partie la plus ancienne de la coquille et donc la plus exposée aux agressions physiques et chimiques du cours d'eau (Cochet 2010). La présence de stries de

croissance denses et régulières permet de déterminer l'âge des individus par le biais de la sclérochronologie.

L'anatomie de la moule perlière est représentée par la figure 4. Entre les valves, la moule perlière possède deux orifices : un orifice inhalant, bordé de papilles brunes et un orifice exhalant à bord lisse, permettant la filtration de l'eau à travers les branchies du bivalve. *M. margaritifera* est une espèce sédentaire qui peut ponctuellement se déplacer lors d'évènements exceptionnels comme par exemple durant les fortes crues des cours d'eau (Prié and Cochet 2011). Elle possède un pied musculeux lui permettant de se déplacer et de s'enfouir verticalement et fermement dans le sédiment.

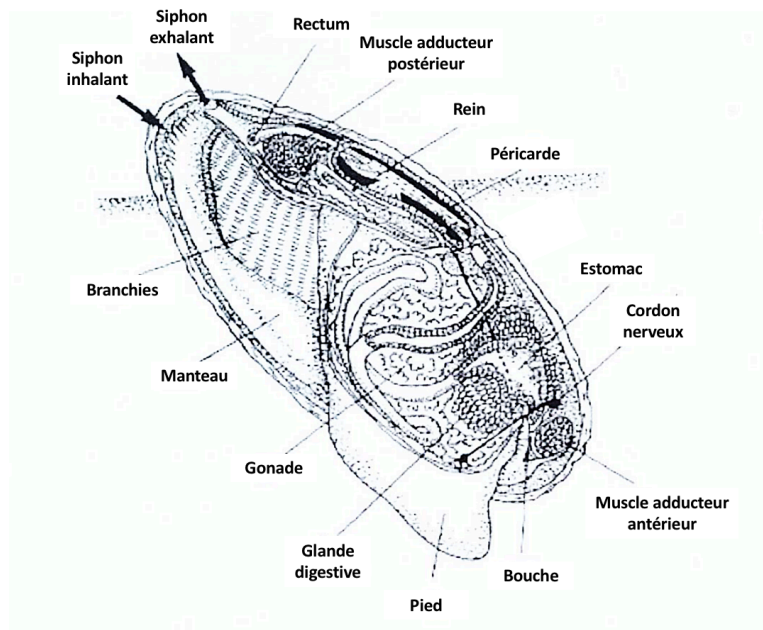


Figure 4. Illustration de l'anatomie de la moule perlière *Margaritifera margaritifera* (adaptée de Ziuganov et al. 1994)

## 1.2. Traits de vie et exigence écologique

### 1.2.1. Milieu de vie et qualité de l'eau

L'habitat naturel de la moule perlière est représenté par des eaux courantes et limpides à débit relativement rapide, d'une profondeur comprise entre 0.5 à 2 m et un lit de rivière stable et hétérogène, généralement sableux et graveleux (Ziuganov et al. 1994). C'est une espèce sédentaire qui n'est pas fixée à un substrat et vit partiellement ou complètement enfouie dans le sédiment, avec sa partie antérieure enfouie tout en gardant son siphon à l'interface entre le sédiment et la colonne d'eau (Ziuganov et al. 1994). La qualité de l'eau est

un paramètre important pour la survie des moules perlières puisque c'est une espèce qui requière une eau oligotrophe (Bauer 1988). La présence de nutriments dans les cours d'eau semble impacter fortement les populations de l'espèce. En effet, une étude menée dans le milieu naturel a montré que la croissance et la survie des moules perlières étaient négativement corrélées à la conductivité, la concentration en ammoniac, nitrate, phosphate, sodium, potassium, calcium et magnésium, tous ces paramètres étant des indicateurs d'eutrophisation (Buddensiek 1995). De plus, Bauer (1988), a montré à travers une étude réalisée sur 11 rivières de l'État libre de Bavière en Allemagne, que la mortalité des adultes de moule perlière était corrélée à la concentration en nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) avec des niveaux allant jusqu'à 13 mg  $\text{NO}_3^-/\text{L}$ . Cette étude a également permis de déterminer des valeurs-guides (Tableau I) pour certains paramètres physico-chimiques, à partir desquels l'absence de juvéniles (< 20 ans) est observée dans les rivières. L'absence de juvéniles suggère que le recrutement de la population est affecté par ces différents paramètres. Une autre étude basée sur l'observation des populations de *M. margaritifera* provenant de rivières irlandaises (Moorkens 2000), a permis de déterminer les valeurs maximales de différents paramètres physico-chimiques des rivières hébergeant des populations fonctionnelles (Tableau I). En 2006, le même auteur a ré-estimé des valeurs seuils pour les nutriments à partir de données historiques sur la qualité des cours d'eau abritant l'espèce. Cette étude propose des valeurs guides largement plus faibles que les valeurs fixées dans la première étude (Tableau I).

Tableau I. Valeurs-guides de différents paramètres physico-chimiques fixées par (Bauer 1988) et (Moorkens 2000; Moorkens 2006) pour la moule perlière à partir d'observations réalisées dans le milieu naturel

<b>Paramètres physico-chimiques</b>	<b>Bauer (1988)</b>	<b>Moorkens (2000)</b>	<b>Moorkens (2006)</b>
Nitrates (mg/L)	< 2.2	< 7.5	<0.55
Ortho-phosphates (mg/L)	< 0.03	< 0.06	<0.005
Ammoniaque (mg/L)	ND	< 0.1	<0.01
pH	ND	< 8.3 ; > 6.5	ND
Conductivité ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	< 70	< 200	ND
Calcium (mg/L)	2	ND	ND
Demande biologique en oxygène (mg/L)	1.4	< 3	ND
Oxygène dissous (mg/L)	ND	> 9	ND

ND : Non déterminé

Ces données issues d'observations réalisées dans le milieu naturel suggèrent que les nutriments constituent un facteur de grande importance puisque les valeurs fixées par ces

auteurs sont largement plus faibles que la valeur seuil en nitrate de 50 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L fixée pour l'eau de consommation par l'organisation mondiale de la santé. Ces données sont également inférieures au critère de classement de l'état d'une eau douce de surface qui doit être inférieur à 10 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L pour une eau de très bonne qualité (Arrêté du 25 janvier 2010 relatif aux méthodes et critères d'évaluation de l'état écologique, de l'état chimique et du potentiel écologique des eaux de surface). Par ailleurs, la qualité chimique de l'eau n'est pas le seul facteur ayant une influence sur le recrutement des populations de moule perlière. En effet, Geist and Auerswald (2007), ont montré que les différences entre les sites naturels accueillant des populations fonctionnelles ou non, résidaient dans la qualité physique du substrat. Les populations en bonne santé sont retrouvées dans des cours d'eau marqués par un faible colmatage du sédiment et par des échanges entre la surface et le milieu interstitiel.

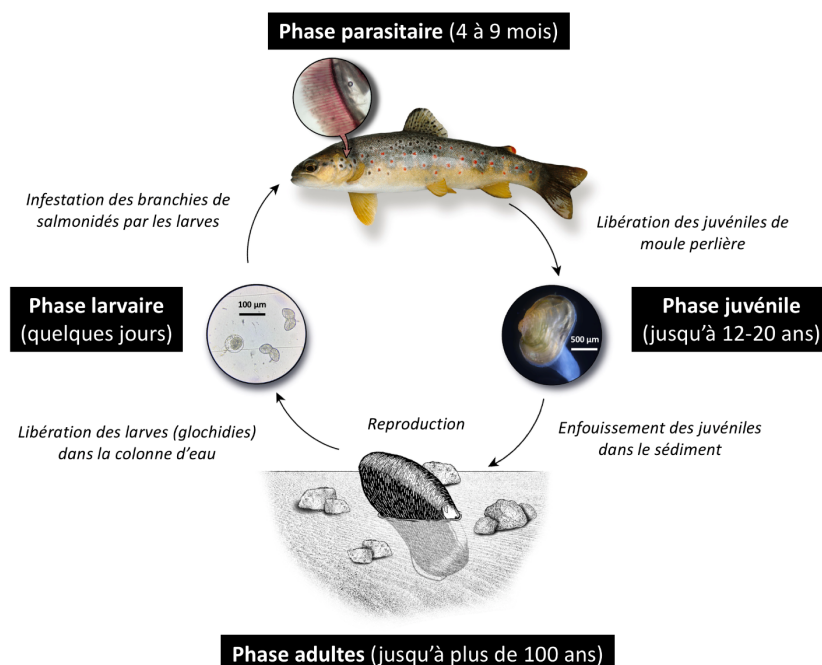
### **1.2.2. Respiration et régime alimentaire**

La moule perlière est une espèce filtreuse dont l'activité de filtration, permet une double fonction biologique : la respiration et la nutrition (Cochet 2010). Elle se nourrit de matières en suspension présentes dans l'eau en assimilant la matière organique et en expulsant les composants inorganiques non assimilables sous forme de pseudo-fèces et les déchets de la nutrition sous forme de fèces (Ziuganov et al. 1994). En conséquence, les populations de moules contribuent à l'apport de nourriture pour de nombreuses espèces benthiques (Strayer 2008). L'eau pénètre de manière passive, à travers l'orifice inhalant pour être filtrée par une série de cténidies (ou branchies), puis ressort par l'orifice exhalant. Les particules alimentaires sont acheminées vers la bouche et les grosses particules sont directement excrétées hors de l'organisme par l'orifice exhalant avec les pseudo-fèces. Ce processus est valable pour les moules adultes qui se nourrissent par filtration, alors que la première année passée dans le sédiment, les juvéniles se nourrissent à l'aide de leur pied. En effet, des études menées sur l'ontogénie de la moule perlière ont montré que les juvéniles subissaient une transformation ontogénique permettant la formation complète des branchies et que cette métamorphose était dépendante de la taille des juvéniles, notamment lorsque les organismes atteignaient une taille comprise entre 1 et 2 mm (Schartum et al. 2016; Araujo et al. 2018; Lavictoire et al. 2018). Ces mêmes auteurs soulignent le lien entre la forte mortalité des juvéniles observée dans le milieu naturel (Young and Williams 1984) et l'incapacité des juvéniles à subir cette transformation due potentiellement à un manque de nourriture. Ces études montrent que

cette période de métamorphose constitue un stade critique pour la survie des juvéniles de moule perlière. En ce qui concerne les besoins nutritionnels et les préférences alimentaires de la moule perlière, ces informations ne sont pas très bien connues à l'heure actuelle. Une moule perlière adulte peut filtrer jusqu'à plus de 50 litres d'eau par jour et en grand nombre, les mulettes peuvent entraîner la sédimentation de plus de 90% des particules en suspension dans l'eau (Ziuganov et al. 1994).

### 1.2.3. Cycle de vie

*M. margaritifera*, à l'instar des autres moules d'eau douce de l'ordre des Unionoïdes, possède un cycle de vie complexe lors duquel la présence d'un poisson hôte est nécessaire pour se développer. Par leur milieu de vie semblable à celui de la mulette, seules deux espèces de la famille des salmonidés sont spécifiques pour le développement de la moule perlière : la truite fario (*Salmo trutta*) et le saumon atlantique (*Salmo salar*) en Europe (Young and Williams 1984; Bauer and Vogel 1987; Ziuganov et al. 1994; Österling and Larsen 2013) et le saumon atlantique et l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) en Amérique du Nord (Smith 1976; Cunjak and McGladdery 1991). Le cycle de vie de la moule perlière se déroule en 4 phases de développement : la phase adulte, la phase larvaire, la phase parasitaire et la phase juvénile (Figure 5).



**Figure 5.** Cycle de vie de la moule perlière *Margaritifera margaritifera* (L. 1758) présentant les quatre stades de développement de l'espèce ainsi que la durée de chacune de ces phases (adaptée de Skinner et al. 2003)

**La phase adulte** comprend les organismes âgés de plus de 15 à 20 ans (Young and Williams 1984; Bauer 1988) correspondant à l'âge auquel la moule atteint sa maturité sexuelle (Bauer 1992). Ce bivalve d'eau douce est une espèce généralement dioïque sans dimorphisme sexuel (Skinner et al. 2003) et dans certaines conditions, comme par exemple dans le cas d'une densité faible de la population, les femelles peuvent devenir hermaphrodites (Bauer and Vogel 1987). Durant la période de reproduction entre les mois de juin et de juillet, les gamètes mâles sont relâchés dans la colonne d'eau puis inhalés par les femelles à la suite d'une activité de filtration normale. Le sperme est transporté jusqu'aux branchies où les œufs sont fertilisés et couvés par la femelle pendant plusieurs semaines. Lorsque les larves, également appelées « glochidies », atteignent leur maturité et une taille de 45 à 70  $\mu\text{m}$  (Araujo and Ramos 1998), généralement entre les mois de juillet et de septembre, elles sont relâchées par les femelles dans la colonne d'eau (Hastie and Young 2003).

Chaque femelle peut pondre jusqu'à 4 millions de larves (Young and Williams 1984) qui vont se retrouver en suspension dans l'eau et mener une courte vie pélagique : **c'est la phase larvaire**. Lorsqu'elles se retrouvent dans la colonne d'eau, les larves sont transportées par le courant permettant ainsi la rencontre avec le poisson hôte. Les glochidies vont alors infester l'hôte puis s'enkyster sur les branchies du saumon atlantique ou de la truite fario (Young and Williams 1984). La durée de vie des larves dans la colonne d'eau n'est pas connue cependant il a été montré que les glochidies pouvaient encore infester le poisson hôte après 6 jours (Zuiganov 1994).

Lorsque les glochidies sont fixées sur les lamelles branchiales du poisson hôte (Figure 5) on parle alors de **la phase parasitaire**. C'est lors de cette étape que les larves vont se développer pendant plusieurs mois pour se métamorphoser en juvénile de moule perlière et atteindre une taille d'environ 400  $\mu\text{m}$  soit jusqu'à dix fois la taille d'origine des larves. Le développement des larves sur les branchies peut durer entre 4 et 9 mois, au terme desquels les juvéniles métamorphosés vont se décrocher des branchies du poisson pour s'enfouir dans le sédiment. La relation complexe entre le poisson hôte et les glochidies est discutée plus en détails dans la partie *1.2.4 Relation hôte-parasite*.

**La phase juvénile** débute à partir du moment où les petites moules se décrochent des branchies du poisson hôte pour s'enfouir dans le substrat jusqu'au moment où elles atteignent leur maturité sexuelle, soit 15 à 20 ans plus tard (Bauer 1992). Lors de leur première année de vie, les juvéniles se nourrissent à l'aide de leur pied. Ce n'est qu'après une

métamorphose ontogénique, que ces jeunes moules vont se nourrir par filtration (Schartum et al. 2016; Araujo et al. 2018; Lavictoire et al. 2018).

#### 1.2.4. Relation hôte-parasite

Contrairement aux autres espèces de moule d'eau douce de la famille des Unionidés, la relation entre *M. margaritifera* et son poisson hôte résulte d'une spécificité importante puisqu'en Europe, seulement deux espèces de la famille des salmonidés, la truite fario et le saumon atlantique, sont adaptées au développement de la moule perlière. Par ailleurs, en fonction de l'aire de répartition de l'espèce, la truite fario est l'hôte exclusif des populations de *M. margaritifera* d'Europe centrale (Bauer and Vogel 1987; Geist et al. 2006), alors que pour certains pays du Nord de l'Europe, le saumon atlantique est le seul poisson hôte de l'espèce (Ieshko et al. 2016). Les populations de moules perlières sont extrêmement dépendantes de la viabilité des populations de poissons hôtes et de leur présence dans les cours d'eau. Cependant, la survie de la moule perlière n'est pas uniquement limitée à la présence du poisson hôte dans les cours d'eau. En effet, le poisson hôte a la capacité d'acquiescer l'immunité contre les larves de *M. margaritifera* et donc de devenir résistant après plusieurs infestations (Young and Williams 1984; Ziuganov et al. 1994; Dodd et al. 2006). Pour cette raison, l'enkystement des glochidies sur les branchies de l'hôte est plus efficace sur les truitelles et les jeunes saumons (Bauer and Vogel 1987), ou encore sur des adultes qui n'ont auparavant jamais été infestés par des larves de moule perlière (Geist et al. 2006).

Dans la littérature, la qualification de la relation entre la moule perlière et son poisson hôte fait l'objet d'avis divergents. Certains auteurs définissent cette interaction biologique comme étant une symbiose proto-coopérative, dont la relation, non facultative, est bénéfique pour les deux espèces (Ziuganov et al. 1994; Geist 2010). En effet, bien que la présence des larves encapsulées sur les branchies n'ait pas d'effet positif et direct pour l'hôte, la filtration de l'eau par les adultes conduisant à la réduction de matière en suspension dans l'eau et la présence des moules sur le lit de la rivière constituant un habitat favorable pour les jeunes stades des salmonidés (Hastie and Cosgrove 2001), sont de manière indirecte, bénéfiques pour le poisson hôte (Ziuganov et al. 1994; Skinner et al. 2003). À contrario, d'autres auteurs qualifient cette interaction comme étant du parasitisme, la relation étant bénéfique pour la moule perlière au détriment du poisson hôte (Bauer and Vogel 1987). Le caractère parasite de la larve de moule



perlière est appuyé par plusieurs études montrant les effets négatifs de la présence des glochidies sur les branchies des salmonidés. Ces études montrent qu'un fort taux d'infestation des branchies par les larves de *M. margaritifera* peut constituer une barrière à la respiration des poissons (Thomas et al. 2013), conduire à une altération de leur capacité de nage ou à la mort du poisson ou la mort de l'hôte (Taeubert and Geist 2013), à une augmentation du métabolisme du poisson (Filipsson et al. 2017), ou encore impacter l'activité du poisson et sa capacité à se nourrir et à rester compétitif (Filipsson et al. 2018).

### **1.3. Caractéristiques de l'espèce**

#### **Longévité**

L'une des particularités de la moule perlière réside dans sa remarquable longévité puisqu'elle peut vivre plus d'un siècle, faisant ainsi partie des invertébrés qui vivent le plus longtemps (Bauer 1992). À titre de comparaison, les autres moules d'eau douce de la famille des Unionidés vivent moins longtemps. Les moules du genre *Anodonta* ou *Unio* peuvent vivre jusqu'à 30 ans à l'exception d'*Unio crassus* dont la longévité peut atteindre 90 ans (Lopes-Lima et al. 2016). La durée de vie des moules perlières est très variable selon les populations et dépend des conditions environnementales, notamment de la température de l'eau (Ziuganov et al. 1994). En outre, les populations de *M. margaritifera* auraient une croissance plus rapide et vivraient moins longtemps dans la partie sud de l'aire de répartition de l'espèce (Europe de l'Ouest) par rapport aux régions plus froides comme les pays scandinaves (Bauer 1992). À titre d'exemple, en Espagne, les individus vivent en moyenne jusqu'à 30 à 65 ans (Miguel et al. 2004; Lopes-Lima et al. 2016) alors qu'en Russie, la durée de vie de cette espèce dépasse le siècle avec l'individu le plus âgé recensé estimé à 167 ans (Ziuganov et al. 1994).

#### **Services écosystémiques**

Les moules d'eau douce ont un rôle important dans les milieux aquatiques en agissant sur plusieurs processus clés du fonctionnement de l'écosystème comme la production primaire et secondaire, le cycle des nutriments, la filtration de l'eau ou encore la sédimentation des particules en suspension dans l'eau (Strayer et al. 1999; Vaughn and Spooner 2006; Vaughn et al. 2008; Haag 2012; Strayer 2014; Boeker et al. 2016; Lummer et al. 2016).

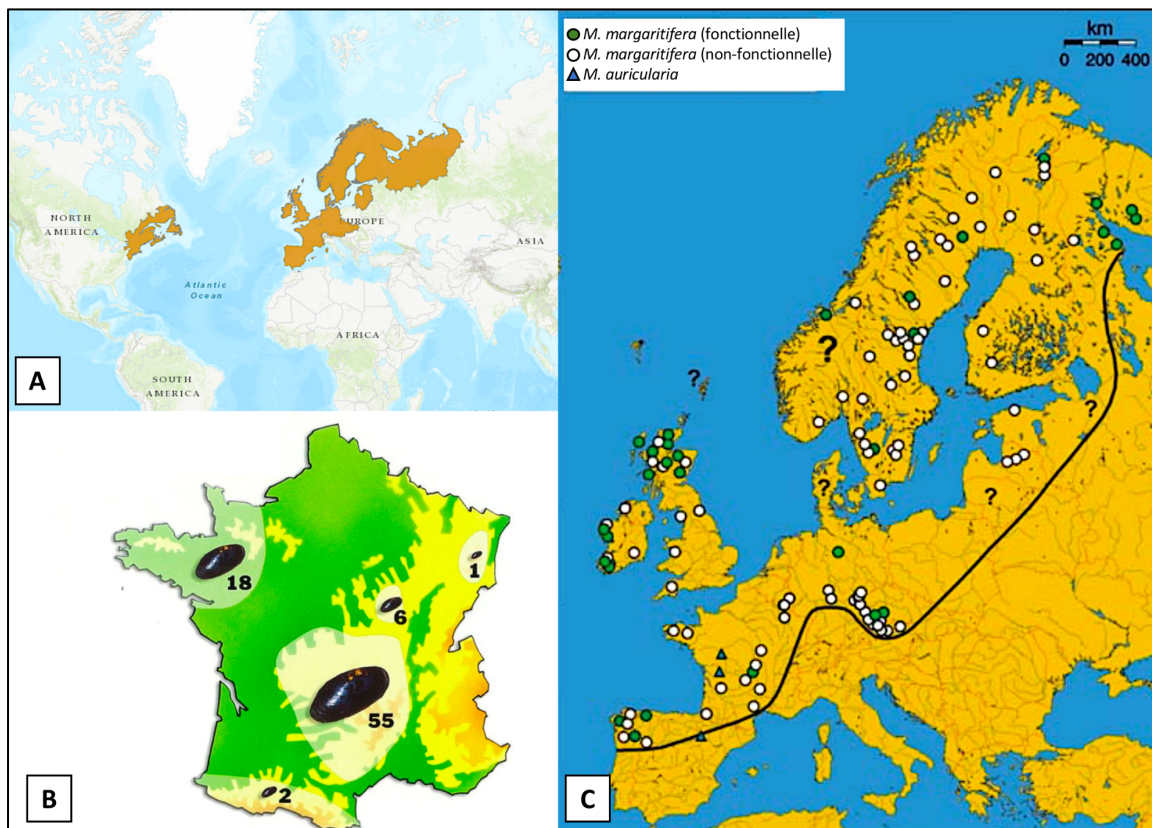
De par leur grande capacité de filtration correspondant à plus de 50 L d'eau par jour et par moule, les populations de moules perlières contribuent fortement à la régulation de la turbidité de l'eau et au recyclage de la matière organique (Ziuganov et al. 1994). Leur effet sur

la turbidité de l'eau, qui améliore la pénétration de la lumière et par conséquent favorise la production primaire *via* la photosynthèse, conduit à l'abondance de plantes macrophytes. Cette végétation contribue à la forte présence d'organismes aquatiques qui en dépendent pour se nourrir ou s'y abriter. Ainsi, par son activité de filtration, la moule perlière favorise la biodiversité du cours d'eau (Geist 2010). De plus, leur présence en grand nombre permet le maintien et la stabilité de la structure physique du lit de la rivière et leurs coquilles constituent un substrat ou un habitat pour d'autres organismes aquatiques (Vaughn and Hakenkamp 2001; Vaughn et al. 2008; Haag 2012). Ces divers services écosystémiques rendus par la moule perlière en font une **espèce clé de voûte** puisque sa présence contribue fortement à la biodiversité et au fonctionnement de l'écosystème (Vaughn and Hakenkamp 2001; Geist 2010; Haag 2012). La moule perlière est également qualifiée d'**espèce bio-indicatrice**, c'est-à-dire que sa présence au sein d'une rivière reflète la bonne qualité du cours d'eau, tant physique que physico-chimique, et la bonne santé des autres organismes vivant dans le même écosystème (Ziuganov et al. 1994; Haag 2012). Ce bivalve d'eau douce est très souvent considéré comme une **espèce ingénieure** puisque par sa présence et ses activités de filtration et de bioturbation, la moule perlière contribue fortement à la modification de son environnement, indiquant ainsi que sa disparition peut conduire à une altération du milieu dans lequel elle vit (Jones et al. 1994; Gutiérrez et al. 2003). Cet atout lui confère également le rôle d'**espèce parapluie** au sein de l'écosystème puisque la protection de sa niche écologique permet de protéger toutes les espèces vivant dans le même milieu qu'elle (Haag 2012). Enfin, toutes ces caractéristiques montrant l'importance de la moule perlière dans son écosystème, a permis de la sélectionner en tant que symbole dans les campagnes de conservation d'espèces, lui conférant ainsi le titre d'**espèce porte-drapeau** (Geist 2010).

## 2. Répartition géographique de l'espèce

À l'échelle mondiale, la moule perlière est une espèce à distribution holarctique, répartie entre les régions arctiques et tempérées de l'ouest de la Russie, au Nord et à l'ouest de l'Europe jusqu'au Nord-Est de l'Amérique et du Canada (Jungbluth et al. 1985; Bouchet et al. 1999; Cochet and Gouilloux 2004)(Figure 6.A). La figure 6.C représente la distribution des populations de deux espèces de la famille des Margaritiferidés en Europe où les formes circulaires et triangulaires représentent les populations de *M. margaritifera* et de *M. auricularia*, respectivement. Les points verts correspondent aux populations fonctionnelles de

moûle perlière dont les juvéniles (âgés de moins de 20 ans) représentent plus de 20% de l'effectif total de la population. Les points blancs représentent les populations dont le recrutement est incertain dû à l'absence de données. Sur cette même figure, la ligne noire montre la limite de distribution de *M. margaritifera*. Pour les régions marquées par un point d'interrogation, les données sur les populations sont incertaines (Geist 2010). En Europe, les populations de moûle perlière sont retrouvées au sud de leur répartition géographique jusqu'en Espagne et au Portugal (Reis 2003). Elle est également présente au Nord de l'Europe, en Suède, en Finlande, en Belgique, au Luxembourg et en Norvège. À l'Ouest, elle est retrouvée au Royaume-Unis et en Irlande, et à l'Est en Autriche, en Tchéquie, en Allemagne, en Estonie et en Lettonie (Geist 2010). Un recensement réalisé en 2004 en France, a permis de répertorier l'espèce dans 82 cours d'eau différents (Figure 6.B) (Cochet and Gouilloux 2004). L'espèce est retrouvée dans les massifs anciens tels que le massif armoricain, le Morvan, les Vosges et le massif central, et dans les Pyrénées (Cochet 1999). Le massif central et le massif armoricain abritent respectivement, 55 et 18 populations de moûle perlière, soit 90% des populations Françaises de *M. margaritifera*.



### 3. États des populations en Europe et en France

La moule perlière est retrouvée dans une grande partie des pays Européens. Le tableau II présente l'état des populations dans les pays d'Europe avec une estimation du nombre de populations, du nombre d'individus et du nombre de populations fonctionnelles pour chaque pays. Le statut UICN (Union internationale pour la conservation de la nature) de l'espèce est également indiqué dans le tableau II (Lopes-Lima et al. 2016). Certaines populations ont totalement disparu, notamment au Danemark, en Lituanie et en Pologne. En Estonie et au Luxembourg, une seule population de moule perlière persiste dans chaque pays mais l'absence de recrutement suggère leur disparition potentielle. Les populations de moule perlière les plus préservées sont retrouvées en Irlande et en Russie où celles-ci peuvent contenir jusqu'à plus de 100 millions d'individus et peuvent être considérées comme des populations de référence en Europe (Geist 2010).

Tableau II. États des populations (Geist 2010) et statut de conservation (Lopes-Lima et al. 2016) de moule perlière en Europe

Pays	Estimation du nombre de population	Estimation du nombre d'individu	Recrutement des populations	Statut de conservation (Lopes-Lima 2016)
Allemagne	69	max. 144 000	1 population	CR
Autriche	29	50 000	Moins de 5 populations	CR
Belgique	5 ou 6	2500 - 3000	Absence de recrutement	CR
Danemark	? <sup>1</sup>	? <sup>1</sup>		EX
Espagne	36	? <sup>1</sup>	2 populations max.	EN
Estonie	1	35 000 - 40 000	Absence de recrutement	Probablement éteinte <sup>2</sup>
Finlande	50	1 500 000	Quelques populations	EN
France	82	max. 100 000	Quelques populations	CR
Irlande	135	> 12 000 000	Quelques populations	CR
Lettonie	8	25 000	Absence de recrutement	EN
Lituanie	1 ? <sup>1</sup>	? <sup>1</sup>		EX
Luxembourg	1	150-200		Presque éteinte <sup>2</sup>
Norvège	340 à 350	Plusieurs millions	Inconnu	VU
Pologne	0	0		EX
Portugal	6	> 1 000 000	1 population	CR
Grande-Bretagne	> 105	> 12 000 000	Quelques populations	CR
Russie	> 8	> 100 000 000	Certaines populations	VU
Suède	> 400	> 8 000 000	50 populations	EN
Tchéquie	6	80 000	3 populations	CR

<sup>1</sup>Les données sont incertaines ou inconnues ; <sup>2</sup>Données issues de Geist 2010 ; CR : danger critique d'extinction ; EX : Éteinte ; EN : en danger d'extinction ; VU : vulnérable

Les populations européennes de moule perlière ont connu un déclin rapide et drastique au cours du 20<sup>ème</sup> siècle, avec 90% et 99% des populations de *M. margaritifera* qui ont disparu en Europe et en France respectivement (Araujo and Ramos 2001; Cochet and Gouilloux 2004). En France, un inventaire réalisé par Cochet en 2004 a permis de dénombrer environ 100 000 individus présents dans 82 rivières où seules une dizaine de rivières hébergent des populations en bonne santé, c'est-à-dire qui se reproduisent et qui recrutent, notamment dans le Morvan (Cochet 1999), le Massif central (Cochet and Gouilloux 2004) et le Massif armoricain (Mérot and Capoulade 2009). Ce n'est pas le cas par exemple des populations présentes dans les Vosges et dans les Pyrénées (Cochet and Gouilloux 2004). Sur la totalité des populations françaises de moule perlière, environ 30% des effectifs sont regroupés dans deux rivières : la Truyère dans le département de la Lozère et la Dronne dans le département de la Dordogne (Cochet and Gouilloux 2004).

## **4. Causes du déclin des populations de moule perlière**

Les menaces liées au déclin des populations de moule perlière en Europe sont multiples et en raison des exigences écologiques de l'espèce, les causes de leur disparition sont principalement reliées à la qualité de l'eau des rivières. Les différentes menaces impliquées dans la disparition des populations de *M. margaritifera* en Europe sont discutées ci-après.

### **4.1. Surexploitation des perles**

Jusqu'au début du 20<sup>ème</sup> siècle, l'exploitation des perles de *M. margaritifera* a eu un impact important sur plusieurs populations de *M. margaritifera* d'Europe centrale et d'Europe du Nord (Young et al. 2001; Makhrov et al. 2014). Bien que la surexploitation des moules perlières puisse avoir impacté fortement certains déclin de manière locale, elle ne peut cependant pas expliquer le déclin dramatique des populations dans toute l'Europe (Lopes-Lima et al. 2016). À la fin du 20<sup>ème</sup> siècle, des protections réglementaires ont été mises en place à l'échelle Européenne pour préserver l'espèce et ont mis fin à l'exploitation des perles.

## 4.2. Disparition du poisson hôte

La présence du poisson hôte dans les cours d'eau est primordiale pour assurer le recrutement des populations de moule perlière et sa raréfaction constitue une menace importante pour la survie à long terme de la moule perlière (Ziuganov et al. 1994; Modesto et al. 2017). Par ailleurs, cette menace est d'autant plus importante pour *M. margaritifera* en raison de sa spécificité pour seulement deux espèces de la famille des salmonidés. Plusieurs facteurs sont à l'origine de la diminution des stocks de saumons et de truites au sein des cours d'eau. Tout d'abord, l'acidification des systèmes aquatiques due aux activités humaines est un facteur important affectant les populations de salmonidés (Exley and Phillips 1988). Par exemple, ce facteur est à l'origine de la diminution des densités de truites fario en Suède, conduisant au déclin des populations de moule perlière de ce pays (Bauer 1988). Aussi, la fragmentation des cours d'eau qui résulte de la présence de barrages ou de seuils, constitue une menace importante puisque ces obstacles empêchent la libre circulation des poissons (Haag 2012; Österling and Söderberg 2015). La qualité de l'eau, la surexploitation des poissons et l'augmentation des températures due au changement climatique sont également des facteurs importants ayant une influence sur les stocks de poissons. L'interaction entre la moule perlière et son poisson hôte est cruciale pour les populations de *M. margaritifera* (Ziuganov et al. 1994). La prise en compte de cette relation complexe entre les deux espèces est nécessaire pour les stratégies de conservation de la moule perlière.

## 4.3. Dégradation, fragmentation et perte des habitats

### Aménagements des rivières

La présence d'ouvrages tels que les seuils, les barrages ou les canalisations le long des cours d'eau, modifie les caractéristiques physiques et la dynamique hydrologique et sédimentaire des écosystèmes aquatiques. Par leur impact net sur la continuité écologique de la rivière, ces ouvrages entraînent une fragmentation de l'habitat puisqu'ils constituent un frein à la dynamique des populations de moule perlière. En effet, leur présence empêche la migration du poisson hôte en amont du cours d'eau, impactant ainsi la possible recolonisation du milieu par cette espèce (Haag 2012; Österling and Söderberg 2015). Aussi, il a été montré que même la présence de petits barrages le long du cours d'eau, pouvait avoir un impact sur l'abondance et la distribution des moules perlières, notamment des juvéniles (Sousa et al. 2020).

De plus, de tels ouvrages conduisent à la dégradation de l'habitat de *M. margaritifera* puisqu'ils induisent des modifications au niveau du sédiment, du débit de la rivière et de la température (Mueller et al. 2011). En effet, l'accumulation de l'apport sédimentaire en amont des barrages est particulièrement nocive pour l'espèce. La sédimentation, notamment des particules fines, l'affecte de manière directe, en augmentant la mortalité des juvéniles (Geist and Auerswald 2007; Österling et al. 2010) et indirectement en dégradant les milieux favorables aux frayères des salmonidés (Sternecker and Geist 2010; Sternecker et al. 2013). De plus, en réduisant les débits des cours d'eau, les barrages entraînent la formation d'une retenue en amont de ces ouvrages. En été, avec l'augmentation de la température et par conséquent, la réduction des niveaux d'oxygène dissous dans l'eau, ces milieux deviennent impropres à la survie des moules perlières.

### **Occupation des sols**

L'occupation des sols par le bétail ou les cultures sur les rives des cours d'eau, conduit à une diminution de la ripisylve et impacte fortement la charge sédimentaire dans les rivières. En effet, l'abreuvement du bétail et l'érosion des sols nus conduisent à un apport important de sédiments fins et de matières organiques au sein des cours d'eau, impactant ainsi l'habitat de la moule perlière (Österling et al. 2008). Aussi, la réduction de la ripisylve affecte la naturalité des cours d'eau puisqu'elle permet le maintien des températures froides, réduisant ainsi les températures estivales, et limite également l'eutrophisation du milieu aquatique. La déforestation sur les rives des cours d'eau affecte donc l'habitat des moules perlières (Popov 2015).

### **4.4. Eutrophisation**

L'eutrophisation des systèmes aquatiques, qui par définition concerne l'enrichissement d'un milieu aquatique dû à un apport important de nutriments et conduisant à une prolifération importante d'algues, est considérée comme l'un des facteurs majeurs affectant les populations de moules perlières (Bauer 1988; Geist and Auerswald 2007; Denic and Geist 2015). En effet, plusieurs études menées dans le milieu naturel ont permis d'établir un lien entre : 1. la présence de nutriments dans les cours d'eau (Bauer 1988; Moorkens 2006) ou l'envasement et le colmatage du fond de la rivière provoqués par l'eutrophisation du milieu (Geist and Auerswald 2007) et 2. le recrutement des populations de moule perlière. L'eutrophisation d'un milieu aquatique peut conduire à la réduction d'oxygène dissous, or les juvéniles de moule perlière qui vivent enfouis dans le sédiment, requièrent un substrat bien

oxygéné. L'effet direct de ces nutriments sur les populations de moule perlière n'est pas connu mais semble indirectement, à travers la dégradation du milieu, impacter la survie des juvéniles.

#### **4.5. Pollution**

Les systèmes aquatiques constituent les réceptacles finaux de contaminants issus des activités anthropiques. En effet, ces écosystèmes sont soumis aux rejets domestiques et industriels ou encore au lessivage des cultures agricoles, conduisant à l'apport dans les cours d'eau de polluants tels que, les nutriments, les éléments traces métalliques, les résidus médicamenteux ou encore les pesticides. La moule perlière, étant une espèce sédentaire qui se nourrit et respire en filtrant l'eau, se retrouve inévitablement exposée à la présence de polluants dans ces systèmes aquatiques. À l'heure actuelle, l'impact de la pollution environnementale sur l'espèce n'est pas très bien connu alors que la pollution est suggérée comme étant un des facteurs majeurs dans le déclin de leurs populations (Ferreira-Rodríguez et al. 2019).

#### **4.6. Changement climatique**

Les effets du changement climatique sont considérés comme une menace potentielle pour les populations de moule perlière. En effet, les modèles prédisent une augmentation des températures et des précipitations en Europe, pouvant conduire à des crues exceptionnelles (Pachauri et al. 2014). Le changement de température peut avoir un impact sur plusieurs facteurs importants pour la survie des moules perlières comme la croissance, la longévité et le succès de reproduction (Bauer 1988), et peut également influencer la toxicité des polluants auxquels les organismes sont exposés. L'augmentation des précipitations peut quant à elle conduire à la réduction de la disponibilité d'habitats favorables pour l'espèce. Enfin, les effets du changement climatique peuvent avoir des conséquences sur les stocks des poissons hôtes qui affectionnent les eaux froides (Hastie et al. 2003) et donc de manière indirecte, peuvent impacter les populations de moule perlière.



## 5. Statut et protections

### 5.1. Liste rouge UICN



L'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) est une organisation non gouvernementale à l'échelle internationale, fondée en France en 1948. L'UICN est surtout connue pour la création de listes rouges consacrées au recensement d'espèces, animales ou végétales, en danger dans le monde, permettant ainsi de leur attribuer un statut de conservation. La moule perlière a été inscrite pour la première fois sur cette liste rouge en 1983 en tant qu'espèce vulnérable (VU) et depuis 1996, elle est classifiée en tant qu'espèce en danger d'extinction (EN) dans le monde (Moorkens et al. 2018). En Europe et en France, elle est cependant inscrite en tant qu'espèce en danger critique d'extinction (CR) (Cuttelod et al. 2011).

### 5.2. Protections et réglementations

À l'échelle Européenne, *M. margaritifera* est inscrite sur **l'annexe III de la Convention de Berne**. Cette convention, entrée en vigueur en 1982, vise à promouvoir la coopération de plusieurs États membres pour assurer la conservation de la vie sauvage et du milieu naturel de l'Europe. Pour cela, chaque État membre s'engage à mettre en place des politiques nationales de conservation de la flore et de la faune sauvages, et des habitats naturels. Ils doivent également intégrer la conservation de la faune et de la flore sauvages dans les politiques nationales d'aménagement, de développement et de l'environnement. Enfin, ces pays membres s'engagent à encourager l'éducation et promouvoir la diffusion d'informations sur la nécessité de conserver les espèces et leurs habitats. Cette convention est composée de 4 annexes qui répertorient les espèces à protéger en fonction du degré de protection à mettre en œuvre. L'annexe III de la convention, qui comprend la moule perlière, concerne les espèces de faune protégées qui doivent faire l'objet d'une réglementation (exploitation ou transport) afin de pérenniser ces populations. *M. margaritifera* est également inscrite sur les **annexes II et IV de la Directive « Habitat, Faune, Flore » 92/43/CEE**. Cette directive créée en 1992 et mise en place par l'Union Européenne, concerne la préservation des habitats naturels de la faune et de la flore sauvages. L'**annexe II** répertorie les espèces animales et végétales d'intérêt communautaire dont la conservation nécessite la désignation de zones spéciales de conservation dans le cadre du réseau Natura 2000. L'**annexe IV** liste les espèces animales et

végétales d'intérêt communautaire qui nécessitent une protection stricte et concerne les espèces devant être strictement protégées.

À l'échelle nationale, la moule perlière est une espèce protégée par un arrêté appliqué en mai 1992 puis révisé le 23 avril 2007, qui fixe la liste des mollusques protégés sur l'ensemble du territoire et les modalités de leur protection. *M. margaritifera* est inscrite dans l'article 2 de l'arrêté du 23 avril 2007 qui interdit la destruction et la perturbation intentionnelles des animaux, toute intervention sur les milieux naturels de ces espèces et la détention ou le transport des individus, sur tout le territoire métropolitain. Ainsi, toute intervention sur l'espèce (prélèvement, manipulation, transport ou élevage) doit faire l'objet d'une dérogation pour autorisation par des services compétents, conformément à l'arrêté du 19 février 2007 fixant les conditions de demande et d'instruction des dérogations définies au 4° de l'article L. 411-2 du code de l'environnement portant sur des espèces de faune et de flore sauvages protégées.

## 6. Conservation de l'espèce

### 6.1. Projets mis en place en Europe

En raison du déclin dramatique et rapide de la moule perlière dans les pays d'Europe, d'important efforts et financements ont été et sont encore aujourd'hui consacrés à la conservation de l'espèce (Geist 2010). En effet, plusieurs programmes portés par l'Europe, notamment les projets LIFE (L'Instrument Financier pour l'Environnement), permettent le financement de projets concernant la conservation d'espèces inscrites sur les listes des directives telles que la directive habitats et oiseaux par exemple. Plusieurs pays européens ont porté des programmes LIFE en vue de préserver la moule perlière d'eau douce :

- La Finlande **LIFE97 NAT/FIN/004086** « Pearl mussels – Restoration of fluvial ecosystems containing pearl mussels »
- Le Royaume-Unis **LIFE99 NAT/UK/006088** « Natura 200 Rivers – Saving Nature 2000 Rivers in the UK »;
- La Belgique **LIFE02 NAT/B/008590** « Pearl mussels – Conservation of habitats of pearl mussels in Belgium »;
- La Tchéquie et l'Allemagne **LIFE02 NAT/D/008458** « Large freshwater mussels Uniodoidea in the border area of Bavaria, Saxony and the Czech Republic »;
- L'Espagne **LIFE03 NAT/E/000082** « Margarita Sanabria - Preservation of *Margaritifera margaritifera* at LIC in Zamora »

- La Suède **LIFE04 NAT/SE/000231** « Freshwater pearl mussel and its habitats in Sweden »;
- Le Luxembourg **LIFE05 NAT/L/000116** « Ardmouperl – Restoration of pearl mussel populations in the Ardennes ».

En France, en 2004, un premier projet LIFE+ (LIFE04 NAT/FR/000082) intitulé « Ruisseaux de têtes de bassins et faune patrimoniale associée » a été mis en place et dont la coordination a été assurée par le Parc naturel régional du Morvan et trois structures partenaires associées (Office National des Forêts, Parc naturel régional du Haut-Jura, et l'Association pour le Développement et l'Animation de la Petite Montagne du Jura). Ce projet a été mené pour la préservation, la restauration et l'amélioration de la qualité de l'eau des cours d'eau et de l'habitat de quatre espèces d'intérêt communautaire majeur listées par la directive habitats, parmi lesquelles on retrouve la moule perlière : *Margaritifera margaritifera*. En 2010, un second projet LIFE+ (LIFE09 NAT/FR/000583) intitulé « Conservation de la moule perlière d'eau douce du Massif Armoricaïn » a été porté par l'association Bretagne vivante, la fédération de pêche du Finistère et le CPIE des collines normandes. Ce projet est le premier à avoir été mis en œuvre pour la sauvegarde directe de l'espèce en France. Il a en effet permis de repeupler les rivières du Massif armoricaïn (e.g. Elez, Bonne chère, Airou,..), à partir de la production et de l'élevage en captivité de la moule perlière. Les retours d'expériences acquises lors de ce projet ont permis la mise au point de diverses actions menées dans le cadre du projet LIFE13 NAT/FR/000506 mis en place en 2014.

## 6.2. Projet LIFE13 NAT/FR/000506 Haute Dronne

### 6.2.1. Description et objectifs du projet



Le projet LIFE+ NATURE (LIFE NAT/FR/000506 Haute Dronne) intitulé, « Préservation de *M. margaritifera* et restauration de la continuité écologique de la Haute Dronne », est un projet Européen mis en place en 2014, dont la coordination est gérée par le Parc National Régional du Périgord-Limousin (PNRPL) et l'Université de Bordeaux notamment par le biais de l'Unité Mixte de Recherche EPOC CNRS 5805 équipe Écotoxicologie Aquatique. Le projet a pour objectif de conserver les populations de *M. margaritifera* présentes dans la Dronne, une rivière qui contient l'une des populations de moule perlière les plus importantes à l'échelle nationale, constituant ainsi une rivière d'intérêt majeur pour la préservation de l'espèce. Pour répondre aux objectifs du projet, qui sont d'une part la restauration de la rivière et d'autre

part, la préservation de l'espèce, deux grandes actions ont été mises en place. Tout d'abord, des travaux sont effectués le long de la Dronne pour restaurer la continuité écologique. En effet, la présence d'anciens moulins ou de barrages constituent un frein pour le déplacement du poisson hôte mais également pour le transfert sédimentaire qui peut conduire à une altération du milieu et devenir impropre à la survie des moules. L'effacement de ces obstacles est donc nécessaire pour améliorer leur habitat. La deuxième action consiste à repeupler la Dronne en produisant des moules perlières en captivité. Pour cela, une ferme aquacole a été mise en place à Firbeix en Dordogne (France). Les détails concernant cette ferme sont présentés dans la partie 6.2.2 *Ferme d'élevage de la moule perlière de Firbeix*. Sur la totalité de la production de moules perlières, une partie est consacrée à la recherche pour des études écotoxicologiques, qui entrent dans le cadre des travaux présentés dans ce manuscrit.

### 6.2.2. Ferme d'élevage de la moule perlière de Firbeix

La ferme aquacole a été mise en place en 2016 dans la commune de Firbeix (Dordogne), pour la production de moules perlières en captivité afin de renforcer les populations de *M. margaritifera* de la Haute-Dronne mais aussi pour la réalisation d'études écotoxicologiques. Cette ferme d'élevage (Figure 7.A) est constituée de 3 entités hébergeant une salle d'élevage de moules perlières (Figure 7.B), une salle de culture d'algues (Figure 7.C) et une salle permettant d'accueillir les truitelles (Figure 7.D).



**Figure 7.** A. Ferme d'élevage de la moule perlière de Firbeix; B. Auges de culture des juvéniles de moule perlière ; C. Laboratoire de culture d'algues pour l'alimentation des moules perlières ; D. Bacs accueillants les truitelles infestées par les larves de moule perlière (Source : M. Baudrimont©)

La culture des juvéniles de *M. margaritifera* s'effectue en circuit fermé où l'eau de la ferme est renouvelée toutes les deux semaines. L'eau utilisée pour la culture des juvéniles est directement pompée dans un affluent de la Haute-Dronne, filtrée à 20 µm pour retenir les micro-organismes et matières en suspension. Elle est également exposée aux UV afin d'éliminer les bactéries qui y sont présentes, puis au charbon actif pour retenir les composés organiques éventuellement présents dans la rivière. Les auges de 160 L qui accueillent les juvéniles de moule perlière, contiennent du substrat composé de sable (silice ultra-pure, SIBELCO) de diamètre compris entre 0.8 et 1.4 millimètres. Les juvéniles sont nourris avec une solution de micro-algues marines lyophilisées (*Nannochloropsis sp.*) et un mélange d'algues vivantes d'eau douce (*Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris* et *Stichococcus bacillaris*) qui sont cultivées dans la ferme aquacole.

## 7. États des connaissances sur la sensibilité de l'espèce

### 7.1. Données issues d'observations dans le milieu naturel

Deux études clés ont permis, à l'aide d'observations réalisées dans le milieu naturel, d'évaluer les paramètres physico-chimiques des rivières ayant un impact sur la distribution et la densité des populations de moules perlières (Bauer 1988; Moorkens 2000).

#### 7.1.1. Étude *in situ* sur des populations allemandes de moule perlière

Une étude menée sur plusieurs rivières de l'État libre de Bavière en Allemagne, a permis d'établir des liens entre la distribution et la densité des populations de moule perlière, et les paramètres physico-chimiques de ces cours d'eau (Bauer 1988). La fertilité et la mortalité des adultes (> 20 ans), les taux d'infestation des poissons hôtes par les larves et la distribution des juvéniles (0-20 ans) ont été évalués. En parallèle, plusieurs paramètres liés au processus d'eutrophisation ont été mesurés, notamment le pH, la conductivité, la demande biologique en oxygène, les phosphates, les nitrates, l'ammonium, le calcium et le chlore. Les résultats de ces travaux ont montré que :

- La mortalité des adultes était positivement corrélée à l'augmentation des concentrations en nitrates dans l'eau soit entre 7 et 13 mgNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L ;
- Une diminution de la survie et du recrutement des juvéniles, étaient corrélés à la présence de phosphates, de calcium et à la demande biologique en oxygène .

Les observations *in situ* réalisées dans ce travail ont également permis de montrer que les populations de moule perlière en bonne santé étaient retrouvées dans des rivières faiblement polluées. À partir des résultats obtenus dans cette étude, l'auteur a estimé des valeurs seuils des caractéristiques physico-chimiques des rivières étudiées (Tableau I - p.33) et suggère qu'au-delà de ces seuils, le recrutement des populations de *M. margaritifera* n'est pas assuré.

### **7.1.2. Étude in situ sur des populations irlandaises de moule perlière**

Une étude a été conduite dans l'objectif d'estimer les valeurs seuils des paramètres physico-chimiques de l'eau des rivières permettant aux moules perlières de vivre et de se reproduire (Moorkens 2000). Le recensement de *M. margaritifera* a été réalisé dans 149 rivières irlandaises et en parallèle, 31 paramètres concernant la qualité chimique et physique des rivières ont été mesurés et observés. Plusieurs résultats ont pu être mis en évidence dans cette étude :

- Les rivières contenant uniquement des individus âgés étaient pourvues d'une ripisylve contrairement aux sites où la moule perlière était absente ;
- Les sites où la présence de juvéniles a pu être observée, présentaient moins d'algues que les sites dépourvus de moules perlières adultes ;
- Les populations les plus denses où la présence de juvéniles a pu être observée, sont généralement retrouvées dans les rivières pauvres en nutriments.

À partir des travaux réalisés dans cette étude, les valeurs seuils de plusieurs paramètres physico-chimiques des rivières où les populations de moule perlière recrutent, ont été déterminées et sont présentées dans le tableau I. En 2006, ce même auteur a déterminé des seuils encore plus faibles concernant les concentrations en nitrates et en ortho-phosphates dans l'eau, à partir de données historiques sur la qualité des rivières à moule perlière. Ces données sont également présentées dans le tableau I.

## **7.2. Données issues d'études en laboratoire**

### **7.2.1. Sensibilité au fer et à l'aluminium**

À notre connaissance, Taskinen et al. 2011, est la seule étude écotoxicologique à avoir été conduite sur des juvéniles de moule perlière. Cette étude, réalisée dans des conditions contrôlées de laboratoire, a permis d'étudier l'effet de l'acidification des rivières sur les jeunes stades de vie de l'espèce : les glochidies libres, les larves accrochées aux branchies du poisson

hôte et les juvéniles fraîchement décrochés. Les organismes ont été exposés à différentes conditions de contamination en aluminium (Al) et en fer (Fe), testés seuls ou en mélange et à différentes conditions de pH, pendant 7 jours à 18°C. Les résultats ont permis de montrer que :

- La survie des glochidies diminuait significativement avec la diminution du pH et l'augmentation des concentrations en métaux étudiés seuls ou en combinaison ;
- Un pH très faible et une exposition à 2mgFe/L conduisait à la mortalité de 100% des glochidies après 24 heures ;
- Après 4 jours d'exposition au fer et à l'aluminium, le taux d'infestation des glochidies sur les branchies de la truite n'est pas impacté ;
- Une faible diminution dans la viabilité des juvéniles est observée dans les conditions à pH faible, lorsque les concentrations en Al augmentent et lorsque les juvéniles sont exposées aux conditions de combinaison entre Al et Fe. Cependant les pourcentages de survie sont supérieurs à 80 % pour chacune des conditions après 7 jours d'exposition.

Cette étude montre finalement que des conditions acides et associées à de fortes concentrations en métaux peuvent être délétères pour les larves de la moule perlière et que cela peut conduire au déclin local des populations de moule perlière.

### **7.2.2. Sensibilité au cadmium**

Une étude en laboratoire a été menée pour évaluer l'effet d'une contamination au cadmium (Cd) sur des individus adultes de *Margaritifera margaritifera* issus de la rivière Dronne (Dordogne), en préalable au projet LIFE13 NAT/FR/000506 Haute Dronne (Baudrimont et al. 2020). Plusieurs paramètres physiologiques et biologiques ont été étudiés notamment par des analyses morphométriques, l'observation histologique des gonades, la bioaccumulation du Cd, des dosages de métallothionéines (protéines ayant un rôle de détoxification contre les métaux), le dosage du malondialdéhyde (MDA) et l'analyse de l'expression de plusieurs gènes codant pour diverses fonctions métaboliques. Les résultats de cette étude ont montré qu'après 7 jours d'exposition à des concentrations relativement faibles en Cd de 2 et 5 µg/L, l'espèce avait la capacité d'accumuler rapidement l'élément trace métallique dans ses tissus et plus particulièrement au niveau des branchies. De plus, l'analyse de l'expression des gènes a révélé une surexpression des gènes codant pour des enzymes luttant contre le stress oxydant. L'analyse histologique des gonades a montré la prédominance

d'individus hermaphrodites (n = 11) cependant après 7 jours d'exposition au Cd, le nombre d'individus femelles a augmenté d'environ 25 %. Cette étude a permis notamment de montrer que le Cd agissait comme un perturbateur du système endocrinien de la moule perlière. Ces travaux sont les premiers à étudier les effets d'un contaminant métallique sur des individus adultes de *Margaritifera margaritifera* issus de la Dronne et les premiers à apporter de nouvelles connaissances sur la sensibilité de l'espèce provenant d'une des populations les plus importantes à l'échelle nationale.

### 7.2.3. Réponse transcriptomique à une contamination métallique

Dans le cadre du projet LIFE13 NAT/FR/000506 Haute Dronne en cours, une étude sur l'analyse des réponses transcriptomiques des moules perlières à une contamination métallique dans la rivière Dronne a été menée (Bertucci et al. 2017). Pour permettre cette étude, des travaux préliminaires ont été effectués dans le but de déterminer le transcriptome de l'espèce à partir de tissus de rein et de déterminer la transcription des gènes à l'aide du séquençage de l'ARN. À partir de ce transcriptome, les niveaux de transcription des gènes ont été évalués en fonction de la présence d'éléments traces métalliques dans les organismes (l'arsenic, le cadmium, le cobalt (Co), le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le manganèse (Mn), le nickel (Ni), le plomb (Pb) et le zinc (Zn)), de l'âge des individus et des indices de condition, afin d'identifier les gènes qui répondent à ces différents facteurs. Les corrélations effectuées entre la modulation des gènes et les différents facteurs étudiés dans ce travail, ont montré que Cr, Zn, Cd et Ni constituaient les facteurs majeurs influençant la transcription des gènes et notamment ceux en relation avec divers processus tels que : la traduction, l'apoptose, la réponse immunitaire ou encore les voies de transports au niveau cellulaire. Aussi, il a été montré que l'âge des individus était un facteur important dans la transcription des gènes. En effet, en fonction de l'âge des individus, les réponses moléculaires sont expliquées par la présence de Cu pour les jeunes moules, par la présence de Zn pour les individus moyennement âgés et par l'âge pour les individus les plus âgés. Ces résultats suggèrent que la moule perlière répond de manière différente à une contamination métallique en fonction de son âge.

En raison du peu de connaissances sur la sensibilité de *M. margaritifera* à la pollution environnementale et de l'augmentation de la pollution des écosystèmes due aux activités anthropiques, il est aujourd'hui nécessaire d'améliorer nos connaissances sur sa sensibilité ou sa tolérance aux contaminants afin d'appréhender et de mieux comprendre sa disparition.



Pour répondre à ces attentes, les études écotoxicologiques apparaissent comme une méthode appropriée pour comprendre les mécanismes de toxicité des polluants et celles-ci devraient permettre par la suite d'améliorer les stratégies de conservation de l'espèce, notamment par un meilleur ciblage des zones de réintroduction de l'espèce dans le milieu naturel.

## 8. Études écotoxicologiques

L'écotoxicologie ou la toxicologie environnementale est définie comme l'étude du devenir des polluants (transfert, transformation et dégradation) dans l'environnement et leurs effets écologiques et toxicologiques sur les organismes, les populations, les communautés et les écosystèmes naturels (Forbes and Forbes 1997). Elle peut être étudiée dans les différents compartiments de l'environnement : les systèmes aquatiques et marins, les sols et dans l'atmosphère.

### 8.1. Types d'approches en écotoxicologie aquatique

L'effet des polluants sur les organismes peut être évalué à l'aide de diverses méthodes regroupées en deux catégories : les études en laboratoire et les études en milieu naturel (Figure 8).

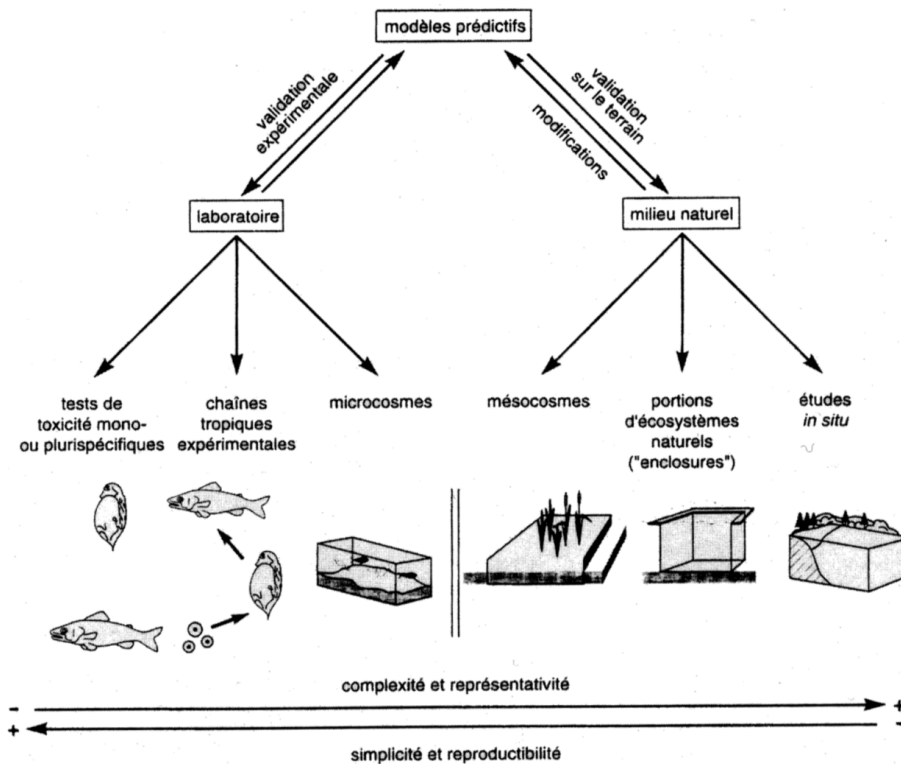


Figure 8. Différentes approches employées en écotoxicologie aquatique (D'après Caquet et al. 1989).

Ces diverses méthodologies se différencient par leur complexité, leur représentativité vis-à-vis du milieu naturel et leur reproductibilité. L'approche la plus simple et reproductible, concerne les tests de toxicité réalisés en laboratoire (Figure 8). Plus on se reproche du milieu naturel, plus la mise en place des expérimentations est complexe. La différence entre les approches en laboratoire et celles réalisées en milieu naturel, se trouve dans le contrôle des paramètres. En effet, en laboratoire, les expérimentations sont réalisées dans des conditions totalement contrôlées (température, choix des espèces, qualité de l'eau...) alors que les études menées dans le milieu naturel dépendent des conditions environnementales.

## 8.2. Tests de toxicité aiguë et sub-aiguë

Les tests de toxicité aiguë et sub-aiguë sont des bioessais réalisés en laboratoire dans des conditions contrôlées durant une période brève (inférieure ou égale à 7 jours) lors desquels les organismes sont exposés à une large gamme de concentrations en contaminant (ASTM E2455 2006). L'objectif de ce test est de déterminer la concentration en toxique entraînant un effet (mortalité ou impact physiologique) sur l'organisme étudié. Ce test permet d'établir une courbe représentant l'effet engendré sur les organismes (en pourcentage) en fonction de la concentration en contaminant (courbe dose-réponse, figure 9). À partir de cette courbe, différents seuils de toxicité peuvent être déterminés :

- Les concentrations létales à 50% (CL<sub>50</sub>), à 20% (CL<sub>20</sub>) ou à 10% (CL<sub>10</sub>), concentrations auxquelles la viabilité de 50, 20 et 10 % de la population est affectée.
- Les concentrations effectives à 50% (CE<sub>50</sub>), 20% (CE<sub>20</sub>) et 10% (CE<sub>10</sub>), concentrations auxquelles des effets sont observés sur 50, 20 et 10 % de la population étudiée.

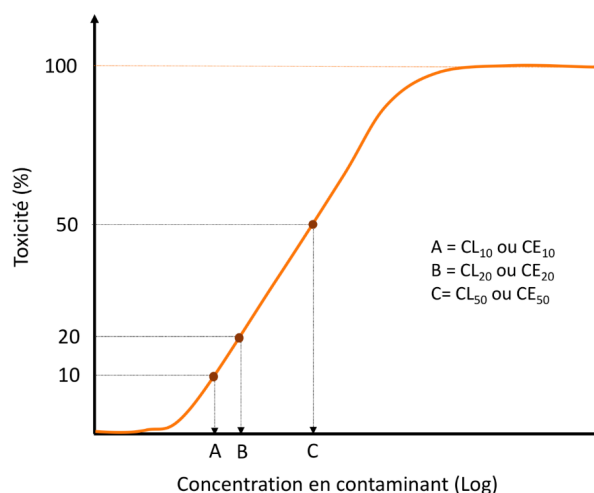


Figure 9. Courbe dose-réponse typique

Ces seuils de toxicité permettent d'évaluer la sensibilité d'une espèce à un contaminant ou un mélange de contaminants et permet également de comparer la sensibilité entre différentes espèces. Plus globalement, ces tests permettent également de déterminer de faibles seuils de toxicités ( $CL_{10}$  et  $CL_{20}$ ) qui sont généralement utilisés pour étudier les effets sub-létaux d'un contaminant à l'aide des tests de toxicité chronique.

### 8.3. Test de toxicité chronique

Les tests de toxicité chronique sont des bioessais réalisés en laboratoire dans des conditions contrôlées durant une longue période (plusieurs jours à plusieurs mois). Lors de ces expérimentations, les organismes sont exposés à des concentrations faibles en contaminant, comme les seuils de toxicité préalablement déterminés par un test de toxicité aiguë, ou à des concentrations environnementales. Ce test permet d'étudier les effets d'une exposition chronique et donc des effets sub-létaux des contaminants étudiés. Ces effets peuvent être évalués à différents niveaux d'intégration de l'organisme à l'aide de biomarqueurs. Ce test permet ainsi, comparé au test de toxicité aiguë, de déterminer les effets et les mécanismes de toxicité des facteurs étudiés.

### 8.4. Biomarqueurs

En écotoxicologie, un biomarqueur est défini comme un indicateur biologique en réponse à un changement moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental qui révèle l'exposition d'un organisme à un polluant ou un stress naturel (Livingstone 1993; Depledge 1994). Les biomarqueurs sont généralement regroupés en deux catégories (Manahan 2003) :

- Les **biomarqueurs de défense** (ou d'exposition) qui correspondent aux modifications induites ou aux défenses mises en place en réponse à la présence des contaminants dans l'organisme comme par exemple, les réponses génétiques (expression des gènes) ou la production de protéines agissant contre les métaux (métallothionéines), contre le stress oxydant (Catalase, Superoxyde-dismutase, glutathione-S-transférase...) ou contre les composés organiques (multidrug-xenobiotic-resistance)

- Les **biomarqueurs de dommages** (ou d'effets) qui correspondent aux modifications induites en réponse à un effet délétère sur l'organisme comme par exemple les impacts histologiques, immunologiques, le stress oxydatif ou la peroxydation lipidique.

Dans les études écotoxicologiques, les biomarqueurs permettent de fournir une réponse précoce des effets délétères subis par les organismes et d'évaluer le degré d'exposition et les effets des contaminants (Lam and Gray 2003). Ces biomarqueurs peuvent être évalués à différents niveaux biologiques : au niveau moléculaire et cellulaire, au niveau tissulaire et au niveau de l'organisme. Seuls les marqueurs biologiques étudiés dans ce manuscrit seront détaillés ci-après.

#### **8.4.1. Au niveau moléculaire**

Dans des conditions physiologiques « normales », le fonctionnement du métabolisme des organismes est régi par des cascades de réactions qui se mettent en place pour réguler les divers processus qui se déroulent au sein des organismes. En effet, le fonctionnement de l'organisme est contrôlé par l'activation des gènes qui se fait par la production d'acide ribonucléique messenger (ARNm), par le biais de la transcription de l'Acide Désoxyribonucléique (ADN) en ARNm. Ces ARNm correspondent à des copies de l'ADN qui codent pour des protéines spécifiques. La traduction de ces ARNm permet à la cellule de synthétiser des protéines aux fonctions diverses. L'étude du transcriptome ou de l'expression génique, concerne la mesure de la totalité des ARNm produit à un moment donné et dans des conditions spécifiques. Lorsque les organismes sont soumis à un stress chimique, physique ou biologique, la régulation des gènes est perturbée et conduit à une modification dans le profil de l'expression des gènes.

L'amplification en chaîne par polymérase (PCR) est une technique de biologie moléculaire permettant d'amplifier un fragment d'ADN spécifique et connu. Le principe de cette technique est la réalisation d'une succession de réactions de réplication de la portion d'ADN qui a préalablement été ciblée et rétro-transcrite en ADN complémentaire (ADNc). Plus la quantité initiale d'ADNc est importante, plus le nombre de copies de ce fragment sera important. La PCR quantitative en temps réel est une réaction en chaîne de 50 cycles identiques permettant de suivre la cinétique d'amplification de l'ADN et de déterminer le cycle seuil (Ct) à partir

duquel on observe une augmentation exponentielle de la quantité d'ADN. La comparaison de ces seuils permet de déterminer l'expression relative des gènes ciblés par rapport à un ou plusieurs gènes de référence, c'est-à-dire des gènes dont l'expression ne varie pas au sein des cellules quelles que soient les conditions d'exposition étudiées.

L'étude de l'expression génique constitue une réponse précoce à la suite d'un stress et permet d'appréhender les mécanismes de toxicité engendrés par les facteurs étudiés. Dans ce manuscrit, l'expression de plusieurs gènes qui codent pour des protéines ayant un rôle dans les réponses des organismes face à un stress, a été évaluée. La liste des gènes, des protéines qu'ils codent et leurs fonctions associées, est présentée dans le tableau III.

**Tableau III.** Listes des gènes étudiés, des protéines qu'ils codent et du mode d'action de ces protéines

<b>Fonctions</b>	<b>Gènes</b>	<b>Nom protéine</b>	<b>Mode d'action de la protéine</b>
<b>Stress oxydant</b>	sod1	Superoxide dismutase 1	Protéine du cytosol (Cu/Zn) qui convertie ERO <sup>1</sup> en O <sub>2</sub> et en peroxyde d'hydrogène
	sod2	Superoxide dismutase 2	Protéine mitochondriale (Mn) qui convertie ERO <sup>1</sup> en O <sub>2</sub> et en peroxyde d'hydrogène
	sod3	Superoxide dismutase 3	Protéine extracellulaire (Cu/Zn) qui convertie ERO <sup>1</sup> en O <sub>2</sub> et en peroxyde d'hydrogène
	cat	Catalase	Enzyme anti-oxydante qui convertie ERO <sup>1</sup> en H <sub>2</sub> O et O <sub>2</sub>
<b>Métabolisme mitochondrial</b>	cox1	Cytochrome C oxydase subunit 1	Composant de la chaîne respiratoire qui catalyse la réduction de O <sub>2</sub> en H <sub>2</sub> O
	12s	12 S ribosomal	ARN ribosomique 12S mitochondrial
<b>Détoxication</b>	mt1	Metallothionein 1	Protéine anti-oxydante, contrôle l'homéostasie des métaux dans la cellule, joue un rôle dans la détoxication des ETMs <sup>2</sup>
	mrx	Multidrug resistance protein 1-like	Protéine membranaire permettant le transport des xénobiotiques hors de la cellule
	gstpi	Glutathione S-Transferase Pi 1	Joue un rôle dans la détoxication en catalysant la conjugaison de plusieurs composés hydrophobes et électrophiles
<b>Apoptose</b>	casp3	Caspase 3	Protéines pro-apoptotiques impliquées dans le déclenchement de l'apoptose
	casp9	Caspase 9	Protéines pro-apoptotiques impliquées dans le déclenchement de l'apoptose
	bak	Bcl-2 antagonist/killer	Protéine apoptotique se fixant sur la membrane externe de la mitochondrie entraînant la sortie de cytochrome C et déclenche l'apoptose
	bcl2	Bcl2 Apoptosis Regulator	Protéine anti-apoptotique localisée dans membrane mitochondriale empêchant la fixation de Bak sur la membrane de la mitochondrie

	card11	Caspase recruitment domain family member 11	Protéine qui active les caspases initiatrices
	p53	Tumor Protein 53	Facteur de transcription contrôlant l'expression de gènes agissant sur la cellule (cycle cellulaire, réparation de la cellule, activation de l'apoptose...)
<b>Réparation de l'ADN</b>	rad51	RAD51 Recombinase	Réparation ADN double brin
	xrcc4	X-ray repair cross complementing 4	Réparation ADN double brin
<b>Immunité</b>	c3	Complement C3	Module l'inflammation et possède une activité anti-microbienne
<b>Traduction</b>	eif2	Eukaryotic translation initiation factor 2	Protéine impliquée dans les premières étapes de la production des protéines
<b>Références</b>	rpl7	Ribosomal protein L7	Joue un rôle de régulation dans la traduction

<sup>1</sup>ERO : espèces réactives de l'oxygène ; <sup>2</sup>ETMs : Éléments traces métalliques

Il est important de noter que l'étude de l'expression des gènes ne renseigne que sur la synthèse d'ARNm. Les processus qui se déroulent à la suite de cette production ne sont pas intégrés dans les profils d'expression des gènes, notamment la synthèse des protéines relatives aux fragments d'ADN étudiés. En d'autres termes, la surexpression ou la répression d'un gène ne conduit pas inéluctablement à une altération physiologique ou comportementale et constitue ainsi la limite des études transcriptomiques (Weis et al. 2001).

#### 8.4.2. Au niveau de l'organisme

##### La bioaccumulation des métaux

La bioaccumulation se définit par l'accumulation d'un composé au sein d'un organisme. Les organismes aquatiques ont la capacité d'accumuler dans leurs organes, différents composés, organiques ou inorganiques, comme les éléments traces métalliques (ETMs) par exemple. Lorsque ces ETMs pénètrent au sein des organismes, ils vont être pris en charge par ces derniers pour être stockés dans l'organisme (principalement les métaux essentiels comme le cuivre et le zinc) ou, être excrétés ou détoxiqués à l'aide de protéines spécifiques, comme les métallothionéines. Cependant, une accumulation excessive d'ETMs, pouvant conduire à une saturation des systèmes de défenses mis en place par les cellules, peut devenir toxique pour l'organisme (Schöne and Krause 2016). De plus, les ETMs sous leur forme inorganique, tendent à se fixer sur les protéines et autres tissus biologiques, ce qui augmente la bioaccumulation

de ces contaminants et en diminue l'excrétion. Les formes ioniques des ETMs se fixent généralement sur les acides-aminés, composante importante des protéines et des polypeptides (Manahan 2003). Donc l'accumulation des ETMs peut être toxique pour les organismes s'ils se fixent sur des protéines ou d'autres molécules possédant des fonctions métaboliques importantes (Rainbow 2002).

### **L'analyse comportementale**

L'étude du comportement dans les études écotoxicologiques est considérée comme une discipline prometteuse. En effet, elle permet d'améliorer l'extrapolation des résultats provenant d'études réalisées dans des conditions contrôlées de laboratoire aux conditions variables du milieu naturel. En effet, la toxicologie comportementale permet l'intégration de la physiologie interne de l'organisme et des conditions environnementales externes (Pyle and Ford 2017). Il a été montré que l'étude du comportement pouvait constituer une méthode sensible, rapide et robuste, dans les études toxicologiques (Melvin and Wilson 2013). Pour étudier l'effet des contaminants sur le comportement des bivalves, différentes méthodes peuvent être employées, par exemple l'analyse des taux de filtration, l'étude de l'ouverture et de la fermeture des valves (à l'aide de la valvométrie) ou encore les capacités d'enfouissement des organismes. D'autres types approches sont menées pour étudier par exemple le comportement natatoire des poissons en réponse à un stress lumineux (Pannetier et al. 2019) ou à un stress chimique (Weeks Santos et al. 2019). Ces études sont basées sur l'analyse du comportement des organismes placés dans une chambre d'observation Daniovision© et à l'aide du logiciel Ethovision, cette méthode consiste en la mesure de plusieurs paramètres comportementaux des organismes (vitesse, distance parcourue, mobilité, immobilité...) par le biais d'une caméra. À notre connaissance, aucune étude n'a encore été réalisée sur ce type de comportement chez les moules perlières. Dans ce manuscrit, un protocole d'expérimentation sur l'étude du comportement des juvéniles de moule perlière, a été développé afin d'exploiter cette approche et permettre d'améliorer nos connaissances sur l'impact de la pollution environnementale sur cette espèce en danger d'extinction.

---

## CHAPITRE II. MATÉRIELS ET MÉTHODES



Ce chapitre porte tout d'abord sur la présentation du site d'étude sur lequel sont basés les travaux présentés dans ce manuscrit. Il est important de noter que compte tenu des lois et des réglementations relatives à la protection des moules perlières en France, les travaux n'ont pas été menés sur des individus provenant du milieu naturel. La présentation du site est cependant importante puisque la production de juvéniles au sein de la ferme aquacole de Firbeix est réalisée à partir de la récolte de larves dans le milieu naturel. La suite du chapitre concerne les différentes méthodologies employées pour la mise en place des différentes expérimentations de cette thèse.

## 1. Site d'étude

### 1.1. La Haute-Dronne

#### 1.1.1. Description et situation géographique

La Dronne est une rivière longue de 200 km située dans le sud-ouest de la France entre les départements de la Haute-Vienne et de la Dordogne en région Nouvelle-Aquitaine (Figure 10.A). Elle draine un bassin versant qui s'étend sur 2800 km<sup>2</sup> et qui représente 11% du bassin versant de la Dordogne. Elle prend sa source dans la commune de Bussière-Galant dans le département de la Haute-Vienne à une altitude de 510 mètres pour se jeter dans l'Isle (affluent de la Dordogne) sur la commune de Coutras, dans le département de la Gironde.

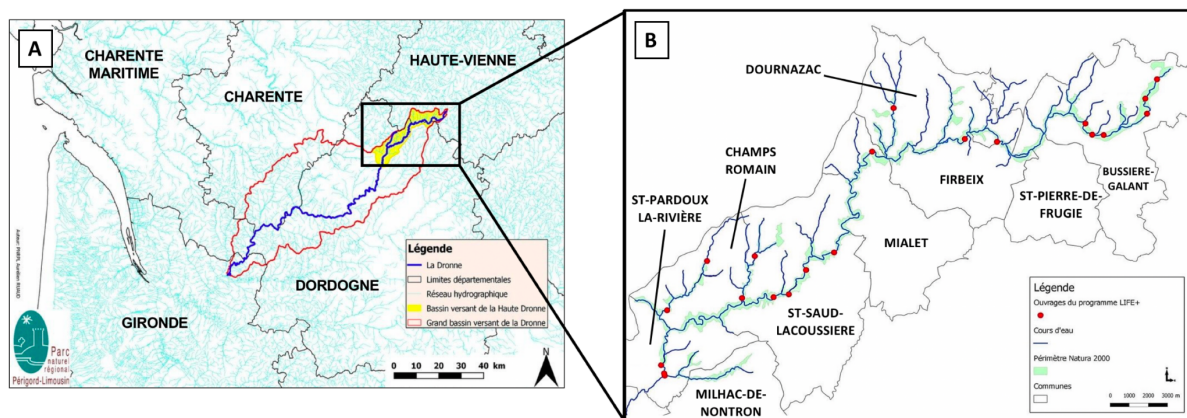


Figure 10. Situation géographique de la Dronne dans son bassin versant (A) et de la Haute-Dronne (B) d'après le PNRPL.

La partie amont de la Dronne, également appelée « **Haute-Dronne** », constitue la zone d'étude dans le cadre du projet LIFE dans lequel ce travail s'inscrit. Cette partie de la Dronne s'étend sur 54 km et traverse de l'amont vers l'aval, les communes de Bussière-Galant, Saint-Pierre-de-Frugie, Dournazac, Firbeix, Mialet, Saint-Saud-Lacoussière, Champs-Romain, Saint-Pardoux-la-Rivière et Milhac-de-Nontron (Figure 10.B).

#### 1.1.2. Population de moule perlière

En 2003, le recensement de la moule perlière dans la Haute-Dronne, réalisé par Patrice Cholet (Association Patrimoine Halieutique limousin Périgord) pour le compte du PNRPL, a révélé la présence d'environ 15 000 individus soit 15% de l'effectif national. La découverte de cette population a permis de mettre en évidence le caractère exceptionnel de la Haute-

Dronne. De ce fait, l'importance de la moule perlière, espèce inscrite à l'annexe II de la Directive « Habitat, Faune et Flore », a principalement justifié la proposition de désignation du site au réseau Natura 2000 en 2015.

Concernant la densité de moules perlières le long de ce cours d'eau, la limite avale est située au niveau de St-Pardoux-la-rivière et peut notamment s'expliquer par un changement de géologie avec un passage du socle cristallin au socle sédimentaire. La limite amont est retrouvée au niveau de Dournazac (Moulin du blé) à environ 25 km des sources.

Grâce au projet LIFE+ Haute-Dronne, une partie de ce cours d'eau (29,3 km) avec le Manet (7,6 km), un de ses affluents (au niveau de Saint-Pardoux-la-Rivière), ont fait l'objet de la labellisation « sites rivières sauvages » en janvier 2019 (Figure 11).

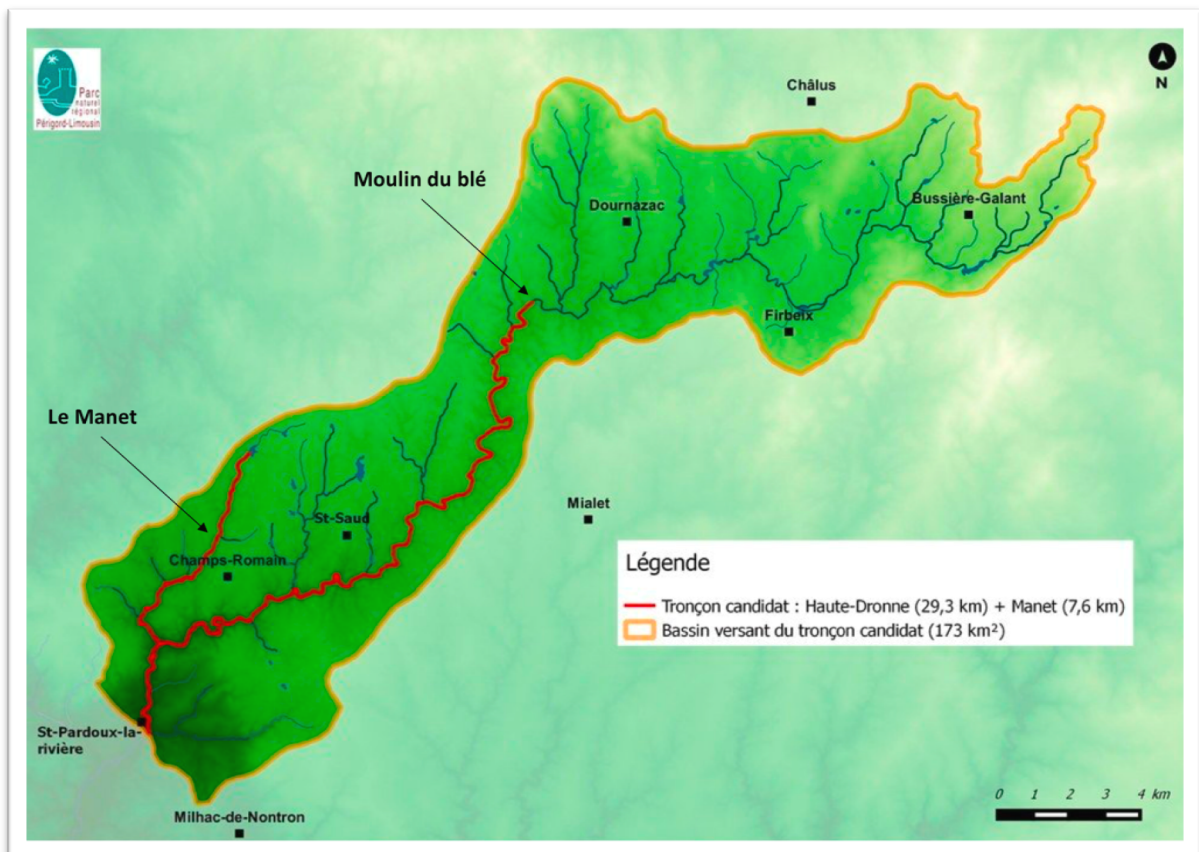


Figure 11. Cours d'eau (Haute Dronne + Manet) ayant fait l'objet d'une labellisation « sites rivières sauvages » dans le cadre du projet LIFE13 NAT/FR/0000506. (Sources : PNRPL)

## 1.2. Occupation des sols et pressions sur la Haute-Dronne

Sur le réseau Natura 2000 (Réseau hydrographique de la Haute-Dronne, FR7200809), qui intègre l'ensemble de la Haute-Dronne, ainsi que certains affluents majeurs de ce cours d'eau, les surfaces sont majoritairement forestières (51%). L'occupation des sols est couverte par des prairies (23%), des zones de plantations d'arbre (10%) et autres habitats naturels (marais, pelouse sèche...). Les surfaces agricoles ne représentent qu'un faible pourcentage de la couverture totale de ce réseau (1%).

En ce qui concerne les pressions pouvant impacter la Haute-Dronne, plusieurs menaces peuvent être décrites. La continuité écologique constitue d'après le site du système d'information sur l'eau de l'Adour-Garonne (SIE-AG), l'unique pression ayant un impact élevé sur cette rivière. En effet, la présence de barrages et de seuils le long du cours d'eau affecte non seulement la qualité de l'eau (augmentation de la température en amont des ouvrages et dynamique sédimentaire perturbée) et constitue également un frein à la circulation du poisson hôte, indispensable à la survie des moules perlières. De plus, bien que sur l'ensemble du réseau, les surfaces agricoles soient mineures, l'agriculture, par le biais du piétinement des berges par les bovins ou l'amendement agricole, peut perturber la qualité du cours d'eau : la déstabilisation des berges, la dégradation de la qualité physico-chimique et bactériologique de l'eau par les déjections des bovins, le colmatage du sédiment par les particules fines ou encore l'enrichissement du milieu par les fertilisants. Par ailleurs, l'exploitation agricole, source de pollution diffuse par les produits phytosanitaires et vétérinaires, peut conduire à la contamination des systèmes aquatiques. Enfin, les rejets domestiques constituent également une menace pour la Haute-Dronne puisqu'en raison du faible nombre de stations d'épuration le long de ce cours d'eau, les systèmes d'assainissement peuvent se retrouver dans l'incapacité à traiter l'intégralité des eaux usées, conduisant directement à leur rejet dans la rivière.

## 1.3. Caractéristiques physico-chimiques de l'eau de la Haute-Dronne

Les valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques mesurés entre 2015 et 2019 dans diverses communes traversant la Haute-Dronne (n=9), ainsi que les valeurs seuils de « bon état » de la masse d'eau, sont présentées dans le tableau IV. Ces données représentent les valeurs retenues pour qualifier la physico-chimie sur trois années correspondant au

percentile 90 (c'est-à-dire à la valeur qui est supérieure à 90% des valeurs annuelles relevées). La Haute-Dronne est caractérisée par une eau très peu enrichie en termes de nutriments avec des concentrations moyennes de  $6.46 \pm 1.17$  mg/L en nitrates,  $0.10 \pm 0.12$  mg/L en ammonium et  $0.08 \pm 0.03$  mg/L en ortho-phosphates. En ce qui concerne le pH, les valeurs se situent en moyenne entre 7 et 8.2. Ce cours d'eau est également représenté par une eau relativement bien oxygénée avec une valeur moyenne de  $8.5$  mgO<sub>2</sub>/L pour une température moyenne de 16°C. En prenant en compte ces différentes données, l'eau de la Haute-Dronne peut être qualifiée en « bon état » concernant la physico-chimie de la masse d'eau. En ce qui concerne la conductivité de ce cours d'eau, la valeur moyenne mesurée sur l'année 2015 (n=38) est de  $87 \pm 16$  µS/cm (Donnée issues des mesures réalisées dans le cadre du projet LIFE NAT/FR/000506/).

**Tableau IV.** Valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques de la Haute-Dronne mesurées entre 2015 et 2019 dans différentes communes le long du cours d'eau (n=9) d'après le site du système d'information sur l'eau de l'Adour-Garonne (SIE-AG).

Paramètres (unités)	Moyennes ± ET	Valeurs seuils de bon état
DBO5 <sup>1</sup> (mgO <sub>2</sub> /L)	$2.1 \pm 0.3$	≤ 6
Oxygène dissous (mgO <sub>2</sub> /L)	$8.49 \pm 1.07$	≥ 6
Température	$18.5 \pm 2$	≤ 21.5
Ammonium (mg/L)	$0.10 \pm 0.12$	≤ 0.5
Nitrates (mg/L)	$6.5 \pm 1.2$	≤ 50
Ortho-phosphates (mg/L)	$0.08 \pm 0.03$	≤ 0.5
pH minimum	$6.96 \pm 0.16$	≥ 6
pH maximum	$8.23 \pm 0.41$	≤ 9

<sup>1</sup>DBO5 : Demande biologique en oxygène

#### 1.4.Éléments traces métalliques retrouvés dans la Haute-Dronne

Dans le cadre du projet LIFE NAT/FR/000506, un état des lieux de la contamination métallique le long de la Haute-Dronne a été réalisé en 2015. Les concentrations dissoutes de plusieurs éléments traces métalliques (ETMs) ont été mesurées dans l'eau sur différents sites le long de ce cours d'eau (Tableau V). Les concentrations de ces mêmes ETMs ont été mesurées au sein de la ferme aquacole en 2018 et sont également présentées dans le tableau V. Pour certains métaux qui ne sont pas présentés dans ce tableau, les valeurs mesurées sont inférieures à la limite de détection soit <0.4 µg/L pour l'argent, <0.6 µg/L pour le cadmium,

<0.7 µg/L pour le cobalt, <0.6 µg/L pour le chrome, <0.8 µg/L pour le nickel et <0.5 µg/L pour le plomb.

**Tableau V.** Concentrations moyennes ± écart-type, minimales et maximales, en Al, As, Cu, Fe, Mn et Zn, mesurées sur différents sites de prélèvements le long de la Haute-Dronne en 2015 et au sein de la ferme aquacole de Firbeix en 2018

Concentrations dissoutes en éléments traces métalliques (µg/L)						
	Haute-Dronne en 2015 (n=10)			Eau de la ferme en 2018 (n=4)		
	Moyenne ± ET	Min	Max	Moyenne ± ET	Min	Max
<b>Al</b>	16 ± 16	5	54	104 ± 14	87	121
<b>As</b>	6.4 ± 9.9	1.4	34.5	14.5 ± 1	13.9	16
<b>Cu</b>	1.33 ± 0.41 <sup>1</sup>	<0.9 <sup>2</sup>	1.8	2.8 ± 0.4	2.5	3.2
<b>Fe</b>	208 ± 174	39	670	612 ± 67	524	682
<b>Mn</b>	18.7 ± 15.9	6	60	8.9 ± 1.7	8	11.5
<b>Zn</b>	<0.8 <sup>2</sup>	<0.8 <sup>2</sup>	<0.8 <sup>2</sup>	11.3 ± 4.9	6.1	17.5

<sup>1</sup>Moyenne calculée avec n=3 (7 valeurs sur 10 en dessous de la limite de détection LD pour Cu <0.9)

<sup>2</sup>Valeur en dessous de la limite de détection, LD pour Zn <0.8

La Haute-Dronne est une rivière très peu polluée en termes de contamination métallique puisque qu'une grande partie des éléments traces métalliques mesurée dans ce cours d'eau est inférieure à la limite de détection de l'appareil utilisé. Lorsque l'on compare ces données aux valeurs guide de l'eau potable pour la consommation, par l'OMS et par l'union européenne (Tableau VI), les concentrations retrouvées dans la Haute-Dronne sont de manière générale en dessous de ces valeurs guides. Lorsque ces valeurs sont comparées aux PNEC (predicted no effect concentration), seuls l'Al et l'As sont au-dessus de ces seuils. En ce qui concerne l'eau de la ferme aquacole, les concentrations en As et Fe sont supérieures aux valeurs guides pour l'eau potable. Par rapport aux PNECs, les concentrations en Al et en As sont relativement plus élevées et les concentrations en Cu et Zn sont légèrement plus élevées.

**Tableau VI.** Valeurs guides (en µg/L) pour la qualité de l'eau de consommation fixées par l'OMS et par l'Union Européenne, et PNEC (en µg/L) fixés par l'INERIS pour Ag, Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb et Zn.

	Ag	Al	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
Valeurs eau potable OMS (µg/L)	na	200	10	3	na	50	2000	na	400	70	na	3000
Valeurs eau potable UE (µg/L)	na	200	10	5	na	na	2000	200	50	20	10	na
Valeurs PNECs	na	0.06	4.4	na	0.5	4.7	1.6	na	15	0.5	1.18	8.6

na : Pas de valeur-guide ; INERIS : Institut national de l'environnement industriel et des risques

## 2. Modèle biologique

### 2.1. Production et description des juvéniles de moule perlière

Lors de la période de ponte qui se manifeste entre les mois d’Août et d’Octobre, le stade de maturation des glochidies est vérifié sur des géniteurs de moule perlière prélevés dans la Haute-Dronne. Le développement du stade larvaire est composé de 5 phases (Figure 12).

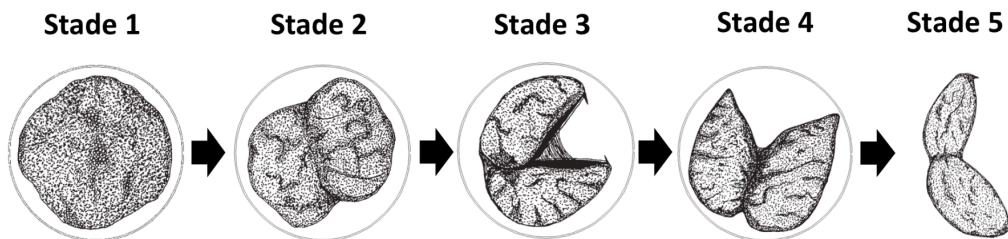


Figure 12. Différents stades de développement des larves de moule perlière (adapté de Pichler-Scheder et al. 2011)

Le premier stade est caractérisé par une masse de cellules sphériques, renfermée à l’intérieur d’une membrane fine et transparente, comme une capsule. Au stade 2, les côtés gauche et droit de la larve, peuvent être distingués. À partir du 3<sup>ème</sup> stade, on peut observer la formation des deux valves. À ce stade, la larve ne présente aucun mouvement. C’est à partir du 4<sup>ème</sup> stade que la larve commence à bouger à l’intérieur de la capsule. Enfin, le stade 5, les larves éclosent de leur membrane et commencent à se déplacer librement en faisant claquer fortement leurs valves. C’est à ce stade que les glochidies sont émises dans l’eau et récoltées. Lorsque ce stade est atteint, les géniteurs de moule perlière sont prélevés dans la rivière puis placés dans des boîtes en plastique contenant de l’eau de la rivière (Figure 13) où ils subissent un choc thermique (augmentation progressive de la température de l’eau) permettant de stimuler la ponte. Pour favoriser la diversité génétique des moules perlières produites au sein de la ferme aquacole, un pool de plusieurs pontes provenant de différents individus et populations, est effectué.



Figure 13. Photographie d'une moule perlière après expulsion des larves suite à un choc thermique (photo : T.Belamy ©)

Une fois la récolte des larves effectuée, celles-ci sont transportées jusqu'à la ferme aquacole pour la mise en contact avec le poisson hôte. Ces poissons, qui correspondent aux jeunes stades de la truite fario (truitelles âgées d'un an), sont issus d'un élevage et sont fournis par la fédération de pêche de la Dordogne. Les poissons infestés par les glochidies sont gardés en captivité tout au long du développement des larves. Après 4 mois pour la première cohorte (2016) et 7 mois pour les autres cohortes (2017, 2018 et 2019), accrochées sur les branchies du poisson, les larves métamorphosées en juvéniles se décrochent et sont récoltées pour être triées et dénombrées. Une partie des juvéniles venant de se décrocher est réintroduite dans la Dronne et l'autre partie est maintenue à la ferme aquacole dans des auge (longueur 2.6 m ; largeur 0.5 m et profondeur 0.15m) de 160 litres contenant du sable ultra-pure (silice de diamètre compris entre 0.8 et 1.4 mm SIBELCO) et de l'eau de la Dronne. Ces juvéniles seront élevés en captivité soit à des fins de réintroduction dans le milieu naturel à différents âges (Tableau VII) soit à des fins d'expérimentations.

**Tableau VII.** Nombre d'individus réintroduits dans la Dronne en fonction des différentes cohortes de moule perlière (*Margaritifera margaritifera*) produites à la ferme aquacole de Firbeix et de l'âge des juvéniles au moment de la réintroduction

Cohorte (Année <sup>a</sup> )	Âge des individus (an)				TOTAL
	0	1	2	3	
Cohorte 1 (2016)	0	1 909	3 130	3000	8 039
Cohorte 2 (2017)	68 000	1 070	600		69 670
Cohorte 3 (2018)	47 000				47 000
Cohorte 4 (2019)	1 035 100				1 035 100
TOTAL	1 150 100	2 979	3 730	3000	1 159 809

<sup>a</sup>Année au cours de laquelle la mise en contact des larves et du poisson hôte a été effectuée

L'âge des juvéniles est défini à partir du moment où ils se décrochent des branchies. Jusqu'à quelques jours après le décrochage, les individus sont qualifiés de juvéniles « fraîchement décrochés » ou « au stade post-parasitaire ». Au-delà de ces quelques jours, le stade juvénile va durer jusqu'à ce que l'individu atteigne sa maturité sexuelle, soit 15 à 20 ans. Au total, 4 cohortes ont été produites au sein de la ferme aquacole depuis 2016 dans le cadre du projet LIFE NAT/FR/000506/. Dans ce manuscrit, seules les cohortes 1 (2016) et 2 (2017) ont été étudiées. En effet, en raison de la faible taille des juvéniles lors de leurs premières années de vie, les expérimentations n'ont pas pu être réalisées sur les cohortes 3 et 4.



Les tailles approximatives des juvéniles de la première cohorte (2016) élevées en captivité au sein de la ferme aquacole de Firbeix en fonction de leur âge sont présentées dans le tableau VIII. Dans ce tableau, seules les tailles moyennes des juvéniles utilisés dans nos expérimentations sont présentées.

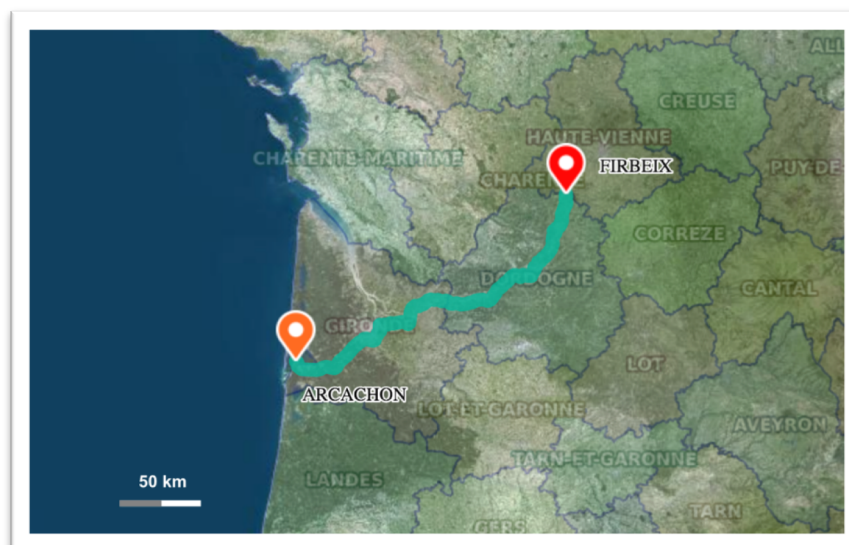
**Tableau VIII.** Tailles approximatives des juvéniles (en mm) de la première cohorte (2016) en fonction de leur âge (en mois), élevés en captivité à la ferme aquacole de Firbeix et utilisés lors des expérimentations présentées dans ce manuscrit.

Date de la mesure	Âge des juvéniles (mois)	Taille des juvéniles (mm)
Déc-16	0	0.40 <sup>1</sup>
Oct-17	10	1.36
Janv-18	13	1.57
Févr-18	14	2.13
Avr-18	16	2.63
Mai-18	17	3.16
Juil-18	19	3.29
Oct-18	22	4.20
Avr-19	28	5.33
Août-19	32	6.59
Oct-19	34	6.93
Févr-20	38	6.95

<sup>1</sup>Taille approximative des juvéniles fraîchement décrochés

## 2.2. Transport des organismes

La distance entre la ferme aquacole où sont produites les moules perlières (Firbeix – France) et le laboratoire où sont effectuées les expérimentations (Arcachon – France) est d’environ 250 kilomètres (Figure 14).



**Figure 14.** Distance entre la ferme d’élevage (Firbeix) et le laboratoire (Arcachon) (Source: Géoportail)

Une étude sur l'effet du transport des moules entre la ferme d'élevage et le laboratoire a donc été réalisée avant le début des travaux. Les juvéniles sont transportés dans une boîte en plastique d'un volume de 500 mL contenant de l'eau de la ferme aquacole sans substrat. La boîte est munie d'un bulleur à pile permettant l'aération de l'eau pendant le transport. L'ensemble est placé dans une glacière contenant des packs de froid permettant de transporter les moules à une température de 12°C. Une fois au laboratoire, la mobilité des juvéniles (mouvement du pied du bivalve) est vérifiée à la loupe binoculaire. Cette étude a été réalisée lors des trois premiers transports et a permis de montrer que le transport n'affectait pas la mobilité des jeunes moules perlières.

### 2.3. Maintien et culture des juvéniles au laboratoire

#### 2.3.1. Dispositif de maintien

Les individus sont maintenus en laboratoire dans des aquariums en verre de 50 litres à l'aide d'un système de circulation d'eau fermé (Figure 4). L'eau est filtrée en permanence grâce à une pompe filtrante dont la sortie d'eau est munie d'une canne percée permettant une bonne oxygénation de l'eau. Pour faciliter la manipulation des juvéniles, ceux-ci sont placés dans des contenants (diamètre de 15 cm et hauteur de 3 cm) avec du sable ultra-pur d'un diamètre compris entre 0.8 et 1.4 mm, eux même placés dans l'aquarium. Pour maintenir l'eau des aquariums à 16°C, ceux-ci sont placés dans un bain marie. L'eau est renouvelée à 50% toutes les deux semaines avec de l'eau provenant de la ferme aquacole. Cette eau est stockée au laboratoire dans une chambre froide à 4°C à l'abri de la lumière. Avant chaque renouvellement d'eau dans les aquariums, elle est gardée hors de la chambre froide afin que la température de l'eau se stabilise à 16°C.



Figure 15. Photographie du dispositif de maintien des organismes au laboratoire

### 2.3.2. Alimentation des juvéniles

Les jeunes moules sont nourries à raison d'environ 35 000 cellules algales/mL, tous les deux jours avec un mélange (en proportion 1 : 3) de 3 souches d'algues vertes d'eau douce qui sont directement cultivées au laboratoire : *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris* et *Stichococcus bacillaris*.

## 3. Facteurs étudiés dans ce manuscrit

### 3.1. Température

Le facteur température a été choisi dans le but d'étudier les potentiels effets du réchauffement climatique puisqu'elle constitue une menace importante pour les populations de moule perlière de la Haute-Dronne. En effet, la présence de retenues et de barrages le long du cours d'eau, conduit à la formation de plans d'eau en amont de ces ouvrages, qui se réchauffent lors des périodes estivales. L'augmentation générale de la température va donc inévitablement accentuer ce phénomène. L'élevage des juvéniles de moule perlière à la ferme aquacole de Firbeix est réalisée à 16°C (hormis en période d'hiver, où la température est descendue progressivement jusqu'à 6°C), correspondant à la température moyenne annuelle retrouvée dans la Haute-Dronne. Dans ce manuscrit, cette condition de température a donc été choisie en tant que température « témoin ». Pour nos expérimentations, les conditions de températures supérieures à 16°C sont contrôlées à l'aide de résistances connectées à une sonde température permettant l'arrêt de la résistance en cas de dépassement de la température souhaitée. Les conditions à 16°C sont généralement réalisées dans un bain marie sauf pour les expérimentations conduites sur les juvéniles fraîchement décrochés, pour lesquelles les unités d'expérimentation sont placées dans une étuve thermostatée à 16°C.

### 3.2. Contaminants et nutriments

La contamination des unités d'expérimentation par les éléments traces métalliques dans ce manuscrit est effectuée à partir de solutions mères à 1g/L, obtenues par dilution d'ampoules titrisol (Merck) dans de l'eau ultra-pure (milli-Q). Pour les nutriments et le chlorure de sodium, les solutions mères sont préparées par dilution de sels dans de l'eau ultra-pure (milli-Q) (Tableau IX).

Tableau IX. Liste des contaminants et des nutriments étudiés

Contaminants	Espèce chimique	Solution mère (Préparation)	Fournisseur	Formule
Aluminium	Al	Ampoule Titrisol® + H <sub>2</sub> O	Merck	AlCl <sub>3</sub>
Arsenic	As	Ampoule Titrisol® + H <sub>2</sub> O	Merck	As <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Cadmium	Cd	Ampoule Titrisol® + H <sub>2</sub> O	Merck	CdCl <sub>2</sub>
Chlorure de sodium	NaCl	Sels + H <sub>2</sub> O milliQ	USB Corporation	NaCl
Cuivre	Cu	Ampoule Titrisol® + H <sub>2</sub> O	Merck	CuSO <sub>4</sub>
Nickel	Ni	Ampoule Titrisol® + H <sub>2</sub> O	Merck	NiCl <sub>2</sub>
Nitrates	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Sels + H <sub>2</sub> O milliQ	Prolabo	NaNO <sub>3</sub>
Ortho-phosphates	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Sels + H <sub>2</sub> O milliQ	Sigma Aldrich	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

Pour chacun des contaminants étudiés, le choix de ces facteurs dans le cadre de cette thèse est expliqué dans le tableau X.

Tableau X. Choix des différents facteurs (éléments traces métalliques, nutriments et chlorure de sodium) dans le cadre de cette étude

Facteurs	Choix du contaminant
Al	Concentration maximale en Al de 120 µg/L mesurée dans l'eau de la ferme en 2018 et potentielle présence due à l'utilisation d'Al dans les pesticides
As	Concentration maximale en As de 35 µg/L mesurée dans l'eau de la ferme en 2018 + fond géochimique élevé
Cd	Référence à titre de comparaison aux effets induits par l'As puisque les effets du Cd sur les bivalves sont bien documentés
NaCl	Utilisé en tant que toxique de référence (recommandation du guide standard ASTM E255) <sup>1</sup>
Cu et Ni	Métaux traces potentiellement présents dans la Dronne pour leur utilisation dans les pesticides ou provenant des rejets des STEP <sup>2</sup>
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> et PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Nutriments pouvant ponctuellement être retrouvés en excès (bassin versant avec activités agricoles) et dont des seuils très faibles fixés sur observations dans le milieu naturel impacteraient la survie des moules (Moorkens 2006) <sup>3</sup>

<sup>1</sup>ASTM 2006<sup>2</sup>STEP : Stations d'épuration des eaux usées<sup>3</sup>Moorkens 2006

## 4. Développement des protocoles d'expérimentation

Pour le développement des protocoles d'expérimentation utilisés dans ce manuscrit, le choix des différentes conditions s'est porté sur les recommandations du guide standard pour conduire des tests de toxicité en laboratoire sur des moules d'eau douce (ASTM 2006). Une seule expérimentation a été conduite en respectant toutes les préconisations de ce guide sauf

la température d'exposition (**CHAPITRE III- Partie 2**). Pour toutes les autres expérimentations, plusieurs paramètres ne suivent pas les conditions recommandées par ce guide notamment : **la température, l'utilisation d'un substrat, l'utilisation de l'eau provenant de la Dronne et enfin l'âge des juvéniles étudiés.**

En effet, la température préconisée dans le guide standard (ASTM 2006) pour conduire les tests de toxicité est de 20°C ce qui est trop élevée pour une espèce affectionnant les eaux fraîches comme la moule perlière. La température de référence choisie correspond à la température moyenne annuelle mesurée sur la Haute-Dronne, soit une température de 16°C. La moule perlière est une espèce vivant essentiellement dans des eaux froides, ce qui est le cas pour les populations de *M. margaritifera* de la Haute-Dronne puisque l'eau de la Dronne dépasse très rarement les 20°C. De ce fait, nous avons choisi de conduire nos expérimentations à une température représentative du milieu naturel de la moule perlière de la Haute-Dronne.

Par ailleurs, afin de respecter les exigences écologiques des juvéniles de moules perlière, la majorité des expérimentations ont été conduites dans des unités d'expérimentation contenant du substrat. Celui-ci est composé de sable de silice ultra-pure d'un diamètre compris entre 0.8 et 1.4 millimètres (SIBELCO – Mios).

Contrairement aux recommandations du guide standard (ASTM 2006) préconisant l'utilisation d'une eau reconstituée pour conduire les tests de toxicité, l'eau provenant de la ferme aquacole a été utilisée dans la majorité de nos expérimentations. Ce choix s'est porté sur la volonté d'évaluer la sensibilité des juvéniles de moule perlière dans le cas de la contamination de la Haute-Dronne, mais également d'assurer le maintien des organismes au laboratoire en raison des exigences physico-chimiques de la moule perlière.

Le guide standard (ASTM 2006) recommande d'effectuer les tests de toxicité sur des juvéniles fraîchement décrochés (âges de quelques jours seulement). Dans nos expérimentations, l'âge des juvéniles varie entre 10 et 38 mois. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce choix :

- **Contrainte de manipulation** : En raison du choix de l'utilisation de substrat dans nos expérimentations et les juvéniles fraîchement décrochés ayant une taille approximative de 400  $\mu\text{m}$  (donc inférieure à celle du sable utilisé pour le substrat), la manipulation des juvéniles lors des expérimentations s'est avérée difficile notamment pour la récolte des individus dans les unités d'expérimentation pour la vérification de la mobilité ;
- **Contrainte d'obtention des organismes** : la période de reproduction n'ayant lieu qu'une fois par an, il est donc difficile de pouvoir mettre en place plusieurs expérimentations sur une période courte (2 mois) à raison d'une fois par an ;
- **Pertinence des résultats** : Enfin dans le cadre du projet LIFE, les juvéniles cultivés au sein de la ferme aquacole sont réintroduits dans le milieu naturel après une ou deux années de culture. Ainsi, pour permettre de répondre aux objectifs de la thèse dans le cadre du projet concernant l'amélioration de nos connaissances sur la sensibilité des juvéniles et permettre un meilleur ciblage des zones de réintroduction, l'étude des effets des facteurs étudiés sur des juvéniles âgés de plusieurs mois, permet de fournir des résultats plus pertinents.

### **Validation du protocole d'expérimentation**

Pour valider le protocole expérimental ne prenant pas en compte l'ensemble des recommandations du guide standard, une première expérience a été réalisée avec un toxique de référence, le chlorure de sodium (NaCl), un contaminant dont l'effet sur la moule d'eau douce est certain. Ensuite, pour valider l'utilisation du substrat dans nos expérimentations, une deuxième expérience a été réalisée afin de comparer les effets de la présence de substrat sur les résultats obtenus. Pour cette expérience, les juvéniles sont exposés à des concentrations croissantes en NaCl et en Cd dans des unités d'expérimentation en présence ou non de substrat.

Ces deux expériences ayant fait l'objet d'une première publication publiée en 2020 et présentée dans le **Chapitre III – partie 2** de ce manuscrit, le matériel et les méthodes employées, ne seront pas présentés ici.

## 5. Protocoles d'expérimentation mis en place

Cette partie concerne les conditions générales d'expérimentation mises en place dans ce manuscrit. Les expérimentations étant relativement variables selon les différents chapitres, les détails concernant le matériel et les méthodes employés pour chaque étude sera présenté dans chacun des chapitres.

### 5.1. Tests de toxicité aiguë

Les tests de toxicité aiguë mis en place (**Chapitre III, Parties 1 et 2**) ont été réalisés à partir des conditions d'expérimentation décrites dans le tableau XI.

Tableau XI. Conditions générales d'expérimentation mises en place pour conduire les tests de toxicité aiguë.

Conditions d'expérimentation	CHAPITRE III-Partie 1	CHAPITRE III-Partie 2
Durée d'exposition	96 heures	
Âge des organismes	3 jours (cohorte 2)	13 à 28 mois (cohorte 1)
Aération des UEs	Oui	
Alimentation	Non	
Nombre de réplicat	3	4
Nombre d'individus / réplicat	10	5
Critère de validité du test	Mobilité des juvéniles chez les témoins $\geq 90\%$	
Système de circulation d'eau	Statique sans renouvellement	
Unité d'expérimentation (UE)	Boite de pétri en plastique	Bocaux en verre
Volume de l'UE	30 ml	300 ml
Volume d'eau dans l'UE	25 ml	150 ml
Eau de dilution	Eau douce reconstituée <sup>1</sup>	Eau de la ferme aquacole
Présence de substrat <sup>2</sup>	Non	Oui
Température d'exposition	16°C	
Critère d'évaluation	Mobilité (mouvement du pied)	

<sup>1</sup>ASTM E729 2002; <sup>2</sup>Sable ultra-pur

## 5.2. Tests de toxicité chronique, subaigüe et effet de la température seule

Les tests de toxicité chronique mis en place (**Chapitre IV, V et VII**) ont été réalisés à partir des conditions d'expérimentation décrites dans le tableau XII.

Tableau XII. Conditions d'expérimentation mises en place pour conduire les tests de toxicité chronique et subaigüe

Conditions d'expérimentation	Tests de toxicité chronique (Chapitre IV, V et VII)	Effet température seule (Chapitre V)	Test multifactoriel de toxicité subaigüe (Chapitre V)
Durée d'exposition	14 ou 21 jours	14 jours	96 heures
Âge des organismes (cohorte 1)	16 à 38 mois	19 mois	14 mois
Aération des UEs	Oui		Non
Alimentation	Oui		Non
Nombre de réplicat	3		
Nombre d'individus / réplicat	10 ou 12	5	
Critère de validité du test	Mobilité des juvéniles chez les témoins $\geq 80\%$		
Système de circulation d'eau	Statique et renouvellement à 50% tous les deux jours		Statique sans renouvellement
Unité d'expérimentation (UE)	Bocaux en verre		
Volume de l'UE	300 ml		
Volume d'eau dans l'UE	200 ml	150 ml	
Eau de dilution	Eau de la ferme aquacole		
Présence de substrat <sup>1</sup>	Oui		
Température d'exposition	16°C (sauf chapitre VII : 16, 26 et 30°C)	16, 22 et 26°C	16°C et 22°C
Critère d'évaluation	Mobilité, bioaccumulation, expression génétique et comportement	Mobilité et expression génétique	

<sup>1</sup>Sable ultra-pur



## 6. Paramètres étudiés

### 6.1. Bioaccumulation des métaux

#### 6.1.1. Prélèvement et stockage des échantillons avant analyse

L'évaluation de la bioaccumulation des métaux a été réalisée dans le cadre des études présentées dans les **chapitre IV** et **VII**. Pour le **chapitre IV**, les juvéniles âgés de 16 à 17 mois utilisés dans cette étude, présentaient une petite taille (entre 2 et 3 mm) rendant la dissection des organismes difficile. La bioaccumulation a donc été étudiée sur l'organisme entier (coquille comprise) avec un pool de 5 individus broyés par échantillon. Pour le **chapitre VII**, les juvéniles étaient âgés de 37 mois et leur taille variait entre 7 et 8 mm. Il a donc été possible de mesurer la bioaccumulation sur le corps mou entier (sans coquille) avec un pool de 6 muettes par échantillon. Pour ces deux études, les échantillons sont placés dans des tubes eppendorf de 2mL puis stockés à -20°C pour être analysés ultérieurement.

#### 6.1.2. Minéralisation des échantillons

Les échantillons ont été mis à sécher dans une étuve à 45°C pendant 24h puis pesés avant de subir une digestion par une attaque à l'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$  ultra-pur à 65%, Sigma Aldrich). Pour ce faire, entre 10 et 15 mg de tissus ont été placés dans des tubes en polypropylène dans lesquels 0.5 mL d' $\text{HNO}_3$  ont été ajoutés. Ce mélange a ensuite été chauffé à l'aide d'une plaque chauffante (HotBlock) pendant 3h à 100°C. Après refroidissement des échantillons, 2.5 mL d'eau ultra-pure ont été ajoutés dans les tubes.

#### 6.1.3. Dosage des échantillons

Avant le dosage des échantillons, trois tubes contenant approximativement 80 mg (en poids sec) de matériel de référence certifié DOLT-5 (foie de poisson) ont été préparés afin de vérifier la précision de la méthode. Le dosage des échantillons est réalisé par spectrométrie d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-EOS) pour Al, Cd et Cu. L'As dans les tissus a été dosé par spectrométrie d'absorption atomique (SAA). Les méthodes de dosage par ICP-EOS et par SAA sont présentées dans la partie 7 de ce chapitre.

## 6.2. Expression génique

### 6.2.1. Prélèvement et stockage des échantillons

L'évaluation de l'expression des gènes a été réalisée dans le cadre des études présentées dans les **chapitres IV, V et VII**. Les échantillons étaient composés d'un pool de 5 individus pour les **Chapitres IV et V**, et d'un pool de 6 pour le **Chapitre VII**. Les individus ont été placés dans un tube eppendorf de 2 mL contenant 500 µL de solution de RNA later (permettant la conservation des tissus et des ARN). Les tubes ont ensuite été stockés au réfrigérateur pendant 24 heures pour permettre une imprégnation totale des tissus par la solution de RNA later puis placés à -20°C pour être analysés ultérieurement.

### 6.2.2. Protocole d'expérimentation

#### 6.2.2.1. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux se fait à l'aide du kit « SV RNA total isolation system » (PROMEGA) selon les instructions du fournisseur. Après décongélation, les juvéniles sont déposés sur du papier absorbant pour retirer au maximum le surplus de RNA later puis sont placés dans des tubes eppendorfs de 2 mL (safe-lock) avec 2 billes en acier et 500 µL de tampon de lyse (RNA lysis buffer) où ils sont broyés à l'aide d'un vibro-broyeur pendant 30 secondes à une vitesse de 30 m/sec. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 2 min à 10 000 rpm. 400 µL de surnageant sont alors mélangés avec 400 µL d'un mélange de phénol et de chloroforme avant de subir une nouvelle centrifugation 10 minutes à 13 000 rpm et à 4°C. Le surnageant est transféré dans un tube de 1,5 mL dans lequel est ajouté un volume d'éthanol à 70% avant d'être mélangé par vortex. Le liquide est ensuite transféré sur une colonne assemblée puis centrifugé à 13 000 rpm pendant 1 min. Après centrifugation, le lysat est éliminé puis 600 µL de RNA wash solution (solution de rinçage) sont ajoutés dans la colonne. Les échantillons sont de nouveau centrifugés à 13 000 rpm pendant 1 min suivi de l'élimination du lysat. Un mélange de DNase I (composé de 40 µL de tampon de réaction + 5 µL MnCl<sub>2</sub> à 0.09 M + 5 µL de DNase I) à raison de 49 µL pour un échantillon, est déposé sur la membrane de la colonne. Les échantillons sont par la suite incubés pendant 15 min dans une étuve à 37°C. Après incubation, 200 µL de DNase STOP solution sont ajoutés dans les colonnes qui sont ensuite centrifugées à 13 000 rpm pendant 1 min suivi de l'élimination du lysat. Après ça, 600 µL de RNA wash solution sont ajoutés dans les colonnes, suivi de nouveau par une

centrifugation à 13 000 rpm pendant 1 min et d'une élimination du lysat. Cette dernière étape est de nouveau réalisée avec 200 µL de RNA wash solution et une centrifugation à 13 000 rpm pendant 2 min. Les colonnes sont ensuite transférées dans des tubes d'éluion et 50 µL de nucléase free water (eau dépourvue de nucléase) sont déposés sur la membrane. Les colonnes sont gardées 5 minutes à température ambiante puis centrifugées à 13 000 rpm pendant 1 min. Le lysat obtenu dans les tubes, contenait l'ARN purifié des échantillons. Avant de passer à l'étape de rétro-transcription des ARN totaux en ADNc, la quantité d'ARN extrait est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Spectrophotomètre Multi-volume Epoch, BioTek™) et du logiciel Gen5 (BioTek™). Les échantillons d'ARN purifié sont stockés à -80°C.

#### 6.2.2.2. Retro-transcription des ARN totaux en ADNc

La rétro-transcription des ARN totaux en ADNc est réalisée à l'aide du kit « GoScript™ Reverse Transcription System » (PROMEGA) selon les instructions du fournisseur. Dans un micro-tube de 200 µL, un volume correspondant à 500 ng d'ARN est ajouté. La différence de volume en nucléase free water, permettant d'avoir un volume final de 3µL, est ajoutée dans le tube. En parallèle, un mélange d'amorces contenant 1µL d'oligo(dT)<sub>15</sub> primer et 1 µL de random primers (pour un échantillon) est préparé puis 2µL de ce mélange sont ajoutés au tube contenant l'échantillon. Les tubes sont ensuite vortexés et soumis à une centrifugation rapide. Les tubes contenant un volume final de 5µL sont placés dans un incubateur à 70°C pendant 5 min. En parallèle, un mélange de réaction RT (mix RT) est préparé pour un volume final de 15 µL (pour un échantillon) et contient : 4µL de 5X reaction buffer, 2.8 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de PCR Nucleotide Mix (dNTP), 1µL d'RNAsin (20u), 1µL de reverse transcriptase et 5.2 µL de free RNA water. Après l'incubation des tubes à 70°C pendant 5 min, 15 µL du mix RT est ajouté dans chaque tube. Les échantillons sont ensuite incubés dans un thermocycleur pendant 1 h 10 suivant un cycle de température de 25°C pendant 5 min, puis 42°C pendant 60 min et enfin 4°C pendant 5 min. Les ADNc obtenus sont ensuite conservés à -20°C avant d'être analysés par q-PCR.

#### 6.2.2.3. PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative en temps réel ou la q-PCR est une technique permettant de suivre la cinétique d'amplification d'une région d'ADN connue tout au long de la réaction de PCR, l'objectif étant la détermination de la quantité initiale cette portion d'ADN. L'utilisation d'une

molécule fluorescente, le SYBR Green, un agent intercalant de l'ADN, permet de mettre en évidence la présence d'ADN double brin formé lors des cycles de la PCR. Cette molécule ne fluoresce que lorsqu'elle est intégrée entre deux brins d'ADN, ainsi l'intensité de la fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'ADN générée pendant la réaction de PCR.

La réaction de PCR se déroule en plusieurs cycles de 3 étapes (Figure 16):

- **La dénaturation des brins d'ADN (à 95°C)** : cette étape permet la dissociation des deux brins d'ADN complémentaires à haute température ;
- **L'hybridation des amorces** : la diminution progressive de la température jusqu'à 60°C permet la fixation des amorces complémentaires des deux extrémités (5' et 3') de la région à amplifier ;
- **L'élongation** : cette étape qui est réalisée à 72°C, permet, grâce à l'activité de la Taq polymérase, la synthèse du brin complémentaire à partir des amorces hybridées.

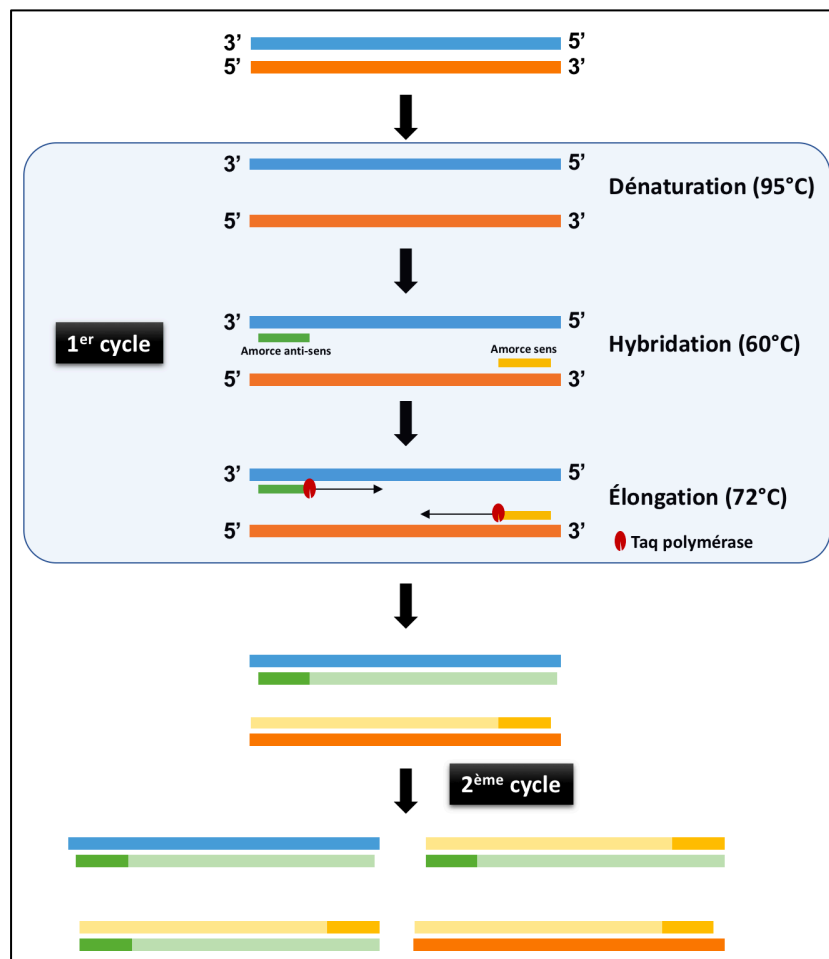


Figure 16. Schéma présentant les différentes étapes de la PCR

Lors de la q-PCR, les échantillons sont soumis à 50 cycles identiques composés de ces 3 étapes. À chaque cycle, le nombre de copies de l'ADN cible est multiplié par 2. Grâce à la mesure de la fluorescence émise par le SYBR Green, le logiciel permet d'établir une courbe d'amplification composée de 3 phases :

- Une première **phase de latence** correspondant au bruit de fond créé par la fluorescence faible émise par le SYBR Green ;
- Suivie d'une **phase exponentielle** résultant du doublement du nombre de copies d'ADN au cours de chaque cycle ;
- Enfin une **phase de plateau** qui résulte de la limitation des capacités de la Taq polymérase.

La fluorescence émise est enregistrée au cours de chaque cycle et représente la quantité d'ADN cible produite en un point précis dans la réaction PCR. Plus la matrice de départ est importante, moins le nombre de cycles nécessaires sera élevé pour atteindre un seuil de fluorescence significativement plus élevé que le bruit de fond. L'intersection entre ce seuil et la courbe d'amplification permet de déterminer le cycle seuil (Ct). Autrement dit, plus l'ADN cible est initialement présent en grande quantité, moins le Ct sera grand. C'est à partir de ce seuil (Ct) que les niveaux d'expression des gènes sont calculés.

### 6.2.3. Gènes étudiés

Pour étudier l'impact des facteurs retenus dans cette thèse sur l'expression de gènes des juvéniles de moule perlière, 19 gènes ont été sélectionnés pour leur rôle dans les réponses à un stress (Tableau XIII). Trois gènes de référence (*rpl7*,  *$\beta$ -actine* et *ef1*) ont initialement été étudiés, cependant seule l'expression du gène *rpl7* s'est avérée stable et ce gène a donc été choisi en tant que gène de référence pour les analyses génétiques présentées dans ce manuscrit. Les couples d'amorces ont été déterminés à partir du transcriptome de *M. margaritifera* qui a été séquencé au sein du laboratoire EPOC (Bertucci et al. 2017).

Tableau XIII. Liste des gènes ciblés, leur fonction biologique associée et les couples d'amorces utilisés pour l'analyse génétique

Fonctions biologiques	Gènes	Séquences des amorces 5'- 3'
<b>Stress oxydant</b>	<i>sod1 (Cu/Zn)</i>	CACCAGCATTGCCAGTTGTC <sup>1</sup> CCTCACAGGGCCAAATTCCA <sup>2</sup>
	<i>sod2 (Mn)</i>	AACACACCCTGCCAGATCTG <sup>1</sup> GATGTTTCTGGTGGTGCAGC <sup>2</sup>
	<i>sod3 (Cu/Zn)</i>	ATTCAGGGCATGCACGTGTA <sup>1</sup> ATTGCCGAAGACTGGGGATG <sup>2</sup>
	<i>cat</i>	TCGGAAGGATGGTGCTCAAC <sup>1</sup> AATGCCAGGGATCATGTGGG <sup>2</sup>
	<b>Mitochondrie</b>	<i>cox1</i>
<i>12s</i>		TAGGGGTATAACCGCGACTG <sup>1</sup> ACCCACAACACCAATGTCCT <sup>2</sup>
<b>Détoxication</b>	<i>mt1</i>	ACCACAGTCACACGAACCAG <sup>1</sup> TGTA CTGGGGACTGCAGATG <sup>2</sup>
	<i>mxr</i>	AGGAGAGGTGAAAGGGGAAA <sup>1</sup> GCATCCAGCAAGATCAAAT <sup>2</sup>
	<i>gstpi</i>	GGTGCCAGCAAAGATGAAT <sup>1</sup> GAAGGCTTCATCTGGAGCAA <sup>2</sup>
<b>Apoptose</b>	<i>casp 3</i>	GCATCTGCAACATCAACACC <sup>1</sup> CTGGCCTTGTAGGAAAACCA <sup>2</sup>
	<i>casp 9</i>	GCCATCCTCCACATTAGCAT <sup>1</sup> TGGTCCAGATGTTGGACAGA <sup>2</sup>
	<i>bak</i>	GGTGTGGCCAGAAAGTTGTT <sup>1</sup> CCCAGTCTCAACACCCTCAT <sup>2</sup>
	<i>bcl2</i>	CAGCAAAGGCATAAACAGCA <sup>1</sup> CGGAGAGATGGGACATAACG <sup>2</sup>
	<i>card11</i>	TGTGGGTGGTAATTGTGTGG <sup>1</sup> GGCTCCGACATTTTATGGA <sup>2</sup>
	<i>p53</i>	CATGAGTCCAGACAGCCAGA <sup>1</sup> GACTGCATGTTGGTGTGAGG <sup>2</sup>
<b>Réparation de l'ADN</b>	<i>rad51</i>	CCCATGGGATTTACAACAGC <sup>1</sup> CTCAATCCCACCTTGGAGAA <sup>2</sup>
	<i>xrcc4</i>	CCAATAAAGCAGGGACCTCA <sup>1</sup> GTCTTTTAGGTCGGGCAACA <sup>2</sup>
<b>Immunité</b>	<i>c3</i>	TCATTTGCTCCAGCGGAAC <sup>1</sup> GCTACAGGCCATTGGGATGT <sup>2</sup>
<b>Traduction</b>	<i>EIF2</i>	ACACCAGAAATGGCCTTGAC <sup>1</sup> TGAGGTCATCAGCAGACAGG <sup>2</sup>
<b>Référence</b>	<i>rpl7</i>	TGGGATGCACTCCATTGATA <sup>1</sup> GATTCGGCTTGAGAGAATGG <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Amorce sens ; <sup>2</sup>Amorce anti-sens

#### 6.2.4. Quantification par q-PCR

Les réactions de PCR ont été réalisées à l'aide du kit « GoTaq® qPCR Master Mix ». Les échantillons d'ADNc obtenus par rétro-transcription de l'ARN, sont dilués à 1/20<sup>ème</sup> dans de l'eau sans nucléases et placés dans des tubes en polypropylène de 200 µL. Dans un autre tube, un mélange d'amorces sens et anti-sens à 10µM pour un gène donné, est dilué au 1/8<sup>ème</sup>. Les réactions sont effectuées dans des microplaques de 96 puits en polypropylène. Dans chaque puits, correspondant à un échantillon pour un gène donné, sont ajoutés 5 µL d'ADNc dilué et 2 µL de mélange d'amorces sens et anti-sens. Enfin, 12.5 µL d'un mélange contenant du SYBR GREEN et la Taq polymerase (GoTaq® qPCR Master Mix, 2X) est ajouté dans chaque puits ainsi que 5.5 µL d'eau sans nucléase. La microplaque est ensuite centrifugée et recouverte d'un film plastique, puis analysée par q-PCR à l'aide du Light Cycler 480 (Roche) afin d'obtenir les cycles seuils (Ct) de chaque échantillon étudié.

#### 6.2.5. Évaluation des niveaux d'expression

Pour évaluer les niveaux d'expression des gènes cibles, leur expression est déterminée par rapport à celle du gène de référence, en l'occurrence celui du gène *rpl7* dans le cas de notre étude. Les gènes de références sont des gènes dont l'expression reste stable, quelles que soient les conditions auxquelles l'organisme a été soumis. Ainsi, les niveaux d'expression d'un gène donné sont évalués à l'aide de la formule suivante :

$$2^{-\Delta Ct} \text{ avec } \Delta Ct = Ct_{\text{gène ciblé}} - Ct_{\text{gène de référence}}$$

Pour comparer les niveaux d'expression des gènes des organismes exposés à des conditions de contamination ou de stress, à des organismes en condition contrôle, le facteur d'induction (FI) est calculé par la formule suivante :

$$FI = \frac{2^{-\Delta Ct \text{ contaminé}}}{2^{-\Delta Ct \text{ contrôle}}}$$

Lorsque  $FI > 1$ , le gène étudié est surexprimé et lorsque  $FI < 1$ , le gène est alors réprimé.

### 6.3. Analyse comportementale

Le développement du protocole d'expérimentation fait l'objet d'une publication en préparation présentée dans le **Chapitre VI**. La mise au point du protocole ainsi que les travaux menés dans cet article, seront présentés de manière succincte dans ce chapitre.

#### 6.3.1. Appareillage et logiciel

L'analyse du comportement des juvéniles de moule perlière a été réalisée à partir d'un système de suivi par vidéo à l'aide du Daniovision (Noldus) et du logiciel Ethovision XT. Ce système est composé d'une chambre observation (Figure 17-A) dotée d'une caméra infrarouge permettant le suivi des organismes dans l'obscurité. La chambre est composée d'un système de bain-marie dans lequel est positionnée une microplaque (6, 12, ou 48 puits) qui permet l'incubation des organismes à la température souhaitée. La température circulant dans le bain-marie peut être contrôlée à l'aide du Daniocooking ou d'un système de régulation thermique (Pilot One, Huber) (Figure 17-B).

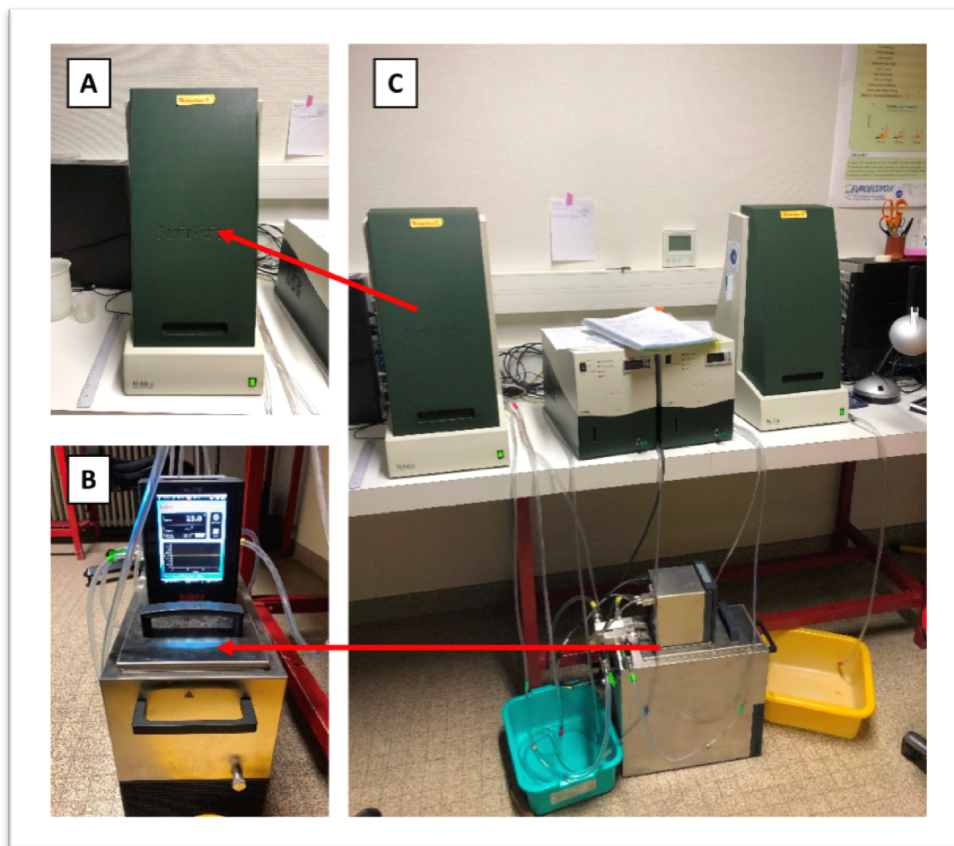
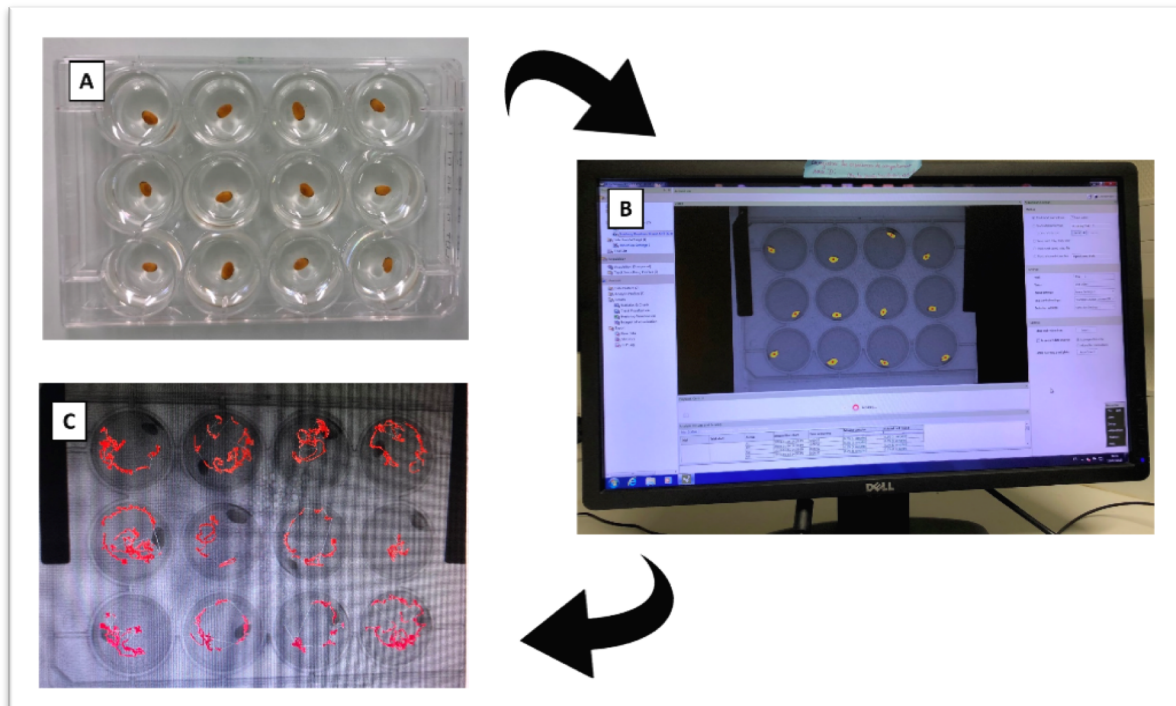


Figure 17. Chambre d'observation Daniovision (A), régulateur thermique Huber (B), dispositif du système pour l'étude du comportement (C).



La chambre d'observation est reliée à un ordinateur permettant d'observer le comportement des organismes à l'aide du logiciel d'analyse vidéo. Pour nos expérimentations, les juvéniles ont été placés dans des microplaques de 12 puits (Figure 18-A). Le logiciel détecte les individus présents dans les micro-puits (Figure 18-B) et l'intégration des données par le logiciel permet d'établir les tracés parcourus par chaque individu (Figure 18-C). Grâce au suivi des organismes, le logiciel permet d'étudier différents paramètres de locomotion tels que la distance parcourue, la vitesse de déplacement, l'immobilité, le comportement natatoire...



**Figure 18.** Microplaque de 12 puits (Longueur x largeur : 10.2 x 7 cm) contenant des juvéniles de moule perlière (A), détection des moules par le logiciel Ethovision XT (B) et tracés des déplacements des individus à la fin d'un enregistrement de 20 min (C)

### 6.3.2. Protocole mis en place

Cette partie porte sur le protocole développé dans cette thèse, dont la mise au point est décrite dans le **Chapitre VI**. Ce protocole a été employé pour les travaux menés dans les **chapitres VI et VII**.

Avant de débiter l'expérience, l'eau du bain marie accueillant la microplaque dans la chambre d'observation est mise à la température souhaitée. Les juvéniles sont délicatement placés dans une microplaque de 12 puits à raison d'un individu par puits contenant 3mL d'eau dans laquelle ils ont été exposés (témoin ou contaminée). La microplaque est placée dans la

chambre d'observation et le logiciel est programmé selon les conditions suivantes : enregistrement de 30 min ou 40 min au total avec une première période de 10 min dans l'obscurité pour l'acclimatation des individus, suivi d'une période d'exposition à la lumière de 20 min (**Chapitre VI**) et d'une dernière phase d'obscurité de 10 min (**Chapitre VII**).

Le choix de ces différentes périodes s'est porté sur les mises au point effectuées et présentées dans le **chapitre IV**.

## **7. Dosage des contaminants**

### **7.1. Métaux traces**

#### **7.1.1. Prélèvement et stockage des échantillons d'eau**

Les échantillons sont récoltés dans des tubes eppendorf de 2mL. Afin d'éviter l'adsorption des métaux sur les parois des tubes, les échantillons sont directement acidifiés à 10% avec de l'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$  à 65%, Sigma Aldrich). Les échantillons sont ensuite stockés à 4°C jusqu'au moment du dosage. En fonction des concentrations en métaux attendues dans les échantillons récoltés, le choix de l'appareil de dosage se porte sur leur limite de quantification. Pour les grandes gammes de concentrations, les échantillons sont dosés par spectrométrie d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-OES). À l'inverse, pour plus de précision, les échantillons en concentrations faibles sont mesurés par spectrométrie d'absorption atomique (SAA).

#### **7.1.2. Dosage par ICP-OES**

L'ICP-OES est une technique analytique permettant de quantifier plusieurs éléments métalliques à la fois, présents dans un échantillon liquide. Les échantillons solides (dosage dans les tissus des organismes par exemple), doivent subir une digestion par l'acide, en d'autres termes subir une minéralisation avant d'être mis en solution. Le principe de cette technique repose sur la vaporisation de l'échantillon au cœur d'un plasma induit d'argon et soumis à de très hautes températures. L'excitation thermique des ions dans le plasma, conduit à une émission de lumière par ces ions excités. Chaque élément émet des longueurs d'onde caractéristiques qui sont identifiées et mesurées par un spectromètre à émission optique. La concentration en élément métallique présent dans l'échantillon est alors déterminée par comparaison à l'intensité émise par le même élément contenu dans un étalon standard, traité

dans les mêmes conditions. Dans cette étude le dosage des éléments traces métalliques est effectué à l'aide de l'ICP-EOS 700 series (Agilent). Le dosage par ICP-OES a été réalisé par la plateforme « majeurs et métaux traces » du laboratoire EPOC sous la direction de P-Y.Gourves et E. Dassie.

### **7.1.3. Dosage par SAA (Four graphite)**

La spectroscopie d'absorption atomique, contrairement à l'ICP-EOS, ne permet de doser qu'un seul élément à la fois. En effet, cette technique repose sur le principe d'absorbance de la lumière d'une longueur d'onde spécifique, par un élément atomisé qui passe de l'état fondamental à un état excité. Chaque élément absorbe la lumière à une certaine longueur d'onde qui est émise par une lampe cathode qui lui est spécifique : Al à 396.2 nm, As à 193.7 nm, Cd à 228.8 nm et Cu à 324.8 nm. L'échantillon liquide est injecté dans un four graphite puis, chauffé électrothermiquement à travers différentes étapes de chauffage permettant l'atomisation de l'échantillon, c'est-à-dire la transformation de l'échantillon liquide en atomes libres. L'élément atomisé et excité, va alors absorber l'énergie lumineuse émise par la lampe.

La quantité d'énergie lumineuse absorbée par les atomes libres est alors mesurée par un détecteur et est proportionnelle à la concentration de l'élément présent dans l'échantillon. Les valeurs d'absorbance sont comparées à celle d'un étalon standard et permet ainsi d'obtenir les concentrations en élément dans nos échantillons. Dans cette étude, l'appareil utilisé pour le dosage des ETMs est effectué à l'aide du spectromètre à absorption atomique 240Z AA (Agilent).

## **7.2. Nutriments**

Le dosage des nutriments a été réalisé au sein du laboratoire EPOC dans l'équipe ECOBIOC et sous la direction de M-A. Cordier.

### **7.2.1. Prélèvement et stockage des échantillons**

Les échantillons, à raison de 10 mL, sont récoltés au sein des unités d'expérimentation et filtrés à 0.45 µm avant d'être placés dans des tubes en plastique de 15 mL. La filtration des échantillons d'eau est réalisée afin d'éviter l'obstruction des micro-tuyaux lors du dosage des

nutriments. Pour maintenir la qualité des échantillons et éviter la décomposition des nutriments, ceux-ci sont ensuite conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'étape de dosage.

### 7.2.2. Dosage des nitrates

Le dosage des nitrates dans les échantillons est réalisé par analyse en flux continu par segmentation à l'aide du QuAAtro (SEAL-Analytical). Le principe de cet appareil consiste à doser indirectement les concentrations en nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) à partir du dosage des nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) suite à une réaction colorimétrique. La totalité des  $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$  est initialement dosée puis les  $\text{NO}_3^-$  sont réduits en  $\text{NO}_2^-$  à travers une colonne cadmium (colonne réductrice). La différence permet d'obtenir les concentrations en  $\text{NO}_3^-$  dans nos échantillons.

### 7.2.3. Dosage des ortho-phosphates

Le dosage des ortho-phosphates dans les échantillons d'eau est également réalisé par analyse en flux continu par segmentation à l'aide de l'AA3 (AutoAnalyzer 3, SEAL-Analytical). Comme pour les nitrates, la mesure des  $\text{PO}_4^{3-}$  est basée sur un dosage colorimétrique. Deux mélanges de réactifs sont préparés :

- Réactif 1 : acide ascorbique + dodécylsulfate de sodium, permettant de fluidifier et d'acidifier le milieu de réaction
- Réactif 2 : ammonium heptanolybdate + potassium antimoine (qui va former un couple) + acide sulfurique pour acidifier le milieu réactionnel.

L'échantillon est additionné de ces réactifs qui entraînent la formation d'un complexe (phospho-molybdenumcomplexe) par réduction. C'est ce complexe qui est mesuré à 880 nm par les détecteurs colorimétriques qui permettent de déterminer les concentrations en  $\text{PO}_4^{3-}$  de nos échantillons.

## 8. Analyses des données et statistiques

Toutes les expérimentations effectuées dans ce travail ont été répliquées au minimum 3 fois, avec chaque réplikat considéré comme un échantillon indépendant. Les données présentées dans ce rapport sont exprimées par des moyennes  $\pm$  l'écart-type (ET ou SD) ou dans certains cas, par des moyennes  $\pm$  l'erreur-standard (ES ou SE). Les seuils de toxicité (CE50 et CE10) ainsi que leurs intervalles de confiance, ont été déterminés à partir de la méthode

décrite par Ritz 2010 et à l'aide du logiciel RStudio (v.1.1.442). Pour comparer les données obtenues pour l'expression des gènes (exprimée en facteur d'induction dans cette thèse), l'analyse statistique a été réalisée sur l'expression relative des gènes par rapport au gène de référence ( $\Delta Ct$ ). La comparaison des moyennes est réalisée par une analyse des variances. Pour cela, la normalité de la distribution des données a été vérifiée graphiquement sur les résidus des données. L'homoscédasticité des variances a ensuite été évaluée à l'aide du test de Levène pour lequel l'homogénéité des données est vérifiée lorsque  $p > 0.05$ . Lorsque ces deux paramètres sont vérifiés, l'analyse des variances est réalisée à l'aide du test paramétrique ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey. Dans le cas où l'un des deux paramètres n'est pas vérifié, un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis est alors utilisé pour comparer les données, suivi d'un test post-hoc de Dunn (correction de bonferroni).

## **9. Expérimentations mises en place dans ce manuscrit**

En raison du nombre important d'expérimentations mises en place dans ce manuscrit et pour une meilleure visualisation des différents travaux menés dans cette thèse, une liste répertoriant toutes les expérimentations ainsi que les conditions permettant de les différencier les unes des autres, a été réalisée et est présentée dans le tableau XIV.

**Tableau XIV.** Liste des expérimentations mises en place dans cette étude.

Chapitre	Âge des juvéniles	Cohorte	Expériences	Facteurs étudiés	Présence de substrat	Durée de l'exposition	Nb. de conditions	Nb. de réplicat/condition	Température d'exposition	Critères d'évaluation	Eau de culture
III	22 mois	1	Test de toxicité aiguë	NaCl	Non	96 h	Tem + 5 conta	4	16°C	Mobilité	Dronne
III	22 mois	1	Test de toxicité aiguë	NaCl	Oui	96 h	Tem + 5 conta	4	16°C	Mobilité	Dronne
III	22 mois	1	Test de toxicité aiguë	Cd	Non	96 h	Tem + 5 conta	4	16°C	Mobilité	Dronne
III	22 mois	1	Test de toxicité aiguë	Cd	Oui	96 h	Tem + 5 conta	4	16°C	Mobilité	Dronne
III	16 mois	1	Test de toxicité aiguë	Cd	Oui	96 h	Tem + 5 conta	4	16°C	Mobilité	Dronne
III	17 mois	1	Test de toxicité aiguë	As	Oui	96 h	Tem + 5 conta	4	16°C	Mobilité	Dronne
III	28 mois	1	Test de toxicité aiguë	Al	Oui	96 h	Tem + 5 conta	4	16°C	Mobilité	Dronne
III	13 mois	1	Test de toxicité aiguë	Nitrates	Oui	96 h	Tem + 5 conta	4	16°C	Mobilité	Dronne
III	13 mois	1	Test de toxicité aiguë	Phosphates	Oui	96 h	Tem + 5 conta	4	16°C	Mobilité	Dronne
III	3 jours	2	Test de toxicité aiguë	Cd	Non	96 h	Tem + 5 conta	3	16°C	Mobilité	Reconstituée
III	3 jours	2	Test de toxicité aiguë	As	Non	96 h	Tem + 5 conta	3	16°C	Mobilité	Reconstituée
III	3 jours	2	Test de toxicité aiguë	Al	Non	96 h	Tem + 5 conta	3	16°C	Mobilité	Reconstituée
III	3 jours	2	Test de toxicité aiguë	Nitrates	Non	96 h	Tem + 5 conta	3	16°C	Mobilité	Reconstituée
III	3 jours	2	Test de toxicité aiguë	Phosphates	Non	96 h	Tem + 5 conta	3	16°C	Mobilité	Reconstituée
III	3 jours	2	Test de toxicité aiguë	Nickel	Non	96 h	Tem + 5 conta	3	16°C	Mobilité	Reconstituée
III	3 jours	2	Test de toxicité aiguë	Cuivre	Non	96 h	Tem + 5 conta	3	16°C	Mobilité	Reconstituée
IV	17 mois	1	Test de toxicité chronique	As	Oui	21 j	Tem + 2 conta	3	16°C	Mobilité/Bioaccumulation/ expression génétique	Dronne
IV	16 mois	1	Test de toxicité chronique	Cd	Oui	21 j	Tem + 2 conta	3	16°C	Mobilité/Bioaccumulation/ expression génétique	Dronne
V	14 mois	1	Test de toxicité sub-aigüe	Nitrates seuls, phosphates seuls, Nitrates + phosphates	Oui	96 h	Tem + 12 conta	4	16°C et 22°C	Mobilité et expression génétique	Dronne
V	32 mois	1	Test de toxicité chronique	Nitrates seuls, phosphates seuls, Nitrates + phosphates	Oui	21 j	Tem + 6 conta	3	16°C	Mobilité et expression génétique	Dronne
V	19 mois	1	Test chronique	Sans contaminants	Oui	14 j	3 températures	3	16°C, 22°C et 26°C	Mobilité et expression génétique	Dronne
VI	37 mois	1	Test comportement témoin	Sans contaminants	Non	0	Témoins	3	16°C	Mobilité et comportement	Dronne
VI	34 mois	1	Test comportement NaCl	NaCl	Non	24 h	Tem + 2 conta	3	16°C	Mobilité et comportement	Dronne
VII	38 mois	1	Test de toxicité chronique multistress	Nitrates, Phosphates, arsenic, cuivre, aluminium	Oui	14 j	Tem + 1 conta	3	16°C, 26°C et 30°C	Mobilité/Bioaccumulation/ expression génétique/Comportement	Dronne

---

## **CHAPITRE III. Toxicité aigüe de différents éléments traces métalliques et des nutriments sur les juvéniles de moule perlière**

Ce chapitre concerne l'étude de la toxicité aigüe de nutriments responsables de l'eutrophisation des milieux aquatiques et de contaminants métalliques sur les jeunes stades de vie de la moule perlière. Ces travaux font l'objet de deux articles scientifiques, dont l'un a été publié dans *Environments* en juin 2020 et l'autre est actuellement en attente de soumission. L'objectif de ces deux articles a été de déterminer la sensibilité des jeunes moules, notamment par la détermination des seuils de toxicité, puisque ces données sont absentes dans la littérature. En effet, de par son statut d'espèce en danger critique d'extinction en Europe, les études en laboratoire sur ces jeunes stades sont rares voire inexistantes. A notre connaissance, seule une étude écotoxicologique a été réalisée en laboratoire sur des juvéniles de moule perlière (Taskinen et al. 2011). Bien que les études écotoxicologiques en laboratoire sur les moules adultes soient tout autant rares (Bertucci et al. 2017; Baudrimont et al. 2020), le stade juvénile est considéré comme le stade le plus sensible de l'espèce. C'est dans cette optique que ces travaux ont été réalisés sur des juvéniles de moule perlière âgés de 3 jours à 28 mois, qui ont été élevés en captivité à la ferme aquacole de Firbeix.



## 1. Article 1: Sensitivity of newly transformed juveniles of the freshwater pearl mussel: *Margaritifera margaritifera* (L.1758) to acute toxicity of a wide range of contaminants

Tiare BELAMY<sup>1</sup>, Magalie BAUDRIMONT<sup>1</sup>, Marie-Ange Cordier<sup>1</sup>, Émilie DASSIE<sup>1</sup>, Pierre-Yves GOURVES<sup>1</sup>, Alexia LEGEAY<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univ. Bordeaux, CNRS, EPOC, EPHE, UMR 5805, F-33600 Pessac, France

Corresponding author: Alexia LEGEAY, alexia.legeay@u-bordeaux.fr

### Abstract

The freshwater pearl mussel (FWPM) *Margaritifera margaritifera* (L.1758) is a bivalve mollusk critically endangered in Europe. There is a special concern about the conservation of this species, but little is known about its sensitivity to environmental pollution. Here, acute toxicity tests were conducted at 16°C according to a standard guide for conducting toxicity tests on freshwater mussels (ASTM E2455 2006), in order to assess toxicity thresholds for As, Al, Cd, Cu, Ni, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> on newly transformed juveniles of *M. margaritifera*. The sensitivity of the species ranged as follow with LC50s of 29 µgCd/L, 33 µgCu/L, 100 µgNi/L, 1081 mgNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, over 130 µgAs/L, over 693 µgAl/L and over 5.68 mgPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L. The comparison with toxicity data for other newly transformed freshwater mussel juveniles from the same family and superfamily, Margaritiferidae and Unionidae, showed that FWPM juveniles were the most sensitive species to NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and Ni, the least sensitive species to Cd and showed an intermediate sensitivity to Cu compared to other freshwater mussels. This study is the first to provide toxicity thresholds for several pollutants on newly transformed juveniles of the FWPM. This brings new knowledge on its sensitivity to environmental pollution that could be helpful data for conservation strategies and these findings represent the first window for further complex studies.

**Keywords:** Newly transformed juveniles, nutrients, trace metals, sensitivity, acute toxicity test

## 1.1. Introduction

Freshwater mussels are important components in aquatic ecosystems since they provide ecosystem services which are essential for aquatic organisms (Vaughn and Hakenkamp 2001; Vaughn et al. 2008). Indeed, mussels are known to have an important role in ecosystem process such as the primary and secondary production, the nutrient cycling, the filtration of the water and the sedimentation rates (Strayer et al. 1999; Vaughn and Spooner 2006; Vaughn et al. 2008; Haag 2012; Strayer 2014; Boeker et al. 2016; Lummer et al. 2016). Moreover, mussel shells provide important substrate or habitat for other freshwater organisms (Vaughn and Hakenkamp 2001; Vaughn et al. 2008; Haag 2012). Consequently, freshwater mussels are considered either as indicator, keystone or umbrella species depending on their ecological functions which are influencing other organisms as well as providing indirect benefits for humans (Haag 2012). Interestingly, the freshwater pearl mussel (FWPM), *Margaritifera margaritifera*, partly met all these characteristics in addition of being a flagship species (Geist 2010), which highlights the importance of focusing research efforts on the FWPM. Freshwater mussels have a complex life cycle that includes an obligate parasitic stage during which the larvae (also called glochidium) must attach to a suitable host in order to allow glochidium metamorphosis into juvenile stage (Barnhart et al. 2008; Haag 2012). Juvenile stage starts at the moment when metamorphosed glochidia fall from the gills of the fish to settle in the river bottom, until they reach the sexual maturity after 10 to 15 years (Skinner et al. 2000). Otherwise, post parasitic juveniles, also called newly transformed or freshly excysted juveniles (aged of several days), are suggested to be the most critical stage of the FWPM (Geist and Auerswald 2007; Geist 2010).

Although this fascinating life trait history and while being ecological relevant species, freshwater mussels are considered to be one of the most imperiled groups of animals worldwide (Bogan 1993; Lydeard et al. 2004; Strayer et al. 2004). Among them, the FWPM is one of the most threatened freshwater species in Europe (Bogan 1993; Young et al. 2001; Lopes-Lima et al. 2016). The causes of the decline are manifold and could be related to over exploitation, habitats modification, water quality degradation, climate change, introduction of non-native species, the decline in fish host population and pollution (Bogan 1993; Young et al. 2001; Strayer et al. 2004; Lopes-Lima et al. 2016; Lopes-Lima et al. 2018). However, due to its complex life cycle including a long-life span and because it is a filter-feeding species, the FWPM might be greatly sensitive to habitat modification and to water quality perturbations

notably by the presence of contaminants (Bogan 1993; Naimo 1995; Lydeard et al. 2004; Milam et al. 2005). Moreover, environmental pollution has been identified as a major threat to freshwater mussel populations (Bauer 1988; Bogan 1993; Young et al. 2001; Strayer et al. 2004; Lopes-Lima et al. 2018). Nevertheless, little is known about the sensitivity of the FWPM to environmental factors and especially for early life stage which appears to be the most sensitive stage of the species (Geist and Auerswald 2007; Geist 2010). Therefore, it is necessary to improve our knowledge about their range of sensitivity to contaminants in order to help finding the best conservation strategies for this species. In this context, the present study is part of a European LIFE Project (LIFE 13 NAT/FR/000506) which aims to preserve the largest French population of *M. margaritifera* living in the Dronne river, accounting for 15% of the total French population of FWPM (Cochet and Gouilloux 2004). A facility farm has been set up in Firbeix (southwest of France) in order to produce juveniles of FWPM, a subpopulation which is reintroduced in the Dronne river or used for ecotoxicological studies. Here, we wanted to provide the first toxicity data on early life stages of the FWPM. The aim of this study was therefore to assess toxicity thresholds for nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), phosphates ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), cadmium (Cd), arsenic (As), aluminum (Al), nickel (Ni) and copper (Cu) on freshly excysted juveniles (aged of less than three days) of FWPM using a standard guide for conducting toxicity test with freshwater mussels (ATSM 2006). As and Al were chosen according to levels found in the Dronne river whereas Cd was chosen because low levels of this trace metal were found to affect FWPM adults (Baudrimont et al. 2020). Nutrients were employed because they were reported to be important factors affecting FWPM populations (Bauer 1988; Moorkens 2006). Ni and Cu were chosen because they were component of organic contaminants that may be found in agricultural runoffs. This study will allow providing the first toxicity data on newly transformed juveniles of the endangered FWPM and will therefore allow improving our knowledge about its sensitivity to environmental pollution.

## **1.2. Materials and methods**

### **1.2.1. Freshly excysted juveniles**

Juvenile mussels (*M. margaritifera*) were produced *in vivo* using the brown trout (*Salmo trutta*) as the fish host at Firbeix captive rearing facility situated near the Dronne river (southwest of France). After juvenile mussels were excysted from fish host gills, they were collected and hold in 300 mL plastic box containing the Dronne river water. For our

experiments, organisms were transferred to the Aquatic Ecotoxicology laboratory of Bordeaux (France), about 200 miles away from the rearing facility, in a cool box with frozen gel packs ensuring a temperature of about 12°C. Once in the laboratory, the plastic box was placed in 16°C chamber in order to gradually acclimate organisms to the test temperature and young mussels were fed with a mixture of viable freshwater algae (*Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris* and *Stichococcus bacillaris*) cultivated in the laboratory. All organisms used for experiments came from the same cohort produced in 2018 and were 3 days old at the start of the experiment.

### **1.2.2. Acute toxicity test**

96-h acute toxicity tests were conducted according to the standard guide for conducting laboratory toxicity tests with freshwater mussels (ASTM E2455 2006) in order to assess the lethal concentrations LC50 and LC10 corresponding to the concentration of contaminant that killed 50% and 10% of the population studied, respectively. Before the start of the test, freshly excysted juveniles were acclimatized for six hours to the reconstituted soft water as describe by (ASTM E729 2002). Indeed, according to (ASTM E2455 2006), juvenile mussels were holding for two hours first, in a 50 to 50 mixture of Dronne river water to reconstituted soft water and then in a 25 to 75 mixture of Dronne river water to reconstituted soft water, followed by a transfer into 100 % reconstituted soft water until the start of the toxicity test. Experiments were conducted 24 hours after the acclimation period. Each test consisted of three replicates at each of five exposure concentrations, plus a control. Tests were conducted in 50 mL plastic petri dishes (94 mm diameter x 16 mm height) containing 25 mL of test solution without a substrate. Tests were performed in a 16°C chamber with 16L: 8D photoperiod. Before the start of the test, juvenile's viability was assessed by checking the movement of mussel's feet within 5 minutes under binocular microscope, then mussels were randomly placed in each experimental unit by a number of ten (corresponding to thirty juveniles per exposure condition). Juvenile's viability was also assessed at 96 hours and individuals showing no movement for 5 minutes were recorded as dead. During the tests, water was not renewed, and organisms were not fed. The test acceptability criterion was control survival > 90%.

### 1.2.3. Water quality and chemical analyses

Toxicants were used as follow: Reagent-grade salts dissolved in de-ionized water for nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) as sodium nitrate ( $\text{NaNO}_3$ , 99.5% purity; PROLABO, Paris, FRANCE) and ortho-phosphates ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) as sodium phosphate dibasic ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 99% purity; Sigma Aldrich). Metal solutions were obtained from Merck with cadmium as  $\text{CdCl}_2$ , arsenic as  $\text{As}_2\text{O}_5$ , aluminum as  $\text{AlCl}_3$ , copper as  $\text{CuCl}_2$  and nickel as  $\text{NiCl}_2$ , all in  $\text{H}_2\text{O}$ . Cd exposure concentrations were measured by Atomic Adsorption Spectrometry (SAA 240Z Agilent) whereas As, Al, Cu and Ni exposure concentrations were measured using Inductively Coupled Plasma Optical Spectrometry (ICP-OES 700 series, Agilent). For metal concentration determinations, water samples were acidified at 10% with 65% nitric acid ( $\text{HNO}_3$ , Merck) directly after each sample collection. Detection limits were 1.5  $\mu\text{g/L}$ , 3.4  $\mu\text{g/L}$ , 0.33  $\mu\text{g/L}$ , 1.6  $\mu\text{g/L}$  and 1.2  $\mu\text{g/L}$  for Al, As, Cd, Cu and Ni respectively. Nutrients as nitrates and phosphates, were measured by gas-segmented continuous flow analysers (SFA) for the determination of dissolved nutrients (AA3-HR, SEAL ANALYTICAL) for phosphates and QuAAtro (QuAAtro, SEAL ANALYTICAL) for nitrates. The quantification limits were 0.21  $\mu\text{mol/L}$  (0.013  $\text{mg/L}$ ) and 0.005  $\mu\text{mol/L}$  (0.002  $\text{mg/L}$ ) for nitrates and phosphates, respectively. Water physico-chemistry was checked as recommended by (ASTM E2455 2006), at the beginning and at the end of each test in control, low, medium and high exposure conditions, using measuring cells (WTW, Germany): Profiline Oxi 3205 for dissolved oxygen, Profiline pH 3110 for pH and Profiline Cond 3110 for temperature and conductivity. Mean values for water quality parameters were calculated on the mean of measurements of all condition exposure concentrations at the beginning and the end of each test. Nominal concentrations tested were as follow: 0, 120, 250, 500, 750 and 1000  $\mu\text{g/L}$  for Al ; 0, 15, 30, 60, 80 and 120  $\mu\text{g/L}$  for As and Cd; 0, 40, 60, 80, 100 and 120  $\mu\text{g/L}$  for Cu ; 0, 100, 200, 400, 500 and 600  $\mu\text{g/L}$  for Ni; 0, 128, 256, 512, 1024 and 2048  $\text{mg/L}$  for  $\text{NO}_3^-$  and 0, 0.2, 1, 2, 4, 6  $\text{mg/L}$  for  $\text{PO}_4^{3-}$ . Mean measured concentrations were calculated on the mean of measurements at the start and at the end of the experiment. These exposure concentrations were chosen according to levels found in the Dronne river for As and Al and according to toxicity data on freshwater mussels found in the literature for nutrients, Cd, Ni and Cu (Wang, Christopher G. Ingersoll, et al. 2007; Douda 2010; Soucek and Dickinson 2012; Wang et al. 2017; Wang et al. 2020; Nakamura et al. 2020).

### 1.2.4. Data analysis

Statistical analyses were performed using RStudio version 1.1.442. Median lethal concentrations were calculated on measured concentrations for all toxicants and nutrients. Those toxicity thresholds were assessed with a three parameters log – logistic model according to (Ritz 2010), allowing us to obtain where possible, toxicity thresholds (LC50) and (LC10), and corresponding to 95% confident intervals. Survival data for each exposure condition was compared to control. Values were first converted from percentage to arcsin, then normality and homoscedasticity were checked and validated using Levene test. Statistical differences were assessed by parametric test as two-way ANOVA with post-hoc analysis using Tukey test.

## 1.3. Results

### 1.3.1. Water physico-chemistry

Table XV shows mean values (standard deviation), minimum and maximum values, for water quality characteristics in all acute toxicity tests. Mean values of pH and dissolved oxygen in all acute toxicity tests were closed and ranged from 7.54 to 8.07 for pH and were over 6.5 mg/L for dissolved oxygen in all experiments. Mean conductivity values were closed to 160  $\mu\text{S}/\text{cm}$  in all acute toxicity tests except for nitrate test, for which mean conductivity was 1317  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Indeed, maximum value measured was 3660  $\mu\text{S}/\text{cm}$  in the highest concentration exposure to nitrate (2048 mg  $\text{NO}_3^-/\text{L}$ ).

Tableau XV. Mean ( $\pm$ SD) values for water quality parameters (pH, Conductivity and Dissolved oxygen) in acute toxicity exposure to Al, As, Cd, Cu, Ni,  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  on three days old *M. margaritifera* juveniles at 16°C.

Toxicants or nutrients	pH			Conductivity ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )			Dissolved oxygen (mg/L)		
	Mean (SD)	Min value <sup>a</sup>	Max value <sup>a</sup>	Mean (SD)	Min value <sup>a</sup>	Max value <sup>a</sup>	Mean (SD)	Min value <sup>a</sup>	Max value <sup>a</sup>
Aluminium	7.92 (0.30)	7.40	8.30	165.2 (4.8)	159.3	175.2	6.61 (0.43)	6.32	7.62
Arsenic	8.07 (0.11)	7.84	8.19	163.8 (5.5)	158.3	172.3	6.76 (0.56)	6.27	7.69
Cadmium	7.72 (0.31)	7.23	8.18	163.6 (2.0)	159.3	165.8	6.57 (0.21)	6.36	7.01
Cuivre	7.54 (0.43)	7.02	8.25	160.6 (1.5)	158.8	162.9	6.63 (0.21)	6.25	6.91
Nickel	7.78 (0.21)	7.60	8.25	163.6 (4.5)	159.0	172.8	6.64 (0.44)	6.25	7.60
Nitrates	7.84 (0.30)	7.45	8.25	1317 (1474)	160.5	3660	6.63 (0.24)	6.25	6.92
Phosphates	7.55 (0.32)	7.26	8.25	165.9 (7.5)	159.7	180.9	6.62 (0.35)	6.13	7.12

<sup>a</sup>Correspond to the minimum or the maximum value measured in all exposure conditions for each contaminant studied;

### 1.3.2. Mean measured exposure concentrations

Mean measured concentrations in each exposure conditions and percent nominal exposure concentrations for all contaminants are presented in table XVI. Values of percent nominal concentrations were calculated on the mean percentages of nominal concentrations for average measured concentrations at the beginning and the end of each toxicity test. High variability for highest concentrations tested for aluminum (313 µg Al /L ± 96; 546 µg Al /L ± 178; 693 µg Al /L ± 233) could be explained by the high nebulization and adsorption of this contaminant during the experimentation. Indeed, at the end of the toxicity test, measured Al concentrations were reduced by two compared to concentrations measured at the beginning of the experiment. Al measured concentrations in all exposure conditions were between 63 and 89 % of nominal concentrations. For all other contaminants listed in this table, measured concentrations were closed to nominal exposure concentrations since percent nominal exposure concentrations were close to 100% (Table XVI).

Tableau XVI. Mean measured concentrations ± SD and percent nominal exposure concentrations of Al, As, Cd, Cu, Ni, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> for each condition exposure in acute toxicity tests conducted on 3 days old juveniles of *M. margaritifera*.

Toxicants or nutrients	Units	Exposure conditions						Percent nominal exp. conc. <sup>b</sup>
		Control	Low	Med-low	Medium	Med-high	High	
Aluminium	µg/L	10 ± 13	106 ± 3	200 ± 25	313 ± 96	546 ± 178	693 ± 233	63 - 89
Arsenic	µg/L	<LD <sup>a</sup>	<LD <sup>a</sup>	31.2 ± 2.5	64.8 ± 11.5	79.1 ± 1.8	130 ± 1	99-108
Cadmium	µg/L	0.14 ± 0.02	15.9 ± 2.8	25 ± 0.9	68.4 ± 18.7	85.9 ± 31.7	171 ± 13	83-142
Cuivre	µg/L	0.6 ± 1.5	39.1 ± 1.8	59.8 ± 1.9	74.9 ± 3.9	94.9 ± 4.2	110 ± 5	92 - 100
Nickel	µg/L	0	95 ± 3	190 ± 4	380 ± 9	458 ± 17	555 ± 9	92 - 95
Nitrates	mg/L	0	118 ± 38	275 ± 4	523 ± 5	1106 ± 25	2076 ± 17	92 - 108
Phosphates	mg/L	0	0.19 ± 0.01	0.93 ± 0.01	1.80 ± 0.08	3.67 ± 0.24	5.68 ± 0.36	90 - 96

<sup>a</sup>Limit detection for As : <6.8 µg/L

<sup>b</sup>Percent nominal exposure concentration

### 1.3.3. Median lethal concentrations

Survivorship in control exposure for all acute toxicity tests met the acceptability criterion which was percentage viability in control condition > 90% according to the ASTM

2006. Table XVII summarizes lethal concentrations (LC50 and LC10) expressed as measured concentration values and mean percentage viability ( $\pm$  SD) for each exposure condition assessed in 96 hours acute toxicity tests. 96h-LC50s with confident intervals (IC 95%) were assessed for Cd: 29 (24-34)  $\mu\text{g/L}$ ; for Cu: 33 (29 – 36)  $\mu\text{g/L}$ ; for Ni: 100 (94 – 105)  $\mu\text{g/L}$  and for nitrate: 1081 (901 – 1260)  $\text{mg/L}$ . Median lethal concentrations for Al, As and  $\text{PO}_4^{3-}$  were over the highest concentrations tested. Indeed, juvenile's viability was affected from 79  $\mu\text{gAs/L}$  with  $83 \pm 6$  % percentage viability ( $p < 0.05$ ). For Al and  $\text{PO}_4^{3-}$ , statistical analysis showed no difference in percentage viability at highest concentration tested compared to control condition ( $93 \pm 6$  % and  $77 \pm 21$  for Al and  $\text{PO}_4^{3-}$  respectively). However, LC50 for those contaminants are higher than the highest concentration tested (693  $\mu\text{g/L}$  for Al, 130  $\mu\text{g/L}$  for As and 5.68  $\text{mg/L}$  for  $\text{PO}_4^{3-}$ ). Rank sensibility of freshly excysted juveniles of *M. margaritifera* according to toxicants or nutrients studied in this study was as follow  $\text{Cd} > \text{Cu} > \text{Ni} > \text{NO}_3^-$ . Moreover, LC10s were 14 (9-19)  $\mu\text{g/L}$  for Cd, 21 (15-27)  $\mu\text{g/L}$  for Cu, 65 (52-78)  $\mu\text{g/L}$  for Ni, and 605 (288-923)  $\mu\text{g/L}$  for  $\text{NO}_3^-$ . These values for Al and  $\text{PO}_4^{3-}$  could not be assessed since no statistical differences were found for the highest concentrations studied compared to controls. For As, the data did not allow to assess the confidence interval (IC95%) for LC10, which was 32  $\mu\text{gAs/L}$ .

**Tableau XVII.** Median lethal concentrations and sublethal thresholds (IC95%) for survival of 3 days old juveniles of *M. margaritifera* and mean percentage viability for each exposure conditions in Al, As, Cd, Cu, Ni,  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  in 96 hours acute toxicity tests.

Toxicants or nutrients	Units	96-h LC10 (IC 95%)	96-h LC50 (IC 95%)	Mean percentage viability (% $\pm$ SD) in each exposure condition					
				Control	Low	Med-low	Medium	Med-high	High
Aluminium	$\mu\text{g/L}$	-	> 693 <sup>b</sup>	100	100	100	93 $\pm$ 11	90 $\pm$ 10	93 $\pm$ 6
Arsenic	$\mu\text{g/L}$	32 <sup>a</sup>	>130 <sup>b</sup>	100	93 $\pm$ 6	90 $\pm$ 10	87 $\pm$ 6	83 $\pm$ 6*	83 $\pm$ 6*
Cadmium	$\mu\text{g/L}$	14 (9-19)	29 (24-34)	100	80 $\pm$ 17	63 $\pm$ 11*	7 $\pm$ 6*	0*	0*
Cuivre	$\mu\text{g/L}$	21 (15-27)	33 (29 - 36)	100	30 $\pm$ 10*	7 $\pm$ 6*	0*	0*	0*
Nickel	$\mu\text{g/L}$	65 (52-78)	100 (94 - 105)	100	57 $\pm$ 11*	3 $\pm$ 6*	0*	0*	0*
Nitrates	$\text{mg/L}$	605 (288-923)	1081 (901 - 1260)	100	90 $\pm$ 10	80 $\pm$ 10	87 $\pm$ 11	43 $\pm$ 15*	7 $\pm$ 6*
Phosphates	$\text{mg/L}$	-	> 5.68 <sup>b</sup>	100	100	97 $\pm$ 6	83 $\pm$ 6	80 $\pm$ 10	77 $\pm$ 21

\*Indicates statistical difference with control (ANOVA  $p < 0.05$ )

<sup>a</sup>Data did not allowed to assess confidence interval

<sup>b</sup>Insufficient mortality for assessing median lethal concentration - LC10s could not be assessed



### 1.3.4. Sensibility compared to other freshwater mussel juveniles

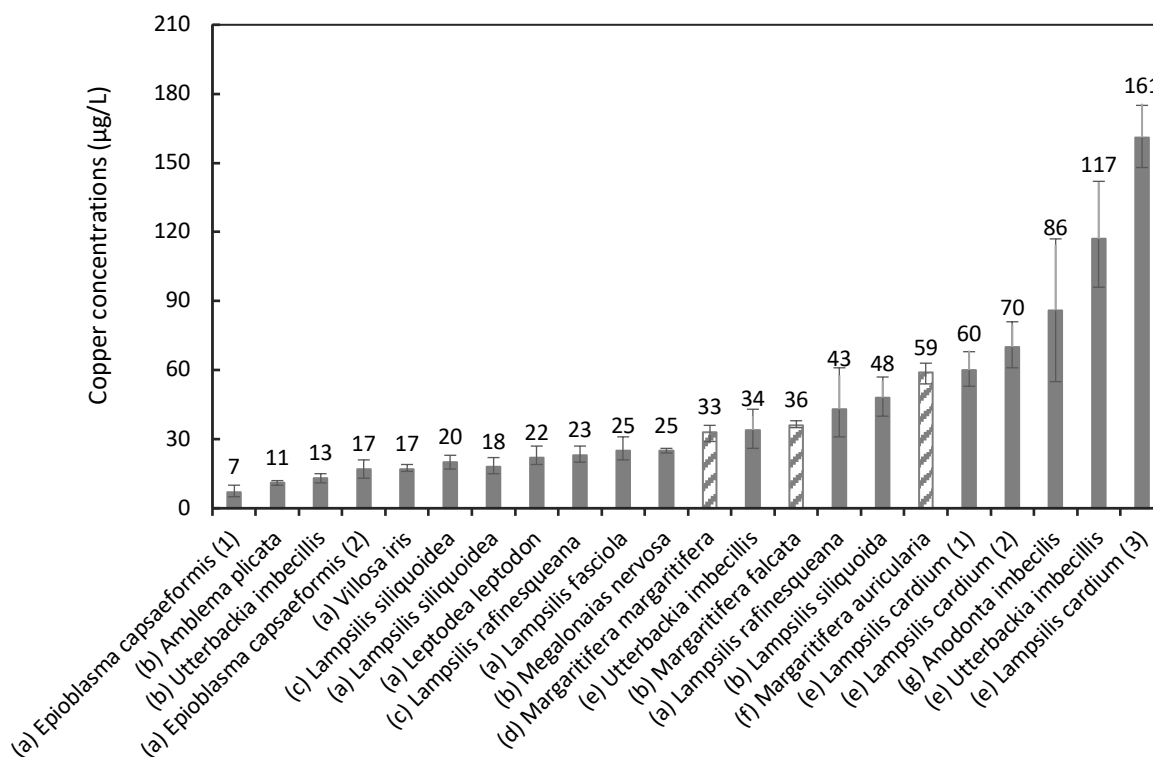
Table XVIII summarize 96-h median lethal concentrations for Al, As, Cd, Ni and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> found in the literature on <10-day old juveniles of ten freshwater mussel species from both families, Unionidae and Margaritiferidae, whereas toxicity thresholds for Cu are presented in Figure 19. The results obtained in the present study are included in both Table XVIII and Figure 19. For Ni, LC50s range from 100 (94-105) to 676 (648-705) µg/L for *M. margaritifera* and *U. imbecillis* respectively. For NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, the toxicity thresholds range from 1081 (901-1260) and 4151 (3624-4753) mg/L for *M. margaritifera* and *M. nervosa* respectively. For both contaminants, the FWPM is the most sensitive species compared to the seven other freshwater species for Ni and four other species for NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. However, for Cd, the FWPM is among the least sensitive species with LC50 of 29 (24-34) µgCd/L compared to four other mussel species with a range value from 9 (6-11) to 39 (35-43) µgCd/L for *A. imbecillis* and *M. auricularia* respectively. Nevertheless, for As and Al, only one LC50 value for each toxicant could be found in the literature on <10-day old juveniles of *L. siliquoidea*.

**Tableau XVIII.** Median lethal concentrations (± IC95) for nickel, cadmium, arsenic, aluminum and nitrate obtained in 96-h acute toxicity test conducted on < 10-day old juveniles of different freshwater mussel species all from the Unionidae family except for Margaritifera gender which are from the Margaritiferidae family.

Freshwater mussels species	Aluminium (µg/L)	Arsenic (µg/L)	Cadmium (µg/L)	Nickel (µg/L)	Nitrates (mg/L)	References
<i>Margaritifera falcata</i>	-	-	-	269 (259-280)	-	Wang et al. 2017
<i>Margaritifera auricularia</i>	-	-	39 (35 - 43)	125 (110-141)	-	Nakamura et al. 2020
<i>Margaritifera margaritifera</i>	> 693	>130	29 (24-34)	100 (94-105)	1081 (901-1260)	Present study
<i>Amblema plicata</i>	-	-	-	234 (207-264)	-	Wang et al. 2017
<i>Anodonta anatina</i>	-	-	-	-	1635 (1258 - 2126)	Douda 2010
<i>Anodonta imbecillis</i>	-	-	9 (6-11)	190 (93- 287)	-	Keller and Zam 1991
<i>Lampsilis siliquoidea</i>	> 54 mg/L	117 mg/L	-	-	-	Wang et al. 2017
<i>Lampsilis siliquoidea</i>	-	-	-	-	1581 (1107 - 2255)	Soucek and Dickinson 2012
<i>Lampsilis siliquoidea</i>	-	-	16 (13-20)	-	-	Wang et al. 2010
<i>Lampsilis siliquoidea</i> (1)	-	-	-	350 (298-411)	-	Wang et al. 2017
<i>Lampsilis siliquoidea</i> (2)	-	-	-	445 (429-461)	-	Wang et al. 2017
<i>Lampsilis rafinesqueana</i>	-	-	20 (19-22)	-	-	Wang et al. 2010
<i>Megaloniaias nervosa</i>	-	-	-	173 (165-181)	-	Wang et al. 2017
<i>Megaloniaias nervosa</i>	-	-	-	-	4151 (3624 - 4753)	Soucek and Dickinson 2012
<i>Unio crassus</i>	-	-	-	-	2233 (1776 - 2804)	Douda 2010
<i>Utterbackia imbecillis</i>	-	-	-	676 (648-705)	-	Wang et al. 2017
<i>Lampsilis siliquoidea</i>	-	-	-	-	2946	Wang et al. 2020

- No data available; (1) and (2) Two median lethal concentrations for the same species assessed in the same study;

These values were largely higher than concentrations studied in this present study. Indeed, while the LC50s were 117 000  $\mu\text{gAs/L}$  and over 54 000  $\mu\text{gAl/L}$  for <10-day old juveniles of *L. siliquoides* (Wang et al. 2017), in our study, the LC50s were over 120  $\mu\text{g/L}$  and over 693  $\mu\text{g/L}$  for As and Al respectively which are also corresponding to the highest concentrations studied in both toxicant experiments. Both *M. margaritifera* and *M. auricularia* were the most and the least sensitive species to Ni and Cd respectively, compared to Unionidae mussel species presented in table XVIII. The two species showed similar sensitivity since their LC50s were close for Ni (100 and 125  $\mu\text{gNi/L}$ ) and for Cd (29 and 39  $\mu\text{gCd/L}$ ). However, sensitivity to copper were different for the two mussels as LC50s were 33 (29-36)  $\mu\text{gCu/L}$  and 59 (54-63)  $\mu\text{gCu/L}$  for *M. margaritifera* and *M. auricularia* respectively. When compared to other freshwater mussels, presented in Figure 19, the Margaritiferidae family appears to show intermediate sensitivity to copper. LC50s for copper ranged from 7 to 161  $\mu\text{gCu/L}$  for *E. capsaeformis* and *L. cardium* respectively, while Margaritiferidae values ranged from 33 to 59  $\mu\text{gCu/L}$ .



**Figure 19.** Copper median lethal concentrations obtained in 96-h acute toxicity test conducted on < 10-day old juveniles of different freshwater mussel species from the Unionidae family (full bars) and from the Margaritiferidae family (hatched bars). (1), (2) or (3) Two or three LC50s obtained for the same species in the same study; (a) (Wang et al. 2007); (b) (Wang et al. 2017); (c) (Wang et al. 2010); (d) The present study; (e) (Popp et al. 2018); (f) (Nakamura et al. 2020); (g) (Keller and Zam 1991);

## 1.4. Discussion

Freshwater mussels were found to be among the most sensitive species to metals and major ions such as ammonia, chlorine, copper, nickel, lead, potassium, sulfate, and zinc, compared to other freshwater organisms (Wang et al. 2017; Popp et al. 2018). However, ecotoxicological studies on the FWPM are scarce while toxicological data provides important information that could help for the establishment of water quality criteria and environmental guidance values for these contaminants (Wang et al. 2017). Moreover, it could help to understand the role of contaminants in the decline of the FWPM and also to target reintroduction areas, since environmental pollution has been suggested to be the major threat to freshwater mussels (Bauer 1988; Bogan 1993; Young et al. 2001; Strayer et al. 2004; Lopes-Lima et al. 2018).

Nutrients such as nitrates and phosphates, both involved in eutrophication process were suggested to be important factors in imperiled population of the FWPM. Indeed, an Irish field study allowed to estimate median nutrients levels found in rivers containing reproducing *Margaritifera* which were 0.005 mg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L for orthophosphates and 0.553 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup> /L for nitrate (Moorkens 2006). Moreover, it has been showed by field observation, that adult mortality was positively correlated with increasing water nitrate concentrations from 6.6 to 13.29 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup> / L, and that increased levels of phosphate, calcium and biological oxygen demand were correlated with decreased survival and the establishment of juvenile mussel populations (Bauer 1988). However, in the present study, freshly excysted juveniles of the FWPM were tolerant to very high concentrations of ortho-phosphates with LC50 over 5.68 mg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L, which was six-fold higher than the limit value between net and significant water pollution in terms of water quality (Genin et al. 1997). Juveniles were also extremely tolerant to high nitrate concentrations since LC50 and LC10 were 1081 (901 - 1260) and 605 (288 - 923) mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, respectively, which are in accordance with nitrate acute toxicity data found in the literature with other freshwater organisms reviewed in (Camargo et al. 2005). Moreover, newly transformed juveniles of Unionidae mussels were also highly tolerant to nitrate exposure since toxicity thresholds ranged from 1635 (1258 – 2126) to 4151 (3624 – 4753) mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup> / L for *A. anatina* and *M. nervosa*, respectively (Douda 2010; Soucek and Dickinson 2012; Wang et al. 2020). As a result, FWPM juveniles were found to be the least tolerant species to nitrate compared to four other Unionidae freshwater mussel species (Douda 2010; Soucek

and Dickinson 2012; Wang et al. 2020). Interestingly, a recent study showed that *L. siliquoides* glochidia exposed to nitrate concentration of 248 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L for 24 hours, were adversely affected for glochidia attachment and juvenile metamorphosis, which therefore led to a significant reduction (35%) in juvenile production (Moore and Bringolf 2018). This finding highlights the importance of early life stages in the complex life cycle of freshwater mussels since negative effects on the latter will consequently impact the juvenile recruitment in mussel populations (Moore and Bringolf 2018). However, freshwater organisms appear to be relatively tolerant to high concentrations of nitrate, but these concentrations are largely higher than concentrations found in the natural environment. For example, in the Dronne river, nitrate concentrations never exceed the European drinking water threshold of 50 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. Nevertheless, the lack of knowledge about the range sensitivity of freshwater mussels led to the difficulty of determining whether these nutrients at high levels have a direct impact on mussel populations or if their effects are indirect through habitat degradation (Douda 2010). Overall, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> might not adversely affect organisms when studied separately in laboratory experimental conditions, but rather, their potential toxic effects might be related to their interaction with other environmental factors such as dissolved oxygen, pH, temperature and pollutants (Camargo et al. 2005; Baker et al. 2017).

The FWPM is inevitably exposed to the potential presence of contaminants since surface water and sediments are important routes of exposure for these filter feeding and sediment burrowing organisms (Cope et al. 2008). Metal trace elements (MTE) are known to induce harmful effects on freshwater bivalves (Keller and Zam 1991; Naimo 1995; Guidi et al. 2010; Giacomini et al. 2013; Jorge et al. 2013). Among them, copper, an essential element, is well-studied on Unionidae freshwater mussels. It has been found that freshwater mussels were among the most sensitive species group to Cu compared to other freshwater organisms (Wang, Christopher G. Ingersoll, et al. 2007; Wang et al. 2017). To our knowledge, the present study is the first to provide Cu toxicity data on the FWPM. Median lethal concentration for Cu on 3 days old *M. margaritifera* juveniles was 33 (29-36) µg/L with LC10 of 21 (15-27) µg/L. Similar result were obtained on freshly excysted juveniles of *Margaritifera falcata* since LC50 was 36 (35-38) µg/L (Wang et al 2017), whereas *Margaritifera auricularia* was less sensitive to Cu with LC50 and LC10 twofold higher than for the latter species with LC50 of 59 (54-63) µgCu/L and LC10 of 44 (37-52) µgCu/L. However, for Cu exposure, juveniles of Margaritiferidae family were found to have intermediate sensitivity compared to 11 other freshwater mussel

juveniles (Keller and Zam 1991; Wang, Christopher G. Ingersoll, et al. 2007; Wang et al. 2010; Wang et al. 2017; Popp et al. 2018; Nakamura et al. 2020) since LC50s for Cu ranged from 33 (29-36)  $\mu\text{g/L}$  to 59 (54-63)  $\mu\text{gCu/L}$  for *M. margaritifera* and *M. auricularia*, respectively, whereas LC50s for Unionidae species ranged from 7 to 161  $\mu\text{gCu/L}$  for *E. capsaeformis* and *L. cardium*, respectively (Wang, Christopher G. Ingersoll, et al. 2007; Popp et al. 2018). However, a study conducted on *U. imbecillis* glochidia showed that low Cu concentrations (3.12  $\mu\text{g/L}$  and 6.30  $\mu\text{g/L}$ ) induced genotoxic responses by DNA damages (Connors and Black 2004). Moreover, the toxic mode of action for copper has been suggested to mainly induce ionoregulatory disturbances. Jorge et al 2013, studied the chronically effect of Cu exposure for 28 days with 6- month old juveniles of *L. siliquoidae* and showed that low concentrations of Cu (2 and 12  $\mu\text{g/L}$ ) were affecting juveniles viability, metal bioaccumulation and physiological responses such as filtration rate, oxygen consumption, membrane integrity and body ions content (Jorge et al. 2013). In the Dronne river, Cu measured concentrations were about 2  $\mu\text{g/L}$  (Data not published) and while LC10 for post parasitic juveniles of *M. margaritifera* was 21 (15-27)  $\mu\text{g/L}$ , the latter finding suggest that lower concentrations of toxicant might affect juveniles in long term exposure. Moreover, with respect to its anti-fungal and anti-microbial properties, Cu is widely used in organic contaminants such as pesticides or herbicides, and the presence of some agricultural crops near the Dronne river, could led to increasing levels of copper in the river and could consequently impact FWPM populations. These findings enhance the importance of assessing the chronic effects of Cu with more environmental relevant concentrations, studied alone or in mixture with other environmental stressors such as the increasing global temperature. Similar observations were found with cadmium exposure in a French study, which conducted a laboratory toxicity test on FWPM adults from the Dronne river. This study highlighted the disruptive effect of cadmium on adult endocrine function since ecotoxicological biomarkers were affected at 2 and 5  $\mu\text{gCd/L}$  after 7 days of exposure (Baudrimont et al. 2020). In the present study, LC50 (IC95%) and LC10 (IC95%) for 3- day old juveniles of *M. margaritifera* were 29 (24-34)  $\mu\text{g/L}$  and 14 (9-19)  $\mu\text{g/L}$ , respectively. Similar results were obtained on freshly excysted juveniles of *M. auricularia* with LC50 (IC95%) of 39 (35-43)  $\mu\text{gCd/L}$  and LC10 (IC95%) of 21 (16–29)  $\mu\text{gCd/L}$  (Nakamura et al. 2020), suggesting that both mussels from the Margaritiferidae family showed nearly the same rank sensitivity to Cd. Moreover, these two mussels were found to be the least sensitive species to Cd compared to three others Unionidae mussel species with LC50s of 9 (6-11)  $\mu\text{g/L}$

for *A. imbecillis*, 16 (13-20) µg/L for *L. siliquoidea* and 20 (19-22) µg/L for *L. rafinesqueana* (Keller and Zam 1991; Wang et al. 2010). In contrast, *M. margaritifera* and *M. auricularia* with their respective LC50 values of 100 (94-105) µg/L and 125 (110-141) µg/L, were found to be the most sensitive species to Ni exposure compared to seven other Unionidae mussel species for which LC50s ranged from 173 (165-181) µgNi/L to 676 (648-705) µgNi/L for *M. nervosa* and *U. imbecillis*, respectively (Keller and Zam 1991; Wang et al. 2017; Nakamura et al. 2020). For *Margaritifera falcata* juveniles, Ni toxicity threshold was 269 µgNi/L (Wang et al, 2017), either two to three fold higher than for *M. margaritifera* and *M. auricularia*, which are both critically endangered species in Europe, according to the International Union for Conservation of Nature, while *M. falcata*, an american species, is a near threatened species. However, Cd and Ni were under the detection limit (<0.61 µg/L) in the Dronne river in 2018, whereas As and Al were found to be in concentration relatively high. Indeed, maximum As and Al measured concentrations were 35 µg/L and 120 µg/L in 2015 and 2018, respectively (unpublished data). Nevertheless, in the present study, 3-day old juveniles were tolerant to high concentrations of As and Al since LC50s values were over the highest concentration studied, either over 130 µg/L for As and higher than 693 µg/L for Al. To our knowledge, only one study was conducted on acute toxicity of As and Al to freshwater mussel juveniles. In this previous study, < 10-day old *L. siliquoidea* juveniles were extremely tolerant to high concentration of As and Al since their LC50 were 117 mgAs/L and over 54 mgAl/L (Wang et al. 2017). Moreover, Taskinen et al, 2011, showed that after 168 hours of exposure to 1mg/L of Al, viability of newly transformed juveniles of *M. margaritifera* was not affected. However, these concentrations are largely higher than those found in the Dronne river, but further studies are needed in order to assess the effects of those contaminants in more realistic environmental concentrations and these studies might be conducted in long term exposure to assess the sublethal effects. Overall, 3-day-old juveniles of the FWPM sensibility according to contaminant ranged as follow: Cd > Cu > Ni > NO<sub>3</sub><sup>-</sup> >> As >> Al >> PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> and were found to be the most sensitive species to NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and Ni, and the least sensitive species to Cd and showed an intermediate sensitivity to Cu compared to other freshwater mussels. Nevertheless, all the comparisons made in this present study were done with acute toxicity tests conducted at 20°C or 23°C whereas *M. margaritifera* were exposed to 16°C, corresponding to the mean temperature found in the Dronne river during the year. It is well accepted that temperature may influence the toxicity of pollutants by affecting organisms' metabolisms, either by

impacting their ventilation rates since elevated temperature is related to decreasing oxygen solubility in the water column, which could lead to a modification in the uptake, the elimination and the detoxification of pollutants by aquatic organisms (Cairns et al. 1975). Considering this statement, we expect a heightened sensitivity of FWPM juveniles to pollutants with higher temperature. However, in the context of our study, the exposure of FWPM juveniles to a 16°C water temperature was more relevant since it corresponded to the mean temperature during the year. Nevertheless, further studies conducted with higher temperatures are needed in order to assess the potential effects of climate change.

It has been suggested that post parasitic stage of the FWPM were the most critical stage of the species (Geist and Auerswald 2007; Geist 2010). A previous study conducted on 13- to 28-month-old juveniles of *M. margaritifera* from the Dronne river, showed a slight sensitivity to Cd and to sodium chloride for younger juveniles (Belamy et al. 2020). When comparing the results to those obtained in the previous study, newly transformed juveniles were found to be significantly more sensitive to Cd since toxicity thresholds were 29 (24-34) µgCd/L for 3-day-old juveniles and over 147 µg/L for 22-month-old juveniles. For NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 3-day-old juveniles showed a slight sensitivity (toxicity thresholds were 1081 (901-1260) mgNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L) compared to 13-month-old juveniles (between 1000 and 1500 mgNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L). For PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, As and Al, toxicity thresholds could not be assessed for freshly excysted juveniles and were over the highest concentration tested for each contaminant which not allowed us to compare the sensitivity according to age. However, it has been suggested that older juveniles were able to avoid the contaminant exposure by temporally closing their valves during 96-h acute toxicity tests (Wang, Christopher G. Ingersoll, et al. 2007) which might be an explanation of the age-related sensitivity.

The European drinking-water threshold standards for all contaminants studied in this work were fixed as follow: Al: 200 µg/L; As: 10 µg/L; Cd: 5 µg/L; Cu: 2000 µg/L; Ni: 20 µg/L and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: 50 mg/L. LC50s obtained in this study were all over water quality criteria except for Cu since LC50 and LC10 were 33 µg/L and 21 µg/L, respectively. This finding highlights the importance of taking freshwater mussels ecotoxicological data for copper in account, when developing water quality standard values as suggested by (Wang et al. 2017) since freshwater mussels were found to be among the most sensitive species to copper compared to other freshwater organisms.

## 1.5. Conclusion

This present study is the first to provide toxicity data as LC50s on newly transformed juveniles of the FWPM. The sensitivity of 3-day-old juveniles of the FWPM ranged as follow: Cd > Cu > Ni > NO<sub>3</sub><sup>-</sup> >> As >> Al >> PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> with LC50s of 29 µgCd/L, 33 µgCu/L, 100 µgNi/L, 1081 mgNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, over 130 µgAs/L, over 693 µgAl/L and over 5.68 mgPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L. In comparison with other freshwater mussels from the same family Margaritiferidae and from the same superfamily Unionoidae, FWPM juveniles were found to be the most sensitive species to NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and to Ni whereas, for Cd, *M. margaritifera* was found to be the least sensitive species. For Cu, Margaritiferidae species showed intermediate sensitivity compared to other freshwater mussel species. However, special concern should be focused on copper toxicity to the FWPM since low levels of Cu were affecting newly transformed juveniles and we suggest that even lower concentrations at long term exposure might exert negative effects on the FWPM. Moreover, the present study also allowed showing a significant sensitivity to Cd for newly transformed juveniles compared to older individuals (22-month-old) thus highlighting the age-related sensitivity. Although sensitivity according to age could not be assessed for all the other contaminants studied here, which could be explained by the range of exposure concentrations tested which was not high enough to assess the toxicity thresholds, this finding suggests that freshly excysted juveniles are tolerant to high concentrations of As, Al and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> since toxicity thresholds were largely higher than concentrations found in the natural environment, notably in the Dronne river. This study provides new knowledge on the endangered FWPM sensitivity to pollutants, which could be helpful not only for targeting reintroduction areas in conservation strategies but also for further studies based on the chronic toxicity effects of these contaminants studied separately or in mixture, with environmentally relevant concentrations.

## 1.6. Acknowledgment

This work was supported by the LIFE13-NAT\_FR\_000506 program, funded by the European Community, the Agence de l'Eau Adour Garonne, the Nouvelle Aquitaine Region, the Dordogne Department, the French government and the Initiative Biosphere Dordogne. We thank the aquatic toxicology team of Talence (University of Bordeaux, TALENCE, FRANCE) for the welcome in their laboratory, which allowed us to conduct our experiments. We also thank A.



Racher and F. Lalanne for providing juvenile mussels for testing. We would like to thank the Périgord-Limousin Regional Natural Park, which also coordinated the project. The authors declare no conflict of interest.

## 2. Article 2: Acute Toxicity of Sodium Chloride, Nitrates, Ortho-Phosphates, Cadmium, Arsenic and Aluminum for Juveniles of the Freshwater Pearl Mussel: *Margaritifera Margaritifera* (L.1758)



environments



Article

### Acute Toxicity of Sodium Chloride, Nitrates, Ortho-Phosphates, Cadmium, Arsenic and Aluminum for Juveniles of the Freshwater Pearl Mussel: *Margaritifera Margaritifera* (L.1758)

Tiare Belamy \*, Alexia Legeay, Bruno Etcheverria, Marie-Ange Cordier, Pierre-Yves Gourves and Magalie Baudrimont

University Bordeaux, UMR EPOC CNRS 5805, F-33120 Arcachon, France; alexia.legeay@u-bordeaux.fr (A.L.); bruno.etccheverria@u-bordeaux.fr (B.E.); marie-ange.cordier@u-bordeaux.fr (M.-A.C.); pierre-yves.gourves@u-bordeaux.fr (P.-Y.G.); magalie.baudrimont@u-bordeaux.fr (M.B.)

\* Correspondence: tiare.belamy@u-bordeaux.fr

Received: 30 April 2020; Accepted: 19 June 2020; Published: 23 June 2020



**Abstract:** The freshwater pearl mussel (FWPM) *Margaritifera margaritifera* (L.1758) is critically endangered in Europe and ecotoxicological studies on the species are scarce. Here, 96 h acute toxicity tests were conducted at 16 °C with sodium chloride (NaCl), nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), ortho-phosphates (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), cadmium (Cd), aluminum (Al) and arsenic (As) on 13- to 28-month-old post-parasitic juveniles. The experimental protocol was developed according to conditions described in a standard guide and was modified in order to assess toxicity thresholds for the Dronne River. Results showed that juveniles were tolerant to concentrations of Al, Cd, As, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NaCl, largely higher than those found in the Dronne river, since 96 h EC50s (effective concentrations) were >954 µg/L for Al; >110 µg/L for Cd; >127 µg/L for As; >5.01 mg/L for PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>; between 1000 and 1500 mg/L for NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and were 1.19 and 1.33 g/L for NaCl. Moreover, the use of a substrate in experiments was found not to affect juvenile responses and younger juveniles seemed more sensitive than older individuals. This study thus provides new data about the tolerance of FWPM to environmental pollution and suggests that pollutant concentrations in the river are significantly lower than levels affecting them.

**Keywords:** juvenile freshwater pearl mussel; nutrients; metals; sensitivity; acute toxicity test

## 2.1. Introduction

*Margaritifera margaritifera* (L.1758) is among the most endangered freshwater species in Europe (Strayer et al. 2004). The population of this freshwater pearl mussel (FWPM) has been declining since the 20th century due to pearl fishing, an alteration in water quality, habitat degradation, decline of host fish and pollution (Bogan 1993; Hastie and Young 2001; Young et al. 2001; Gumpinger et al. 2015; Hauer 2015; Scheder et al. 2015; Lopes-Lima et al. 2016). In Europe, several programs have been set up in order to preserve this species by restoring habitats and by the application of captive breeding techniques for the reintroduction of *M. margaritifera* into its natural habitats (Gum et al. 2011). But the knowledge of the best ecological and ecotoxicological requirements for the survival of this species in the field is still mostly lacking. *Margaritifera margaritifera* (L.1758) is a long-lived species presenting a complex life cycle that includes a compulsory parasitic stage during which the larvae (also called glochidium) must attach to the gills of a suitable fish host in order to allow glochidium metamorphosis into juvenile stage (Barnhart et al. 2008; Haag 2012). The juvenile stage starts when metamorphosed glochidia fall from the gills of the fish to settle on the river bottom, until they reach sexual maturity after 10 to 15 years (Young et al. 2001). Otherwise, post-parasitic juveniles (also called freshly excysted juveniles) are suggested to be the most critical stage of the FWPM (Geist and Auerswald 2007; Geist 2010). Since the first developmental stages of freshwater mussels are often more vulnerable than the adult stage (Naimo 1995; Wang, Christopher G. Ingersoll, et al. 2007; Österling et al. 2008), extensive investigation into assessing the sensitivity of the early life stages of the FWPM is, therefore, highly relevant for ecotoxicological study and in helping to find the best conservation strategies for this endangered species (Österling et al. 2008; Gumpinger et al. 2015; Ferreira-Rodríguez et al. 2019).

Research on some ecological requirements of the FWPM are well documented, including reports on its feeding requirements, laboratory holding conditions and species ontogeny (Gramstad 2014; Lavictoire et al. 2016; Schartum et al. 2016; Araujo et al. 2018; Lavictoire et al. 2018). With its general tendency to cause habitat degradation or alteration in water quality, pollution appears to be an important factor in the declining population of the FWPM (Bauer 1988; Augspurger et al. 2003; Strayer et al. 2004). Nutrient input to rivers from various anthropogenic sources, such as municipal and industrial sewage effluents and agricultural runoff, contributes to increased nutrient concentrations in freshwater ecosystems

(Augspurger et al. 2003; Camargo and Alonso 2006; Soucek and Dickinson 2012). Elevated nutrient concentrations leading to the eutrophication process can adversely affect organisms (Camargo et al. 2005; Camargo and Alonso 2006) and notably the FWPM since this species inhabits oligotrophic rivers (Skinner et al. 2003). Thus, it is necessary to directly assess the effects of such contaminants on the FWPM. Field observations have allowed the estimation of water-quality thresholds in terms of population size, recruitment and distribution within rivers, with very low values especially for nutrients involved in water eutrophication such as nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) and ortho-phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (Bauer 1988; Moorkens 2000; Moorkens 2006). An Irish study first estimated minimal *Margaritifera* water-quality standards for those two nutrients: 7.5 mg/L for  $\text{NO}_3^-$  and 0.06 mg/L for  $\text{PO}_4^{3-}$  (Moorkens 2000). Subsequently in 2006, the same author (Moorkens 2006) assessed median river levels at which *Margaritifera* is capable of reproduction and estimated lower values of 0.553 mg  $\text{NO}_3^-$ /L and 0.005 mg  $\text{PO}_4^{3-}$ /L for nitrate and ortho-phosphate, respectively. This finding thus addresses the need to study the toxicity effect of both nutrients on the FWPM since these values are considerably lower than concentrations found in the field. Moreover, these values are also lower than the European drinking-water threshold standard for nitrate: 50 mg  $\text{NO}_3^-$ /L and lower than 1 mg  $\text{PO}_4^{3-}$ /L for ortho-phosphates, which represent the threshold values between net and significant water pollution in terms of water quality (Genin et al. 1997).

As filtering and sediment living organisms, the FWPM is inevitably exposed to the potential presence of contaminants, since surface water and sediments are important routes of exposure for these bivalves (Cope et al. 2008). Metal trace elements (MTE) that enter into aquatic ecosystems are absorbed by suspended particles that subsequently accumulated in the sediment. MTE are known to exert harmful effects on freshwater bivalves by causing mortality, alterations in weight, changes in enzyme activity, filtration rate and behavioral modifications (Hemelraad et al. 1990; Keller and Zam 1991; Naimo 1995; Legeay et al. 2005; Guidi et al. 2010; Giacomini et al. 2013; Jorge et al. 2013). In particular, cadmium (Cd) is well known to impact on bivalve mollusks, notably *M. margaritifera* from the Dronne river in the Dordogne region of France (Bertucci et al. 2017; Baudrimont et al. 2020). Moreover, arsenic (As) and aluminum (Al) were found to be present in the upper part of this river, especially in the sediment, from to studies developed in the European Financial Instrument for the Environment (LIFE) Project (LIFE 13 NAT/FR/000506) which aims to preserve the largest French population of *M. margaritifera* contained in the Dronne river. This project also allowed the development of a rearing facility in 2016 in Firbeix (France), in order to produce the

FWPM, a subpopulation of which is reintroduced in the Dronne river after one or two years of culture, while the remainder are used for ecotoxicological studies. Currently, the total population of *M. margaritifera* in France has been estimated at 100,000 individuals dispersed in 82 different rivers (Cochet and Gouilloux 2004), with the Dronne river accounting for 15% of this population, making ecotoxicological studies on this river of major interest in preserving this species.

The aim of this study was first to develop a suitable experimental protocol for testing FWPM juveniles in toxicology studies focused on the toxicity threshold determination for the Dronne river. Indeed, experimental conditions were selected in order to get closer to the conditions found in this river, by using a substrate sand, the Dronne river water as dilution water and juveniles aged more than one year old (corresponding to the age of juveniles that are reintroduced in the Dronne river), in our experiments. The objective was then to assess toxicity thresholds for sodium chloride (NaCl), nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), ortho-phosphates (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), Cd, As and Al on artificially reared juveniles of the FWPM and to compare, when possible, their sensitivity according to age, in experiments conducted on animals from the same cohort at different times during the year. The contaminants As and Al were chosen according to their concentrations found in the Dronne river study site, whereas Cd was employed for a comparative assessment of its effects on juvenile versus adult *M. margaritifera*. The selected nutrients were studied to provide new data and add to the current literature on the general effects of nutrients on freshwater bivalves. Our results are expected to assess contaminant levels that could affect FWPM juveniles and, therefore, improve our knowledge about the pollutant sensitivity of this endangered species.

## **2.2. Materials and Methods**

### **2.2.1. Test Organisms and Laboratory Culture Conditions**

Juvenile mussels (*M. margaritifera*) were produced in vivo using the brown trout (*Salmo trutta*) as the fish host at the Firbeix captive rearing facility situated near the Dronne river (France). After juvenile mussels were excysted from their fish hosts, they were housed at the rearing facility in a flow-through system using 160 L tanks containing silicate sand as a substrate. The animals were kept in the farm facility for one to two years before reintroduction into the natural environment or are used for research experiments. For our

experiments, organisms were transported to the laboratory of the marine station of Arcachon (France) about 250 km away from the facility farm, in a cool box with frozen gel packs ensuring a temperature of about 12 °C. They were then transferred to a 300 mL plastic box without substrate and filled with aerated Dronne river water. The viability of juveniles was checked before and after the shipment. Once in the laboratory, the plastic boxes containing juveniles were placed in a 16 °C water bath in order to raise the temperature and ensure organism acclimatization. After that, the juveniles were kept in a closed recirculating system consisting of 50 L glass aquaria placed in a 16 °C water bath and filled with Dronne river water. The aquaria water was continuously filtered through a pump and inflow to the aquaria was via a spray bar allowing water aeration. Within these aquaria, individuals were placed in 100 mL experimental units (width 120 mm, height 30 mm) filled with a silicate sand substrate (diam. 0.8–1.4 mm obtained from Sibelco, Mios, France). Juveniles were fed daily with a mixture of living freshwater algae (*Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris* and *Stichococcus bacillaris*) cultivated in the laboratory. Half of the culture water volume was renewed twice monthly. Water physico-chemistry was based on averages from October 2017 to January 2018: Temperature 16.5 °C (range 16.3–16.7); dissolved oxygen 8.50 mg/L (range 7.24–9.60); pH 7.48 (range 7.10–7.80); conductivity 84.25 µS/cm (range 72.8–93.8). This culture system was tested over 4 months to ensure organisms viability at the laboratory. Dronne river water, used for dilution purposes in experiments and culture water for maintaining the mussels, was collected at the rearing facility and stored at 4 °C at the laboratory. All organisms used in these experiments originated from the same cohort produced in 2016. FWPM larvae, also called glochidia, were collected from the Dronne river in August 2016 allowing juveniles production in December 2016. In this study, the age of juveniles is expressed as the number of months after the point of dropping from the gills of the host fish.

### **2.2.2. Acute Toxicity Testing**

Initial experiments were conducted in order to assess the effective concentrations (EC50) and (EC10) corresponding respectively to the concentration of contaminant that affected 50% and 10% of the population studied, respectively. We conducted 96 h acute toxicity tests according to the standard guide for conducting laboratory toxicity testing with freshwater mussels (American Society for Testing Material E2455 2006) (ASTM E2455 2006), but with some modifications. Each test comprised four replicates for each of five exposure

concentrations, along with a control condition. Tests were conducted in 300 mL glass beakers containing 150 mL of test solution. Unlike the recommendation of ASTM E2455 2006 (ASTM E2455 2006), silicate sand was used as the substrate in order to allow mussels to burrow during the test period which we considered to more relevant for sediment dwelling species and Dronne river water was used for dilution water in experiments. We employed the same artificial substrate (diam. 0.8–1.4 mm obtained from Sibelco, Mios, France) used for *M. margaritifera*'s production at the Firbeix farm facility since the typical substrate preference for the FWPM are small sand patches stabilized amongst large stones or boulders (Skinner et al. 2003). Each experimental unit contained about 1 cm thickness of substrate. Before the start of a given test, juvenile viability was verified under a binocular microscope by observing foot movement during a 5 min trial. Individuals showing no movement within this period were recorded as impacted juveniles and were discarded. Live mussels were randomly placed in each beaker to a number of 5 (corresponding to 20 juveniles per exposure condition). The experimental units were continuously aerated and placed in a water bath at 16 °C, corresponding to the holding temperature at the rearing facility, which was closed to the mean temperature (14 °C) of the Dronne river throughout 2016. Water physico-chemistry (T°C, pH, conductivity and dissolved oxygen) was measured at the beginning (0 h) and at the end (96 h) of each experimental test with control, low-, medium- and high-contaminant concentrations. The viability of juveniles was again assessed at 48 and 96 hrs. In order to validate our method of exposure and to validate the use of a substrate, experiments with or without the use of substrate were conducted following the same experimental protocol as described above with NaCl as a reference toxicant (US Environmental Protection Agency 2002; Valenti 2004) and Cd. Given that the juveniles in this study came from the same cohort, experiments were conducted at different times between 2017 and 2018, allowing data comparisons to be made between animal groups of the same cohort in function of juveniles age. Organisms used for toxicity tests ranged in age from 13 to 28 months post-parasitic stage and toxicity tests were not conducted on newly transformed juveniles since new pearl mussel were produced the next year. However, in the context of the Dronne river, studies on older juveniles were more relevant since juveniles are reintroduced in the natural field after one or two years of culture at the rearing facility. Tests were carried out with static water without renewal and the animals were unfed for the duration of experiments. The test acceptability criterion was control survival >90% according to the ASTM E2455 2006 (ASTM E2455 2006).

### 2.2.3. Water Physico-Chemistry and Chemical Analysis

Toxicants used were as follows: reagent-grade salts dissolved in de-ionized water for sodium chloride (NaCl, reagent grade; USB Corporation, Cleveland, OH, USA), nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) as sodium nitrate ( $\text{NaNO}_3$ , 99.5% purity; Prolabo, Paris, France) and ortho-phosphates ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) as sodium phosphate dibasic ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 99% purity; Sigma Aldrich, *St. Louis, MO, USA*). Metal solutions were obtained from Merck with cadmium as  $\text{CdCl}_2$ , arsenic as  $\text{As}_2\text{O}_5$  and aluminum as  $\text{AlCl}_3$  all in  $\text{H}_2\text{O}$ . For metal concentration determinations, water samples were acidified at 10% with 65% nitric acid ( $\text{HNO}_3$ , Merck, Kenilworth, NJ, USA) directly after each sample collection. Cadmium and arsenic exposure concentrations were measured by Atomic Adsorption Spectrometry (SAA 240Z Agilent, Santa Clara County, CA, USA) and aluminum exposure concentrations were measured by inductively coupled plasma optical spectrometry (ICP-OES, 700 series, Agilent). The detection limits were 0.075  $\mu\text{g/L}$  and 0.5  $\mu\text{g/L}$  for cadmium and arsenic, respectively. Because of its high adsorption properties, cadmium concentration was measured in the testing solutions after 24 h during the acute 96 h toxicity tests and readjusted as necessary. Nutrients as nitrates and phosphates, were measured by gas-segmented continuous flow analysers (SFA) for the determination of dissolved nutrients (AA3-HR, SEAL ANALYTICAL) for phosphates and QuAAtro (QuAAtro, SEAL ANALYTICAL) for nitrates. The quantification limits were 0.21  $\mu\text{M/L}$  (0.013  $\text{mg/L}$ ) and 0.005  $\mu\text{M/L}$  (0.002  $\text{mg/L}$ ) for nitrates and phosphates, respectively. Water physico-chemistry was checked as recommended by ASTM E2455 2006 (ASTM E2455 2006), at the beginning and at the end of each test using measuring cells (WTW, Germany): Profiline Oxi 3205 for dissolved oxygen, Profiline pH 3110 for pH and Profiline Cond 3110 for temperature and conductivity. Nominal concentrations tested were as follows: 0, 5, 15, 30, 60 and 120  $\mu\text{g/L}$  for As and Cd; 0, 120, 250, 500, 750 and 1000  $\mu\text{g/L}$  for Al; 0, 0.2, 0.6, 1.6, 3, 6  $\text{mg/L}$  for  $\text{PO}_4^{3-}$ ; 0, 128, 256, 512, 1024 and 2048  $\text{mg/L}$  for  $\text{NO}_3^-$  and 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2 and 1.6  $\text{g/L}$  for NaCl. As and Al concentrations were chosen according to their maximum concentrations found in the Dronne river, which were about 35  $\mu\text{g As/L}$  in 2015 and 120  $\mu\text{g Al/L}$  in 2018. Concentrations tested for As and Cd were the same in order to compare the effect of both metals, although the Cd concentration measured in the Dronne river was under the detection limit in 2015 and 2018 ( $<0.61 \mu\text{g/L}$ ). Nitrates concentrations were first chosen according to thresholds found in the literature (Moorkens 2006), with the highest concentration tested being 8  $\text{mg NO}_3^-/\text{L}$ . However, at the end of the testing under such  $\text{NO}_3^-$  conditions, viability was found to be 100%. Therefore, in



order to assess the median effective concentration, the experiment was conducted again with higher concentrations that were chosen according to nitrates median effective concentrations found in the literature for other species of freshwater mussels from the Unionidae family (Soucek and Dickinson 2012).

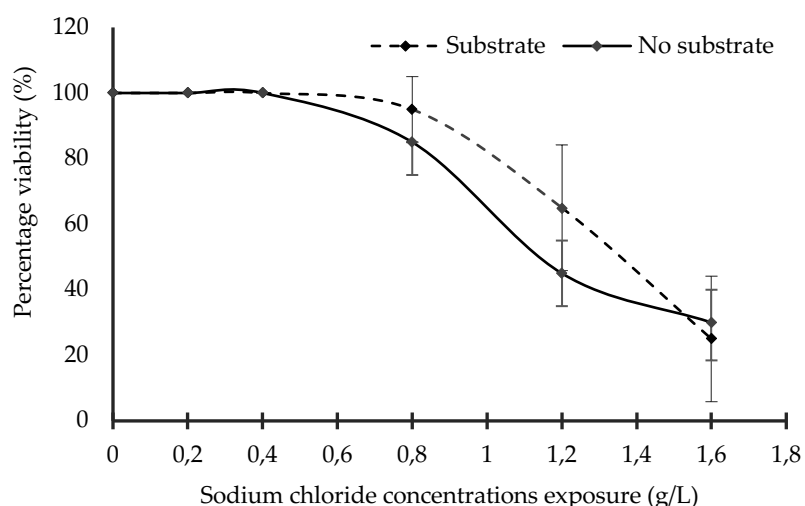
#### **2.2.4. Data Analysis**

Statistical analyses were performed using RStudio version 1.1.442. Normality and homoscedasticity were checked using the Levene test. Differences in age-related sensitivity or between the presence or absence of a substrate, were assessed by parametric testing with a two-way analysis of variance (ANOVA) with post-hoc Tukey analysis, or when necessary, by a non-parametric test using Kruskal–Wallis with a post hoc Dunn test. Values were first converted from percentages to arcsin functions for survival data. Effective concentrations (EC50) and (EC10) values were calculated from nominal concentrations for sodium chloride and from measured concentrations for all other toxicants. These toxicity thresholds were assessed with a three parameters log-logistic model allowing us to obtain where possible, the EC50 and the EC10 with corresponding to 95% confidence intervals (Ritz 2010).

### **2.3. Results**

#### **2.3.1. Validation of the Protocol**

Acute toxicity tests were carried out in order to assess median effective concentrations of NaCl,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , Cd, As and Al for several month-old juveniles of *M. margaritifera*. The tests were conducted according to ASTM E2455 2006 guidelines (ASTM E2455 2006), but with some modifications. Whereas this standard recommendation is based on water-only exposure, in the present study, silicate sand was employed to provide a substrate that more closely resembles the natural environment of the burrowing FWPM. In order to validate the use of a silicate sand substrate, acute toxicity tests in the substrate's presence or absence were conducted simultaneously on 22-month-old juveniles under NaCl and Cd exposure. Survival control was 100% at the end of the 96 hrs acute toxicity test for all conditions (Supplementary data, Table S3 – ANNEXE 2). The EC50s for NaCl in tests conducted with and without the sand substrate were  $1.33 \pm 0.09$  g NaCl/L and  $1.19 \pm 0.08$  g NaCl/L respectively (Figure 20). Statistical analyses showed no differences in the percentage of juvenile viability at each exposure concentrations of NaCl in tests conducted with or without a substrate ( $p > 0.05$ ).



**Figure 20.** Viability (%  $\pm$  standard deviation (SD)) of 22-month-old *M. margaritifera* juveniles exposed to sodium chloride in 96 h acute toxicity tests conducted with substrate (dashed line) or without (solid line) a sand substrate at 16 °C.

Under exposure to Cd, viability was 100% for all concentrations and both substrate (with or without) conditions at the end of the 96 h experiments. The high variability found in cadmium measured concentration measurements is due to the adjustment after 48 h of exposure by the compensated additions method, allowing mean cadmium concentrations to be maintained constant throughout each experiment (Supplementary data, Table S3 – ANNEXE 2). Nevertheless, comparison of Cd exposure concentrations showed no differences between the two tests for each exposure concentration ( $p > 0.05$ ) (Supplementary data, Table S3 – ANNEXE 2). Measured physico-chemical parameters (temperature, pH, dissolved oxygen and conductivity) during Cd and NaCl acute toxicity tests were remained very similar in the two substrate conditions (Supplementary data, Table S2 – ANNEXE 2).

### 2.3.2. Toxicity Thresholds

Table XIX summarizes the median effective concentrations (EC50) obtained in 96 h acute toxicity tests for NaCl, Al, As, Cd,  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{PO}_4^{3-}$ . The values obtained with or without the use of a substrate in these experiments and the total number of organisms used for each test are also presented. Overall, in the acute toxicity tests conducted, only a few EC50s could be established. Indeed, a 50% population effect rate was not reached for the highest exposure concentrations tested for Al, As, Cd and  $\text{PO}_4^{3-}$ . The 96 h acute toxicity thresholds were higher than 954  $\mu\text{g/L}$  for aluminum; over 110, 112 and 147  $\mu\text{g/L}$  for cadmium toxicity tests; higher

than 127 µg/L for arsenic, and over 5.01 mg/L for phosphates. Moreover, in the nitrate exposure test, we were unable to assess the exact median effective concentration because the dilution factor between two exposure concentrations was too high. In fact, the percentage viability at the end of the test to medium-high concentration exposure was 80%, whereas all organisms died in the highest exposure condition. However, the data allowed us to determine a range of toxicity threshold values between 1000 to 1500 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, which is not representative of the natural environmental conditions. EC10s were assessed for the two NaCl toxicity tests and for the cadmium acute toxicity test conducted on 16-month-old juveniles. These values were as follow with corresponding confident intervals: 0.64 (0.53–0.77) g NaCl/L for the 96 hrs toxicity test conducted without substrate; 0.91 (0.75–1.08) g NaCl/L for the 96 hrs toxicity test conducted with substrate, and 75 (55–95) µg Cd/L. The EC10 for nitrate could not be established for the same reason as our inability to determine the exact EC50. Similarly, the EC10s could not be calculated for all the other contaminants since survival was 100% at the end of the trials for the highest concentrations tested. Mean measured values of water-quality parameters (pH, conductivity, dissolved oxygen and temperature) for all acute toxicity tests presented in Table XIX were measured at the beginning and at the end of the test (See Supplementary data, Table S2 – ANNEXE 2). Nominal and mean measured concentration of toxicants, and juveniles' viability at the end of the tests are presented as Supplementary data, Table S3 – ANNEXE 2.

**Tableau XIX.** Median effective concentrations (EC50s) in 96 h acute toxicity tests with sodium chloride, nitrates, phosphates, cadmium and arsenic for *M. margaritifera* juveniles. (T°C = 16 °C) (n=4).

Toxicants or Nutrients		Age of Organisms (months)	Substrate	Total Number of Organisms	EC50 (48 h)	EC50 (96h)	Units
NaCl	Sodium Chloride	22	No	120	>1.6 <sup>1</sup>	1.19 (1.11–1.28)	g/L
NaCl	Sodium Chloride	22	Yes	120	1.5 (1.35–1.66)	1.33 (1.24–1.42)	g/L
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrates	13	Yes	120	>2290 <sup>1</sup>	1000–1500 <sup>2</sup>	mg/L
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Phosphates	13	Yes	120	>5.01 <sup>1</sup>	>5.01 <sup>1</sup>	mg/L
CdCl <sub>2</sub>	Cadmium	16	Yes	120	>112 <sup>1</sup>	>112 <sup>1</sup>	µg/L
CdCl <sub>2</sub>	Cadmium	22	No	120	>147 <sup>1</sup>	>147 <sup>1</sup>	µg/L
CdCl <sub>2</sub>	Cadmium	22	Yes	120	>110 <sup>1</sup>	>110 <sup>1</sup>	µg/L
As <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Arsenic	17	Yes	96	>127 <sup>1</sup>	>127 <sup>1</sup>	µg/L
AlCl <sub>3</sub>	Aluminum	28	Yes	120	>954 <sup>1</sup>	>954 <sup>1</sup>	µg/L

Numbers in parentheses denote 95% confidence intervals; <sup>1</sup> Insufficient effect on mobility for assessing EC50; <sup>2</sup> Range values of EC50 where the dilution factor between exposure concentrations was too high.

### 2.3.3. Age-Related Sensitivity

Table XX shows the mean survival of juveniles in 96 h acute toxicity tests to Cd for 16- and 22-month old juveniles. The viability of 16-month-old juveniles was affected at 120 µg Cd/L with 80% survival occurring, while the viability of 22-month-old juveniles was not affected even at the highest exposure concentration. For NaCl exposure conducted with sediment, the 48-h EC50 assessed for 22-month-old juveniles was 1.5 g NaCl/L with a 95% confidence interval of between 1.35 and 1.66. A previous experiment conducted on 10-month-old juveniles allowed to assess 48-h EC50 of 0.96 g NaCl/L with a 95% confidence interval of between 0.88 and 1.05 (Supplementary data, Figure S1, Table S1 – ANNEXE 1). However, missing data of this experiment such as water-quality parameters at the end of the experiment or measured NaCl concentrations, and the short duration of the acute toxicity test (48 hrs) did not allow us to confirm the robustness of these results but provided interesting information concerning the sensitivity of the youngest juveniles studied in this present study. Indeed, the EC50 seems to be 0.5-fold lower than for 22-month-old juveniles (1.5 (1.35–1.66) g NaCl/L). Moreover, in terms of mean survival, the viability of 10-month-old juveniles was affected at 1 g NaCl/L with 45% of organisms remaining alive (Supplementary data, Figure S1 – ANNEXE 1), whereas 70% of 22-month-old juveniles were still alive after 1.2 g NaCl/L exposure (Supplementary data, Table S3 – ANNEXE 2).

**Tableau XX.** Mean survival (%) and median effective concentrations for cadmium (µg Cd/L) in acute toxicity tests with a substrate for 16- and 22-month-old *M. margaritifera* juveniles, T°C = 16 °C.

Cd (µg/L) <sup>1</sup>	Organisms Age	
	16 months	22 months
Control	100	100
5	100	100
15	100	100
30	100	100
60	95	100
120	80	100
<b>96 h EC50 <sup>2</sup></b>	>112	>110

<sup>1</sup> Expressed as nominal concentrations; <sup>2</sup> Expressed as measured concentrations.

## 2.4. Discussion

### 2.4.1. Experimental Procedure

The lack of knowledge about the endangered FWPM's sensitivity to pollutants and the scarcity of laboratory testing on this species, due mostly to its complex life cycle, provided the initial impetus to develop suitable experimental protocols for investigating this organism's ecotoxicology. Although the protocols we employed complied mostly with ASTM E2455 2006 (ASTM E2455 2006) guidelines, some important modifications were introduced such as a substrate, the use of Dronne river water as the dilution water, and the use of juveniles aged of more than one year. Our results showed that the presence of silicate sand as a substrate in 96 h acute toxicity tests did not impact either on water quality parameters or toxicant concentrations, and did not affect the juveniles' sensitivity, since EC50s in NaCl toxicity tests conducted with a substrate and without any, were similar with overlapping confidence interval (1.33 (1.24–1.42) g NaCl/L and 1.19 (1.11–1.28) g NaCl/L, respectively), thus validating our method of exposure. However, these results also showed that in acute toxicity tests, the presence of a substrate is not necessary, as recommended by the ASTM E2455 2006 (ASTM E2455 2006), but with respect to this present study objectives, the use of a substrate in our experiments met conditions that corresponded more closely to this burrowing mussel's natural environment, notably in the Dronne river. A previous study on the unionid mussel (*Lampsilis siliquoidea*) in 28-day chronic toxicity tests to ammonia, conducted with soil substrate ranging in size of 300 to 500 µm and conducted without any, similarly found that the presence of a substrate did not influence the toxicant sensitivity of this freshwater mussel (Wang et al. 2011). However, the same author conducted more recently another study based on the same experimental test on chronic toxicity to NaCl and potassium chloride (KCl) with silica sand (particle size of 100 to 400 µm) used as substrate and reported that EC20, based on biomass endpoint, in substrate presence, was twofold lower than without substrate (Wang et al. 2018). This indicates that the mussel responses in the presence or absence of substrate might be dependent on the exposure duration and might differ according to the endpoint studied. Nevertheless, in this present study, acute toxicity tests were conducted for 96 h and the endpoint was juvenile's immobility. In order to further validate the experimental protocol developed in the present study, acute toxicity tests were conducted using NaCl as a reference toxicant, which is amongst those toxicants used to assess the health and sensitivity of organisms generally, thereby allowing a comparison over time to be made between organisms

of different species (US Environmental Protection Agency 2002; Valenti 2004). FWPM juveniles displayed a dose-dependent sensitivity to sodium chloride: the median effective concentration for 22-month-old juveniles in 96 h acute toxicity tests were 1.33 (1.24–1.42) g NaCl/L and 1.19 (1.11–1.28) g NaCl/L in the presence or absence of substrate, respectively. Moreover, the EC10s were 0.64 (0.53–0.77) g NaCl/L and 0.91 (0.75–1.08) g NaCl/L in 96 h tests conducted with and without a substrate, respectively. An earlier study in which the 96 h median effective concentrations for chloride (tested as sodium chloride) on 6- to 10-day-old post-parasitic juveniles of five other species of freshwater mussels (four from the family Unionidae and one from the family Margaritiferidae) were established, reported EC50s values ranging from 1.038 to 2.246 g Cl/L (1.711 to 3.703 g NaCl/L) (Wang et al. 2017). However, it has been shown that water chemistry as water hardness, was impacting sensitivity to NaCl toxicity for mussels (Wang, Ivey, et al. 2018) and for other freshwater organisms (Elphick et al. 2011; Soucek et al. 2011; Mount et al. 2016), with increasing water hardness leading to decreasing sensitivity to NaCl. In this present study, water hardness was not measured which makes it difficult to compare the sensitivity of *M. margaritifera* juveniles to NaCl with mussel juveniles of the previous study (Wang et al. 2017). Although median effective concentrations obtained in our study were assessed on 22-month-old juveniles, comparison of these values indicates that *M. margaritifera* appears to be more sensitive to NaCl than other freshwater mussel species, since lower toxicity thresholds would be expected in younger, especially recently excysted, juveniles.

#### 2.4.2. Toxicity Thresholds

Little is known about the sensitivity of the FWPM to pollution threats. Many programs have been set up for the reinforcement of the FWPM population in Europe (Gum et al. 2011), but research on this organism's pollutant sensitivity is scarce. This could be partially explained by its endangered species status since *M. margaritifera* is protected by appendix III of the Bern Convention, by the European habitats Directive annexes II and V and is included in the red list of the International Union for Conservation of Nature as being critically endangered in Europe. This in turn leads to difficulty in using this organism for laboratory testing, a problem that is further compounded by the long-life span and complex life cycle of this species, which as a consequence, requires knowledge of potential threats affecting both the FWPM's different life stages as well as its host population (Bogan 1993; Hastie and Young 2001; Österling et al.

2008). However, several field studies have provided estimates of low water-quality thresholds in rivers where recruitment has been observed (Moorkens 2006), and have allowed showing a positive correlation between increasing nitrate concentrations and adult mortality (Bauer 1988). Moreover, a recent French study conducted laboratory experiments to study the effects of cadmium exposure on FWPM adults sampled from the Dronne river (Baudrimont et al. 2020). Organisms were exposed to 2 and 5  $\mu\text{g Cd/L}$  for 7 days and ecotoxicological biomarkers such as gonad histological observations, metal bioaccumulation, metallothionein production, malondialdehyde concentrations and quantitative relative expression analysis of genes were assessed. The results of this study, which was the first to use various toxicological biomarkers to investigate the impact of cadmium exposure on *M. margaritifera* adults, provided new knowledge about the sensitivity of the freshwater pearl mussel, in particular highlighting the disruptive effect of this metal trace element on adult endocrine function. However, despite the fact that early life stages are considered to be the critical survival period for this species (Naimo 1995; Österling et al. 2008), to our knowledge, only one ecotoxicological study has hitherto been conducted on *M. margaritifera* juveniles (Taskinen et al. 2011). This previous study, in which the effects of pH, Al and iron (Fe) on the survival of early life stages of *M. margaritifera* were assessed at 17–18 °C, reported relatively low effects of Al and Fe after 168 h exposure on the survival of newly transformed juveniles. Even at the highest concentrations tested (1 mg Al/L and 2 mg Fe/L), survival rates were over 80%. In our study, the 96 hrs median effective concentration (96 h EC50) for Al on 28-month-old juveniles was  $>0.954 \text{ mg/L}$ . Those findings showed that newly transformed or older juveniles (by several months) are more tolerant to high concentrations of Al in a short-term exposure since, according to the FOREGS base data (Salminen et al. 2005), mean measured concentrations of Al found in European stream waters is  $75.5 \pm 180 \mu\text{g Al/L}$ . Similar results were obtained for As and Cd, since the 96 h EC50 determined in the present study was greater than  $127 \mu\text{g As/L}$  for 17 month old juveniles and from 110 to  $147 \mu\text{g Cd/L}$  for 16 to 22 month old juveniles. Moreover, EC10 for cadmium was  $75 \mu\text{g/L}$ , which underlies the high tolerance of juveniles to acute cadmium exposure. In the Dronne river, measured Cd concentrations in 2015 and 2018 were under the detection limit ( $<0.61 \mu\text{g Cd/L}$ ), whereas the maximum measured concentrations of Al and As were  $120 \mu\text{g Al/L}$  and  $35 \mu\text{g As/L}$ , respectively (unpublished data). Since drinking-water threshold for As fixed by the World Health Organization (WHO) is  $10 \mu\text{g As/L}$ , the relatively high As concentration could be related to background levels in the studied site (Mauroux et al. 2009), perhaps leading to an adaptation of the mussel to such high

environmental As concentrations. Moreover, the high tolerance of *M. margaritifera* juveniles aged from 16 to 22 months to high concentrations of Al, Cd and As could be explained by the capacity of mussels to avoid contaminant exposure by temporarily closing their valves during laboratory testing (Farris et al. 2007; Wang, Christopher G. Ingersoll, et al. 2007; Cope et al. 2008). It is relevant in this context that another study showed that toxicity thresholds were increased at least threefold when two-month-old *Lampsilis siliquoidea* juveniles were transferred to clean water without contaminant for 24 h after a 96 h toxicity tests to copper whereas for newly transformed juveniles, toxicity threshold was similar after the 24 h recovery time. Moreover, for ammonia exposure, EC50s were found to be similar for newly transformed and two-month-old juveniles of *L. siliquoidea* (Wang, Christopher G. Ingersoll, et al. 2007). This finding led to the conclusion that depending on the pollutant studied, older juveniles (months) were avoiding pollutant exposure by closing their valves since survival was assessed by checking mussel foot movement. In the present study, juvenile FWPM viability was also evaluated by checking foot movement within a 5 min assessment period. Interestingly, most of the dead mussels remained open with their motionless foot projecting out of the valves. Since mussels might have reduced the filtration process that would be the main mediator for environmental pollutant intake, this potential capacity of avoiding toxicant exposure by FWMP juveniles could lead to an underestimation of actual contaminant toxicity. However, since the current study showed the high tolerance of FWPM juveniles to acute concentrations of metal trace elements (Al, As and Cd) and nutrients ( $\text{NO}_3^-$  and  $\text{PO}_4^{3-}$ ) in short-term exposure, further studies investigating the sublethal effects of pollutants in long-term exposures are now needed to complete our knowledge of survival responsiveness.

Water-quality degradation has been reported to be an important factor in imperiling FWPM populations, especially arising from the presence of nutrients involved in the eutrophication process (Skinner et al. 2003; Strayer et al. 2004; Douda 2010). An Irish field study reported estimates of median nutrient levels found in reproducing *Margaritifera* containing rivers (Moorkens 2006), with values being 0.005 mg  $\text{PO}_4^{3-}$ /L for orthophosphates and 0.553 mg  $\text{NO}_3^-$ /L for nitrate. Another study through field observations on 13 Bavarian rivers (Germany) found that adult mortality was positively correlated with increasing water nitrate concentrations from 6.6 to 13.29 mg  $\text{NO}_3^-$ /L, and that increased levels of phosphate, calcium and biological oxygen demand were correlated with decreased survival and the establishment of juvenile mussel populations (Bauer 1988). In our study, the 96 hrs median effective concentrations for nitrate and ortho-phosphate on 13-month old juveniles were



between 1000 and 1500 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L and >5.01 mg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L, respectively. We also found that 13-month-old juveniles are tolerant to very high concentrations of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> in short-term and single contaminant exposures at 16 °C, which is in accordance with the high tolerance of other species of freshwater mussels to nitrate exposure. Indeed, previous acute toxicity tests conducted at 20 °C on newly transformed juveniles of *U. crassus* and *A. anatina* established 96 h median lethal concentrations of 2233 and 1635 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, respectively (Douda 2010). Moreover, a recent study conducted acute toxicity tests to nitrate on different freshwater species including a freshwater mussel (*L. siliquoidea*) and allowed the assessment of nitrate EC50s ranging from 837 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L to over 3912 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L for larvae midge (*Chironomus dilitus*) and rainbow trout juveniles (*Oncorhynchus mykiss*), respectively, with nitrate EC50 of 2946 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L for the unionid mussel (Wang et al. 2020). However, these threshold values are significantly higher than the nitrate concentrations reported in the natural environment. In fact, in the Dronne river, the maximum measured nitrate and orthophosphate concentrations were 9.4 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L and 0.22 mg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L according to the water information system of the “Adour-Garonne” web site. This therefore suggests that these nutrients are in concentrations in the Dronne river that are significantly lower than levels affecting *M. margaritifera* juvenile survival. Nevertheless, the little available data on nitrate toxicity in freshwater mussels makes it difficult to determine whether these nutrients at high levels have a direct effect on mussel populations or whether their impact is more indirect through habitat impairment (Douda 2010). Moreover, nitrates and phosphates might not be found to be toxic when studied separately in laboratory experimental conditions, but rather, their adverse effects may arise from a concomitant interaction with other environmental factors such as dissolved oxygen, pH and temperature (Camargo et al. 2005; Baker et al. 2017).

However, it is important to emphasize that our experiments were based on the assessment of juvenile viability, whereas at the same exposure concentrations, the physiology and metabolism of the mussels could still be impacted and sublethal effects might be occurring. Moreover, median effective concentration values from the current study were obtained from 96 h exposure testing. Further studies into long-term exposure are now needed in order to assess the full impact of environmentally relevant concentrations of contaminants, studied both independently and in combination, and in addition to other environmental factors such as temperature or dissolved oxygen. Such a multifactorial approach could allow investigation into the potential broader effects of climate change with increasing temperatures (Douda 2010; Ferreira-Rodríguez et al. 2019).

### 2.4.3. Age-Related Sensitivity

*Margaritifera margaritifera* is a long-living species whose juvenile stage starts at the moment they drop off from the host fish gills, then lasts for 10 to 15 years until sexual maturity is reached (Skinner et al. 2003). Consequently, the juvenile's sensitivity to a particular contaminant may differ significantly according to age (Jacobson et al. 1993). In the present study, a comparison of the sensitivity of 10- and 22-month-old juveniles in 48-h acute toxicity testing to sodium chloride and 16- and 22-month-old juveniles in 96 h acute exposures to cadmium were made. The results showed a slightly enhanced sensitivity for younger juveniles in both cases. Since the 96 h EC50s were greater than 110 and 112 µg Cd/L in both cadmium experiments, a direct comparison of toxicity thresholds was not possible. However, the viability of 16-month old juveniles was adversely affected by 110 µg Cd/L, with a viability percentage of 80%, whereas at the same concentration, the viability of 22-month old juveniles remained 100%, thus indicative of a sensitivity related to age. Moreover, 10-month-old juveniles were found to be more sensitive to NaCl than older 22-month-old juveniles with EC50s of 0.96 g/L and 1.5 g/L for 10-month-old and 22-month-old juveniles, respectively. This is in accordance with the age-dependent sensitivity reported for other freshwater mussel species. For example, although two-month-old juveniles from the Unionidae family display a sensitivity to ammonia that is similar to that of newly transformed juveniles, the tolerance to copper is lower than in the younger animals (Wang, Christopher G. Ingersoll, et al. 2007). Moreover, acute sensitivity to the toxic effects of lead, cadmium and zinc has been found to be higher in newly transformed Unionidae mussels than in glochidia, and also compared to older 2- to 6-month-old Unionidae juveniles (Wang et al. 2010). Those findings, therefore, underline the importance of studying the most relevant life-stage and to take the age factor into account when comparing juvenile contaminant sensitivities between different studies.

### 2.5. Conclusions

The present study provides new data on the toxicant sensitivity of *Margaritifera margaritifera* juveniles in demonstrating that animals aged from 13 to 28 months were found to be tolerant to concentrations of Al, Cd, As,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{NO}_3^-$  and NaCl, that are largely higher than those found in the Dronne river, under 96 h experimental exposure conditions. These findings suggest that nutrients and trace metals studied in this present study, are significantly lower in the Dronne river than levels of toxicant affecting FWPM juveniles. Moreover, the

tolerance of FWPM juveniles appears to be dependent on age, with younger juveniles suggested as being more sensitive than older individuals, a finding that emphasizes the importance of studying early life stages of this species and notably freshly excysted juveniles. However, further studies on the sub-lethal effects (e.g., gene expression, mussel physiology and behavior etc.) of those contaminants are now needed since this could enable the detection of significant deleterious effects at lower contaminant concentrations and with long-term exposure (Douda 2010; Ferreira-Rodríguez et al. 2019). Moreover, since single-contaminant exposure might not alone affect juvenile viability, studies on multiple-stress effects might be more relevant (e.g., chronic exposure to a mixture of nitrates and phosphate at different temperatures). Nevertheless, this study has improved our knowledge about this endangered species and has pointed to the ecological and ecotoxicological directions needed to develop future conservation strategies.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-3298/7/6/48/s1>, Figure S1: Viability ( $\% \pm$  SD) of 10-month old *M. margaritifera* juveniles exposed to sodium chloride in 48-h acute toxicity test conducted at 16 °C; Table S1: Mean values ( $\pm$  SD) measured at the beginning of the test, for water parameters (pH, conductivity, dissolved oxygen and temperature) in 48-h acute toxicity tests; Table S2: Mean measured values ( $\pm$  SD) for pH, temperature (°C), conductivity ( $\mu$ s/cm) and dissolved oxygen (mg/L) at the beginning and at the end of each acute toxicity tests conducted in this study in Control, low, medium and high exposure conditions ( $n = 3$ ); Table S3: Nominal concentrations, mean measured concentration values  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) and mean percentage viability  $\pm$  SD ( $n = 4$ ) at the end of the test (based on juveniles immobility) for each acute toxicity tests. (ANNEXES 1 et 2)

**Author Contributions:** Conceptualization, T.B., M.B. and A.L.; methodology, T.B. and B.E.; formal analysis, T.B.; investigation, T.B.; resources, P.Y.G. and M.A.C; writing—original draft preparation, T.B.; writing—review and editing, T.B., M.B., A.L., M.A.C., B.E. and P.Y.G.; visualization, T.B.; supervision, M.B. and A.L.; funding acquisition, M.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the LIFE programme (LIFE13 NAT/FR/000506).

**Acknowledgments:** This work was supported by the LIFE13 NAT/FR/000506 program, funded by the European Commission, “Agence de l’Eau Adour Garonne”, New Aquitaine Region, the Dordogne Department, the French government and the “Initiative Biosphere Dordogne”.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## BILAN DU CHAPITRE III

Ces deux études sont les premières à avoir été réalisées sur la détermination de seuils de toxicité concernant la moule perlière. Les résultats de ces travaux ont permis de mettre en évidence **trois points importants** sur la sensibilité des jeunes stades de vie de la moule perlière :

- Ces travaux ayant été réalisés sur des juvéniles âgés de 3 jours et jusqu'à plus de 2 ans, une **différence de sensibilité** a pu être observée **en fonction de l'âge** des juvéniles. Les plus jeunes individus se sont avérés plus sensibles comparé aux individus plus âgés.
- Pour certains contaminants, notamment **l'arsenic**, **l'aluminium** et les **ortho-phosphates**, les résultats ont révélé une **grande tolérance des juvéniles** à ces différents facteurs quel que soit l'âge des juvéniles. En effet, la mobilité des individus n'a pas été affectée par ces facteurs étudiés en concentrations largement supérieures à celles retrouvées dans l'environnement.
- Enfin, la première étude ayant été réalisée dans des conditions similaires à celles qui sont communément mises en place pour les tests de toxicité sur les moules d'eau douce (ASTM E2455 2006), les résultats ont pu être comparés aux données de la littérature. En comparant les seuils de toxicité obtenus dans cette étude sur les juvéniles de moule perlière à celles retrouvées dans la littérature pour les moules d'eau douce de la famille des Unionidés, les **juvéniles de *M. margaritifera*** se sont avérés **plus sensibles à une contamination aux nitrates et au nickel**.

Ces deux études ont finalement permis d'améliorer nos connaissances sur la sensibilité de l'espèce et apportent des informations clés pour le développement de futures investigations. En effet, les tests de toxicité aigüe permettent d'avoir une vision globale sur la sensibilité d'une espèce à un facteur donné puisque les impacts sont observés à l'échelle de l'organisme (évaluation de la mobilité). Pour mieux comprendre l'impact des contaminants, des études à plus long terme sur les effets sub-létaux sont nécessaires notamment par le biais de biomarqueurs étudiés à différentes échelles d'organisation. C'est dans ce cadre que les travaux présentés dans les chapitres suivants, ont été menés.

---

# **CHAPITRE IV. Bioaccumulation et réponses transcriptomiques chez les juvéniles de moule perlière chroniquement exposés à l'arsenic et au cadmium**

## Introduction du chapitre

L'étude des effets létaux sur les organismes, notamment par l'application de bio-essais de toxicité aigüe, permet de déterminer la sensibilité de l'espèce vis-à-vis du contaminant étudié. Cependant, ce type de test effectué sur une courte période de temps (jusqu'à 96 heures), ne renseigne que sur la toxicité générale d'un contaminant donné puisque le critère d'évaluation est basé sur la mobilité de l'organisme et les concentrations en contaminant étudiées sont généralement largement supérieures à celles retrouvées dans les milieux naturels. Afin de mieux comprendre les mécanismes de toxicité d'un contaminant, les organismes sont exposés à des concentrations faibles et représentatives des niveaux environnementaux sur une période de temps plus longue (exposition chronique). Dans ces conditions, des effets sub-létaux peuvent être observés sans pour autant conduire à la mortalité des organismes. En effet, les réponses biologiques au niveau moléculaire, cellulaire et tissulaire sont considérées comme les premières réponses au stress de l'organisme et le couplage d'études réalisées à ces différents niveaux d'organisation permet ainsi de mieux comprendre et d'appréhender les mécanismes de toxicité induits par un facteur de stress. Dans ce chapitre, les effets sub-létaux de l'As et du Cd, en concentrations représentatives de celles retrouvées dans la Haute-Dronne, sur les juvéniles de moule perlière, ont été évalués à l'échelle moléculaire via les réponses transcriptomiques de gènes cibles, et à l'échelle de l'organisme par l'étude de l'accumulation de ces deux ETMs.

## 1. Introduction

L'arsenic (As) est un métalloïde naturellement présent dans la croûte terrestre et classé au 20<sup>ème</sup> rang d'abondance. Les sources d'As dans l'environnement peuvent être naturelles (activités volcaniques, érosion des minéraux) mais également d'origine anthropogénique résultant de l'exploitation minière, de leur utilisation dans des engrais ou des pesticides ou encore de la combustion de carburants fossiles (Cullen and Reimer 1989; Mandal and Suzuki 2002; Smedley and Kinniburgh 2002; Bissen and Frimmel 2003; Duker et al. 2005). L'As est retrouvé dans l'environnement sous plusieurs formes et à différents degrés d'oxydation : As(V), As(III), As(-III) et As(0). Dans les systèmes aquatiques, les formes pentavalents et trivalents sont majoritaires avec l'As(V) correspondant à la forme la plus stable dans des conditions oxydantes (Azizur Rahman and Hasegawa 2012). La forme trivalente (arsenite, As III) étant généralement plus toxique que la forme pentavalente (arsenate, As VI) (Cervantes et al. 1994; Duker et al. 2005), la toxicité de ce métalloïde va donc dépendre de sa spéciation. L'arsenic et ses composés ont été classés dans les produits cancérigènes pour l'Homme selon le centre international de recherche sur le cancer (CIRC). Les divers effets toxiques engendrés par une exposition des organismes à l'arsenic concernent : l'inhibition de nombreuses enzymes due à l'interaction de l'As avec les groupements sulfhydryles des protéines et des enzymes (Abernathy et al. 1999; Gebel 2000; Tseng 2004; Y.-C. Wang et al. 2004), l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène au sein des cellules, conduisant à des dommages cellulaires (Wang et al. 1996; Chen et al. 1998; Nies 1999; Ahmad et al. 2000), l'altération des réactions permettant la formation d'adénosine triphosphate (ATP) puisque l'arsenate (As V) présente une structure proche des phosphates et donc va se substituer au phosphore et conduire à une altération de l'énergie des cellules (Winship 1984; Fattorini and Regoli 2004) ou encore l'inhibition des mécanismes de réparation de l'ADN (Brockmüller et al. 2000). La présence d'As est de l'ordre de 1 à 8 µg/L dans les systèmes aquatiques marins, et de l'ordre de 1 à 10 µg/L dans les écosystèmes aquatiques d'eau douce non pollués (Mandal and Suzuki 2002). Dans la Haute-Dronne, les niveaux d'As se situent dans cet ordre mais peuvent être retrouvés en concentrations plus élevées, par exemple en 2015, une concentration de 35 µg/L a été mesurée dans ce cours d'eau (données internes non-publiées). La présence d'As dans cette rivière est notamment expliquée par un fond géochimique riche en cet élément (Mauroux et al. 2009). Contrairement à l'As, le cadmium (Cd) est très peu présent dans la Haute-Dronne. Le Cd fait partie des substances prioritaires listées par la

directive cadre sur l'eau (directive 2008/105/EC) et les effets toxiques de cet élément sur les organismes aquatiques sont bien documentés (Baudrimont et al. 1997; Géret et al. 2002; Baudrimont et al. 2003; Legeay et al. 2005; Marie et al. 2006; Arini et al. 2014) où les principaux modes d'action de cet élément résident dans son affinité pour les groupements thiols des protéines, enzymes et acides nucléiques et de sa capacité à se substituer à d'autres ions métalliques (essentiellement  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ ) au sein des métalloenzymes, conduisant ainsi à l'inhibition de leur activité catalytique (Jacobson and Turner 1980; Stohs and Bagchi 1995). Par ailleurs, une étude menée sur des adultes de *M. margaritifera* a montré que le Cd agissait comme un perturbateur endocrinien sur l'espèce et que l'exposition des individus au Cd pendant 7 jours conduisait à une altération des capacités anti-oxydantes à l'échelle moléculaire (Baudrimont et al. 2020).

À notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur l'évaluation des effets chroniques d'une contamination métallique sur les juvéniles de *M. margaritifera*. Dans cette étude, les effets chroniques de l'arsenic et du cadmium ont été étudiés sur des juvéniles de moule perlière âgés de 17 et 16 mois, respectivement. Pour évaluer les effets sub-létaux de ces ETMs, deux critères d'évaluation ont été étudiés : les réponses transcriptomiques à l'échelle moléculaire et la bioaccumulation de ces ETMs au niveau de l'organisme. Les seuils de toxicité aiguë (CE50s) pour l'As et le Cd déterminés dans une précédente étude sur des juvéniles également âgés de 16 et 17 mois, sont  $> 127 \mu\text{g/L}$  pour l'As et  $> 112 \mu\text{g/L}$  pour le Cd (**Chapitre III - Partie 2**)(Belamy et al. 2020). L'objectif de ce travail a donc été d'évaluer les impacts de ces deux ETMs en concentrations plus faibles et représentatives de celles retrouvées dans l'environnement. Pour le Cd, les juvéniles sont exposés à 2 et 5  $\mu\text{g/L}$  (valeur guide UEu) et pour l'As, à 10  $\mu\text{g/L}$  (valeur guide OMS et UEu) et 35  $\mu\text{g/L}$  (concentration maximale en As dans la Haute-Dronne).



## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Juvéniles de moule perlière

Les organismes sont récoltés à la ferme aquacole de Firbeix et transportés jusqu'au laboratoire de la Station Marine d'Arcachon dans les conditions qui sont décrites dans le **Chapitre II - transport des organismes**. Pour ces expérimentations, les juvéniles sont âgés de 16 et 17 mois pour les expositions au cadmium et à l'arsenic, respectivement.

### 2.2. Test de toxicité chronique

Les bases du protocole sont mises en place à partir du guide standard pour conduire des expérimentations sur les jeunes stades de vie des moules d'eau douce (ASTM E2455 2006). Cependant, quelques modifications ont été effectuées concernant les conditions d'expérimentation. Les recommandations du guide standard et les conditions employées dans cette étude sont présentées dans le tableau XXI.

Tableau XXI. Conditions d'expérimentation recommandées par le guide standard (ASTM E2455 2006) et celles employées pour les expositions chroniques des juvéniles de moule perlière au cadmium et à l'arsenic

CONDITIONS	RECOMMANDATIONS ASTM	CONDITIONS EMPLOYÉES
Type de test	Statique à renouvellement ou à flux continu	Statique avec renouvellement de 50% de l'eau tous les 2 jours
Durée d'exposition	21 à 28 jours	21 jours
Température	20°C	16°C
Unité d'expérimentation (UE)	Statique et renouvellement : min. 50 mL; Flux continu : min. 300 mL	Bocaux en verre de 300 mL
Volume d'eau dans les UE	Statique et renouvellement : min. 30 mL; Flux continu : min. 200 mL	200 mL
Âge des juvéniles	2 à 4 mois	16 et 17 mois
Nb. organismes/UE	Minimum 10	30
Nb. réplicats/condition	Minimum 3	3
Alimentation des organismes	Algues	Mélange d'algues d'eau douce <sup>1</sup>
Aération des UE	Non si O <sub>2</sub> dissous > 4,5 mg/L	Oui
Eau de culture	Eau reconstituée	Eau de la ferme aquacole
Critère de validation du test	Survie témoins > 80 %	Survie des témoins > 80%

<sup>1</sup>Mélange de 3 souches : *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris* et *Stichococcus bacillaris*

Chacune des expérimentations, présentées dans la figure 21, consiste en 3 conditions : une condition témoin sans contaminant et deux conditions de contamination (2 et 5 µg/L pour Cd ; 10 et 35 µg/L pour l'As) où chaque condition est réalisée en triplicat. La contamination des UEs est effectuée à partir d'une solution mère de pentoxyde d'arsenic As(V) (Merck) à 1mg/L pour l'As, et de chlorure de cadmium CdCl<sub>2</sub> (Merk) à 1mg/L pour le Cd, qui a été diluée dans de l'eau ultra-pure (milliQ). Cette contamination est réalisée par des ajouts compensés afin de maintenir les concentrations stables en ETMs au sein des UEs, à t1j, t2j, t4j, t7j, t9j, t11j, t14j et t18j pour le Cd, et à t2j, t4j, t7j, t14j et t18j pour l'As. Les UEs correspondent à des bocaux en verre de 300 mL contenant 200 mL d'eau de la Dronne et environ 1 cm de sable ultra-pur (SILBECO) d'un diamètre compris entre 0.8 et 1.4 mm. Avant l'expérience, le sable est nettoyé 3 fois à l'eau de robinet puis 3 fois avec de l'eau de la ferme aquacole. Chaque UE est aérée à l'aide de bulleur avec une faible intensité pour éviter l'évaporation de l'eau. Les juvéniles, âgés de 16 et 17 mois, pour l'exposition au Cd et à l'As, respectivement, sont répartis au hasard dans chaque UE à raison de 30 juvéniles. Après 4, 7 et 21 jours d'exposition, 10 juvéniles sont prélevés dans chaque UE (5 individus pour l'analyse génétique et 5 pour le dosage des contaminants dans les tissus). Les échantillons d'eau (2 ml) sont récoltés tous les jours lors de la première semaine d'exposition, puis tous les deux jours, dans les UEs afin suivre la pression de contamination. En début d'expérience puis après 4, 7, 14 et 21 jours d'exposition, la mobilité des juvéniles est vérifiée sous une loupe binoculaire à partir du mouvement du pied pendant une période de 5 minutes. Les organismes ne montrant aucun mouvement durant cette période sont considérés comme morts et ne sont pas comptabilisés dans l'analyse génétique et dans l'analyse de la bioaccumulation. L'eau des UEs est renouvelée à 50% tous les deux jours et les paramètres physico-chimiques de l'eau sont mesurés au début de l'expérience puis après 4, 7, 11, 14 et 21 jours d'exposition. Les deux expériences ont été réalisées en séquentiel et selon le même protocole.

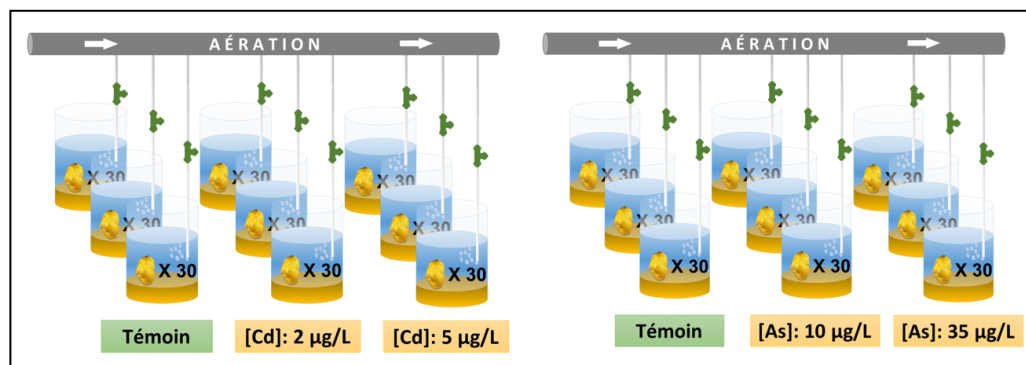


Figure 21. Protocoles expérimentaux mis en place pour l'exposition chronique des juvéniles de moule perlière au cadmium et à l'arsenic pendant 21 jours à 16°C.

## 2.3. Expression génétique

En raison de leur faible taille (entre 2 et 3 mm) ne permettant pas la dissection des juvéniles de moule perlière de 16 à 17 mois, un échantillon est composé d'un pool de 5 mulettes et l'analyse est réalisée sur la totalité de l'organisme, coquille comprise.

### 2.3.1. Prélèvements et préparation des échantillons

Les mulettes récoltées à chaque temps, sont placées dans des tubes eppendorfs de 2 mL contenant 500 µL de RNAlater. Ces échantillons sont ensuite gardés 24 h au réfrigérateur puis stockés à -20°C jusqu'au moment de l'extraction. Le protocole d'expérimentation employé pour la préparation des échantillons avant la mesure de l'expression des gènes par qPCR est détaillé dans la partie matériels et méthodes (**Chapitre II**).

### 2.3.2. Gènes étudiés

Les gènes étudiés lors de cette étude, les fonctions biologiques associées, et leurs séquences, sont présentés dans le tableau XXII.

Tableau XXII. Liste des gènes étudiés, leur fonction biologique et leurs séquences d'amorces respectives.

Gènes	Fonctions	Séquences des amorces 5'-3'
<i>sod1 (Cu/Zn)</i>	Stress oxydant	CACCAGCATTGCCAGTTGTC <sup>1</sup> CCTCACAGGGCCAAATTCCA <sup>2</sup>
<i>sod2 (Mn)</i>	Stress oxydant	AACACACCCTGCCAGATCTG <sup>1</sup> GATGTTTCTGGTGGTGCAGC <sup>2</sup>
<i>sod3 (Cu/Zn)</i>	Stress oxydant	ATTCAGGGCATGCACGTGTA <sup>1</sup> ATTGCCGAAGACTGGGGATG <sup>2</sup>
<i>cat</i>	Stress oxydant	TCGGAAGGATGGTGCTCAAC <sup>1</sup> AATGCCAGGGATCATGTGGG <sup>2</sup>
<i>Cox1</i>	Métabolisme mitochondrial	GTCTTCGTGGGGTTCTTTGA <sup>1</sup> CTTAAAGCCCTGCCTCACAC <sup>2</sup>
<i>12s</i>	Métabolisme mitochondrial	TAGGGGTATAACCGCGACTG <sup>1</sup> ACCCACAACCAATGTCCT <sup>2</sup>
<i>mt1</i>	Détoxication	ACCACAGTCACACGAACCAG <sup>1</sup> TGTACTGGGGACTGCAGATG <sup>2</sup>
<i>mxr</i>	Détoxication	AGGAGAGGTGAAAGGGGAAA <sup>1</sup> GCATCCCAGCAAGATCAAAT <sup>2</sup>
<i>gstpi</i>	Détoxication	GGTGCCAGCAAAGATGAAT <sup>1</sup> GAAGGCTTCATCTGGAGCAA <sup>2</sup>
<i>casp 3</i>	Apoptose	GCATCTGCAACATCAACACC <sup>1</sup> CTGGCCTGTAGGAAAACCA <sup>2</sup>

<i>casp 9</i>	Apoptose	GCCATCCTCCACATTAGCAT <sup>1</sup> TGGTCCAGATGTTGGACAGA <sup>2</sup>
<i>bak</i>	Apoptose	GGTGTGGCCAGAAAGTTGTT <sup>1</sup> CCCAGTCTCAACACCCTCAT <sup>2</sup>
<i>bcl2</i>	Apoptose	CAGCAAAGGCATAAACAGCA <sup>1</sup> CGGAGAGATGGGACATAACG <sup>2</sup>
<i>card11</i>	Apoptose	TGTGGGTGGTAATTGTGTGG <sup>1</sup> GGCTCCGACATTTATGGA <sup>2</sup>
<i>p53</i>	Apoptose/cycle cellulaire	CATGAGTCCAGACAGCCAGA <sup>1</sup> GACTGCATGTTGGTGTGAGG <sup>2</sup>
<i>rad51</i>	Réparation de l'ADN	CCCATGGGATTTACAACAGC <sup>1</sup> CTCAATCCCACCTTGAGAA <sup>2</sup>
<i>XRCC4</i>	Réparation de l'ADN	CCAATAAAGCAGGGACCTCA <sup>1</sup> GTCTTTTAGGTCGGGCAACA <sup>2</sup>
<i>EIF2</i>	Traduction	ACACCAGAAATGGCCTTGAC <sup>1</sup> TGAGGTCATCAGCAGACAGG <sup>2</sup>
<i>RPL7</i>	Référence	TGGGATGCACTCCATTGATA <sup>1</sup> GATTCGGCTTGAGAGAATGG <sup>2</sup>

<sup>1</sup>amorce sens ; <sup>2</sup>amorce anti-sens

## 2.4. Qualité de l'eau

Les paramètres physico-chimiques tels que la température, le pH, la conductivité et l'oxygène dissous, sont mesurés tous les 4 jours pendant l'expérience à l'aide de sondes portatives (WTW, Germany): l'oxymètre Profiline Oxi 3205 pour l'oxygène dissous, le pHmètre Profiline pH 3110 pour le pH et le conductimètre Profiline Cond 3110 pour la conductivité et la température.

## 2.5. Dosage des contaminants

### 2.5.1. Dans les échantillons d'eau

Les échantillons d'eau sont récoltés dans des tubes eppendorfs de 2 mL et sont directement acidifiés avec de l'acide nitrique (HNO<sub>3</sub> à 65%, Sigma Aldrich) pour un volume final dilué à 10%. Ils sont ensuite stockés dans une chambre froide à 4°C jusqu'au moment du dosage qui est effectué par spectrométrie d'absorption atomique (SAA).

### 2.5.2. Dans les tissus

Un pool de 5 muettes est utilisé par échantillon. Les juvéniles sont prélevés après 4, 7 et 21 jours de contamination et sont placés dans des tubes eppendorfs de 2 ml puis stockés au

congélateur à -20°C jusqu'au moment du dosage qui est réalisé par spectrométrie d'absorption atomique (SAA) pour l'As (limite de détection : 0.23 µg/L) et par ICP-EOS pour le Cd (limite de détection : 0.1 µg/L).

## **2.6. Analyses statistiques**

Pour l'expression génique, les analyses statistiques sont réalisées sur les expressions relatives de chaque gène d'intérêt par rapport au gène de référence ( $\Delta Ct$ ) puis la comparaison est effectuée par rapport aux témoins pour chaque temps d'exposition. La comparaison des moyennes est réalisée par une analyse des variances (pour l'analyse génétique et pour la bioaccumulation). Pour cela, la normalité de la distribution des données a été vérifiée graphiquement sur les résidus des données. L'homoscédasticité des variances a ensuite été évaluée à l'aide du test de Levène ( $p > 0.05$ ). L'analyse des variances est ensuite réalisée à l'aide du test paramétrique ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey.

## **3. Résultats**

### **3.1. Qualité de l'eau et concentrations en As et Cd**

Les concentrations réelles en As et en Cd mesurées dans les unités expérimentales sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type ( $n=17$ ) et sont présentées dans le tableau XXIII. Pour le cadmium, les écart-types sont élevés en raison des ajouts compensés réalisés lors de la contamination des UEs pour maintenir une concentration à 2 et 5 µg/L. Pour l'arsenic, les concentrations mesurées dans l'eau des unités témoins sont en moyenne de 4.7 µg As/L, qui correspond à la concentration moyenne en As retrouvée dans la Dronne, ce qui explique les valeurs plus élevées des deux conditions de contamination pour l'arsenic comparées aux concentrations nominales.

Les paramètres physico-chimiques mesurés pendant les expérimentations sont également présentés dans le tableau XXIII. Les valeurs sont calculées à partir de la moyenne de toutes les mesures effectuées pendant l'expérience ( $n=6$ ).

**Tableau XXIII.** Concentrations nominales et concentrations moyennes ( $\pm$  écart-type) mesurées en cadmium et en arsenic dans l'eau en  $\mu\text{g/L}$  ( $n = 17$ ) et paramètres physico-chimiques mesurés pendant l'expérience ( $n = 6$ ).

Éléments traces	Concentrations ( $\mu\text{g/L}$ )		Paramètres physico-chimiques de l'eau			
	Nominales	Mesurées	Température ( $^{\circ}\text{C}$ )	pH	Conductivité ( $\mu\text{S/cm}$ )	O <sub>2</sub> dissous (mg/L)
<i>Cadmium</i>	0	0.04 $\pm$ 0.04	15.9 $\pm$ 0.2	6.9 $\pm$ 0.3	68 $\pm$ 3	8.2 $\pm$ 0.4
	2	2.3 $\pm$ 1.5	15.8 $\pm$ 0.2	6.9 $\pm$ 0.1	66 $\pm$ 2	8.1 $\pm$ 0.3
	5	5.3 $\pm$ 3.3	15.7 $\pm$ 0.2	6.8 $\pm$ 0.1	65 $\pm$ 2	7.9 $\pm$ 0.2
<i>Arsenic</i>	0	4.7 $\pm$ 0.5	15.8 $\pm$ 0.1	6.9 $\pm$ 0.2	66 $\pm$ 1	7.5 $\pm$ 0.3
	10	15.2 $\pm$ 2.1	15.8 $\pm$ 0.1	6.9 $\pm$ 0.2	66 $\pm$ 1	7.6 $\pm$ 0.2
	35	43.2 $\pm$ 6.4	15.7 $\pm$ 0.1	7.1 $\pm$ 0.4	69 $\pm$ 6	7.5 $\pm$ 0.3

### 3.2. Mobilité des organismes

La mobilité des organismes lors des expériences, est présentée dans le tableau XXIV. À chaque temps, le pourcentage de mobilité est calculé sur le nombre total d'individus présents dans les UEs pour une condition donnée. Le critère de validité du test fixé par le guide standard (ASTM 2006) est respecté puisque la mobilité des juvéniles dans les conditions témoins à la fin des deux tests est supérieure à 80%. Dans deux conditions, la mobilité des juvéniles est très faiblement impactée (après une exposition de 7 jours à 2  $\mu\text{g/L}$  de Cd et après 14 jours d'exposition à 35  $\mu\text{g/L}$  en As).

**Tableau XXIV.** Pourcentage de juvéniles mobiles (%) en début d'expérience et après 7, 14 et 21 jours d'exposition aux différentes conditions.

Éléments traces	Conditions	Temps d'exposition			
		t0 jours (n=90)	t7 jours (n=60)	t14 jours (n=30)	t21 jours (n=30)
<i>Cadmium</i>	Témoins	100	100	100	100
	2 $\mu\text{g/L}$	100	98.3 $\pm$ 2.9 <sup>1</sup>	100	100
	5 $\mu\text{g/L}$	100	100	100	100
<i>Arsenic</i>	Témoins	100	100	100	100
	10 $\mu\text{g/L}$	100	100	100	100
	35 $\mu\text{g/L}$	100	100	93.3 $\pm$ 11.5 <sup>1</sup>	100

<sup>1</sup>Pourcentage  $\pm$  écart-type ; n : nombre d'individus par condition

### 3.3. Bioaccumulation des métaux

Les concentrations moyennes en Cd accumulées chez les juvéniles de moule perlière âgés de 16 mois sont présentées dans la figure 22. Les résultats montrent la présence de cadmium chez les témoins avec des teneurs de  $1.66 \pm 0.08 \mu\text{g/g}$  (ps),  $1.46 \pm 0.12 \mu\text{g/g}$  (ps) et  $1.88 \pm 0.21 \mu\text{g/g}$  (ps) après 4, 7 et 21 jours d'exposition, respectivement. Pour les organismes exposés, après 4 jours d'exposition à une concentration de  $2\mu\text{gCd/L}$  et de  $5\mu\text{gCd/L}$ , les juvéniles accumulent en moyenne  $3.92 \pm 0.09 \mu\text{g/g}$ , ps et  $6.37 \pm 0.92 \mu\text{g/g}$ , ps, respectivement. Après 7 jours d'exposition, ces valeurs atteignent  $4.62 \pm 0.21 \mu\text{g/g}$ , ps et  $8.49 \pm 0.60 \mu\text{g/g}$ , ps. Après 21 jours d'exposition, les juvéniles accumulent  $11.4 \pm 0.9 \mu\text{g/g}$ , ps pour une exposition de  $2 \mu\text{gCd/L}$  et  $21.8 \pm 2.3 \mu\text{g/g}$ , ps pour une exposition de  $5 \mu\text{gCd/L}$ .

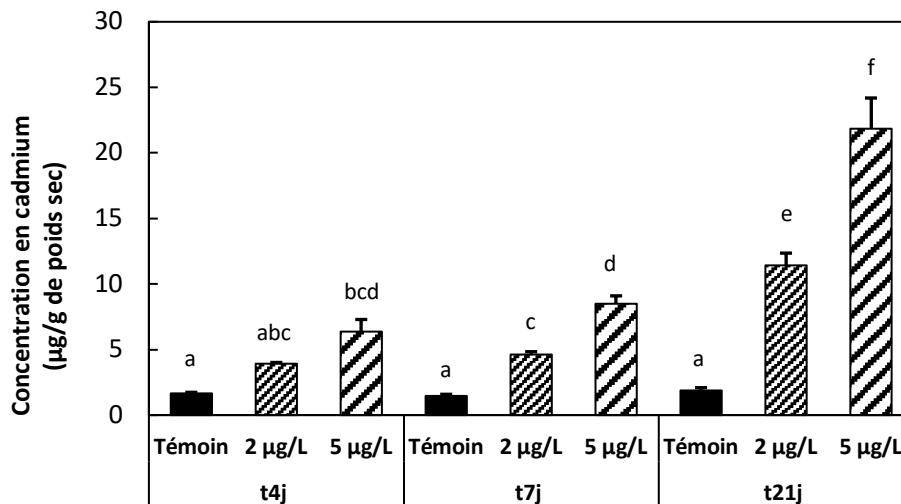


Figure 22. Concentrations moyennes en cadmium ( $\mu\text{g/g}$ , ps) dans des juvéniles de *M. margaritifera* (coquille comprise), âgés de 16 mois après 4, 7 et 21 jours d'exposition à différentes concentrations en Cd. Les barres d'erreurs correspondent aux écart-types ( $n=3$ , pools de 5 individus). Les lettres montrent les différences significatives ( $p < 0.05$ )

Les concentrations moyennes en As accumulées chez les juvéniles de moule perlière âgés de 17 mois sont présentées dans la Figure 23. Les organismes témoins présentent en moyenne moins d' $1 \mu\text{g/g}$  (ps) d'As quel que soit le temps d'exposition. Une augmentation de l'accumulation d'As est observée chez les juvéniles exposés après 4 et 7 jours, cependant ces niveaux restent faibles puisqu'ils ne dépassent pas  $2 \mu\text{gAs/g}$  (ps). Une concentration maximale accumulée de  $3.71 \pm 0.78 \mu\text{g/g}$  (ps) est observée chez les juvéniles exposés pendant 21 jours à  $35 \mu\text{g/L}$  d'As.

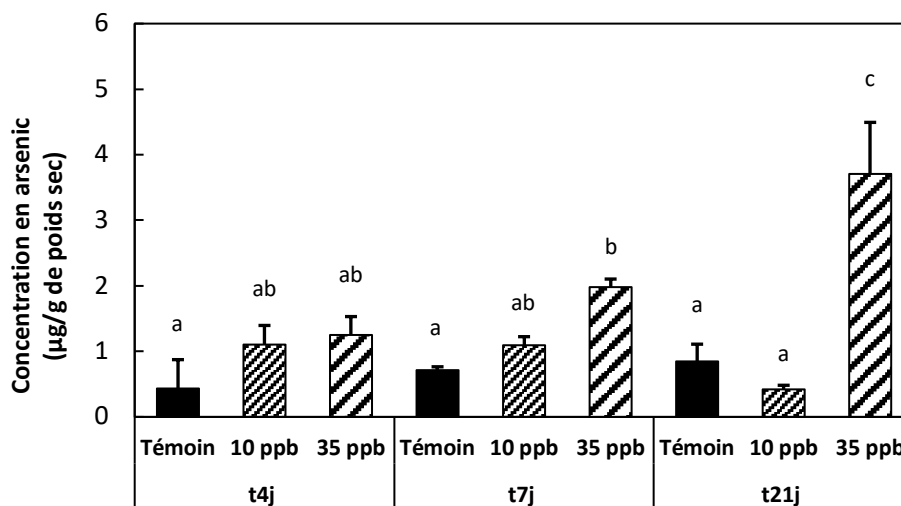


Figure 23. Concentrations moyennes en arsenic ( $\mu\text{g/g}$ , ps) dans des juvéniles de *M. margaritifera* (coquille comprise), âgés de 17 mois après 4, 7 et 21 jours d'exposition à différentes concentrations en As. Les barres d'erreurs correspondent aux écart-types ( $n=3$ , pools de 5 individus). Les lettres montrent les différences significatives ( $p < 0.05$ )

### 3.4. Expression génique

Les expressions de gènes codant pour des protéines ayant un rôle dans divers processus biologiques en réponse à un stress ont été évaluées et sont présentées dans le tableau XXV pour l'exposition au cadmium et dans le tableau XXVI pour l'exposition à l'arsenic.

L'exposition des juvéniles au Cd pendant 21 jours induit des altérations sur l'expression de 4 gènes sur 18. Après 4 jours d'exposition au Cd, l'expression de 2 gènes est impactée à  $5 \mu\text{gCd/L}$  : une répression des gènes *bcl2*, codant pour une protéine jouant un rôle important dans la mort cellulaire et *elif2*, ayant un rôle dans la traduction donc la production de protéines. Aucun impact n'a été relevé sur l'expression des gènes des juvéniles exposés à  $2 \mu\text{gCd/L}$ . Après 7 jours d'exposition, d'autres gènes sont impactés. Le gène *mt1*, codant pour la métallothionéine, une protéine impliquée dans la détoxification, est surexprimé après 7 et 21 jours d'exposition aux deux conditions de contamination. Le gène *rad51*, impliqué dans les processus de réparation de l'ADN, est surexprimé après 7 jours d'exposition à  $5 \mu\text{gCd/L}$ . Après 21 jours d'exposition, seul le gène *mt1*, est affecté et surexprimé aux deux conditions de contamination.



**Tableau XXV.** Expression des gènes, exprimée en facteur d'induction par rapport aux témoins, des juvéniles de moule perlière âgés de 16 mois, exposés à 2 et 5 µg/L de cadmium après 4, 7 et 21 jours d'exposition à 16°C.

Fonctions	Gènes	Temps d'exposition					
		4 jours		7 jours		21 jours	
		2 µg/L	5 µg/L	2 µg/L	5 µg/L	2 µg/L	5 µg/L
<b>Métabolisme mitochondrial</b>	<i>12s</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>cox1</i>	/	/	/	/	/	/
<b>Apoptose</b>	<i>bak</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>bcl2</i>	/	0.56*	/	/	/	/
	<i>card11</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>caspase3</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>caspase9</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>p53</i>	/	/	/	/	/	/
<b>Stress oxydant</b>	<i>sod1</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>sod2</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>sod3</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>catalase</i>	/	/	/	/	/	/
<b>Détoxication</b>	<i>gst</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>mt</i>	/	/	1.72*	1.77*	3.05*	4.22*
	<i>mxr</i>	/	/	/	/	/	/
<b>Traduction</b>	<i>eif2</i>	/	0.72*	/	/	/	/
<b>Réparation de l'ADN</b>	<i>rad51</i>	/	/	/	1.09*	/	/
	<i>xrcc4</i>	/	/	/	/	/	/

\*Indique une différence significative par rapport aux témoins (p < 0.05)

FI > 1 = gène réprimé ; FI > 1 = gène surexprimé

L'exposition des juvéniles à l'As pendant 21 jours induit des altérations sur l'expression de 5 gènes sur les 18 étudiés. Après 4 jours d'exposition à l'As, aucun impact sur l'expression des 18 gènes étudiés n'a été relevé pour les deux conditions d'exposition (10 et 35 µgAs/L). Après 7 jours d'exposition, le gène *p53* codant pour la protéine P53, jouant un rôle dans le cycle cellulaire et dans le processus d'apoptose, est surexprimé dans la condition de contamination à 35 µgAs/L. Aucun impact n'a été relevé sur l'expression des 17 autres gènes. Après 21 jours d'exposition, l'expression de 4 gènes est altérée. Le gène *12s*, codant pour l'ARN mitochondrial est réprimé à 10 µg/L mais son expression n'est pas modifiée à la plus grande concentration étudiée (35µg/L). Les gènes *bak* et *caspase3*, impliqués dans le processus d'apoptose, sont réprimés aux deux conditions de contamination. Enfin, le gène *card11*, impliqué également dans le processus de mort cellulaire, est réprimé à 35µgAs/L.

**Tableau XXVI.** Expression des gènes, exprimée en facteur d'induction par rapport aux témoins, des juvéniles de moule perlière âgés de 17 mois, exposés à 10 et 35 µg/L d'arsenic après 4, 7 et 21 jours d'exposition à 16°C.

Fonctions	Gènes	Temps d'exposition					
		4 jours		7 jours		21 jours	
		10µg/L	35 µg/L	10µg/L	35 µg/L	10µg/L	35 µg/L
<b>Métabolisme mitochondrial</b>	<i>12s</i>	/	/	/	/	0.71*	/
	<i>cox1</i>	/	/	/	/	/	/
<b>Apoptose</b>	<i>bak</i>	/	/	/	/	0.79*	0.77*
	<i>bcl2</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>card11</i>	/	/	/	/	/	0.66*
	<i>caspase3</i>	/	/	/	/	0.74*	0.70*
	<i>caspase8</i>	/	/	/	/	/	/
<b>Stress oxydant</b>	<i>p53</i>	/	/	/	1.51*	/	/
	<i>sod1</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>sod2</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>sod3</i>	/	/	/	/	/	/
<b>Détoxication</b>	<i>catalase</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>gst</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>mt</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>mxr</i>	/	/	/	/	/	/
<b>Traduction</b>	<i>eif2</i>	/	/	/	/	/	/
<b>Réparation de l'ADN</b>	<i>rad51</i>	/	/	/	/	/	/
	<i>xrcc4</i>	/	/	/	/	/	/

\*Indique une différence significative par rapport aux témoins (p <0.05)

FI > 1 = gène réprimé ; FI > 1 = gène surexprimé

## 4. Discussion

La mobilité des juvéniles de *M. margaritifera* âgés de 16 et 17 mois, exposés à des concentrations en As et en Cd, représentatives de celles retrouvées dans l'environnement pendant 21 jours, n'est pas affectée puisqu'elle est supérieure à 90%. La présence de Cd mesurée chez les juvéniles témoins (entre 1.7 et 1.9 µg/g, ps), indique une potentielle accumulation chronique de ce métal lors de leur élevage au sein de la ferme aquacole puisque les concentrations en Cd mesurées dans les conditions témoins sont faibles (0.04 µgCd/L). L'exposition des juvéniles au Cd a conduit à une accumulation de cet ETM au sein des organismes de manière dépendante de la dose en contaminant et du temps d'exposition. Ces résultats sont en accord avec une étude menée sur des adultes de *M. margaritifera* où l'accumulation du Cd s'est révélée dose-dépendante (Baudrimont et al. 2020). Les teneurs en Cd mesurées chez les individus témoins après 7 jours d'exposition, sont similaires pour les juvéniles et les adultes, avec des teneurs de 1.4 µg/g, ps et 1.1 µg/g, ps, respectivement. Cependant, pour les conditions de contamination (à 2 et 5 µg/L), l'accumulation du Cd après 7 jours de contamination par les adultes est 2 à 3 fois plus élevée que les teneurs accumulées par les juvéniles soit 4.6 µg/g, ps pour les juvéniles contre 12.4 µg/g, ps pour les adultes, pour une contamination à 2 µg/L et, 8.5 pour les juvéniles contre 17.2 µg/g pour les adultes, pour une contamination à 5 µg/L (Baudrimont et al. 2020). Ces résultats montrent que les capacités d'accumulation des juvéniles sont moins importantes que celles des adultes, ce qui peut être expliqué par leur capacité de filtration respective. Après 4 jours d'exposition, une différence dans l'accumulation du Cd par rapport aux individus témoins est observée à la plus grande concentration d'exposition chez les juvéniles. En parallèle, à l'échelle moléculaire, une répression de l'expression des gènes *bcl2* et *EIF2* est observée pour la même condition de contamination (5µg/L), indiquant un potentiel impact sur le processus d'apoptose et sur la traduction à la suite d'une accumulation plus importante du Cd. Après 7 jours d'exposition, l'accumulation du Cd est significativement différente pour chaque condition de contamination par rapport aux témoins. En parallèle, les réponses transcriptomiques ont montré une surexpression du gène *mt* chez les juvéniles exposés aux deux conditions de contamination, qui par ailleurs indique une réponse tardive des juvéniles puisque les réponses transcriptomiques sont généralement précoces. Ce résultat suggère que les mécanismes de défense des juvéniles ont éventuellement été mis en place pour permettre la séquestration du Cd par les métallothionéines cependant le gène *rad51*, impliqué dans la réparation de

l'ADN, est surexprimé à la plus grande concentration de contamination, indiquant de potentiels impacts sur l'ADN des juvéniles à partir de 5µgCd/L. Après 21 jours d'exposition à des concentrations en Cd de 2 et 5 µg/L, les juvéniles ont accumulé 11.4 et 21.8 µg/g (ps) respectivement, soit environ 2.5 fois plus qu'après 7 jours d'exposition. À l'échelle moléculaire, seul le gène *mt* a été impacté après 21 jours d'exposition aux deux conditions d'exposition. La surexpression de ce gène ainsi que l'absence d'altération au niveau de l'expression des autres gènes, suggèrent une limitation des effets toxiques exercés sur d'autres fonctions biologiques à la suite de la séquestration du Cd par les métallothionéines. Par ailleurs, il est important de noter que l'exposition des juvéniles n'a pas conduit à une altération de l'expression des gènes en relation avec le stress oxydant alors que le Cd est connu pour induire un stress oxydant chez les bivalves (Dovzhenko et al. 2005; Bigot et al. 2011; Yan et al. 2020) et notamment chez les adultes de *M. margaritifera* (Baudrimont et al. 2020). En effet le Cd peut inhiber la chaîne de transfert des électrons et ainsi conduire à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (Wang et al. 2004). L'absence d'impact au niveau de l'expression des gènes en relation avec le stress oxydant chez les juvéniles exposés au Cd peut être expliquée par le rôle antioxydant des métallothionéines (Thornalley and Vašák 1985).

Contrairement au Cd, l'As a été faiblement accumulé par les juvéniles. En effet, bien que les concentrations d'exposition en As soient plus élevées, la teneur maximale en As accumulée par les juvéniles est de 4.7 µg/g (ps) après 21 jours d'exposition à 35 µg/L. Après 7 et 21 jours d'exposition, l'accumulation bien que faible, est néanmoins significative pour cette concentration. Au niveau moléculaire, la répression de gènes qui concernent essentiellement ceux qui codent pour des protéines ayant un rôle dans la mort cellulaire et le métabolisme mitochondrial, a été observée après 7 jours d'exposition à 35µg/L et après 21 jours d'exposition aux deux conditions de contamination. Nous pouvons observer par exemple une répression du gène *12S* marqueur du nombre de mitochondries, alors que le gène de la *cox1* n'est pas modulé. Cette observation indique une baisse du nombre de mitochondries alors que le fonctionnement de la chaîne respiratoire n'est pas modifié, indiquant une potentielle diminution du métabolisme énergétique. En effet, l'arsenate (As V) possède des propriétés biochimiques proche des phosphates (Dixon 1996), pouvant ainsi conduire à des altérations de la synthèse d'ATP (adénosine triphosphate) (Fattorini and Regoli 2004). Parallèlement, les répressions observées au niveau de l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose (*bak*, *p53*, *caspase3* et *card11*) peuvent être liées à cette baisse du métabolisme énergétique ou à

une possible altération des enzymes. En effet, l'arsenite (As III) possède une forte affinité pour les groupements thiols (Tseng 2004), pouvant ainsi induire des modifications sur la structure des protéines (Wang et al. 2004) et conduire à l'inactivation de nombreuses enzymes (Akter et al. 2005). La génération d'un stress oxydant à la suite d'une contamination à l'As, constitue le principal impact observé chez les organismes aquatiques (Bagnyukova et al. 2007; Ventura-Lima, de Castro, et al. 2009; Ventura-Lima, Fattorini, et al. 2009; Ventura-Lima et al. 2011), les rats (Samuel et al. 2005) ou encore sur les lignées cellulaires de poisson (Wang et al. 2004; Seok et al. 2007). Une étude menée sur l'impact de l'arsenic sur un mollusque bivalve marin (*Ruditapes philippinarum*) a montré que l'exposition de *R. philippinarum* à des concentrations en As allant jusqu'à 17 mg /L, conduisait à une augmentation des défenses anti-oxydantes (activité de la superoxyde dismutase et de la catalase) et induisait un stress oxydant (augmentation de la peroxydation lipidique) (Freitas et al. 2016). L'exposition des juvéniles de *M. margaritifera* à l'As pendant 21 jours n'a pas conduit à une altération de l'expression des gènes en relation avec le stress oxydant. Cette observation peut être expliquée par la capacité de l'espèce à réguler cet ETM puisqu'il est faiblement accumulé au sein des juvéniles. Aussi, l'As est un composé complexe dont la toxicité dépend fortement de sa spéciation, ainsi l'absence d'effet sur les capacités anti-oxydantes à l'échelle moléculaire peut être expliquée par la biodisponibilité limitée de l'As ou par les concentrations étudiées, qui n'ont pas conduit à des effets sur le stress oxydant.

Une différence dans les profils d'expression des gènes des organismes exposés à ces deux ETMs, a pu être mise en évidence. L'exposition au Cd a révélé des impacts au niveau de l'expression des gènes codant pour des protéines ayant un rôle dans la détoxification, la réparation de l'ADN, l'apoptose et la traduction, alors que l'exposition à l'As a essentiellement montré un impact sur les gènes de l'apoptose et du métabolisme mitochondrial. De plus, les réponses transcriptomiques des juvéniles semblent être corrélées à la contamination, notamment l'induction du gène *mt* suite à la bioaccumulation du Cd, puisque ce métal est connu pour induire la synthèse de ces protéines (Couillard et al. 1995; Baudrimont et al. 1997; Geng et al. 2015). Cependant, ces réponses se manifestent de manière tardive, soit après 7 et 21 jours d'exposition, alors qu'elles sont considérées comme des réponses précoces à un stress. Cette constatation peut s'expliquer par le métabolisme lent de l'espèce puisqu'elle peut vivre plus d'un siècle et cette observation est en cohérence avec ce qui a été observé chez les adultes de moule perlière (Baudrimont et al. 2020).

## 5. Conclusion

Cette étude est la première à fournir des données sur les effets chroniques de contaminants métalliques sur les juvéniles de *M. margaritifera*. Ce travail a permis d'évaluer les capacités d'accumulation de l'As et du Cd par ces organismes, où le Cd est accumulé au sein des organismes de manière dépendante de la dose et du temps d'exposition, alors que l'As est faiblement accumulé par les jeunes moules. En parallèle, l'approche moléculaire à travers l'expression des gènes a permis d'appréhender les potentiels effets de ces contaminants en concentrations relativement faibles. Des études complémentaires sont cependant nécessaires pour confirmer les effets observés au niveau des réponses d'expression génique comme par exemple le dosage des protéines ou des activités enzymatiques correspondants. Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier l'activité des protéines anti-oxydantes comme la superoxyde dismutase et la catalase ou encore d'évaluer la peroxydation lipidique en réponse à une exposition à l'As puisqu'il a été montré que cet ETM exerçait des effets sur la génération du stress oxydant. Ainsi, au regard des résultats obtenus dans cette étude, les concentrations en As retrouvées dans la Haute-Dronne peuvent potentiellement impacter l'intégrité des cellules et le métabolisme énergétique des juvéniles de *M. margaritifera* et ainsi impacter leur croissance ou leur survie.

## BILAN DU CHAPITRE IV

Les travaux présentés dans ce chapitre constituent les premières études à fournir des connaissances sur les effets chroniques de deux éléments traces métalliques (As et Cd) sur les juvéniles de moule perlière âgés de 17 et 16 mois, respectivement. Les résultats ont permis de souligner 4 points majeurs sur la réponse des juvéniles à une exposition chronique à l'As et au Cd :

- Des réponses tardives des juvéniles à l'échelle moléculaire en réponse à la contamination de chaque ETM, soit à partir de 7 jours d'exposition ;
- Une accumulation dépendante de la dose et du temps d'exposition pour le Cd et une faible accumulation de l'As par les juvéniles ;
- Bien que l'étude de la toxicité aiguë des deux ETMs a montré une forte résistance des juvéniles (**CHAPITRE III**), des effets à l'échelle moléculaire ont pu être relevés pour des concentrations en As et en Cd représentatives du milieu naturel ;
- Les mécanismes de toxicité induits par ces ETMs concernent la voie apoptotique et l'altération du métabolisme énergétique pour l'As, et des dommages à l'ADN, l'apoptose, la traduction et les mécanismes de détoxification pour le Cd.

Les impacts observés dans cette étude ont été induits par des concentrations en As représentatives des concentrations pouvant être retrouvées dans la Haute-Dronne. D'autres études doivent être réalisées pour confirmer les effets sur l'expression des gènes et il serait également intéressant d'étudier les effets de ces contaminants métalliques en combinaison à d'autres facteurs environnementaux représentatifs de la Haute-Dronne comme les nutriments et la température, afin de se rapprocher au mieux des conditions environnementales dans lesquelles les juvéniles sont amenés à être réintroduit à la suite de leur élevage en captivité.

---

## **CHAPITRE V. Effets des nutriments en concentrations environnementales, étudiés seuls ou en mélange, associés à la température, sur l'expression des gènes des juvéniles de moule perlière**





## INTRODUCTION DU CHAPITRE V

Les travaux présentés dans le **chapitre III** ont permis de déterminer les seuils de toxicité aiguë des nitrates et des ortho-phosphates sur les juvéniles de moule perlière âgés de 3 jours et de 13 mois. Ces études ont montré une grande tolérance des juvéniles à de fortes concentrations en nutriments qui sont largement supérieures à celles retrouvées dans l'environnement et ont permis de déterminer les seuils suivants : CE50 = 1081 mgNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L et > 5.68 mgPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L pour les juvéniles âgés de 3 jours, et CE50 entre 1000 et 1500 mgNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L et > 5.01 mgPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L pour les individus âgés de 13 mois. Cependant, ce type de test, réalisé à court terme (96 heures), ne renseigne que sur la sensibilité globale de l'espèce pour un contaminant donné et les seuils obtenus sont basés sur la mobilité des organismes. Pour mieux comprendre l'impact de ces facteurs sur les juvéniles, des expérimentations à plus long-terme et à travers l'étude des effets sub-létaux de ces nutriments et de la température, sont nécessaires. Ainsi, ce chapitre concerne l'étude des effets chroniques induits par les nutriments et la température, sur les juvéniles de moule perlière âgés de 14 à 32 mois. Les différentes études présentées dans ce chapitre ont été mises en place afin d'évaluer l'effet combiné des deux nutriments. De plus, le facteur température a également été étudié seul et en combinaison à une contamination aux nutriments. Les impacts des différents facteurs de stress étudiés dans ce chapitre ont été évalués à l'échelle moléculaire par l'étude des réponses transcriptomiques en lien avec divers processus biologiques connus pour être modulés en réponse à un stress (métabolisme mitochondrial, stress oxydant, apoptose, réparation de l'ADN, immunité et traduction).

## 1. Introduction

L'eutrophisation est le processus par lequel un écosystème aquatique est enrichi en éléments nutritifs (Smith et al. 1999). Dans des conditions naturelles, ce phénomène se produit sur plusieurs milliers d'années, cependant il est aujourd'hui fortement accéléré par les activités anthropiques (Patzner and Müller 2001). Les apports en nutriments au sein des écosystèmes aquatiques sont essentiellement issus des activités agricoles et industrielles ou des rejets d'eaux usées domestiques. Les nutriments tels que le phosphore et l'azote sont essentiels à la croissance des algues et des plantes aquatiques, où le phosphore constitue l'un des facteurs limitant leur développement. Lorsque ces éléments se retrouvent en excès dans l'eau, sous forme d'ortho-phosphates ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) ou de nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), ils contribuent à l'augmentation de la biomasse d'algues benthiques ou en suspension dans l'eau. Cette prolifération importante conduit à des modifications dans la structure et les fonctions de l'écosystème entraînant notamment une dégradation du milieu comme la diminution de l'oxygène dissous ou l'augmentation de la turbidité de l'eau (Smith et al. 1999). Ce déséquilibre peut ainsi conduire à l'altération de la qualité des habitats des organismes aquatiques comme les poissons ou les macro-invertébrés. En conséquence, ces éléments nutritifs font partie des paramètres physico-chimiques permettant d'évaluer la qualité d'une masse d'eau. Le seuil de qualité relatif à la potabilité de l'eau pour les nitrates est fixé à 50mg/L (OMS) alors que pour le seuil de qualité environnementale se référant au risque d'eutrophisation des eaux de surface est fixé à 18mg/L (arrêté du 5 mars 2015). Pour les ortho-phosphates, au-delà d'un seuil fixé à 1 mg/L, la masse d'eau est considérée comme étant excessivement polluée par les phosphates (Genin et al. 2003).

La présence de nutriments dans les rivières à moule perlière est considérée comme l'un des facteurs majeurs affectant les populations de l'espèce. Bauer (1988), a montré à travers une étude réalisée dans le milieu naturel, que l'augmentation des concentrations en nitrates (de 7 à 13  $\text{mgNO}_3^-/\text{L}$ ) était positivement corrélée à la mortalité des adultes de *M. margaritifera* et que le recrutement des juvéniles diminuait en présence de phosphates. De plus, Moorkens (2000), dans une étude menée *in situ*, a estimé des valeurs-guides en nitrates et en ortho-phosphates de 7.5 mg/L et 0.06 mg/L, respectivement, à partir desquelles les populations de moule perlière ne sont plus fonctionnelles (absence de recrutement). À l'heure actuelle, les connaissances sur l'espèce ne permettent pas de définir l'impact toxique de ces nutriments sur la moule perlière et de savoir si ces nutriments agissent de façon directe sur

l'espèce, ou indirectement à travers la dégradation de son habitat. De plus, l'augmentation générale de la température due au réchauffement climatique peut potentiellement impacter non seulement le métabolisme de l'espèce, mais également accentuer les effets de l'eutrophisation puisque l'augmentation de la température favorise également la prolifération des algues. Afin de comprendre l'effet de ces facteurs pouvant conduire au déclin de l'espèce, il est aujourd'hui nécessaire de développer des études expérimentales afin de définir leurs seuils de tolérance à ces différents paramètres.

C'est dans ce contexte que les travaux présentés dans ce chapitre ont été menés. Des expositions à plusieurs facteurs (nutriments et température) étudiés seuls ou en combinaison, ont été réalisées avec des concentrations en nutriments représentatives du milieu naturel et à des températures clés dans le contexte de la Haute-Dronne. Les effets ont porté sur l'étude de l'expression de 15 gènes chez les juvéniles de moule perlière de manière à observer les réponses précoces des moules à ces facteurs et d'en comprendre les principaux mécanismes d'action. Le choix des gènes s'est porté sur leur association à des fonctions biologiques connues pour être altérées en réponse à un stress. Pour cela trois expériences, conduites indépendamment les unes des autres, ont été mises en place :

- **Un test multifactoriel de toxicité subaigüe (expérience 1) :** étude de l'effet des nutriments en concentrations environnementales, étudiés seuls ou en mélange, dans deux conditions de température : 16° et 22°C, après 96 h d'exposition ;
- **Une exposition à différentes températures (expérience 2) :** 16°C, 22°C et 26°C pendant 14 jours ;
- **Un test de toxicité chronique aux nitrates et aux phosphates (expérience 3) :** effets des nutriments étudiés seuls et en mélange à 16°C sur une période de 21 jours.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Juvéniles de moule perlière

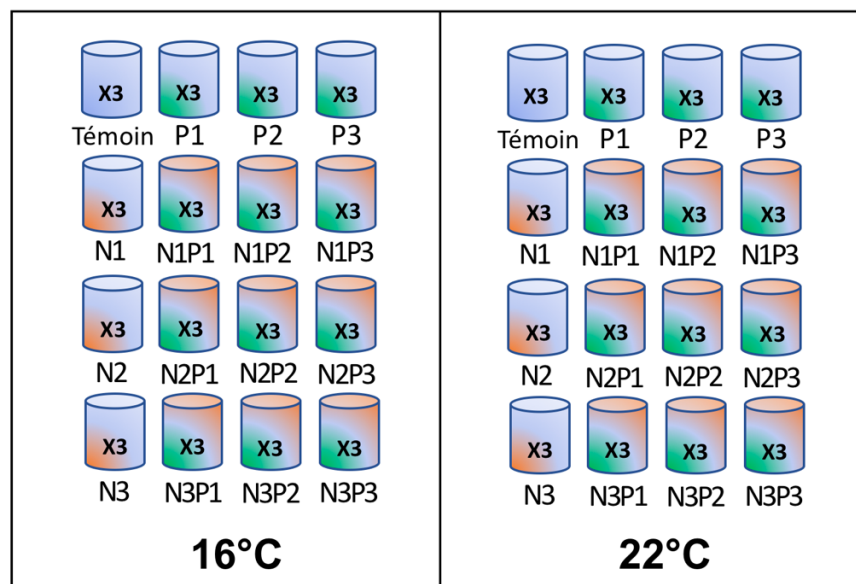
Les organismes sont récoltés à la ferme aquacole de Firbeix et transportés jusqu'au laboratoire de la Station Marine d'Arcachon dans les conditions qui sont décrites dans le **Chapitre II**. Les différentes expérimentations présentées dans ce chapitre ayant été réalisées indépendamment les unes des autres, l'âge des juvéniles utilisés pour chacune de ces expérimentations n'est pas le même.

### 2.2. Test multifactoriel de toxicité subaigüe

Les juvéniles âgés de 14 mois, sont exposés pendant 96 h à différentes conditions où les nutriments sont étudiés seuls ou en mélange :

- Une condition témoin sans nutriments ;
- Deux conditions de températures (16°C et 22°C) ;
- Trois concentrations en nitrates (5, 10 et 50 mg/L) ;
- Et trois concentrations en phosphates (0.05, 0.22 et 1 mg/L).

Soit 32 conditions différentes à raison de 3 réplicats par condition (Figure 24).



**Figure 24.** Représentation schématique du protocole expérimental pour l'exposition multifactorielle avec 5 individus par unité d'expérimentation où chaque condition est mise en place en triplicat (N1, N2 et N3 : nitrates à 5, 10 et 50 mg/L ; P1, P2 et P3 : ortho-phosphates à 0.05, 0.22 et 1 mg/L)

Le choix des concentrations étudiées s'est porté sur des données environnementales : 5 et 10 mg /L correspondant aux concentrations minimale et maximale en nitrates retrouvées dans la Haute-Dronne en 2016 (d'après le système d'information sur l'eau de l'Adour-Garonne, SIE-AG) et 50mg/L correspondant à la norme de potabilité fixé par l'OMS. Pour les phosphates, 0.05 et 0.22 mg/L font également référence aux concentrations minimale et maximale retrouvées dans la Haute-Dronne en 2016 (SIE-AG) et 1 mg/L correspond à la limite au-delà de laquelle on considère qu'un milieu aquatique est excessivement pollué par les phosphates (Genin et al. 2003). En ce qui concerne les températures, le choix s'est basé sur un pic de température de 22°C mesurée en été dans la Haute-Dronne en 2017 et la condition à 16°C correspond à la température moyenne annuelle de la Haute-Dronne et donc à la température « témoin » dans nos expérimentations.

Avant de débiter l'expérience, une partie des juvéniles est soumise à une augmentation progressive de la température afin de les acclimater à la T°C d'exposition de 22°C à raison de 3°C par jour, et l'autre partie est maintenue à 16°C. Lors de cette acclimatation, la totalité des individus est nourrie avec un mélange d'algues d'eau douce (*Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris* et *Stichococcus bacillaris*) à raison d'environ 15 000 cellules algales par mL.

Pour l'expérimentation, les juvéniles sont placés dans des bocaux en verre de 300 mL (5 individus par UE) contenant 1 cm de sable ultra pur de diamètre compris entre 0.8 et 1.4 mm et 150 mL d'eau de la ferme aquacole. Ces UEs sont déjà présentes dans les bains-marie à 16°C ou à 22°C au moment où les juvéniles y sont placés. Les individus ne sont pas nourris pendant l'expérience et les UEs ne sont pas aérées en raison de leur nombre important (96 UEs au total). L'eau des UEs n'est pas renouvelée sur toute la durée de l'expérimentation. La mobilité des individus est évaluée par observation du mouvement du pied durant une période de 5 minutes sous une loupe binoculaire, après 48h d'exposition et à la fin de l'expérience (96 h). Les paramètres physico-chimiques (O<sub>2</sub>, T°C, pH et conductivité) sont mesurés en début et en fin d'expérience. Les échantillons d'eau sont récoltés à t<sub>0j</sub> pour la mesure des concentrations réelles en nutriments dans les UEs. Après 96h d'exposition, les jeunes moules sont placées dans des tubes eppendorf de 2 mL (à raison de 5 juvéniles par tube) contenant 500 µL de RNA later. Les tubes sont placés au réfrigérateur pendant 24 h puis stockés à -20°C jusqu'au moment de l'analyse génétique.

### 2.3. Exposition à différentes températures

Les juvéniles âgés de 19 mois sont exposés pendant 14 jours à différentes températures :

- 16°C, correspondant à la température « témoin » ;
- 22°C, au pic de T°C mesurée dans la Dronne en 2017 ;
- 26°C choisie pour étudier l'effet d'une T°C « extrême » dans le cas de la Haute-Dronne.

Comme pour l'expérience présentée précédemment, avant de débiter l'expérience, les juvéniles sont acclimatés aux différentes températures d'exposition (22°C et 26°C). Pour la condition à 26°C, les juvéniles ont été exposés à une augmentation de 3°C par jour pendant 4 jours. En parallèle, pour la condition à 22°C, les juvéniles ont subi une montée de température de 3°C par jour pendant 2 jours. Pour la condition témoin à 16°C, les organismes n'ont pas subi d'augmentation de température. Lors de cette période d'acclimatation, les juvéniles sont nourris tous les deux jours avec un mélange d'algues d'eau douce à raison d'environ 20 000 cellules algales/mL. Pour maintenir l'eau des UEs aux températures souhaitées, celles-ci sont placées dans des bains-marie à 16, 22 et 26°C, en fonction des conditions de température. Le protocole expérimental est présenté figure 25.

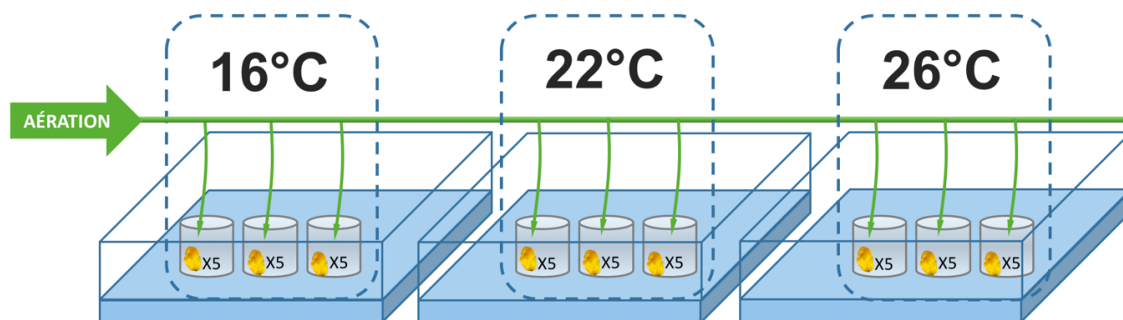


Figure 25. Protocole expérimental mis en place pour l'étude de l'effet de la température

Pour l'expérimentation, les juvéniles sont placés dans des bocaux en verre de 300 ml contenant 200 ml d'eau de la ferme aquacole. Chaque unité d'expérimentation est aérée et contient environ 1 cm de substrat et 5 juvéniles. Chaque condition est répétée 3 fois. Tous les deux jours, les juvéniles sont nourris avec un mélange d'algues d'eau douce (20 000 cellules algales/mL) et l'eau des UEs est renouvelée à 50%. La mobilité des organismes est vérifiée à t<sub>0j</sub>, t<sub>7j</sub> et t<sub>14j</sub>. Les paramètres physico-chimiques de l'eau (O<sub>2</sub>, T°C, pH, Conductivité) sont mesurés à t<sub>0j</sub>, t<sub>3j</sub>, t<sub>7j</sub>, t<sub>9j</sub>, t<sub>11j</sub> et t<sub>14j</sub>. Après 14 jours d'exposition, les jeunes moules sont placées dans des tubes eppendorf de 2 mL (à raison de 5 juvéniles par tube) contenant 500 µL

de RNA later. Les tubes sont placés au réfrigérateur pendant 24 h puis stockés à -20°C jusqu'au moment de l'analyse génétique.

#### 2.4. Test de toxicité chronique aux nitrates et aux phosphates

Les juvéniles âgés de 32 mois, sont exposés à différentes concentrations en nutriments à 16°C et pendant 21 jours. Cette expérience compte 7 conditions (Figure 26):

- Une condition témoin ;
- Deux conditions « nitrate » (10 et 50 mg/L) ;
- Deux conditions « ortho-phosphates » (0.3 et 1 mg/L) ;
- Une condition « modérée » en nutriments étudiés en mélange ( $[\text{NO}_3^-] = 10 \text{ mg/L}$  et  $[\text{PO}_4^{3-}] = 0.3 \text{ mg/L}$ ) ;
- Et une condition « excessive » en nutriments étudiés en mélange ( $[\text{NO}_3^-] = 50 \text{ mg/L}$  et  $[\text{PO}_4^{3-}] = 1 \text{ mg/L}$ ) ;

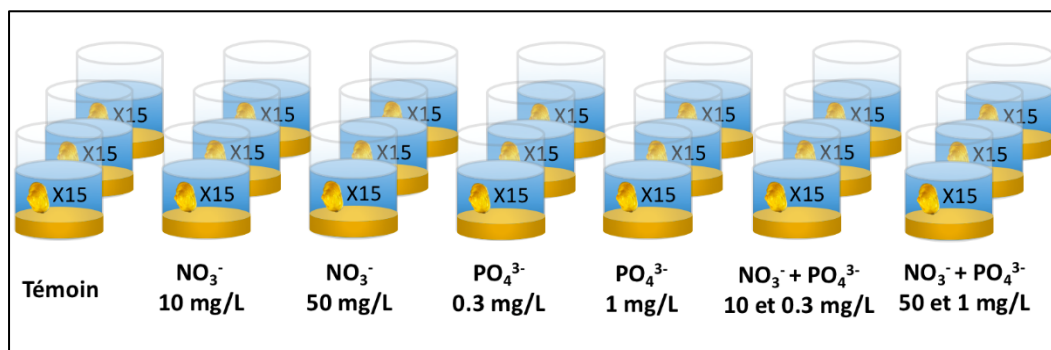


Figure 26. Schéma du protocole expérimental pour le test de toxicité chronique aux nutriments

Dans cette expérimentation, les concentrations en nutriments étudiées ont été choisies pour les mêmes raisons que celles présentées pour le test multifactoriel de toxicité subaiguë (10 mgNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L et 0.3 mgPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L correspondant aux seuils au-delà desquels on considère un milieu aquatique comme étant modérément pollué (Genin et al. 2003) et aux concentrations maximales retrouvées dans la Dronne en 2016 (SIE-AG), 50 mgNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L pour le seuil de qualité de l'eau potable et 1 mgPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L pour le seuil au-dessus duquel on estime qu'un milieu aquatique est excessivement pollué en phosphates).

Pour l'expérimentation, les juvéniles sont placés dans des bocaux en verre de 300 mL contenant 200 mL d'eau de la ferme aquacole. Chaque unité d'expérimentation est aérée et contient environ 1 cm de substrat. Chaque condition est répétée 3 fois et dans chaque UE sont répartis 15 juvéniles. Tous les deux jours, les juvéniles sont nourris avec un mélange d'algues d'eau douce (45000 cellules algales/mL) et l'eau des UEs est renouvelée à 50%. La mobilité est vérifiée à t0j, t7j, t14j et t21j. Les paramètres physico-chimiques de l'eau (O<sub>2</sub> dissous, pH, T°C



et conductivité) sont mesurés t0j, t4j, t7j, t14j et t21j. L'eau des UEs est prélevée pour la mesure des concentrations réelles en nutriments à t0j, t4j, t7j, t14j et t21j. Après 48h, 96h, 7j, 14j et 21j d'exposition, les jeunes moules sont placées dans des tubes eppendorf 2 mL (à raison de 3 juvéniles par tube) contenant 500 µL de RNA later. Les tubes sont ensuite placés au réfrigérateur pendant 24 h puis stockés à -20°C jusqu'au moment de l'analyse génétique.

## 2.5. Analyse génétique

Le protocole d'expérimentation employé pour la préparation des échantillons avant le dosage de l'expression génétique est le même pour les 3 expérimentations présentées dans ce chapitre. Les ARNm sont extraits des échantillons, transcrits en ADNc puis dosés par qPCR. Les différentes étapes du protocole sont présentées dans le **Chapitre II**. Pour chacune des expérimentations présentées dans ce chapitre, l'expression de 15 gènes et d'un gène de référence (*rpl7*), a été étudiée. Ces gènes, ainsi que les fonctions biologiques auxquelles ils sont liés sont présentés dans le Tableau XXVII. Les séquences d'amorces de chaque gène présenté dans ce tableau sont détaillées dans le **Chapitre II – partie 6.2.3**.

Tableau XXVII. Gènes étudiés et leur fonction biologique associée.

Gènes	Fonctions
<i>sod1 (Cu/Zn)</i>	Stress oxydant
<i>sod2 (Mn)</i>	Stress oxydant
<i>sod3 (Cu/Zn)</i>	Stress oxydant
<i>cat</i>	Stress oxydant
<i>cox1</i>	Métabolisme mitochondrial
<i>12s</i>	Métabolisme mitochondrial
<i>mt1</i>	Détoxication
<i>casp9</i>	Apoptose
<i>bak</i>	Apoptose
<i>bcl2</i>	Apoptose
<i>p53</i>	Apoptose/cycle cellulaire
<i>rad51</i>	Réparation de l'ADN
<i>xrcc4</i>	Réparation de l'ADN
<i>c3</i>	Immunité
<i>EIF2</i>	Traduction
<i>rpl7</i>	Référence

## **2.6. Solutions et dosage des nutriments**

La contamination des UEs est réalisée avec une solution mère en nitrates à 10g/L, préparée à partir de sels de nitrates de sodium ( $\text{NaNO}_3$ , Prolabo) dilués dans de l'eau ultra pure (milli-Q), et une solution mère en ortho-phosphates à 0.5 g/L, préparée à partir de sels de phosphates de sodium dibasiques ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Sigma Aldrich) dilués dans de l'eau ultra pure (milli-Q). Les échantillons d'eau récoltés pendant les expérimentations sont filtrés à 0.45  $\mu\text{m}$  puis stockés à  $-20^\circ\text{C}$  jusqu'au moment du dosage. Le dosage est réalisé par analyse en flux continu par segmentation à l'aide du QuAAtro pour les nitrates et à l'aide de l'AA3 pour les ortho-phosphates (**Chapitre II**).

## **2.7. Paramètres physico-chimiques de l'eau**

Les paramètres physico-chimiques (température, pH, conductivité et oxygène dissous) sont mesurés à l'aide de sondes portatives (WTW, Germany): l'oxymètre Profiline Oxi 3205, du pHmètre Profiline pH 3110 et du conductimètre Profiline Cond 3110.

## **2.8. Statistiques**

Pour comparer les données obtenues pour l'expression des gènes (exprimés en facteur d'induction), l'analyse statistique a été réalisée sur l'expression relative des gènes par rapport au gène de référence ( $\Delta\text{Ct}$ ). La comparaison des moyennes est réalisée par une analyse des variances. Pour cela, la normalité de la distribution des données a été vérifiée graphiquement sur les résidus des données. L'homoscédasticité des variances a ensuite été évaluée à l'aide du test de Levène. Lorsque ces deux paramètres sont vérifiés, l'analyse des variances est réalisée à l'aide du test paramétrique ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey. Dans le cas où l'un des deux paramètres n'est pas vérifié, un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis est alors utilisé pour comparer les données, suivi d'un test post-hoc de Dunn (correction de bonferroni).

### 3. Résultats

Pour chacun des travaux présentés dans ce chapitre, la mobilité des organismes est de 100% à la fin de chaque expérimentation.

#### 3.1. Test multifactoriel de toxicité subaigüe

Les valeurs moyennes et les écart-types des différents paramètres physico-chimiques mesurés en début et en fin d'expérience pour les conditions à 16 et 22°C sont présentées dans les tableaux XXVIII et XXIX, respectivement. Ces données ont été mesurées dans deux des trois réplicats en raison du nombre important d'UEs, ce qui peut expliquer les valeurs nulles des écart-types dans les tableaux. Les différences observées dans la conductivité sont dues à l'ajout de sels de nitrates dans les UEs.

Tableau XXVIII. Moyennes et écart-types des paramètres physico-chimiques de l'eau dans chaque condition, en début et en fin d'expérience, pour l'exposition à 16°C (n=2).

Conditions	Début d'expérience								Fin d'expérience							
	Conductivité (µS/cm)		pH		Oxygène dissous (mg/L)		Température (°C)		Conductivité (µS/cm)		pH		Oxygène dissous (mg/L)		Température (°C)	
	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET
Témoin	63	1	7.50	0.14	7.49	0.37	15.8	0.1	68	6	7.39	0	5.87	0.11	15.5	0.1
N1	73	2	7.00	0.02	7.45	0.43	15.8	0.1	73	2	6.35	0.06	5.74	0.28	15.4	0.1
N2	80	1	6.77	0.08	7.83	0.28	15.9	0.1	77	5	6.57	0.05	6.39	0.37	15.3	0.1
N3	150	1	6.77	0.04	7.44	0.33	15.8	0.1	151	1	6.36	0.08	5.81	0.26	15.4	0.1
P1	63	1	7.43	0.08	7.57	0.46	15.8	0.1	63	1	7.23	0.06	5.84	0.19	15.4	0.1
P2	64	1	7.24	0.09	7.51	0.16	15.9	0	63	1	6.63	0	5.68	0.01	15.5	0.1
P3	64	1	7.17	0.03	7.52	0.04	15.8	0	64	1	6.51	0.10	5.86	0.08	15.3	0.1
N1P1	72	1	7.00	0.04	7.54	0.21	15.8	0.1	72	1	6.42	0.03	6.50	0.01	15.3	0
N1P2	73	1	6.95	0.01	7.72	0.03	15.7	0	72	1	7.27	0.18	6.71	0.23	15.4	0.1
N1P3	74	1	6.90	0.01	7.59	0.32	15.7	0	74	1	6.96	0.04	6.72	0.54	15.3	0.1
N2P1	81	1	6.81	0.04	7.75	0.31	15.7	0	81	1	6.44	0.08	6.43	0.28	15.4	0.1
N2P2	81	1	6.83	0.03	7.66	0.04	15.7	0	81	1	6.47	0.04	5.99	0.18	15.3	0
N2P3	82	1	6.81	0	7.74	0.06	15.7	0	82	1	6.54	0.11	5.92	0.42	15.4	0
N3P1	152	1	6.76	0.01	7.83	0.35	15.8	0.1	152	1	6.39	0.11	6.03	0.16	15.3	0.1
N3P2	152	1	6.78	0.28	7.38	0.28	15.7	0	152	1	6.41	0.04	5.91	0.30	15.4	0
N3P3	154	1	6.97	0.03	7.62	0.28	15.7	0	154	1	6.36	0.08	6.21	0.13	15.4	0

M= moyennes ; ET : écart-types ; N1, N2 et N3 : nitrates à 5, 10 et 50 mg/L ; P1, P2 et P3 : ortho-phosphates à 0.05, 0.22 et 1 mg/L ;

Tableau XXIX. Moyennes et écart-types des paramètres physico-chimiques de l'eau dans chaque condition, en début et en fin d'expérience, pour l'exposition à 22°C (n=2).

Conditions	Début d'expérience								Fin d'expérience							
	Conductivité (µS/cm)		pH		Oxygène dissous (mg/L)		Température (°C)		Conductivité (µS/cm)		pH		Oxygène dissous (mg/L)		Température (°C)	
	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET	M	ET
Témoin	64	1	7.28	0.05	7.38	0.51	22.0	0	64	1	7.30	0.15	5.32	0.01	21.7	0.1
N1	73	1	6.75	0.07	6.77	0.10	21.9	0	73	1	6.45	0.03	5.08	0.08	21.7	0.1
N2	82	1	6.64	0.02	6.68	0.37	22.0	0	83	1	6.40	0.04	5.36	0.16	21.7	0.1
N3	148	1	6.50	0	6.71	0.16	22.0	0	150	1	6.34	0.08	5.72	0.54	21.6	0
P1	63	1	7.11	0.07	6.72	0.13	22.0	0.1	63	1	7.05	0.06	5.59	0.01	21.6	0
P2	64	1	7.01	0.01	6.87	0.26	21.8	0	65	4	6.65	0	5.80	0.26	21.6	0
P3	64	1	6.94	0.05	6.87	0.16	21.9	0	65	1	6.62	0.03	5.67	0.14	21.5	0
N1P1	74	1	7.03	0.04	6.67	0.30	21.9	0	74	1	6.43	0.02	5.63	0.21	21.6	0
N1P2	73	1	6.81	0.08	6.72	0.03	21.9	0.1	73	1	6.50	0.04	5.75	0.13	21.6	0
N1P3	74	1	6.74	0.01	6.75	0.06	21.9	0	74	1	6.50	0.06	5.61	0.13	21.6	0.1
N2P1	81	1	6.60	0.04	6.79	0.33	22.0	0.1	82	1	6.52	0.05	5.53	0	21.6	0
N2P2	81	1	6.64	0.04	6.88	0.07	21.9	0.1	81	1	6.50	0.03	5.81	0.13	21.6	0
N2P3	82	1	6.62	0.02	6.85	0.06	21.9	0.1	82	1	6.56	0.06	5.86	0.04	21.6	0
N3P1	152	2	6.60	0.01	6.77	0.34	21.9	0.1	154	2	6.42	0.05	5.94	0.20	21.6	0
N3P2	153	1	6.57	0.01	6.82	0.10	21.9	0	154	1	7.07	0.08	5.69	0.19	21.6	0
N3P3	153	1	6.63	0.05	6.64	0.04	21.9	0.1	155	2	6.61	0.03	5.68	0.02	21.6	0

M= moyennes ; ET : écart-types ; N1, N2 et N3 : nitrates à 5, 10 et 50 mg/L ; P1, P2 et P3 : ortho-phosphates à 0.05, 0.22 et 1 mg/L ;

Les concentrations nominales et réelles en nutriments dans les UEs pour chaque condition de température en début d'expérience, sont présentés dans les tableaux XXX et XXXI, pour les ortho-phosphates et les nitrates, respectivement. Ces résultats montrent la présence des deux nutriments dans l'eau utilisée pour cette expérimentation (eau de la ferme aquacole) soit 0.03 mgPO<sub>4</sub><sup>3-</sup> /L pour les ortho-phosphates et environ 2.5 mgNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L pour les nitrates. En ce qui concerne les UEs contaminées, les concentrations réelles en nutriments sont proches des concentrations nominales.

**Tableau XXX.** Concentrations nominales et réelles (moyennes  $\pm$  écart-types) en ortho-phosphates en mg/L pour chaque condition de contamination et de température (16 et 22°C) en début d'expérience (n=3).

Conditions	Concentrations nominales (mg/L)	Concentrations réelles en $\text{PO}_4^{3-}$ (mg/L)	
		16°C	22°C
Témoins	0	0.03 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01
N1	0	0.03 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01
N2	0	0.03 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01
N3	0	0.03 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01
P1	0.05	0.03 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01
P2	0.22	0.28 $\pm$ 0.01	0.24 $\pm$ 0.04
P3	1	0.80 $\pm$ 0.04	0.74 $\pm$ 0.04
N1P1	0.05	0.03 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01
N1P2	0.22	0.28 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01
N1P3	1	0.93 $\pm$ 0.13	0.95 $\pm$ 0.04
N2P1	0.05	0.03 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01
N2P2	0.22	0.26 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.01
N2P3	1	0.84 $\pm$ 0.09	0.77 $\pm$ 0.08
N3P1	0.05	0.04 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01
N3P2	0.22	0.27 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01
N3P3	1	1.12 $\pm$ 0.06	0.75 $\pm$ 0.03

N1, N2 et N3 : nitrates à 5, 10 et 50 mg/L ; P1, P2 et P3 : ortho-phosphates à 0.05, 0.22 et 1 mg/L ;

**Tableau XXXI.** Concentrations nominales et réelles (moyennes  $\pm$  écart-types) en nitrates en mg/L pour chaque condition de contamination et de température (16 et 22°C) en début d'expérience (n=3).

Conditions	Concentrations nominales (mg/L)	Concentrations réelles en $\text{NO}_3^-$ (mg/L)	
		16°C	22°C
Témoins	0	2.6 $\pm$ 0.03	2.4 $\pm$ 0.03
N1	5	6.6 $\pm$ 0.1	6.1 $\pm$ 0.6
N2	10	10.2 $\pm$ 0.2	9.9 $\pm$ 0.6
N3	50	45 $\pm$ 1	40 $\pm$ 5
P1	0	2.5 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.2
P2	0	2.6 $\pm$ 0.1	2 $\pm$ 0.25
P3	0	2.4 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.2
N1P1	5	6.5 $\pm$ 0.1	5.6 $\pm$ 0.6
N1P2	5	6.6 $\pm$ 0.3	6.1 $\pm$ 0.1
N1P3	5	7.1 $\pm$ 0.1	6.6 $\pm$ 0.6
N2P1	10	10.3 $\pm$ 0.1	9.3 $\pm$ 0.6
N2P2	10	10.3 $\pm$ 0.1	8.9 $\pm$ 1.1
N2P3	10	11.7 $\pm$ 0.3	9.9 $\pm$ 1.5
N3P1	50	45 $\pm$ 3	41 $\pm$ 2
N3P2	50	44 $\pm$ 2	42 $\pm$ 2
N3P3	50	44 $\pm$ 1	42 $\pm$ 1

N1, N2 et N3 : nitrates à 5, 10 et 50 mg/L ; P1, P2 et P3 : ortho-phosphates à 0.05, 0.22 et 1 mg/L ;

Les facteurs d'induction des gènes par rapport aux témoins en fonction des différentes conditions de contamination par les nutriments sont présentés dans le tableau XXXII pour l'exposition à 16°C et dans le tableau XXXIII pour l'exposition à 22°C.

À 16°C, lorsque les nutriments sont étudiés seuls, aucune modification dans l'expression des gènes par rapport aux témoins n'a été observée. Lorsque les nutriments sont étudiés en mélange, seuls deux gènes sur les 15 étudiés voient leur expression modifiée. On peut noter une répression du gène *bcl2*, marqueur de l'apoptose, dans la condition à 50 mgNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L + 0.22 mgPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L. On observe une surexpression du gène *sod3(Cu/Zn)* dans les conditions à 5 mgNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L + 0.05 mgPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L, à 5 mgNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L + 1 mgPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L et à 10 mgNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L + 0.05 mgPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L, montrant la potentielle induction d'un stress oxydant.

**Tableau XXXII.** Facteurs d'induction par rapport aux témoins, des juvéniles exposés aux différentes conditions de contamination par les nutriments étudiés seuls ou en mélange et à 16°C (n=3).

Fonctions	Gènes	N1	N2	N3	P1	P2	P3	N1P1	N1P2	N1P3	N2P1	N2P2	N2P3	N3P1	N3P2	N3P3
<b>Métabolisme mitochondrial</b>	<i>12S</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	<i>cox1</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Apoptose</b>	<i>bak</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	<i>bcl2</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	<b>0.68</b>	/
	<i>casp9</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	<i>p53</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Stress oxydant</b>	<i>sod1(Cu/Zn)</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	<i>sod2(Mn)</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	<i>sod3(Cu/Zn)</i>	/	/	/	/	/	/	<b>3.02</b>	/	<b>2.65</b>	<b>2.34</b>	/	/	/	/	/
	<i>cat</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Traduction</b>	<i>elf2</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Détoxication</b>	<i>mt1</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Immunité</b>	<i>c3</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Réparation de l'ADN</b>	<i>rad51</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	<i>xrcc4</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Les facteurs d'induction présentés dans ce tableau sont significativement différents des témoins (p<0.05) ; N1, N2 et N3 : nitrates à 5, 10 et 50 mg/L ; P1, P2 et P3 : ortho-phosphates à 0.05, 0.22 et 1 mg/L.

Lorsque les juvéniles sont exposés dans les mêmes conditions de contamination à 22°C, aucun n'impact n'est observé lorsque les nutriments sont étudiés séparément. Lorsque les nutriments sont étudiés en mélange, des différences par rapport aux témoins sont observées sur l'expression de 5 gènes: *12S*, *cox1*, *p53*, *elf2* et *xrcc4*, montrant un potentiel impact sur le métabolisme mitochondrial, l'apoptose, la traduction et la réparation de l'ADN.

**Tableau XXXIII.** Facteurs d'induction par rapport aux témoins, des juvéniles exposés aux différentes conditions de contamination par les nutriments étudiés seuls ou en mélange et à 22°C.

Fonctions	Gènes	N1	N2	N3	P1	P2	P3	N1P1	N1P2	N1P3	N2P1	N2P2	N2P3	N3P1	N3P2	N3P3
<b>Métabolisme mitochondrial</b>	<i>12S</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	<b>2.78</b>	/	/	/	/	/
	<i>cox1</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	<b>1.82</b>	/	<b>1.82</b>	/	/
<b>Apoptose</b>	<i>bak</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	<i>bcl2</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	<i>casp9</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	<i>p53</i>	/	/	/	/	/	/	/	<b>0.61</b>	/	/	/	/	<b>1.56</b>	/	/
<b>Stress oxydant</b>	<i>sod1(Cu/Zn)</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	<i>sod2(Mn)</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	<i>sod3(Cu/Zn)</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	<i>cat</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Traduction</b>	<i>eif2</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	<b>1.47</b>	/	<b>1.98</b>	<b>1.85</b>	<b>1.61</b>	<b>1.69</b>	<b>1.61</b>
<b>Détoxication</b>	<i>mt1</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Immunité</b>	<i>c3</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>Réparation de l'ADN</b>	<i>rad51</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	<i>xrcc4</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	<b>1.62</b>	/	/	/	/

Les facteurs d'induction présentés dans ce tableau sont significativement différents des témoins ( $p < 0.05$ ) ; N1, N2 et N3 : nitrates à 5, 10 et 50 mg/L ; P1, P2 et P3 : ortho-phosphates à 0.05, 0.22 et 1 mg/L.

### 3.2. Exposition à différentes températures

Les valeurs moyennes ( $\pm$  écart-types), minimales et maximales des paramètres physico-chimiques mesurées lors de l'expérimentation sont présentées dans le tableau XXXIV.

**Tableau XXXIV.** Moyennes  $\pm$  écart-types des paramètres physico-chimiques de l'eau pour chaque condition de température. Les « n » représentent le nombre de valeurs sur lesquelles les moyennes ont été calculées, soit le nombre de mesures effectuées.

Conditions	Oxygène (mg/L) (n=6)		Température (°C) (n=6)		Conductivité ( $\mu$ S/cm) (n=3)		pH (n=3)	
	Moy $\pm$ ET	(min - max)	Moy $\pm$ ET	(min - max)	Moy $\pm$ ET	(min - max)	Moy $\pm$ ET	(min - max)
<b>T°C = 16°C</b>	9.11 $\pm$ 0.34	(8.83 - 9.67)	15.8 $\pm$ 0.3	(15.4 - 16.1)	66 $\pm$ 4	(61 - 69)	7.14 $\pm$ 0.06	(7.07 - 7.2)
<b>T°C = 22°C</b>	7.62 $\pm$ 0.25	(7.35 - 8.08)	22.1 $\pm$ 0.3	(21.6 - 22.4)	76 $\pm$ 8	(69 - 85)	7.24 $\pm$ 0.06	(7.2 - 7.31)
<b>T°C = 26°C</b>	6.94 $\pm$ 0.42	(6.51 - 7.69)	25.5 $\pm$ 0.2	(25.2 - 25.8)	98 $\pm$ 22	(79 - 122)	7.15 $\pm$ 0.06	(7.1 - 7.22)

Moy : moyennes ; ET : écart-types ;

Les facteurs d'induction des gènes chez les juvéniles exposés à 22 et 26°C, par rapport à l'expression des gènes chez les juvéniles exposés à 16°C sont présentés dans le Tableau XXXV. Sur les 15 gènes étudiés, seuls deux gènes ont été modulés. L'expression des gènes *sod3(Cu/Zn)* (stress oxydant) et *xrcc4* (réparation de l'ADN) est significativement induite chez les juvéniles exposés à 26°C, alors que les individus exposés à 22°C ne présentent aucune modification d'expression des 15 gènes étudiés.

**Tableau XXXV.** Facteurs d'induction de 15 gènes de juvéniles exposés à 22 et 26°C pendant 14 jours par rapport à l'expression de ces mêmes gènes chez les juvéniles témoins exposés à 16°C.

Fonctions	Gènes	22°C	26°C
<b>Métabolisme mitochondrial</b>	<i>12s</i>	/	/
	<i>cox1</i>	/	/
<b>Apoptose</b>	<i>bak</i>	/	/
	<i>bcl2</i>	/	/
	<i>casp9</i>	/	/
	<i>p53</i>	/	/
<b>Stress oxydant</b>	<i>sod1(Cu-Zn)</i>	/	/
	<i>sod2(Mn)</i>	/	/
	<i>sod3(Cu-Zn)</i>	/	2.15
	<i>cat</i>	/	/
<b>Traduction</b>	<i>eif2</i>	/	/
<b>Détoxication</b>	<i>mt</i>	/	/
<b>Immunité</b>	<i>c3</i>	/	/
<b>Réparation de l'ADN</b>	<i>rad51</i>	/	/
	<i>xrcc4</i>	/	2.09

Les facteurs d'induction présentés dans ce tableau sont significativement différents des témoins ( $p < 0.05$ ).

### 3.3. Test de toxicité chronique aux nutriments

Les valeurs moyennes  $\pm$  écart-types des paramètres physico-chimiques mesurés à différents temps pendant l'expérience dans les différentes conditions, sont présentées dans le Tableau XXXVI.

**Tableau XXXVI.** Moyennes  $\pm$  écart-types ( $n=3$ ) des paramètres physico-chimiques de l'eau dans chaque condition en fonction du temps.

Paramètres	Temps	Témoins	N1	N2	P1	P2	N1P1	N2P2
<b>Température (°C)</b>	t0j	16.6 $\pm$ 0.1	16.4 $\pm$ 0.2	16.3 $\pm$ 0.1	16.5 $\pm$ 0.1	16.3 $\pm$ 0.1	16.4 $\pm$ 0.1	16.4 $\pm$ 0.1
	t4j	16.1 $\pm$ 0.1	15.9 $\pm$ 0.1	15.9 $\pm$ 0.1	15.9 $\pm$ 0.1	16 $\pm$ 0.1	16 $\pm$ 0.1	16.1 $\pm$ 0.1
	t7j	15.4 $\pm$ 0.2	15.3 $\pm$ 0.1	15.3 $\pm$ 0.1	15.3 $\pm$ 0.1	15.2 $\pm$ 0.1	15.3 $\pm$ 0.1	15.3 $\pm$ 0
	t14j	15.4 $\pm$ 0.1	15.4 $\pm$ 0.1	15.3 $\pm$ 0	15.4 $\pm$ 0.1	15.4 $\pm$ 0.1	15.4 $\pm$ 0	15.4 $\pm$ 0
	t21j	16 $\pm$ 0.1	15.9 $\pm$ 0.1	15.9 $\pm$ 0	15.9 $\pm$ 0.1	15.8 $\pm$ 0.1	15.9 $\pm$ 0.1	15.9 $\pm$ 0
<b>Conductivité (<math>\mu</math>S/cm)</b>	t0j	61 $\pm$ 1	79 $\pm$ 1	152 $\pm$ 1	60 $\pm$ 1	61 $\pm$ 1	78 $\pm$ 1	150 $\pm$ 1
	t4j	69 $\pm$ 2	78 $\pm$ 1	150 $\pm$ 1	59 $\pm$ 1	60 $\pm$ 1	77 $\pm$ 1	150 $\pm$ 1
	t7j	59 $\pm$ 1	78 $\pm$ 1	152 $\pm$ 1	59 $\pm$ 1	61 $\pm$ 1	78 $\pm$ 1	158 $\pm$ 1
	t14j	64 $\pm$ 3	80 $\pm$ 1	172 $\pm$ 11	65 $\pm$ 4	68 $\pm$ 3	84.4	166 $\pm$ 11
	t21j	60 $\pm$ 7	80 $\pm$ 2	167 $\pm$ 9	62 $\pm$ 1	64 $\pm$ 2	83 $\pm$ 4	154 $\pm$ 6
<b>Oxygène dissous (mg/L)</b>	t0j	7.10 $\pm$ 0.11	7.24 $\pm$ 0.28	7.26 $\pm$ 0.23	6.96 $\pm$ 0.11	7.2 $\pm$ 0.27	7.2 $\pm$ 0.36	7.23 $\pm$ 0.16
	t4j	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	t7j	7.32 $\pm$ 0.17	6.99 $\pm$ 0.14	7.18 $\pm$ 0.15	7 $\pm$ 0.16	7.38 $\pm$ 0.25	6.87 $\pm$ 0.16	7.21 $\pm$ 0.19
	t14j	7.09 $\pm$ 0.21	7.23 $\pm$ 0.09	6.86 $\pm$ 0.08	7.27 $\pm$ 0.07	7.24 $\pm$ 0.31	7.22 $\pm$ 0.06	6.96 $\pm$ 0.17
	t21j	7.1 $\pm$ 0.35	6.92 $\pm$ 0.3	6.93 $\pm$ 0.23	7.43 $\pm$ 0.34	7.42 $\pm$ 0.11	6.96 $\pm$ 0.14	7.26 $\pm$ 0.11
<b>pH</b>	t0j	7.32 $\pm$ 0.09	7.14 $\pm$ 0.01	7.06 $\pm$ 0.03	6.48 $\pm$ 0.09	6.65 $\pm$ 0.01	6.38 $\pm$ 0.10	6.73 $\pm$ 0.12
	t4j	7.62 $\pm$ 0.15	7.33 $\pm$ 0.02	7.11 $\pm$ 0.02	6.91 $\pm$ 0.05	6.86 $\pm$ 0.05	6.67 $\pm$ 0.04	6.83 $\pm$ 0.09
	t7j	7.32 $\pm$ 0.04	7.10 $\pm$ 0.03	7.01 $\pm$ 0.05	6.92 $\pm$ 0.04	6.93 $\pm$ 0.02	6.86 $\pm$ 0.03	6.92 $\pm$ 0.06
	t14j	6.63 $\pm$ 0.03	6.79 $\pm$ 0.07	6.86 $\pm$ 0.04	6.77 $\pm$ 0.03	6.76 $\pm$ 0.03	6.69 $\pm$ 0.03	6.79 $\pm$ 0.1
	t21j	7.3 $\pm$ 0.1	7.24 $\pm$ 0.11	7.03 $\pm$ 0.03	6.9 $\pm$ 0.05	6.91 $\pm$ 0.07	6.76 $\pm$ 0.03	6.80 $\pm$ 0.08

nd : pas de mesure ; N1 et N2 : nitrates à 10 et 50 mg/L ; P1 et P2 : 0.3 et 1 mg/L



Après 4 jours d'exposition, l'oxygène dissous n'a pas été mesuré en raison d'un problème technique rencontré avec la sonde de mesure. Les différences observées dans la conductivité sont dues à l'ajout de sels de nitrates dans les UEs.

Les concentrations nominales et réelles (moyennes  $\pm$  écart-types) mesurées dans les UEs pour chaque condition et à chaque temps de prélèvement, sont présentées dans le tableau XXXVII pour les ortho-phosphate et dans le tableau XXXVIII pour les nitrates. Comme pour la première expérience présentée dans ce chapitre, les valeurs mesurées dans les UEs montrent la présence de  $\text{PO}_4^{3-}$  et de  $\text{NO}_3^-$  dans l'eau de la ferme aquacole, entre 0.23 et 0.31 mg/L pour les ortho-phosphates et entre 0.9 et 2.6 mg/L pour les nitrates. Les valeurs ainsi mesurées dans les autres conditions sont légèrement supérieures aux concentrations nominales, notamment pour les ortho-phosphates.

Tableau XXXVII. Concentrations nominales et réelles (moyennes  $\pm$  écart-types) en ortho-phosphates en mg/L pour chaque condition et à chaque temps de prélèvement.

Conditions	Concentrations nominales	Concentrations réelles en $\text{PO}_4^{3-}$ (mg/L) à chaque temps				
		t0j	t4j	t7j	t14j	t21j
Témoin	0	0.24 $\pm$ 0.02	0.31 $\pm$ 0.04	0.27 $\pm$ 0.03	0.27 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.02
N1	0	0.23 $\pm$ 0.001	0.28 $\pm$ 0.01	0.26 $\pm$ 0.01	0.26 $\pm$ 0.01	0.21 $\pm$ 0.03
N2	0	0.22 $\pm$ 0.01	0.26 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0.03	0.24 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.02
P1	0.3	0.51 $\pm$ 0.01	0.55 $\pm$ 0.02	0.52 $\pm$ 0.03	0.56 $\pm$ 0.04	0.46 $\pm$ 0.03
P2	1	1.27 $\pm$ 0.02	1.25 $\pm$ 0.01	1.24 $\pm$ 0.02	1.37 $\pm$ 0.03	1.25 $\pm$ 0.01
N1P1	0.3	0.50 $\pm$ 0.01	0.55 $\pm$ 0.04	0.45 $\pm$ 0.09	0.55 $\pm$ 0.03	0.47 $\pm$ 0.02
N2P2	1	1.23 $\pm$ 0.002	1.31 $\pm$ 0.11	1.25 $\pm$ 0.04	1.45 $\pm$ 0.04	1.33 $\pm$ 0.02

N1 et N2 : nitrates à 10 et 50 mg/L ; P1 et P2 : ortho-phosphates à 0.3 et 1 mg/L

Tableau XXXVIII. Concentrations nominales et réelles (moyennes  $\pm$  écart-types) en nitrates en mg/L pour chaque condition et à chaque temps de prélèvement.

Conditions	Concentrations nominales	Concentrations réelles en $\text{NO}_3^-$ (mg/L)				
		t0j	t4j	t7j	t14j	t21j
Témoin	0	1.7 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.5	2.2 $\pm$ 1.1	2.6 $\pm$ 0.1
N1	10	10.3 $\pm$ 0.4	11 $\pm$ 1	11 $\pm$ 2	11 $\pm$ 1	7.8 $\pm$ 1.1
N2	50	46 $\pm$ 9	57 $\pm$ 12	53 $\pm$ 7	64 $\pm$ 2	76 $\pm$ 3
P1	0	1.1 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.8	2.7 $\pm$ 0.5	2.6 $\pm$ 0.3
P2	0	0.4 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.5
N1P1	10	9.9 $\pm$ 0.2	12 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1	9 $\pm$ 2	7.9 $\pm$ 0.5
N2P2	50	59 $\pm$ 6	59 $\pm$ 2	63 $\pm$ 13	70 $\pm$ 8	64 $\pm$ 11

N1 et N2 : nitrates à 10 et 50 mg/L ; P1 et P2 : ortho-phosphates à 0.3 et 1 mg/L

Sur les 15 gènes étudiés seul le gène *bcl2* est significativement réprimé après 14 jours d'exposition dans la condition N2P2 (nitrates à 50mg/L et ortho-phosphates à 1mg/L). Pour

tous les autres gènes étudiés l'expression ne diffère pas par rapport aux témoins à chaque temps de prélèvement.

## 4. Discussion

Les différentes conditions auxquelles les juvéniles ont été exposés à travers les divers travaux présentés dans cette étude, n'ont pas conduit à la mortalité des organismes. Les résultats obtenus pour l'étude de l'effet de la température seule (expérience 2), montrent que les juvéniles âgés de 19 mois tolèrent des températures de 22 et 26°C sur une période de 14 jours, soit 6 à 10°C de plus que la température moyenne annuelle de la Haute-Dronne. Cependant, bien que la mobilité des organismes ne soit pas affectée, des modifications au niveau de l'expression des gènes a pu être observée. En effet, lorsque les juvéniles sont exposés à 26°C, 2 gènes (*sod3* et *xrcc4*) sur 15 étudiés, présentent à 14 jours une différence dans leur expression par rapport aux juvéniles exposés dans les conditions témoins à 16°C. Le gène *sod3*(Cu/Zn) code pour la superoxyde dismutase extracellulaire (Cu/Zn), une protéine anti-oxydante ayant un rôle dans la régulation des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les ERO sont des radicaux libres naturellement présents dans l'organisme et présentant une grande réactivité biologique qui permet la communication entre les cellules et la défense immunitaire contre des éléments exogènes (Zelko et al. 2002). Il existe un équilibre entre la production d'ERO et les capacités anti-oxydantes des cellules qui sont régies par des enzymes spécifiques (superoxyde dismutase ou catalase). Cependant lorsque cet équilibre est rompu, les capacités anti-oxydantes deviennent inefficaces entraînant ainsi un stress oxydatif (Davies 1995). Ces protéines anti-oxydantes sont considérées comme des biomarqueurs du stress oxydant (Valavanidis et al. 2006). L'exposition des juvéniles à 26°C entraîne une surexpression du gène *sod3*(Cu/Zn) par rapport à ceux exposés à 16°C, montrant ainsi le potentiel impact de la température sur la mise en place d'un stress oxydatif chez les juvéniles. Le stress oxydatif, résultant de la production excessive d'ERO peut conduire à l'oxydation de molécules biologiques (protéines, lipides, acides nucléiques) entraînant ainsi la dégradation des structures cellulaires (Richter 1987; Stadtman and Levine 2000). Le gène *xrcc4* (X-Ray cross complementing 4), codant pour une protéine ayant un rôle dans les voies de réparation de l'ADN double-brin (Thacker and Zdzienicka 2004), est également surexprimé chez les juvéniles exposés à 26°C. L'augmentation de la température semble donc impacter les juvéniles en

induisant un stress oxydant qui en conséquence, a potentiellement conduit à l'altération de l'ADN. Cependant, l'exposition des juvéniles à une température de 22°C n'a conduit à aucune modification dans l'expression des gènes étudiés indiquant une possible existence d'un seuil de température au-delà duquel, le métabolisme de la moule perlière est impacté.

Cette étude a également été réalisée dans le but de déterminer les effets des nutriments en mélange (Test de toxicité chronique aux nutriments, expérience 3). Les résultats ont globalement montré qu'une exposition de 21 jours à des concentrations en nitrates de 10 et 50mg/L, et en ortho-phosphates de 0.3 et 1 mg/L, étudiés seuls et en mélange, et à 16°C, n'entraînait qu'une seule modification dans l'expression des 15 gènes étudiés chez des juvéniles âgés de 32 mois par rapport aux témoins. Seuls les juvéniles exposés aux plus grandes concentrations en nutriments étudiés en mélange, et après 14 jours d'exposition, ont montré une répression au niveau de l'expression du gène *bcl2*. Ce gène code pour la protéine Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) qui joue un rôle important dans le processus d'apoptose puisqu'elle permet de l'inhiber. La répression de ce gène indique alors que le processus d'apoptose peut être déclenché. Cette étude montre donc qu'une exposition de 14 jours à un mélange de nutriments (50 mg/L de nitrates et 1 mg/L d'ortho-phosphates) affecte le mécanisme d'apoptose et peut conduire à la destruction des cellules de l'organisme bien qu'après 21 jours d'exposition, l'expression de ce même gène n'est plus affectée. Dans cette étude, une cinétique des réponses transcriptomiques a été réalisée dans l'optique de déceler les réponses à l'échelle moléculaire qui sont généralement précoces. Cependant, aucune modulation concernant l'expression des gènes étudiés n'a pu être observée après 48h, 96h, 7j, 14j et 21j d'exposition sauf pour le gène *bcl2* après 14 jours d'exposition.

Lorsque les facteurs de contamination aux nutriments et de températures sont étudiés indépendamment les uns des autres (expériences 2 et 3), une faible réponse est observée au niveau moléculaire par rapport aux 15 gènes étudiés dans ce chapitre. Lorsque les nutriments en mélange sont associés à une augmentation de température (expérience 1), le profil d'expression des gènes est différent. En effet, 5 gènes sur 15 sont impactés chez des juvéniles de 14 mois exposés aux nutriments en mélange pendant 96h à 22°C. Les gènes *12s* et *cox1*, qui codent pour l'ARN ribosomique mitochondrial et pour la protéine cytochrome c oxydase 1 (COX-1), respectivement, font référence au métabolisme mitochondrial et par conséquent, au métabolisme énergétique de l'organisme. Ces deux gènes sont surexprimés chez les juvéniles exposés à 22°C (combiné aux nutriments en mélange), indiquant ainsi une possible

augmentation du métabolisme énergétique des individus en réponse au stress combinant les nutriments à la température. Le gène *p53* code pour la protéine TP53 (tumor protein 53) qui est un facteur de transcription permettant la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose, notamment en réponse à des dommages à l'ADN. La modulation de l'expression de ce gène *p53*, ainsi que du gène *xrcc4* chez les juvéniles exposés à 22°C, indique ainsi un potentiel impact au niveau cellulaire (apoptose) et moléculaire (dommage à l'ADN). Enfin, le dernier gène modulé, concerne le gène *eif2* qui code pour une protéine jouant un rôle dans la traduction des ARN messager en protéines. La surexpression de ce gène indique une potentielle production de protéines en réponse au stress induit par les facteurs de contamination aux nutriments associés à l'augmentation de la température. En comparaison, lorsque les juvéniles ont uniquement été exposés à une température de 22°C, aucune modification dans l'expression des gènes n'a été observée.

À travers ces résultats deux hypothèses peuvent être émises : 1) L'absence de réponse au niveau moléculaire lorsque des juvéniles de 19 mois sont exposés à 22°C sans nutriments (expérience 2) peut être due au fait que l'analyse de l'expression des gènes ait été faite après 14 jours d'exposition (contre 96h pour l'exposition aux nutriments associée à la température, expérience 1). En effet, une modulation de ces gènes a pu se manifester avant la fin des 14 jours d'exposition ; 2) L'association du stress température à une contamination aux nutriments (expérience 1), a conduit à un impact significatif au niveau moléculaire. Des études complémentaires sont nécessaires pour affirmer l'effet synergique des nutriments en combinaison d'une augmentation de la température. À contrario, l'exposition à 16°C pour cette expérimentation (expérience 1) peut être comparée aux données obtenues sur les réponses génétiques pour le test de toxicité chronique aux nutriments (expérience 3). Après 96 h d'exposition à 16°C (expérience 1), deux gènes sur 15 ont été modulés, notamment les gènes *bcl2* et *sod3(Cu/Zn)* chez les juvéniles exposés aux nutriments étudiés en mélange. Cependant, les résultats obtenus pour le test de toxicité chronique menée sur 21 jours (expérience 3), n'ont montré aucune modification dans l'expression des 15 gènes après 96 h d'exposition. Cette observation peut être expliquée par la différence d'âge des juvéniles pour les deux expérimentations, soit plus d'un an de différence (19 mois pour le test multifactoriel de toxicité subaiguë et 32 mois pour le test de toxicité chronique). Les juvéniles plus âgés ont pu se montrer moins sensibles au niveau des réponses génétiques à une contamination par les nutriments. Par ailleurs, des différences de sensibilités en fonction de l'âge des jeunes

moûles ont été observées sur les seuils de toxicité aiguë évalués dans une précédente étude (Belamy et al. 2020).

Dans la littérature, très peu de données sont retrouvées sur l'évaluation des effets chroniques des nitrates sur les moules d'eau douce bien que plusieurs études aient permis la détermination des seuils de toxicité aux nitrates pour différentes espèces de moule de la famille des unionidés (Douda 2010; Soucek and Dickinson 2012). Une étude récente a évalué les toxicités aiguës et chroniques des nitrates sur les juvéniles (âgés de 6 à 14 jours) de *Lampsilis siliquoidea* de la famille des Unionidés (Wang et al. 2020). Les résultats de cette étude ont montré une forte tolérance de l'espèce à une contamination aiguë aux nitrates avec un seuil de toxicité de 3000 mgNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L (CE50 à 96h), alors que l'étude des effets chroniques sur 28 jours a montré une perte dans la biomasse de 20% des organismes à partir de 75 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L (EC20 à 28 jours). Ces résultats montrent que même si le seuil de toxicité aiguë des nitrates est relativement élevé, des effets peuvent être observés en concentrations plus faibles, d'où la nécessité d'évaluer les effets sublétaux de la pollution environnementale. Ces résultats suggèrent également la potentielle toxicité des nitrates en tant que contaminant. La toxicité des nitrates relative aux organismes aquatiques concerne le blocage de la fixation de l'oxygène et de son transport dans l'organisme, notamment par la transformation des nitrates en nitrites au sein de l'organisme (Bodansky 1951; Jensen 1996; Cheng and Chen 2002). Cependant, en raison de la faible perméabilité des branchies aux nitrates, l'accumulation des NO<sub>3</sub><sup>-</sup> au sein de l'organisme est plus limitée que celle des nitrites, résultant de la faible toxicité des NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Jensen 1996; Camargo et al. 2005).

## 5. Conclusion

Cette étude est la première à apporter des connaissances sur les effets chroniques des nutriments (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) étudiés seul ou en mélange, et associés à la température, sur les juvéniles de *M. margaritifera*. Les résultats ont montré qu'une exposition aux nutriments en mélange et associés à une augmentation de la température ne conduisait pas à la mortalité des jeunes moules âgés de 14 à 32 mois. Ces travaux ont cependant permis de montrer que la combinaison des deux nutriments en concentrations environnementales conduisait à un impact au niveau des réponses génétiques alors que lorsqu'ils sont étudiés seuls, aucun effet sur l'expression des gènes étudiés n'est observé. De plus, cette étude a montré que l'augmentation de la température accentuait les effets observés au niveau moléculaire

lorsqu'elle est combinée à la présence de nutriments mais également lorsque la température est le seul facteur étudié. Globalement, les nutriments en mélange associés à la température semblent impacter diverses fonctions biologiques telles que l'apoptose, le stress oxydant, la réparation de l'ADN, le métabolisme mitochondrial ainsi que la traduction. D'autres études sont nécessaires pour confirmer les effets observés sur les réponses transcriptomiques, cependant ces données constituent une première approche pour de futures recherches. Dans la Haute-Dronne, les concentrations moyennes en nutriments mesurées entre 2015 et 2019 sont de 6.5 mg/L et 0.08 mg/L pour les nitrates et les ortho-phosphates, respectivement. Ces valeurs moyennes étant relativement proches des concentrations en nutriments étudiés dans cette étude, les résultats suggèrent que dans le cas d'une faible augmentation des apports en nutriments dans la Haute-Dronne combinée à l'augmentation générale de la température due au réchauffement climatique, ces conditions pourraient porter atteintes aux populations de moule perlière et notamment aux juvéniles qui sont considérés comme l'un des stades les plus sensibles de l'espèce (Geist and Auerswald 2007; Geist 2010). D'autres études doivent être réalisées afin de mieux comprendre les mécanismes de toxicité des facteurs étudiés, notamment par des approches protéomiques ou métabolomiques, qui permettront de compléter les résultats obtenus. Ces données apportent néanmoins de nouvelles connaissances sur la sensibilité de *M. margaritifera* relatives aux nutriments et à la température, et sont d'une très grande importance pour les stratégies de conservation de l'espèce puisqu'elles permettront de cibler les zones de réintroduction des juvéniles dans le milieu naturel.

## BILAN DU CHAPITRE V

L'ensemble des travaux présentés dans ce chapitre a permis d'évaluer l'impact des nutriments étudiés seuls et en mélange, associés à la température, et de la température seule, à l'échelle moléculaire sur les réponses transcriptomiques des juvéniles de *M. margaritifera*. Les différentes études de ce chapitre ont permis de mettre en évidence 4 points majeurs sur les effets des nutriments et de la T°C :

- Aucune des conditions d'exposition présentées dans ce chapitre n'a conduit à la mortalité des juvéniles âgés de 14 à 32 mois pour des concentrations en nitrates et en ortho-phosphates allant jusqu'à 50mg/L et 1mg/L, respectivement, et une T°C maximale de 26°C ;
- Pour les juvéniles de 14 mois, les altérations au niveau de l'expression des gènes sont uniquement observées lorsque les nutriments sont étudiés en mélange. Ces effets sont par ailleurs accentués par une augmentation de la température (4 gènes impactés à 22°C contre 2 gènes à 16°C) ;
- En réponse à la température seule, les effets sur l'expression des gènes ont été observés pour une température d'exposition de 26°C alors qu'à 22°C aucun impact n'a été révélé ;
- Pour les juvéniles de 32 mois, seul un gène a été modulé après 14 jours d'exposition aux nutriments étudiés en mélange (aucun impact à 48h, 96h, 7j et 21j d'exposition). Ce résultat indique l'innocuité des nutriments étudiés seuls à l'échelle moléculaire mais également que la sensibilité des juvéniles est dépendante de l'âge.

Ces travaux ont finalement permis d'évaluer l'impact des nutriments et de la température à l'échelle du transcriptome des juvéniles de *M. margaritifera* en montrant l'effet combiné des 3 facteurs ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  et T°C) et l'innocuité des nutriments étudiés seuls. D'autres études doivent être réalisées afin de confirmer les effets observés à l'échelle moléculaire notamment par des études de dosage enzymatique ou de protéines, permettant d'évaluer l'activité physiologique des juvéniles de moule perlière. D'autres types d'études pourraient être intéressantes à exploiter comme par exemple l'étude des effets des facteurs étudiés sur le comportement des juvéniles. Cette méthode permettrait notamment d'établir un lien entre les facteurs de stress et la physiologie des juvéniles.

---

# **CHAPITRE VI. Analyse comportementale : un nouvel outil pour l'évaluation de l'effet des polluants sur la moule perlière**



## INTRODUCTION DU CHAPITRE VI

Dans ce chapitre, le développement d'une méthode permettant l'étude du comportement des juvéniles de moule perlière a été réalisée. L'étude du comportement des organismes a été suggérée comme étant un domaine permettant de lier la physiologie interne de l'organisme à l'environnement externe dans lequel il se trouve (Pyle and Ford 2017). Le comportement des bivalves est généralement évalué par valvométrie sur leur capacité de filtration, leur alimentation ou leur respiration à partir de l'ouverture et de la fermeture de leurs valves (Tran et al. 2003; Andrade et al. 2016; Hartmann et al. 2016; Giari et al. 2017; Charifi et al. 2018). En raison de la faible taille des juvéniles de moule perlière (environ 7 mm à 38 mois), cette méthode ne peut pas être appliquée. C'est dans ce contexte qu'une nouvelle méthode a été développée à partir d'un système de suivi par vidéo (Logiciel Ethovision® et chambre d'observation Daniovisio) communément utilisé pour étudier le comportement natatoire des embryons de poisson (en l'occurrence le Danio, *Danio rerio*). De par sa simplicité et par la possibilité de suivre le comportement de plusieurs organismes à la fois, le choix de cette méthode apparaît comme un outil intéressant à exploiter et à appliquer sur les juvéniles de faible taille. Une mise au point du protocole a été réalisée afin d'appliquer cette méthode aux juvéniles de *M. margaritifera* et a été optimisée pour évaluer la locomotion des organismes (en termes de distance parcourue). Pour valider le protocole d'expérimentation, une exposition des juvéniles à différentes concentrations en NaCl a été réalisée. Le développement de cette méthode a été effectué au sein du laboratoire EPOC sous la direction du Pr. Jérôme Cachot.

### **Article 3. Behavioral assessment: A new tool for the evaluation of the contaminant effects on the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* (L.1758)**

**Tiare BELAMY**, Alexia LEGEAY, Jérôme CACHOT, Christelle CLERANDEAU, Florane LE BIHANIC, Magalie BAUDRIMONT

University of Bordeaux, UMR EPOC CNRS 5805, F-33120 Arcachon and F-33400 Talence, France  
Contact: magalie.baudrimont@u-bordeaux.fr

#### **Abstract**

The lack of knowledge about the sensitivity of the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) to environmental pollution and the rapid decline of its populations in Europe, has led to the need of developing non-destructive experimental protocols in order to assess the impact of such pollution. This species has a complex life cycle within which early life stages are considered to be the most sensitive. This study deals with the development of a methodology for the assessment of juvenile mussels' behavior using an automated video tracking system. Different parameters were determined such as the duration of the recording and the use of the light during the experiment. Moreover, standard locomotion behavior of juveniles was assessed and contamination exposure to sodium chloride as a positive control was conducted in order to validate the experiment protocol developed in this study. Despite the high inter-individual variability of behavioral responses (distance travelled and velocity), this work allowed the development of a valuable protocol since results were repeatable. Moreover, exposure to sodium chloride (0.8 and 1.2 g/L) for 24 hours was found to decrease juveniles' locomotion by almost three-times, thus validating our experimental methodology. This study allowed to provide a new tool for the assessment of contaminants impacts on the endangered freshwater pearl mussel, which could be used as a non-destructive biomarker in order to assess organisms' health in the natural field. Consequently, this will help in the improvement of our knowledge on *M. margaritifera* sensitivity to environmental pollution.

**Keywords:** Behavior, Freshwater pearl mussel juveniles, Ethovision, video tracking system

## 1. Introduction

The freshwater pearl mussel (FWPM) *Margaritifera margaritifera* (L. 1758) is considered to be one of the most endangered freshwater species in Europe (Bogan 1993; Young et al. 2001; Lopes-Lima et al. 2016). The decline of European population of *M. margaritifera* was suggested to be related to over exploitation, habitats modification, water quality degradation, climate change, introduction of non-native species, the decline in fish host population and pollution (Bogan 1993; Young et al. 2001; Strayer et al. 2004; Lopes-Lima et al. 2016; Lopes-Lima et al. 2018). As filter-feeder and sediment living species, the FWPM is especially susceptible to pollutants exposure originating from anthropogenic activities. Environmental pollution was suggested to be a major threat to freshwater mussel populations (Bauer 1988; Bogan 1993; Young et al. 2001; Strayer et al. 2004; Lopes-Lima et al. 2018) but knowledge about *M. margaritifera* sensitivity to pollutants is scarce. Moreover, the FWPM has a long-life span including a complex life cycle for which early life stages were suggested to be the most sensitive stages of the species (Geist and Auerswald 2007; Geist 2010). To our knowledge, only few ecotoxicological studies were conducted on juvenile stages (Taskinen et al. 2011; Belamy et al. 2020) which could be explained by the difficulty to have test organisms due to their endangered status and the related protection laws (Red list IUCN, Bern convention, Habitat directive). Previous studies were based on the assessment of 3-day to 28-month-old juvenile's survival exposed to several contaminants (Taskinen et al. 2011; Belamy et al. 2020). Survival data are useful since it gives an overview on the toxicity of a given contaminant and could help to target the potential reintroduction areas within conservation measures for *M. margaritifera*, however, acute toxicity tests are often known to underestimate the toxic effects of contaminants (Connon et al. 2012). On the contrary, sub-lethal effects are more relevant data and can be studied at various levels of organization from molecular to organism level such as genetic responses, enzyme activity, tissues alterations, endocrine disruption, reproduction, development or organisms' behavior (Connon et al. 2012). Nevertheless, on the one hand, responses at biochemical and cell levels are considered as early warning indicators of contaminant induced-stress but provide no insights into consequences for higher levels of organization. On the other hand, studies on populations and communities do not allow to assess the causal effects induced by contaminants (Weis et al. 2001). Interestingly, behavioral end-points that integrate endogenous and exogenous factors,

can link biochemical and physiological processes, thus reflecting individual- and community-level effects of environmental contamination (Vogl et al. 1999; Brewer et al. 2001).

Behavioral responses have been used for decades, but these studies have previously received much less attention than other end-points such as developmental or reproductive effects (Scott and Sloman 2004). This could be explained by the lack of user-friendly tools allowing to easily assess behavioral end-points such as automatic image acquisition systems. Moreover, it is also due to the scarcity in our understanding of the natural behaviors of many organisms or in the ecological relevance of behavioral responses for inferring higher-level effects such as survival, development and fitness (Kane et al. 2005). However, behavioral ecotoxicology was suggested to emerge as a promising discipline to link the bridge between laboratory and field studies since it allows integrating the organisms' internal physiology and the external conditions of the environment (Pyle and Ford 2017). Behavioral end-points in aquatic ecotoxicology studies can consist on a variety of activities such as avoidance, burrowing, feeding, ventilation or locomotion (Hellou 2011). For aquatic invertebrate organisms such as bivalves, behavior end-points employed in order to study the impact of environmental pollution are mainly based on the assessment of valve closure or burrowing capacity, allowing to study ventilation, feeding and filtration rates (Tran et al. 2003; Legeay et al. 2005). Indeed, mussels keep their shells open for 70-80% of the time for feeding and respiratory processes under normal conditions (Kramer and Foekema 2001). Closing shells of mussels is considered as indicative of escape behavior under stress conditions (de Zwart et al. 1995; Borcharding 2006). However, due to the small size of the FWPM juveniles, which is about 6 mm for 3-years-old juveniles, the study of valve closure as behavioral end-point is impossible to set up.

The aim of this study was then to develop an experimental protocol for the assessment of juvenile mussels' behavior using a video tracking system (Daniovisio) and the software Ethovisio, which are commonly used for the assessment of fish larvae' locomotion. In order to achieve this goal, the first objective was to evaluate the standard locomotor behavior of *M. margaritifera* juveniles as total distance travelled and the velocity, and then the aim was to validate the developed protocol by exposing juvenile mussels to sodium chloride, a chemical known to affect juveniles' mobility (Belamy et al. 2020) and classically used as reference toxicant for freshwater organisms (US Environmental Protection Agency 2002; Valenti 2004).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Juvenile mussels

Juvenile mussels aged of 2 to 3-year-old (*M. margaritifera*), were collected at Firbeix captive rearing facility (Dordogne – France), where they were produced *in vivo* using the brown trout (*Salmo trutta*) as the fish host. For our experiments, organisms were transported in 300 mL plastic boxes to the laboratory of Talence (France), about 200 km away from the facility farm, in a cool box with gel packs ensuring a temperature of about 12°C. Once in the laboratory, plastic boxes containing juveniles were aerated and placed in a 16°C chamber allowing the rise in temperature and organisms' acclimatization for one day. Juveniles were fed daily with a mixture of living freshwater algae (*Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris* and *Stichococcus bacillaris*). Dronne river water, used in experiments and culture water for maintaining the mussels, was collected at the rearing facility and stored at 4°C at the laboratory.

### 2.2. Ethovisio behavior measurement

The Daniovisio Image Analysis System with Ethovision software (Version 12.0 Noldus) is an automated video tracking system. This tool allows quantifying locomotor behavior of the studied organisms such as the total distance travelled and the mean velocity. Multi-well microplates (6, 12, 24 or 48 wells) containing organisms are placed in the recording chamber connected to a thermo-regulation system (Pilot one®, Huber) allowing to cool the water temperature in the test chamber. The system owing an infrared camera allows the use of the light, or not, during the recording.

### 2.3. Protocol development

For the development of the protocol, 12-wells microplates (6.9 mL volume and 22.1 mm diameter, for each well) containing 3 mL of Dronne river water were used. The water temperature in the recording chamber (Daniovisio) was set to 16°C which corresponds to the mean temperature in the Dronne river during the year. Several adjustments were done in order to determine the best conditions for the experimental protocol. The use of the light was evaluated by subjecting 12 FWPM juveniles of 2 years old which sizes were about 4 mm (one individual per well) to a light/dark cycle of 50 min, divided into 10 min dark, 20 min light, and 20 min dark. After that, the best recording duration was assessed by subjecting FWPM for 10

min in the dark then for 30 min in the light. The objective was to determine the duration allowing the assessment of the maximum mussel activity with the most shorter time period because mussels were moving slowly. The experiment was duplicated at one hour apart with the same individuals. During the recording, mussel detection could be missed which was recorded by the software and calculated as percentage subject not found (SNF). By convention, the data for individuals with a SNF of more than 10% were deleted from the final data analysis.

#### **2.4. Standard juvenile mussel's behavior**

In order to determine the standard behavior of juvenile mussels, an experiment was conducted in triplicates with 12 individuals randomly distributed in a 12-well microplate (36 individuals in total), with wells containing 3 mL of Dronne river water at 16°C. All the organisms were 33-month-old and sized 6 mm, when the experiment was conducted. The recording last for 30 minutes with a 10 min dark period for the mussel's acclimatization following a 20 min light period. Distance travelled (mm) and velocity ( $\mu\text{m/s}$ ) were recorded. Moreover, for assessing the mussel size effect on the behavior, length and width of juveniles were measured using image J before the start of the test.

#### **2.5. Sodium chloride exposure**

In order to validate the experimental protocol developed in this study, mussels were exposed for 24 hours to two sodium chloride (NaCl) concentrations (0.8 and 1.2 g NaCl/L) since NaCl is known to affect juveniles of FWPM. Indeed, these two exposure conditions correspond to effective concentrations that affected 50 % and 20% of the population studied (EC50 and EC20) obtained in 96-h acute toxicity tests conducted on 22-month-old juveniles of the FWPM (Belamy et al. 2020). However, lower toxicity thresholds should have been used for our experiment, but we decided to choose these concentrations since in this present study, mussels were one year older, and we expected a lower sensitivity for the latter. Moreover, exposure to NaCl last for 24 hours in the present study, whereas toxicity thresholds were obtained for 96 hours in previous toxicity tests. Experiment was conducted in triplicates and consisted of 3 conditions, two exposures conditions of NaCl and a control. A stock solution of NaCl concentrated at 240 g/L was used for NaCl exposure condition as reagent-grade salt dissolved in de-ionized water (NaCl, reagent grade; USB Corporation, Cleveland, OHIO, USA).

Each replicate contained 12 juveniles (36 individuals per condition). Juvenile mussels were randomly distributed in 50 mL petri dishes (94 mm diameter x 16 mm height) containing 40 mL of Dronne river water without substrate. Petri dishes were placed in a 16°C dark chamber and juveniles were not fed during the experiment. Juveniles were then transferred to 12-wells microplates with 3 mL of solution for behavior assessment. Total distance travelled was assessed using the protocol developed in this study, which was a light/dark cycle of 30 min, divided into 10 min dark and 20 min light. Velocity data results will not be presented for this experiment since both parameters (velocity and distance travelled) were linked and results showed the same tendency. We decided not to study velocity data since distance travelled is more relevant as behavioral end-point for the FWPM, than velocity.

## **2.6. Data analysis**

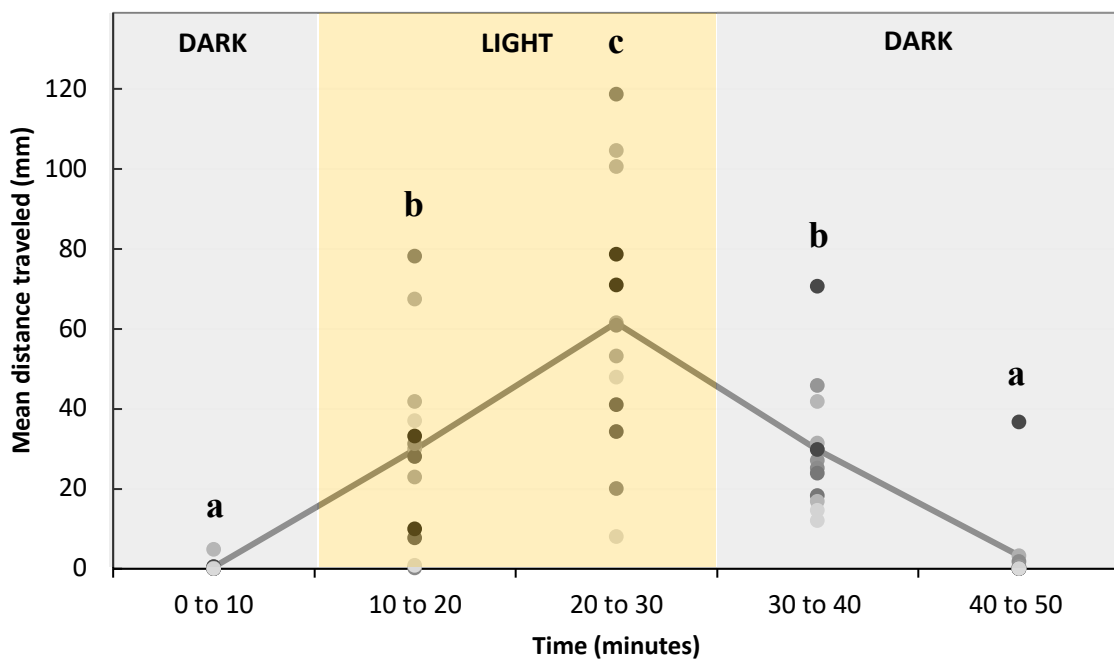
Statistical analyses were performed using RStudio version 1.1.442. Normality and homoscedasticity were checked using the Levene test. Statistical differences were assessed by parametric test as two-way ANOVA with post-hoc analysis using Tukey test or when necessary, by a non-parametric test using Kruskal-wallis test with a post hoc Dunn test (bonferroni method).

### 3. Results

#### 3.1. Development of the protocol

##### *Light effect on juvenile mussel's behavior*

Results for the experiment conducted in order to determine the light effect on juvenile mussels is presented in Figure 27. Results showed that during the dark period, juveniles were not moving at all since no distance travelled were recorded until 10 minutes of recording. At the time when light was turned on, juveniles started to move, and their activity increased to reach a mean distance travelled of about 60 mm after a period of 20 minutes in the light. Then, when light was turned off, juvenile's activity was found to decrease. Dots representing each juveniles' activity showed that inter-individual were highly variable, mainly when juveniles were showing active movements. However, statistical analysis showed significant differences between each time of measurement ( $p < 0.05$ ).



**Figure 27.** Mean distance travelled (mm) by 2-year-old juvenile mussels ( $n=12$ ) in a 50 min tracking video with a 10 min dark period following by 20 min light on and 20 min dark periods at 16°C. Dots correspond to each individual and mean distance travelled at each time is represented by the full line. Letters show significant differences ( $p < 0.05$ ; Kruskal-Wallis).

##### *Assessment of the recording duration*

Results for the experiment conducted in order to assess the maximum mussel's activity as locomotory behavior is presented in Figure 28. Results are expressed as mean distance



travelled in a 10 min period. These results showed that juvenile's activity as distance travelled was proportionally increased in the light condition for a 20 minutes period and then started to reach a plateau by 30 min in the light.

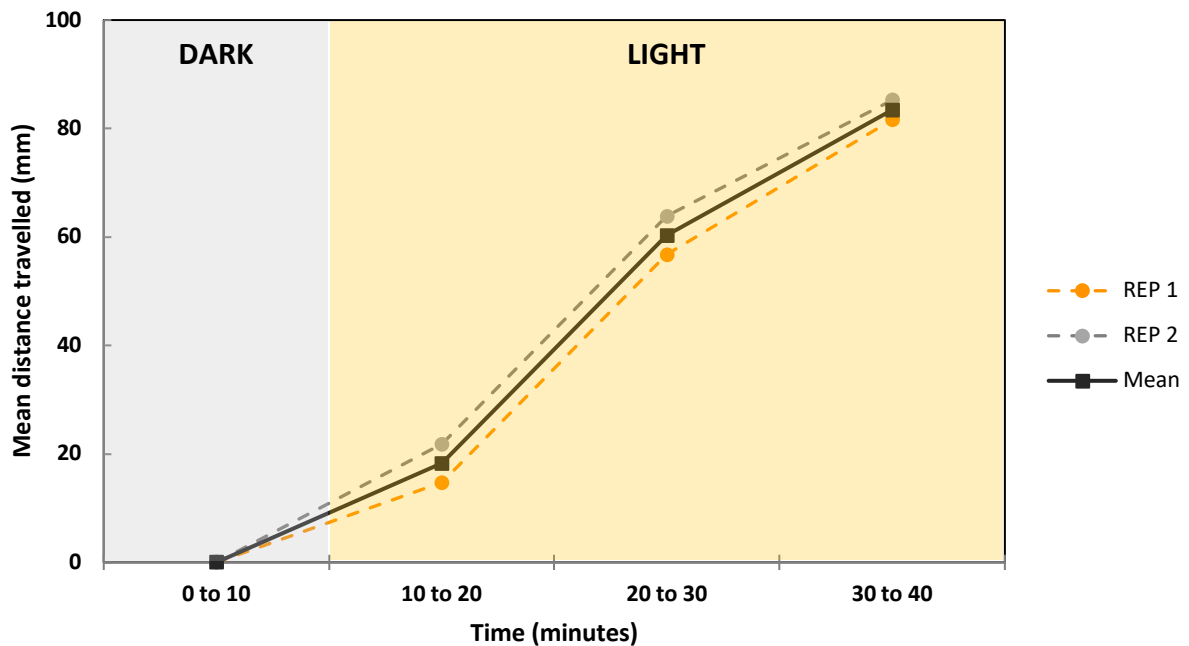
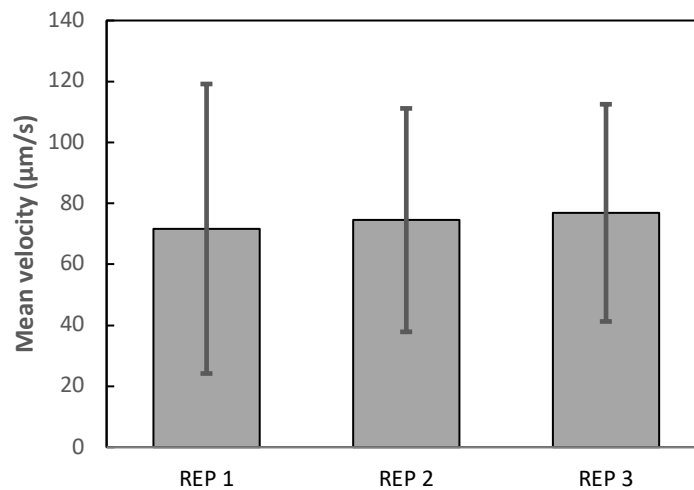


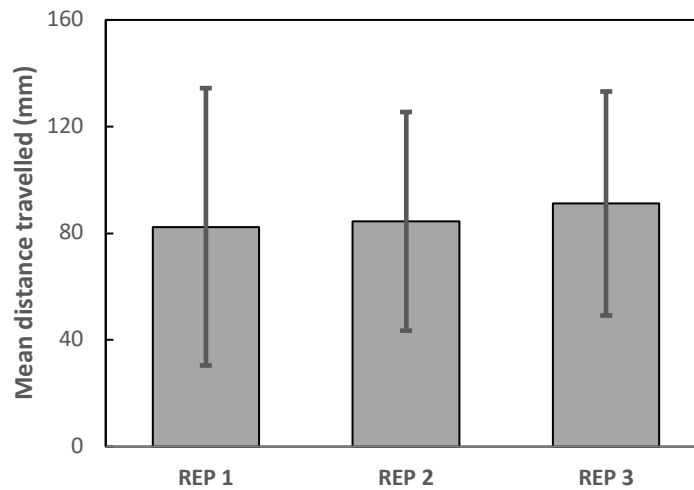
Figure 28. Mean distance travelled (mm) by 2-year-old *M. margaritifera* juveniles (n=12) every 10 min in a 40 min video track recording divided in 10 min dark period following by a 30 min light on period. Dashed lines correspond to two different recording (replicate 1 and replicate 2) assessed with the same individual at one hour of interval. Full dark line corresponds to the mean of both replicates.

### 3.2. Standard behavior of juvenile mussels

Mean velocity ( $\mu\text{m/s}$ ) and mean distance travelled (mm) by *M. margaritifera* juveniles in "control" condition at 16°C for a 20 minutes period of light, are presented in Figure 29 and Figure 30. Results showed that the experiment was repeatable since no differences ( $p > 0.05$ ) were found between the 3 replicates,  $72 \pm 47$ ;  $74 \pm 37$  and  $77 \pm 36$  for mean velocity ( $\mu\text{m/s}$ ), and  $82 \pm 52$ ;  $84 \pm 41$  and  $91 \pm 42$  for mean distance travelled (mm). These results allowed us to assess standard mean velocity and standard mean distance travelled by 3-year-old juvenile mussels during 20 minutes under light exposure, which were about  $74 \mu\text{m/s}$  and 86 mm, for velocity and distance travelled, respectively.



**Figure 29.** Mean velocity ( $\mu\text{m/s} \pm \text{SD}$ ) for 3-year-old *M. margaritifera* juveniles during a “control” experiment at 16°C for 20 minutes period of light. Each bar corresponds to one replicate (n=12). No statistical differences were found between the 3 groups ( $p > 0.05$ ).



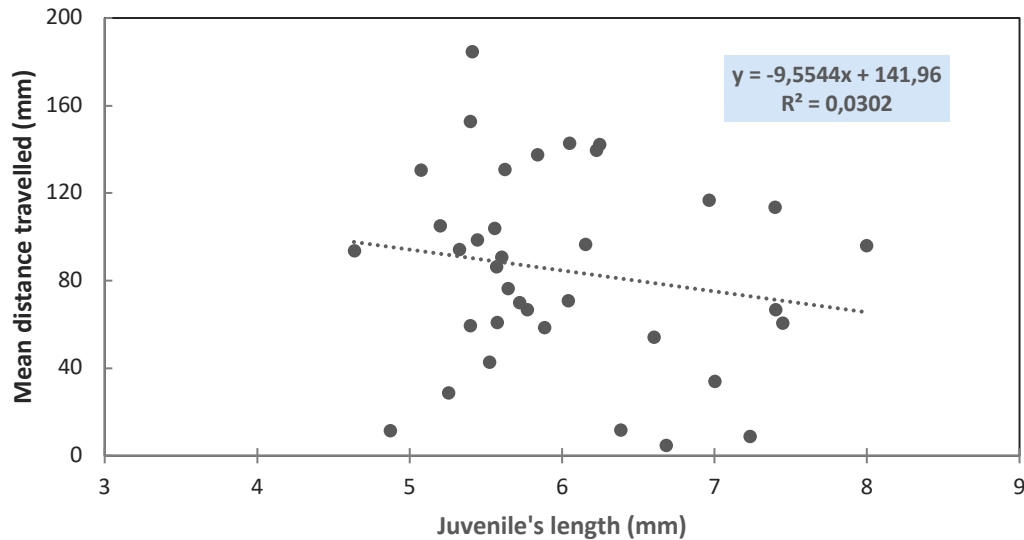
**Figure 30.** Mean distance travelled ( $\text{mm} \pm \text{SD}$ ) for 3-year-old *M. margaritifera* juveniles during a “control” experiment at 16°C for 20 minutes period of light. Each bar corresponds to one replicate (n=12). No statistical differences were found between the 3 groups ( $p > 0.05$ ).

Mean size as length and width of juveniles ( $\text{mm} \pm \text{SD}$ ) are presented in Table XXXIX. Statistical analysis showed that mean size of juveniles (length and width) in REP 3 was significantly different from mean size of REP 1 ( $p < 0.05$ ) but not from REP 2 ( $p > 0.05$ ). The relationship between juvenile’s size (length in mm) and the distance travelled (mm) is presented in Figure 31. These data showed that the behavior of mussel, as the distance travelled, was not related to juvenile’s size since  $R^2$  was largely lower than 1 ( $R^2=0.0302$ ). Similar results were obtained for relationship between mussels’ size and mean velocity with  $R^2= 0.0414$  (Data not show). These findings highlight that mussels’ size is not influencing behavior results.

**Tableau XXXIX.** Mean length and width (mm ± SD) of juvenile mussels in each of the 3 replicates for the assessment of the standard *M. margaritifera* juvenile behavior.

Replicates	Length (mm)	Width (mm)
REP 1 <sup>a</sup>	6.5 ± 0.8	4 ± 0.5
REP 2 <sup>a,b</sup>	6.1 ± 0.8	3.7 ± 0.4
REP 3 <sup>b</sup>	5.4 ± 0.4	3.3 ± 0.3

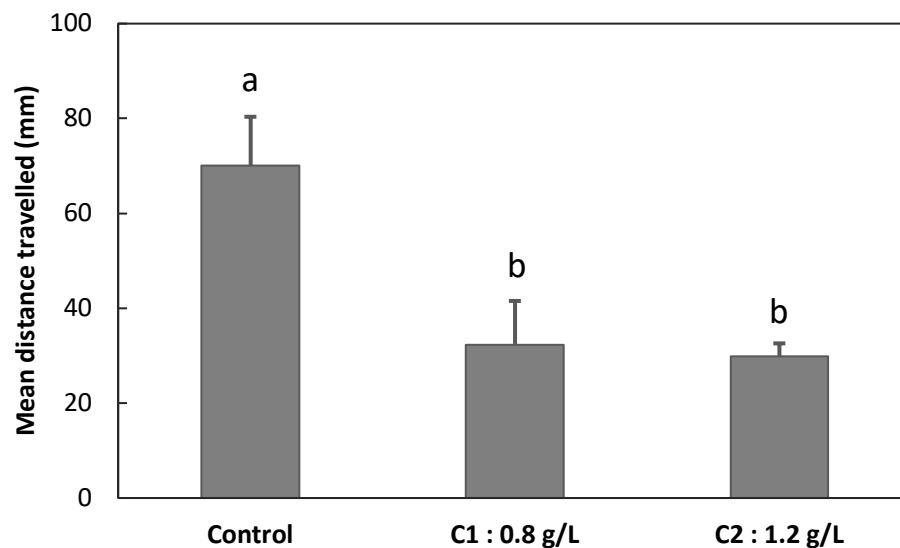
Letters show significant differences in size (length and width) (p<0.05).



**Figure 31.** Relationship between the distance travelled (mm) by juvenile mussels of *M. margaritifera* (n=36) for 20 minutes and their respective length (mm).

### 3.3. Sodium chloride exposure

Results showed that mean distance travelled by 3-year-old juvenile mussels of the FWPM for 20 minutes in a light period was decreased after 24 hours exposure to NaCl concentration (0.8 and 1.2 gNaCl/L; Figure 32). No differences were found between the two different exposure concentrations of NaCl but both conditions were significantly different from the control condition (p<0.05) with mean distance travelled of 70 ± 10 mm for control conditions and 32 ± 9 and 30 ± 3 mm for both NaCl exposures, at 0.8 and 1.2 g NaCl/L, respectively.



**Figure 32.** Mean distance travelled by 3-year-old *M. margaritifera* juveniles exposed to NaCl and to control condition at 16°C, after 24 hours exposure (n=3). Letters show significant differences ( $p < 0.05$ ).

## 4. Discussion

The lack of knowledge about the sensitivity of the endangered freshwater pearl mussel to environmental pollution has led to the need of studying the effect of contaminants that enter aquatic ecosystems through anthropogenic activities. Ecotoxicological studies allow evaluating these impacts using a wide range of biomarkers at different integration levels (molecule, cell, tissues and organisms). However, sublethal effects of contaminant exposure, such as behavior response, can be 10 to 100 times more sensitive than commonly used end-points such as lethality (Dell’Omo 2002; Robinson 2009; Melvin and Wilson 2013; Hasenbein et al. 2015). In order to assess the effects of stress factors on freshwater organisms’ behavior, a wide variety of methodologies and end-points may be employed. For example, fish locomotion behavior in response to chemical and photomotor stresses were assessed using a video tracking system allowing to evaluate organisms swimming behavior (Pannetier et al. 2019; Weeks Santos et al. 2019). Moreover, the behavioral response of marine and freshwater bivalves may be studied by the assessment of valve closure (Tran et al. 2003; Giari et al. 2017; Charifi et al. 2018; Miserazzi et al. 2020), or burrowing abilities (Flynn and Spellman 2009) or aggregation rates (Flynn and Spellman 2009) of mussels. A behavioral study was conducted on adult freshwater mussels *Anodonta anatina* from the family Unionidae (Hartmann et al. 2016). Three different behavioral end-points were studied in response to NaCl exposure: the filtration activity, the transition frequency (as change in activity status) and the avoidance

behavior. Results allowed to state that adult mussels' behavior could be a good biomarker for assessing ecotoxicological effects on bivalves. However, our study is based on the assessment of juvenile mussels of the FWPM' behavior and due to their relatively small size (which is about 6 mm for 3-year-old juveniles), these kind of sublethal end-points using hall sensors (filtration activity, transition frequency or avoidance behavior) could not be applied to small organisms. Consequently, other kinds of behavioral end-points such as locomotion behavior was developed and employed for the assessment of *M. margaritifera* juveniles' behavior.

In this study, an experimental protocol was first developed. The light was found to be a good stimulus in order to observe juvenile mussels' behavior. Indeed, in the dark, juvenile mussels did not show any movement and were starting to move when the light was turned on. This finding suggests that juvenile mussels were trying to avoid the light exposure by moving as if mussels were searching to burrow. However, even if the light might stress juvenile mussels, it can be a good stimulus to induce mussels' movements, since *M. margaritifera* is a sedentary species. Moreover, maximum mussels' activity as distance travelled was determined for a 20 minutes period under the light exposure. After that time, mussels' activity was started to decrease suggesting that juvenile mussels might be exhausted at this moment. From these findings, an experimental protocol was developed in order to assess the locomotion behavior of FWPM juveniles. Measurements of standard locomotion behavior allowed to assess the mean distance travelled and the mean velocity of 3-year-old FWPM juveniles for a 20 minutes period in the light, which were about 86 mm and 74  $\mu\text{m/s}$ , respectively. Our results showed that this protocol could be valuable since it yielded repeatable results. It is important to note that these data could not be directly considered as ecologically relevant since FWPM are sedentary species, so the evaluation of the distance travelled or the velocity as behavioral end-points under light exposure, is not really meaningful in term of mussel ecology. Moreover, here, the distance travelled as behavioral end-point is more relevant than velocity, for sedentary species as *M. margaritifera* mussels. Nevertheless, these data provide somehow interesting information notably on the capacity of mussels to move in the case of environmental stress or specific event such as flood. Indeed, an alteration in the locomotion behavior of FWPM juveniles might affect its capacity to change of habitat or to burry in the sediment if mussels are removed by high flow of the stream. Consequently, behavioral end-points serve as valuable tools to assess and evaluate effects of environmental stressors exposure (Kane et al. 2005) and alterations in behavior may be associated with reduced fitness and survival, resulting in adverse consequences at the

population level (Bridges 1997). The high inter-individual variability found in the size of *M. margaritifera* juveniles cultivated at the facility farm of Firbeix, might lead to wonder if the organisms' size could affect mussels' activity. Our results showed that mean distance travelled and mean velocity, were not correlated to the size of juveniles. In order to validate the experimental protocol developed in the present study, mussels were exposed to sodium chloride which is known to affect juvenile mussels of the FWPM (Belamy et al. 2020). The results showed that mussels' activity as distance travelled, was significantly reduced by two after exposure to these toxicity thresholds for 24 hours (0.8 and 1.2 g/L respectively). This finding allows to validate our experimental protocol showing that mussels' behavior alterations could be a good indicator of mussels' impairments. Nevertheless, juveniles of freshwater mussel were suggested to be able to avoid contamination exposure to pollutants by temporary closing their valves (Farris et al. 2007; Wang, Christopher G Ingersoll, et al. 2007; Cope et al. 2008). In our contaminated experiments, juvenile mussels of *M. margaritifera* might have closed their valves during the measurement of behavior which might contributed to decrease in mussels' movements. However, we showed that juveniles were moving under the light exposure as if they were trying to escape it, so taking this, sodium chloride exposure affected mussel abilities to avoid the supplemental stress as the light exposure.

Due to the lack of knowledge on the sensitivity of the freshwater pearl mussel to environmental pollution, the use of a video tracking system for the assessment of mussel behavior appears as a good tool for the evaluation of low contaminant concentrations found in the environment. Indeed, behavioral end-points are suggested to be characterized by short response times, sensitivity, ecological relevance, and are often non-destructive (Gerhardt 2007). This kind of study provides relevant data on the mussel physiology which are not detectable at low level of organization. Further studies could be developed from the present study to evaluate the burrowing abilities of FWPM juveniles for example, as this behavior activity is ecologically important for burrowing mussels. Moreover, the protocol developed in this study could be applied to early life stages of the FWPM such as the larval stage and the freshly excysted juveniles, which are both really small organisms (<1mm) since methodology for assessing environmental pollution impacts on these life stages are restricted to acute toxicity tests.

## 5. Conclusion

To our knowledge, the present study is the first to provide behavioral assessment of the FWPM juveniles as standard behavior and alterations caused by NaCl exposure. Our results showed that the assessment of mussels' locomotion could be a valuable end-point in order to study the impact of contaminant exposure. The use of a video tracking system was shown to be a good tool in order to assess FWPM juveniles' behavior and allowed to evaluate the behavior of 12 individuals at the same time, providing a lot of data in a short time. This work allowed the development of an experimental protocol for the assessment of behavior responses of the FWPM juveniles, which could be applied to younger life stages of the species. In combination to other end-points at lower level of organization, behavioral responses might provide a better understanding of contaminant effects on juveniles of *M. margaritifera* and therefore better help conservation strategies of this endangered species.

## 6. Acknowledgments

This work was supported by the LIFE13-NAT\_FR\_000506 program, funded by the European Community, the Agence de l'Eau Adour Garonne, the Nouvelle Aquitaine Region, the Dordogne Department, the French government and the Initiative Biosphere Dordogne. We would like to thank the Aquatic ecotoxicology laboratory (UMR EPOC – Site TALENCE) for the welcome in their laboratory, allowing us to develop and conduct our experiments thanks to their skills in behavioral studies. We also thank A. Racher and F. Lalanne for providing juvenile mussels for testing.

## BILAN DU CHAPITRE 6

Ce travail constitue la première étude comportementale à avoir été développée sur les juvéniles de moule perlière. Dans un premier temps, différents paramètres ont été déterminés afin de mettre au point un protocole expérimental pouvant être appliqué aux juvéniles de moule perlière (utilisation de la lumière pendant l'expérimentation et détermination de la durée d'enregistrement). Dans un second temps, il a été nécessaire de déterminer le comportement « standard » des juvéniles en termes de distance parcourue afin de se renseigner sur les capacités naturelles des jeunes moules à se déplacer. Enfin pour valider le protocole d'expérimentation mis au point, une exposition des juvéniles au NaCl a été réalisée afin d'évaluer l'impact de ce toxique de référence sur le déplacement des organismes. Les résultats ont montré une réduction de la distance parcourue par les juvéniles exposés au NaCl pendant 24h et a donc permis de valider le protocole d'expérimentation qui a été développé dans cette étude.

Le développement de cette méthode appliquée aux juvéniles de moule perlière, constitue une grande opportunité puisque cette technique permet d'établir un lien entre les effets physiologiques internes des juvéniles en réponse à un facteur de stress. Cette méthode permet notamment de déceler des effets qui n'auraient pas pu être observés à d'autres niveaux d'organisation. Cet outil constitue également une nouvelle approche exploitable pour les juvéniles de *M. margaritifera* puisque leur faible taille ne permet pas toujours d'appliquer certaines méthodes ou critères d'évaluation comme la valvométrie, l'étude des capacités d'enfouissement dans le sédiment, la croissance des juvéniles ou encore leur biomasse. Cette méthode a été développée sur l'impact du NaCl étudié seul, il serait notamment intéressant d'évaluer l'effet de facteurs étudiés en mélange et représentatifs des conditions environnementales sur la capacité des juvéniles à se déplacer.



---

# **CHAPITRE VII. Effets d'une exposition multi-stress dans un contexte environnemental sur les juvéniles de moule perlière : une étude à différentes échelles de l'organisme (du gène au comportement) et à différentes températures**

## INTRODUCTION DU CHAPITRE VII

La sensibilité des premiers stades de vie de la moule perlière a été évaluée à partir de bioessais de toxicité, qui ont permis d'étudier les effets létaux et sub-létaux des différents facteurs de contamination étudiés seuls pour les métaux, et étudiés seuls et en mélange pour les nutriments. Les résultats obtenus et présentés dans les **chapitres III, IV et V**, ont permis de mettre en évidence 3 points importants sur la sensibilité des juvéniles aux éléments traces métalliques, aux nutriments et à la température :

- Une forte tolérance des organismes à des concentrations en contaminant et en nutriment largement supérieures à celles retrouvées dans le milieu naturel ;
- Un faible impact au niveau moléculaire lorsque les contaminants métalliques sont étudiés seuls ;
- Les nutriments étudiés seuls (nitrates et ortho-phosphates) n'induisent aucun effet sur l'expression des gènes sélectionnés alors qu'en mélange et combinés à une augmentation de la température, des effets au niveau moléculaire ont pu être observés.

Ces résultats montrent l'importance de la prise en considération des potentielles interactions entre les différents facteurs étudiés puisque des effets synergiques ou antagonistes peuvent avoir lieu et ainsi conduire à une accentuation ou à une inhibition des effets toxiques causés par un stress chimique ou physique.

De plus, le développement d'un protocole d'expérimentation permettant l'étude du comportement des juvéniles a été réalisé (**CHAPITRE VI**) et a permis de montrer que l'évaluation du déplacement des jeunes bivalves pouvait constituer un paramètre intéressant pour étudier l'effet des contaminants sur la physiologie de l'organisme, ce qui permettrait d'élargir les connaissances sur l'impact de tels facteurs.

C'est dans ce contexte que l'étude présentée dans ce chapitre a été mise en place, où une expérimentation multi-stress, et représentative des conditions qui pourraient être présentes dans la Haute-Dronne, a été réalisée. Différents facteurs clés de notre site d'étude ont été sélectionnés et étudiés en mélange et à différentes températures. Pour évaluer l'effet de ce stress à plusieurs facteurs, les différentes approches employées dans cette thèse ont été mises en œuvre à savoir, l'expression génique, la bioaccumulation des métaux, le comportement des organismes et leur mobilité.

## 1. Introduction

L'altération générale de la qualité de l'eau constitue un enjeu majeur pour les écosystèmes aquatiques. La détérioration de ces milieux est essentiellement causée par les activités humaines comprenant les rejets domestiques et d'eaux usées, le lessivage des terres agricoles, l'aménagement des rivières ou encore les activités récréatives présentes autour de ces systèmes aquatiques (Peters and Meybeck 2000). À terme, ces altérations peuvent conduire à la destruction des habitats et ainsi impacter la survie des espèces aquatiques notamment celles qui requièrent un environnement de bonne qualité. C'est le cas de la moule perlière, un bivalve filtreur qui vit enfoui dans les sédiments lors des premières années de sa vie et dont la survie dépend de la qualité du sédiment (Geist and Auerswald 2007). Par ailleurs, l'altération de la qualité de l'eau des rivières constitue l'un des principaux facteurs causant la disparition des populations de *M. margaritifera* à l'échelle européenne (Young et al. 2001; Lopes-Lima et al. 2016).

La Haute-Dronne, abritant l'une des plus grandes populations de moule perlière en France (Cochet and Gouilloux 2004), est une rivière de bonne qualité qui est relativement épargnée de pressions anthropiques (Système d'information sur l'eau Adour-Garonne SIE-AG) et dont une portion a été labellisée « Rivière sauvage ». Cependant, comme pour la majorité des rivières européennes, la présence d'obstacles tels que les seuils, les barrages ou les moulins, le long de ce cours d'eau, entrave la continuité écologique et entraîne des modifications dans les caractéristiques physiques et chimiques de l'eau (Gleick 2003; Mueller et al. 2011). Les conséquences engendrées par la présence de ces obstacles concernent notamment une modification dans la dynamique hydrologique des cours d'eau et dans le transport sédimentaire. En effet, la réduction du débit de l'eau peut conduire à la formation d'un plan d'eau stagnant en amont de ces obstacles où les particules en suspension vont s'accumuler et conduire au colmatage du sédiment. De plus, les effets induits par ces barrages ou ces seuils, peuvent être accentués par le réchauffement climatique puisqu'en périodes estivales, les plans d'eau stationnaires voient leur température augmenter et en conséquence leur oxygénation diminuer. Une telle altération de la qualité de l'eau, peut induire des modifications sur la biodisponibilité des contaminants métalliques présents dans les cours d'eau (de Paiva Magalhães et al. 2015; Adams et al. 2020). Aussi, l'augmentation de la température de l'eau peut affecter le processus d'eutrophisation de façon directe en favorisant la prolifération d'espèces algales et indirectement en contribuant à l'évaporation

de l'eau et par conséquent à l'augmentation des teneurs en nutriments dans l'eau (Nazari-Sharabftian et al. 2018).

Afin d'appréhender l'effet d'une dégradation accentuée de la qualité de l'eau de la Haute-Dronne, les juvéniles de moule perlière ont été exposés en conditions contrôlées de laboratoire représentatives du site d'étude et correspondant à un cas de dégradation « extrême » du cours d'eau. Les facteurs de pression exercés sur les organismes (nutriments et éléments traces métalliques) ont été choisis pour leur présence avérée dans la Haute-Dronne. En effet, le choix des concentrations en ETMs est basé sur les concentrations moyennes retrouvées dans l'eau de la ferme aquacole en 2018 soit 15 µg/L pour As, 100 µg/L pour Al et 2 µg/L pour Cu (ces concentrations étant plus élevées que celles retrouvées dans la Haute-Dronne en 2015, Cf. **Chapitre II**). Pour les nutriments, le choix s'est basé sur le seuil de potabilité de l'eau pour les nitrates (50 mg/L) et sur la limite au-delà de laquelle un milieu aquatique est considéré comme étant excessivement pollué par les phosphates (1mg/L) (Genin et al. 2003). Et enfin pour la température, trois conditions ont été choisies : 16°C correspondant à la température témoin (T°C moyenne annuelle de la Haute-Dronne), 26°C à la température maximale étudiée dans une précédente étude (**Chapitre V**) et 30°C à la température maximale mesurée en 2018 dans la Haute-Dronne. L'objectif de cette étude a donc été d'étudier les effets d'une exposition multi-stress combinant tous les facteurs clés dans le cas de la Haute-Dronne, à savoir : As, Al, Cu, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, étudiés en mélange et associés à différentes températures : 16, 26 et 30°C. L'impact de ces facteurs a été évalué à l'aide de plusieurs paramètres permettant la détermination des effets à différentes échelles de l'organisme: l'expression des gènes, la bioaccumulation des métaux, le comportement des organismes et leur mobilité.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Juvéniles

Les juvéniles de moule perlière âgés de 38 mois sont récoltés au sein de l'élevage de la ferme aquacole de Firbeix. Les organismes sont transportés jusqu'au laboratoire d'écotoxicologie aquatique de l'UMR EPOC à Talence (Bordeaux) dans les conditions qui sont décrites dans le **Chapitre II – transport des organismes**.

### 2.2. Protocole d'expérimentation

Les unités expérimentales (UEs), correspondant à des bocaux en verre de volume 300 mL, contiennent environ 1 cm de sable ultra pur (silice) d'un diamètre compris entre 0.8 et 1.4 mm, et 200 mL d'eau de la ferme aquacole. Les juvéniles de moules perlières sont répartis aléatoirement dans les UE, à raison de 12 individus / bocal et l'eau des UEs est renouvelée à 50% tous les deux jours.

Le protocole d'expérimentation mis en place est présenté Figure 33.

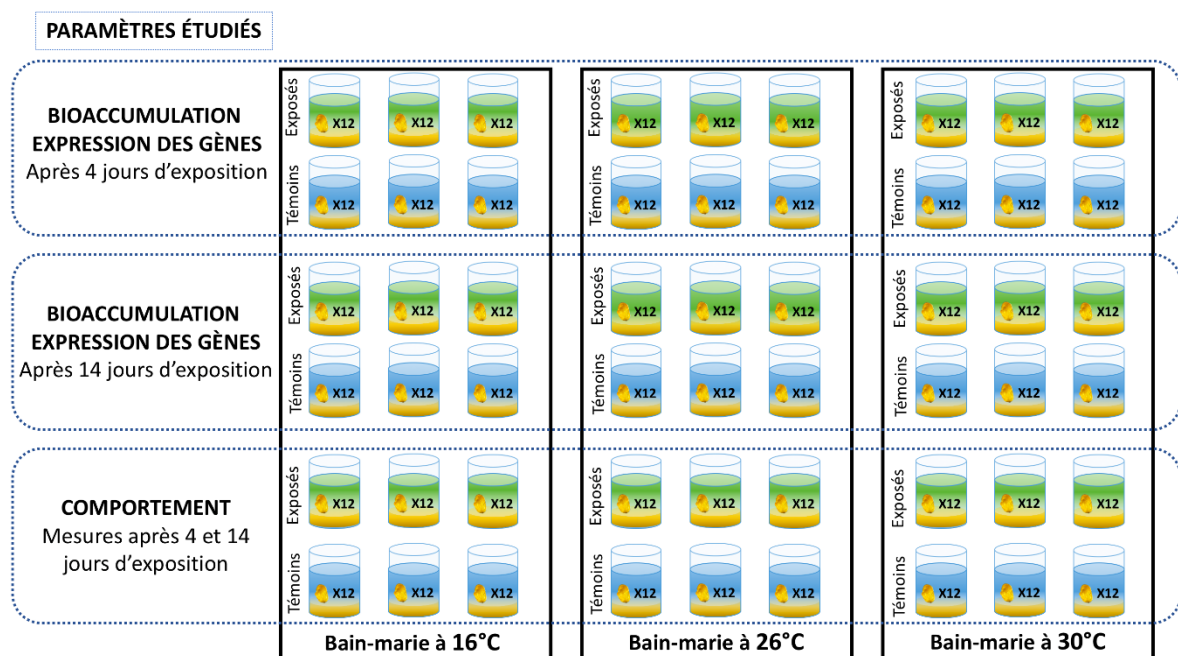


Figure 33. Protocole expérimental mis en place pour l'exposition multi-stress des juvéniles de moule perlière âgés de 38 mois à différents facteurs de contamination en mélange (Al, As, Cu,  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{PO}_4^{3-}$ ) combinés à trois températures : 16, 26 et 30°C.

Avant de débiter l'expérience, les juvéniles sont acclimatés aux différentes températures d'exposition directement dans les UEs mises en place pour l'expérimentation. L'acclimatation à la température d'exposition est réalisée sur 5 jours à raison d'une augmentation de 3°C par jour sauf pour les juvéniles qui ont été exposés à 16°C. Lors de cette période et pendant toute la durée de l'expérience, les juvéniles sont nourris tous les deux jours avec un mélange d'algues d'eau douce (*Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris* et *Stichococcus bacillaris*) à raison d'environ 55 000 cellules algales/mL.

La mobilité des individus est vérifiée en début d'expérience puis à t4j, t7j, t11j et t14j. L'oxygène dissous, le pH et la conductivité sont mesurés à t0j, t4j, t7j, t11j et t14j et la température à t0j, t2, t3j, t4j, t7j, t9j, t11j et t14j. L'eau des UEs est prélevée à t0j, t4j, t10j et t14j pour la mesure des concentrations réelles en nutriments et en ETMs.

### **2.3. Bioaccumulation**

Après 4 et 14 jours d'exposition, les juvéniles sont récoltés (à raison de 6 juvéniles par UE) et placés sur du papier absorbant. Un scalpel est utilisé pour séparer les valves des juvéniles puis le corps mou est récupéré à l'aide d'une pince en plastique et placé dans un tube eppendorf de 2 mL à raison d'un pool de 6 individus par échantillon. Les tubes sont ensuite conservés à -20°C jusqu'au moment du dosage. Avant la mesure des concentrations en métaux, les échantillons sont séchés puis minéralisés. Le protocole décrivant ces étapes est présenté dans le **Chapitre II – Partie 6**. Le dosage des métaux est ensuite réalisé par spectrométrie d'absorption atomique (SAA) pour l'As (limite de détection : 0.23 µg/L) et par ICP-EOS pour Al et Cu (limite de détection : 1.1 µgAl/L et 2.1 µgCu/L). En parallèle, 3 échantillons certifiés (Dogfish Liver Certified Reference Material for trace metals – DOLT-5) ont été dosés afin de tester la validité de la méthode employée.

### **2.4. Expression génique**

#### **2.4.1. Prélèvement et préparation des échantillons**

Les moules récoltées à t4j et t14j à raison de 6 individus par UE, sont poolées dans des tubes eppendorf de 2 mL contenant 500 µL de RNAlater. Ces échantillons sont ensuite gardés 24 h au réfrigérateur puis stockés à -20°C jusqu'au moment de l'extraction de l'ARN. Le protocole d'expérimentation employé pour la préparation des échantillons avant la mesure de l'expression des gènes par qPCR est détaillé dans le **Chapitre II – 6.2 Expression génique**.

### 2.4.2. Gènes étudiés

Dans ce chapitre, les expressions de 16 gènes, dont un gène de référence (*rpl7*), ont été déterminées. Ces gènes, ainsi que les fonctions biologiques auxquelles ils sont liés et leurs séquences d'amorce, sont présentés dans le Tableau XL.

Tableau XL. Gènes étudiés, leur fonction biologique associée et leurs séquences d'amorce.

Gènes	Fonctions	Séquences des amorces 5'-3'
<i>sod1 (Cu/Zn)</i>	Stress oxydant	CACCAGCATTGCCAGTTGTC <sup>1</sup> CCTCACAGGGCCAAATTCCA <sup>2</sup>
<i>sod2 (Mn)</i>	Stress oxydant	AACACACCCTGCCAGATCTG <sup>1</sup> GATGTTTCTGGTGGTGACG <sup>2</sup>
<i>sod3 (Cu/Zn)</i>	Stress oxydant	ATTCAGGGCATGCACGTGTA <sup>1</sup> ATTGCCGAAGACTGGGGATG <sup>2</sup>
<i>cat</i>	Stress oxydant	TCGGAAGGATGGTGCTCAAC <sup>1</sup> AATGCCAGGGATCATGTGGG <sup>2</sup>
<i>cox1</i>	Métabolisme mitochondrial	GTCTTCGTGGGGTCTTTGA <sup>1</sup> CTTAAAGCCCTGCCTCACAC <sup>2</sup>
<i>12s</i>	Métabolisme mitochondrial	TAGGGGTATAACCGCGACTG <sup>1</sup> ACCCACAACACCAATGTCCT <sup>2</sup>
<i>mt1</i>	Détoxication	ACCACAGTCACACGAACCAG <sup>1</sup> TGTACTGGGGACTGCAGATG <sup>2</sup>
<i>casp9</i>	Apoptose	GCCATCCTCCACATTAGCAT <sup>1</sup> TGGTCCAGATGTTGGACAGA <sup>2</sup>
<i>bak</i>	Apoptose	GGTGTGGCCAGAAAGTTGTT <sup>1</sup> CCCAGTCTCAACACCCTCAT <sup>2</sup>
<i>bcl2</i>	Apoptose	CAGCAAAGGCATAAACAGCA <sup>1</sup> CGGAGAGATGGGACATAACG <sup>2</sup>
<i>p53</i>	Apoptose/cycle cellulaire	CATGAGTCCAGACAGCCAGA <sup>1</sup> GACTGCATGTTGGTGTGAGG <sup>2</sup>
<i>rad51</i>	Réparation de l'ADN	CCCATGGGATTTACAACAGC <sup>1</sup> CTCAATCCCACCTTGAGAA <sup>2</sup>
<i>xrcc4</i>	Réparation de l'ADN	CCAATAAAGCAGGGACCTCA <sup>1</sup> GTCTTTTAGGTCGGGCAACA <sup>2</sup>
<i>c3</i>	Immunité	TCATTTGCTCCAGGCGAACT <sup>1</sup> GCTACAGGCCATTGGGATGT <sup>2</sup>
<i>eif2</i>	Traduction	ACACCAGAAATGGCCTTGAC <sup>1</sup> TGAGGTCATCAGCAGACAGG <sup>2</sup>
<i>rpl7</i>	Référence	TGGGATGCACTCCATTGATA <sup>1</sup> GATTCGGCTTGAGAGAATGG <sup>2</sup>

<sup>1</sup>amorce sens ; <sup>2</sup>amorce anti-sens

## **2.5. Comportement des juvéniles**

Après 4 et 14 jours d'exposition, les juvéniles sont récoltés et placés dans des microplaques de 12 puits à raison d'un individu par puits où chaque puits contient 3 mL d'eau d'exposition. La distance parcourue par les juvéniles est mesurée à l'aide du Daniovision (Noldus) et du logiciel Ethovision XT. L'enregistrement est réalisé sur une durée totale de 40 min comprenant une période de 10 min dans l'obscurité, suivi d'une période de 20 min à la lumière et enfin 10 min d'obscurité. La mise au point du protocole d'expérimentation est présentée par le **Chapitre VI**.

## **2.6. Paramètres physico-chimiques de l'eau**

Les paramètres physico-chimiques (température, pH, conductivité et oxygène dissous) sont mesurés à l'aide de sondes portatives (WTW, Germany): l'oxymètre Profiline Oxi 3205, le pHmètre Profiline pH 3110 et le conductimètre Profiline Cond 3110 pour la conductivité et la température.

## **2.7. Dosage des éléments traces métalliques dans l'eau**

Les échantillons d'eau sont récoltés dans des tubes de 15 mL (Falcon) et sont directement acidifiés avec de l'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$  à 65%, Sigma Aldrich) pour un volume final dilué à 10%. Les tubes sont ensuite stockés dans une chambre froide à 4°C jusqu'au moment du dosage qui est effectué par spectrométrie d'absorption atomique (SAA) pour Cu (LD = 0.54 µg/L) et par ICP-EOS pour Al et As (LD = 1 µgAl/L et 4.3 µgAs/L).

## **2.8. Dosage des nutriments dans l'eau**

Les échantillons d'eau sont récoltés pendant les expérimentations à raison de 8 mL dans des tubes falcon de 15mL et sont filtrés à 0.45 µm puis stockés à -20°C jusqu'au moment du dosage. Le dosage est réalisé par analyse en flux continu par segmentation à l'aide du QuAAtro pour les nitrates et à l'aide de l'AA3 pour les ortho-phosphates.

## **2.9. Analyses statistiques**

Pour comparer les données obtenues pour l'expression des gènes (exprimées en facteur d'induction), l'analyse statistique a été réalisée sur l'expression relative des gènes par rapport



CHAPITRE VII. Effets d'une exposition multi-stress dans un contexte environnemental sur les juvéniles de moule perlière : une étude à différentes échelles de l'organisme (du gène au comportement) et à différentes températures

au gène de référence ( $\Delta C_t$ ). De manière générale, la comparaison des moyennes est réalisée par une analyse des variances. Pour cela, la normalité de la distribution des données a été vérifiée graphiquement sur les résidus des données. L'homoscédasticité des variances a ensuite été évaluée à l'aide du test de Levene. Lorsque ces deux paramètres sont vérifiés, l'analyse des variances est réalisée à l'aide du test paramétrique ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey. Dans le cas où l'un des deux paramètres n'est pas vérifié, un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis est alors utilisé pour comparer les données, suivi d'un test post-hoc de Dunn (correction de bonferroni).

### 3. Résultats

#### 3.1. Paramètres physico-chimiques de l'eau

Les valeurs moyennes  $\pm$  écart-types des paramètres physico-chimiques de l'eau mesurés dans les UEs sont présentés dans le tableau XLI. En fonction des conditions de température étudiées, la conductivité et l'oxygène dissous dans l'eau diffèrent des conditions à 16°C. En effet, plus la température est élevée, plus la conductivité augmente. Ces différences peuvent être expliquées par l'évaporation de l'eau dans les UEs pendant l'expérimentation dans les conditions à 26°C et 30°C. En ce qui concerne les concentrations en oxygène dissous, la diminution de ce paramètre est due à l'augmentation de la température. La température étant un paramètre très important dans cette expérimentation, le nombre de valeurs mesurées est plus important que pour les autres paramètres (n=8).

Tableau XLI. Valeurs moyennes  $\pm$  écart-types (n=5) des paramètres physico-chimiques mesurés dans les UEs contenant les individus témoins et exposés, en fonction des conditions de température.

Températures nominales	Conditions	Conductivité ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	pH	Oxygène dissous (mg/L)	Température <sup>1</sup> (°C)
16°C	Témoins	70 $\pm$ 4	6.8 $\pm$ 0.2	8.7 $\pm$ 0.4	16.0 $\pm$ 0.1
	Exposés	165 $\pm$ 5	6.6 $\pm$ 0.1	8.8 $\pm$ 0.4	16.0 $\pm$ 0.1
26°C	Témoins	145 $\pm$ 11	6.7 $\pm$ 0.3	6.8 $\pm$ 0.4	26 $\pm$ 0.1
	Exposés	276 $\pm$ 42	6.8 $\pm$ 0.2	7.0 $\pm$ 0.4	25.9 $\pm$ 0.1
30°C	Témoins	178 $\pm$ 22	6.9 $\pm$ 0.1	6.0 $\pm$ 0.1	29.9 $\pm$ 0.1
	Exposés	340 $\pm$ 65	7.0 $\pm$ 0.1	5.9 $\pm$ 0.2	29.9 $\pm$ 0

<sup>1</sup>n=8

#### 3.2. Concentrations réelles en contaminants et en nutriments

Les concentrations réelles en ETMs et en nutriments dans les UEs sont présentées dans le tableau XLII. De manière générale, les concentrations mesurées dans les conditions de température à 26°C et 30°C sont légèrement plus élevées que dans les conditions à 16°C et peuvent être expliquées par l'évaporation de l'eau pendant l'expérimentation. Les résultats montrent la présence des contaminants métalliques et des nutriments dans les conditions témoins (correspondant à l'eau de la ferme aquacole) soit environ 70  $\mu\text{gAl}/\text{L}$ , 3  $\mu\text{gCu}/\text{L}$ , 4  $\text{mgNO}_3^-/\text{L}$  et 0.2  $\text{mgPO}_4^{3-}$ . L'analyse statistique des données montrent des différences entre les concentrations en ETMs et en nutriments, chez les témoins et les exposés (p<0.05, Kruskal-Wallis).

Tableau XLII. Valeurs moyennes  $\pm$  écart-types des concentrations réelles (n=4) mesurées dans les UEs contenant les individus témoins et exposés aux concentrations nominales de 100 $\mu$ gAl/L, 15 $\mu$ gAs/L, 2  $\mu$ gCu/L, 50mgNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L et 1mgPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L, en fonction des conditions de température.

Températures nominales	Conditions	Al ( $\mu$ g/L)	As ( $\mu$ g/L)	Cu ( $\mu$ g/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg/L)
16°C	Témoins	71 $\pm$ 14	< LD	2.9 $\pm$ 0.4	4 $\pm$ 2	0.2 $\pm$ 0.1
	Exposés	95 $\pm$ 22	24 $\pm$ 6	4.0 $\pm$ 0.4	48 $\pm$ 6	2.3 $\pm$ 0.8
26°C	Témoins	67 $\pm$ 23	< LD	3.7 $\pm$ 1.0	11 $\pm$ 4	0.3 $\pm$ 0.2
	Exposés	91 $\pm$ 31	32 $\pm$ 15	5.1 $\pm$ 1.4	65 $\pm$ 14	2.4 $\pm$ 1.1
30°C	Témoins	66 $\pm$ 20	< LD	4.0 $\pm$ 1.0	14 $\pm$ 11	0.3 $\pm$ 0.2
	Exposés	101 $\pm$ 39	37 $\pm$ 17	5.4 $\pm$ 1.7	73 $\pm$ 37	2.3 $\pm$ 1.0

<sup>1</sup>LD : 4.3  $\mu$ gAs/L

### 3.3. Bioaccumulation des métaux

Les concentrations moyennes en Al (en  $\mu$ g/g, ps) accumulées dans le corps mou des juvéniles exposés aux différentes conditions d'expérimentation, sont présentées sur la Figure 34.

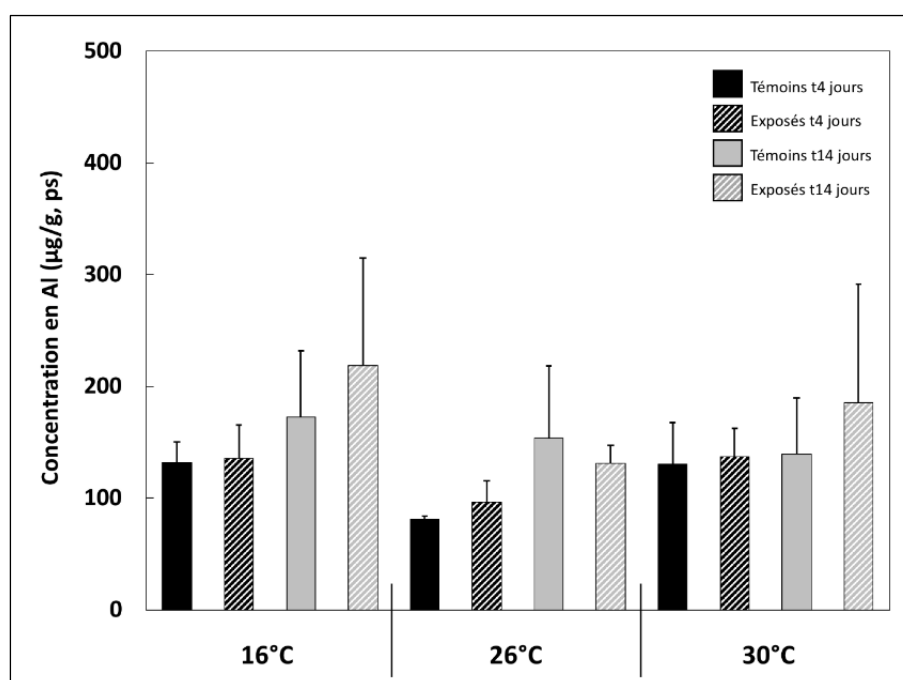


Figure 34. Concentrations moyennes en Al (en  $\mu$ g/g, ps) dans le corps mou des juvéniles de moule perlière âgés de 38 mois en fonction de la température d'exposition et du temps de prélèvement. Les barres d'erreurs correspondent aux écart-types (n=3). Aucune différence significative n'est observée entre les différentes conditions et différents temps d'exposition ( $p > 0.05$ )

Les résultats montrent tout d'abord que les juvéniles témoins présentent de l'Al autour de 100  $\mu$ g/g, ps. Cette concentration est expliquée par la présence d'Al dans l'eau de la ferme aquacole à environ 70  $\mu$ g/L.

De plus, quelle que soit la condition d'exposition et le temps de prélèvement (t4j et t14j), les juvéniles accumulent des teneurs proches en Al soit entre 100 et 200  $\mu\text{g/g}$ , ps. Globalement, après 14 jours d'exposition, une grande variabilité est observée dans l'accumulation d'Al par les juvéniles. L'analyse statistique des données n'a montré aucune différence significative dans l'accumulation d'Al par les juvéniles, entre les différentes conditions d'exposition ( $p > 0.05$ ).

Les concentrations moyennes en As (en  $\mu\text{g/g}$ , ps) mesurées dans le corps mou des juvéniles sont présentées sur la Figure 35. Les résultats montrent une faible présence d'As dans le corps mou des juvéniles témoins (entre 0.5 et 0.75  $\mu\text{g/g}$ , ps). Aucune accumulation significative d'As n'est observée chez les juvéniles placés à 16°C, en revanche, des différences significatives sont observées chez les juvéniles exposés dans la condition à 26°C (après 4 et 14 jours d'exposition), avec des accumulations atteignant 1.1 et 1.3  $\mu\text{g/g}$ , ps respectivement (x 2 environ par rapport aux témoins). À 30°C, seul un effet du temps d'exposition est observé avec des différences significatives entre 4 et 14j d'exposition, quelle que soit la condition (témoins ou exposés).

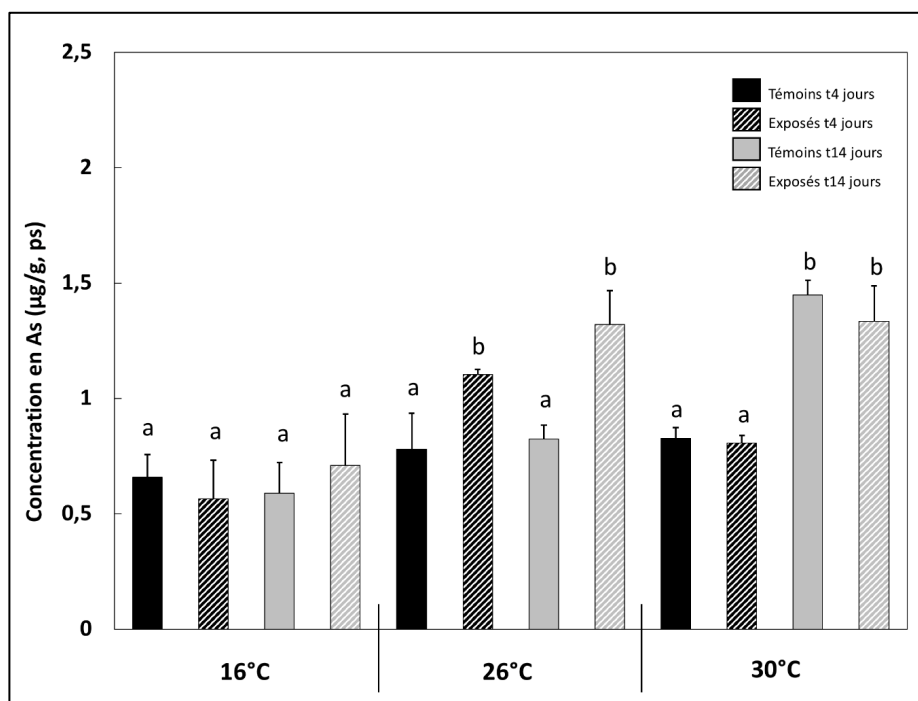


Figure 35. Concentrations moyennes en As (en  $\mu\text{g/g}$ , ps) dans le corps mou des juvéniles de moule perlière âgés de 38 mois en fonction de la température d'exposition et du temps de prélèvement. Les

barres d'erreurs correspondent aux écart-types (n=3). Les lettres indiquent une différence significative (p<0.05).

Les concentrations moyennes en Cu (en  $\mu\text{g/g}$ , ps) mesurées dans le corps mou des juvéniles exposés aux différentes conditions d'expérimentation, sont présentées sur la Figure 36. Quelle que soit la condition d'exposition et le temps de prélèvement, les juvéniles de moule perlière présentent des concentrations en cuivre aux alentours de 30  $\mu\text{g/g}$ , ps. Ces teneurs restent constantes en fonction du temps et selon les conditions de température.

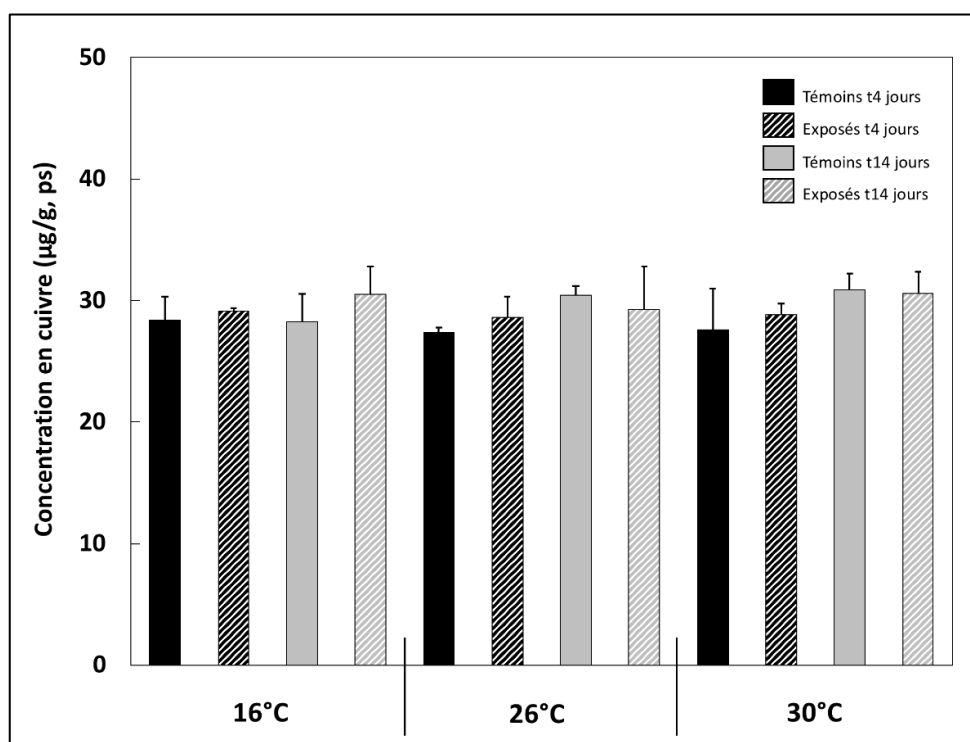


Figure 36. Concentrations moyennes en Cu (en  $\mu\text{g/g}$ , ps) dans le corps mou des juvéniles de moule perlière âgés de 38 mois en fonction de la température d'exposition et du temps de prélèvement. Les barres d'erreurs correspondent aux écart-types (n=3). Aucune différence significative n'est observée entre les différentes conditions et les différents temps d'exposition (p>0.05).

### 3.4. Expression génique

Les facteurs d'induction des 15 gènes d'intérêt par rapport aux témoins exposés à 16, 26 et 30 °C sont présentés dans le Tableau XLIII (après 4 jours d'exposition) et dans le tableau XLIV (après 14 jours d'exposition). Dans ces tableaux, seuls les facteurs d'induction qui sont significativement différents des témoins exposés à 16°C sont présentés (p<0.05). En effet, la comparaison des facteurs d'induction des différents gènes pour une température donnée, n'a montré aucune différence significative entre les individus témoins et les individus contaminés

( $p < 0.05$ ). Après 4 jours d'exposition, l'expression des gènes chez les individus exposés aux contaminants et aux nutriments à 16°C, n'est pas modulée.

Des différences dans l'expression des gènes sont cependant observées pour les juvéniles exposés à 26°C et à 30°C, chez les individus contaminés mais également chez les individus témoins. Concernant l'effet de la température seule, indiqué par les facteurs d'induction des témoins pour chaque température, les gènes *12S* et *sod1* sont réprimés, et le gène *bcl2* est surexprimé pour la condition à 26°C. À 30°C, les gènes *12S*, *cox1*, *p53* et *sod1* sont réprimés, et les gènes *bcl2* et *eif2* sont surexprimés. L'effet de la contamination associé à la température, indiqué par les facteurs d'induction des individus exposés pour une température donnée, toujours après 4 jours d'exposition, entraîne la répression des gènes *12S*, *cox1*, *p53* et *sod1*, et la surexpression des gènes *bcl2* et *eif2* pour les conditions à 26 et à 30°C. Après 14 jours d'exposition, seuls 3 gènes sur les 15 étudiés sont modulés. Concernant l'effet de la température seule, le gène *12s* est réprimé à 26°C alors qu'à 30°C, les gènes *12S* et *sod1* sont réprimés. Pour la contamination associée à la température, le gène *12S* est encore une fois réprimé à 26°C alors qu'à 30°C, la répression des gènes *12S*, *cox1* et *sod1* est observée.

**Tableau XLIII.** Facteurs d'induction des gènes chez les juvéniles exposés aux différentes conditions par rapport aux témoins exposés à 16°C, après 4 jours d'exposition.

Fonctions	Gènes	16°C		26°C		30°C	
		Exposés	Témoins	Exposés	Témoins	Exposés	
<b>Métabolisme mitochondrial</b>	<i>12S</i>	/	0.55	0.35	0.21	0.31	
	<i>cox1</i>	/	/	0.53	0.36	0.37	
<b>Apoptose</b>	<i>bak</i>	/	/	/	/	/	
	<i>bcl2</i>	/	1.76	1.55	1.84	1.93	
	<i>casp9</i>	/	/	/	/	/	
	<i>p53</i>	/	/	0.69	0.59	0.62	
	<i>cat</i>	/	/	/	/	/	
<b>Stress oxydant</b>	<i>sod1</i>	/	0.49	0.45	0.36	0.34	
	<i>sod2</i>	/	/	/	/	/	
	<i>sod3</i>	/	/	/	/	/	
	<i>eif2</i>	/	/	1.47	1.59	1.55	
<b>Détoxication</b>	<i>mt1</i>	/	/	/	/	/	
<b>Immunité</b>	<i>c3</i>	/	/	/	/	/	
<b>Réparation de l'ADN</b>	<i>rad51</i>	/	/	/	/	/	
	<i>xrcc</i>	/	/	/	/	/	

Les facteurs d'induction présentés dans ce tableau sont significativement différents des témoins exposés à 16°C ( $p < 0.05$ ).

**Tableau XLIV.** Facteurs d'induction des gènes chez les juvéniles exposés aux différentes conditions par rapport aux témoins exposés à 16°C, après 14 jours d'exposition.

Fonctions	Gènes	16°C		26°C		30°C	
		Exposés	Témoins	Exposés	Témoins	Exposés	Témoins
<b>Métabolisme mitochondrial</b>	<i>12S</i>	/	0.47	0.39	0.28	0.22	
	<i>cox1</i>	/	/	/	/	0.34	
<b>Apoptose</b>	<i>bak</i>	/	/	/	/	/	
	<i>bcl2</i>	/	/	/	/	/	
	<i>casp9</i>	/	/	/	/	/	
	<i>p53</i>	/	/	/	/	/	
<b>Stress oxydant</b>	<i>cat</i>	/	/	/	/	/	
	<i>sod1</i>	/	/	/	0.41	0.36	
	<i>sod2</i>	/	/	/	/	/	
	<i>sod3</i>	/	/	/	/	/	
<b>Traduction</b>	<i>eif2</i>	/	/	/	/	/	
<b>Détoxication</b>	<i>mt1</i>	/	/	/	/	/	
<b>Immunité</b>	<i>c3</i>	/	/	/	/	/	
<b>Réparation de l'ADN</b>	<i>rad51</i>	/	/	/	/	/	
	<i>xrcc</i>	/	/	/	/	/	

Les facteurs d'induction présentés dans ce tableau sont significativement différents des témoins exposés à 16°C ( $p < 0.05$ ).

### 3.5. Comportement

La distance moyenne parcourue par les juvéniles exposés à la lumière pendant 20 min en fonction des différentes conditions d'exposition est présentée par la figure 37. L'analyse statistique des données n'a montré aucune différence significative dans la distance moyenne parcourue par les juvéniles en fonction des différentes conditions d'exposition en raison notamment de la grande variabilité observée essentiellement après 4 jours d'exposition.

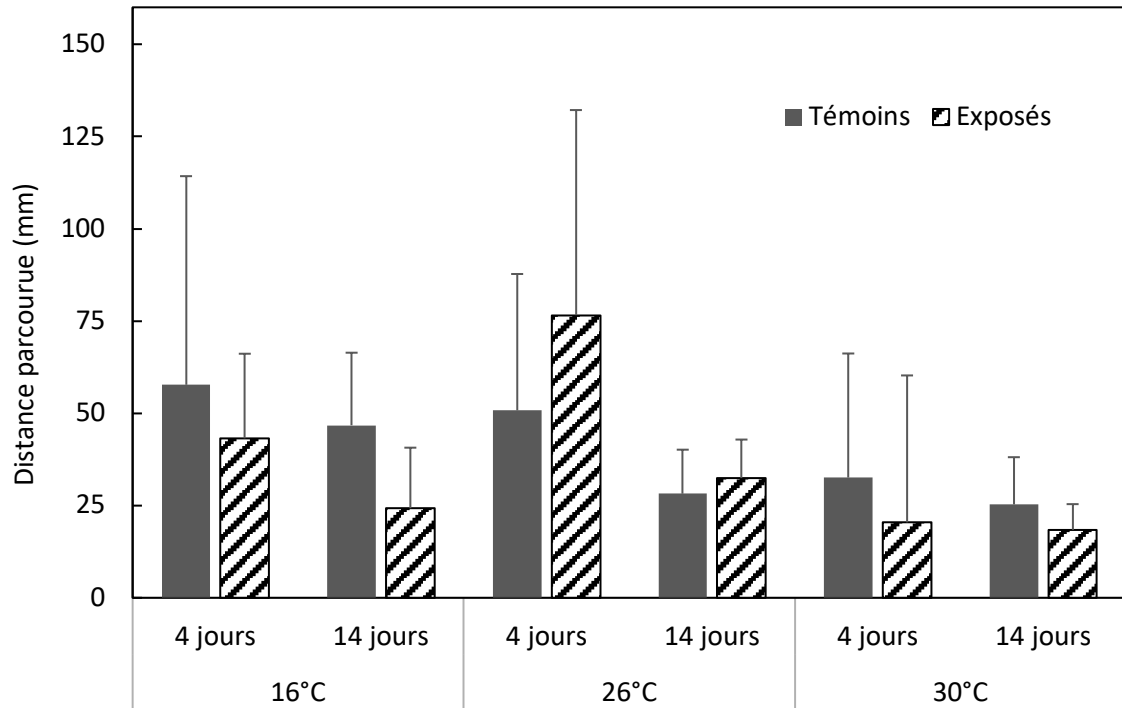


Figure 37. Distances moyennes parcourues  $\pm$  écart-types (en mm) par les juvéniles de moule perlière exposés à la lumière pendant 20 minutes, après 4 et 14 jours d'exposition aux différentes conditions d'exposition. Aucune différence significative n'a été observée ( $p > 0.05$ , Kruskal-Wallis).



## 4. Discussion

L'exposition des juvéniles à une contamination multi-stress, aux ETMs et aux nutriments, associée à différentes conditions de température, n'a pas conduit à la mortalité des individus après 14 jours d'exposition. Ces résultats, plutôt inattendus, notamment pour l'exposition à 30°C, montrent que les juvéniles âgés de 38 mois, pourraient tolérer des conditions considérées comme « extrêmes » dans le cas de la Haute-Dronne sur une courte période de temps. Cependant, bien que la mobilité des organismes n'ait pas été affectée lors de cette expérimentation, des effets sublétaux ont pu être observés à l'échelle moléculaire. En tant qu'espèce respirant et se nourrissant par filtration, la moule perlière est fortement exposée aux contaminants métalliques potentiellement présents dans la colonne d'eau. Lorsque les ETMs pénètrent au sein des organismes, ils peuvent être stockés ou éliminés par ces derniers. Cependant, en quantité excessive, l'accumulation des ETMs peut conduire à l'épuisement des capacités de défense mises en place par les cellules et peut induire des effets délétères pour l'organisme (Schöne and Krause 2016). Dans cette étude, la présence d'Al dans le corps mou des jeunes moules est observée après 4 et 14 jours d'exposition aussi bien dans les conditions témoins que dans les conditions de contamination, et aux trois températures d'exposition. Ces teneurs en Al mesurées dans le corps mou des juvéniles varient entre 100 et 200 µgAl/g de poids sec, pour des concentrations d'exposition comprises entre  $66 \pm 20$  et  $71 \pm 14$  µg/L pour les conditions témoins, et entre  $91 \pm 31$  et  $101 \pm 39$  µg/L pour les conditions de contamination. Aucune différence n'a été observée dans les concentrations d'Al accumulées par les juvéniles exposés aux différentes conditions et en fonction du temps. En condition acide, la solubilité de l'Al augmente et entraîne des modifications dans la spéciation de cet élément (Gensemer and Playle 1999) et conduit donc à la formation de formes biodisponibles d'Al pour les organismes (Macdonald and Bruce Martin 1988). Pynnönen 1990 a montré que l'accumulation d'Al dans les branchies de deux moules d'eau douce de la famille des Unionidés (*Anodonta anatina* et *Unio pictorum*) était essentiellement conditionnée en milieu acide avec un pH compris entre 4 et 5. Dans nos expérimentations, les valeurs du pH étant supérieures à 6, la biodisponibilité limitée de l'Al peut expliquer l'absence de différence dans les concentrations en Al mesurées dans les juvéniles témoins et contaminés. Ainsi, la présence d'Al dans les juvéniles peut être expliquée par une accumulation de cet élément de façon chronique lors de leur élevage en captivité au sein de la ferme aquacole. Contrairement à l'Al, le Cu est un métal essentiel pour les organismes aérobies en raison de son rôle de cofacteur

pour plusieurs enzymes (Solomon and Lowery 1993). Cet élément est également un constituant important des hémocyanines, des protéines permettant le transport de l'oxygène chez certains invertébrés aquatiques (Taylor and Anstiss 1999; van Holde et al. 2001), il est donc plus facilement régulé par l'organisme. Néanmoins, en quantité élevée, cet ETM peut s'avérer toxique pour les organismes. Dans cette étude, les juvéniles ont été exposés à une concentration nominale en Cu de 2 µg/L. Cependant, la mesure des concentrations réelles en Cu a montré la présence de cet élément de l'ordre de 3 µg/L dans les conditions témoins et par conséquent, les conditions de contamination contenaient environ 5 µgCu/L. Quelle que soit la condition d'exposition (avec ou sans contaminant ajouté), les concentrations en Cu dans le corps mou des juvéniles restent constantes avec des teneurs de 30 µg/g de poids sec, et ce, même au cours du temps. Jorge et al. 2013 a évalué la bioaccumulation du Cu après exposition des juvéniles d'une espèce de moule d'eau douce *Lampsilis siliquoidea* âgés de 6 mois, pendant 28 jours à 2 et 12 µgCu/L. Les individus témoins présentaient des concentrations moyennes en Cu de  $28 \pm 9$  µgCu/g de poids sec, même après 28 jours d'exposition. Les juvéniles de *L. siliquoidea* ayant été exposés à des conditions « témoins » dépourvues de Cu, ces résultats démontrent la présence naturelle du Cu dans les organismes et reflète notamment leurs besoins biologiques en Cu ainsi que leur capacité de régulation de ce métal. Cependant, après 14 jours d'exposition à 2 et 12 µg/L de Cu, les juvéniles de *L. siliquoidea* ont accumulé en moyenne 100 µgCu/g de poids sec. Dans notre étude, les teneurs similaires en Cu chez les individus témoins et exposés, montrent d'une part que les concentrations mesurées correspondent au Cu nécessaire aux besoins biologiques des juvéniles de *M. margaritifera* et d'autre part que ces juvéniles ont une meilleure capacité à réguler le Cu comparé aux juvéniles de *L. siliquoidea*. Contrairement à l'Al et au Cu, l'accumulation de l'As par les juvéniles de moule perlière est relativement faible puisque les concentrations en As mesurées dans le corps mou des individus ne dépassent pas 1.5 µg/g de poids sec. Cependant, des différences d'accumulation d'As par les juvéniles entre les différentes conditions d'exposition ont été observées notamment après 14 jours d'exposition pour les conditions à 26°C et 30°C, bien que ces teneurs restent très faibles. Ces données sont en accord avec les résultats obtenus dans une précédente étude (**Chapitre IV**), qui ont montré que les juvéniles accumulaient peu d'As même après 21 jours d'exposition. L'As est un composé complexe dont la toxicité et la biodisponibilité dépendent de sa spéciation (Azizur Rahman et al. 2012). La faible accumulation de cet ETM par les juvéniles peut être expliquée

soit par la capacité des juvéniles à éliminer efficacement l'As puisqu'en raison du fond géochimique de la Haute-Dronne riche en As (Mauroux et al. 2009), les populations de moule perlière sont probablement adaptées à la contamination par cet ETM, soit par la spéciation de cet élément qui ne permet pas son accumulation par les juvéniles de moule perlière.

Au niveau moléculaire, la modification de l'expression de plusieurs gènes en relation avec des fonctions biologiques connues pour leur régulation en réponse à un stress, a été observée. Après 4 jours d'exposition à température élevée (26° et 30°C), avec ou sans contamination, différentes réponses au niveau moléculaire ont pu être observées. Le métabolisme énergétique des juvéniles semble avoir été impacté puisque la répression des gènes *12S* et *cox1* indique une potentielle réduction du métabolisme mitochondrial. De plus, des impacts au niveau cellulaire ont pu avoir lieu suite à la modulation des gènes *bcl2* et *p53*, tous deux impliqués dans le processus d'apoptose et dans la régulation du cycle cellulaire. La surexpression du gène *bcl2* et la répression du gène *p53* montrent une potentielle activation de la mort cellulaire programmée. Aussi, la répression du gène *sod1*, impliqué dans la production d'une protéine anti-oxydante (la superoxyde dismutase 1), indique une altération des capacités anti-oxydantes des cellules, nécessaires à la régulation des espèces réactives de l'oxygène pour contrer le déclenchement d'un stress oxydant au sein des cellules (Davies 1995; Valavanidis et al. 2006). Enfin, la surexpression du gène *ef2*, codant pour une protéine ayant un rôle dans la traduction de l'information génétique en protéine, suggère la potentielle synthèse des protéines relatives aux différents gènes dont l'expression a été modulée. L'expression de ces différents gènes constitue les premières réponses des juvéniles à la suite d'un stress qui dans le cas de cette étude, est essentiellement causé par une exposition des organismes à de fortes températures. En effet, lorsque les juvéniles sont exposés à une contamination multiple et à 16°C, aucune différence dans l'expression des gènes n'a été observée. Ce résultat indique que les effets observés au niveau moléculaire ne sont pas impactés par la contamination mais plutôt par une exposition à de fortes températures puisque l'expression des gènes est également modulée dans les conditions témoins à 26°C et 30°C. Cette observation est notamment appuyée par l'absence de différence dans l'expression des gènes entre les individus témoins et les individus contaminés pour une même température. Après 14 jours d'exposition, les effets observés sur l'expression des gènes sont moins marqués puisque seuls 3 gènes sur les 15 étudiés sont modulés. Ces gènes, en relation avec le métabolisme mitochondrial et les capacités anti-oxydantes (*12S*, *cox1* et *sod1*) sont

modulés encore une fois dans les conditions à hautes températures (26 et 30°C) sauf pour le gène *cox1* qui est uniquement modulé chez les juvéniles exposés à 30°C dans la condition de contamination. Ces résultats montrent que le métabolisme mitochondrial et par conséquent le métabolisme énergétique, ainsi que les capacités anti-oxydantes des juvéniles de moule perlière, semblent correspondre aux principales fonctions biologiques affectées par une exposition à de fortes températures, puisque même après 14 jours d'exposition, l'expression des gènes relatifs à ces fonctions, est encore modulée. La température est un facteur jouant un rôle important dans la régulation du métabolisme et des divers processus biologiques des organismes ectothermes, les rendant ainsi vulnérables aux changements de température de leur environnement (Hochachka and Somero 2002). La survie d'un organisme est régie par sa capacité à maintenir un équilibre entre la demande et l'approvisionnement énergétique (Calow and Forbes 1998; Roff 2002). En général, en réponse à un stress thermique, les bivalves augmentent leur ventilation afin de contrer le manque d'oxygène disponible dans la colonne d'eau, ce qui résulte d'une augmentation de l'activité métabolique de l'organisme, l'oxygène étant nécessaire à la production d'énergie par les mitochondries. Par exemple, Ganser et al. 2015 ont montré qu'une exposition à de fortes températures (jusqu'à 35°C) impactait la consommation d'oxygène chez différentes espèces de moule d'eau douce où l'oxygène consommé par les organismes était positivement corrélé à l'augmentation de la température. Les résultats de cette étude suggèrent que des températures élevées peuvent altérer le métabolisme des bivalves et par conséquent conduire à une réduction de la quantité d'énergie disponible pour d'autres processus biologiques clés comme la reproduction, la survie ou la croissance. Cependant, ce phénomène dépend de la limite thermique de chaque espèce (Chen et al. 2001). Au-delà de cette limite, les capacités aérobies des organismes sont réduites puisque les mécanismes d'approvisionnement en oxygène à travers la ventilation et le transport d'oxygène par l'organisme sont limités, résultant d'une diminution du métabolisme énergétique des organismes (Pörtner et al. 2001; Pörtner 2002; Pörtner et al. 2004). Dans notre étude, le stress induit par une exposition des juvéniles à 26°C et 30°C a conduit à une réduction du métabolisme mitochondrial à l'échelle moléculaire indiquant ainsi une potentielle réduction du métabolisme énergétique des organismes. Ces résultats suggèrent que les jeunes moules ont éventuellement été exposées à des températures qui semblent dépasser leur limite thermique puisque même après seulement 4 jours d'exposition, les réponses transcriptomiques montrent une réduction du métabolisme mitochondrial.

Pandolfo et al. 2010, a permis la détermination des limites de tolérance thermique conduisant à la mortalité des juvéniles de différentes espèces de moule d'eau douce de la famille des Unionidés. La température létale à 50% (conduisant à la mortalité de 50% de la population d'étude) se situe en moyenne à 34.7°C avec des valeurs comprises entre 32.5 et 38.8°C. Pour les juvéniles de *M. margaritifera*, les températures étudiées ici n'ont pas conduit à la mortalité des juvéniles mais elles ont cependant induit des effets sublétaux qui ont pu être observés au niveau moléculaire. Finalement, ces résultats suggèrent que l'augmentation des températures de l'eau de la Haute-Dronne peut impacter les juvéniles en réduisant leur métabolisme énergétique et en conséquence conduire à une diminution de l'activité métabolique nécessaire à leur croissance ou à leur survie. De plus, la présence de contaminants dans leur milieu naturel, associée à l'augmentation de la température peut accentuer les effets délétères initialement causés par de fortes températures (Sokolova and Lannig 2008).

L'étude du comportement des organismes en réponse à un stress est considérée comme une discipline prometteuse permettant l'intégration de la physiologie interne de l'organisme et des conditions environnementales externes (Pyle and Ford 2017). Ce domaine étant en pleine émergence, aucune donnée n'a été reportée sur l'étude du comportement de la moule perlière. En général, le comportement des bivalves au stade adulte est étudié à travers l'évaluation de l'ouverture des valves (Tran et al. 2003; Hartmann et al. 2016; Giari et al. 2017) ou leur capacité à s'enfouir dans le sédiment (Yeager et al. 1994; Bonnard et al. 2009). En raison de la faible taille des juvéniles de moule perlière, soit environ 6 mm pour des juvéniles âgés de 38 mois, ces critères d'évaluation sont difficiles à mettre en œuvre. Ainsi, dans ce travail, le comportement des juvéniles de *M. margaritifera* a été étudié à travers la mesure de la distance parcourue par les organismes suite à leur exposition aux différentes conditions d'expérimentation. Les résultats ont montré l'absence de différence dans le comportement des juvéniles quelle que soit la condition d'expérimentation. Ces résultats indiquent que les conditions de stress étudiées dans ce travail, n'induisent aucun effet sur le déplacement des organismes. Cependant, il est important de noter que cette absence de différence peut être expliquée par une très grande variabilité interindividuelle notamment observée après 4 jours d'exposition. Après 14 jours d'expérimentation, cette variabilité est beaucoup plus faible mais ne permet pas de distinguer une différence dans la distance parcourue par les juvéniles témoins ou exposés aux différentes températures. D'autres paramètres peuvent être évalués et il serait notamment intéressant d'étudier la mobilité versus l'immobilité des juvéniles en

réponse à un facteur de stress, d'évaluer leur capacité à s'enfouir dans le sédiment ou encore de mesurer la distance parcourue par les organismes sur plusieurs périodes de 5 minutes.

## 5. Conclusion

Cette étude a permis d'évaluer les effets d'une contamination multiple à différents ETMs et nutriments présents naturellement dans la Haute-Dronne, et associée à différentes températures, sur les juvéniles de *M. margaritifera* âgés de 38 mois. À notre connaissance, cette étude est la première à fournir des données sur l'impact de différents stress étudiés en mélange, évalué à l'aide de plusieurs paramètres (mobilité, expression génétique, bioaccumulation des métaux et comportement des organismes) sur des juvéniles de moule perlière. Ce travail a permis de montrer une résistance des jeunes moules en termes de mobilité après 14 jours d'exposition et que des conditions de contamination aux ETMs, de pollution aux nutriments et de températures élevées dans le cas de la Haute-Dronne, considérées comme « extrêmes » bien que représentatives du milieu naturel, ne conduisent pas à des effets sur la mobilité des juvéniles et sur l'accumulation des métaux au sein de leur corps mou. Des impacts ont cependant pu être observés au niveau moléculaire dans des conditions de fortes températures (soit 10 à 14 °C plus élevées que la température moyenne annuelle de la Haute-Dronne), attestant ainsi le potentiel impact du réchauffement climatique sur les jeunes moules. D'autres études sont cependant nécessaires pour confirmer les effets observés à l'échelle moléculaire bien que ces résultats apportent des informations clés sur les premières réponses à la suite du stress thermique subi par les juvéniles. Ce travail souligne ainsi le potentiel impact du réchauffement climatique sur les juvéniles et par conséquent sur les populations de moule perlière. Par ailleurs, l'augmentation de la température constitue également un facteur pouvant affecter les populations du poisson hôte, représentant ainsi une menace supplémentaire pour la moule perlière. Les températures étudiées dans ce travail étant représentatives des conditions pouvant être relevées dans la Haute-Dronne, il est nécessaire de prendre en compte ce facteur dans les stratégies de conservation notamment en ce qui concerne la restauration de la continuité écologique du cours d'eau et la réhabilitation des berges de la Haute-Dronne pour garantir le maintien des températures fraîches en période estivale.

## BILAN DU CHAPITRE VII

L'objectif des travaux présentés dans ce chapitre concerne l'évaluation des effets engendrés par des conditions représentatives de la Haute-Dronne impliquant d'une part, une dégradation du milieu naturel et d'autre part, une augmentation de la température afin de simuler les potentiels effets du réchauffement climatique. Les résultats ont montré que seule la température induisait des effets qui ont pu être observés au niveau moléculaire. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans les précédentes études présentées dans cette thèse. Tout d'abord, l'étude réalisée sur l'évaluation de la contamination des juvéniles par l'arsenic à 16°C (**Chapitre IV**) a montré que des concentrations de 10 et 35 µg/L induisaient des effets au niveau moléculaire seulement après 21 jours d'exposition. Dans ce chapitre, les juvéniles ont été exposés à des concentrations comprises entre 24 et 37 µg/L pendant 14 jours. La différence dans la durée d'exposition peut expliquer l'absence d'impacts au niveau moléculaire, causés par une contamination à l'As. De plus, la différence d'âge des juvéniles étudiés peut également expliquer cette différence de sensibilité puisque les jeunes moules présentaient presque 2 années de différence (soit 17 mois pour le **Chapitre IV** et 38 mois pour le **Chapitre VII**). L'étude réalisée sur l'évaluation de l'effet des nutriments en mélange, associés à différentes températures (**Chapitre V**) a montré de faibles impacts au niveau de l'expression des gènes uniquement dans les conditions de nutriments en mélange et à 16°C et que ces effets étaient accentués par une exposition des juvéniles à une température de 22°C. De plus, lorsque la température est étudiée seule, des réponses au niveau transcriptomique sont essentiellement observées lorsque les juvéniles sont exposés à 26°C. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans ce chapitre, où la température apparaît comme un facteur affectant les juvéniles notamment sur l'expression des gènes étudiés et impacte principalement le métabolisme mitochondrial, l'apoptose, la réparation de l'ADN et le stress oxydant. Par ailleurs, la contamination métallique, considérée comme extrême, étant représentative des concentrations maximales retrouvées dans la Haute-Dronne, n'a pas conduit à une accumulation significative de ces ETMs au sein des juvéniles malgré l'augmentation de la température. Aussi, la contamination par les nutriments étudiés en mélange et à des concentrations représentatives des seuils de qualité environnementale, n'a pas conduit à des effets délétères sur les organismes. Ces observations sont également appuyées par l'étude présentée dans le **chapitre V**, où aucun effet n'a été reporté sur l'expression des gènes lorsque les juvéniles ont été exposés aux nutriments en mélange

pendant 21 jours et à 16°C. Ces résultats soulignent ainsi l'innocuité de ces éléments nutritifs sur les juvéniles en termes d'effet direct puisque la présence des nutriments peut à long terme contribuer à la dégradation du milieu et ainsi indirectement affecter l'espèce.

L'étude menée dans ce chapitre a été réalisée dans l'optique d'englober l'ensemble des différentes études menées dans cette thèse permettant de reproduire au mieux les conditions représentatives du milieu naturel où l'effet des facteurs étudiés est évalué à partir des différentes méthodes employées au cours de cette thèse. Cependant, d'autres critères écotoxicologiques doivent être évalués afin de confirmer les effets qui ont été observés à l'échelle la plus basse de l'organisme. De plus, dans le milieu naturel, d'autres facteurs environnementaux et de contamination qui n'ont pas été pris en compte dans cette étude peuvent influencer les effets observés de manière positive ou négative. Par exemple, la présence de matière en suspension peut réduire la biodisponibilité des contaminants métalliques tout comme la présence de contaminants organiques tels que les pesticides peuvent affecter les juvéniles. Néanmoins, ce chapitre a permis de souligner l'impact avéré des fortes températures sur les juvéniles mais également l'innocuité des nutriments et des contaminants métalliques en concentrations relativement élevées. Il est important de noter que ces expérimentations ont été réalisées sur du relatif court terme (jusqu'à 21j) compte-tenu de la durée de vie de la moule perlière, et que d'autres effets sublétaux pourraient être observés suite à une exposition à beaucoup plus long terme.



---

## **CHAPITRE VIII. Synthèse et perspectives**

Les différents travaux présentés dans cette thèse avaient pour but de répondre à trois objectifs :

- 1. Quels sont les principaux facteurs environnementaux et de contamination pouvant affecter les populations de moule perlière à l'échelle de la Haute-Dronne ?**
- 2. Quelle est la sensibilité « générale » des juvéniles de moule perlière, considéré comme le stade le plus vulnérable de l'espèce, aux différents facteurs sélectionnés ?**
- 3. Quels sont les mécanismes de toxicité induits par ces différents facteurs ?**

Afin de répondre à ces objectifs, une étude bibliographique a été réalisée en amont des expérimentations afin de déterminer les principaux facteurs environnementaux et de contamination pouvant affecter les moules perlières à l'échelle Européenne et au niveau de la Haute-Dronne. Différents types de tests de toxicité menés à court (96 heures) et long (> 7 jours) terme, en conditions contrôlées de laboratoire, ont été mis en place afin d'évaluer les effets des facteurs de stress sélectionnés, sur les juvéniles de *M. margaritifera* âgés de 3 jours à 38 mois, et issus d'élevage en captivité. Ainsi, deux grandes approches ont été employées :

- ◆ L'étude de la toxicité aiguë des facteurs de contamination permettant la détermination des seuils de toxicité ;
- ◆ L'étude de la toxicité subaiguë et chronique des facteurs de stress étudiés seuls et en mélange, qui permet d'évaluer les mécanismes de toxicité induits par ces différents facteurs dans des conditions environnementales réalistes.

Les principaux résultats obtenus pour chacune des études présentées dans ce manuscrit sont décrits dans le tableau XLV. La suite du chapitre porte sur les discussions autour des résultats majeurs obtenus, de l'implication de ces données et des perspectives de recherche qui en découlent.

**Tableau XLV.** Résultats majeurs des différents travaux présentés dans ce manuscrit. Le type de test de toxicité, la durée, les paramètres étudiés, l'âge des juvéniles ainsi que les facteurs de stress étudiés, sont également présentés dans ce tableau.

Chapitres	Type de test de toxicité (durée)	Paramètres étudiés	Âges des juvéniles	Facteurs de stress	Résultats majeurs
III	Toxicité aiguë (96 heures)	Mobilité des organismes (CE50)	3 jours	As, Al, Cd, Cu, Ni, NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> et PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Tolérance aux [ETM] et [NUT] &gt;&gt;&gt; aux concentrations environnementales</li> <li>● Sensibilité de <i>M. margaritifera</i> / autres moules d'eau douce: (+) aux NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et au Ni; (-) au Cd et <b>intermédiaire</b> au Cu.</li> </ul>
III	Toxicité aiguë (96 heures)	Mobilité des organismes (CE50)	Entre 10 et 28 mois	As, Al, Cd, NaCl, NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> et PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Tolérance aux [ETM] et [NUT] &gt;&gt;&gt; aux concentrations environnementales</li> <li>● Sensibilité dépendante de l'âge</li> </ul>
IV	Toxicité chronique (21 jours)	Bioaccumulation du Cd et expression génique	16 mois	Cd	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Bioaccumulation du Cd dépendante du temps d'exposition et de la dose</li> <li>● Impacts moléculaires : détoxification, réparation de l'ADN, apoptose et traduction</li> </ul>
IV	Toxicité chronique (21 jours)	Bioaccumulation d'As et expression génique	17 mois	As	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Bioaccumulation d'As faible et dépendante du temps</li> <li>● Impacts moléculaires : apoptose et métabolisme mitochondrial</li> </ul>
V	Toxicité sub-aiguë (96 heures)	Expression génique	14 mois	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> et T°C	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Impacts lorsque nutriments en mélange (altération du stress oxydant et de l'apoptose)</li> <li>● Effets accentués par une augmentation de la T°C à 22°C (métabolisme mitochondrial, apoptose, réparation de l'ADN et traduction)</li> </ul>
V	Toxicité chronique (14 jours)	Expression génique	19 mois	T°C	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Impacts au niveau moléculaire uniquement à forte température (26°C) : stress oxydant et mécanismes de réparation de l'ADN affectés</li> </ul>
V	Toxicité chronique (21 jours)	Expression génique	32 mois	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> et PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Impacts moléculaires faibles (un seul gène sur 15 impacté lorsque nutriments en mélange)</li> <li>● Étude appuyant la sensibilité dépendante de l'âge des juvéniles</li> </ul>
VII	Toxicité chronique (14 jours)	Mobilité des organismes, bioaccumulation des métaux, expression génique et comportement	38 mois	As, Al, Cu, NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> et T°C	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Mobilité non affectée en condition "extrême" de contamination et de T°C après 14 jours</li> <li>● Faible accumulation d'As et absence d'accumulation de Cu et Al</li> <li>● Impacts moléculaires essentiellement induits par températures élevées (26 et 30°C) : altération des capacités anti-oxydantes et du métabolisme énergétique des juvéniles</li> <li>● Aucune altération au niveau du comportement des juvéniles</li> </ul>

# 1. Principaux facteurs environnementaux et de contamination pouvant affecter les populations de moule perlière à l'échelle de la Haute-Dronne

## Facteurs de contamination métallique dans la Haute-Dronne

La Haute-Dronne est une rivière de bonne qualité peu soumise aux pressions anthropiques (Système d'information sur l'eau – Adour-Garonne), justifiant ainsi la présence d'une des plus importantes populations de *M. margaritifera* à l'échelle nationale. Cependant, la présence de contaminants métalliques en concentrations relativement élevées par endroits soulève des questions concernant l'impact de ces éléments traces métalliques sur l'espèce. En effet, des concentrations en As ont été relevées avec une valeur maximale de 35 µg/L en 2015. À titre de comparaison, des teneurs comprises entre 1 et 10 µgAs/L sont retrouvées dans les eaux de surface non polluées (Sharma and Sohn 2009). Les teneurs moyennes en arsenic retrouvées dans la Haute-Dronne se situent aux alentours de 6 µg/L (données internes) avec des valeurs comprises entre 2 et 35 µg/L (n=10). Bien que les concentrations moyennes en As soient en accord avec les teneurs généralement retrouvées dans les eaux de surface non polluées, l'occurrence de valeurs supérieures à ces teneurs dans la Haute-Dronne s'expliquent notamment par le fond géochimique du site d'étude riche en As (Mauroux et al. 2009). Ainsi, il apparaît nécessaire d'étudier l'impact de cet ETM et d'évaluer la réponse des juvéniles de *M. margaritifera* exposés à l'As. Le cadmium est très peu présent au sein de la Haute-Dronne (< 0.6 µg/L) cependant les effets de ce contaminant sur les bivalves sont très bien documentés (Baudrimont et al. 1997; Géret et al. 2002; Baudrimont et al. 2003; Legeay et al. 2005; Marie et al. 2006; Arini et al. 2014) et constituent ainsi une base comparative des effets engendrés par l'arsenic. Un autre contaminant métallique retrouvé en concentration relativement élevée est l'aluminium. Une concentration maximale de 120 µg/L a été relevée au sein de l'eau de culture de la ferme aquacole en 2018 (données internes non publiées) alors que la Haute-Dronne contient en moyenne 16 µgAl/L avec des valeurs comprises entre 5 et 54 µg/L (n=10). D'autres ETMs, utilisés dans certains pesticides ou contenus dans les effluents des stations d'épuration, sont également présents en quantité relativement faible dans la rivière et peuvent également avoir un impact sur l'espèce. C'est notamment le cas du cuivre et du nickel dont les concentrations moyennes mesurées dans la Haute-Dronne en 2015 étaient de 1.3 µg/L (avec des valeurs comprises entre 0.9 et 1.8 µg/L) pour le Cu et < à 0.8 µg/L pour Ni.

### **Facteurs majeurs décrits par la littérature**

Dans la littérature, les nutriments responsables de l'eutrophisation des milieux aquatiques, tels que les nitrates et les ortho-phosphates, sont considérés comme des facteurs majeurs pouvant affecter les populations de moule perlière. Cependant, les effets exacts et directs de ces nutriments ne sont pas connus puisque les valeurs-guides fixées pour l'espèce sont basées sur des observations effectuées dans le milieu naturel (Bauer 1988; Moorkens 2000). Dans la Haute-Dronne, les nutriments sont peu présents avec des teneurs moyennes mesurées entre 2015 et 2019, de 6.5 mgNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L et 0.08 mgPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L. Cette rivière n'est cependant pas totalement épargnée des activités agricoles qui peuvent contribuer à des apports ponctuels en nutriments. Les valeurs-guides fixées par Moorkens 2000, déterminées par l'absence de juvéniles au sein des cours d'eau irlandais, sont très proches des concentrations retrouvées dans la Haute-Dronne, soit 7.5 mgNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L et 0.06 mgPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L. Le seuil de qualité environnementale pour les nitrates étant fixé à 18 mg/L (arrêté du 5 mars 2015) et des concentrations en ortho-phosphates supérieures à 1 mg/L indiquant une pollution excessive d'une masse d'eau (Genin et al. 2003), l'évaluation de l'impact des nutriments sur les moules perlières est nécessaire.

### **La température : un facteur environnemental en augmentation**

En ce qui concerne les facteurs environnementaux pouvant affecter les populations de moule perlière de la Haute-Dronne, l'augmentation de la température liée au réchauffement climatique, est un paramètre à prendre en compte puisqu'elle joue un rôle important dans le métabolisme des organismes ectothermes et peut également influencer leur répartition géographique. Par ailleurs, pour certaines espèces de poisson comme la truite fario, l'élévation de la température peut induire un stress physiologique chez le poisson, augmentant ainsi sa vulnérabilité aux facteurs environnementaux comme les infections bactériennes par exemple. En 2017 et 2018, des pics de température ont été mesurés en été au sein de la Haute-Dronne, allant jusqu'à 30°C, alors que la température moyenne annuelle de cette rivière est de 16°C. De plus, la présence d'étangs le long de la Haute-Dronne peut également conduire au réchauffement global de la T°C de la rivière puisque ces masses d'eau constituent des plans d'eau stagnants qui se réchauffent facilement en période estivale. Bien que les pics de T°C relevés dans la Haute-Dronne, aient été mesurés de manière ponctuelle,

il est nécessaire de déterminer les impacts de ce facteur de stress qui permettra d'appréhender les potentiels effets du réchauffement climatique.

Dans le cadre de cette thèse, trois groupes de facteur de stress ont donc été sélectionnés afin d'évaluer la sensibilité des juvéniles de moule perlière : **les ETMs (As, Al, Cd, Cu et Ni), les nutriments ( $\text{NO}_3^-$  et  $\text{PO}_4^{3-}$ ) et la température.** Le chlorure de sodium (NaCl) a également été étudié en termes de toxique de référence pour les moules d'eau douce notamment pour le développement des protocoles d'expérimentation.

En perspective des facteurs de stress sélectionnés, il aurait été intéressant d'étudier l'effet des pesticides ou des produits vétérinaires sur les juvéniles de *M. margaritifera*, molécules qui peuvent être présentes dans cette rivière par les activités agricoles présentes sur le bassin versant. Dans le cadre de cette thèse, une première approche a été développée grâce à l'encadrement d'un étudiant de Master 1, et a permis d'évaluer la toxicité aigüe d'un herbicide (RoundUp®) et de sa substance active (glyphosate), sur les juvéniles de moule perlière. Les résultats ont montré que les juvéniles de *M. margaritifera* âgés de plus d'un an, toléraient de fortes concentrations en glyphosate et en RoundUp® puisque les seuils de toxicité (CE50 à 96h) sont supérieurs à 1mg/L pour chaque composé. Bringolf et al. 2007, ont déterminé des seuils de toxicité (CE50 à 96h) de 5.9 mg/L pour le RoundUp et > à 200mg/L pour le glyphosate, pour des juvéniles de *Lampsilis siliquoidea* (moule d'eau douce de la Famille Unionidae) âgés de 2 à 8 semaine, montrant la forte résistance de cette espèce aux deux composés. Une autre étude menée sur des larves de *Utterbackia imbecillis* (Famille Unionidae) a quant à elle montré une sensibilité plus importante de *U. imbecillis* au RoundUp (CL50 à 24h = 18.3 mg/L) comparé aux espèces communément étudiées lors de tests de toxicité aigüe comme les daphnies (*Daphnia magna*) avec une CL50 à 24h comprise entre 24 et 37 mg/L et le gammare (*Gammarus pseudolimnaeus*) avec une CL50 à 24h de 100 mg/L (Conners and Black 2004). Cette même étude suggère que les moules d'eau douce pourraient figurer parmi les espèces les plus sensibles à certains composés organiques comparé à d'autres organismes aquatiques comme cela a déjà été montré pour les métaux et autres ions majeurs tels que l'ammoniac, le chlore, le cuivre, le nickel, le plomb ou encore le zinc (Wang et al. 2017; Popp et al. 2018).

Une autre perspective en termes de facteur environnemental concerne l'évaluation des effets de l'hypoxie sur les moules perlières. En effet, ce paramètre est important pour la

survie des juvéniles puisqu'une bonne oxygénation du sédiment leur est nécessaire. Par ailleurs, la présence de barrages et de seuils le long de la Haute-Dronne peut conduire à la formation de zones hypoxiques en amont de ces obstacles. De plus, l'augmentation de la température causée par le réchauffement climatique, ainsi que par la présence de seuils conduisant au ralentissement du débit de l'eau et donc au réchauffement de l'eau, peuvent conduire à une diminution de la quantité d'oxygène dissous dans certaines zones de cette rivière. Ainsi il conviendrait de déterminer les besoins en oxygène de l'espèce et d'évaluer sa sensibilité aux contaminants en condition d'hypoxie puisque pour répondre à ses besoins, la moule perlière peut éventuellement effectuer une hyperventilation qui résultera d'une accumulation plus importante des contaminants.

## **2. Quelle est la sensibilité « générale » des juvéniles de *M. margaritifera* aux facteurs de contamination métallique et aux nutriments ?**

L'ensemble des travaux présentés dans le **CHAPITRE III** ont montré une certaine tolérance des juvéniles de moule perlière à des concentrations en éléments traces métalliques et en nutriments qui sont largement supérieures à celles retrouvées dans l'environnement. En ce qui concerne la sensibilité de l'espèce au NaCl, *M. margaritifera* semble figurer parmi les espèces les plus sensibles puisqu'une CE50 de 1.2 (1.1 -1.3) gNaCl/L pour des juvéniles de 10 mois a été déterminée contre 1.7 à 3.7 gNaCl/L pour cinq autres espèces de moules d'eau douce âgés de moins de 10 jours (Wang et al. 2017). En outre, des seuils de toxicité plus bas sont attendus pour des juvéniles de *M. margaritifera* fraîchement décrochés (âgés de 3 jours), suggérant ainsi une sensibilité plus importante de l'espèce. Sur l'ensemble des facteurs de contamination étudiés (ETMs et nutriments), les seuils de toxicité (CE50) déterminés pour les juvéniles âgés de 13 à 28 mois sont > 110 µg/L pour Cd, > 127 µg/L pour As, > 954 µg/L pour Al, > 5.01 mg/L for PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> ; entre 1000 et 1500 mg/L pour NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et, 1.19 et 1.33 g/L pour NaCl. Pour les juvéniles âgés de 3 jours, le rang de sensibilité des organismes en fonction des contaminants a été déterminé comme suit : Cd > Cu > Ni > As > Al > PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> > NO<sub>3</sub><sup>-</sup> avec des CE50 de 29 µgCd/L, 33 µgCu/L, 100 µgNi/L, > 130 µgAs/L, > 693 µgAl/L, > 5.68 mg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/L et de 1081 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. Par ailleurs, ces mêmes résultats soulignent la sensibilité dépendante de l'âge des juvéniles de moule perlière, par exemple pour le Cd avec une CE50 supérieure à 147 µg/L pour les juvéniles âgés de 22 mois contre une CE50 de 29 µg/L pour les jeunes moules âgés de 3

jours. À partir de données collectées dans la littérature, il a été montré que la sensibilité des juvéniles de *M. margaritifera* par rapport à d'autres espèces de moule d'eau douce de la même superfamille (Unionoidea), dépendait du contaminant. En effet, les juvéniles de moule perlière âgés de 3 jours se sont montrés plus sensibles aux nitrates avec une CE50 de 1081 mg/L (n=5) et au Ni avec une CE50 de 100 µg/L (n=8). En ce qui concerne le Cd, *M. margaritifera* s'avère être l'espèce la plus sensible avec une CE50 de 29 µg/L comparé à 4 autres espèces de moule d'eau douce (n=4), alors que pour le Cu, les juvéniles de moule perlière présentent une sensibilité intermédiaire avec une CE50 de 33 µg/L (n=21).

Pour conclure sur la sensibilité de *M. margaritifera*, l'espèce semble moins sensible que ce que stipule la littérature notamment en ce qui concerne sa sensibilité à la pollution environnementale. La moule perlière reste cependant la plus sensible pour certains composés (NaCl, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et le Ni) comparé à d'autres moules d'eau douce de la famille des Unionidés. L'ensemble des seuils de toxicité obtenus à travers les différents travaux présentés dans le **CHAPITRE III**, permettront dans le cadre du projet Européen (LIFE13 NAT/FR/000506, Haute-Dronne), d'améliorer le ciblage des zones de réintroduction des juvéniles dans le milieu naturel.

En perspective des résultats obtenus concernant la sensibilité de l'espèce à différents facteurs de contamination métallique et aux nutriments, ces premiers résultats ayant montré une sensibilité plus importante pour les juvéniles âgés de 3 jours, il serait intéressant d'évaluer la sensibilité des glochidies de moule perlière qui pourraient être récoltées *in situ* au moment de leur expulsion par les adultes lors de la période de ponte (limitée à une fois par an). Des travaux préliminaires ont été réalisés en début de thèse sur des glochidies de moule perlière, cependant une optimisation du protocole d'expérimentation est nécessaire. Ces travaux ont malgré tout montré que la mobilité des larves était affectée lorsque qu'elles étaient exposées à une température de 24°C pendant 24 heures. De plus, il serait également intéressant d'évaluer la sensibilité des juvéniles à la température en déterminant le seuil de toxicité pour ce paramètre (TL50, température létale à 50%). Ces données permettront notamment d'évaluer l'optimum thermique de l'espèce et ainsi d'appréhender les potentiels effets du réchauffement climatique et de la présence de seuils de long de la Haute-Dronne.



### 3. Quels sont les mécanismes de toxicité induits par les différents facteurs de stress étudiés ?

#### Effets du chlorure de sodium (NaCl)

Dans cette thèse, le NaCl a été étudié en tant que toxique de référence notamment pour le développement des protocoles expérimentaux et selon les recommandations du guide standard pour réaliser des tests de toxicité sur les moules d'eau douce (ASTM E2455 2006). Les travaux présentés dans le **CHAPITRE VI**, ont montré que l'exposition des juvéniles âgés de 34 mois à 0.8 et 1.2 gNaCl/L (correspondant à la 96h-CL20 et à la 96h-CL50 déterminées pour des juvéniles de 13 mois, **CHAPITRE III**), conduisait à une réduction par deux des capacités de déplacement des jeunes moules (80 mm en moyenne pour les juvéniles non exposés contre 40 mm pour les juvéniles contaminés). Ce résultat suggère que le salage des routes se situant aux alentours de la Haute-Dronne en période d'hiver peut constituer une problématique non négligeable pour l'espèce.

#### Impacts des éléments traces métalliques (As, Al, Cd et Cu)

Concernant les contaminants métalliques, l'arsenic est très peu accumulé au sein des juvéniles de moule perlière. Les travaux présentés dans les **CHAPITRE IV et VII**, ont montré que les juvéniles âgés de 17 mois accumulaient des teneurs inférieures à 4 µgAs/g, ps, après 21 jours d'exposition à 35 µgAs/L et que les juvéniles âgés de 38 mois accumulaient des teneurs maximales de 1.5 µgAs/g, ps, à la suite de leur exposition à des concentrations en As comprises entre 32 et 37 µg/L pendant 14 jours. Les individus témoins présentaient quant à eux des teneurs inférieures à 1 µgAs/g, ps, suggérant ainsi que malgré leur élevage en captivité avec l'eau de la Haute-Dronne (contenant en moyenne  $15 \pm 1$  µgAs/L, en 2018), l'accumulation d'As par les juvéniles reste limitée. Les réponses transcriptomiques des juvéniles à la suite de leur exposition à l'As de façon chronique (sur 21 jours) ont montré des atteintes au niveau du processus d'apoptose et du métabolisme mitochondrial à l'échelle moléculaire. Les effets ont été observés seulement après 7 jours d'exposition (à 35µg/L) et après 21 jours (à 10 et 35µg/L). Ces résultats soulignent les réponses tardives des juvéniles puisque les réponses transcriptomiques sont généralement précoces.

Contrairement à l'As, les juvéniles accumulent efficacement le Cd puisque l'exposition des juvéniles âgés de 16 mois à 5 µgCd/L pendant 21 jours a conduit à l'accumulation de ce métal

à hauteur de 22 µgCd/g, ps, au sein des organismes contre 1.1µg/g, ps, chez les témoins. De plus, l'accumulation du Cd s'est montrée dépendante de la dose et du temps d'exposition. Ce résultat est en accord avec une précédente étude menée sur les impacts du Cd sur les adultes de *M. margaritifera* qui a également montré une accumulation du Cd de manière dose-dépendante (Baudrimont et al. 2020). L'exposition chronique des jeunes moules au Cd a induit des impacts au niveau moléculaire sur divers processus biologiques : la détoxification (induction du gène *mt*), la réparation de l'ADN (induction du gène *rad51*), l'apoptose (répression du gène *bcl2*) et la traduction (répression du gène *elf2*). Contrairement aux juvéniles, les adultes de *M. margaritifera* exposés à 5µgCd/L pendant 7 jours présentaient une altération des capacités anti-oxydantes, du métabolisme mitochondrial et de la détoxification, au niveau moléculaire (Baudrimont et al. 2020). Ces résultats montrent que les réponses transcriptomiques de l'espèce à un facteur de stress donné dépendent de son stade de vie voire de son âge. Par ailleurs, l'expression du gène codant pour les métallothionéines (MT) a été induite aussi bien chez les juvéniles que chez les adultes exposés au Cd, cet élément trace métallique étant connu pour induire la synthèse de MT chez les bivalves d'eau douce (Couillard et al. 1995; Baudrimont et al. 1997; Geng et al. 2015) et marins (Zorita et al. 2007; Paul-Pont et al. 2010; Pytharopoulou et al. 2011).

L'aluminium a quant à lui été peu accumulé par les juvéniles exposés à des concentrations de 100 µg/L sur une période de 14 jours. Cependant, des teneurs en Al comprises entre 100 et 200 µg/g, ps, ont pu être observées chez des juvéniles âgés de 38 mois, reflétant ainsi l'accumulation chronique (environ 3 ans) de ce métal lors de leur élevage en captivité au sein de la ferme aquacole de Firbeix avant la mise en place des expérimentations. L'accumulation de l'Al par les juvéniles de moule perlière semble ainsi se manifester sur du long terme et peut être expliquée par une régulation efficace de cet ETM jusqu'à un certain seuil ou par un métabolisme lent de l'espèce.

En ce qui concerne le cuivre, les juvéniles de *M. margaritifera* semblent réguler cet ETM de manière efficace. En effet, après 14 jours d'exposition des juvéniles âgés de 38 mois à des concentrations comprises entre 2 et 5 µgCu/L, des teneurs similaires en Cu ont été mesurées dans les individus témoins et contaminés (environ 30 µgCu/g, ps). À titre de comparaison, des juvéniles de *Lampsilis siliquoidea* (âgés de 6 mois) qui ont été exposés à 2µgCu/L pendant 14 jours, ont accumulés jusqu'à 100 µgCu/g, ps (Jorge et al. 2013). Ce résultat indique une

meilleure capacité de régulation du Cu par les juvéniles de *M. margaritifera* comparé à une autre espèce de moule d'eau douce de la même superfamille.

### **Impacts des nutriments ( $\text{NO}_3^-$ et $\text{PO}_4^{3-}$ )**

Les effets sub-létaux induits par les nutriments ont été étudiés sur des juvéniles âgés de 14 et 32 mois. Lorsque les nutriments sont étudiés seuls, aucun impact n'est observé au niveau moléculaire (sur les 15 gènes étudiés), quel que soit l'âge des juvéniles et la concentration en nutriments (de 5 à 50 mg/L pour les nitrates et de 0.05 à 1 mg/L pour les ortho-phosphates). Ces résultats suggèrent que les nitrates et les phosphates, étudiés indépendamment l'un de l'autre, n'exercent aucun effet toxique à l'échelle moléculaire sur les 15 gènes étudiés, pour des concentrations allant jusqu'à 50 mg/L pour les  $\text{NO}_3^-$  et jusqu'à 1 mg/L pour les  $\text{PO}_4^{3-}$ . Cependant, lorsque les nutriments sont étudiés en mélange, les juvéniles âgés de 14 mois présentent des impacts au niveau moléculaire sur les processus d'apoptose et sur le stress oxydant, indiquant de potentiels altérations à l'échelle de la cellule. Par ailleurs, les juvéniles âgés de 32 mois ne présentent aucun impact sur l'expression des gènes étudiés au même temps d'exposition (96 heures). Seule l'expression d'un gène (gène *bcl2* en relation avec l'apoptose) a été affectée après 14 jours d'exposition aux nutriments (50 mg $\text{NO}_3^-$ /L + 1 mg $\text{PO}_4^{3-}$ /L). Ces résultats soulignent la sensibilité de l'espèce dépendante de l'âge des juvéniles puisque le profil des réponses transcriptomiques est différent pour un même temps d'exposition et pour des juvéniles ayant 18 mois de différence.

### **Impacts de la température**

Les travaux présentés dans cette thèse ont montré que les juvéniles de moule perlière âgés de 38 mois pouvaient survivre jusqu'à 14 jours à des T°C de 26 et 30°C. Cependant des effets sur les réponses transcriptomiques ont été observés. En effet, l'exposition des juvéniles de 38 mois aux T°C élevées (26°C et 30°C) a conduit à des altérations du métabolisme mitochondrial et du stress oxydant à l'échelle moléculaire, indiquant de potentiels impacts sur le métabolisme énergétique et les capacités anti-oxydantes des juvéniles. Ces résultats soulignent les potentiels impacts à l'échelle des populations de moule perlière de la Haute-Dronne puisqu'une réduction du métabolisme énergétique peut avoir une influence sur les fonctions biologiques nécessaires à la survie de l'espèce comme la croissance et la reproduction. De plus, l'exposition des juvéniles âgés de 19 mois à une T°C de 26°C induit des altérations à l'échelle moléculaire sur le stress oxydant et les mécanismes de réparation de

l'ADN alors qu'à 22°C, aucun impact sur les 15 gènes étudiés n'a été observé. Ce résultat indique que des T°C supérieures ou égales à 26°C conduit à des altérations à l'échelle moléculaire. Cependant, lorsque le facteur T°C est étudié en combinaison aux nutriments, les effets observés au niveau moléculaire sont accentués puisque 4 fonctions biologiques sont touchées à 22°C (métabolisme mitochondrial, apoptose, réparation de l'ADN et traduction) contre seulement deux fonctions à 16°C (apoptose et stress oxydant). Par ailleurs, les réponses transcriptomiques diffèrent en fonction de l'âge des juvéniles puisqu'après 14 jours d'exposition à 26°C les juvéniles âgés de 19 mois présentent une altération du stress oxydant et des mécanismes de réparation de l'ADN alors que le métabolisme énergétique et les capacités anti-oxydantes des juvéniles de 38 mois sont affectés. Ce résultat indique encore une fois que la sensibilité des jeunes moules est dépendante de leur âge, même en réponse à une augmentation de la T°C. Enfin, les T°C étudiées dans cette thèse reflétant les T°C pouvant être retrouvées dans la Haute-Dronne, il est impératif de prendre en compte ce paramètre dans les stratégies de conservation.

#### **Impacts des facteurs de stress en mélange (As + Al + Cu + NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> + T°C)**

L'étude des effets de différents facteurs de stress étudiés en mélange et en concentrations environnementales, a montré qu'une contamination « extrême » dans le cas de la Haute-Dronne avec [As]= 35µg/L, [Al]= 120 µg/L, [Cu]= 2 µg/L, [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>]= 50mg/L et [PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>]= 1mg/L, ne conduisait pas à des impacts sur l'expression des gènes étudiés, sur la mobilité des juvéniles et sur leur comportement en termes de déplacement. Ce résultat indique que les juvéniles âgés de 38 mois sont résistants à des conditions « extrêmes » sur 14 jours. Lorsque le facteur température est associé à cette contamination (26 et 30°C), la mobilité des juvéniles ainsi que leur comportement ne sont toujours pas affectés. Cependant des impacts ont pu être relevés à l'échelle moléculaire alors qu'à 16°C, aucun effet n'a été observé sur les réponses transcriptomiques des juvéniles. Ces travaux ont ainsi montré que les impacts observés étaient essentiellement induits par des températures élevées (26° et 30°C). Ces T°C induisent des effets sur le métabolisme énergétique et les capacités anti-oxydantes des juvéniles de moule perlière suggérant ainsi que ce facteur environnemental peut potentiellement impacter les populations de cette espèce. En effet, une réduction du métabolisme énergétique peut porter atteinte aux fonctions biologiques nécessaires à leur survie ou leur reproduction. De plus, une altération des capacités anti-oxydantes peut créer

un déséquilibre dans la présence d'espèces réactives de l'oxygène dans l'organisme des jeunes moules et ainsi conduire à une induction du stress oxydant, néfaste pour l'intégrité des cellules.

Les réponses transcriptomiques constituent un biomarqueur remarquable en raison des réponses généralement précoces qu'elles peuvent fournir bien que les effets observés à l'échelle moléculaire ne conduisent pas inéluctablement à une altération physiologique ou comportementale. En perspective des mécanismes de toxicité induits par les différents facteurs étudiés dans cette thèse, il serait donc intéressant d'évaluer certaines activités enzymatiques des juvéniles pour confirmer les effets observés au niveau moléculaire. Il s'agirait notamment de cibler des protéines dont les gènes ont été modulés dans le cadre des études présentées dans cette thèse comme par exemple le dosage des activités anti-oxydantes (superoxyde dismutase), de protéines de détoxification (métallothionéines) ou encore des protéines connues pour répondre à un stress thermique (Heat Shock Protein). De plus, il a été montré que les réponses au niveau moléculaire se manifestaient tardivement, il conviendrait donc d'étudier le métabolisme général de l'espèce puisque *M. margaritifera* a une durée de vie exceptionnelle (jusqu'à plus d'un siècle). On pourrait notamment étudier l'activité des mitochondries ou la synthèse d'ATP (Adénosine triphosphate) et ainsi comparer le métabolisme de *M. margaritifera* à celui d'autres espèces. Par ailleurs, nous avons pu observer une très grande variabilité, en termes de taille, chez les juvéniles de moule perlière issus d'une même cohorte. Afin de déterminer l'origine de cette variabilité, il serait également intéressant de réaliser une étude épigénétique puisque la différence de taille chez les huîtres (*Crassostrea gigas*) est corrélée à un mécanisme épigénétique (Riviere et al. 2017). Des travaux préliminaires ont été réalisés au cours de la thèse sur 10 juvéniles provenant de la même cohorte et ayant une taille comprise entre 1.7 et 5.5 mm, où la méthylation de certains gènes en relation avec la croissance des bivalves a été mesurée. Les résultats obtenus à partir des gènes sélectionnés n'ont pas permis d'établir un lien entre la taille et la méthylation des gènes sélectionnés. Il serait donc intéressant de choisir d'autres gènes afin de déterminer l'origine de cette variabilité. De plus, dans cette thèse, une méthode permettant l'étude du comportement des juvéniles en termes de locomotion, a été développée et constitue la première étude comportementale sur les juvéniles de *M. margaritifera*. Les conditions d'exposition présentées dans le **CHAPITRE VII** n'ont pas conduit à une altération du déplacement des juvéniles. Au vu de ces résultats il serait notamment intéressant d'étudier

d'autres paramètres comportementaux qui pourraient être plus pertinents tels que la capacité d'enfouissement des juvéniles dans le sédiment ou encore la mobilité des organismes (en pourcentage) sur une période de temps donné. Lors de cette thèse, l'évaluation des capacités d'enfouissement des juvéniles n'a pas été possible en raison de leur faible taille (de l'ordre du diamètre des grains de sable présents dans le sédiment dans lequel les juvéniles sont élevés). Il conviendrait ainsi de réaliser cette étude sur des juvéniles ayant une taille plus importante, permettant de les distinguer des grains de sables. Par ailleurs, le comportement des juvéniles ayant une taille suffisante pour l'application de cette méthode ou des adultes, pourrait être étudié à l'aide de la valvométrie qui permet d'évaluer la capacité des bivalves à ouvrir et fermer leurs valves et permet notamment d'étudier leur capacité de filtration. Enfin, en raison de son statut d'espèce en danger critique d'extinction (UICN), il serait intéressant d'utiliser des méthodes non-destructives comme par exemple l'étude des effets des facteurs de stress sur l'hémolymphe des organismes. Cette technique qui ne conduit pas à la mortalité des individus, permettrait d'évaluer les impacts induits par les facteurs de stress à l'échelle moléculaire (réponses transcriptomiques) mais également à l'échelle de la cellule (activité enzymatique, protéomique, génotoxicité, évaluation des cellules apoptotiques par cytométrie en flux ou encore l'étude des réponses immunitaires).

L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse contribuent avant tout à l'amélioration des connaissances sur la sensibilité du jeune stade de vie de la moule perlière, répondant ainsi aux objectifs de la thèse. Au vu des résultats obtenus, la problématique d'As peut être écartée dans le cas de la Haute-Dronne et l'impact des nutriments doit être évalué à l'échelle des adultes, notamment sur la reproduction puisque les rivières contenant des populations de moule perlière sans recrutement sont marquées par la présence de ces nutriments (Moorkens 2000). De plus, il apparaît clairement que l'augmentation générale de la température n'est pas sans risques pour les populations de moule perlière déjà fragilisées dans plusieurs pays Européens. La réalisation des travaux présentés dans ce manuscrit constitue une opportunité exceptionnelle puisqu'ils ciblent une espèce en voie de disparition et permet finalement de combler les lacunes concernant la sensibilité de l'espèce à la pollution environnementale et aux effets potentiels du réchauffement climatique. De plus, les données obtenues apportent des informations clés et nécessaires pour les stratégies de conservation de l'espèce. Ainsi, les objectifs de la thèse ont été remplis bien que les résultats présentés ici ne représentent qu'une infime partie des connaissances qu'il reste encore à découvrir.

---

# BIBLIOGRAPHIE

Abernathy CO, Liu YP, Longfellow D, Aposhian H V, Beck B, Fowler B, Goyer R, Menzer R, Rossman T, Thompson C, et al. 1999. Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues. *Environmental health perspectives*. 107(7):593–597. doi:10.1289/ehp.99107593. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10379007>.

Adams W, Blust R, Dwyer R, Mount D, Nordheim E, Rodriguez PH, Spry D. 2020. Bioavailability Assessment of Metals in Freshwater Environments: A Historical Review. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 39(1):48–59. doi:<https://doi.org/10.1002/etc.4558>. <https://doi.org/10.1002/etc.4558>.

Ahmad S, Kitchin KT, Cullen WR. 2000. Arsenic Species That Cause Release of Iron from Ferritin and Generation of Activated Oxygen. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 382(2):195–202. doi:<https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2023>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000398610092023X>.

Akter KF, Owens G, Davey DE, Naidu R. 2005. Arsenic speciation and toxicity in biological systems. United States.

Andrade H, Massabuau JC, Cochrane S, Ciret P, Tran D, Sow M, Camus L. 2016. High frequency non-invasive (HFNI) bio-sensors as a potential tool for marine monitoring and assessments. *Frontiers in Marine Science*. 3(OCT):1–10. doi:10.3389/fmars.2016.00187.

Araujo R, Campos M, Feo C, Varela C, Soler J, Ondina P. 2018. Who wins in the weaning process? Juvenile feeding morphology of two freshwater mussel species. *Journal of Morphology*. 279(1):4–16. doi:10.1002/jmor.20748.

Araujo R, Ramos M. 2001. Action plans for *Margaritifera auricularia* and *Margaritifera margaritifera* in Europe. *Nature and Environment*. 117:29–66. <https://core.ac.uk/download/pdf/36038652.pdf>.

Araujo R, Ramos MA. 1998. Description of the glochidium of *Margaritifera auricularia* (Spengler 1793) (Bivalvia, Unionoidea). *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 353(1375):1553–1559. doi:10.1098/rstb.1998.0309.

Arini A, Daffe G, Gonzalez P, Feurtet-Mazel A, Baudrimont M. 2014. Detoxification and recovery capacities of *Corbicula fluminea* after an industrial metal contamination (Cd and Zn): A one-year depuration experiment. *Environmental Pollution*. 192(July 2014):74–82. doi:10.1016/j.envpol.2014.04.012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2014.04.012>.

ASTM E2455. 2006. American society for testing and materials, Standard guide for conducting laboratory toxicity tests with freshwater mussels E 2455-06. West Conshohocken, PA (United States): ASTM International.

ASTM E729. 2002. Methods for Acute Toxicity Tests With Fish, Macroinvertebrates, and Amphibians.

Augspurger T, Eller AE, Lack MC, Cope WG, Dwyer FJ. 2003. Water quality guidance for protection of freshwater mussels (unionidae) from ammonia exposure. *Environmental toxicology and Chemistry / SETAC*. 22(11):2569–2575.

Azizur Rahman M, Hasegawa H. 2012. Arsenic in freshwater systems: Influence of eutrophication on occurrence, distribution, speciation, and bioaccumulation. *Applied Geochemistry*. 27(1):304–314. doi:10.1016/j.apgeochem.2011.09.020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apgeochem.2011.09.020>.

Azizur Rahman M, Hasegawa H, Peter Lim R. 2012. Bioaccumulation, biotransformation and trophic transfer of arsenic in the aquatic food chain. *Environmental Research*. 116:118–



135. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envres.2012.03.014>.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935112001144>.
- Bagnyukova T V, Luzhna LI, Pogribny IP, Lushchak VI. 2007. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish liver in response to short-term exposure to arsenite. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 48(8):658–665. doi:<https://doi.org/10.1002/em.20328>. <https://doi.org/10.1002/em.20328>.
- Baker JA, Gilron G, Chalmers BA, Elphick JR. 2017. Evaluation of the effect of water type on the toxicity of nitrate to aquatic organisms. *Chemosphere*. 168:435–440. doi:[10.1016/j.chemosphere.2016.10.059](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.059).  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.059>.
- Barnhart MC, Haag WR, Roston WN. 2008. Adaptations to host infection and larval parasitism in Unionoida. *Journal of the North American Benthological Society*. 27(2):370–394. doi:[10.1899/07-093.1](https://doi.org/10.1899/07-093.1).
- Baudrimont M, Andres S, Durrieu G, Boudou A. 2003. The key role of metallothioneins in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase, after in situ exposure to Cd and Zn. *Aquatic Toxicology*. 63(2):89–102. doi:[https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00134-0](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00134-0).  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X02001340>.
- Baudrimont M, Gonzalez P, Mesmer-Dudons N, Legeay A. 2020. Sensitivity to cadmium of the endangered freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* from the Dronne River (France): experimental exposure. *Environmental Science and Pollution Research*. 27(4):3715–3725. doi:[10.1007/s11356-019-05025-0](https://doi.org/10.1007/s11356-019-05025-0).
- Baudrimont M, Metivaud J, Maury-Brachet R, Ribeyre F, Boudou A. 1997. Bioaccumulation and metallothionein response in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 16(10):2096–2105. doi:[10.1897/1551-5028\(1997\)016<2096:BAMRIT>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(1997)016<2096:BAMRIT>2.3.CO;2).
- Bauer G. 1988. Threats to the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* L. in Central Europe. *Biological Conservation*. 45(4):239–253. doi:[10.1016/0006-3207\(88\)90056-0](https://doi.org/10.1016/0006-3207(88)90056-0).
- Bauer G. 1992. Variation in the Life Span and Size of the Freshwater Pearl Mussel. *The Journal of Animal Ecology*. 61(2):425. doi:[10.2307/5333](https://doi.org/10.2307/5333).
- Bauer G, Vogel C. 1987. The parasitic stage of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.). I: Host response to glochidiosis. *Archiv für Hydrobiologie Supplementband Monographische Beiträge*. 76(4):393–402.
- Belamy T, Legeay A, Etcheverria B, Cordier M, Gourves P, Baudrimont M. 2020. Acute Toxicity of Sodium Chloride, Nitrates, Ortho-Phosphates, Cadmium, Arsenic and Aluminum for Juveniles of the Freshwater Pearl Mussel: *Margaritifera Margaritifera* (L.1758). *Environments*. 7(6):48. doi:[10.3390/environments7060048](https://doi.org/10.3390/environments7060048). <https://www.mdpi.com/2076-3298/7/6/48>.
- Bertucci A, Pierron F, Thébault J, Klopp C, Bellec J, Gonzalez P, Baudrimont M. 2017. Transcriptomic responses of the endangered freshwater mussel *Margaritifera margaritifera* to trace metal contamination in the Dronne River, France. *Environmental Science and Pollution Research*. 24(35):27145–27159. doi:[10.1007/s11356-017-0294-6](https://doi.org/10.1007/s11356-017-0294-6).
- Bigot A, Minguez L, Giambérini L, Rodius F. 2011. Early defense responses in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* exposed to copper and cadmium: Transcriptional and histochemical studies. *Environmental Toxicology*. 26(6):623–632. doi:<https://doi.org/10.1002/tox.20599>. <https://doi.org/10.1002/tox.20599>.

- Bissen M, Frimmel FH. 2003. Arsenic — a Review. Part I: Occurrence, Toxicity, Speciation, Mobility. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*. 31(1):9–18. doi:<https://doi.org/10.1002/aheh.200390025>. <https://doi.org/10.1002/aheh.200390025>.
- Bodansky O. 1951. Methemoglobinemia and methemoglobin-producing compounds. *Pharmacological reviews*. 3(2):144–196. <http://europepmc.org/abstract/MED/14843826>.
- Boeker C, Lueders T, Mueller M, Pander J, Geist J. 2016. Alteration of physico-chemical and microbial properties in freshwater substrates by burrowing invertebrates. *Limnologia*. 59:131–139. doi:10.1016/j.limno.2016.05.007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.limno.2016.05.007>.
- Bogan AE. 1993. Freshwater bivalve extinctions (mollusca: Unionoida): A search for causes. *Integrative and Comparative Biology*. 33(6):599–609. doi:10.1093/icb/33.6.599.
- Bonnard M, Roméo M, Amiard-Triquet C. 2009. Effects of Copper on the Burrowing Behavior of Estuarine and Coastal Invertebrates, the Polychaete *Nereis diversicolor* and the Bivalve *Scrobicularia plana*. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*. 15(1):11–26. doi:10.1080/10807030802614934. <https://doi.org/10.1080/10807030802614934>.
- Borcherding J. 2006. Ten Years of Practical Experience with the Dreissena-Monitor, a Biological Early Warning System for Continuous Water Quality Monitoring. *Hydrobiologia*. 556(1):417–426. doi:10.1007/s10750-005-1203-4. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-1203-4>.
- Bouchet P, Falkner G, Seddon MB. 1999. Lists of protected land and freshwater molluscs in the Bern Convention and European Habitats Directive: are they relevant to conservation? *Biological Conservation*. 90(1):21–31.
- Brewer SK, Little EE, DeLonay AJ, Beauvais SL, Jones SB, Ellersieck MR. 2001. Behavioral dysfunctions correlate to altered physiology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to cholinesterase-inhibiting chemicals. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 40(1):70–76. doi:10.1007/s002440010149.
- Bridges CM. 1997. Tadpole swimming performance and activity affected by acute exposure to sublethal levels of carbaryl. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 16(9):1935–1939. doi:10.1002/etc.5620160924. <https://doi.org/10.1002/etc.5620160924>.
- Bringolf RB, Cope WG, Mosher S, Barnhart MC, Shea D. 2007. Acute and chronic toxicity of glyphosate compounds to glochidia and juveniles of *Lampsilis siliquoidea* (Unionidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 26(10):2094–2100. doi:10.1897/06-519R1.1.
- Brockmöller J, Cascorbi I, Henning S, Meisel C, Roots I. 2000. Molecular Genetics of Cancer Susceptibility. *Pharmacology*. 61(3):212–227. doi:10.1159/000028403. <https://www.karger.com/DOI/10.1159/000028403>.
- Buddensiek V. 1995. The culture of juvenile freshwater pearl mussels *Margaritifera margaritifera* L. in cages: A contribution to conservation programmes and the knowledge of habitat requirements. *Biological Conservation*. 74(1):33–40. doi:10.1016/0006-3207(95)00012-S.
- Cairns J, Heath AG, Parker BC. 1975. The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Hydrobiologia*. 47(1):135–171. doi:10.1007/BF00036747.
- Calow P, Forbes VE. 1998. How do physiological responses to stress translate into ecological and evolutionary processes? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*:

Molecular & Integrative Physiology. 120(1):11–16. doi:[https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10003-X](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10003-X). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S109564339810003X>.

Camargo JA, Alonso Á. 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International*. 32(6):831–849. doi:10.1016/j.envint.2006.05.002.

Camargo JA, Alonso A, Salamanca A. 2005. Nitrate toxicity to aquatic animals: A review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere*. 58(9):1255–1267. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.10.044.

Caquet T, Thybaud E, Le Bras S, Ramade F. 1989. Utilisation de mesocosmes pour l'étude du comportement et des effets biologiques des composés phytosanitaires en milieu aquatique. Application à la deltaméthrine. *Mededelingen van de Faculteit landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent*. 54(3b):1049–1060.

Cervantes C, Ji G, Ramírez JL, Silver S. 1994. Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*. 15(4):355–367. doi:10.1111/j.1574-6976.1994.tb00145.x. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00145.x>.

Charifi M, Miserazzi A, Sow M, Perrigault M, Gonzalez P, Ciret P, Benomar S, Massabuau JC. 2018. Noise pollution limits metal bioaccumulation and growth rate in a filter feeder, the Pacific oyster *Magallana gigas*. *PLoS ONE*. 13(4):1–21. doi:10.1371/journal.pone.0194174.

Chen L-Y, Heath AG, Neves RJ. 2001. Comparison of oxygen consumption in freshwater mussels (Unionidae) from different habitats during declining dissolved oxygen concentration. *Hydrobiologia*. 450(1–3):209–214.

Chen Y-C, Lin-Shiau S-Y, Lin J-K. 1998. Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*. 177(2):324–333. doi:[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199811\)177:2<324::AID-JCP14>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199811)177:2<324::AID-JCP14>3.0.CO;2-9). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199811\)177:2%3C324::AID-JCP14%3E3.0.CO](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199811)177:2%3C324::AID-JCP14%3E3.0.CO).

Cheng S-Y, Chen J-C. 2002. Study on the oxyhemocyanin, deoxyhemocyanin, oxygen affinity and acid–base balance of *Marsupenaeus japonicus* following exposure to combined elevated nitrite and nitrate. *Aquatic Toxicology*. 61(3):181–193. doi:[https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00053-X](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00053-X). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X0200053X>.

Cochet G. 1999. Le statut des Margaritiferidae de France (Mollusca: Bivalvia: Unionacea: Margaritiferidae). *Vertigo*. 6(1996):27–31.

Cochet G. 2010. Etat de l'art sur la Moule perlière (*Margaritifera margaritifera*).

Cochet G, Gouilloux N. 2004. La moule perlière et les nayades de France: histoire d'une sauvegarde. Catiche Productions (Histoire d'une sauvegarde). <https://books.google.fr/books?id=tLVTGQAACAAJ>.

Connors DE, Black MC. 2004. Evaluation of Lethality and Genotoxicity in the Freshwater Mussel *Utterbackia imbecillis* (Bivalvia: Unionidae) Exposed Singly and in Combination to Chemicals Used in Lawn Care. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 46(3):362–371. doi:10.1007/s00244-003-3003-z.

Connon RE, Geist J, Werner I. 2012. Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. *Sensors (Switzerland)*. 12(9):12741–12771. doi:10.3390/s120912741.

- Cope WG, Bringolf RB, Buchwalter DB, Newton TJ, Ingersoll CG, Wang N, Augspurger T, Dwyer FJ, Barnhart MC, Neves RJ, et al. 2008. Differential exposure, duration, and sensitivity of unionoidean bivalve life stages to environmental contaminants. *Journal of the North American Benthological Society*. 27(2):451–462. doi:10.1899/07-094.1.
- Couillard Y, Campbell PGC, Tessier A, Auclair JC, Pellerin-Massicotte J. 1995. Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. I. Temporal changes in metallothionein and metal (Cd, Cu, and Zn) concentrations in soft tissues. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 52(4):690–702. doi:10.1139/f95-070. <https://doi.org/10.1139/f95-070>.
- Cullen WR, Reimer KJ. 1989. Arsenic speciation in the environment. *Chemical reviews*. 89(4):713–764.
- Cunjak RA, McGladdery SE. 1991. The parasite-host relationship of glochidia Mollusca: (Margaritiferidae) on the gills of young-of-the-year Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Zoology*. 69(2):353–358. doi:10.1139/z91-055.
- Cuttelod A, Seddon M, Neubert E. 2011. European Red List of Non-marine Molluscs.
- Davies KJA. 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. Rice-Evans C, Halliwell B, Lunt GG, editors. *Biochemical Society Symposia*. 61:1–31. doi:10.1042/bss0610001. <https://doi.org/10.1042/bss0610001>.
- Dell’Omo G. 2002. *Behavioural ecotoxicology*. John Wiley & Sons.
- Denic M, Geist J. 2015. Linking stream sediment deposition and aquatic habitat quality in pearl mussel streams: implications for conservation. *River research and applications*. 31(8):943–952.
- Depledge MH. 1994. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. *Nondestructive biomarkers in vertebrates*:271–295.
- Dixon HBF. 1996. The Biochemical Action of Arsonic Acids Especially As Phosphate Analogues. In: Sykes AGBT-A in IC, editor. Vol. 44. Academic Press. p. 191–227. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898883808601312>.
- Dodd BJ, Barnhart MC, Rogers-Lowery CL, Fobian TB, Dimock R V. 2006. Persistence of host response against glochidia larvae in *Micropterus salmoides*. *Fish and Shellfish Immunology*. 21(5):473–484. doi:10.1016/j.fsi.2006.02.002.
- Douda K. 2010. Effects of nitrate nitrogen pollution on central european unionid bivalves revealed by distributional data and acute toxicity testing. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. 20(2):189–197. doi:10.1002/aqc.1076.
- Dovzhenko N V, Kurilenko A V, Bel’cheva NN, Chelomin VP. 2005. Cadmium-induced oxidative stress in the bivalve mollusk *Modiolus modiolus*. *Russian Journal of Marine Biology*. 31(5):309–313.
- Dudgeon D, Arthington AH, Gessner MO, Kawabata ZI, Knowler DJ, Lévêque C, Naiman RJ, Prieur-Richard AH, Soto D, Stiassny MLJ, et al. 2006. Freshwater biodiversity: Importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 81(2):163–182. doi:10.1017/S1464793105006950.
- Duker AA, Carranza EJM, Hale M. 2005. Arsenic geochemistry and health. *Environment International*. 31(5):631–641. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.10.020>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412004001953>.

Elphick JRF, Bergh KD, Bailey HC. 2011. Chronic toxicity of chloride to freshwater species: Effects of hardness and implications for water quality guidelines. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 30(1):239–246. doi:10.1002/etc.365.

Exley C, Phillips MJ. 1988. *Recent Advances in Aquaculture*.

Farris JL, Van Hassel JH, (Society) S. 2007. A review of the use of unionid mussels as biological indicators of ecosystem health. In *Freshwater bivalve ecotoxicology*. Society of. Boca Raton : CRC Press, editor. Pensacola, FL: SETAC.

Fattorini D, Regoli F. 2004. Arsenic speciation in tissues of the mediterranean polychaete *Sabella spallanzanii*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23(8):1881–1887. doi:https://doi.org/10.1897/03-562. https://doi.org/10.1897/03-562.

Ferreira-Rodríguez N, Akiyama YB, Aksenova O V., Araujo R, Christopher Barnhart M, Bernal Y V., Bogan AE, Bolotov IN, Budha PB, Clavijo C, et al. 2019. Research priorities for freshwater mussel conservation assessment. *Biological Conservation*. 231(January):77–87. doi:10.1016/j.biocon.2019.01.002.

Filipsson K, Brijs J, Näslund J, Wengström N, Adamsson M, Závorka L, Österling EM, Höjesjö J. 2017. Encystment of parasitic freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) larvae coincides with increased metabolic rate and haematocrit in juvenile brown trout (*Salmo trutta*). *Parasitology Research*. 116(4):1353–1360. doi:10.1007/s00436-017-5413-2.

Filipsson K, Petersson T, Höjesjö J, Piccolo JJ, Näslund J, Wengström N, Österling EM. 2018. Heavy loads of parasitic freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) larvae impair foraging, activity and dominance performance in juvenile brown trout (*Salmo trutta* L.). *Ecology of Freshwater Fish*. 27(1):70–77. doi:10.1111/eff.12324.

Flynn K, Spellman T. 2009. Environmental levels of atrazine decrease spatial aggregation in the freshwater mussel, *Elliptio complanata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72(4):1228–1233. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.02.013.

Forbes VE, Forbes TL. 1997. *Ecotoxicologie: théorie et applications*. Editions Quae.

Freitas R, Salamanca L, Velez C, Wrona FJ, Soares AMVM, Figueira E. 2016. Multiple stressors in estuarine waters: Effects of arsenic and salinity on *Ruditapes philippinarum*. *Science of The Total Environment*. 541:1106–1114. doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.149. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004896971530810X.

Ganser AM, Newton TJ, Haro RJ. 2015. Effects of elevated water temperature on physiological responses in adult freshwater mussels. *Freshwater Biology*. 60(8):1705–1716.

Gebel T. 2000. Confounding variables in the environmental toxicology of arsenic. *Toxicology*. 144(1):155–162. doi:https://doi.org/10.1016/S0300-483X(99)00202-4. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X99002024.

Geist J. 2010. Strategies for the conservation of endangered freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera* L.): A synthesis of conservation genetics and ecology. *Hydrobiologia*. 644(1):69–88. doi:10.1007/s10750-010-0190-2.

Geist J, Auerswald K. 2007. Physicochemical stream bed characteristics and recruitment of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*). *Freshwater Biology*. 52(12):2299–2316. doi:10.1111/j.1365-2427.2007.01812.x.

Geist J, Porkka M, Kuehn R. 2006. The status of host fish populations and fish species

- richness in European freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) streams. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. 16(3):251–266. doi:10.1002/aqc.721.
- Geng N, Wang C, Wang P, Qi N, Ren L. 2015. Cadmium Accumulation and Metallothionein Response in the Freshwater Bivalve *Corbicula fluminea* Under Hydrodynamic Conditions. *Biological Trace Element Research*. 165(2):222–232. doi:10.1007/s12011-015-0266-y. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0266-y>.
- Genin B, Chauvin C, Ménard F. 1997. Cours d'eau et indices biologiques: pollutions, méthodes, IBGN. ENESAD-CNERTA. <https://books.google.fr/books?id=oZPVAAAACAAJ>.
- Genin B, Chauvin C, Ménard F. 2003. Cours d'eau et indices biologiques. Pollutions - méthodes - IBGN.
- Gensemer RW, Playle RC. 1999. The Bioavailability and Toxicity of Aluminum in Aquatic Environments. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 29(4):315–450. doi:10.1080/10643389991259245. <https://doi.org/10.1080/10643389991259245>.
- Géret F, Jouan A, Turpin V, Bebianno MJ, Cosson RP. 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):61–66. doi:10.1016/S0990-7440(01)01147-0.
- Gerhardt A. 2007. Aquatic behavioral ecotoxicology - Prospects and limitations. *Human and Ecological Risk Assessment*. 13(3):481–491. doi:10.1080/10807030701340839.
- Giacomin M, Gillis PL, Bianchini A, Wood CM. 2013. Interactive effects of copper and dissolved organic matter on sodium uptake, copper bioaccumulation, and oxidative stress in juvenile freshwater mussels (*Lampsilis siliquoidea*). *Aquatic Toxicology*. 144–145:105–115. doi:10.1016/j.aquatox.2013.09.028. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.09.028>.
- Giari L, Vincenzi F, Fano EA, Graldi I, Gelli F, Castaldelli G. 2017. Sensitivity to selected contaminants in a biological early warning system using *Anodonta woodiana* (Mollusca). *Water SA*. 43(2):200–208. doi:10.4314/wsa.v43i2.04.
- Gleick PH. 2003. Global freshwater resources: soft-path solutions for the 21st century. *Science*. 302(5650):1524–1528.
- Gramstad J. 2014. Finding the way to food, Patch quality evaluation performed by young of the year freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*), Master's thesis. [Bergen, Norway]: University of Bergen.
- 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. doi:10.1016/j.aquatox.2010.07.009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.07.009>.
- Gum B, Lange M, Geist J. 2011. A critical reflection on the success of rearing and culturing juvenile freshwater mussels with a focus on the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. 21(7):743–751. doi:10.1002/aqc.1222.
- Gumpinger C, Hauer C, Scheder C. 2015. The current status and future challenges for the preservation and conservation of freshwater pearl mussel habitats. *Limnologica*. 50:1–3. doi:10.1016/j.limno.2015.01.001.
- Gutiérrez JL, Jones CG, Strayer DL, Iribarne OO. 2003. Mollusks as ecosystem engineers:

- The role of shell production in aquatic habitats. *Oikos*. 101(1):79–90. doi:10.1034/j.1600-0706.2003.12322.x.
- Haag WR. 2012. North American freshwater mussels: Natural history, ecology, and conservation. *North American Freshwater Mussels: Natural History, Ecology, and Conservation*:1–521. doi:10.1017/CBO9781139048217.
- Hartmann JT, Beggel S, Auerswald K, Stoeckle BC, Geist J. 2016. Establishing mussel behavior as a biomarker in ecotoxicology. *Aquatic Toxicology*. 170:279–288. doi:10.1016/j.aquatox.2015.06.014.
- Hasenbein S, Lawler SP, Geist J, Connon RE. 2015. The use of growth and behavioral endpoints to assess the effects of pesticide mixtures upon aquatic organisms. *Ecotoxicology (London, England)*. 24(4):746–759. doi:10.1007/s10646-015-1420-1.
- Hastie LC, Cosgrove PJ. 2001. The decline of migratory salmonid stocks: a new threat to pearl mussels in Scotland. *Freshwater Forum*. 15(1994):85–96.
- Hastie LC, Cosgrove PJ, Ellis N, Gaywood MJ. 2003. The threat of climate change to freshwater pearl mussel populations. *Ambio*. 32(1):40–46. doi:10.1579/0044-7447-32.1.40.
- Hastie LC, Young MR. 2001. Freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) glochidiosis in wild and farmed salmonid stocks in Scotland. *Hydrobiologia*. 445:109–119. doi:10.1023/A:1017588222480.
- Hastie LC, Young MR. 2003. Timing of spawning and glochidial release in Scottish freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) populations. *Freshwater biology*. 48(12):2107–2117.
- Hauer C. 2015. Review of hydro-morphological management criteria on a river basin scale for preservation and restoration of freshwater pearl mussel habitats. *Limnologica*. 50:40–53. doi:10.1016/j.limno.2014.11.002. <http://dx.doi.org/10.1016/j.limno.2014.11.002>.
- Hellou J. 2011. Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. *Environmental Science and Pollution Research*. 18(1):1–11. doi:10.1007/s11356-010-0367-2.
- Hemelraad J, Holwerda DA, Herwig HJ, Zandee DI. 1990. Effects of cadmium in freshwater clams. III. Interaction with energy metabolism in *Anodonta cygnea*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 19(5):699–703. doi:10.1007/BF01183987.
- Hochachka PW, Somero GN. 2002. *Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution*. Oxford University Press.
- van Holde KE, Miller KI, Decker H. 2001. Hemocyanins and invertebrate evolution. *Journal of Biological Chemistry*. 276(19):15563–15566.
- Ieshko EP, Geist J, Murzina SA, Veselov AE, Lebedeva DI, Ziuganov V V. 2016. The characteristics of the infection of juvenile Atlantic salmon with glochidia of the freshwater pearl mussel in rivers of Northwest Russia. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*.(417). doi:10.1051/kmae/2015039.
- Jacobson KB, Turner JE. 1980. The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids. *Toxicology*. 16(1):1–37. doi:https://doi.org/10.1016/0300-483X(80)90107-9. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0300483X80901079>.
- Jacobson PJ, Cherry DS, Farris JL, Neves RJ. 1993. Juvenile freshwater mussel (bivalvia: unionidae) responses to acute toxicity testing with copper. *Environmental Toxicology and*

Chemistry. 12(5):879–883. doi:10.1002/etc.5620120512.

Jensen FB. 1996. Uptake, elimination and effects of nitrite and nitrate in freshwater crayfish (*Astacus astacus*). *Aquatic Toxicology*. 34(2):95–104. doi:[https://doi.org/10.1016/0166-445X\(95\)00030-8](https://doi.org/10.1016/0166-445X(95)00030-8).  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166445X95000308>.

Jones CG, Lawton JH, Shachak M. 1994. Organisms as Ecosystem Engineers. *Oikos*. 69(3):373–386. doi:10.2307/3545850. <http://www.jstor.org/stable/3545850>.

Jorge MB, Loro VL, Bianchini A, Wood CM, Gillis PL. 2013. Mortality, bioaccumulation and physiological responses in juvenile freshwater mussels (*Lampsilis siliquoidea*) chronically exposed to copper. *Aquatic Toxicology*. 126:137–147. doi:10.1016/j.aquatox.2012.10.014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.10.014>.

Jungbluth JR, Coomans HE, Groh H. 1985. Bibliographie der Flussperlmuschel *Margaritifera margaritifera* (Linn. 1785); Verslagenen Technische Gegevens No 41. Instituut voor Taxonomische Zoologie, Universiteit Amsterdam.

Kane AS, Salierno JD, Brewer SK. 2005. Fish models in behavioral toxicology: Automated techniques, updates and perspectives. *Methods in Aquatic Toxicology*. 2:1–38. <http://aquaticpath.php.ufl.edu/pubs/images/AqToxMethods-Ch32.pdf>.

Keller AE, Zam SG. 1991. The Acute Toxicity of Selected Metals To the Freshwater Mussel, *Anodonta imbecilis*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 10(4):539. doi:10.1897/1552-8618(1991)10[539:tatosm]2.0.co;2.

Kramer KJM, Foekema EM. 2001. The “Musselmonitor<sup>®</sup>” as Biological Early Warning System BT - Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change 2: A Handbook. In: Butterworth FM, Gunatilaka A, Gensebatt ME, editors. Boston, MA: Springer US. p. 59–87. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1305-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1305-6_4).

Lam PKS, Gray JS. 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin*. 46(2):182–186. doi:10.1016/S0025-326X(02)00449-6.

Lavictoire L, Moorkens E, Ramsey AD, Sinclair W, Sweeting RA. 2016. Effects of substrate size and cleaning regime on growth and survival of captive-bred juvenile freshwater pearl mussels, *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus, 1758). *Hydrobiologia*. 766(1):89–102. doi:10.1007/s10750-015-2445-4.

Lavictoire L, Ramsey AD, Moorkens EA, Souch G, Barnhart MC. 2018. Ontogeny of juvenile freshwater pearl mussels, *Margaritifera margaritifera* (Bivalvia: Margaritiferidae). *PLoS ONE*. 13(3). doi:10.1371/journal.pone.0193637.

Legeay A, Achard-Joris M, Baudrimont M, Massabuau JC, Bourdineaud JP. 2005. Impact of cadmium contamination and oxygenation levels on biochemical responses in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. *Aquatic Toxicology*. 74(3):242–253. doi:10.1016/j.aquatox.2005.05.015.

Livingstone DR. 1993. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 57(3):195–211.

Lopes-Lima M, Burlakova LE, Karatayev AY, Mehler K, Seddon M, Sousa R. 2018. Conservation of freshwater bivalves at the global scale: diversity, threats and research needs. *Hydrobiologia*. 810(1):1–14. doi:10.1007/s10750-017-3486-7. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3486-7>.



- Lopes-Lima M, Sousa R, Geist J, Aldridge DC, Araujo R, Bergengren J, Bespalaya Y, Bódis E, Burlakova L, Van Damme D, et al. 2016. Conservation status of freshwater mussels in Europe: state of the art and future challenges. *Biological Reviews*. 92(1):572–607. doi:10.1111/brv.12244.
- Lummer EM, Auerswald K, Geist J. 2016. Fine sediment as environmental stressor affecting freshwater mussel behavior and ecosystem services. *Science of the Total Environment*. 571:1340–1348. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.07.027. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.027>.
- Lydeard C, Cowie RH, Ponder WF, Bogan AE, Bouchet P, Clark SA, Cummings KS, Frest TJ, Gargominy O, Herbert DG, et al. 2004. The Global Decline of Nonmarine Mollusks. *BioScience*. 54(4):321. doi:10.1641/0006-3568(2004)054[0321:tgdonm]2.0.co;2.
- Macdonald TL, Bruce Martin R. 1988. Aluminum ion in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences*. 13(1):15–19. doi:[https://doi.org/10.1016/0968-0004\(88\)90012-6](https://doi.org/10.1016/0968-0004(88)90012-6). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0968000488900126>.
- Makhrov A, Bespalaya J, Bolotov I, Vikhrev I, Gofarov M, Alekseeva Y, Zotin A. 2014. Historical geography of pearl harvesting and current status of populations of freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* (L.) in the western part of Northern European Russia. *Hydrobiologia*. 735(1):149–159.
- Manahan SE. 2003. *Toxicological Chemistry and Biochemistry*, 425. Lewis Publ CRC London.
- Mandal BK, Suzuki KT. 2002. Arsenic round the world: a review. *Talanta*. 58(1):201–235. doi:[https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(02\)00268-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00268-0). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914002002680>.
- Marie V, Baudrimont M, Boudou A. 2006. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere*. 65(4):609–617. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.01.074.
- Mauroux B, Wyns R, Castagnac C, Prognon C, Zammit C, Martelet G., Lions J, Touchard F, Karnay G. 2009. SILURES Limousin, module 1, SILURES « Base de données » Recueil des données, interprétations et bilans - Rapport final. Limoges France.
- Melvin SD, Wilson SP. 2013. The utility of behavioral studies for aquatic toxicology testing: A meta-analysis. *Chemosphere*. 93(10):2217–2223. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.07.036. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.036>.
- Mérot J, Capoulade M. 2009. Étude de localisation de la moule perlière *Margaritifera margaritifera*, sur l'Elorn et ses affluents. Rapport Bretagne Vivante–SEPNB, Syndicat de bassin de l'Elorn.
- Miguel ES, Monserrat S, Fernández C, Amaro R, Hermida M, Ondina P, Altaba CR. 2004. Growth models and longevity of freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*) in Spain. *Canadian Journal of Zoology*. 82(8):1370–1379. doi:10.1139/Z04-113.
- Milam CD, Farris JL, Dwyer FJ, Hardesty DK. 2005. Acute toxicity of six freshwater mussel species (*Glochidia*) to six chemicals: Implications for daphnids and *Utterbackia imbecillis* as surrogates for protection of freshwater mussels (*Unionidae*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 48(2):166–173. doi:10.1007/s00244-003-3125-3.
- Miserazzi A, Sow M, Gelber C, Charifi M, Ciret P, Dalens JM, Weber C, Le Floch S, Lacroix

C, Blanc P, et al. 2020. Asiatic clam *Corbicula fluminea* exhibits distinguishable behavioural responses to crude oil under semi-natural multiple stress conditions. *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands). 219:105381. doi:10.1016/j.aquatox.2019.105381.

Modesto V, Ilarri M, Souza AT, Lopes-Lima M, Douda K, Clavero M, Sousa R. 2017. Fish and mussels: Importance of fish for freshwater mussel conservation. *Fish and Fisheries*. 19(2):244–259. doi:10.1111/faf.12252.

Moore AP, Bringolf RB. 2018. Effects of nitrate on freshwater mussel glochidia attachment and metamorphosis success to the juvenile stage. *Environmental Pollution*. 242(3):807–813. doi:10.1016/j.envpol.2018.07.047. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.047>.

Moorkens E. 2000. Conservation Management of the Freshwater Pearl Mussel *Margaritifera margaritifera*. Part 2: Water Quality Requirements. In: *Irish Wildlife Manuals*. Dublin, Ireland.

Moorkens E. 2006. Irish non-marine molluscs - an evaluation of species treat status. In: *Bulletin of the Irish Biogeographical Society*. Dublin, Ireland. p. 348–371.

Moorkens E, Cordeiro J, Seddon M, von Proschwitz T, Woolnough D. 2018. *Margaritifera margaritifera* (errata version published in 2018). The IUCN Red List of Threatened Species 2018. 8235:e.T12799A128686456. doi:<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T12799A508865.en>. <https://www.iucnredlist.org/species/12799/128686456>.

Motte G. 2005. Biologie et statut de la moule perlière en wallonie. In: *Forêt wallonie* No 74. p. 10–16.

Mount DR, Erickson RJ, Highland TL, Hockett JR, Hoff DJ, Jenson CT, Norberg-King TJ, Peterson KN, Polaske ZM, Wisniewski S. 2016. The acute toxicity of major ion salts to *Ceriodaphnia dubia* : I. influence of background water chemistry. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 35(12):3039–3057. doi:10.1002/etc.3487. <http://doi.wiley.com/10.1002/etc.3487>.

Mueller M, Pander J, Geist J. 2011. The effects of weirs on structural stream habitat and biological communities. *Journal of Applied Ecology*. 48(6):1450–1461. doi:10.1111/j.1365-2664.2011.02035.x.

Naimo TJ. 1995. A review of the effects of heavy metals on freshwater mussels. *Ecotoxicology*. 4(6):341–362. doi:10.1007/BF00118870.

Nakamura K, Cañete J, Vijuesca D, Guillén N, Sosa C, Mesquita-Joanes F, Sousa R, Ginés E, Sorribas V. 2020. Sensitivity of *Pseudunio auricularius* to metals and ammonia: first evaluation. *Hydrobiologia*. doi:10.1007/s10750-020-04277-z. <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04277-z>.

Nazari-Sharabian M, Ahmad S, Karakouzian M. 2018. Climate change and eutrophication: a short review. *Engineering, Technology and Applied Science Research*. 8(6):3668.

Nies DH. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51(6):730–750. doi:10.1007/s002530051457. <https://doi.org/10.1007/s002530051457>.

Österling ME, Arvidsson BL, Greenberg LA. 2010. Habitat degradation and the decline of the threatened mussel *Margaritifera margaritifera*: Influence of turbidity and sedimentation on the mussel and its host. *Journal of Applied Ecology*. 47(4):759–768. doi:10.1111/j.1365-2664.2010.01827.x.

Österling ME, Greenberg LA, Arvidsson BL. 2008. Relationship of biotic and abiotic factors to recruitment patterns in *Margaritifera margaritifera*. *Biological Conservation*. 141(5):1365–1370. doi:10.1016/j.biocon.2008.03.004.

Österling ME, Larsen BM. 2013. Impact of origin and condition of host fish (*Salmo trutta*) on parasitic larvae of *Margaritifera margaritifera*. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. 23(4):564–570. doi:10.1002/aqc.2320.

Österling ME, Söderberg H. 2015. Sea-trout habitat fragmentation affects threatened freshwater pearl mussel. *Biological Conservation*. 186:197–203. doi:10.1016/j.biocon.2015.03.016.

Pachauri RK, Allen MR, Barros VR, Broome J, Cramer W, Christ R, Church JA, Clarke L, Dahe Q, Dasgupta P. 2014. Climate change 2014: synthesis report. Contribution of Working Groups I, II and III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Ipcc.

de Paiva Magalhães D, da Costa Marques MR, Baptista DF, Buss DF. 2015. Metal bioavailability and toxicity in freshwaters. *Environmental Chemistry Letters*. 13(1):69–87.

Pandolfo TJ, Cope WG, Arellano C, Bringolf RB, Barnhart MC, Hammer E. 2010. Upper thermal tolerances of early life stages of freshwater mussels. *Journal of the North American Benthological Society*. 29(3):959–969.

Pannetier P, Morin B, Clérandeau C, Lacroix C, Cabon J, Cachot J, Danion M. 2019. Comparative biomarker responses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to benzo[a]pyrene and challenged with betanodavirus at three different life stages. *Science of the Total Environment*. 652:964–976. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.10.256. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.256>.

Patzner RA, Müller D. 2001. Effects of eutrophication on Unionids. In: *Ecology and Evolution of the Freshwater Mussels Unionoida*. Springer. p. 327–335.

Paul-Pont I, Gonzalez P, Baudrimont M, Nili H, de Montaudouin X. 2010. Short-term metallothionein inductions in the edible cockle *Cerastoderma edule* after cadmium or mercury exposure: Discrepancy between mRNA and protein responses. *Aquatic Toxicology*. 97(3):260–267. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.007>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X09004184>.

Peters NE, Meybeck M. 2000. Water quality degradation effects on freshwater availability: impacts of human activities. *Water International*. 25(2):185–193.

Pichler-Scheder C, Gumpinger C, Csar D. 2011. Application of a five-stage field key for the larval development of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* Linné, 1758) under different temperature conditions – A tool for the approximation of the optimum time for host fish infection in . *Ferrantia*. 64.

Popov I. 2015. Impact of deforestation on pearl mussel habitats in the Russian section of the Baltic Sea basin. *Limnologica*. 50:84–91. doi:10.1016/j.limno.2014.10.003. <http://dx.doi.org/10.1016/j.limno.2014.10.003>.

Popp A, Cope WG, McGregor MA, Kwak TJ, Augspurger T, Levine JF, Koch L. 2018. A Comparison of the chemical sensitivities between in vitro and in vivo propagated juvenile freshwater mussels: Implications for standard toxicity testing. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 37(12):3077–3085. doi:10.1002/etc.4270.

Pörtner HO. 2002. Climate variations and the physiological basis of temperature

dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 132(4):739–761. doi:[https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00045-4](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00045-4). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1095643302000454>.

Pörtner HO, Berdal B, Blust R, Brix O, Colosimo A, De Wachter B, Giuliani A, Johansen T, Fischer T, Knust R, et al. 2001. Climate induced temperature effects on growth performance, fecundity and recruitment in marine fish: developing a hypothesis for cause and effect relationships in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and common eelpout (*Zoarces viviparus*). *Continental Shelf Research*. 21(18):1975–1997. doi:[https://doi.org/10.1016/S0278-4343\(01\)00038-3](https://doi.org/10.1016/S0278-4343(01)00038-3). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278434301000383>.

Pörtner HO, Mark FC, Bock C. 2004. Oxygen limited thermal tolerance in fish?: Answers obtained by nuclear magnetic resonance techniques. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 141(3):243–260. doi:<https://doi.org/10.1016/j.resp.2004.03.011>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569904804000692>.

Prié V. 2017. Naïades et autres bivalves d'eau douce de France. Biotope; Publications scientifiques du Muséum.

Prié V, Cochet G. 2011. Plan national d'actions en faveur de la Mulette perlière *Margaritifera margaritifera*.

Pyle G, Ford AT. 2017. Behaviour revised: Contaminant effects on aquatic animal behaviour. *Aquatic Toxicology*. 182:226–228. doi:10.1016/j.aquatox.2016.11.008.

Pynnönen K. 1990. Aluminium accumulation and distribution in the freshwater clams (unionidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*. 97(1):111–117. doi:[https://doi.org/10.1016/0742-8413\(90\)90180-H](https://doi.org/10.1016/0742-8413(90)90180-H). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/074284139090180H>.

Pytharopoulou S, Grintzalis K, Sazakli E, Leotsinidis M, Georgiou CD, Kalpaxis DL. 2011. Translational responses and oxidative stress of mussels experimentally exposed to Hg, Cu and Cd: One pattern does not fit at all. *Aquatic Toxicology*. 105(1):157–165. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.06.007>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X11001652>.

Rainbow PS. 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental pollution*. 120(3):497–507.

Reis J. 2003. The freshwater pearl mussel [*Margaritifera margaritifera* (L.)] (*Bivalvia*, *Unionoida*) rediscovered in Portugal and threats to its survival. *Biological Conservation*. 114(3):447–452. doi:10.1016/S0006-3207(03)00086-7.

Richter C. 1987. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*. 44(2):175–189. doi:[https://doi.org/10.1016/0009-3084\(87\)90049-1](https://doi.org/10.1016/0009-3084(87)90049-1). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0009308487900491>.

Ritz C. 2010. Toward a unified approach to dose-response modeling in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 29(1):220–229. doi:10.1002/etc.7.

Riviere G, He Y, Tecchio S, Crowell E, Gras M, Sourdain P, Guo X, Favrel P. 2017. Dynamics of DNA methylomes underlie oyster development. *PLoS genetics*. 13(6):e1006807–e1006807. doi:10.1371/journal.pgen.1006807. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28594821>.

Robinson P. 2009. Behavioural toxicity of organic chemical contaminants in fish: application to ecological risk assessments (ERAs). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic*

Sciences. 66:1179–1188.

Roff DA. 2002. Life history evolution.

Salminen R, Batista MJ, Bidovec M, Demetriades A, De Vivo B, De Vos W, Duris M, Gilucis A, Gregorauskiene V, Halamić J, et al. 2005. Forum of European Geological Surveys (FOREGS) - Statistical data of analytical results. Geochemical atlas of Europe, part 1, background information, methodology and maps. [accessed 2020 Mar 25]. <http://weppi.gtk.fi/publ/foregsatlas/article.php?id=15>.

Samuel S, Kathirvel R, Jayavelu T, Chinnakkannu P. 2005. Protein oxidative damage in arsenic induced rat brain: influence of dl- $\alpha$ -lipoic acid. *Toxicology Letters*. 155(1):27–34. doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.08.001>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427404003972>.

Schartum E, Mortensen S, Pittman K, Jakobsen PJ. 2016. From pedal to filter feeding: Ctenidial organogenesis and implications for feeding in the postlarval freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus, 1758). *Journal of Molluscan Studies*. 83(1):36–42. doi:10.1093/mollus/eyw037.

Scheder C, Lerchegger B, Flödl P, Csar D, Gumpinger C, Hauer C. 2015. River bed stability versus clogged interstitial: Depth-dependent accumulation of substances in freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) habitats in Austrian streams as a function of hydromorphological parameters. *Limnologia*. 50:29–39. doi:10.1016/j.limno.2014.08.003.

Schöne BR, Krause RA. 2016. Retrospective environmental biomonitoring – Mussel Watch expanded. *Global and Planetary Change*. 144:228–251. doi:10.1016/j.gloplacha.2016.08.002. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gloplacha.2016.08.002>.

Scott GR, Sloman KA. 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology*. 68(4):369–392. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.016>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X0400102X>.

Seok S-H, Baek M-W, Lee H-Y, Kim D-J, Na Y-R, Noh K-J, Park S-H, Lee H-K, Lee B-H, Ryu D-Y, et al. 2007. Arsenite-induced apoptosis is prevented by antioxidants in zebrafish liver cell line. *Toxicology in Vitro*. 21(5):870–877. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.02.011>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233307000628>.

Sharma VK, Sohn M. 2009. Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation. *Environment International*. 35(4):743–759. doi:10.1016/j.envint.2009.01.005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2009.01.005>.

Skinner A, Young M, Hastie L. 2000. A.Skinner (2000).pdf.

Skinner A, Young M, Hastie L. 2003. Ecology of the Freshwater Pearl Mussel *Margaritifera margaritifera*. *Conserving Natura 2000 Rivers Ecology Series*. English Nature, Peterborough.

Smedley PL, Kinniburgh DG. 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*. 17(5):517–568. doi:[https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(02\)00018-5](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(02)00018-5). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0883292702000185>.

Smith DG. 1976. Notes on the biology of *Margaritifera margaritifera margaritifera* (Lin.) in Central Massachusetts. *American Midland Naturalist*.:252–256.

Smith VH, Tilman GD, Nekola JC. 1999. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs

- on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*. 100(1):179–196. doi:[https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00091-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00091-3).  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749199000913>.
- Sokolova IM, Lannig G. 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate Research*. 37(2–3):181–201.
- Solomon EI, Lowery MD. 1993. Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry. *Science*. 259(5101):1575–1581.
- Soucek DJ, Dickinson A. 2012. Acute toxicity of nitrate and nitrite to sensitive freshwater insects, mollusks, and a crustacean. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 62(2):233–242. doi:10.1007/s00244-011-9705-8.
- Soucek DJ, Linton TK, Tarr CD, Dickinson A, Wickramanayake N, Delos CG, Cruz LA. 2011. Influence of water hardness and sulfate on the acute toxicity of chloride to sensitive freshwater invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 30(4):930–938. doi:10.1002/etc.454.
- Sousa R, Ferreira A, Carvalho F, Lopes-Lima M, Varandas S, Teixeira A, Gallardo B. 2020. Small hydropower plants as a threat to the endangered pearl mussel *Margaritifera margaritifera*. *Science of the Total Environment*. 719. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.137361.
- Stadtman ER, Levine RL. 2000. Protein Oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 899(1):191–208. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06187.x.  
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06187.x>.
- Sternecker K, Cowley DE, Geist J. 2013. Factors influencing the success of salmonid egg development in river substratum. *Ecology of Freshwater Fish*. 22(2):322–333. doi:10.1111/eff.12020.
- Sternecker K, Geist J. 2010. The effects of stream substratum composition on the emergence of salmonid fry. *Ecology of Freshwater Fish*. 19(4):537–544. doi:10.1111/j.1600-0633.2010.00432.x.
- Stohs SJ, Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*. 18(2):321–336. doi:[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00159-H](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00159-H).  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/089158499400159H>.
- Strayer DL. 2008. *Freshwater Mussel Ecology : A Multifactor Approach to Distribution and Abundance*. 1st ed. University of California Press.  
<http://www.jstor.org/stable/10.1525/j.ctt1pnwnj>.
- Strayer DL. 2014. Understanding how nutrient cycles and freshwater mussels (Unionoida) affect one another. *Hydrobiologia*. 735(1):277–292. doi:10.1007/s10750-013-1461-5.
- Strayer DL, Caraco NF, Cole JJ, Findlay S, Pace ML. 1999. Transformation of Freshwater Ecosystems by Bivalves. *BioScience*. 49(1):19. doi:10.2307/1313490.
- Strayer DL, Downing JA, Haag WR, King TL, Layzer JB, Newton TJ, Nichols SJ. 2004. Changing Perspectives on Pearly Mussels, North America's Most Imperiled Animals. *BioScience*. 54(5):429. doi:10.1641/0006-3568(2004)054[0429:cpopmn]2.0.co;2.
- Taeubert JE, Geist J. 2013. Critical swimming speed of brown trout (*Salmo trutta*) infested with freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) glochidia and implications for artificial breeding of an endangered mussel species. *Parasitology Research*. 112(4):1607–

1613. doi:10.1007/s00436-013-3314-6.

Taskinen J, Berg P, Saarinen-Valta M, Vällilä S, Mäenpää E, Myllynen K, Pakkala J. 2011. Effect of pH, iron and aluminum on survival of early life history stages of the endangered freshwater pearl mussel, *Margaritifera margaritifera*. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 93(9):1764–1777. doi:10.1080/02772248.2011.610798.

Taylor HH, Anstiss JM. 1999. Copper and haemocyanin dynamics in aquatic invertebrates. *Marine and Freshwater Research*. 50(8):907–931. <https://doi.org/10.1071/MF99117>.

Thacker J, Zdzienicka MZ. 2004. The XRCC genes: expanding roles in DNA double-strand break repair. *DNA Repair*. 3(8):1081–1090. doi:<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.04.012>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568786404001430>.

Thomas GR, Taylor J, Garcia de Leaniz C. 2013. Does the parasitic freshwater pearl mussel *M. margaritifera* harm its host? *Hydrobiologia*. 735(1):191–201. doi:10.1007/s10750-013-1515-8.

Thornalley PJ, Vašák M. 1985. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 827(1):36–44. doi:[https://doi.org/10.1016/0167-4838\(85\)90098-6](https://doi.org/10.1016/0167-4838(85)90098-6). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167483885900986>.

Tran D, Ciret P, Ciutat A, Durrieu G, Massabuau JC. 2003. Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: Application to cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22(4):914–920. doi:10.1897/1551-5028(2003)022<0914:EOPALO>2.0.CO;2.

Tseng C-H. 2004. The potential biological mechanisms of arsenic-induced diabetes mellitus. *Toxicology and applied pharmacology*. 197(2):67–83.

US Environmental Protection Agency. 2002. *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms Fifth Edition*. Washington, DC. <http://www.epa.gov/waterscience/WET/disk1/ctm.pdf>.

Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 64(2):178–189. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651305000643>.

Valenti TW. 2004. Approaches for assessing toxicity of selected contaminants to freshwater mussels (*Bivalvia: Unionidae*), PhD thesis. Virginia Polytechnic Institute and State University.

Vaughn C, Spooner D. 2006. Unionid mussels influence macroinvertebrate assemblage structure in streams. *Journal of the North American Benthological Society*. 25:691–700.

Vaughn CC, Hakenkamp CC. 2001. The functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems. *Freshwater Biology*. 46(11):1431–1446. doi:10.1046/j.1365-2427.2001.00771.x. <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2427.2001.00771.x>.

Vaughn CC, Nichols SJ, Spooner DE. 2008. Community and foodweb ecology of freshwater mussels. *Journal of the North American Benthological Society*. 27(2):409–423. doi:10.1899/07-058.1.

Ventura-Lima J, Bogo MR, Monserrat JM. 2011. Arsenic toxicity in mammals and aquatic animals: a comparative biochemical approach. *Ecotoxicology and environmental safety*. 74(3):211–218. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.11.002. <http://europepmc.org/abstract/MED/21112631>.

Ventura-Lima J, de Castro MR, Acosta D, Fattorini D, Regoli F, de Carvalho LM, Bohrer D, Geracitano LA, Barros DM, Marins LFF, et al. 2009. Effects of arsenic (As) exposure on the antioxidant status of gills of the zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae). *Comparative biochemistry and physiology Toxicology & pharmacology : CBP*. 149(4):538–543. doi:10.1016/j.cbpc.2008.12.003. <http://europepmc.org/abstract/MED/19138757>.

Ventura-Lima J, Fattorini D, Regoli F, Monserrat JM. 2009. Effects of different inorganic arsenic species in *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) tissues after short-time exposure: Bioaccumulation, biotransformation and biological responses. *Environmental Pollution*. 157(12):3479–3484. doi:https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.06.023. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749109003212>.

Vogl C, Grillitsch B, Wytek R, Spieser OH, Scholz W. 1999. Qualification of spontaneous undirected locomotor behavior of fish for sublethal toxicity testing. Part I. Variability of measurement parameters under general test conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18(12):2736–2742. doi:10.1002/etc.5620181213. <https://doi.org/10.1002/etc.5620181213>.

Wang N, Consbrock RA, Ingersoll CG, Barnhart MC. 2011. Evaluation of influence of sediment on the sensitivity of a unionid mussel (*Lampsilis siliquoidea*) to ammonia in 28-day water exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 30(10):2270–2276. doi:10.1002/etc.616.

Wang N, Dorman RA, Ivey CD, Soucek DJ, Dickinson A, Kunz BK, Steevens JA, Hammer EJ, Bauer CR. 2020. Acute and Chronic Toxicity of Sodium Nitrate and Sodium Sulfate to Several Freshwater Organisms in Water-Only Exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 39(5):1071–1085. doi:10.1002/etc.4701. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.4701>.

Wang N, Ingersoll Christopher G, Hardesty DK, Ivey C, Kuntz JL, May TW, Dwyer FJ, Roberts AD, Augspurger T, Kane CM, et al. 2007. Acute toxicity of copper, ammonia, and chloride to glochidia and juveniles of freshwater mussels (Unionidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 26(10):2036–2047. doi:10.1897/06-523R.1.

Wang N, Ingersoll Christopher G., Hardesty DK, Ivey CD, Kunz JL, May TW, Dwyer FJ, Roberts AD, Augspurger T, Kane CM, et al. 2007. Acute toxicity of copper, ammonia, and chlorine to glochidia and juveniles of freshwater mussels (Unionidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 26(10):2036–2047. doi:10.1897/06-523R.1.

Wang N, Ingersoll CG, Ivey CD, Hardesty DK, May TW, Augspurger T, Roberts AD, Van Genderen E, Barnhart MC. 2010. Sensitivity of early life stages of freshwater mussels (Unionidae) to acute and chronic toxicity of lead, cadmium, and zinc in water. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 29(9):2053–2063. doi:10.1002/etc.250.

Wang N, Ivey CD, Dorman RA, Ingersoll CG, Steevens J, Hammer EJ, Bauer CR, Mount DR. 2018. Acute toxicity of sodium chloride and potassium chloride to a unionid mussel (*Lampsilis siliquoidea*) in water exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 37(12):3041–3049. doi:10.1002/etc.4206. <http://doi.wiley.com/10.1002/etc.4206>.

Wang N, Ivey CD, Ingersoll CG, Brumbaugh WG, Alvarez D, Hammer EJ, Bauer CR, Augspurger T, Raimondo S, Barnhart MC. 2017. Acute sensitivity of a broad range of



- freshwater mussels to chemicals with different modes of toxic action. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 36(3):786–796. doi:10.1002/etc.3642.
- Wang N, Kunz JL, Dorman RA, Ingersoll CG, Steevens JA, Hammer EJ, Bauer CR. 2018. Evaluation of chronic toxicity of sodium chloride or potassium chloride to a unionid mussel (*Lampsilis siliquoidea*) in water exposures using standard and refined toxicity testing methods. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 37(12):3050–3062. doi:10.1002/etc.4258.
- Wang T-S, Kuo C-F, Jan K-Y, Huang H. 1996. Arsenite induces apoptosis in chinese hamster ovary cells by generation of reactive oxygen species. *Journal of Cellular Physiology*. 169(2):256–268. doi:https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199611)169:2<256::AID-JCP5>3.0.CO;2-N. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199611)169:2%3C256::AID-JCP5%3E3.0.CO
- Wang Y-C, Chaung R-H, Tung L-C. 2004. Comparison of the cytotoxicity induced by different exposure to sodium arsenite in two fish cell lines. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*. 69(1):67–79. doi:10.1016/j.aquatox.2004.04.007. http://europepmc.org/abstract/MED/15210298.
- Wang Y, Fang J, Leonard SS, Krishna Rao KM. 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces Reactive Oxygen Species. *Free Radical Biology and Medicine*. 36(11):1434–1443. doi:https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.03.010. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584904002230.
- Weeks Santos S, Gonzalez P, Cormier B, Mazzella N, Bonnaud B, Morin S, Clérandeau C, Morin B, Cachot J. 2019. A glyphosate-based herbicide induces sub-lethal effects in early life stages and liver cell line of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology*. 216(February):105291. doi:10.1016/j.aquatox.2019.105291. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105291.
- Weis JS, Smith G, Zhou T, Santiago-Bass C, Weis P. 2001. Effects of contaminants on behavior: Biochemical mechanisms and ecological consequences. *BioScience*. 51(3):209–217. doi:10.1641/0006-3568(2001)051[0209:EOCOBB]2.0.CO;2.
- Winship KA. 1984. Toxicity of inorganic arsenic salts. *Adverse drug reactions and acute poisoning reviews*. 3(3):129–160.
- Yan B, Liu X, Zhao X, Tian S. 2020. Single and joint oxidative stress of cadmium and phenanthrene on the Bivalve *Anadara subcrenata*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 55(4):448–456. doi:10.1080/10934529.2019.1707563. https://doi.org/10.1080/10934529.2019.1707563.
- Yeager MM, Cherry DS, Neves RJ. 1994. Feeding and Burrowing Behaviors of Juvenile Rainbow Mussels, *Villosa iris* (Bivalvia:Unionidae). *Journal of the North American Benthological Society*. 13(2):217–222. doi:10.2307/1467240. https://doi.org/10.2307/1467240.
- Young M, Williams J. 1984. The reproductive biology of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* (Linn.) in Scotland. II: Laboratory studies.
- Young MR, Cosgrove PJ, Hastie LC. 2001. The Extent of, and Causes for, the Decline of a Highly Threatened Naiad: *Margaritifera margaritifera*. :337–357. doi:10.1007/978-3-642-56869-5\_19.
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and

expression. *Free Radical Biology and Medicine*. 33(3):337–349.  
doi:[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00905-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00905-X).  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089158490200905X>.

Ziuganov V, Zotin A, Nezlin L, Tretiakov V. 1994. The freshwater pearl mussels and their relationships with salmonid fish.

Zorita I, Bilbao E, Schad A, Cancio I, Soto M, Cajaraville MP. 2007. Tissue- and cell-specific expression of metallothionein genes in cadmium- and copper-exposed mussels analyzed by in situ hybridization and RT-PCR. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 220(2):186–196.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.01.003>.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X07000191>.

de Zwart D, Kramer KJM, Jenner HA. 1995. Practical experiences with the biological early warning system “mosselmonitor.” *Environmental Toxicology and Water Quality*. 10(4):237–247. doi:10.1002/tox.2530100403. <https://doi.org/10.1002/tox.2530100403>.

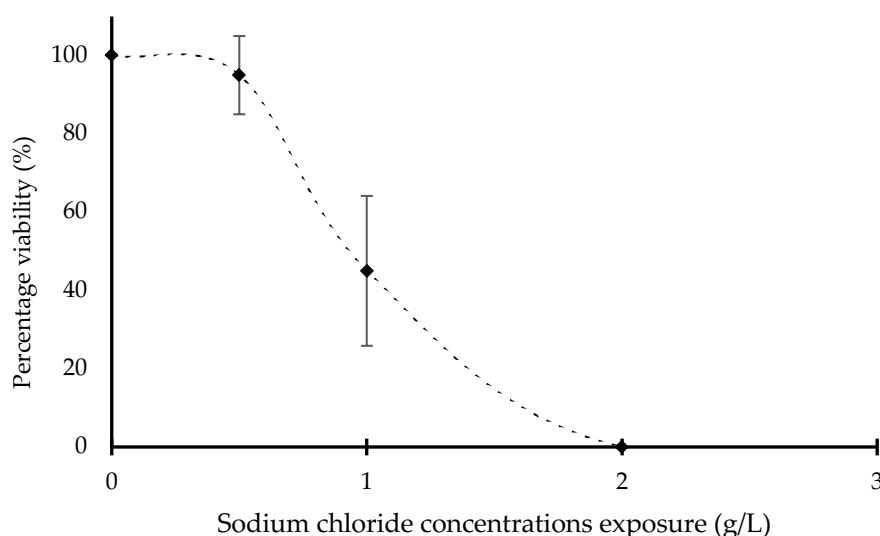
---

# ANNEXES

# 1. ANNEXE 1 : Test de toxicité aigüe au chlorure de sodium (48h) – Figure S1 et Table S1.

## Section 1. Sodium chloride 48-h toxicity test

Figure S1 corresponds to the dose-response curve obtained in the 48 hrs toxicity test to NaCl with 10-month-old juveniles of the Freshwater Pearl Mussel *Margaritifera margaritifera* (FWPM) and Table S1 presents mean values of water quality parameters (pH, conductivity, dissolved oxygen and temperature) measured at the beginning of the test.



**Figure S1.** Viability (%  $\pm$  SD) of 10- month old *M. margaritifera* juveniles exposed to sodium chloride in 48-h acute toxicity test conducted at 16°C.

**Table S1.** Mean values ( $\pm$  SD) measured at the beginning of the test, for water parameters (pH, conductivity, dissolved oxygen and temperature) in 48-h acute toxicity tests.

Experimental conditions (NaCl nominal concentrations in g/L)	pH	Conductivity ( $\mu$ S/cm)	Dissolved oxygen (mg/L)	Temperature ( $^{\circ}$ C)
Control (0)	7.1 $\pm$ 0.1	73 $\pm$ 6	7.7 $\pm$ 0.3	15.0 $\pm$ 0.1
Low (0.5)	7.1 $\pm$ 0.2	1074 $\pm$ 39	7.8 $\pm$ 0.3	14.9 $\pm$ 0
Medium-low (2)	6.9 $\pm$ 0.1	3707 $\pm$ 11	8.1 $\pm$ 0.3	14.8 $\pm$ 0.1
High (8)	6.9 $\pm$ 0.1	13603 $\pm$ 101	7.8 $\pm$ 0.2	14.7 $\pm$ 0.1

## 2. ANNEXE 2 : Paramètres physico-chimiques, pourcentage de viabilité des juvéniles et moyennes des concentrations mesurées – Table S2 et S3.

### Section 2. Water quality parameters values, mean percentage viability and mean measured concentration values.

Mean measured values of pH, temperature (°C), conductivity (µS/cm) and dissolved oxygen (mg/L) at the beginning and at the end of each acute toxicity tests conducted in this study, in Control, low, medium and high exposure conditions, are presented in the table S2. Nominal toxicant concentrations for each exposure conditions are also described in this table. Water quality parameters were measured in 3 replicates (n=3) for all acute toxicity test expect for phosphate exposure for which, pH was measured in one replicate at the end of the experiment. All experiments presented in this table were conducted in the presence of a substrate sand except for experiments where the absence of substrate is noticed in the table S2.

**Table S2.** Mean measured values (±SD) for pH, temperature (°C), conductivity (µS/cm) and dissolved oxygen (mg/L) at the beginning and at the end of each acute toxicity tests conducted in this study in Control, low, medium and high exposure conditions (n=3).

Pollutants (units)	Conditions	Nominal concentrations	pH		Temperature (°C)		Conductivity (µS/cm)		Dissolved oxygen (mg/L)	
			Start	End	Start	End	Start	End	Start	End
NaCl without substrate (g/L) <sup>1</sup>	Control	0	7.0 ± 0.1	7.3 ± 0.04	16 ± 0.1	16.3 ± 0.1	59 ± 1	60 ± 1	7.12 ± 0.26	7.07 ± 0.09
	Low	0.2	6.7 ± 0.1	7.1 ± 0.1	15.9 ± 0	16.2 ± 0	484 ± 1	493 ± 2	7 ± 0.24	6.62 ± 0.02
	Medium	0.8	6.7 ± 0.1	7.1 ± 0.1	15.8 ± 0.1	16.2 ± 0	1707 ± 11	1816 ± 102	7.12 ± 0.27	6.92 ± 0.09
	High	1.6	6.8 ± 0.1	7.1 ± 0.1	15.7 ± 0.1	16.2 ± 0	3272 ± 10	3319 ± 16	7 ± 0.08	7 ± 0.08
NaCl with substrate (g/L) <sup>1</sup>	Control	0	7.12 ± 0.05	7.1 ± 0.2	16.1 ± 0.1	16.3 ± 0.1	62 ± 2	61 ± 2	7.23 ± 0.26	7.22 ± 0.45
	Low	0.2	7.02 ± 0.01	6.8 ± 0.1	16 ± 0.1	16.3 ± 0	471 ± 6	478 ± 7	7.28 ± 0.45	7.17 ± 0.12
	Medium	0.8	6.95 ± 0.02	7 ± 0.1	15.8 ± 0.1	16.3 ± 0	1647 ± 13	1675 ± 18	7.17 ± 0.09	6.98 ± 0.09
	High	1.6	6.92 ± 0.03	7 ± 0.1	15.7 ± 0.1	16.2 ± 0	3112 ± 73	3157 ± 64	7.17 ± 0.39	7.05 ± 0.06
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	Control	0	7.8 ± 0.2	7.6 ± 0.1	15.3 ± 0.1	15.5 ± 0.1	69 ± 2	71 ± 3	7.82 ± 0.03	7.55 ± 0.07
	Low	128	7.57 ± 0.01	7.3 ± 0.04	15.3 ± 0	15.4 ± 0	290 ± 2	295 ± 4	7.96 ± 0.01	7.54 ± 0
	Medium	512	7.3 ± 0.1	7.15 ± 0.01	15.3 ± 0	15.4 ± 0	913 ± 2	935 ± 15	8.04 ± 0.06	7.92 ± 0
	High	2048	7.1 ± 0	6.94 ± 0.02	15.3 ± 0	15.4 ± 0	3360 ± 42	3455 ± 64	7.96 ± 0.09	7.82 ± 0
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg/L)	Control	0	7.43 ± 0.04	7.46 <sup>2</sup>	16 ± 0.1	15.8 ± 0.2	68 ± 1	74 ± 5	7.69 ± 0.02	7.48 ± 0.12
	Low	0.2	7.3 ± 0.1	7.54 <sup>2</sup>	16 ± 0.1	15.6 ± 0	68 ± 0	71 ± 2	7.6 ± 0.2	7.55 ± 0.04
	Medium	1.6	7.03 ± 0.03	7.48 <sup>2</sup>	16 ± 0	15.6 ± 0	70 ± 0	74 ± 4	7.79 ± 0.03	7.49 ± 0.13
	High	6	6.9 ± 0.01	7.45 <sup>2</sup>	16 ± 0	15.6 ± 0	74 ± 0	79 ± 5	7.58 ± 0.07	7.42 ± 0.01
Cadmium (µg/L)	Control	0	7.1 ± 0.1	7.4 ± 0.2	15.4 ± 0	15.9 ± 0.1	70 ± 0.5	72 ± 4	7.84 ± 0.23	7.91 ± 0.29
	Low	5	7.1 ± 0.1	7.1 ± 0.1	15.3 ± 0	15.8 ± 0.1	70 ± 0	69 ± 0.5	7.61 ± 0.03	7.35 ± 0.13
	Medium	30	6.8 ± 0.2	6.8 ± 0.1	15.2 ± 0	15.8 ± 0.1	68 ± 0	68 ± 0.5	7.81 ± 0.01	7.42 ± 0.18
	High	120	6.86 ± 0.01	6.6 ± 0	15.2 ± 0	15.8 ± 0	69 ± 1	68 ± 0	7.67 ± 0.07	7.23 ± 0.05
Cadmium with substrate (µg/L) <sup>1</sup>	Control	0	7.02 ± 0.05	6.8 ± 0.1	16.5 ± 0.1	15.8 ± 0.1	63 ± 0.5	64.2 ± 2	6.25 ± 0.09	6.28 ± 0.24
	Low	5	6.9 ± 0.1	6.79 ± 0.04	16.5 ± 0.1	15.6 ± 0	62 ± 0	62.9 ± 0.3	6.36 ± 0.12	6.27 ± 0.09
	Medium	30	6.88 ± 0.03	6.72 ± 0.03	16.4 ± 0	15.6 ± 0	61.5 ± 0.9	62 ± 1	6.53 ± 0.15	6.39 ± 0.04
	High	120	6.74 ± 0.04	6.8 ± 0.1	16.4 ± 0	15.5 ± 0	61.2 ± 0.8	61 ± 1	6.58 ± 0.16	6.57 ± 0.12
Cadmium without substrate (µg/L) <sup>1</sup>	Control	0	7.2 ± 0.1	7.6 ± 0.1	16.4 ± 0.1	15.6 ± 0.1	59.4 ± 0.1	61 ± 1	6.38 ± 0.09	6.51 ± 0.15
	Low	5	7.01 ± 0.05	7.3 ± 0.1	16.4 ± 0	15.5 ± 0	59.2 ± 0.1	59.5 ± 0.1	6.53 ± 0.21	6.59 ± 0.11
	Medium	30	6.97 ± 0.05	7.1 ± 0.03	16.4 ± 0.1	15.5 ± 0	58.9 ± 0.2	59.5 ± 0.2	6.65 ± 0.08	6.51 ± 0.14
	High	120	6.9 ± 0.1	7 ± 0.1	16.3 ± 0	15.5 ± 0	58.7 ± 0.1	59.8 ± 0.5	6.53 ± 0.21	6.4 ± 0.21
Arsenic (µg/L)	Control	0	7.4 ± 0.1	7.64 ± 0.04	16.3 ± 0	15.8 ± 0.1	70.4 ± 0.4	73 ± 5	7.52 ± 0.13	7.32 ± 0.18
	Low	5	7.23 ± 0.03	7.4 ± 0.1	16.2 ± 0.1	15.9 ± 0.1	69 ± 0.4	68.6 ± 0.2	7.17 ± 0.21	7.12 ± 0.04
	Medium	30	7 ± 0.1	7.2 ± 0.1	15.5 ± 0.1	15.6 ± 0	70 ± 1	69.4 ± 0.1	7.19 ± 0.12	7.42 ± 0.16

	High	120	6.84 ± 0.02	7 ± 0.1	15.3 ± 0	15.5 ± 0	68.7 ± 0.3	67 ± 1	7.1 ± 0.17	7.33 ± 0.03
Aluminium (µg/L)	Control	0	7.6 ± 0.1	7.5 ± 0.4	15.3 ± 0.2	14.8 ± 0.1	66 ± 0.5	66 ± 2	7.51 ± 0.2	7.3 ± 0.5
	Low	120	7.4 ± 0.1	7.5 ± 0.1	15 ± 0	14.6 ± 0.1	66 ± 0.5	63.9 ± 0.3	7.77 ± 0.8	7.47 ± 0.2
	Medium	500	7 ± 0.1	7.2 ± 0.2	14.9 ± 0.2	14.6 ± 0.2	67.4 ± 0.2	69.5 ± 0.4	7.29 ± 0.2	7.65 ± 0.2
	High	1000	6.5 ± 0.1	6.3 ± 0.1	14.9 ± 0.1	14.5 ± 0.1	69.3 ± 0	81 ± 1	7.42 ± 0.1	7.69 ± 0.1

<sup>1</sup>Acute toxicity tests conducted simultaneously for the assessment of substrate effects; <sup>2</sup>pH values were measured only in one replicate (n=1)

The table S3 presents nominal and mean measured pollutant concentrations, and mean percentage viability of juveniles at the end of each of the 96-h toxicity tests. Viability was checked on 20 juveniles/ exposure condition and was based on the immobility of the mussel.

**Table S3.** Nominal concentrations, mean measured concentration values ± SD (n=3) and mean percentage viability ± SD (n=4) at the end of the test (based on juveniles immobility) for each acute toxicity tests.

Pollutants	Nominal concentrations	Measured concentrations	Viability (%)
NaCl without substrate (mg/L) <sup>1</sup>	0	ND <sup>2</sup>	100
	0.2	ND <sup>2</sup>	100
	0.4	ND <sup>2</sup>	100
	0.8	ND <sup>2</sup>	85 ± 10
	1.2	ND <sup>2</sup>	45 ± 10
	1.6	ND <sup>2</sup>	30 ± 12
NaCl with substrate (mg/L) <sup>1</sup>	0	ND <sup>2</sup>	100
	0.2	ND <sup>2</sup>	100
	0.4	ND <sup>2</sup>	100
	0.8	ND <sup>2</sup>	95 ± 10
	1.2	ND <sup>2</sup>	65 ± 19
	1.6	ND <sup>2</sup>	25 ± 19
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	0	4 ± 0.36	100
	128	130 ± 1.39	100
	256	246 ± 8.33	100
	512	493 ± 13.01	80 ± 28
	1024	1026 ± 51.50	80 ± 16
	2048	2290 ± 85.74	0
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg/L)	0	0.022 ± 0.009	100
	0.2	0.084 ± 0.106	100
	0.6	0.316 ± 0.215	100
	1.6	1.120 ± 0.286	100
	3	2.303 ± 0.311	100
	6	5.007 ± 0.331	100
Cadmium (µg/L)	0	0.03 ± 0.04	100
	5	3.9 ± 3.6	100
	15	12 ± 12	100
	30	23 ± 25	100
	60	52 ± 45	95 ± 10

## ANNEXES

	120	113 ± 81	80
<b>Cadmium with substrate (µg/L)<sup>1</sup></b>	0	0.6 ± 0.4	100
	5	3 ± 2	100
	15	8 ± 5	100
	30	23 ± 10	100
	60	49 ± 15	100
	120	111 ± 32	100
<b>Cadmium without substrate (µg/L)<sup>1</sup></b>	0	0.2 ± 0.3	100
	5	3 ± 1	100
	15	12 ± 7	100
	30	40 ± 16	100
	60	701 ± 41	100
	120	147 ± 92	100
<b>Arsenic (µg/L)</b>	0	4.9 ± 0.7	100
	5	10 ± 1	100
	15	22 ± 3	100
	30	35 ± 3	100
	60	68 ± 13	93.8
	120	127 ± 23	93.8
<b>Aluminium (µg/L)</b>	0	221 ± 17	100
	120	362 ± 86	100
	250	408 ± 79	100
	500	567 ± 147	100
	750	774 ± 273	100
	1000	954 ± 457	100

<sup>1</sup>Acute toxicity tests conducted simultaneously for the assessment of substrate effects; <sup>2</sup>ND: not determined.