



**HAL**  
open science

# Approche mécanistique en radioécologie : processus d'accumulation de radionucléides dans les mollusques bivalves

Romain Stefanelli

► **To cite this version:**

Romain Stefanelli. Approche mécanistique en radioécologie : processus d'accumulation de radionucléides dans les mollusques bivalves. Chimie organique. Université Côte d'Azur, 2024. Français. NNT : 2024COAZ5001 . tel-04526164

**HAL Id: tel-04526164**

**<https://theses.hal.science/tel-04526164>**

Submitted on 29 Mar 2024

**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 DE DOCTORAT

## Approche mécanistique en radioécologie : Processus d'accumulation de radionucléides dans les mollusques bivalves

**Romain STEFANELLI**

Institut de Chimie de Nice

**Présentée en vue de l'obtention  
du grade de docteur en Chimie  
d'Université Côte d'Azur**

**Dirigée par** : Christophe DEN AUWER/  
Jean AUPIAIS

**Co-encadrée par** : Maria-Rosa BECCIA/  
Marguerite MONFORT

**Soutenue le** : 10 janvier 2024

**Devant le jury, composé de :**

Dominic LARIVIERE, PR, Rapporteur,  
Département de chimie, Université Laval

Gilles MONTAVON, DR, Rapporteur, CNRS  
SUBATECH, Université de Nantes

Marie-Yasmine BOTTEIN, PR, Examinatrice,  
ECOSEAS, Université Côte d'Azur

Melody MALOUBIER, CR, Examinatrice, CNRS  
IJClab, Université Paris Saclay

Christophe DEN AUWER, PR, Directeur de thèse,  
ICN, Université Côte d'Azur, Nice

Jean AUPIAIS, DR, co-Directeur de thèse, CEA  
DAM DIF, Bruyères-le-Châtel

Maria-Rosa BECCIA, MCF, Invitée, ICN, Université  
Côte d'Azur, Nice

Marguerite MONFORT, DR, Invitée, CEA DAM DIF,  
Bruyères-le-Châtel



# **Approche mécanistique en radioécologie : Processus d'accumulation de radionucléides dans les mollusques bivalves**

## **Composition du jury :**

### **Rapporteurs :**

Dominic LARIVIERE, Professeur, Département de chimie, Université Laval

Gilles MONTAVON, Directeur de recherche, SUBATECH, Université de Nantes

### **Examineurs :**

Marie-Yasmine BOTTEIN, Professeure, ECOSEAS, Université Côte d'Azur, Nice

Melody MALOUBIER, Chargée de recherche, IJClab, Université de Saclay

### **Directeurs de thèse**

Christophe DEN AUWER, Professeur, ICN, Université Côte d'Azur, Nice

Jean AUPIAIS, Directeur de recherche, CEA-DAM, Bruyères-le-Châtel

### **Encadrement de la thèse**

Maria-Rosa BECCIA, Maître de conférences, ICN, Université Côte d'Azur, Nice

Marguerite MONFORT, Directrice de recherche, CEA-DAM, Bruyères-le-Châtel

## **Approche mécanistique en radioécologie : Processus d'accumulation de radionucléides dans les mollusques bivalves**

**Résumé** - Les incidents nucléaires, à l'instar de Fukushima en 2011, soulèvent des préoccupations d'ordre géopolitique, économique et d'acceptation publique. Les océans servent de réceptacle aux pollutions terrestres, notamment aux radionucléides d'origine naturelle (provenant de l'érosion et du ruissellement) et d'origine anthropique (issus des essais nucléaires et des rejets nucléaires industriels). La compréhension de la spéciation des radionucléides dans le milieu marin revêt donc une importance capitale pour évaluer leur impact environnemental. Certains organismes marins, notamment les moules, ont la capacité d'accumuler ces radionucléides. L'étude de la spéciation *in vivo* est fondamentale pour appréhender l'accumulation, la biodisponibilité et la toxicité de ces éléments, ainsi que leur incidence sur l'écosystème marin. Au cours de cette thèse, deux radionucléides ont été examinés : le  $^{60}\text{Co}$ , un émetteur gamma provenant de l'activation dans les centrales nucléaires, et l'uranium, un actinide naturellement présent dans le milieu marin, servant de modèle pour les actinides lourds. La glande digestive joue un rôle majeur dans les mécanismes de leurs détoxifications chez les mollusques, permettant la mobilisation des métaux et participant aux processus de détoxification. Plusieurs métabolites, notamment les métallothionéines, des protéines de faible poids moléculaire possédant une forte affinité pour les ions métalliques en raison de la présence de groupes thiols, sont impliqués dans ces processus. Le byssus, quant à lui, revêt une grande importance pour les mollusques, leur permettant de s'ancrer sur des supports. Les fils de byssus, principalement composés de collagène, présentent des propriétés adhésives qui suscitent l'intérêt des chercheurs. Des protéines spécifiques, appelées "protéines du pied de la moule" (mfp), contiennent une quantité significative de DOPA (1-3,4-dihydroxyphénylalanine), allant jusqu'à 15 % moléculaire, au niveau des fils. La DOPA participe à la complexation d'ions métalliques, tels que le vanadium et le fer, influençant les propriétés mécaniques des fils de byssus. Ce travail a permis de quantifier le cobalt et l'uranium à l'aide de techniques telles que la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) et la spectrométrie gamma dans les organes, offrant des informations sur leur répartition au sein de différents compartiments subcellulaires. Des outils d'imagerie ont permis de localiser ces métaux à diverses échelles biologiques, tels que les organes par la fluorescence des rayons X ( $\mu$ -XRF) et l'émission de rayons X induite par des particules (PIXE) et les cellules par spectrométrie de masse à ions secondaires (SIMS), ont fourni des renseignements sur leur distribution et leur spéciation. La spéciation a été étudiée au moyen de la spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS) et de la spectrofluorimétrie laser à résolution temporelle (SLRT), cette dernière a été utilisée exclusivement pour l'uranium.

Cette thèse a permis d'associer quantification, imagerie et spéciation pour mieux comprendre le transfert de l'uranium et du cobalt chez les mollusques bivalves.

Mots-clés : spéciation, radionucléides, uranium, cobalt, moule, *Mytilus galloprovincialis*, imagerie, XAS, SLRT, SIMS, bioaccumulation

## **A mechanistic approach to radioecology: Radionuclide accumulation processes in bivalve molluscs**

**Abstract :** Nuclear incidents, such as the one in Fukushima in 2011, raise concerns in terms of geopolitics, economics, and public acceptance. Oceans act as receptacles for terrestrial pollution, including radionuclides of both natural origin (resulting from erosion and runoff) and anthropogenic origin (from nuclear tests and industrial nuclear releases). Therefore, understanding the speciation of radionuclides in the marine environment is of paramount importance to assess their environmental impact. Certain marine organisms, notably mussels, have the ability to accumulate these radionuclides. *in vivo* speciation studies are fundamental in comprehending the accumulation, bioavailability, and toxicity of these elements and their impact on the marine ecosystem. In the course of this thesis, two radionuclides were examined:  $^{60}\text{Co}$ , a gamma emitter originating from activation in nuclear power plants, and uranium, a naturally occurring actinide in the marine environment, serving as a model for heavy actinides. The digestive gland plays a significant role in the detoxification mechanisms in mollusks, allowing for the mobilization of metals and participating in detoxification processes. Several metabolites, including metallothioneins, low-molecular-weight proteins with a strong affinity for metal ions due to the presence of thiol groups, are involved in these processes. The byssus is of great importance to mollusks, enabling them to anchor onto surfaces. Byssal threads, primarily composed of collagen, exhibit adhesive properties that have piqued the interest of researchers. Specific proteins, known as "mussel foot proteins" (mfps), contain a significant amount of DOPA (1-3,4-dihydroxyphenylalanine), up to 15% molecular content, in the threads. DOPA plays a role in the complexation of metal ions, such as vanadium and iron, influencing the mechanical properties of byssal threads. This work allowed for the quantification of cobalt and uranium using techniques such as inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and gamma spectrometry in various organs, providing information on their distribution within different subcellular compartments. Imaging tools were used to locate these metals at various biological scales, including organs through X-ray fluorescence ( $\mu$ -XRF) and particle-induced X-ray emission (PIXE), as well as cells through secondary ion mass spectrometry (SIMS), yielding insights into their distribution and speciation. Speciation was studied using X-ray absorption spectroscopy (XAS), and time-resolved laser-induced spectrofluorimetry (SLRT), the latter being exclusively employed for uranium.

This thesis has integrated quantification, imaging, and speciation to gain a better understanding of the transfer of uranium and cobalt in bivalve mollusks.

Keywords: speciation, radionuclides, uranium, cobalt, mussel, *Mytilus galloprovincialis*, imaging, XAS, SLRT, SIMS, bioaccumulation



# Table des matières

<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>5</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>7</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>13</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>15</b>
<b>Chapitre 1 – Matériels et méthodes</b> .....	<b>21</b>
I. Exposition et récoltes des moules.....	23
1) Choix de sites de récoltes des moules.....	23
2) Préparation des aquariums.....	27
a) Sélection des moules.....	27
b) Protocole d'exposition des moules <i>in vivo</i> .....	29
c) Protocole de contamination <i>ex vivo du byssus</i> .....	30
3) Solution de contaminations des moules.....	30
4) Compartimentalisation des échantillons.....	30
a) Protocole de dissection des échantillons.....	30
b) Compartimentalisation subcellulaire.....	31
II. Les outils analytiques.....	34
1) Quantification des métaux.....	34
a) Minéralisation des échantillons.....	34
b) Spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif (ICP-MS).....	34
c) Spectrométrie gamma.....	36
2) Spéciation.....	37
a) Absorption des rayons X (XAS).....	37
b) Spectrofluorométrie laser à résolution temporelle (SLRT).....	41
3) Localisation des métaux dans les échantillons de moules, imagerie.....	43
a) Préparation des échantillons.....	43
b) La spectrométrie de fluorescence des rayons X ( $\mu$ -XRF).....	44
c) Spectrométrie de masse à ions secondaires (SIMS).....	46
d) Analyse Émission de rayons X induite par des particules (PIXE).....	49
4) Extraction de protéines.....	51
a) Estimation de la concentration : Méthode de Bradford.....	51
b) Chromatographie d'affinité avec métal immobilisé.....	52
c) Électrophorèse des protéines.....	53
<b>Chapitre 2 – Contexte général</b> .....	<b>55</b>
I. Le milieu marin.....	57
II. Généralités sur les radionucléides.....	59
1) Les radionucléides d'origine naturelle.....	61

2)	Les radionucléides d'origine anthropique .....	63
a)	Les essais nucléaires .....	63
b)	Rejet par l'industrie nucléaire .....	65
c)	Accidents de réacteurs nucléaires .....	67
III.	Accumulation de métaux dans le biote marin .....	70
1)	Définitions générales .....	70
a)	Facteur de bioaccumulation .....	70
b)	Facteur de bioconcentration .....	71
c)	Facteur de concentration .....	72
2)	Accumulation de métaux traces dans le compartiment marin .....	73
3)	Modèle d'étude, la moule : <i>Mytilus</i> .....	79
a)	Biologie : anatomie et physiologie .....	79
b)	La biosurveillance en milieu marin, cas particulier des mollusques .....	86
c)	Mécanisme général de l'accumulation des métaux dans les mollusques .....	88

### **Chapitre 3 – Le cobalt, un métal essentiel..... 93**

I.	L'élément et le radionucléide .....	95
II.	Le cobalt dans les processus biologiques .....	98
1)	Un métal essentiel .....	98
2)	Toxicité et bioaccumulation .....	99
III.	Étude de l'accumulation du cobalt par les moules <i>M. galloprovincialis</i> .....	103
1)	Accumulation du cobalt à l'échelle des ultra-traces : contamination au <sup>60</sup> Co .....	103
2)	Étude comparative de l'accumulation de cobalt stable chez les moules .....	107
a)	Accumulation des métaux chez les moules de différentes origines : cas de Villefranche-sur-Mer et la petite rade de Toulon .....	107
b)	Étude cinétique comparative de l'accumulation du cobalt chez les moules de Villefranche-sur-Mer ....	112
3)	Distribution subcellulaire du cobalt dans la glande digestive des moules exposées au cobalt .....	115
4)	Conclusion .....	117
IV.	Détection et localisation du cobalt dans la moule .....	118
1)	Étude de la distribution du cobalt par $\mu$ -XRF .....	118
a)	Byssus .....	120
b)	Glande digestive .....	123
2)	Étude de la distribution du cobalt par SIMS .....	126
a)	Byssus .....	127
b)	Glande digestive .....	129
3)	Analyse par microfaisceau d'ion du cobalt dans la moule par cartographie PIXE .....	133
a)	Byssus .....	134
b)	Glande digestive .....	135
V.	Étude de la spéciation du cobalt dans la moule par XAS .....	136
a)	Glande digestive .....	140
b)	Byssus .....	142

VI.	Les métallothionéines un candidat de choix pour la détoxification des métaux : Purification et complexation de la protéine.....	144
VII.	Bilan.....	149
<b>Chapitre 4 – L’Uranium un radioélément et un métal lourd.....</b>		<b>151</b>
I.	Généralités.....	153
1)	Occurrence dans l’environnement.....	153
a)	Propriété de l’uranium.....	155
b)	Spéciation en milieu marin.....	156
2)	Bioaccumulation de l’uranium dans les mollusques bivalves.....	158
II.	Étude de l’accumulation de l’uranium par les moules <i>M. galloprovincialis</i> .....	161
1)	Étude de l’accumulation de l’uranium chez les moules à différentes échelles.....	161
a)	Accumulation des métaux chez les moules de différentes origines : cas de Villefranche-sur-Mer et la petite rade de Toulon.....	161
b)	Distribution subcellulaire de l’uranium dans la glande digestive des moules exposées à l’uranium.....	166
III.	Détection et localisation de l’uranium dans la moule.....	170
1)	Étude de la distribution de l’uranium par $\mu$ -XRF.....	170
a)	Byssus.....	171
b)	Glande digestive.....	172
2)	Caractérisation de la distribution de l’uranium par SIMS.....	174
a)	Branchies.....	175
b)	Byssus.....	177
c)	Glande digestive.....	181
d)	Conclusion.....	183
IV.	Étude de la spéciation de l’uranium chez la moule.....	184
1)	Étude de la spéciation par XAS.....	184
a)	Glande digestive.....	186
b)	Byssus.....	191
2)	Spectres SLRT de moules exposées à l’uranium.....	193
3)	Spectres FTIR de byssus contaminés <i>ex vivo</i> .....	197
4)	Conclusion.....	198
V.	Bilan.....	200
<b>Conclusions et perspectives.....</b>		<b>201</b>
<b>Références.....</b>		<b>211</b>
<b>Annexes.....</b>		<b>237</b>



# Liste des abréviations

EBq ( $10^{18}$  Bq), PBq ( $10^{15}$  Bq), TBq ( $10^{12}$  Bq), GBq ( $10^9$  Bq)

ALPS : Advanced Liquid Processing System (Système avancé de traitement des liquides)

CAM : cathécolamide

CEA : Commissariat à l'Énergie Atomique

CF : Facteur de concentration

CL50 : Concentration Efficace à 50 %

CNFD : Centrale nucléaire de Fukushima Daiichi

CONTAMED : (Contaminant en Méditerranéen)

DCE : Directive Cadre Eau

DCSMM : Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin

DOPA : 3,4-dihydroxyphénylalanine

ETM : Élément trace métal

EXAFS : Extended X-ray Fine Structure (Structure fine étendue de l'absorption des rayons X)

FSM : fraction sensible aux métaux

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

HOPO : hydroxypyridinone

HSAB : Hard and Soft Acids and Bases (acides et bases durs et mous)

ICP-MS : Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

KB : Kirkpatrick-Baez

MARIS : radioactivité de l'environnement marin

MDB : métaux détoxifiés biologiquement

MET : microscopie électronique à transmission

Mfp : Mussel foot protein (protéine du pied de la moule)

$\mu$ -XRF : X-ray fluorescence (spectrométrie de fluorescence des rayons X)

PIXE : Particle-induced X-ray emission (Émission de rayons X induite par des particules)

ppb : Partie par milliard

ppm : Partie par million

PRT : Petite rade de Toulon

PTD : protéines thermodénaturables

PTS : protéines thermostables

RINBIO : Réseau Intégrateurs Biologiques

ROCCH : Réseau d'observation de la contamination chimique

SLRT : spectrofluorimétrie laser à résolution temporelle

SDD : Silicon drift detector (détecteur à dérive au silicium)

SIMS : Secondary ion mass spectrometry (Spectrométrie de masse à ions secondaires)

Tris : Trishydroxyméthylaminométhane

VFM : Villefranche-sur-Mer

XANES : X-ray Absorption Near Edge Structure (Spectroscopie de structure près du front d'absorption de rayons X)

XAS : X-ray absorption spectroscopy (Spectroscopie d'absorption des rayons X)

# Liste des figures

Figure 1. Localisation de Villefranche-sur-Mer et de Toulon.....	24
Figure 2. Histogramme représentant la répartition des moules exposées à de l'uranium en fonction de leurs tailles et leurs lieux de récoltes.....	28
Figure 3. Histogramme représentant la répartition des moules exposé au cobalt en fonction de leurs tailles et leurs lieux de récoltes.....	28
Figure 4. Schéma général des contaminations des moules avec du cobalt ou de l'uranium ....	29
Figure 5. Organigramme du protocole de fractionnement subcellulaire sur des glandes digestives de moules exposés à l'uranium. ....	32
Figure 6. Organigramme du protocole de fractionnement subcellulaire sur des glandes digestives de moules exposés à du cobalt. ....	33
Figure 7. Schéma du principe de fonctionnement d'un ICP-MS (Modifié d'après: Košler and Sylvester, 2003).....	35
Figure 8. Structure d'une ligne de lumière et du synchrotron SOLEIL ("Synchrotron SOLEIL") .....	38
Figure 9. Photographie de la cabane d'expérience avec le montage « cryostat ». ....	40
Figure 10. Élimination d'une fluorescence parasite par résolution temporelle (Modifié d'après:Lourenço, 2007). ....	42
Figure 11. Photographie du montage expérimental pour l'analyse de l'uranium en $\mu$ -XRF. ...	45
Figure 12. Principe de fonctionnement d'un SIMS et de la collecte des ions (Modifié d'après: Agüi-Gonzalez et al., 2019). ....	46
Figure 13. Photographie du porte-échantillon et des supports en siliciums pour les analyses SIMS.....	47
Figure 14. Spectre de masse de la glande digestive autour de la masse du $^{59}\text{Co}$ réalisé avec un support en silicium. ....	49
Figure 15. Vue schématique de la plateforme AIFIRA et des 5 lignes de lumières. ....	50
Figure 16. Photographie du montage expérimental de la chambre sous vide et du porte-échantillons.....	51
Figure 17. Simplification des courants marins à la surface des océans. (Modifié d'après : Ahlenius et al., 2007) .....	57
Figure 18. Diagramme de Segré ou « vallée de la stabilité » des nucléides et leur mode de désintégrations principal.(N : Neutron ; Z : Proton) (Modifié d'après: <a href="http://www.nds.iaea.org/relnsd/vcharhtml/VChartHTML.html">www-nds.iaea.org/relnsd/vcharhtml/VChartHTML.html</a> ) .....	60
Figure 19. Chaîne de la désintégration radioactive de $^{238}\text{U}$ vers le $^{206}\text{Pb}$ stable (Modifié d'après: Goldstein et al., 1999) .....	62
Figure 20. Essais d'armes nucléaires atmosphérique et souterraine (Modifié d'après: UNSCEAR, 2012).....	64
Figure 21. Densité de dépôt mondial cumulé global (pondérée par la population mondiale) de radionucléides produits lors d'essais atmosphériques. (Modifié d'après: UNSCEAR, 2012)..	65
Figure 22. Rejets de radionucléides entre les années 1977 et 2000 issus des usines de retraitement nucléaire (Sellafield, La Hague, Tokai) (Modifié d'après: UNSCEAR, 2012) ...	67
Figure 23. Schéma de la décontamination de l'eau radioactive de CNFD traité par ALPS (Modifié d'après: <a href="https://www.iaea.org/fr/themes/l'intervention/rejet-des-eaux-traitees-a-la-centrale-nucleaire-de-fukushima-daiichi/questions-frequeemment-posees">https://www.iaea.org/fr/themes/l'intervention/rejet-des-eaux-traitees-a-la-centrale-nucleaire-de-fukushima-daiichi/questions-frequeemment-posees</a> ).....	69

Figure 24. Facteurs influençant la biodisponibilité d'un métal dans le milieu aquatique (Modifié d'après: Wang and Fisher, 1997).....	74
Figure 25. Diagramme du modèle d'activité d'un ion libre (Modifié d'après: Markich and Brown, 2018).....	75
Figure 26. Principales localisations de <i>M. galloprovincialis</i> dans le monde (Modifié d'après: Gosling, 2003).....	79
Figure 27. Anatomie générale d'une moule ( <i>M. galloprovincialis</i> ), vue ventrale après ouverture par coupe du muscle adducteur. V : ventral ; D : dorsal ; P : postérieur ; A : antérieur ©Romain Stefanelli.....	80
Figure 28. Représentation schématique du byssus et des fonctions présentes dans la matrice et la cuticule. ©Romain Stefanelli .....	82
Figure 29. 3,4-dihydroxyphénylalanine - DOPA .....	83
Figure 30. Schéma de la répartition des protéines mfp et les interactions impliquées dans le byssus. (Modifié d'après: Chen and Zeng, 2022).....	84
Figure 31. Simplification de la décroissance du $^{60}\text{Co}$ en $^{60}\text{Ni}$ .....	96
Figure 32. Diagramme de spéciation du $\text{Co}^{2+}$ dans l'eau de mer ( $[\text{Co}] = 10^{-6}\text{M}$ ) simulé par le logiciel JCHESS.....	97
Figure 33. Structure moléculaire de la cyanocobalamine. (CNCbl-Vitamine B <sub>12</sub> ).....	98
Figure 34. Accumulation du $^{60}\text{Co}$ dans différents organes de la moule après 12 jours d'exposition à $100\text{ Bq.L}^{-1}$ .....	104
Figure 35. Comparaison des facteurs de concentrations du cobalt dans la glande digestive (carré noir) de moule exposée à de l'eau de mer dopée au $^{58}\text{Co}$ pendant 42 jours et dans les tissus mous (carré rouge) de moule exposée à de l'eau de mer dopée au $^{60}\text{Co}$ pendant 30 jours. Le graphique est reproduit d'après les figures de Pentreath et de Carvalho (Modifié d'après: Carvalho, 1987; Pentreath, 1973). .....	105
Figure 36. Facteur de concentration dans les moules entières (masse sèche) en fonction de leurs lieux de récolte (PRT : petite rade de Toulon ; VFM : Villefranche-sur-Mer).....	109
Figure 37. Facteur de concentration dans différents organes (masse sèche) de moules en fonction de leurs lieux de récolte. a) Moules provenant de Villefranche-sur-Mer, b,c) Moules provenant de la petite rade de Toulon. Sur c) l'échelle en ordonnée est dilatée. ....	110
Figure 38. Comparaison des facteurs de concentrations dans différents organes de moules en fonction du temps d'exposition dans de l'eau de mer dopée en cobalt. ....	114
Figure 39. Diagramme de l'accumulation de cobalt dans différents compartiments de la glande digestive de moules exposées à $[\text{Co}] = 10^{-6}\text{ M}$ .....	116
Figure 40. Comparaison des images optiques (Barre d'échelle 1 mm) et des cartographies de la fluorescence X réalisée au seuil K du cobalt (Barre d'échelle 5 $\mu\text{m}$ ) du byssus. Le rectangle noir présent sur les images optiques localise la zone analysée en fluorescence X. Les zones délimitées par les cercles en pointillés rouges sur les cartographies de fluorescence X indiquent la tige, le reste de l'image correspond au fil du byssus. Les étoiles noires sur les cartographies de fluorescence X montrent où ont été réalisés les spectres XANES au seuil K du cobalt. Les numéros associés correspondent aux spectres XANES Figure 41. Temps d'intégration 1s-5s par pixel. ....	122
Figure 41. Comparaison des spectres XANES réalisés au seuil K du cobalt sur du byssus de moules exposées à différentes concentrations d'eau de mer dopée en cobalt. Les numéros des spectres sont associés aux numéros indiqués sur les cartographies de fluorescence X de la Figure 40. La « référence $\text{Co}^{2+}$ aquo » a été réalisée avec une solution à 0,1 M de $\text{CoCl}_2$ .....	123
Figure 42. Comparaison des images optiques (barre d'échelle 1 mm) et des cartographies de la fluorescence X réalisée au seuil K du cobalt (Barre d'échelle 5 $\mu\text{m}$ ) de la glande digestive. Le	

rectangle noir présent sur les images optiques localise la zone analysée en fluorescence X. Les étoiles noires sur les cartographies de fluorescence X montrent où ont été réalisés les spectres XANES réalisés au seuil K du cobalt, les numéros associés correspondent aux spectres XANES de la Figure 43. Temps d'intégration 1 s par pixel.....	125
Figure 43. Comparaison des spectres XANES réalisés au seuil K du cobalt sur la glande digestive de moules exposées à de l'eau de mer dopée en cobalt $10^{-5}$ M. Les numéros des spectres sont associés aux numéros indiqués sur les cartographies de fluorescence X. ....	126
Figure 44. Images ioniques obtenues dans le byssus de moule exposée à de l'eau de mer dopée en $^{59}\text{Co}$ . L'image ionique du $^{23}\text{Na}$ permet de localiser la cuticule et la matrice (flèche blanche). Barre d'échelle 20 $\mu\text{m}$ . Paramètre d'acquisition : 250 $\times$ 250 $\mu\text{m}$ ; 500 pA. L'image de la zone analysée est obtenue par une caméra optique. Barre d'échelle 500 $\mu\text{m}$ .....	128
Figure 45. Images ioniques obtenues dans la glande digestive de moule exposée à de l'eau de mer dopée en $^{59}\text{Co}$ . L'image ionique du $^{23}\text{Na}$ et du $^{40}\text{Ca}$ permet de localiser les structures subcellulaires. Le carré rouge sur les images ioniques du $^{23}\text{Na}$ et $^{40}\text{Ca}$ correspond à la zone analysée Figure 46. Barre d'échelle 20 $\mu\text{m}$ . Paramètre d'acquisition : 500 $\times$ 500 $\mu\text{m}$ ; 10 pA. L'image de la zone analysée est obtenue par une caméra optique. Barre d'échelle 500 $\mu\text{m}$ .	130
Figure 46. Images ioniques obtenues dans la glande digestive de moule exposée à de l'eau de mer dopée en $^{59}\text{Co}$ . L'image ionique du $^{23}\text{Na}$ et du $^{40}\text{Ca}$ permet de localiser les structures subcellulaires. Cette zone correspond à un agrandissement de la zone définie par un carré rouge dans la Figure 45. Barre d'échelle 5 $\mu\text{m}$ . Paramètre d'acquisition : 50 $\times$ 50 $\mu\text{m}$ ; 10 pA. ....	130
Figure 47. Images ioniques obtenues dans la glande digestive de moule exposée à de l'eau de mer dopée en $^{59}\text{Co}$ . L'image ionique du $^{23}\text{Na}$ et du $^{40}\text{Ca}$ permet de localiser les structures subcellulaires de la glande digestive et superposition de l'image ionique du $^{40}\text{Ca}$ et l'image ionique du $^{59}\text{Co}$ . Barre d'échelle 20 $\mu\text{m}$ . Paramètre d'acquisition : 500 $\times$ 500 $\mu\text{m}$ ; 10 pA. Image optique de la glande digestive montrant la présence des tubules et superposition de l'image optique et de l'images ioniques du $^{40}\text{Ca}$ et du $^{59}\text{Co}$ .	131
Figure 48. Schéma d'un tubule de la glande digestive avec les cellules F, B et R. (Modifié d'après :Johnson 1995 Handbook).....	132
Figure 49. Spectre de fluorescence X du byssus réalisé par microfaisceau d'ion. Les pics de fluorescence X du cobalt et du fer ont été identifiés par rapport à un échantillon contrôle...	134
Figure 50. Cartographie de la fluorescence X par PIXE du byssus. Barre d'échelle 50 $\mu\text{m}$ .	135
Figure 51. Spectres XANES au seuil K du cobalt. Comparaison des spectres XANES a) des références de cobalt, b) des spectres expérimentaux correspondant au surnageant, au culot de la glande digestive et au fils de byssus.....	138
Figure 52. Spectres EXAFS expérimentaux de la glande digestive et du byssus (contamination ex vivo) au seuil K du cobalt. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (cercle). .....	139
Figure 53. a) Module de la transformée de Fourier, et b) partie imaginaire de la transformée de Fourier en $k^2\chi(k)$ de la glande digestive. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (cercle).....	141
Figure 54. Structure du complexe modèle pyrocatechol-cobalt. Les atomes d'hydrogène ont été omis pour plus de clarté. ....	142
Figure 55. a) Module de la transformée de Fourier, et b) partie imaginaire de la transformée de Fourier en $k^2\chi(k)$ du byssus. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (cercle). .....	143

Figure 56. Purification par chromatographie d'affinité. Les différentes fractions éluées ont été séparées par SDS-PAGE. La flèche indique la région dans laquelle les métallothionéines migrent. ....	146
Figure 57. Spectres XANES de la fraction 6 et des références de $\text{Co}^{2+}$ aquo et $\text{CoF}_3$ (Co +III). ....	147
Figure 58. Séquence complète des acides aminés du MT-10-1 de la moule <i>M. edulis</i> . (Mackay et al., 1993).....	148
Figure 59. Tableau périodique de Mendeleïev et la place des actinides. ....	153
Figure 60. Chaînes de désintégration de l'uranium-235 (a) et du thorium-232 (b) .....	154
Figure 61. Potentiels standard de couples de l'uranium (T= 298 K ; pH = 8,1 ; I=0,7) (Choppin and Wong, 1998). ....	156
Figure 62. Structure de Lewis de l'uranyle.....	156
Figure 63. Diagramme de spéciation théorique de l'uranium (VI) $5.10^{-5}$ M dans l'eau de mer (JCHESS). ....	157
Figure 64. Comparaison des facteurs de concentrations des moules entières provenant de Villefranche-sur-Mer et de la petite rade de Toulon en fonction de la taille des individus. ..	163
Figure 65. Comparaison des facteurs de concentrations dans les organes de moules en fonction de l'origine a) Villefranche-sur-Mer et b) Petite rade de Toulon. ....	164
Figure 66. Facteur de concentration des byssus récoltés sur des moules de Villefranche-sur-Mer à la suite d'une exposition pendant 12 jours à une eau de mer dopée en uranium. ....	166
Figure 67. Diagramme de l'accumulation de l'uranium dans différents compartiments de la glande digestive de moules exposées à $[\text{U}]=10^{-6}$ M.....	168
Figure 68. Comparaison des images optiques et des cartographies de fluorescence X réalisées au seuil $L_{II}$ de l'uranium du byssus. (Barre d'échelle 1 mm). La zone délimitée par le cercle en pointillé rouge indique la tige, le reste de l'image correspond au fils du byssus. Les étoiles noires sur les cartographies de fluorescence X montrent où ont été réalisés les spectres XANES au seuil $L_{II}$ de l'uranium, les numéros associés correspondent aux spectres XANES Figure 69. Temps d'intégration de 500 ms par pixel.....	171
Figure 69. Comparaison des spectres XANES réalisés au seuil $L_{II}$ de l'uranium sur le byssus cartographié par fluorescence X. Les numéros indiqués correspondent à ceux présents sur la Figure 68. ....	172
Figure 70. Comparaison des images optiques et des cartographies de la fluorescence X réalisée au seuil $L_{II}$ de l'uranium de la glande digestive. (Barre d'échelle 1 mm). Le carré noir sur l'image optique représente la zone qui a été cartographiée par fluorescence X. L'étoile noire sur la cartographie de fluorescence X montre où a été effectué le spectre XANES réalisé au seuil $L_{II}$ de l'uranium. Temps d'intégration de 500 ms par pixel. ....	173
Figure 71. Comparaison des spectres XANES réalisés au seuil $L_{II}$ de l'uranium sur des glandes digestives cartographiées par fluorescence X. Le spectre noir correspond à la zone indiquée par une étoile noire sur la Figure 70 et le spectre rouge correspond à une autre glande digestive analysée. ....	174
Figure 72. Comparaison des images ioniques réalisées au niveau de la branchie de moule exposé à de l'eau de mer dopée à l'uranium. Image ionique du $^{40}\text{Ca}^+$ , image ionique du $^{238}\text{U}^+$ , Superposition $^{238}\text{U}^+$ (rouge)/ $^{40}\text{Ca}^+$ (vert), photographie de la zone analysée, image optique des branchies, af, abfrontale ; f, frontale. Les flèches rouges indiquent les amas d'uranium sur les images ioniques. Barre d'échelles 100 et 10 $\mu\text{m}$ (raster 200 $\mu\text{m}$ $\times$ 200 $\mu\text{m}$ 5nA).....	176
Figure 73. Schéma du byssus et de la répartition de l'uranyle en fonction de la méthode de contamination. ....	177

Figure 74. Comparaison des images ioniques réalisées au niveau du byssus de moule exposé à de l'eau de mer dopée à l'uranium, image ionique du $^{23}\text{Na}$ , du $^{238}\text{U}^+$ , superposition $^{238}\text{U}^+$ (violet)/ $^{23}\text{Na}^+$ (bleu), Image optique du byssus. Les flèches vertes permettent de visualiser l'orientation des images. Barre d'échelles 50 et 10 $\mu\text{m}$ (raster 200 $\mu\text{m}$ $\times$ 200 $\mu\text{m}$ 5nA).....	179
Figure 75. Comparaison des images ioniques réalisées au niveau du byssus à la suite d'une contamination ex vivo à l'uranium., image ionique du $^{23}\text{Na}^+$ , du $^{40}\text{Ca}^+$ et de $^{238}\text{U}^+$ , superposition $^{238}\text{U}^+$ (rouge)/ $^{23}\text{Na}^+$ (vert), et superposition $^{238}\text{U}^+$ (rouge)/ $^{40}\text{Ca}^+$ (vert), Image optique les flèches vertes permettent de visualiser l'orientation des images. Les carrées et les numéros correspondent à différents agrandissements. Barre d'échelles 50 et 20 $\mu\text{m}$ (raster 200 $\mu\text{m}$ $\times$ 200 $\mu\text{m}$ 5nA). .....	180
Figure 76. Complexe possible DOPA-uranyle ( $\text{UO}_2$ ) par la protéine mfp-1 au niveau de la cuticule du byssus.....	181
Figure 77. Comparaison des images ioniques réalisées au niveau de la glande digestive, moule exposée à de l'eau de mer dopée à l'uranium, image ionique du $^{40}\text{Ca}^+$ , du $^{238}\text{U}^+$ , superposition $^{238}\text{U}^+$ (rouge)/ $^{40}\text{Ca}^+$ (vert), Image optique. Les flèches vertes permettent de visualiser l'orientation des images. Les pointillés repèrent la structure cellulaire Barre d'échelles 50 et 10 $\mu\text{m}$ (raster 200 $\mu\text{m}$ $\times$ 200 $\mu\text{m}$ 5nA).....	182
Figure 78. Comparaison des spectres XANES obtenus dans le pied, la branchie, le manteau et une référence de Liebigite. ....	185
Figure 79. Comparaison des spectres XANES obtenus dans le byssus à la suite d'une contamination ex vivo $[\text{U}]=5\times 10^{-4}\text{ M}$ et dans la glande digestive .....	185
Figure 80. Spectres EXAFS expérimentaux de la glande digestive et du byssus (contamination ex vivo) au seuil $L_{II}$ de l'uranium. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (cercle).....	186
Figure 81. a) Module de la transformée de Fourier, et b) partie imaginaire de la transformée de Fourier en $k^2\chi(k)$ de la glande digestive avec les différents modèles : vert Phosphate, bleu carboxylate, noir thiol. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (cercle). ....	187
Figure 82. Schéma de la structure du complexe uranyle-thiol (sphère bleue : Uranium, sphère rouge : oxygène, sphère jaune : soufre, sphère grise : carbone)(Kannan et al., 2005).....	188
Figure 83. a) Module de la transformée de Fourier, et b) partie imaginaire de la transformée de Fourier en $k^2\chi(k)$ de la glande digestive avec thiol (noir) et sans thiol (bleu). Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (cercle).....	188
Figure 84. Exemple de motif catéchol et hydroxypyridinone et DOPA .....	191
Figure 85. a) Module de la transformée de Fourier, et b) partie imaginaire de la transformée de Fourier en $k^2\chi(k)$ du byssus. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (cercle). .....	193
Figure 86. Spectres de fluorescence de la glande digestive de moule exposée à de l'eau de mer dopée. ....	194
Figure 87. Ajustement de la décroissance de la fluorescence à l'aide d'une fonction bi-exponentielle. ....	195
Figure 88. Spectres infrarouge (FTIR) du byssus (rouge) exposé ex vivo à de l'eau de mer dopée en uranium et byssus contrôle. ....	198
Figure 89. Réaction de Griess permettant le dosage du nitrite.....	239
Figure 90. Schéma représentant un montage SLRT proche de celui utilisé.....	241
Figure 91. Haut : Porte-échantillons « roue » avec simple confinement pour les analyses $\mu$ -XRF cobalt. Bas : Porte-échantillons avec double confinement pour les analyses $\mu$ -XRF et XAS uranium.....	242

Figure 92. Spectre gamma de l'eau de mer.....	243
Figure 93. Spectres de masse dans la région du $^{59}\text{Co}$ effectuée sur la glande digestive d'une moule exposée à de l'eau de mer dopée en cobalt (bleue) et d'un échantillon contrôle (vert). .....	248
Figure 94. Images ioniques obtenues dans le byssus de moule exposée à de l'eau de mer dopée en $^{59}\text{Co}$ . L'image ionique du $^{23}\text{Na}$ permet de localiser la cuticule et le matrice (flèche blanche). Barre d'échelle 20 $\mu\text{m}$ . Paramètre d'acquisition : 250 $\times$ 250 $\mu\text{m}$ ; 500 pA. L'image de la zone analysée est obtenue par une caméra optique. Barre d'échelle 500 $\mu\text{m}$ .....	249
Figure 95. Images ioniques obtenues dans la glande digestive de moule exposée à de l'eau de mer dopée en $^{59}\text{Co}$ . L'image ionique du $^{23}\text{Na}$ permet de localiser la cuticule et le matrice (flèche blanche). Barre d'échelle 20 $\mu\text{m}$ . Paramètre d'acquisition : 250 $\times$ 250 $\mu\text{m}$ ; 500 pA. L'image de la zone analysée est obtenue par une caméra optique. Barre d'échelle 500 $\mu\text{m}$ . ....	250
Figure 96. Comparaison des cartographies de fluorescence X du byssus par XAS et par PIXE. XAS : a) cartographies de fluorescence X du cobalt, b) cartographies de fluorescence X du chlore PIXE : b) cartographies de fluorescence X du chlore exposé à 1000 ppb de cobalt, d) cartographies de fluorescence X du chlore du chlore exposé à 1000 ppb de cobalt 500 ppb.	251
Figure 97. Superposition de l'image optique d'une coupe de moules avec l'image de fluorescence X de l'uranium dans les branchies. ....	252
Figure 98. Superposition de l'image optique d'une coupe de moules avec l'image de fluorescence X de l'uranium dans les branchies. ....	253
Figure 99. Spectre de masse de l'uranium. ....	254
Figure 100. Comparaison des images ioniques réalisées au niveau du byssus à la suite d'une contamination ex vivo à l'uranium. Image ionique du $^{40}\text{Ca}^+$ et du $^{238}\text{U}^+$ , Superposition $^{238}\text{U}^+$ (rouge)/ $^{40}\text{Ca}^+$ (vert), image optique du byssus. Barre d'échelles 250 et 20 $\mu\text{m}$ (raster 200 $\mu\text{m} \times$ 200 $\mu\text{m}$ 5 nA) .....	255
Figure 101. Comparaison des images ioniques réalisées au niveau du byssus à la suite d'une contamination ex vivo à l'uranium. Image ionique du $^{40}\text{Ca}^+$ et du $^{238}\text{U}^+$ , Superposition $^{238}\text{U}^+$ (rouge)/ $^{40}\text{Ca}^+$ (vert), image optique du byssus. Barre d'échelles 250 et 20 $\mu\text{m}$ (raster 200 $\mu\text{m} \times$ 200 $\mu\text{m}$ 5 nA) .....	256
Figure 102. Spectre de fluorescence de la glande digestive de moule exposé à de l'eau de mer dopée en uranium. ....	257
Figure 103. Courbe de croissance d'une culture de T. Iso (Modifié d'après: ("L'Institut Agro Rennes-Angers : Formation, Recherche, Valorisation en agronomie, agroalimentaire, horticulture et paysage," n.d.) .....	259
Figure 104. Déroulement schématique de l'ensemencement des souches T. Iso.....	260
Figure 105. Détail de la cellule de Malassez (gauche) et comptage des cellules à partir d'un rectangle quadrillé (droite). ....	261
Figure 106. Spectres UV-visible issus de la purification des protéines contenues dans la glande digestive par chromatographie d'affinité .....	262
Figure 107. Image de microscopie électronique à transmission de la glande digestive.....	263

# Liste des tableaux

Tableau 1. Réseaux de suivi de la contamination chimique dans les organismes marins méditerranéens en France.....	25
Tableau 2. Définition des classes de qualité utilisées dans le cadre du réseau RINBIO (Andral and Tomasino, 2010).....	26
Tableau 3. Conditions expérimentales d'analyses utilisées avec le LG-SIMS et le SG-SIMS 7f. ....	48
Tableau 4. Concentration des 11 constituants majoritaires à la surface des océans. (Carpenter and Manella, 1973; Culkin and Cox, 1966; Pilson, 2012; Uppström, 1974).....	58
Tableau 5. Rejets radioactifs des usines de traitement du combustible nucléaire usé de Sellafield et La Hague entre 1970 et 1998.(Aarkrog, 2003) .....	66
Tableau 6. Réglementation des seuils pour les facteurs de bioconcentration. REACH : Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals. TSCA : Toxic Substance Control Act. ....	72
Tableau 7. Facteur de concentration (CF) estimé dans plusieurs espèces marines.(IAEA, 2004) .....	77
Tableau 8. Conditions expérimentales des contaminations pour la quantification du <sup>60</sup> Co dans les moules.....	103
Tableau 9. Conditions expérimentales des contaminations pour la quantification du cobalt dans les moules provenant de Villefranche-sur-Mer et la petite rade de Toulon. ....	108
Tableau 10. Conditions expérimentales des contaminations pour la quantification du cobalt dans les moules en fonction de la durée d'exposition : 12 jours et 60 jours.....	112
Tableau 11. Conditions expérimentales des contaminations de moules au cobalt pour l'étude de la distribution subcellulaire du cobalt. ....	115
Tableau 12. Conditions expérimentales des contaminations au cobalt des moules provenant de Villefranche-sur-Mer pour les imageries synchrotrons.....	119
Tableau 13. Conditions expérimentales des contaminations au cobalt des moules provenant de Villefranche-sur-Mer pour les imageries SIMS cobalt. ....	127
Tableau 14. Conditions expérimentales des contaminations au cobalt des moules pour les cartographies PIXE. ....	133
Tableau 15. Caractéristiques des échantillons de référence. ....	137
Tableau 16. Paramètres structuraux obtenus à partir de l'ajustement des données EXAFS dans la glande digestive.....	140
Tableau 17. Paramètres structuraux obtenus à partir de l'ajustement des données EXAFS du byssus. ....	143
Tableau 18. Concentration des protéines dans les différentes fractions d'élution de la chromatographie d'affinité. LD : limite de détection (0,1 mg.g <sup>-1</sup> ).....	145
Tableau 19. Propriétés de l'uranium naturel.....	154
Tableau 20. Conditions expérimentales des contaminations à l'uranium comparant les moules de Villefranche-sur-Mer et de la petite rade de Toulon. ....	161
Tableau 21. Conditions expérimentales des contaminations de moules à l'uranium pour l'étude de la distribution subcellulaire de l'uranium.....	167
Tableau 22. Conditions expérimentales des contaminations à l'uranium de moules pour les analyses par $\mu$ -XRF.....	170

Tableau 23. Conditions expérimentales des contaminations à l'uranium de moules pour les cartographies SIMS. ....	175
Tableau 24. Paramètres structurels obtenus à partir de l'ajustement des données EXAFS dans la glande digestive. ....	189
Tableau 25. Paramètres structurels obtenus à partir de l'ajustement des données EXAFS du byssus. ....	192
Tableau 26. Données spectroscopiques (longueur d'onde, temps de vie) de la glande digestive provenant de moule exposée à de l'eau de mer dopée en uranium et la comparaison avec des données de la littérature (Liste non exhaustive). ....	196
Tableau 27. Principaux éléments mesurables en spectrométrie gamma (source : Randolph S. Peterson). ....	240

# Introduction



## Introduction

Les océans sont considérés comme le réceptacle de l'ensemble des contaminations terrestres susceptibles de contenir des éléments traces métalliques et des radionucléides. Les études sur ces radionucléides dans le milieu marin demeurent parcellaires et ne permettent pas actuellement d'appréhender leur impact environnemental marin.

Les radionucléides présents dans le compartiment marin sont principalement d'origine naturelle, résultant notamment de l'érosion des sols et du ruissellement. En proportion réduite, les radionucléides d'origine anthropique proviennent des activités nucléaires humaines, telles que les retombées des essais nucléaires atmosphériques et les rejets des installations nucléaires. Bien que ces événements soient peu fréquents, avec seulement deux accidents (la catastrophe nucléaire de Tchernobyl et de Fukushima) classés au niveau sept sur l'échelle internationale des événements nucléaires, les accidents liés aux centrales nucléaires ont eu un impact sociétal significatif.

Le rejet de radionucléides dans l'environnement demeure un sujet largement controversé et actuel, en particulier suite au rejet en mer d'eau contaminée suite à l'accident de la centrale nucléaire de Fukushima-Daiichi. La dispersion des radionucléides dans les océans soulève des questions aux enjeux géopolitiques, économiques, et concerne également la santé humaine liée à la consommation de produits de la mer. Comprendre la spéciation de ces éléments contribuerait à mieux appréhender leur interaction avec le biote et leurs effets toxiques.

La quantification de des radionucléides dans le milieu marin et le biote permet de suivre leur migration à travers les océans et leur transfert dans les êtres vivants. Le milieu marin constitue un compartiment complexe, caractérisé par la présence d'ions et de molécules organiques susceptibles de complexer les métaux. Les différentes formes physico-chimiques d'un métal ont un impact direct sur sa biodisponibilité et son accumulation dans les êtres vivants. Cependant, les données de spéciation en milieu marin sont principalement obtenues à l'aide de modèles théoriques en raison de la faible concentration de ces éléments.

Les radionucléides métalliques peuvent exposer le biote à une contamination lorsqu'ils traversent les membranes biologiques ou sont ingérés. La plupart de ces radionucléides ne participent pas aux processus biologiques des organismes vivants (e.g., U, Pu, Am). Cependant, certains organismes marins ont la capacité d'accumuler ces radionucléides et pourraient utiliser des mécanismes de détoxification associés aux métaux lourds. Ces processus impliquent des

## Introduction

métabolites complexant les métaux et favorisant leur transport ou leur séquestration en vue de leur élimination.

Parmi ces organismes, les mollusques bivalves, tels que les moules, sont particulièrement efficaces en raison de leur capacité à bioaccumuler et de leur rôle en tant qu'organismes filtreurs. Les moules sont utilisées dans de nombreux programmes internationaux comme des organismes sentinelles pour surveiller la pollution marine en y quantifier des polluants (métallique et organique). La spéciation *in vivo* est une notion essentielle pour comprendre les processus d'accumulation et de transfert des radionucléides métalliques. En effet, ces données sont nécessaires pour comprendre leur biodisponibilité, leur toxicité, et par conséquent, l'impact potentiel des activités nucléaires humaines sur l'écosystème marin.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons également réalisé une comparaison quantitative de l'accumulation en fonction de l'origine géographique des moules. Pour ce faire, nous avons étudié un site non pollué situé à Villefranche-sur-Mer et un site contaminé par des métaux lourds situé dans la petite rade de Toulon. En effet, les métabolites impliqués dans les processus de détoxification et de lutte contre le stress oxydant sont exprimés différemment dans les zones portuaires contaminées.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons sélectionné deux radionucléides :

- Le  $^{60}\text{Co}$ , l'un des principaux émetteurs gamma dans les effluents des centrales nucléaires (produit d'activation), dont la forme stable ( $^{59}\text{Co}$ ) est indispensable dans les processus biologiques, notamment la cobalamine ( $\text{B}_{12}$ ). De plus, le cobalt permet de travailler avec l'isotope stable, facilitant son utilisation.

- L'uranium est un radioélément de la famille des actinides que l'on retrouve naturellement dans le compartiment marin et qui peut être utilisé comme modèle pour les actinides lourds. De plus, sa faible radiotoxicité est compatible avec le travail proposé dans cette thèse. L'objectif est d'obtenir des informations sur la spéciation de ces deux radionucléides pour comprendre leurs interactions dans les mollusques bivalves et leur impact sur l'environnement.

## Introduction

Dans un premier temps, nous avons quantifié l'accumulation à l'échelle des traces et des ultra-traces du cobalt et de l'uranium dans différents organes à l'aide d'outils tels que la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) et la spectroscopie gamma. Nous avons également quantifié ces éléments à l'échelle subcellulaire grâce au fractionnement cellulaire. Des outils permettant d'imager la répartition du cobalt et de l'uranium à différentes échelles nous ont permis de visualiser les structures cellulaires impliquées. L'utilisation de sondes différentes, telles que la fluorescence des rayons X ( $\mu$ -XRF) ou la spectrométrie de masse à ions secondaires (SIMS), nous a fourni des informations complémentaires indispensables pour comprendre la spéciation de ces éléments.

Des techniques dédiées à l'étude de la spéciation ont été utilisées lors de nos études. La spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS) est particulièrement adaptée pour acquérir des données de spéciation et décrire l'environnement moléculaire proche du métal sondé. En complément, la spectrofluorimétrie laser à résolution temporelle (SLRT) a été utilisée uniquement sur l'uranium, car elle nécessite une espèce fluorescente.

Ce manuscrit de thèse se compose de quatre chapitres :

Le premier chapitre est dédié à la description du milieu marin, à la présentation générale des radionucléides, ainsi qu'à l'accumulation des métaux dans le biote marin. Cette dernière partie est axée sur les mollusques bivalves, qui sont les organismes modèles que nous avons choisis pour cette étude.

Le deuxième chapitre est consacré à l'étude du cobalt, avec son accumulation, sa spéciation, ainsi que sa distribution dans la moule *Mytilus galloprovincialis*.

Le troisième chapitre présente les résultats obtenus suite à l'exposition de la moule *Mytilus galloprovincialis* à de l'eau de mer dopée en uranium. L'objectif est de pouvoir décrire l'accumulation, la spéciation et la distribution de l'uranium à l'échelle subcellulaire.

Le quatrième chapitre est consacré à l'ensemble des méthodologies et protocoles mis en place pour mener les expériences avec des organismes vivants. Puis, une partie est dédiée aux outils analytiques utilisés dans le cadre de cette thèse.

## Introduction

Pour terminer, une conclusion permet de synthétiser les résultats et d'apporter des explications possibles, ainsi que les perspectives proposées. L'ensemble de ces données nous permet de mieux établir le devenir du cobalt et de l'uranium dans la moule et de comprendre sa spéciation. Ces informations peuvent avoir des conséquences sur notre compréhension de la contamination dans la chaîne trophique.

# **Chapitre 1 – Matériels et méthodes**



## I. Exposition et récoltes des moules

### 1) Choix de sites de récoltes des moules

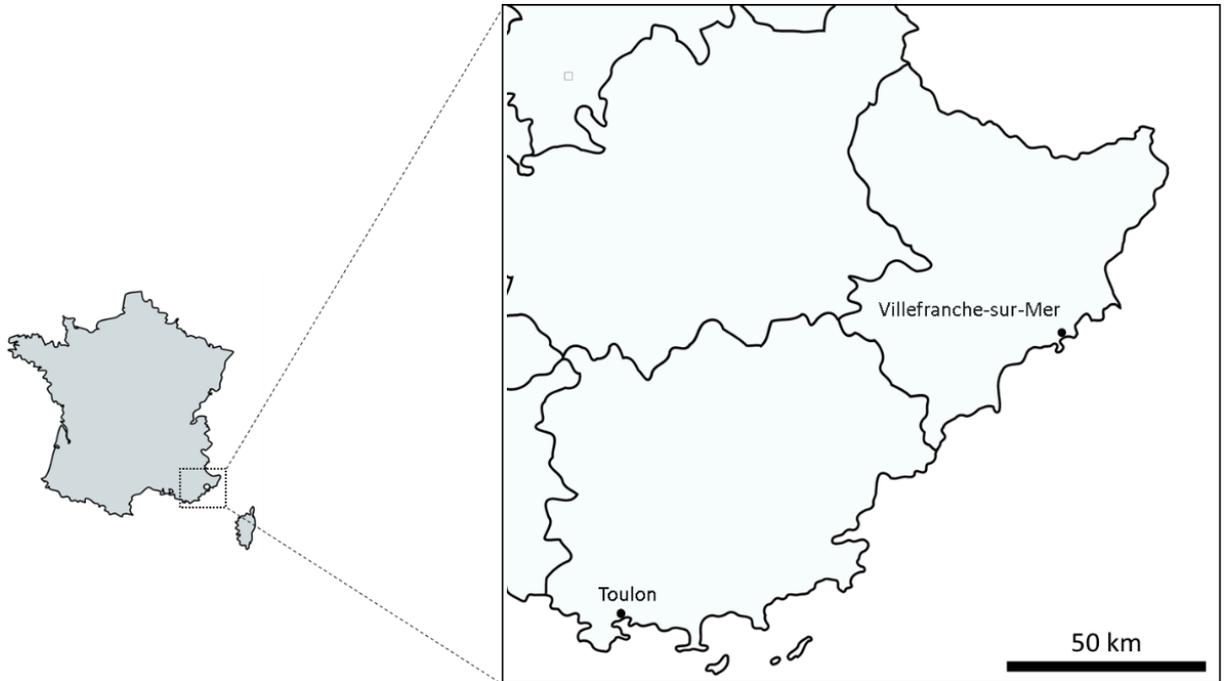
L'eau de mer a été prélevée à l'Institut de la mer de Villefranche-sur-Mer (IMEV) (43°41'44.4"N 7°18'28.0"E) et préfiltrée à 1 µm par des filtres « Crystal filter » (PP-01-978) cartouche sédiments SPNU afin d'éliminer les particules en suspension. L'eau de mer a ensuite été acheminée à Nice puis stockée à température ambiante dans des cuves de 300-500 L. Un système constitué d'une pompe à eau et d'une pompe à air a été installé dans les cuves pour permettre leurs brassage et oxygénation.

Les moules ont été récoltées par l'IMEV sur demande par le service de plongée « Moyens à la mer » rattaché à la fédération de recherche FR3761. Les mollusques ont été récupérés dans une zone entre Nice et Saint-Jean-Cap-Ferrat (43°41'02.4"N 7°18'56.2"E) (Figure 1). Les moules sont situées au niveau d'une zone regroupée autour de la bouée de repérage et sur les cordages à environ un mètre de profondeur. Une fois les mollusques récoltés, ils ont été maintenus en vie dans un premier temps à l'IMEV dans des aquariums avec un flux continu d'eau de mer pendant un à six jours.

D'autres mollusques proviennent de la petite rade de Toulon, proche de la baie du Lazaret (43°05.40' N, 5°54.50' E) (Figure 1). Ils ont été récoltés par les plongeurs de la base navale de Toulon.

Les mollusques provenant de Toulon et de Villefranche-sur-Mer ont été ramenés à l'institut de chimie de Nice où ils ont été acclimatés progressivement dans un vivier. Ce vivier est maintenu à 16°C par des groupes réfrigérants (Aquavie Ice), un système de filtration composé uniquement de mousse (sans produit chimique ni charbon actif) ainsi que des pompes à eau permettent de maintenir un flux d'eau dans le vivier. Jusqu'à 100 individus ont pu être stockés dans le vivier pendant plusieurs semaines. Pour ce faire, le vivier est régulièrement contrôlé (pH = 7,8, salinité ~ 38 g.L<sup>-1</sup>, nitrite, présence d'algues sur les parois). Le pH des solutions a été mesuré avec un pH-mètre standard (Metler-Toledo) équipé d'une microélectrode (modèle MIXC710). La salinité a été mesurée à l'aide d'un réfractomètre de salinité. Le protocole pour quantifier les nitrites est basé sur la méthode de Griess (Annexe I).

L'eau de mer du vivier a été renouvelée une fois toutes les deux semaines par le remplacement d'environ un tiers du volume d'eau de mer. Les mollusques ont été inspectés quotidiennement et les individus décédés retirés.



*Figure 1. Localisation de Villefranche-sur-Mer et de Toulon.*

Les sites où nous collectons les moules (Villefranche-sur-Mer et la petite rade de Toulon) sont surveillés dans le cadre du suivi de la contamination chimique des eaux côtières méditerranéennes opérées par l'IFREMER. Ce travail de surveillance s'inscrit plus globalement dans la gestion du littoral. Un rapport synthétise le résultat de vingt années de recherches et de surveillance du littoral méditerranéen français par différents programmes tels que RINBIO, ROCCH, CONTAMED, REMTOX permettant d'avoir une vue d'ensemble de la pollution des côtes françaises (Tableau 1) (Andral Bruno, 1996; Bouchoucha et al., 2021; "ROCCH," n.d.).

*Tableau 1. Réseaux de suivi de la contamination chimique dans les organismes marins méditerranéens en France.*

<b>Nom du réseau</b>	<b>Réseaux Contaminant dans la chaîne trophique en Méditerranée (CONTAMED)</b>	<b>Réseau Intégrateur Biologique (RINBIO)</b>	<b>Réseau d'Observation des Contaminants Chimiques matière vivante (ROCCH MV)</b>
<b>Description</b>	Suivi de la concentration en contaminants chez les poissons	Suivi de la concentration en contaminants et le cas échéant en radioéléments dans la chair de moules encagées	Observatoire national de la concentration en contaminants chimiques du milieu marin à partir de dosages dans des gisements de mollusques pérennes
<b>Fréquence du suivi</b>	Tous les 5 ans	Tous les 3 ans	Tous les ans
<b>Substances suivies</b>	7 métaux : Hg, Cd, Pb, Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, 7 PCB, Dioxines	Variables (métaux, radionucléides, POM)	Variables (selon la DCSMM)
<b>Démarrage</b>	2012	1996	1979

Les métaux, aussi appelés éléments trace métalliques (ETM), forment une classe particulière de contaminants chimiques et sont contrôlés dans l'environnement marin. Trois métaux sont des indicateurs communs aux obligations de suivi de la Directive Cadre Eau (DCE), de la Convention de Barcelone et de la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM) : le cadmium, le mercure et le plomb. D'autres éléments trace métalliques sont mesurés par les réseaux RINBIO, ROCCH et CONTAMED.

Le réseau RINBIO a établi une méthode de classification des données afin de faciliter le traitement global des données (Andral and Tomasino, 2010). L'utilisation de cette classification permet de comparer les données de différentes campagnes en se basant sur la moyenne de la distribution. Le Tableau 2 synthétise les différentes classes utilisées où la moyenne correspond au bruit de fond de la contamination de chaque contaminant.

Tableau 2. Définition des classes de qualité utilisées dans le cadre du réseau RINBIO (Andral and Tomasino, 2010).

Classe	Limite	Description
Classe 0	Données inférieures à la moyenne de la distribution (bruit de fond)	Bruit de fond de la contamination côtière
Classe 1	Borne supérieure de la classe 0 de deux fois la valeur de l'écart type	Faible contamination, voire incertaine. La classe 1 permet de tenir compte de la variabilité inhérente à l'utilisation d'un biointégrateur et à la précision des méthodes analytiques.
Classe 2	Borne supérieure de la classe 1 de deux fois la valeur de l'écart type	Valeurs de contamination subnormales par rapport au bruit de fond. Pollution certaine, mais modérée du milieu
Classe 3	Borne supérieure de la classe 2 de deux fois de l'écart type	Valeurs anormales de contamination par rapport au bruit de fond
Classe 4	> Classe 3	Valeurs très élevées de contamination

L'analyse de l'eau de mer au niveau de la rade de Villefranche-sur-Mer (point le plus proche de la collecte des moules) indique une eau de bonne qualité vis-à-vis des concentrations d'ETM présents. Cependant, l'état des sédiments de cette zone montre des niveaux de contamination élevés pour le Cu, Hg, Pb, Zn, qui peuvent être supérieurs aux limites réglementaires. Dans le cadre de la surveillance menée par RINBIO sur les moules, il ressort que les concentrations d'ETM sont comprises entre le bruit de fond côtier (Classe 0 : Ni) et une faible contamination (Classe 1 : Hg, Pb). Il est cependant à noter que d'autres types de contaminants tels que les composés organiques peuvent se retrouver dans le milieu marin. Parmi ces composés, les polluants organiques persistants peuvent aussi être analysés dans des organismes sentinelles qui peuvent les concentrer avec des facteurs pouvant atteindre les 100 000.

Autour du point de pompage, la présence de certains polluants organiques a été mentionnée dans les sédiments comme les polychlorobiphényles et les hydrocarbures polycycliques.

Au niveau de la baie du Lazaret, les mesures indiquent des niveaux de concentration dans les mollusques élevés et supérieurs à la médiane nationale pour deux métaux lourds (Classe 4 : Hg, Pb). Ce site est particulièrement suivi dans les réseaux RNO et RINBIO avec des concentrations en métaux lourds également présents dans le sédiment. La contamination du sédiment de cette zone provient en grande partie des vestiges de la Seconde Guerre mondiale. Le 27 novembre 1940 a eu lieu le sabordage de la flotte française à Toulon détruisant près de 90 % des navires y étant amarrés. De plus, la baie de Toulon est sujette aux contaminations qui peuvent provenir de l'arsenal militaire et de l'activité portuaire dans la zone (civile, militaire, commerciale). Dans la petite rade de Toulon, la conjonction de divers paramètres hydrodynamiques favorise l'augmentation de la concentration des polluants chimiques dans les sédiments et la colonne d'eau. Les marées et les courants y étant généralement faibles permettent la sédimentation de tous les apports en mer.

Les données issues du site non contaminé pourront être utilisées et appliquées à d'autres sites présentant des caractéristiques similaires. Ce site nous permet d'obtenir des données générales sur l'accumulation des radionucléides. Le site pollué est spécifique compte tenu des contaminations importantes observées. Les données nous permettront de comprendre l'impact de la pollution sur la répartition des radionucléides dans les mollusques bivalves.

## **2) Préparation des aquariums**

### **a) Sélection des moules**

Les mollusques ont été sélectionnés dans le vivier en fonction de la longueur des coquilles. Dans le cas des cohortes, les tailles sont comprises entre 3,5 et 7,5 cm pour l'exposition à l'uranium (Figure 2) et entre 5,5 et 7,5 cm pour l'exposition au cobalt (Figure 3). Les moules utilisées pour toutes les autres analyses se situent entre 6 et 7 cm de longueur. Les coquilles ont été nettoyées à l'aide d'une brosse en Teflon et d'une pince pour enlever les bernacles, les algues et le byssus a été sectionné.

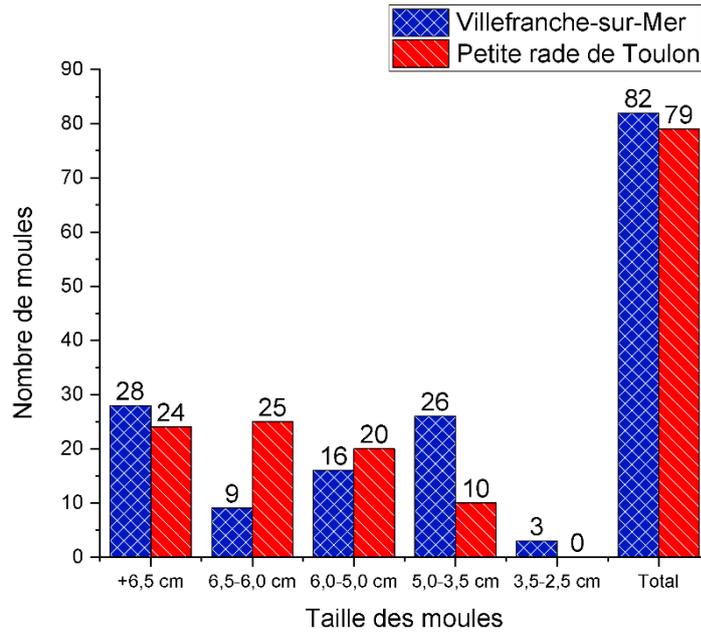


Figure 2. Histogramme représentant la répartition des moules exposés à de l'uranium en fonction de leurs tailles et leurs lieux de récoltes

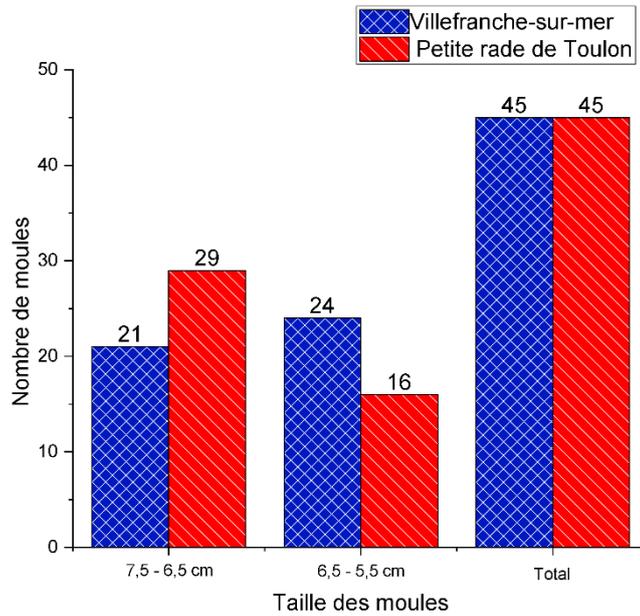


Figure 3. Histogramme représentant la répartition des moules exposés au cobalt en fonction de leurs tailles et leurs lieux de récoltes.

## b) Protocole d'exposition des moules *in vivo*

Après avoir sélectionné et préparé les mollusques, ils ont été placés pendant une période d'adaptation de trois jours dans des aquariums préalablement remplis avec le volume d'eau de mer nécessaire. À la suite de ces trois jours d'adaptation, l'eau de mer a été renouvelée et contaminée avec les solutions mères de cobalt ou de nitrate d'uranyle suivant la concentration désirée.

Cette période d'adaptation est nécessaire pour vérifier que le changement d'environnement ne perturbe pas les individus. Pendant ces trois jours, la production de byssus, l'ouverture de la valve et sa fermeture ont été contrôlées. Les individus ne montrant pas de réponse satisfaisante ont été retirés des expériences et remplacés par de nouveaux individus avec une nouvelle phase d'adaptation de trois jours.

L'eau de mer a été renouvelée après cinq jours avec la même concentration d'exposition. Le schéma (Figure 4) permet d'avoir une vue résumée du protocole de contamination.

Les mesures réalisées avec des Réplicas comprennent toujours un aquarium contrôle non contaminé.

Les concentrations du cobalt et de l'uranium dans les aquariums sont issues de mesures expérimentales. Des prélèvements de l'eau de mer ont été réalisés après chaque contamination puis les aliquotes mesurées en ICP-MS.

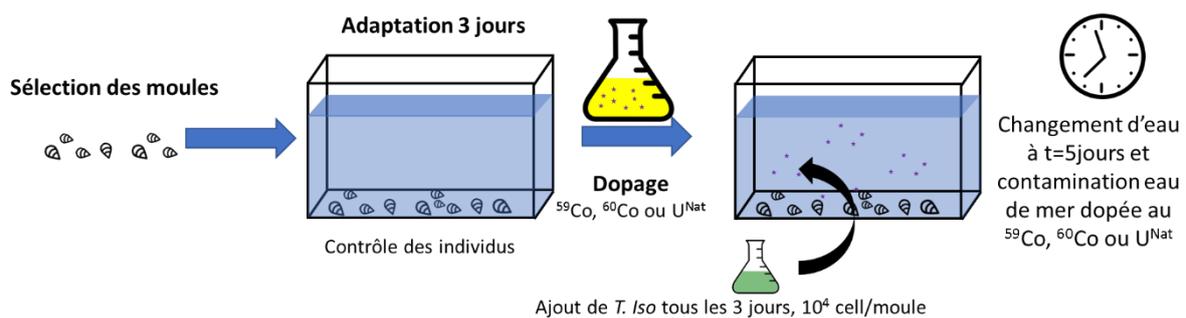


Figure 4. Schéma général des contaminations des moules avec du cobalt ou de l'uranium

### c) Protocole de contamination *ex vivo du byssus*

Dans le cadre des contaminations *ex vivo* les fils de byssus ont été récoltés sur des individus non contaminés provenant de Villefranche-sur-Mer. Ces fils de byssus ont ensuite été nettoyés pour enlever les résidus présents au niveau des plaques. Les fils ont pu ensuite être contaminés dans de l'eau de mer dopée avec du cobalt ou de l'uranium. L'objectif de ce mode de contamination est de favoriser une potentielle rétention de ces éléments au niveau de la cuticule par des phénomènes de surfaces.

## 3) Solution de contaminations des moules

Préparation de la solution stock d'uranium

Les solutions stock d'uranium ont été préparées à partir de nitrate d'uranyle ( $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) solubilisé dans une solution d'acide nitrique 0,1M.

Préparation de la solution stock de cobalt ( $^{59}\text{Co}$ )

Les solutions stock de cobalt ont été préparées à partir de chlorure de cobalt ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) solubilisé dans une solution d'eau Milli-Q.

Préparation de la solution stock de cobalt ( $^{60}\text{Co}$ )

La solution de  $^{60}\text{Co}$  provient d'une solution de  $^{60}\text{Co}$  stabilisé avec  $5 \times 10^{-4}$  M de  $^{59}\text{Co}$  ( $30 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) (Eckert & Ziegler).

## 4) Compartimentalisation des échantillons

### a) Protocole de dissection des échantillons

Une procédure de dissection similaire a été utilisée pour toutes les expériences. Une fois la période d'exposition atteinte, les moules contaminées ont été prélevées puis rincées avec de l'eau de mer.

Le petit matériel (scalpels, pince, ciseaux, spatule) a été rincé à l'acide nitrique suprapure concentré puis à l'eau désionisée entre chaque organe prélevé. Il est essentiel de

maintenir la propreté de la surface de travail pendant les dissections, afin de prévenir tout risque de contamination croisée pouvant se produire à ce stade.

Dans un premier temps, les mollusques ont été ouverts avec le scalpel au niveau du muscle adducteur postérieur puis rincés à nouveau dans un grand volume d'eau. Les organes ont été prélevés en fonction de leur accessibilité dans l'ordre suivant : byssus, pied, branchie, manteau, glande digestive et le reste du corps mou. Pour la quantification des moules entières, après l'ouverture de la coquille, le byssus a été retiré puis la chair prélevée dans sa globalité.

Les tissus ont été placés dans des boites en plastique sans couvercle puis conservés au congélateur (-20°C). Les échantillons ont ensuite été lyophilisés pendant 48h puis pesés pour obtenir le poids sec des organes ou des moules entières.

Les expériences de  $\mu$ -XRF ont nécessité le décoquillage des moules à l'aide d'une pince et d'un scalpel pour extraire le mollusque sans l'endommager. La chair a été retirée en sectionnant les muscles la reliant à la coquille.

### **b) Compartimentalisation subcellulaire**

Les protocoles de compartimentalisations ont été adaptés d'après Urien. (Urien et al., 2020). Les protocoles utilisés pour l'uranium et le cobalt sont différents en raison des contraintes liées à la manipulation d'éléments radioactifs.

#### **i. Uranium**

Les glandes digestives ont été prélevées lors des dissections et homogénéisées à 4°C dans une solution tampon (20 mM Tris, pH 7,6) (1 : 5 ; tissus : solution tampon) à l'aide d'un broyeur de tissus de type Potter-Elvehjem muni d'un piston en Teflon. Puis la mixture a subi dix cycles de sonications (100 % ; 30s ON/OFF, Vibracell modèle 75186) dans un bain de glace.

Les tissus homogénéisés ont été centrifugés à 1 500 × g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot résultant (P1) contenant des débris cellulaires et des granules a été suspendu dans de l'eau ultrapure, puis dissous dans une solution NaOH (1M) à 80°C pendant 1 heure. Le mélange a ensuite été centrifugé à 5 000 × g pendant 10 minutes à 20°C. Le culot obtenu contient les

granules riches en métaux (résistant au NaOH) (P2) et le surnageant (S2) comprend les débris cellulaires solubilisés. Le surnageant provenant de la première étape de centrifugation contenant le cytosol (S1) a été centrifugé à  $100\,000 \times g$  pendant 1 heure à  $4^{\circ}\text{C}$ , pour obtenir le cytosol dans le surnageant (S3) et les microsomes ainsi que les mitochondries dans le culot (P3). La dernière étape a été réalisée pour séparer les protéines thermostables (PTS) des protéines thermodénaturables (PTD) en chauffant le cytosol à  $80^{\circ}\text{C}$  pendant 10 minutes. Puis le mélange a été refroidi dans la glace pendant 1 heure avant d'être centrifugé à  $30\,000 \times g$  pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu (S4) contenant les PTS et les culots (P4) contiennent les PTD. Le protocole de fragmentation est un résumé en Figure 5.

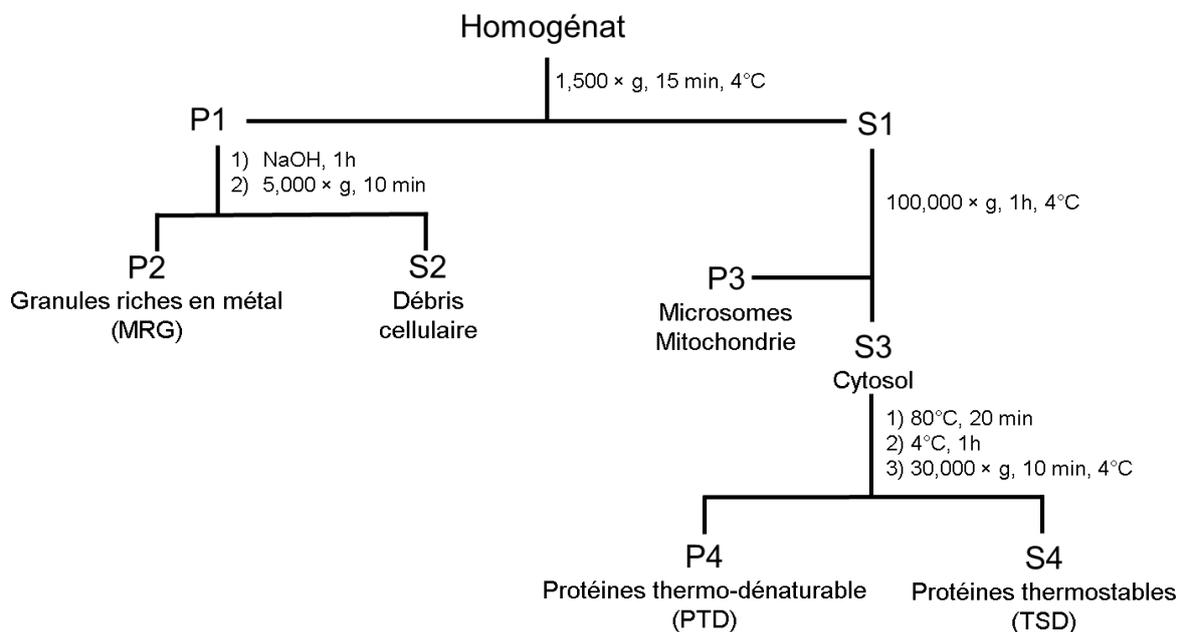


Figure 5. Organigramme du protocole de fractionnement subcellulaire sur des glandes digestives de moules exposés à l'uranium.

ii. Cobalt

Les glandes digestives ont été prélevées lors des dissections et homogénéisées à  $4^{\circ}\text{C}$  dans une solution tampon (20 mM Tris, pH 7,6, 150 mM NaCl) (1 : 5 ; tissus : solution tampon) à l'aide d'un broyeur de tissus de type Potter-Elvehjem muni d'un piston en Teflon. Puis la mixture a subi dix cycles de sonications (20 % ; 30s ON/OFF) dans un bain de glace.

Les tissus homogénéisés ont été centrifugés à  $1\,500 \times g$  pendant 15 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le culot résultant (P1) contenant des débris cellulaires et des granules a été resuspendu dans de

l'eau ultrapure, puis dissous dans une solution de NaOH (1M) à 80°C pendant 1 heure. Le mélange a ensuite été centrifugé à  $5\,000 \times g$  pendant 10 minutes à 20°C. Le culot (P2) obtenu contient les granules riches en métaux (résistant au NaOH) (P2) et le surnageant (S2) comprenant les débris cellulaires solubilisés. Le surnageant provenant de la première étape de centrifugation contenant le cytosol (S1) a été centrifugé à  $15\,000 \times g$  pendant 45 minutes à 4°C, pour obtenir le cytosol dans le surnageant (S3) et les mitochondries dans le culot (P3).

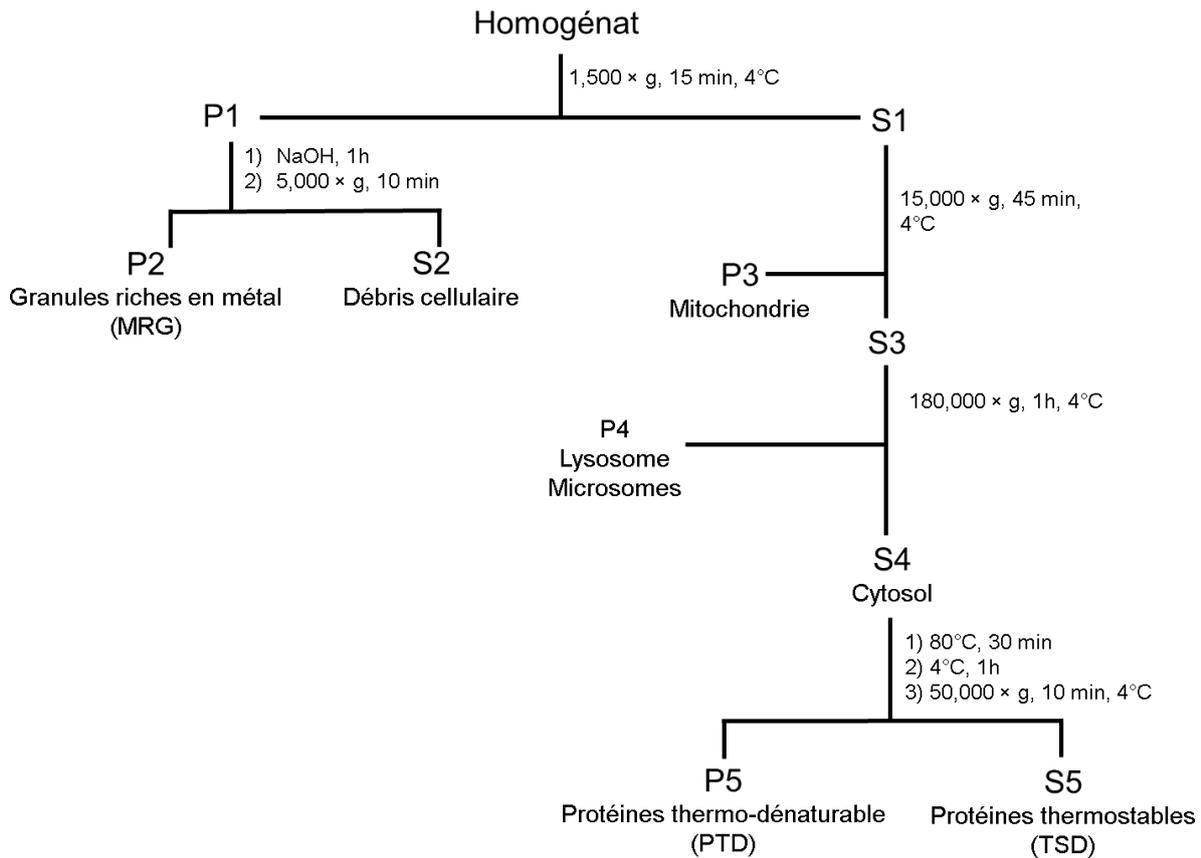


Figure 6. Organigramme du protocole de fractionnement subcellulaire sur des glandes digestives de moules exposés à du cobalt.

Le surnageant (S3) a été centrifugé à  $180\,000 \times g$  pendant 1 heure à 4°C, pour obtenir le cytosol dans le surnageant (S4) et les microsomes ainsi que les lysosomes dans le culot (P4). La dernière étape a été réalisée pour séparer les protéines stables à la chaleur (PTS) des protéines dénaturables par la chaleur (PTD) en chauffant le cytosol à 80°C pendant 10 minutes. Puis le mélange a été refroidi dans la glace pendant 1 heure avant d'être centrifugé à  $30\,000 \times g$  pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu (S4) contenant les PTS et les culots (P4) contiennent les PTD. Le protocole de fragmentation est résumé Figure 6.

## II. Les outils analytiques

### 1) Quantification des métaux

#### a) Minéralisation des échantillons

Les échantillons ont été minéralisés dans de l'acide nitrique concentré suprapur 67-70 % pendant 2h à 100°C au reflux. Après l'ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 :4 ; v/v), le mélange a été laissé au repos pendant 15 minutes pour permettre à tout gaz de s'échapper. La solution a été chauffée 2h à 100°C au reflux puis évaporée à sec.

Les minéralisations des échantillons ont été réalisées à l'aide d'un Digiprep (DigiPREP MS, 50 mL 48 positions, SCP Science) dans des tubes en polypropylène de 50 mL (DigiTUBEs 50 mL).

#### b) Spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif (ICP-MS)

##### i. Principe

La spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif (ICP-MS) est une technique pour l'analyse d'éléments trace, le schéma détaillant le principe de fonctionnement d'un ICP-MS est disponible Figure 7. L'échantillon liquide est converti en aérosol lors de son passage à travers le nébuliseur et la chambre de nébulisation. Ensuite, cet échantillon est acheminé vers un plasma à couplage inductif (ICP) généré par de l'argon gazeux à haute température (~8000 K). Les éléments présents dans l'échantillon sont ionisés au contact du plasma. Les ions sont ensuite entraînés par le flux d'argon et passent à travers deux cônes métalliques (en nickel ou en platine) : un cône échantillonneur et un cône excréteur. Ces cônes assurent le transfert des ions à pression atmosphérique vers le spectromètre de masse sous vide. Des lentilles sont disposées après les cônes, garantissant ainsi la focalisation du faisceau d'ions.

Le spectromètre de masse quadripôle filtre chaque isotope grâce à des courants à haute fréquence, en fonction de leur rapport masse/charge. Selon le courant appliqué, certains ions suivront une trajectoire stable à travers le quadripôle tandis que d'autres seront déviés. Les ions

qui passent à travers le quadripôle sont ensuite mesurés par un détecteur. L'utilisation d'une calibration externe permet d'établir un lien entre l'intensité obtenue et la concentration des échantillons.

La limite de détection pour un ICP-MS est généralement de l'ordre de la nanomole par litre ( $\text{nmol.L}^{-1}$ ), bien que cette valeur dépende de plusieurs paramètres liés à la préparation des échantillons ainsi qu'aux caractéristiques techniques de chaque instrument.

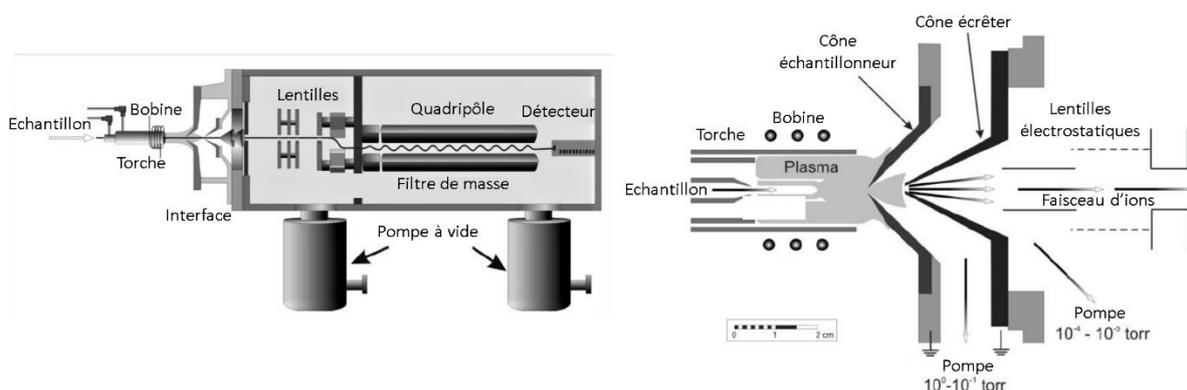


Figure 7. Schéma du principe de fonctionnement d'un ICP-MS (Modifié d'après: Košler and Sylvester, 2003).

## ii. Préparation des échantillons

Les échantillons minéralisés ont été repris dans une solution contenant 5 % d'acide nitrique et un étalon interne ( $5\text{-}10 \text{ mg.mL}^{-1}$  suivant les séries de mesures). Pour les mesures de cobalt par ICP-MS, le standard interne utilisé est le rhodium, tandis que pour les mesures d'uranium, nous avons ajouté du thulium. Les échantillons contrôles ont été préparés dans les mêmes conditions.

L'acide nitrique (67-70 %, Plasmapur plus degree) et les solutions standards pour ICP-MS proviennent de SCP Science et Honeywell Fluka.

Les analyses par ICP-MS ont été faites sur un ICP-MS iCAP RQ (ThermoFisher).

La quantification du cobalt a été effectuée au moyen d'une calibration externe en utilisant des solutions étalons de cobalt dans d'acide nitrique 5 % ( $\text{HNO}_3$ ) qui ont été préparées à partir de la solution standard ICP-MS Co (SCP Science, plasmaCAL).

La quantification d'uranium a été effectuée au moyen d'une calibration externe en utilisant des solutions étalons d'uranium dans l'acide nitrique 5 % (HNO<sub>3</sub>) préparées à partir de la solution standard ICP-MS U (SCP Science, plasmaCAL).

### c) Spectrométrie gamma

#### i. Principe

La spectrométrie gamma est une technique de mesure de la radioactivité des radionucléides émettant des radiations gamma. Pour résumer, parmi les interactions entre la matière et les photons, les trois principales sont :

L'effet photoélectrique : Un photon incident transfère son énergie à un électron lié à l'atome qui est éjecté avec une certaine énergie. La vacance liée à la perte d'un électron est alors comblée par un électron d'un niveau supérieur via des transitions (Rayon X). Cet effet est dominant à basse énergie, la section efficace ( $\sigma_{EP}$ ) augmente rapidement avec le numéro atomique  $Z$ .

$$\sigma_{EP} = C \times \frac{Z^4}{E_\gamma^3}$$

Où  $E_\gamma$  est l'énergie du photon incident,  $C$  une constante

L'effet Compton ou diffusion Compton : Ce phénomène apparaît lorsqu'un photon incident rentre en collision avec un électron libre ou peu lié. L'électron est éjecté avec une énergie cinétique  $E_c$  et un angle  $\phi$ , le photon est diffusé avec une énergie  $E'_\gamma$  et un angle  $\Theta$ .

La production des paires : Le photon incident peut être absorbé lorsqu'il est proche d'un noyau atomique, son énergie permet la création d'une paire d'électron-positron. L'énergie du photon incident doit être supérieure à 1,022 MeV pour correspondre à la somme de l'énergie de masse au repos des particules émises ( $E = mc^2$  ;  $E$  est l'énergie,  $m$  la masse au repos,  $c$  la vitesse de la lumière ; l'énergie d'une particule est de 0,511 MeV). L'énergie résiduelle est convertie en énergie cinétique entre les deux particules.

La détection des rayons gamma s'effectue en comptant les interactions entre la matière et les photons gamma. Plusieurs types de détecteurs existent, les principaux étant les semi-

conducteurs et les scintillateurs. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un détecteur équipé d'un cristal de germanium ultrapur (HPGe) refroidi à l'azote liquide. Un champ électrique est appliqué dans le semi-détecteur, et les interactions (paires d'électrons et électron-trou) qui s'y déroulent génèrent un courant sur les électrodes du détecteur. Ce courant est proportionnel à l'énergie déposée par le rayon gamma dans le détecteur. La charge est convertie en tension dans un préamplificateur, puis le signal est recueilli par un amplificateur. Ensuite, un analyseur multicanal permet de passer d'un signal continu à un spectre où l'énergie déposée correspond à un numéro de canal. Des tables répertorient les énergies spécifiques des rayons gamma associés aux différents radionucléides (Annexe Tableau 27). Ces spectres peuvent être utilisés pour déterminer le type de radionucléide présent dans les échantillons et pour déterminer sa concentration à l'aide d'une calibration externe.

### ii. Préparation des échantillons

Les échantillons minéralisés ont été repris dans une solution contenant 5 % d'acide nitrique puis analysés en spectrométrie gamma. L'analyse d'échantillons en solutions permet de se soustraire aux variations géométriques qui pourraient être induites par les mesures effectuées sur des organes fraîchement disséqués. La calibration en énergie est effectuée avec une référence  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{137}\text{Cs}$  et  $^{152}\text{Eu}$  et une solution standard de  $^{60}\text{Co}$  à 1000 Bq (6 mL).

## 2) Spéciation

### a) Absorption des rayons X (XAS)

#### i. Principe

Le synchrotron est un instrument de grande envergure sous forme d'un anneau qui permet l'accélération d'électrons à haute énergie (2,75 GeV pour SOLEIL), lesquels sont ensuite utilisés pour générer des photons, sous forme de rayonnement synchrotron. Ces photons sont ensuite distribués le long de l'anneau dans des lignes de lumière (Figure 8).

L'absorption des Rayons X est un outil de spectroscopie de spéciation permettant l'étude de l'environnement atomique proche d'un élément donné.

Lorsque l'énergie du faisceau de photons incidents est suffisante pour éjecter un électron de cœur de l'atome central, laissant un trou  $e^-$  et une partie de l'énergie est absorbée, c'est le seuil d'absorption. Un électron d'une couche supérieure peut alors combler ce trou par relaxation et émettre un photon de fluorescence. Le XANES fournit des informations sur une plage d'environ 100 eV autour du seuil d'absorption. Cette partie du spectre permet d'obtenir des informations sur le degré d'oxydation et l'environnement de coordination de l'atome central.

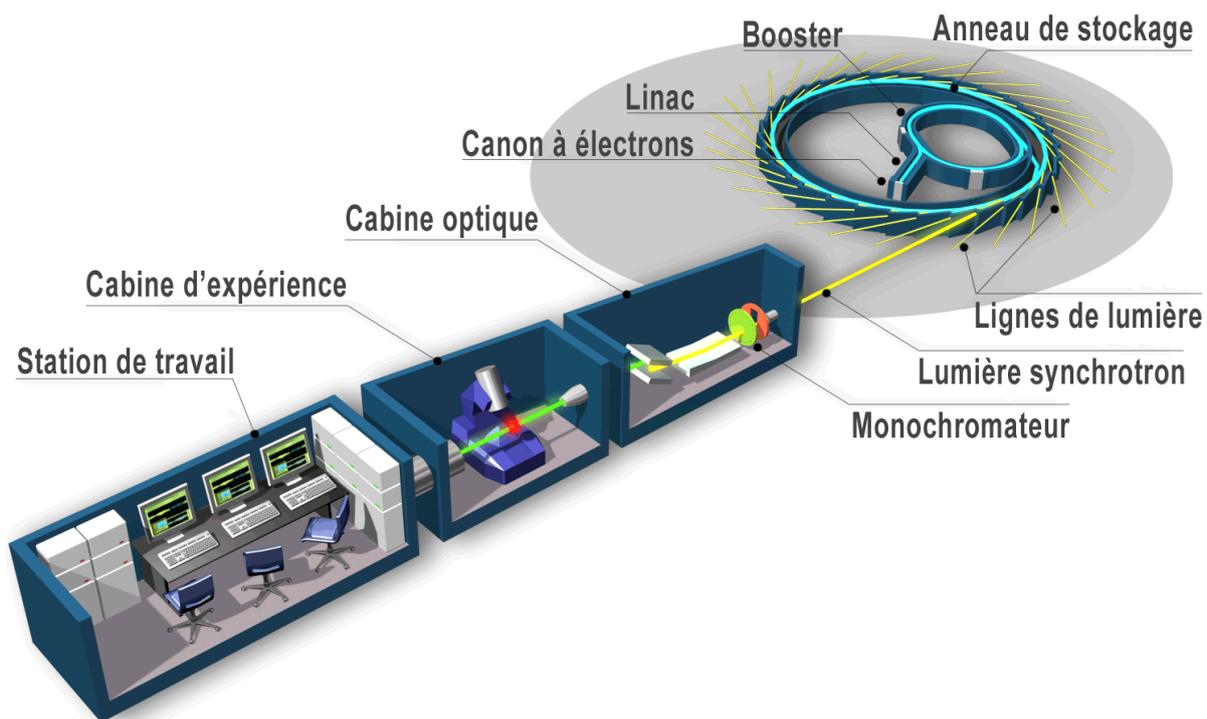


Figure 8. Structure d'une ligne de lumière et du synchrotron SOLEIL ("Synchrotron SOLEIL")

L'EXAFS est la partie du spectre d'absorption qui s'étend de 150 eV après le seuil à 1500 eV après. L'électron est éjecté vers un niveau du continuum avec une énergie cinétique proportionnelle à la différence entre l'énergie du faisceau incident et le seuil d'absorption. Le photoélectron émis interagit avec les atomes voisins, provoquant des oscillations sur le spectre, ce qui constitue la partie EXAFS du spectre. Un traitement mathématique est nécessaire pour utiliser la partie EXAFS, mais sa description détaillée ne fait pas partie de ce travail. La partie EXAFS du spectre fournit notamment des informations sur la distance moyenne entre l'atome central et ses atomes voisins ainsi que leur nombre.

### ii. Montage expérimental

Les expériences XAS et  $\mu$ -XRF ont été réalisées sur la ligne MARS du synchrotron SOLEIL qui est la seule ligne de lumière capable de détenir des échantillons radioactifs Figure 9 (LLorens et al., 2014; Sitaud et al., 2012; Solari et al., 2009). Le montage expérimental des deux modes (XAS et  $\mu$ -XRF) est relativement proche et fait partie de la branche monochromatique de la ligne.

Dans la cabane optique, les optiques de rayon X de la ligne permettent d'obtenir un faisceau monochromatique de photons collimatés et focalisés. En effet, le faisceau de photons passe par un collimateur suivant l'axe vertical puis un monochromateur qui va permettre de choisir l'énergie de travail (proche du seuil atomique de l'atome sondé) enfin un miroir focalise le faisceau. Le monochromateur est composé d'un cristal Si (111) et d'un cristal Si (220) permettant de travailler dans une gamme d'énergie des rayons X « dur » comprise entre 3,5 keV et 36 keV. L'énergie du monochromateur a été calibrée à l'aide de références métalliques de Fer au seuil K (7112 eV) pour sonder le seuil K du Cobalt (7 709 eV) et de Molybdène au seuil K (20000) eV pour sonder le seuil L<sub>II</sub> (20 948 eV) et L<sub>III</sub> (17 166 eV) de l'uranium. Les analyses XAS ont été réalisées avec un faisceau focalisé d'une taille de 300×300  $\mu$ m.

Les porte-échantillons ont été positionnés à 45° par rapport au faisceau incident et au détecteur X. Ils ont été montés sur une table optique munie d'une base motorisée permettant des déplacements micrométriques (~100  $\mu$ m) multiaxiales. Le signal XAS a été enregistré à l'aide d'un germanium de haute précision (HPGe) disposant de 13 éléments ou d'un détecteur silicium à dérive (SDD) à 4 éléments (Vortex).

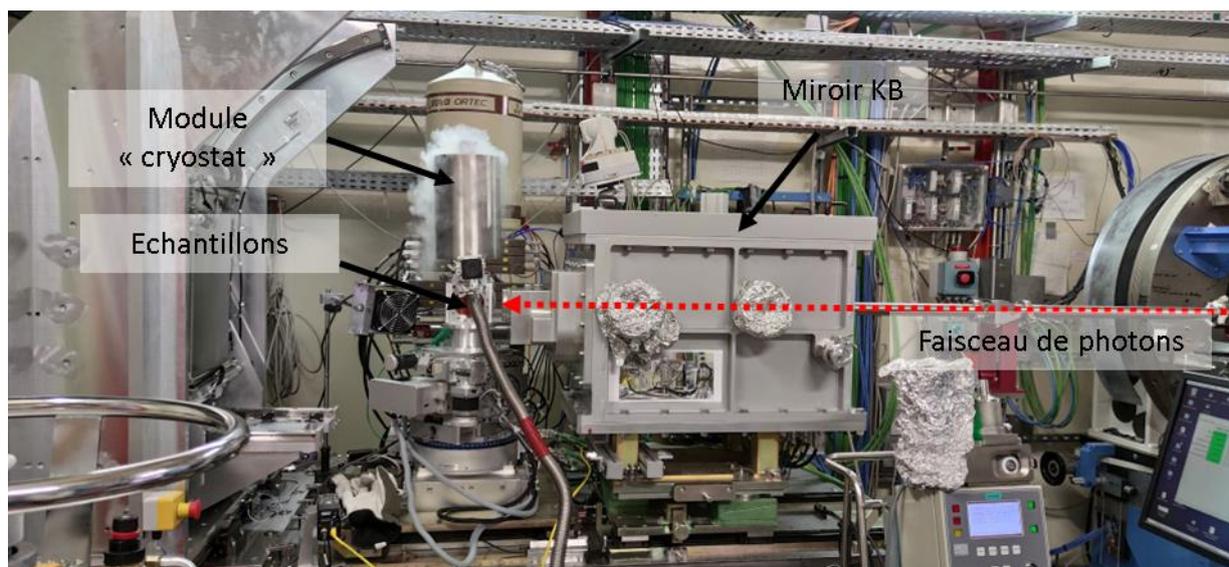


Figure 9. Photographie de la cabane d'expérience avec le montage « cryostat ».

iii. Préparation des échantillons

Les échantillons ont été placés dans des porte-échantillons en Teflon disposant de trois alvéoles, le dispositif peut être scellé par des fenêtres en Kapton® (50  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) permettant un confinement. L'analyse des échantillons peut être effectuée sous forme solide (pastilles) et liquide. Ces porte-échantillons peuvent être placés dans un cadre dont les fenêtres en Kapton® assurent le deuxième confinement.

Les pastilles ont été réalisées avec du polyéthylène afin d'avoir un support solide sur lequel ont été déposés les échantillons. Les tissus mous des moules ont été préparés en les broyant à l'aide d'un mortier et d'un pilon puis le mélange a été ajouté de manière homogène sur le dessus de la pastille. Les fils de byssus sont très résistants aux contraintes mécaniques, nous n'avons pas réussi à obtenir une poudre homogène. Les fils ont été réduits à l'aide d'un mortier et d'un pilon dans de l'azote liquide pour réduire leurs élasticités.

Les analyses XAS des échantillons contaminés avec de l'uranium ont été réalisées à l'aide d'un porte-échantillons à double confinement.

Les analyses des solutions de cobalt ont été effectuées à l'aide d'un porte-échantillons spécifique permettant de faire des mesures à très basse température ( $-167^{\circ}\text{C}$ ). Dans le cadre des analyses XAS de la glande digestive de moule exposé dans de l'eau de mer dopée au cobalt,

nous avons utilisé les fractions P1 (culot) et S1 (surnageant), obtenue à la suite d'une centrifugation à  $1500 \times g$ .

Les références de cobalamine ont été préparées dans des conditions similaires à celles décrites par Schrapers et ses collaborateurs (Schrapers et al., 2016). Une solution de cobalamine ( $\text{Cbl}^{\text{ox}}$ ) (5 mM) a été préparée par sa dissolution dans un tampon de 20 mM TRIS-HCl (pH 7,6). La réduction de la cobalamine ( $\text{Cbl}^{\text{red}}$ ) a été effectuée par l'ajout de sodium dithionite (100 mM) à la solution de  $\text{Cbl}^{\text{ox}}$ .

Le traitement des données a été réalisé en utilisant le code ATHENA du logiciel DEMETER 0.9.26. (Ravel and Newville, 2005). Le code ARTEMIS intégrant le code Feff7 a été utilisé pour ajuster les données EXAFS. Le signal EXAFS a été ajusté dans l'espace R après transformation de Fourier en utilisant une fenêtre de Hanning en pondéré en  $k^1$  et  $k^2$ . Dans tous les ajustements, un seul facteur d'amplitude global  $S_0^2$  et un seul facteur de seuil d'énergie  $E_0$  ont été considérés pour toutes les contributions. Le facteur R d'accord (en %) a été fourni comme indication de la qualité de l'ajustement.

### **b) Spectrofluorométrie laser à résolution temporelle (SLRT)**

#### **i. Principe**

La spectrofluorométrie laser à résolution temporelle (SLRT) est une technique basée sur l'excitation d'un atome et la mesure de son spectre de fluorescence. Cette technique s'avère particulièrement intéressante pour l'étude des lanthanides et des actinides fluorescents (Moulin et al., 1998, 1997).

Une molécule peut absorber un photon, ce qui excite l'un de ses électrons de l'atome fluorescent si l'énergie permet une transition électronique. La relaxation de cet électron pour revenir à son état fondamental peut se faire de manière radiative, induisant ainsi l'émission d'une luminescence, qu'il s'agisse de fluorescence ou de phosphorescence. La principale différence entre la fluorescence et la phosphorescence réside dans le temps retardé de l'émission d'un photon pour cette dernière. Dans le contexte de l'analyse des actinides et des lanthanides, les transitions peuvent impliquer plusieurs niveaux vibrationnels, ce qui se traduit par des pics de fluorescence dans le spectre (*e.g.*,  $\text{UO}_2^{2+}$ ).

La SLRT permet d'accéder au temps de vie de l'espèce ( $\tau$ ), qui dépend de l'environnement (spéciation) de la molécule, et se définit par  $\tau = \frac{1}{k}$ , où  $k$  est une constante de vitesse. Le déclin de la fluorescence lors de l'excitation d'une molécule par un laser pulsé est décrit par  $I = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$  avec  $I_0$  l'intensité de fluorescence initiale,  $t$  le temps par rapport à l'impulsion du laser.

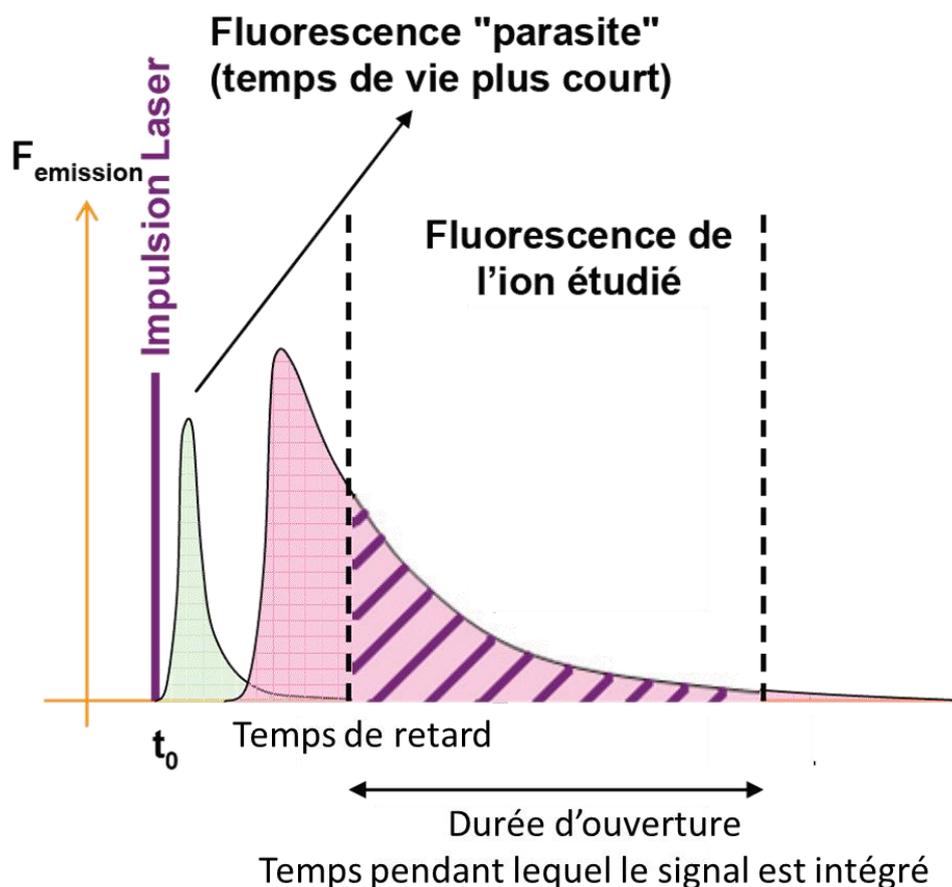


Figure 10. Élimination d'une fluorescence parasite par résolution temporelle (Modifié d'après: Lourenço, 2007).

Lors de l'analyse de la molécule fluorescente, il est possible que d'autres molécules organiques ou inorganiques présentes dans le milieu (solide ou liquide) émettent un signal de fluorescence généralement très bref (0,01 à 1  $\mu\text{s}$ ). Lorsque les temps de fluorescences entre la molécule d'intérêt et la molécule « parasite » sont suffisamment distincts, il est possible d'obtenir une résolution temporelle des spectres de fluorescence. Pour ce faire, il suffit d'acquérir le spectre de fluorescence de la molécule d'intérêt après un laps de temps permettant

la décroissance de la fluorescence et de s'affranchir de la contribution de l'espèce parasite (Figure 10).

Parmi les nombreux avantages de cette technique, on peut évoquer sa sensibilité ( $[U] = 10^{-12}M$ ), une triple sélectivité (excitation, émission, résolution temporelle), la préparation des échantillons (solide ou liquide), le caractère non destructif, la rapidité de l'analyse (quelques minutes) (Moulin et al., 1997).

### ii. Préparation des échantillons

Les glandes digestives analysées proviennent de moules exposées à une concentration d' $U = 5 \times 10^{-5} M$  pendant 12 jours. Ces glandes digestives ont été prélevées par dissections et conservées à  $-80^{\circ}C$  jusqu'à leur analyse. Pour réaliser les mesures, les organes ont été homogénéisés à l'aide d'un broyeur de tissus de type Potter-Elvehjem, en ajoutant de l'eau Milli-Q (1:1 ; v/v). Ensuite, la mixture a été analysée dans des cuves en quartz. Le montage expérimental est présenté en Annexe Figure 90.

## **3) Localisation des métaux dans les échantillons de moules, imagerie**

### **a) Préparation des échantillons**

#### i. Résine époxy

La résine est composée d'un mélange de NMA (durcisseur : méthylmadic anhydride), de DDSA (durcisseur : 2-dodécényl succinic anhydride), d'AGAR 100 (résine base) incubé 10 minutes à l'étuve à  $60^{\circ}C$  pour diminuer la viscosité des produits et faciliter le mélange. Puis le mélange a été agité 20 minutes et le DMAE (accélérateur : 2-diméthylaminoéthanol) a été ajouté sous agitation pendant 10 minutes.

#### ii. Inclusion des échantillons en résine

La description générale ci-après présente la préparation des échantillons d'organes (de quelques millimètres cubes). Le protocole pour l'inclusion en résine des moules entières est identique pendant les temps sont allongés.

Les échantillons fraîchement disséqués ont été fixés dans une solution d'eau de mer avec 2,5 % de glutaraldéhyde. Ensuite, le fixateur a été rincé et l'échantillon déshydraté plusieurs fois avec de l'acétone. Une substitution en résine époxy a été réalisée avec la résine diluée à 50 % dans l'acétone puis plusieurs bains de résine pure. La polymérisation de la résine s'effectue à 60°C pendant plusieurs jours.

On notera également que des analyses (ICP-MS) ont été effectuées pour mesurer le cobalt ou l'uranium (en fonction des contaminations réalisées) pour déterminer leur diffusion dans l'acétone. L'acétone a été évaporée à sec puis 5 mL d'une solution d'acide nitrique 5 % (HNO<sub>3</sub>) (avec standard interne) a été ajoutée pour solubiliser le résidu. Aucune trace d'uranium ou de cobalt n'a été détectée lors des mesures.

Les colorations histologiques ont été obtenues en laissant les coupes quelques minutes dans un bain de bleu de méthylène et azur II (v/v) qui permet d'avoir une coloration bleue des tissus.

### **b) La spectrométrie de fluorescence des rayons X ( $\mu$ -XRF)**

Le principe et le montage général ont été décrits précédemment (partie « Absorption des rayons X »).

Au niveau de la cabane d'expérience, un système optique appelé KB (Kirkpatrick-Baez) a été ajouté ce qui permet une microfocalisation du faisceau et d'avoir un flux de photons plus important en microfaisceau comparé à un faisceau collimaté en amont. Le KB est situé en amont du poste d'analyse permet d'effectuer les cartographies  $\mu$ -XRF avec un faisceau d'une taille inférieure à 30×30  $\mu$ m. Deux miroirs en rhodium assurent la focalisation du faisceau verticalement puis horizontalement.

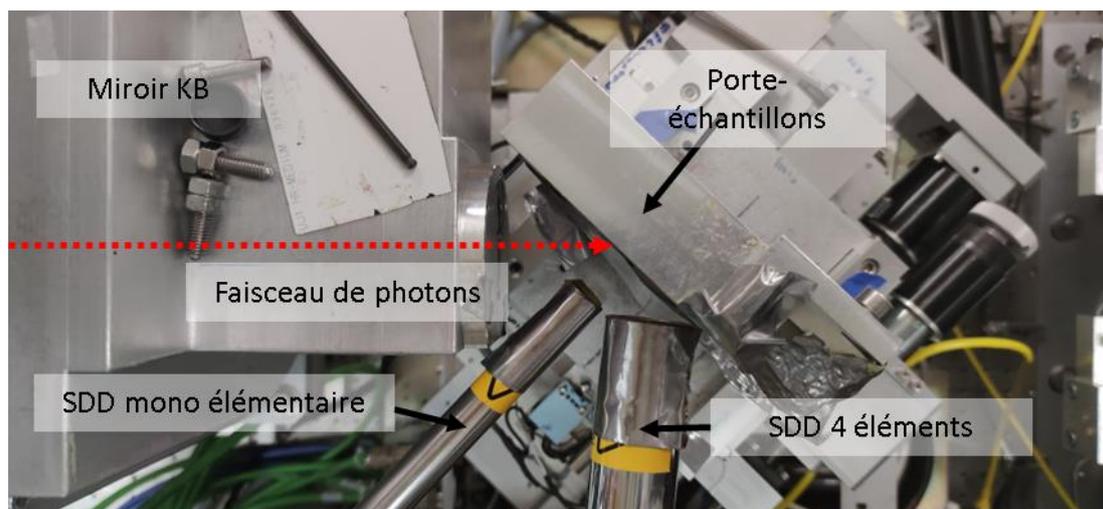


Figure 11. Photographie du montage expérimental pour l'analyse de l'uranium en  $\mu$ -XRF.

Les porte-échantillons ont été positionnés à  $45^\circ$  par rapport au faisceau incident et au détecteur X. Ils ont été montés sur une table optique munie d'une base motorisée permettant des déplacements micrométriques avec une faible amplitude. Les cartographies ont été effectuées à l'aide du mode *flyscan* ce qui permet un mouvement continu des moteurs et une diminution des temps d'acquisition (Leclercq et al., 2015). L'acquisition du signal de fluorescence X a été réalisée à l'aide d'un détecteur silicium à dérive (SDD) à 4 éléments (Vortex) ou/et un détecteur SDD mono-élémentaire (Vortex) suivant les analyses effectuées et l'élément analysé.

Les coupes des échantillons pour les mesures en imageries de fluorescence X ont été obtenues à l'aide d'une microtrancheuse de précision (Mecatome T205, PRESI). Les échantillons ont été placés dans des porte-échantillons dédiés (Annexe Figure 91). Les analyses  $\mu$ -XRF du cobalt ont été effectuées à l'aide d'un « support roue » qui a été développé au cours de la thèse, permettant une diminution des effets de parallaxes. Les analyses  $\mu$ -XRF de l'uranium ont été effectuées à l'aide d'un porte-échantillon à double confinement (Annexe Figure 91). Dans la configuration utilisée, les éléments (e.g., Ca, Na) avec des seuils d'absorption inférieurs à 5000 eV sont difficilement observables en raison d'une atténuation de fraction transmise due à l'air, la résine et le confinement des échantillons.

Les cartographies ont été traitées à l'aide du logiciel PyMCA (Laclavetine, 2015) et d'Origin (Pro).

### c) Spectrométrie de masse à ions secondaires (SIMS)

#### i. Principe

Le SIMS est une technique dite destructive, car un faisceau d'ions primaires est accéléré sous vide et bombardé vers la surface de l'échantillon provoquant des collisions en cascades. Ces collisions entraînent l'éjection et l'ionisation d'atomes, formant ce que l'on appelle des ions secondaires, à la surface de l'échantillon. Ces ions secondaires sont collectés dans un champ électrique, puis séparés dans un spectromètre de masse en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ) puis sont analysés au par un détecteur.

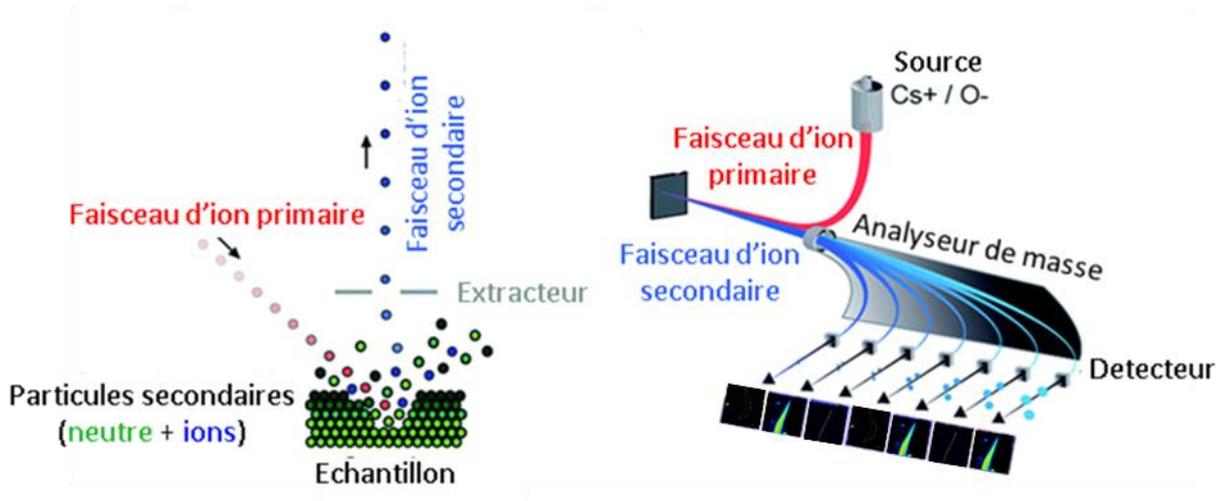


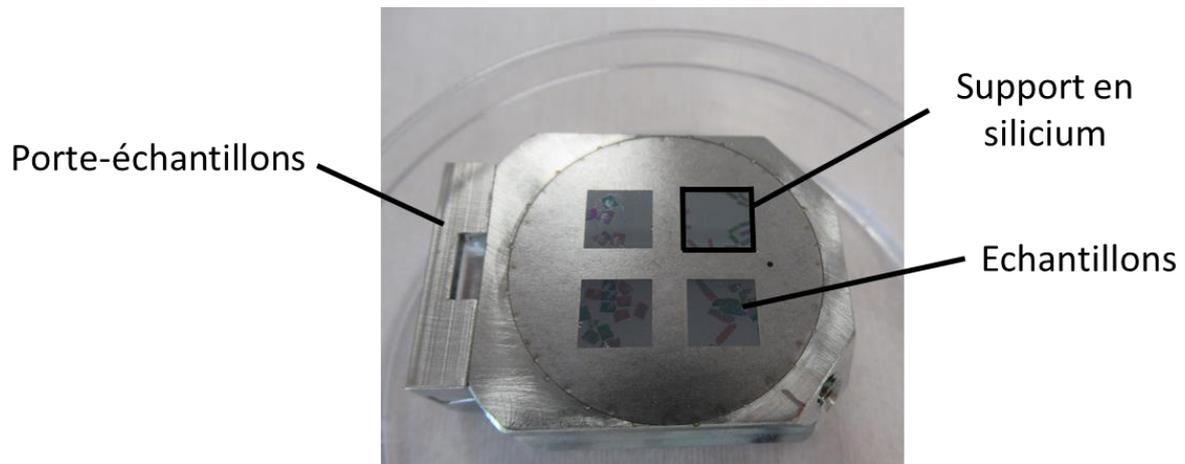
Figure 12. Principe de fonctionnement d'un SIMS et de la collecte des ions (Modifié d'après: Agüi-Gonzalez et al., 2019).

Le faisceau primaire peut être focalisé pour atteindre une taille de sonde inférieure au micromètre en mode imagerie. Le faisceau balaye ensuite la surface de l'échantillon, permettant ainsi l'acquisition d'une image ionique en reliant la position de la sonde aux informations obtenues au niveau du détecteur. Cette technique offre la possibilité d'analyser la surface d'un échantillon avec une grande sensibilité isotopique, pouvant détecter des concentrations aussi faibles que quelques particules par million. Un schéma détaillant le principe du SIMS est disponible Figure 12.

Le SIMS à large géométrie (LG-SIMS) a une résolution en masse bien supérieure à un SIMS à petite géométrie (SG-SIMS) ce qui lui permet de s'affranchir d'interférences en ayant une meilleure résolution isotopique. Les expériences SIMS ont été réalisées sur différents appareils suivant le métal analysé (uranium ou cobalt) et ont nécessité un test de faisabilité. Les échantillons d'uranium ont été analysés sur un SG-SIMS 7f (Cameca) sur la plateforme PATERSON (plateforme analytique de spectrométrie de masse commune aux pôles de l'Environnement et de la Santé de l'Institut de Radioprotection et Sûreté Nucléaire). Les échantillons de cobalt sur un LG-SIMS 1300-HR<sup>3</sup> (Cameca).

La résolution nécessaire pour différencier deux masses ( $M_1$  et  $M_2$ ) est définie par la formule suivante :  $\frac{M_1}{\Delta M}$  avec  $\Delta M = M_1 - M_2$

ii. Préparation des échantillons



*Figure 13. Photographie du porte-échantillon et des supports en siliciums pour les analyses SIMS.*

Les échantillons contenant les organes d'intérêt ont été inclus en résine puis coupés à l'aide d'un microtome en tranche de 100-150 nm d'épaisseur. Les coupes ont été déposées sur des plaques de siliciums pures (cobalt et uranium) (Figure 13) lors des tests de faisabilité puis d'autres échantillons ont été déposés sur des disques en carbone (uniquement pour le cobalt). En raison de la source  $O_2^+$  utilisée des éléments tels que le C, S, O n'ont pas pu être analysés. En effet, ces éléments sont ionisés avec une source  $Cs^+$ .

Le Tableau 3 décrit les conditions expérimentales d'analyses utilisées avec le LG-SIMS et le SG-SIMS 7f.

*Tableau 3. Conditions expérimentales d'analyses utilisées avec le LG-SIMS et le SG-SIMS 7f.*

<b>Instrument</b>	<b>LG-SIMS</b>	<b>SG-SIMS 7f</b>
<b>Faisceau d'ions primaires</b>	O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	O <sub>2</sub> <sup>+</sup>
<b>Énergie du faisceau primaire</b>	10000 eV	10000 eV
<b>Intensité du faisceau primaire</b>	10 - 100- 500 pA	10 nA
<b>Énergie du faisceau secondaire</b>	5000 eV	5000 eV
<b>Raster du faisceau primaire (µm<sup>2</sup>)</b>	20 - 50 – 100 - 250	150
<b>Résolution en masse</b>	M/ΔM= 4000	M/ΔM= 300

#### Échantillons cobalt

Ce travail a permis le développement d'une méthode d'analyse avec des échantillons biologiques sur le LG-SIMS, qui n'avait pas été optimisée pour obtenir des images ioniques dans ce type d'échantillon. L'analyse en mode imagerie avec le cobalt n'avait jamais été réalisée auparavant à l'aide de cet instrument.

Le pic de l'interférence liée au <sup>29</sup>Si<sup>30</sup>Si (M=59) est très intense à cause de l'utilisation d'un support en silicium pur ; cette interférence a un ΔM de seulement 0.017 (u) avec le <sup>59</sup>Co ce qui nécessite une résolution supérieure à 3500 (u). La haute résolution du LG-SIMS permet de discriminer le pic de l'interférence avec celui du <sup>59</sup>Co cependant les pieds de pic se superposent, réduisant la fenêtre de masse intégrable pour l'acquisition de l'image cobalt (Figure 14). Les disques de carbones permettent de travailler sans la présence de cette

interférence liée au support de silicium. Des spectres de masse du  $^{59}\text{Co}$  ont été réalisés sur des échantillons contaminés ainsi que sur des échantillons contrôles.

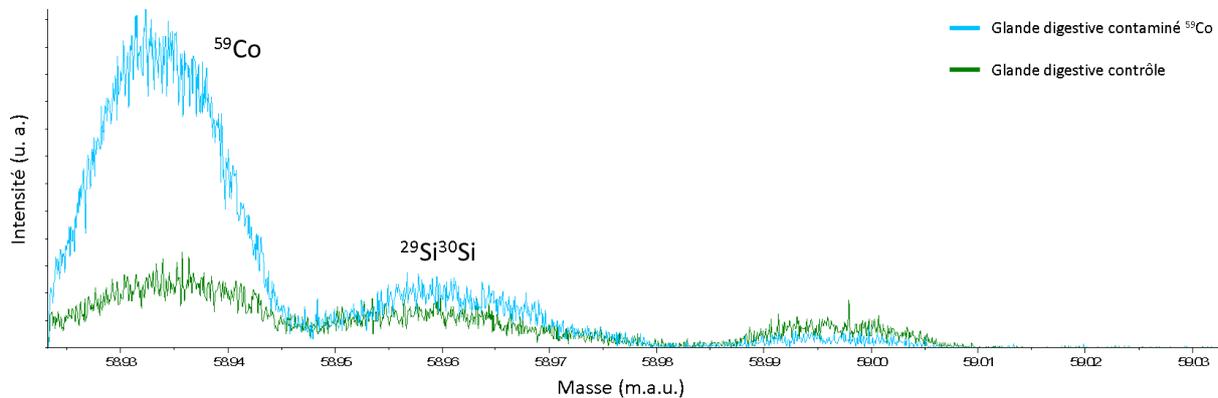


Figure 14. Spectre de masse de la glande digestive autour de la masse du  $^{59}\text{Co}$  réalisé avec un support en silicium.

Échantillons d'uranium :

L'uranium naturel que nous avons utilisé pour les contaminations est composé d'un mélange isotopique et l' $^{238}\text{U}$  est l'isotope le plus abondant (99 %). Les images ioniques de l'uranium et le spectre de masse de l'uranium ont été effectués avec l' $^{238}\text{U}$ . Le spectre de masse ne présente pas d'interférences avec la résolution en masse de 300 ( $M/\Delta M$ ) qui a été utilisée pour les analyses.

#### d) Analyse Émission de rayons X induite par des particules (PIXE)

##### i. Principe

Le PIXE (Particule induced X-ray Emission) est une méthode qui repose sur l'émission de rayons X. Les analyses ont été effectuées sur la plateforme AIFIRA (Applications Interdisciplinaires des Faisceaux d'Ions en Région Aquitaine) qui dispose de 5 lignes de lumière (Figure 15). Un accélérateur de particules (Singletron<sup>TM</sup> 3.5 MV) assure la stabilité et la résolution du faisceau d'ions des ions produits (les protons ( $\text{H}^+$ ), des deutons ( $\text{D}^+$ ), Hélium ( $\text{He}^+$ )) (Barberet et al., 2021). Le long des lignes de lumières, des collimateurs et des lentilles magnétiques assurent la mise en forme du faisceau.

La ligne de lumière microfaisceau que nous avons utilisée permet de faire de l'imagerie à l'échelle micrométrique avec un faisceau d'un diamètre compris entre 0,3  $\mu\text{m}$  et 1  $\mu\text{m}$ . La

chambre d'analyse (sous vide) est équipée de plusieurs détecteurs, deux détecteurs Si (Li) permettent l'acquisition de la fluorescence X, un détecteur mesure les particules rétrodiffusées et un détecteur d'électron secondaire. Les données ont été traitées à l'aide du logiciel ImageJ et d'un plugiciel développé par les membres de la plateforme AIFIRA (Devès et al., 2015).

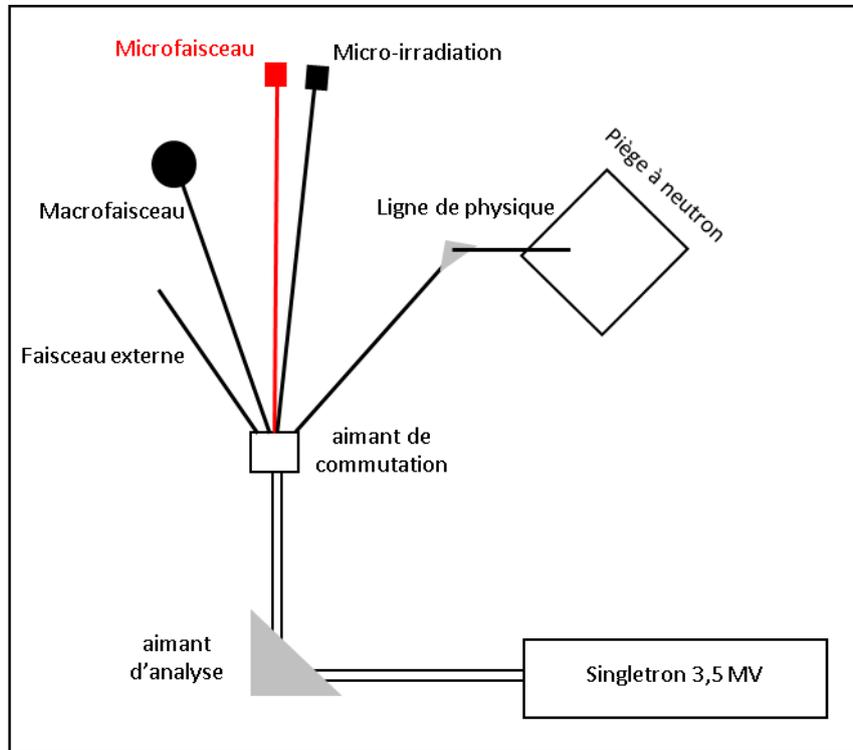


Figure 15. Vue schématique de la plateforme AIFIRA et des 5 lignes de lumières.

L'échantillon est placé sous vide et bombardé par un faisceau de particules chargées à haute énergie collimaté, ce qui provoque l'ionisation des atomes de l'échantillon. Comme décrit précédemment l'éjection d'un électron du cortège électronique, provoque une lacune dans les couches électroniques qui peut être comblée par différents mécanismes (*e.g.*, Fluorescence X). Un détecteur permet la mesure de l'énergie du rayon X et l'identification de l'élément. Le PIXE a plusieurs avantages, l'analyse des métaux de transition se situe dans sa plage d'énergie optimale ( $\sim 3\text{MeV}$ ) ce qui assure une limite de détection basse (partie par million), la taille de la sonde est de l'ordre de quelques micromètres, la méthode est non destructive et elle permet une analyse multi-élémentaire.

### ii. Préparation des échantillons

Les échantillons de la glande digestive et de byssus ont été inclus en résine puis des coupes de 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur ont été réalisés. L'analyse PIXE a été effectuée sur un porte-échantillon en PEEK, les échantillons sont déposés sur une fenêtre en polycarbonate. La Figure 16 présente le montage expérimental utilisé lors de l'analyse des échantillons. La résolution des images est de  $256 \times 256$  pixels

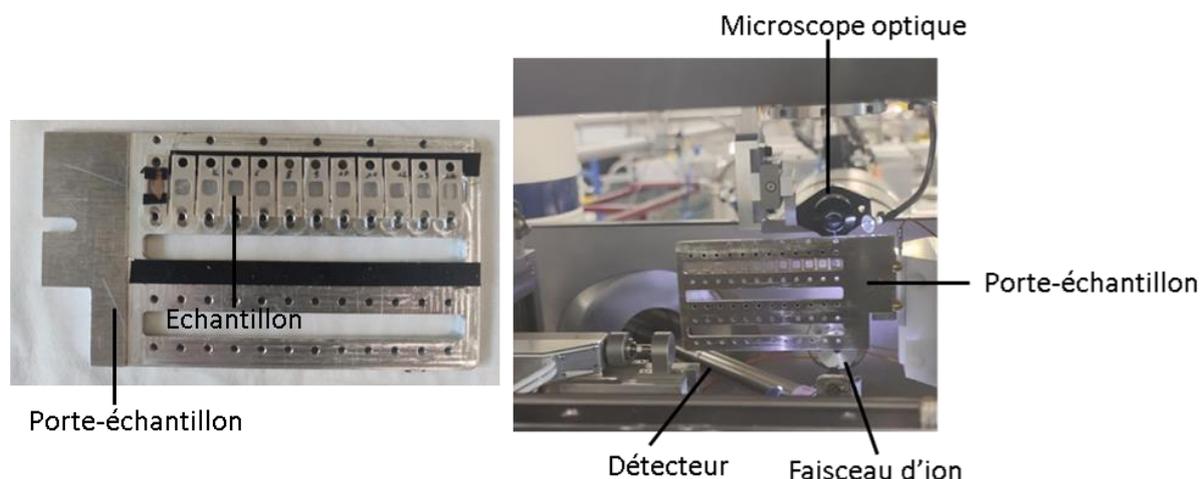


Figure 16. Photographie du montage expérimental de la chambre sous vide et du porte-échantillon.

## 4) Extraction de protéines

### a) Estimation de la concentration : Méthode de Bradford

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique, permettant de connaître la teneur totale en protéines. Cette méthode se base sur le changement d'absorbance, dû à la capacité de fixation des protéines par le bleu de Coomassie G-250. Le colorant possède une affinité pour les acides aminés basiques et aromatiques (*e.g.*, arginine, histidine, lysine) et ce qui entraîne un changement de son maximum d'absorption. Le domaine de linéarité est typiquement situé entre  $125\text{-}1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . La calibration de la méthode de Bradford a été réalisée en utilisant de l'albumine provenant de sérum bovin (BSA) comme substance de référence.

Pour réaliser les mesures, il est préférable d'utiliser des cuvettes en plastique. Dans une cuvette de 1 mL, la solution du colorant (1 mL) est ajoutée avec le standard (20  $\mu\text{L}$ ), le mélange

est laissé au moins 5 minutes à température ambiante avant la mesure à 595 nm où l'absorption est maximale.

Les spectres d'absorption UV-Visible des échantillons ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Vis Agilent Cary 60 à faisceau unique en PMMA de petit volume.

### **b) Chromatographie d'affinité avec métal immobilisé**

Les métallothionéines sont des protéines cruciales chez les mollusques, car elles facilitent la détoxification des métaux en les liant grâce à leurs nombreuses fonctions cystéines. Honda et ses collaborateurs ont décrit une méthode de purification des métallothionéines en une seule étape, ce qui réduit considérablement le temps nécessaire, la perte de masse protéique lors des différentes étapes et l'équipement requis (Honda et al., 2005). Cette méthode repose sur l'immobilisation de métaux de transition tels que  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$  sur une colonne chélatante spécifique (HiTrap™ Chélatante 1 mL) afin de sélectionner les protéines capables de lier ces métaux. Cependant, une limitation de cette méthode réside dans la possible perte de métallothionéines qui pourraient retenir les ions métalliques de la colonne.

Les glandes digestives ont été extraites de moules non contaminées provenant de Villefranche-sur-Mer. Ces organes ont été homogénéisés à l'aide d'un broyeur de tissus de type Potter-Elvehjem équipé d'un piston en Teflon dans une solution tampon à 4°C. Ensuite, la mixture a subi dix cycles de sonication (20 % ; 30 s ON/OFF) dans un bain de glace. La solution a été centrifugée à  $15\,000 \times g$  pendant 90 minutes à 4°C, puis le surnageant a été ajouté à la chromatographie d'affinité.

La colonne a été préparée conformément aux instructions du fabricant. Une solution de 0,1 M de  $\text{NiSO}_4$  (0,5 mL) a été utilisée pour charger la colonne, puis elle a été rincée avec de l'eau distillée (5 mL). L'ajout de la solution tampon (10 mL) a permis d'équilibrer la colonne. Puis l'échantillon a été ajouté, la colonne a été lavée à l'aide de la solution tampon (10 mL). Pour terminer, une solution d'élution (10 mL) a été ajoutée pour créer un gradient linéaire (de 0 à 100 %), et les fractions ont été collectées toutes les minutes, ce qui correspond à dix échantillons.

Les fractions ont été lavées avec la solution tampon ( $3 \times 1$  mL) en utilisant un filtre centrifuge (Amicon ultra 3 kDa 2 mL) à  $7\,500 \times g$  pendant plusieurs heures à  $4^{\circ}\text{C}$ . Ensuite, les solutions ont été concentrées pour atteindre un volume final d'environ 100-150  $\mu\text{L}$ .

La vitesse du flux des solutions passant dans la colonne a été fixée à  $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  à l'aide d'une pompe péristaltique multi-canal.

Solution tampon : 50 mM HEPES, pH 7,4 ; 0,1 mM PMSF ; 0,5 mM DTT ; 150 nM NaCl

Solution d'éluion : 50 mM HEPES, pH 7,4 ; 150 nM NaCl ; 500 nM d'imidazole

### c) **Électrophorèse des protéines**

#### i. SDS-PAGE

Le SDS-PAGE a été réalisé conformément à Laemmli (Laemmli, 1970). Les gels 4-20 % ont un domaine optimum de séparation entre 10-200 kDa. La migration a été effectuée dans un tampon 1x SDS à 200V pendant environ 45-50 min.

En résumé, 5  $\mu\text{L}$  de Tampon Laemmli, 5  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont mélangés et chauffés à  $90^{\circ}\text{C}$  pendant 5 min puis le mélange introduit dans les puits du gel d'électrophorèse.

Solution 1x SDS : 25 mM Tris, 192 mM glycine

Tampon Laemmli : 62.5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 % SDS, 25 % glycérol, 0.01 % bleu de bromophénole, 100 mM DTT

Les gels d'électrophorèse 4-20 % Criterion Tris-Cl Gel, le 2x Laemmli, le 10xTris/Glycine, SDS, le standard de protéine (10–250 kD) et la cellule d'électrophorèse proviennent de Bio-Rad.

#### ii. Coloration du gel polyacrylamide

La PAGE-SDS a été colorée avec au bleu de Coomassie selon Zehr et ses collaborateurs (Zehr et al., 1989). Le gel a été fixé et équilibré pendant au moins 1h et après 3 lavages de 10 minutes à l'eau pour éliminer l'alcool et l'acide. Le gel a été incubé dans la solution de coloration

## Chapitre 1 - Matériels et méthodes

sous agitation pendant une nuit. Pour la décoloration, le gel a été lavé plusieurs fois avec de la solution décolorante jusqu'à obtenir le fond désiré.

Solution de fixation : 40 % méthanol, 10 % acide acétique

Solution colorante : 0,025 (w/v) Bleu de Coomassie G-250, 10 % acide acétique

Solution décolorante : 10 % acide acétique

# **Chapitre 2 – Contexte général**



## I. Le milieu marin

Vu de l'espace on l'appelle la planète bleue, la Terre est composée majoritairement d'eau. La surface du globe est recouverte à 71 % d'eau, la majeure partie de cette eau est présente sous forme liquide dans les mers et océans avec plus de 97 % du volume d'eau disponible. L'autre partie de l'eau disponible est sous forme de glace, soit environ 2 %.

Les océans et mers sont différenciés de l'eau douce par leur salinité allant jusqu'à 41 g.kg<sup>-1</sup>. Les différences de salinité, de température entre les océans participent à la structure hydrographique à grande échelle et du transport de l'eau dans le globe. Les grands courants présents dans les océans sont responsables de la dispersion des substances dissoutes dans l'eau (Figure 17).

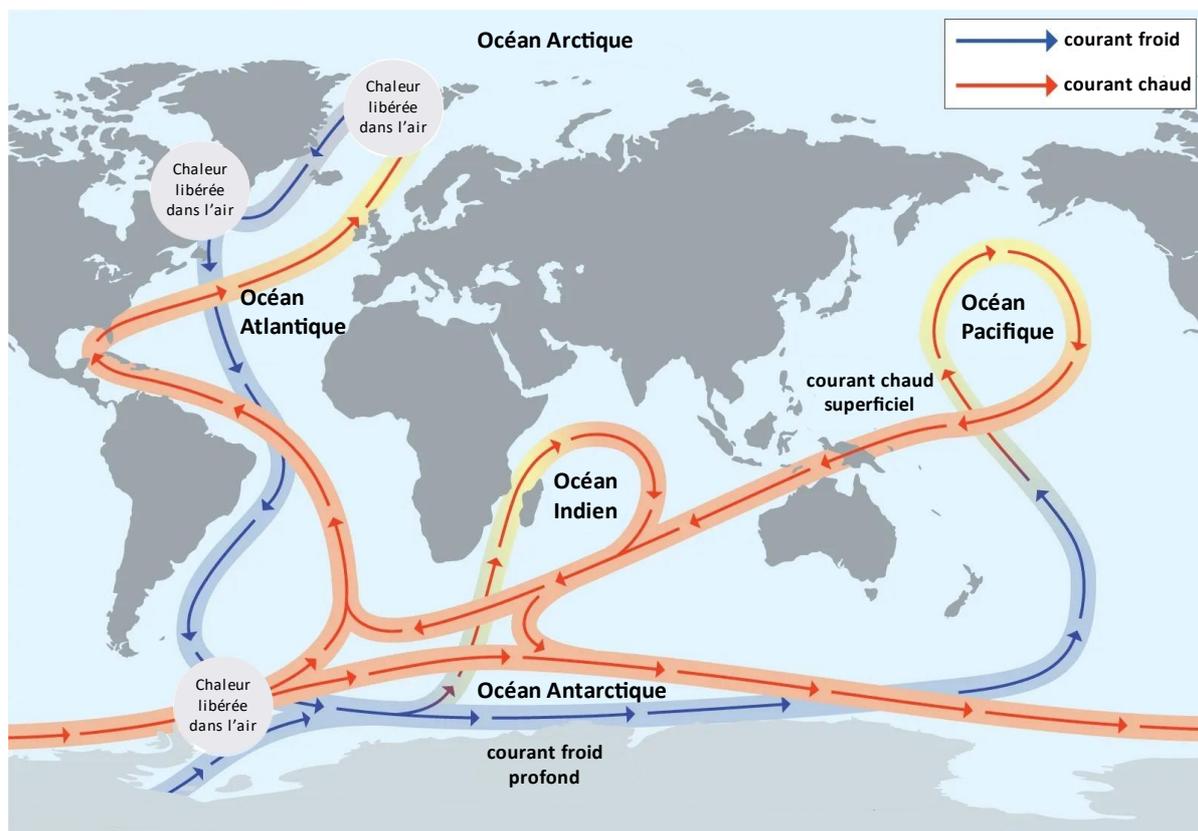


Figure 17. Simplification des courants marins à la surface des océans. (Modifié d'après : Ahlenius et al., 2007)

## Chapitre 2 – Contexte général

En moyenne la salinité des océans à l'échelle mondiale se situe à 34,72 ‰, en gramme par kilogramme ( $\text{g.kg}^{-1}$ ). De plus, 90 % des océans ont des concentrations en sels qui varie de seulement  $\pm 1,1$  % comparé à la moyenne. La proportion en sel dissous reste relativement identique dans l'eau salée, cependant la quantité en sel total y est variable. Les recherches océanographiques ont permis au 18<sup>ème</sup> siècle de décrire avec une grande précision la composition des différents éléments chimiques présents dans l'eau de mer (Marcet, 1819). Le standard IAPSO (Association pour les sciences physiques des océans) permet d'obtenir des mesures de l'eau de mer avec une référence qui définit la chlorinité égale à 19.374 ‰ soit une conductivité de  $1,0000$  ( $\text{mS.cm}^{-1}$ ), une salinité définie comme  $S = 35.000$  ‰. Les 11 éléments majoritairement présents dans l'eau de mer sont rapportés dans le Tableau 4.

*Tableau 4. Concentration des 11 constituants majoritaires à la surface des océans. (Carpenter and Manella, 1973; Culkin and Cox, 1966; Pilson, 2012; Uppström, 1974)*

	$\text{g.kg}^{-1}$	mM
$\text{Cl}^-$	19,353	559,39
$\text{Na}^+$	10,782	480,61
$\text{SO}_4^{2-}$	2,712	28,935
$\text{Mg}^{2+}$	1,284	54,13
$\text{Ca}^{2+}$	0,411	10,52
$\text{K}^+$	0,399	1046
$\text{HCO}_3^-   \text{CO}_3^{2-}   \text{CO}_2$	0,1243	–
$\text{Br}^-$	0,0673	0,863
$\text{B}(\text{OH})_3   \text{B}(\text{OH})_4^-$	0,0272	–
$\text{Sr}^{2+}$	0,0078	0,092
$\text{F}^-$	0,00130	0,070

D'autres éléments minoritaires sont présents dans l'eau de mer avec des concentrations très variables allant de quelques fmol ( $10^{-15}$  mol) (*e.g.* or, bismuth) à quelques  $\mu\text{mol}$  ( $10^{-6}$  mol) (*e.g.* lithium, silicium) par litre d'eau de mer (Pilson, 2012).

La présence de matière organique dissoute (DOM) dans l'eau salée provient majoritairement d'espèces microcellulaires telles que les phytoplanctons, les bactéries, mais également de transport provenant des fleuves. La DOM est estimée par la mesure du carbone organique dissous (DOC).

$$\frac{\text{DOM}}{\text{DOC}} = 2,2 \text{ (sans unité)}$$

La concentration du DOC est comprise entre 40 et 250  $\mu\text{M}$  dans l'eau salée. Comme pour le biote marin, la diversité de cette matière organique reflète la complexité du milieu marin (Wells and Goldberg, 1993).

Avant la convention d'Oslo en 1972 visant à limiter les rejets anthropiques dans les mers et océans, de nombreux déchets ont été déversés sans restriction. On peut citer les déchets radioactifs, des déchets industriels et chimiques qui ont été jetés au fond des océans. Concernant les déchets radioactifs immergés entre 1946 et 1982 par quatorze pays dans les océans Pacifique, Atlantique et Arctique, l'activité a été estimée à 85 000 TBq (ANDRA, 2017). Depuis 1993, l'immersion des déchets radioactifs est définitivement interdite. Les déchets aux fonds de l'océan ne sont pas destinés à être récupérés. À ce jour, bien que jugée non nécessaire par l'AIEA la France continue d'effectuer une surveillance radiologique des sites qui lui incombent.

## II. Généralités sur les radionucléides

Selon l'EPA (Environmental Protection Agency), les formes radioactives d'un élément sont appelées radionucléides. Les radionucléides peuvent être naturellement présents dans l'environnement ou produits par l'homme sous forme de produits de fissions ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{90}\text{Sr}$ ,  $^{137}\text{Cs}$ ) ou d'activation neutronique ( $^{60}\text{Co}$ ). Parmi les éléments instables, deux catégories se distinguent. Dans la première catégorie se trouvent les radioéléments qui sont des éléments chimiques dont tous les isotopes connus sont radioactifs comme l'uranium ou le plutonium.

Dans la seconde catégorie, les radionucléides sont les isotopes instables d'un élément chimique donné (e.g.  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{137}\text{Cs}$ ). On compte plus de 1 700 radionucléides pour seulement 280 nucléides stables (Figure 18).

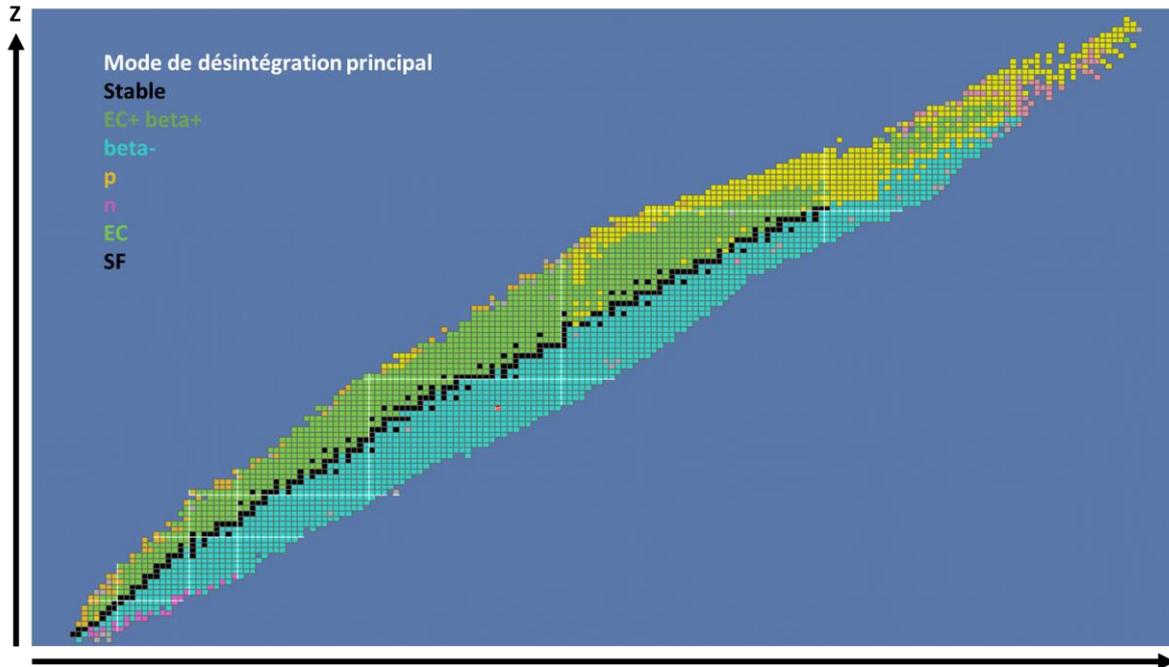


Figure 18. Diagramme de Segré ou « vallée de la stabilité » des nucléides et leur mode de désintégrations principal. (N : Neutron ; Z : Proton)  
(Modifié d'après: [www-nds.iaea.org/relnsd/vcharthtml/VChartHTML.html](http://www-nds.iaea.org/relnsd/vcharthtml/VChartHTML.html))

L'instabilité d'un radionucléide provoque la transformation spontanée de son noyau par décroissance radioactive. La désintégration radioactive est basée sur une loi statistique et peut être exprimée simplement par une relation cinétique d'ordre 1.

$$\frac{dN}{dt} = -\lambda N$$

avec N le nombre d'atomes présents,  $\lambda$  la constante radioactive ( $\text{s}^{-1}$ ) et  $t$  le temps (s). Cette loi permet de calculer de façon statistique l'activité (A) d'un élément en Bq au moment  $t$  en connaissant la population initiale  $N_0$ .

$$A = N_0 \cdot \lambda \cdot e^{-\lambda t}$$

Plusieurs unités différentes peuvent être utilisées pour quantifier la radioactivité. La première unité créée en 1910 en hommage au couple Curie fut le *Curie* (Ci). Cette unité représente le nombre de désintégrations par seconde d'un gramme de radium-226. L'unité internationale est dorénavant le *Becquerel* (Bq) qui représente le nombre de désintégrations par seconde d'une quantité de matière radioactive. La relation entre les deux unités est  $1 \text{ Bq} = 2,7 \times 10^{-11} \text{ Ci}$ .

### 1) Les radionucléides d'origine naturelle

Parmi les radionucléides naturels, on distingue les radionucléides primordiaux, c'est à dire ceux présents sur Terre depuis sa formation il y a 4,6 milliards d'années et qui ont une période radioactive suffisamment longue pour être encore observé aujourd'hui, les autres ayant disparu (Fowler, 1967). Des radionucléides avec des périodes très longues comme le  $^{40}\text{K}$  ( $t=1,28 \times 10^9$  années), le  $^{232}\text{Th}$  ( $t=1,41 \times 10^{10}$  années), le  $^{235}\text{U}$  ( $t=7,04 \times 10^8$  années), le  $^{238}\text{U}$  ( $t=4,47 \times 10^9$  années), sont considérés comme des radionucléides primordiaux. Les radionucléides naturels sont répartis en deux groupes ; ceux qui forment les trois chaînes de désintégration naturelles que sont le  $^{232}\text{Th}$ , le  $^{235}\text{U}$ , le  $^{238}\text{U}$  et qui à la suite d'une succession de désintégration alpha et bêta conduisent à la formation de plomb stable (Figure 19). L'autre partie est formée par les radionucléides primordiaux de filiation simple comme le  $^{40}\text{K}$  et le  $^{87}\text{Rb}$ .

Dans l'eau de mer, les radionucléides peuvent être utilisés comme traceurs afin de comprendre les phénomènes de diffusion océanographiques. Ainsi en utilisant la décroissance radioactive du  $^{238}\text{U}$ , il est possible de quantifier les échanges air-mer en quantifiant le  $^{222}\text{Rn}$  qui diffuse de la surface des océans vers l'atmosphère. La vitesse de sédimentation peut être estimée grâce au  $^{210}\text{Pb}$  qui est très peu soluble et réactif aux particules dans l'eau de mer. La radioactivité naturelle dans 1 kilogramme d'eau de mer est essentiellement associée au  $^{40}\text{K}$  avec une activité de  $12,39 \text{ Bq.kg}^{-1}$  ce qui représente 90 % de l'activité totale.

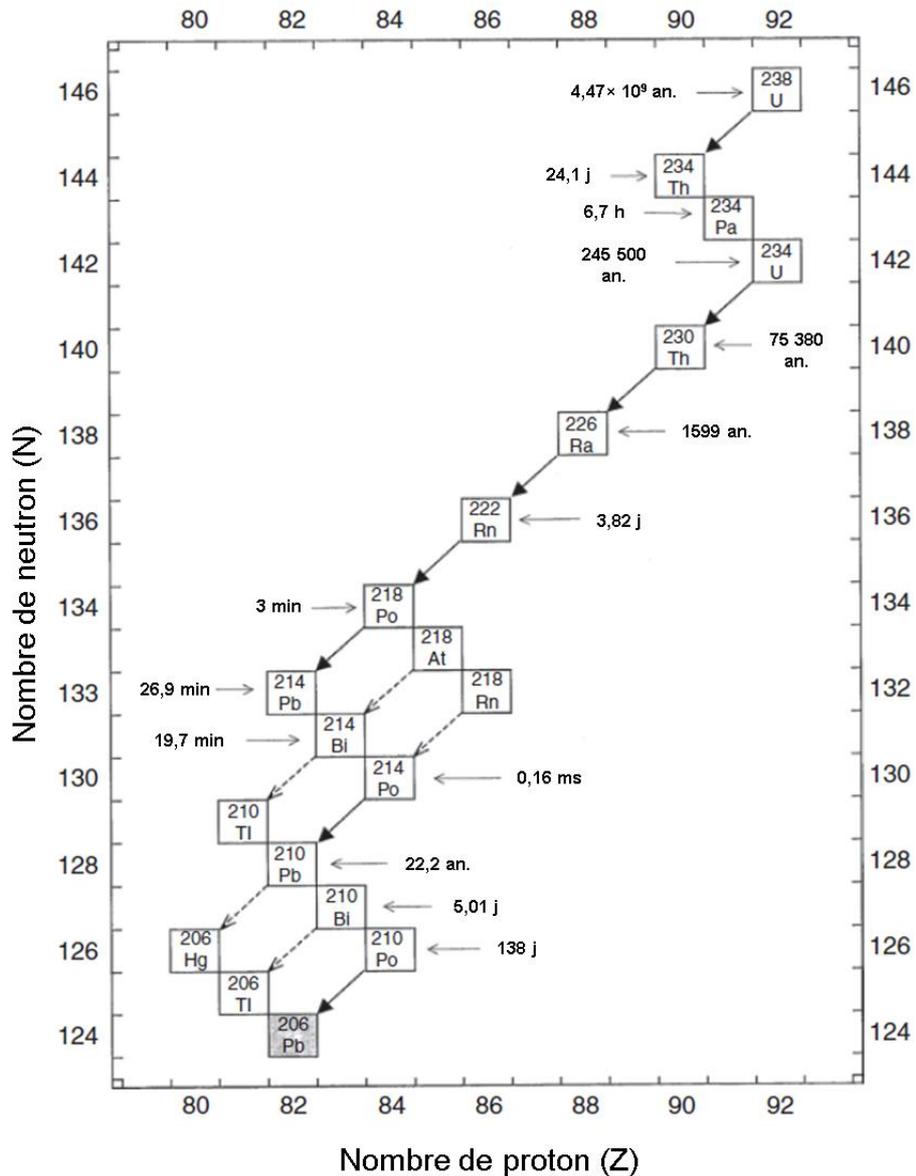


Figure 19. Chaîne de la désintégration radioactive de  $^{238}\text{U}$  vers le  $^{206}\text{Pb}$  stable (Modifié d'après: Goldstein et al., 1999)

De plus, des radionucléides cosmogéniques sont créés en permanence dans la haute atmosphère sous l'effet du rayonnement cosmique. Ces rayons cosmiques ont une énergie élevée et sont très pénétrants. L'interaction des particules primaires et des noyaux atmosphériques forme des électrons, des rayons gamma, des neutrons, des pions et des muons. Parmi les 22 radionucléides cosmogéniques identifiés, seulement deux d'entre eux impactent la dose reçue par l'Homme ( $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ). Tous ces radionucléides naturels présents sur Terre sont transportés par des phénomènes d'érosion côtière et par les fleuves (Morris and Raiswell, 2002).

## 2) Les radionucléides d'origine anthropique

Contrairement aux radionucléides naturels, les radionucléides d'origine anthropique désignent des nucléides radioactifs qui ne sont plus présents sur Terre, résultant principalement d'une période radioactive courte qui ne permet pas leur observation. Ces éléments peuvent être recréés artificiellement.

### a) Les essais nucléaires

Les nucléides artificiels présents dans l'océan ont pour origine principale les retombées atmosphériques mondiales résultant des essais d'armes nucléaires, les sources ponctuelles dérivées des déchets de réacteurs nucléaires qui pénètrent dans l'océan, ou les accidents nucléaires. Plus de 2 400 essais nucléaires ont été effectués entre 1945 et 1996, 543 d'entre eux ont été faits dans l'atmosphère avec un rendement total de 440 Mt et plus de 1 800 sont des essais nucléaires souterrains pour un rendement total de 90 Mt (Figure 20). Durant ces tests, les radionucléides produits lors des explosions ont été dispersés dans l'atmosphère et se sont répartis sur la surface du globe. Cependant il existe une disparité dans la répartition des radionucléides due à la localisation des sites de tirs principalement dans l'hémisphère nord.

Entre 1945 (premier essai atomique du Nouveau-Mexique, É.-U.) et 1963, les essais d'armes atmosphériques se sont intensifiés. En 1963, le traité d'interdiction partielle des essais nucléaires a eu pour objectif premier de lutter contre la prolifération nucléaire, mais également de limiter la propagation des contaminants radioactifs dans l'environnement et dans l'alimentation humaine. En effet, le traité a permis de limiter les essais nucléaires à des essais souterrains pour contenir la contamination dans le pays responsable de l'explosion. À la suite de ce traité, les États-Unis, l'URSS et le Royaume-Uni ont arrêté les essais atmosphériques. Ces essais ont été définitivement clôturés en 1980 par la Chine, dernier pays à avoir continué les essais atmosphériques. Les essais souterrains ont été réalisés en nombre bien supérieur aux essais atmosphériques, cependant, leur rendement total était très inférieur, respectivement 90 Mt contre 440 Mt. En 1996, un traité d'interdiction complète des essais nucléaires a été formulé, marquant la fin des essais en France et en Chine (Figure 20). Le texte de l'ONU n'a pas été ratifié par l'ensemble des puissances nucléaires (*e.g.* États-Unis, Chine) et certains pays

qui continuent les essais souterrains ou sont suspectés de le faire ne l'ont ni signé, ni ratifié (e.g. Inde, Pakistan, République Populaire Démocratique de Corée).

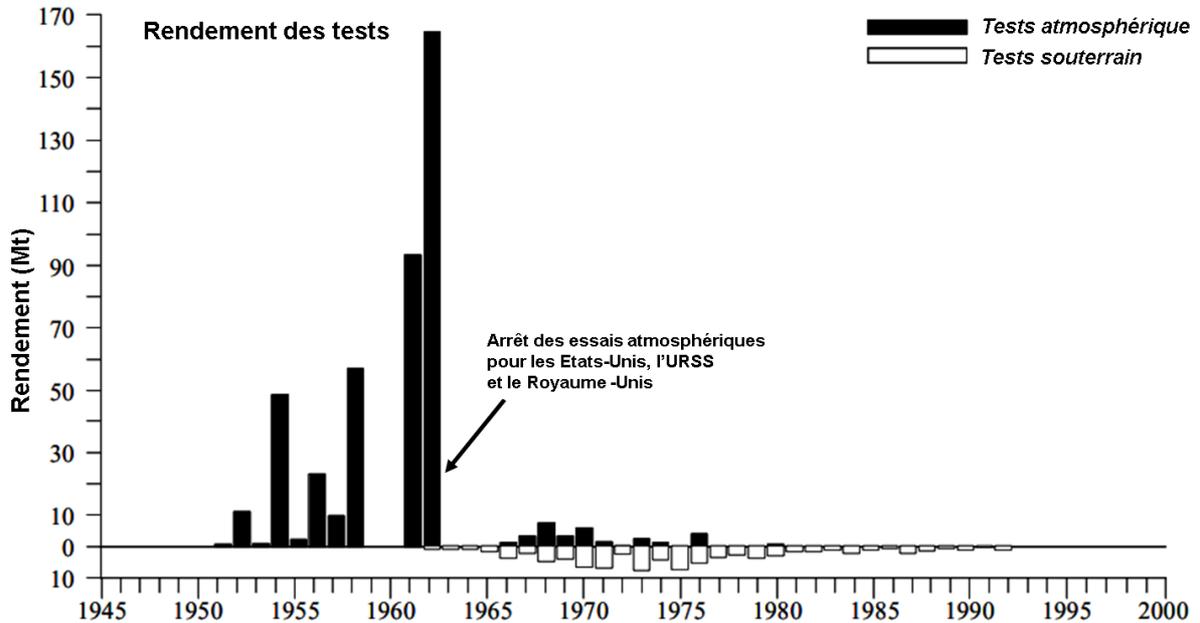


Figure 20. Essais d'armes nucléaires atmosphérique et souterraine (Modifié d'après: UNSCEAR, 2012)

Le cumul des dépôts de radionucléides à l'échelle mondiale a atteint un maximum de 460 PBq entre 1967 et 1972 et se situe en dessous de 250 PBq de nos jours (par décroissance). La Figure 21 montre la densité de dépôt cumulé mondial pour les radionucléides majoritaires. Certains radionucléides avec des demi-vies courtes sont présents de nos jours en quantité résiduelle négligeable tels que le  $^{95}\text{Zr}$  ( $t=64,02$  j), le  $^{106}\text{Ru}$  ( $t=373.6$  j) ou le  $^{144}\text{Ce}$  ( $t=284,9$  j). De nos jours l'activité est principalement due au  $^{90}\text{Sr}$  ( $t=28,78$  an.), au  $^{137}\text{Cs}$  ( $t=30,07$  an.) et aux actinides  $^{241}\text{Am}$  ( $t=432,7$  an.),  $^{239,240}\text{Pu}$  ( $t=24\ 110$  an. ;  $t=6\ 563$  an.).

Il est également à noter qu'en 1964 un satellite fonctionnant avec un générateur SNAP-9A au plutonium n'a pas pu atteindre son orbite et s'est désintégré dans l'atmosphère lors de sa chute. Les quelque 900 grammes de plutonium présents ont été dispersés, soit environ 100 TBq, en majorité dans l'hémisphère Sud (Atwood, 2010).

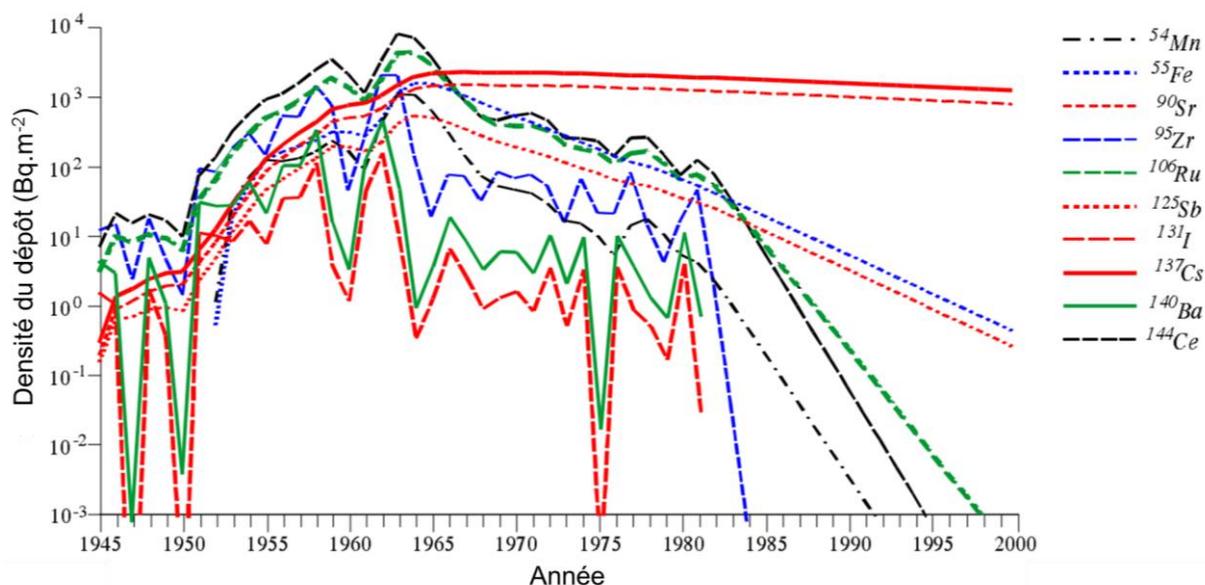


Figure 21. Densité de dépôt mondial cumulé global (pondérée par la population mondiale) de radionucléides produits lors d'essais atmosphériques. (Modifié d'après: UNSCEAR, 2012)

## b) Rejet par l'industrie nucléaire

La grande majorité des radionucléides présents dans l'environnement en raison de l'activité industrielle nucléaire sont similaires à ceux provenant des essais nucléaires. Le retraitement du combustible usagé est l'une des sources de rejets de radionucléides dans l'environnement, en particulier dans l'eau de mer. Les usines de retraitement les plus importantes se situent à Sellafield au Royaume-Uni, La Hague en France et Tokai au Japon. Le rejet d'effluents liquides provenant de l'usine de Sellafield a participé à la dispersion de radionucléides en mer d'Irlande, en mer du Nord et dans l'océan atlantique (Vintró et al., 2000). Dans les années 70, cette usine a rejeté du  $^{137}\text{Cs}$ , ainsi que du  $^{238,239,240}\text{Pu}$ , du  $^{241}\text{Am}$  et du  $^{99}\text{Tc}$  qui ont été détectés dans l'océan Atlantique et l'océan arctique (Aarkrog, 2003). Des prélèvements d'eau de mer et la prise en compte de différents facteurs tel que les courants ont permis de modéliser un profil de dispersion provenant de l'usine de Sellafield pour le  $^{137}\text{Cs}$  (Baxter et al., 1979; Jefferies et al., 1973; Mauchline, 1980; McKinley et al., 1981).

D'autres produits de fissions moins solubles dans l'eau de mer comme le plutonium ou l'américium ont été retrouvés dans les sédiments notamment en mer d'Irlande. Entre 1970 et 1998, plus de 38 000 TBq de  $^{137}\text{Cs}$  ont ainsi été rejetés dans l'eau de mer, soit 40 fois plus que l'usine de La Hague pour la même période (Tableau 5).

*Tableau 5. Rejets radioactifs des usines de traitement du combustible nucléaire usé de Sellafield et La Hague entre 1970 et 1998.(Aarkrog, 2003)*

<b>Usine de traitement</b>	<b><sup>137</sup>Cs (TBq)</b>	<b><sup>90</sup>Sr (TBq)</b>
La Hague	961	1 106
SellaField	38 837	5 528
Total	39 798	6 634

En 2003, les rejets en <sup>137</sup>Cs étaient de 0,76 TBq à l’usine de La Hague et 6,24 TBq de Sellafield, soit bien inférieurs aux pics de rejet de 243 TBq et 5 230 TBq respectivement dans les années 70 (Asker, 2003).

Des radionucléides comme le <sup>3</sup>H, <sup>137</sup>Cs, <sup>99</sup>Tc, <sup>106</sup>Ru, <sup>129</sup>I ont toujours été rejetés dans les effluents liquides des usines de retraitement à cause des activités des ateliers de recyclage (Figure 22). Les effluents liquides sont traités dans des stations afin de décontaminer l’eau via divers traitements chimiques avant le rejet en mer en respectant les autorisations en vigueur.

Le décret du 4 mai 1995 publié en France a établi un nouveau cadre réglementaire pour les autorisations de prélèvement d'eau de refroidissement et de rejets des installations nucléaires de base. Plus précisément, le décret fixe des limites pour les rejets radioactifs d’effluents liquides et gazeux. Dans le but de protéger l’environnement et la santé publique, le décret instaure des procédures de contrôle, de surveillance des rejets radioactifs. En 1998, la convention pour la protection du milieu marin de l’Atlantique du Nord-Est (OSPAR) est entrée en vigueur en Europe et fixe des objectifs de diminution des rejets radioactifs. Les données recueillies par l’OSPAR pour évaluer le secteur nucléaire (usines de retraitement, centrales, installations de recherche, recherche et développement en combustibles nucléaires) permettent de comparer les rejets radioactifs entre 1995 et 2001 et ceux entre 2007 et 2013. Les résultats mettent en avant la diminution des rejets totaux radioactifs qui ont été divisés par 2,5 pour les émetteurs alpha et divisé par 12 pour les bêta (hors tritium) et notent l’absence d’augmentation des rejets. Le retraitement du combustible est la principale source de rejet dans la filière

nucléaire représentant 90 % des rejets du total des alpha et 80 % des rejets du total des bêta (OSPAR, 2017).

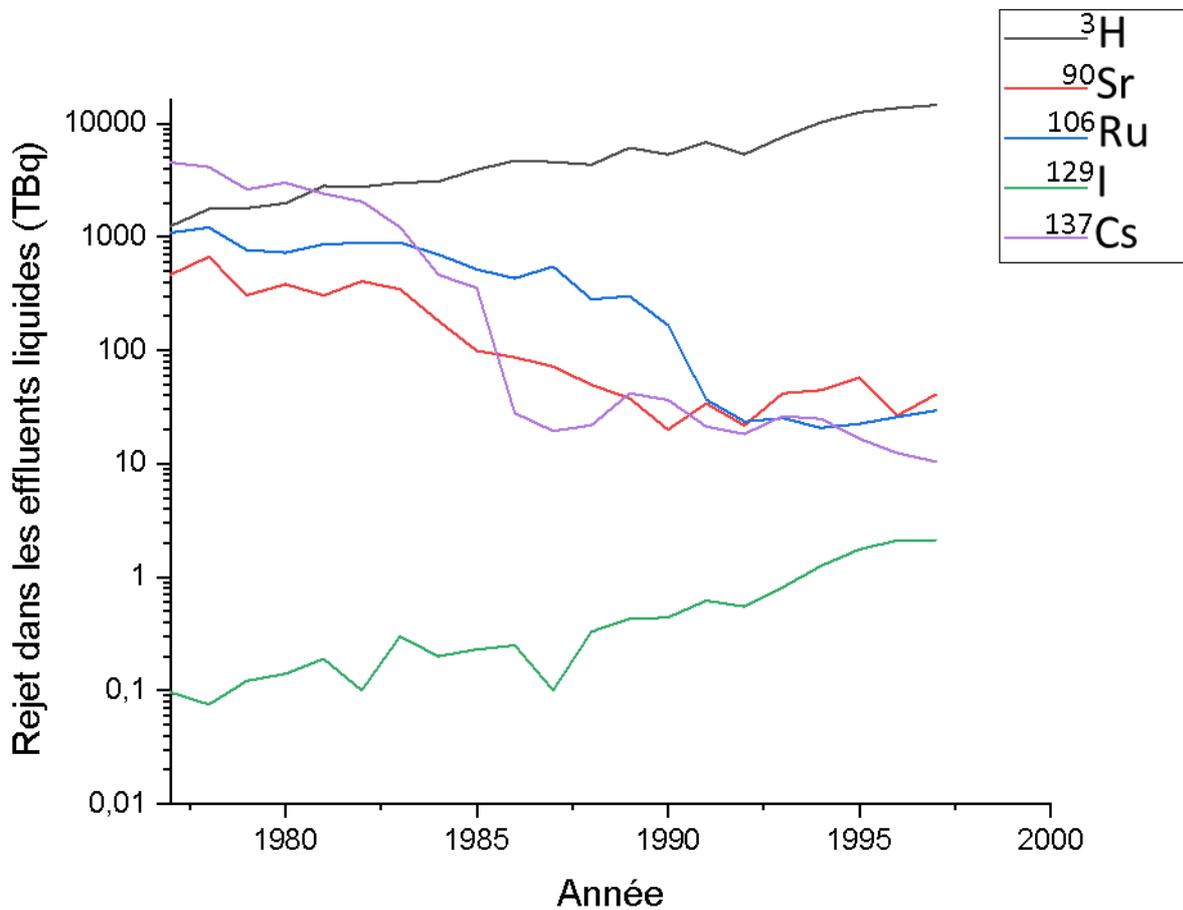


Figure 22. Rejets de radionucléides entre les années 1977 et 2000 issus des usines de retraitement nucléaire (Sellafield, La Hague, Tokai) (Modifié d'après: UNSCEAR, 2012)

### c) Accidents de réacteurs nucléaires

Les accidents majeurs d'exploitation constituent une source de rejets de la filière nucléaire. Les risques liés à l'usage du nucléaire sont connus et des actions sont constamment mises en place pour les limiter ou les maîtriser. On peut considérer l'accident de Three Mile Island aux États-Unis du 29 mars 1978 comme étant le premier dans l'histoire des accidents de centrale nucléaire provoqués par des défaillances mécaniques avec une classification de niveau 5 sur l'échelle internationale des événements nucléaires (INES). À la suite d'une défaillance du système de refroidissement du réacteur n°2, le cœur du réacteur a partiellement fondu. Bien que maintenu dans les enceintes de confinement et sans conséquence radiologique

pour l'environnement proche, cet événement a remis la sûreté nucléaire au cœur des débats. Il a eu un impact fort sur l'opinion publique et la perception de celle-ci vis-à-vis de l'énergie nucléaire et il peut être considéré comme l'un des plus importants dans l'histoire des États-Unis. À la suite de cet accident, des améliorations sur la sécurité des centrales ont été mises en place avec notamment des systèmes de surveillance et de contrôle renforcés, des systèmes de secours pour l'eau de refroidissement en cas d'urgence.

L'accident de Tchernobyl du 26 avril 1986 a changé à jamais le débat autour du nucléaire dans l'Union européenne, traumatisant l'opinion publique du monde entier. L'échelle INES a classé cet accident au niveau maximal (niveau 7) avec un rejet majeur dans l'environnement. L'accident est survenu dans la centrale nucléaire de Tchernobyl (Ukraine) à la suite de défaillances techniques et d'erreurs humaines qui ont conduit à une explosion du réacteur n°4. Le cœur du combustible est rentré en fusion et a entraîné une explosion de vapeur libérant une grande quantité de radionucléides (*e.g.* :  $^{133}\text{Xe}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{132}\text{Te}$ ) dans l'environnement pour une activité totale d'environ 1-2 EBq. La contamination ne s'est pas cantonnée aux frontières de la région touchée, mais s'est dispersée dans la majorité des pays de l'Europe occidentale les jours suivants l'accident. Dans l'eau de mer, l'impact de cet accident a été relativement limité. Cependant, du  $^{137}\text{Cs}$  et du  $^{90}\text{Sr}$  ont été retrouvés dans la mer Baltique et la mer Noire, ayant également eu un impact sur la chaîne alimentaire marine avec une accumulation de radionucléides dans des mollusques et des poissons (Aarkrog, 2003; Kryshev, 1995). Actuellement, les niveaux de radioactivités pour les eaux côtières continuent d'être surveillés. L'accident de Tchernobyl a mis en exergue l'importance de l'information et de sa crédibilité dans des situations de gestion de crise nucléaire. Il a provoqué une remise en question des pratiques et normes de sécurité dans les centrales nucléaires à l'échelle mondiale.

Le 11 mars 2011, un accident a lieu sur la centrale nucléaire de Fukushima Daiichi (CNFD) au Japon, à la suite d'un puissant tremblement de terre (magnitude 9 de Richter) suivi d'un tsunami. La CNFD a alors perdu son système de refroidissement, ce qui a provoqué la fusion de trois des six réacteurs nucléaires (n°1,2,3). La plus grande retombée de radionucléides est venue de la libération de gaz et de radionucléides volatils dans l'atmosphère. Une autre partie de la contamination est venue du refroidissement du cœur des réacteurs, puisqu'une partie de cette eau a fini par s'écouler dans l'océan (malgré les tentatives de TEPCO (Tokyo Electric Power Compagny) pour la contenir). Plusieurs articles permettent d'estimer le dépôt total de

$^{137}\text{Cs}$ , bien que les données soient variables suivant les paramètres de transports pris en compte et par manque de données d'observation. Les modèles de transports estiment qu'au moins 80 % des retombées se sont déposées à la surface des océans. Du  $^{137}\text{Cs}$  a été très largement dispersé dans l'environnement, les retombées atmosphériques totales estimées peuvent représenter jusqu'à 36 PBq avec un pic mi-mars de 15 PBq. D'autres radionucléides avec des demi-vies supérieures à une année telle que le  $^{90}\text{Sr}$ ,  $^{239,240}\text{Pu}$ ,  $^{134}\text{Cs}$ ,  $^{129}\text{I}$  ont été dispersés. Un grand nombre de données a été publié principalement par TEPCO et par des agences japonaises pour le  $^{131}\text{I}$ , le  $^{134}\text{Cs}$  et le  $^{137}\text{Cs}$ .

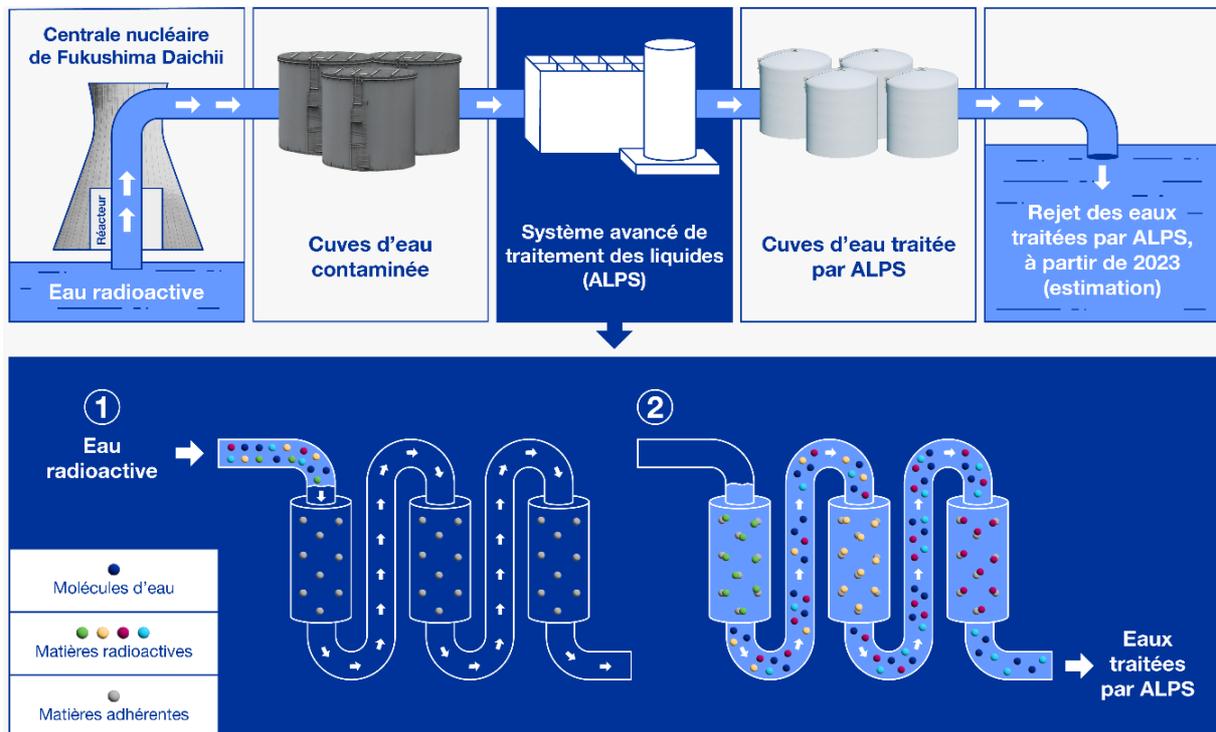


Figure 23. Schéma de la décontamination de l'eau radioactive de CNFD traité par ALPS (Modifié d'après: <https://www.iaea.org/fr/themes/l'intervention/rejet-des-eaux-traitees-a-la-centrale-nucleaire-de-fukushima-daiichi/questions-frequemment-posees>)

La difficulté pour quantifier les radionucléides issus de la CNFD dans l'océan a été de les différencier de ceux encore dus aux retombées des essais d'armes nucléaires, les modèles de dispersion se sont principalement appuyés sur le ratio  $^{134}\text{Cs}/^{137}\text{Cs}$ . Le  $^{137}\text{Cs}$  a été analysé dans l'eau de mer à la suite de cet accident, ce qui a permis d'estimer les rejets directs dans l'océan avec un pic à  $68 \text{ MBq} \cdot \text{m}^{-3}$  au niveau du point de décharge situé à proximité de CNFD (Buessler et al., 2017). Des actinides tels que le  $^{238,239,240}\text{Pu}$ , le  $^{241}\text{Am}$  et le  $^{244}\text{Cm}$  ont également été

retrouvés dans l'eau de mer proche de CNFD et leur présence est attribuable à l'accident avec des concentrations faibles (*e.g.* : 2,1 Bq.L<sup>-1</sup>, <sup>238</sup>Pu ; 0,56 Bq.L<sup>-1</sup> <sup>241</sup>Am)(METI, 2023).

Actuellement plus de 1 million de tonnes d'eau contaminée sont stockées sur le site de CNFD, depuis l'accident et 140 000 litres d'eau contaminée sont chaque jour produits. Cette eau va être décontaminée par un système avancé de traitement des liquides (ALPS) de 62 des 63 radionucléides présents (sauf le <sup>3</sup>H) dans des usines construites sur le site (Figure 23). Les autorités japonaises planifient un rejet dans la mer par un conduit sous-marin d'un kilomètre de l'eau partiellement décontaminé malgré les fortes polémiques à ce sujet. Cet accident a mis en exergue les données limitées pour comprendre l'interaction entre les radionucléides et les organismes marins. Plusieurs semaines après l'accident des activités importantes ont été retrouvées dans les eaux propres de la centrale (<30 km). Par exemple, en février 2013, dans le port de la CNFD une activité de 720 000Bq.kg<sup>-1</sup> a été détectée dans un poisson de roche (MAFF, 2015; TEPCO, 2016). Sur une courte période, plusieurs radionucléides ont été découverts dans le biote marin, suscitant une inquiétude de la population sur la consommation de produits provenant de la mer.

### III. Accumulation de métaux dans le biote marin

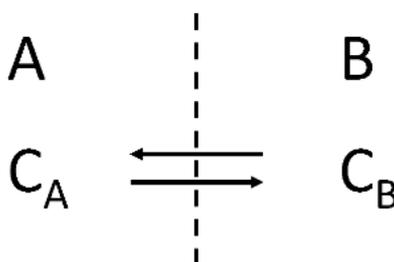
#### 1) Définitions générales

##### a) Facteur de bioaccumulation

Le facteur de bioaccumulation (BAF) des métaux par le biote marin est défini par toutes les voies d'exposition à son environnement naturel. Les voies d'exposition incluent le contact avec l'eau, l'alimentation et la respiration. Le BAF peut se référer à l'organisme entier, à un organe ou à un tissu, en utilisant le poids humide, le poids sec ou le poids des lipides. Le terme BAF décrit la concentration de métal dans l'organisme et sa concentration totale dans l'eau. Le BAF peut être exprimé en L.kg<sup>-1</sup>. Le BAF et le facteur de bioconcentration (BCF) ne sont pas identiques, bien qu'ils puissent souvent être confondus. La bioaccumulation inclut à la fois la bioconcentration et l'exposition par la nutrition.

## b) Facteur de bioconcentration

Le BCF des métaux par les organismes marins inclut uniquement l'accumulation par la respiration et le contact avec le milieu environnant. Le BCF est défini comme la concentration de métaux présents dans les organismes, les organes ou les tissus biologiques, divisée par leur concentration présente dans l'environnement. Ce facteur est destiné uniquement à des mesures en laboratoire dans des conditions contrôlées, notamment avec une régulation de la nourriture pour éliminer l'apport de métaux. Le BCF peut être représenté simplement par l'équilibre suivant :



avec  $C_A$  la concentration dans le milieu A (*e.g.* eau de mer) et  $C_B$  la concentration dans le milieu B (*e.g.* les tissus mous). La formule pour exprimer le BCF est :

$$BCF = \frac{C_B}{C_A}$$

Généralement la masse de l'organisme est exprimée en masse humide, masse sèche ou masse lipidique. De ce fait, le BCF peut être exprimé en  $L.kg^{-1}$ .

Le Tableau 6 regroupe des valeurs seuil de BCF définies par des agences de régulation européenne (Agence européenne des produits chimiques : ECHA) et américaine (Agence de protection de l'environnement : EPA) pour des produits chimiques et des métaux lourds. Ces valeurs indicatives permettent de comprendre la relation d'un organisme vis-à-vis d'un contaminant et son caractère accumulateur (Regulation (EC) No 1907/2006, 2014; Rosioru et al., 2016).

Tableau 6. Réglementation des seuils pour les facteurs de bioconcentration. REACH : Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals. TSCA : Toxic Substance Control Act.

Agence de régulation (programme)	Valeur seuil (L.kg <sup>-1</sup> )
Régulation CE n°1907/2006 (REACH)	≥2000 = bioaccumulateur ≥5000 = très bioaccumulateur
USA EPA (TSCA)	≥1000 = bioaccumulateur ≥5000 = très bioaccumulateur

### c) Facteur de concentration

Le facteur de concentration (CF) est un outil permettant de comparer simplement la radioactivité présente dans un organisme, un tissu ou un organe, à la radioactivité présente dans l'eau de mer, sans prendre en compte la source de contamination. Afin de pouvoir comparer les différentes valeurs, on prend en compte la concentration dans l'eau de mer ambiante pour l'exprimer sous forme de CF. La masse des échantillons biologiques peut être exprimée en masse sèche ou en masse humide. Le CF est un outil pertinent pour comprendre l'accumulation de métaux ou de radionucléides dans le biote marin et peut être exprimé par deux formules :

$$CF \text{ (sans unité)} = \frac{\text{Concentration par unité de masse de l'organisme } \left(\frac{kg}{kg} \text{ ou } \frac{Bq}{kg}\right)}{\text{Concentration par unité de masse d'eau de mer } \left(\frac{kg}{kg} \text{ ou } \frac{Bq}{kg}\right)}$$

$$CF \text{ (L.kg}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Concentration par unité de masse de l'organisme } \left(\frac{kg}{kg} \text{ ou } \frac{Bq}{kg}\right)}{\text{Concentration par unité de masse d'eau de mer } \left(\frac{kg}{L} \text{ ou } \frac{Bq}{L}\right)}$$

Dans le cadre de ce travail, nous utiliserons la première formule, car la deuxième est plus souvent utilisée pour les espèces planctoniques.

## 2) Accumulation de métaux traces dans le compartiment marin

De manière arbitraire les éléments présents dans l'eau de mer ont été classés en deux catégories :

- les éléments majoritaires de l'eau de mer ont été décrits précédemment et sont définis par une concentration moyenne dans l'eau de mer supérieure à  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$
- les métaux traces ont une concentration moyenne inférieure à  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$

La plupart des éléments traces ont une concentration non conservative dans l'eau de mer en raison des processus biologique et géochimique qui se déroulent dans les océans. Les métaux traces sont présents dans l'eau de mer à différentes concentrations (nmol à fmol), leur présence peut être naturelle ou être augmentée par des activités anthropiques. Parmi les métaux traces que l'on retrouve dans le compartiment marin, on peut y retrouver les métaux dits « lourds ». Cette catégorie regroupe des éléments avec des propriétés métalliques incluant les métaux de transition, métalloïdes, lanthanides et actinides possédant des masses atomiques débutant vers  $60 \text{ g.mol}^{-1}$  (Cu) et pouvant être supérieurs à  $200 \text{ g.mol}^{-1}$  (Hg) avec une densité supérieure à  $4,5 \text{ g.cm}^{-3}$  (Fergusson, 1991; Tchounwou et al., 2012). Ces métaux lourds peuvent être naturellement présents dans l'eau de mer à des concentrations qui peuvent être très basses (*e.g.* [Au] = 50 fmol), on parle dans la littérature de métaux lourds traces (trace heavy metals). On peut également retrouver le terme d'éléments traces métalliques. Les deux appellations recourent des définitions qui ne sont pas clairement établies et dont les limites peuvent dépendre des auteurs. Pour simplifier, nous parlerons ici de métaux ou de radionucléides métalliques.

La présence de métaux lourds dans l'eau de mer et le biote peut provenir de sources naturelles ou de pollution anthropique. Certains métaux peuvent être toxiques à faible concentration (*e.g.* Cd, Pb, Hg) et n'ont pas de rôle dans les processus biologiques (Nordberg, 2007). Au contraire d'autres métaux sont essentiels (Cu, Mo, Zn) pour le fonctionnement d'organismes vivants (*e.g.* enzyme, protéine). Les éléments essentiels ne peuvent pas être substitués par d'autres éléments et exercent une influence directe et indispensable au fonctionnement du métabolisme cellulaire (Rainbow, 1995). Bien qu'ils soient essentiels, la concentration dans l'environnement de certains métaux peut cependant induire une toxicité

pour les organismes marins. Une concentration de Zn à  $10^{-3}$  M et de Cd à  $10^{-2}$  M provoque par exemple la diminution significative d'une enzyme essentielle (AChE) alors que le Fe pour les mêmes concentrations entraîne une inhibition totale chez *M. galloprovincialis* et *Perna perna* (Deidda et al., 2021; Najimi et al., 1997). La concentration toxique d'un métal dépend de l'organisme et de son seuil de tolérance. Une concentration importante peut perturber la croissance, la reproduction et le système endocrinien. Les individus les plus jeunes ont une activité biologique plus importante de ce fait, ils sont plus impactés par ces perturbations. Dans les organismes vivants, l'accumulation de métaux dépend de plusieurs facteurs, tels que la disponibilité de l'élément, donc de sa spéciation et de facteurs biologiques. La forme physico-chimique des métaux dans l'eau de mer est liée à de nombreux facteurs, tels que le pH, la salinité et la force ionique (Jakimska et al., 2011). La géochimie inclut la spéciation d'un métal et revêt une importance primordiale pour comprendre les mécanismes d'accumulation d'un métal par les organismes (Luoma and Rainbow, 2005; Simkiss, K and Taylor, MG, 1989).

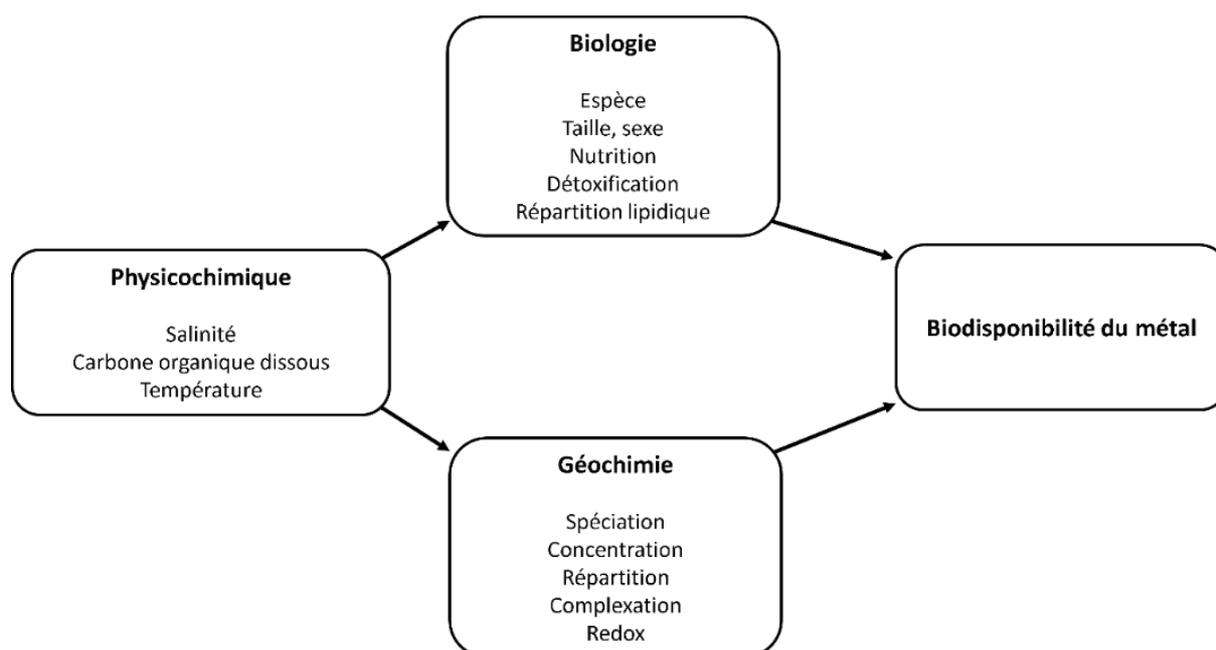


Figure 24. Facteurs influençant la biodisponibilité d'un métal dans le milieu aquatique (Modifié d'après: Wang and Fisher, 1997)

Pour un même métal, un changement de biodisponibilité peut lui permettre de passer les membranes biologiques ou de se lier à la surface des cellules. Certaines espèces marines régulent les métaux avec facilité (e.g., la moule Cu, Zn), alors que d'autres espèces montrent une très grande variation de concentration (Rainbow, P. S, 1988). La biodisponibilité d'un métal

est un phénomène multifactoriel complexe (voir la Figure 24) qui doit donc être étudié de manière interdisciplinaire pour comprendre l'impact d'un métal sur le biote marin.

Les concentrations métalliques dans les organismes vivants peuvent atteindre des niveaux élevés n'atteignant jamais un état d'équilibre. La relation entre la bioaccumulation des métaux et leur toxicité est complexe, car elle dépend d'une connaissance parfaite du système étudié et de la spéciation du métal. Le métal peut être présent sous diverses formes (ion libre, complexe organique ou inorganique) et interagir avec une membrane biologique ou les sites physiologiquement actifs d'un organisme comme illustré sur la Figure 25. On parle de ligand biotique.

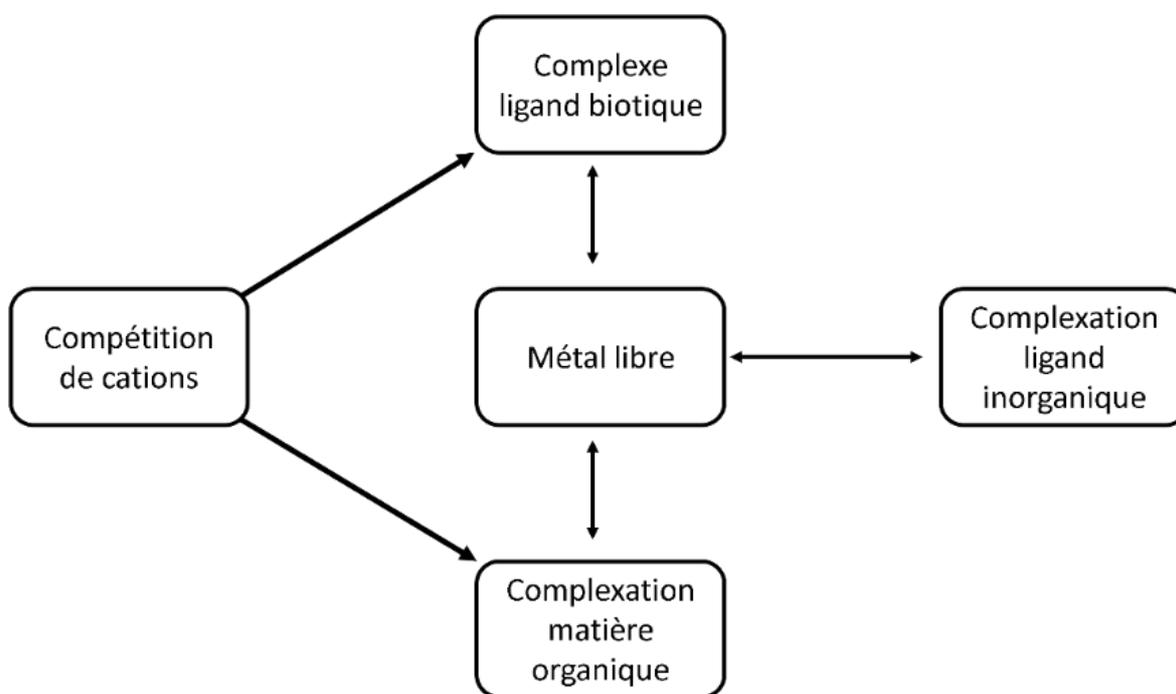


Figure 25. Diagramme du modèle d'activité d'un ion libre (Modifié d'après: Markich and Brown, 2018).

La toxicité des métaux résulte de la formation d'un complexe entre le métal et un ligand biotique qui peut perturber l'équilibre de l'organisme à différentes échelles. Le lien entre la concentration des métaux dans les organismes et leur toxicité n'est pas linéaire. De ce fait il est difficile de comprendre et de prédire les réponses d'un organisme à un polluant métallique. Contrairement aux molécules organiques, les métaux ne se décomposent jamais. Ils peuvent échanger des ligands ou changer d'état d'oxydation, et être concentrés (e.g., dans les sédiments

ou les organismes vivants). Ces changements de spéciation peuvent transformer des métaux non toxiques en métaux toxiques par des organismes qui modifient leur spéciation et augmentent leur toxicité. Certains métaux ne peuvent être assimilés que sous des formes chimiques spécifiques, comme le cobalt qui peut être assimilé sous forme de cobalt organique par les diatomées. Le cobalt inorganique quant à lui peut être considéré comme étant moins biodisponible puisqu'il est moins accumulé par les diatomées. Dans ce cas, 80 % du cobalt inorganique se lie à la membrane plasmique des cellules et n'est pas métabolisé. De ce fait, cette forme chimique du cobalt n'est pas considérée comme un élément essentiel, car le cobalt n'est plus biodisponible (Nolan et al., 1992). Il n'existe pas de règle générale pour prédire les concentrations de métaux dans les organismes. Par exemple pour deux espèces de gastéropodes proches (*Morula musiva* et *Thais luteostoma*) provenant du même site de prélèvement, le cadmium est accumulé à la même concentration alors que dans la première espèce la concentration de zinc y est dix fois plus importante que dans la seconde. Les métaux peuvent être biomagnifiés (augmentation de la concentration) ou biodiminués (diminution de la concentration) le long de la chaîne trophique suivant leur spéciation, mais également l'efficacité de l'assimilation par les organismes vivants (Carvalho, 2018). Les concentrations en mercure peuvent par exemple être augmentées lorsque l'on passe à des niveaux trophiques supérieurs (biomagnification) alors que les concentrations de cadmium peuvent diminuer dans les niveaux trophiques supérieurs (biodiminution) (e.g. du phytoplancton au zooplancton, puis aux poissons) (Wang, 2002). Le zinc est un métal bioamplifié dans la chaîne trophique, c'est le deuxième métal de transition le plus abondant dans le vivant après le fer dans de nombreux organismes (végétaux et animaux). Le zinc est nécessaire aux processus biologiques étant un cofacteur important dans de nombreuses enzymes (plus de 200) jouant un rôle catalytique. On le retrouve notamment dans les métallothionéines et les hémocyanines qui sont particulièrement importantes chez les mollusques puisqu'elles interviennent dans la respiration. La concentration à partir de laquelle le zinc est toxique dépend de l'espèce considérée et de la disponibilité du métal dans l'organisme. Dans les crustacés décapodes, les mécanismes de détoxification du zinc ne permettent pas de le réguler efficacement. C'est également le cas pour de nombreux mollusques qui sont des accumulateurs nets de métaux toxiques, c'est-à-dire que le métal présent dans l'organisme est biodisponible. Cependant la relation entre la concentration totale de métal accumulé et la toxicité reste difficile à établir (Rainbow and Luoma, 2011). Certains métaux sont reconnus dans les organismes et peuvent être détoxifiés facilement. Le

cadmium par exemple est un métal détoxifié par des métallothionéines dans de nombreux organismes aquatiques (vertébré et invertébré). Dans les mollusques, le Cd est principalement localisé dans les tissus mous, d'abord stocké dans le foie puis transféré dans les reins, il y est absorbé par la présence des métallothionéines qui sont particulièrement importantes. La toxicité du Cd est globalement plus importante dans les poissons que dans les mollusques. En effet, les concentrations de cadmium provoquant la mort sont plus faibles dans les poissons. Par exemple, après une période d'exposition de 96h à une concentration de 2,4 mg.L<sup>-1</sup> il induit une mortalité à 95 % chez une espèce de palourde (*Surf Clam*) alors que dans une espèce de poisson (*Poecilia reticulata*) seulement 0,17 mg.L<sup>-1</sup> est nécessaire à la même mortalité (Nelson et al., 1988; Shuhaimi-Othman et al., 2015). La présence de phosphate dans l'environnement peut également faciliter l'accumulation du cadmium par les organismes (Roméo et al., 2000). La métabolisation d'un métal est un processus complexe dans les organismes vivants qui dépend notamment de la bioaccumulation, la détoxification et des mécanismes d'élimination (Tribskorn et al., 1997).

Tableau 7. Facteur de concentration (CF) estimé dans plusieurs espèces marines.(IAEA, 2004)

Espèce Éléments	Espèce				
	Poisson	Crustacé	Mollusques <sup>a</sup>	Macroalgue	Zooplancton
Na	1×10 <sup>0</sup>	7×10 <sup>-2</sup>	3×10 <sup>-1</sup>	5×10 <sup>-1</sup>	1×10 <sup>0</sup>
Cd	5×10 <sup>3</sup>	8×10 <sup>4</sup>	8×10 <sup>4</sup>	2×10 <sup>4</sup>	6×10 <sup>4</sup>
Co	7×10 <sup>2</sup>	7×10 <sup>3</sup>	2×10 <sup>4</sup>	6×10 <sup>-3</sup>	7×10 <sup>3</sup>
Cs	1×10 <sup>2</sup>	5×10 <sup>1</sup>	6×10 <sup>1</sup>	5×10 <sup>1</sup>	4×10 <sup>1</sup>
Pb	2×10 <sup>2</sup>	9×10 <sup>4</sup>	5×10 <sup>4</sup>	1×10 <sup>3</sup>	1×10 <sup>3</sup>
U	1×10 <sup>0</sup>	1×10 <sup>1</sup>	3×10 <sup>1</sup>	1×10 <sup>2</sup>	3×10 <sup>1</sup>

<sup>a</sup> (hors céphalopodes)

Dans un rapport de l'AIEA (IAEA, 2004), une compilation de données issues de mesures effectuées par la communauté scientifique permet d'estimer les facteurs de concentration pour différents organismes marins (tels que mollusques, macroalgues, planctons) ce qui donne un ordre de grandeur des métaux bioaccumulés (Tableau 7).

## Chapitre 2 – Contexte général

Les différences entre les organismes peuvent s'expliquer par des mécanismes d'accumulation qui dépendent des espèces étudiées et de leurs caractéristiques physiologiques (Bustamante et al., 2002).

Parmi les métaux, les radionucléides métalliques sont étudiés afin de comprendre les conséquences de leurs accumulations sur la santé des organismes marins, ainsi que sur la santé humaine lorsqu'ils entrent dans la chaîne alimentaire humaine. Un système d'information sur la radioactivité de l'environnement marin (MARIS) regroupe des résultats de mesures de la radioactivité dans l'eau de mer, le biote, les sédiments ("MARIS - Marine Radioactivity Information System," n.d.). Ces données peuvent être utilisées pour évaluer la distribution et l'évolution des radionucléides dans l'environnement marin. Les radionucléides métalliques peuvent avoir une double toxicité, chimique et radiologique, ce qui renforce le besoin de comprendre leur devenir au contact d'organismes vivants. De nombreux radionucléides, tels que les actinides, ne sont pas des éléments essentiels dans les organismes vivants (*e.g.* uranium, plutonium, américium). Les interactions de ces radionucléides non essentiels avec les bioligands et les voies de métabolisation sont peu connues dans le biote marin. Le manque de données de spéciation ne permet pas actuellement de prédire avec précision la biodisponibilité d'un radionucléide une fois accumulé par un organisme ni sa toxicité. Des études réalisées grâce à des outils spectroscopiques tels que l'EXAFS, la SLRT ou avec l'aide de codes de modélisations de la spéciation géochimique peuvent permettre d'obtenir des modèles de spéciation suivant la composition du milieu (Moulin et al., 2005). Ces modèles calculent la répartition des espèces en fonction des paramètres du milieu, ce qui permet d'obtenir la répartition des ions libre, les complexes organiques, inorganiques et la répartition entre la forme soluble/insoluble (Figure 24).

### 3) Modèle d'étude, la moule : *Mytilus*

#### a) Biologie : anatomie et physiologie

L'espèce de moule utilisée dans ce travail est *Mytilus galloprovincialis*, également connue sous le nom de moule méditerranéenne, bien qu'elle soit présente dans plusieurs régions du monde (Figure 26).

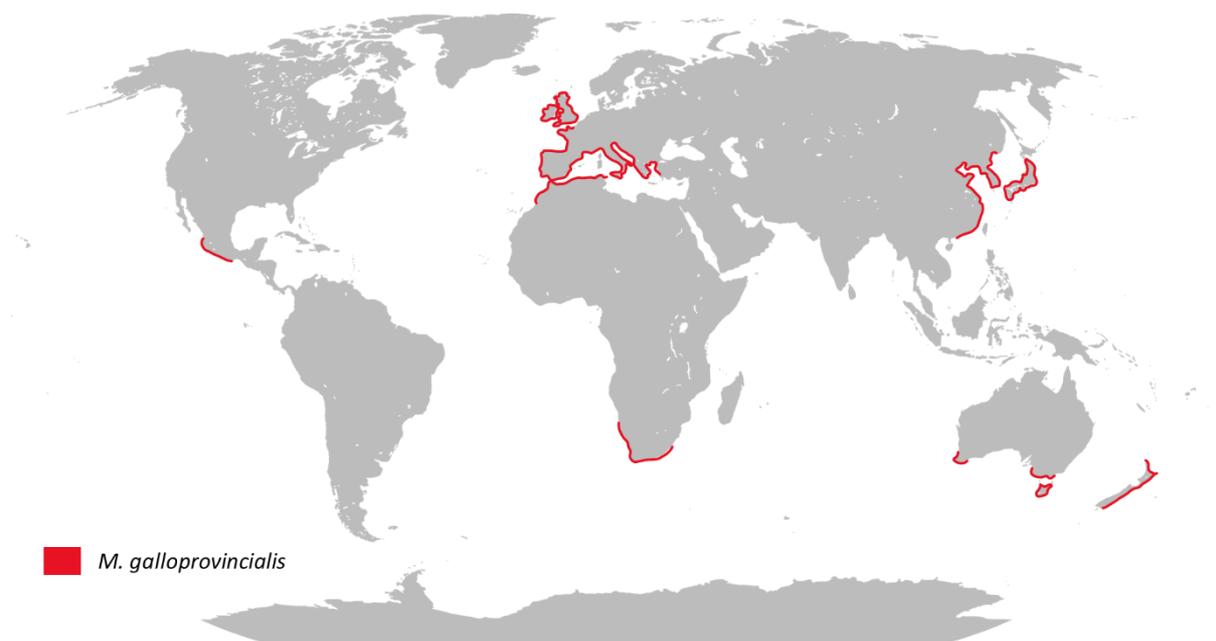


Figure 26. Principales localisations de *M. galloprovincialis* dans le monde (Modifié d'après: Gosling, 2003)

La moule *M. galloprovincialis* est considérée comme une espèce invasive et sa présence à certains endroits pose de nombreux problèmes, car elle remplace les populations de moules indigènes (Global Invasive Species Database, 2023). Cette moule appartient au genre *Mytilus*, de la classe des lamellibranches, également connus sous le nom de bivalves. Les bivalves ont une morphologie similaire et des organes semblables. L'anatomie de la moule est présentée Figure 27.

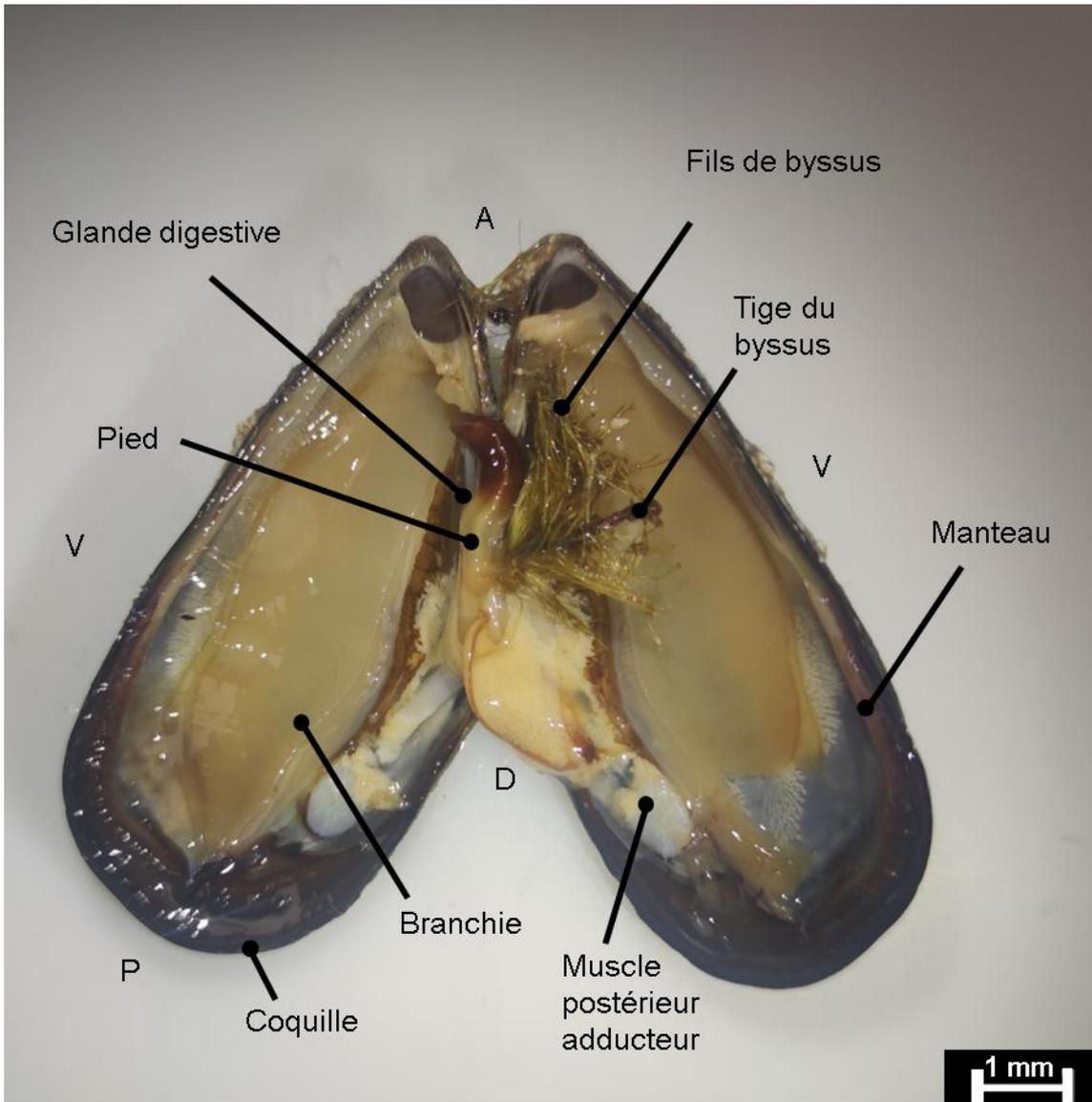


Figure 27. Anatomie générale d'une moule (*M. galloprovincialis*), vue ventrale après ouverture par coupe du muscle adducteur. V : ventral ; D : dorsal ; P : postérieur ; A : antérieur ©Romain Stefanelli

Les bivalves possèdent une coquille qui leur sert de « squelette » pour les insertions musculaires, de moyen de protection contre les prédateurs et protège les tissus mous de l'extérieur. La coquille est composée de trois couches riches en carbonate de calcium qui s'agencent sous différentes formes (Gao et al., 2015). Ces couches sont sécrétées par le manteau ce qui permet la croissance de la coquille. Plusieurs caractéristiques de la coquille sont utilisées pour différencier les bivalves. La moule possède deux lobes identiques en taille reliés l'un à l'autre par un puissant muscle adducteur situé au niveau de la partie postérieure. Le manteau est attaché à la coquille au niveau de la partie dorsale et est ouvert sur la partie ventrale. Il recouvre

entièrement la partie interne de la coquille pour former la cavité palléale, constituée d'un siphon inhalant (partie ventrale) et d'un siphon exhalant (partie dorsale) qui permettent à l'eau de circuler à l'intérieur de la cavité. Les branchies lamelibranches sont reliées au manteau sur un axe dorsal. Elles ont deux fonctions essentielles :

- La respiration : assurée par une surface importante riche en hémolymphe qui permet des échanges gazeux efficaces.
- La nutrition : garantie par les cils présents sur la partie terminale des branchies qui participent au transport de la nourriture jusqu'à la bouche située sur la partie antérieure et surmontée par deux paires de palpes labiales assurant le tri pour une filtration en continu.

La bouche se prolonge en œsophage, menant à l'intestin qui est connecté à la glande digestive, également appelé hépatopancréas/glande digestive (Eggermont et al., 2020). La glande digestive constitue le principal site de digestion intracellulaire et est reliée à l'estomac par des canaux ciliés. Les organes impliqués dans la digestion contiennent des protéines digestives et antioxydantes.

Le pied est un organe musculaire qui permet une faible mobilité chez les moules, mais surtout la sécrétion de fils de byssus grâce à la glande byssogène leur permettant de s'ancrer dans leur environnement. À partir de cette glande, une tige se forme, servant de base pour attacher les fils de byssus. Un liquide protéique précurseur y est sécrété permettant de former un fil solide après autoassemblage et couplage croisé du collagène (Tanzer, 1973). Les fils de byssus sont principalement composés d'un cœur riche en fibres de collagène assemblé en triple hélice, assurant leur solidité et leur élasticité, et d'une cuticule protectrice à l'extérieur. Les fils de byssus peuvent atteindre quelques centimètres (2-4 cm) pour un diamètre compris entre 100 et 300  $\mu\text{m}$ , et la partie distale est pourvue d'une plaque riche en protéines adhésives (Figure 28) (Harrington et al., 2018).

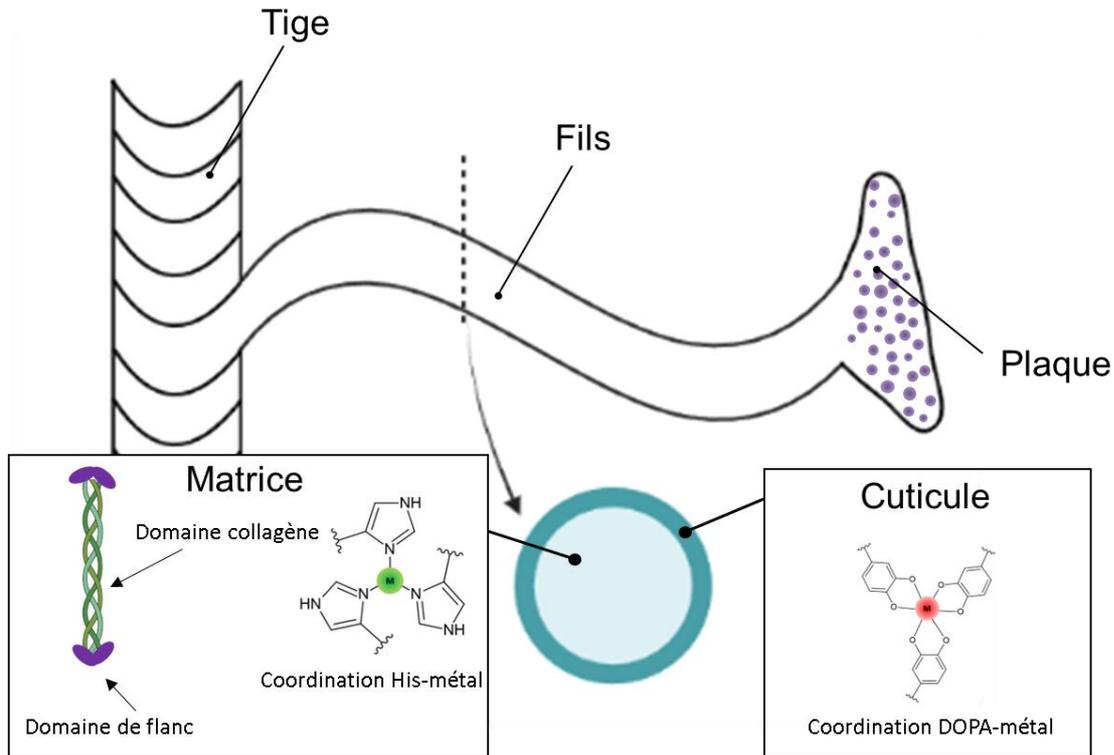


Figure 28. Représentation schématique du byssus et des fonctions présentes dans la matrice et la cuticule. ©Romain Stefanelli

Le cœur fibreux possède deux régions qui se distinguent par leurs propriétés mécaniques. La partie proximale a une structure ondulée, une extensivité et une rigidité inférieures à la partie distale qui a une extensibilité de 100 %. La région distale est capable de retrouver son état initial après avoir subi des contraintes mécaniques grâce à des processus d'autoguérison spontanée. La famille de collagène présente dans le cœur fibreux est appelée préCol. Le domaine central, précol-NG (homogène), est composé d'une séquence  $[\text{Gly-X-Y}]_n$  (X et Y étant souvent de la proline ou de l'hydroxyproline).

Ce domaine de collagène est entouré de deux domaines de flanc dans sa partie terminale N- et C- nommée préCol-D (environ 97 kDa) et préCol-P (environ 95 kDa) (Qin et al., 1997). Ces deux domaines ont des régions terminales riches en histidine pouvant se lier au  $\text{Zn}^{2+}$  et au  $\text{Cu}^{2+}$ . Le domaine préCol-D,  $[\text{Gly-X}_1\text{-X}_2]_n[\text{A}]_n$  ( $\text{X}_{1,2}$  = n'importe quel acide aminé ; A = Alanine), (présent à l'extrémité distale) possède des séquences riches en polyalanines et glycine (60 mol %). Le domaine préCol-P ;  $[\text{Gly-X}_1\text{-X}_2]_n$  (présent à l'extrémité proximale) est hydrophobe et assimilable à des protéines élastiques. La DOPA, 3,4-dihydroxyphénylalanine est issue de modifications post-traductionnelles de la tyrosine (Figure 29). Les complexes

métalliques impliquant la DOPA sont généralement simplifiés par un motif catéchol (Figure 28).

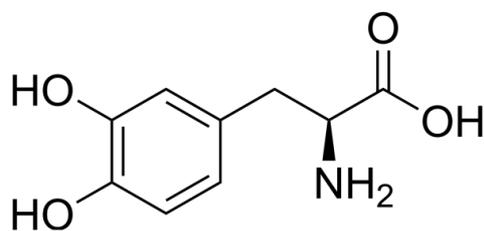


Figure 29. 3,4-dihydroxyphénylalanine - DOPA

Au niveau des domaines terminaux du collagène, son oxydation peut amener à la formation de liaisons covalentes. Ces liaisons sont réalisées par couplage aryle ou par réaction avec d'autres acides aminés via des additions de Michael, mais également des réactions avec des bases de Schiff. Ces couplages croisés ne sont rendus possibles que par l'oxydation spontanée de la DOPA sous sa forme quinone à l'intérieur de la matrice du byssus. D'autres interactions non covalentes de la DOPA telles que les liaisons hydrogène, la coordination métallique ou les interactions  $\pi$ - $\pi$  participent aux propriétés adhésives des protéines du byssus (Bandara et al., 2013). La présence de formes oxydées de la DOPA (quinone ou semi-quinone) qui sont très réactives permet notamment la formation de fibres à partir du liquide protéique précurseur et leur maturation dans la matrice (Lee et al., 2006).

Parmi les protéines du byssus, les protéines du pied de la moule (mfp) forment des polymères organiques. La Figure 30 schématise la répartition de ces protéines au niveau du byssus.

Les mfp-1 sont les seules protéines de cette famille présentes au niveau de la cuticule. Leur présence dans la cuticule contribue à la résistance mécanique des fils, assurant ainsi leur dureté et leur rigidité. Cette protéine contient une quantité élevée de DOPA, pouvant atteindre jusqu'à 15 % mol, ce qui lui permet de former des complexes stables avec le  $\text{Fe}^{3+}$ . En effet, la DOPA reste réduite dans la cuticule, ce qui lui confère la capacité à chélater des métaux. De plus, les complexes catecholato- $\text{Fe}^{3+}$  pourraient former des chaînes entre les protéines mfp-1 grâce à des couplages croisés (Taylor et al., 1996). La coordination de la DOPA avec des métaux ioniques dans une protéine mfp-1 recombinante a également été explorée récemment. La formation de complexes avec le vanadium ( $\text{V}^{3+}$  et  $\text{VO}^{2-}$ ) est possible. Les complexes formés

avec du vanadium semblent avoir une plus grande stabilité que les complexes ferriques avec la tendance suivante :  $V^{3+} > VO^{4+} > Fe^{3+}$ . Les conditions de formations de ces complexes tris-DOPA-vanadium semblent également être adaptées avec les conditions de pH dans lesquelles le byssus est formé (Mesko et al., 2021).

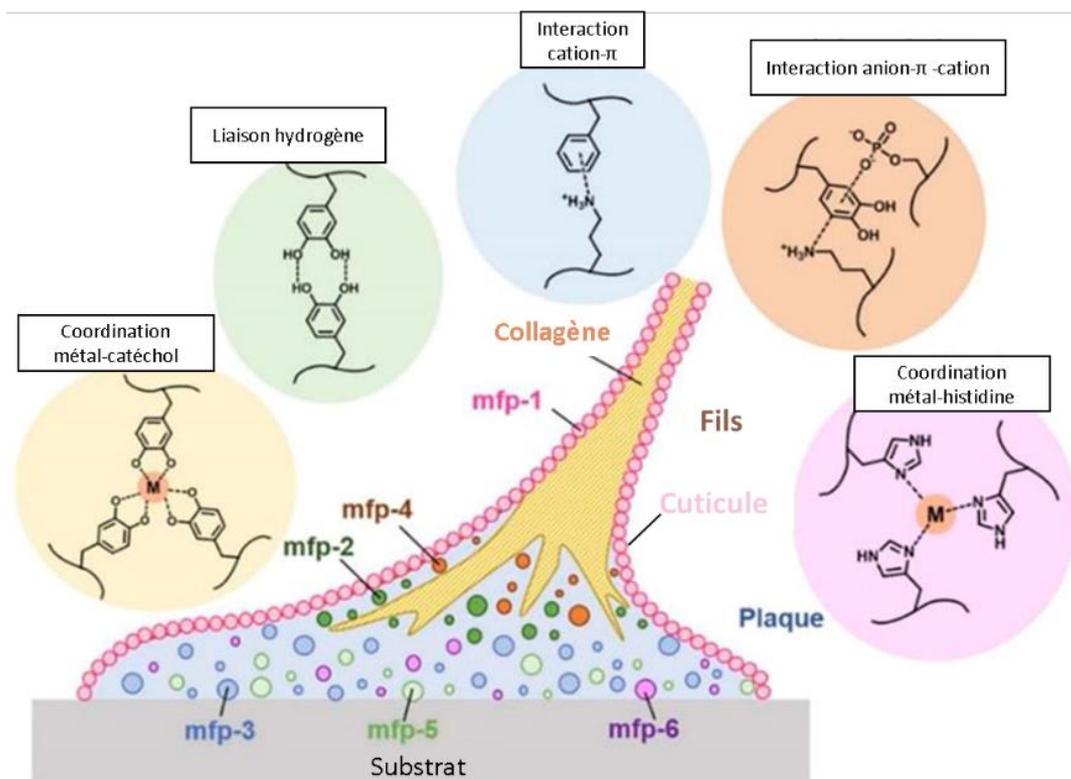


Figure 30. Schéma de la répartition des protéines mfp et les interactions impliquées dans le byssus. (Modifié d'après: Chen and Zeng, 2022)

La plaque est composée de plusieurs protéines (mfp-2,-3,-4,-5,-6) dont les propriétés adhésives sont induites par la présence de DOPA. Les protéines mfp-2 exclusivement présents au niveau de la plaque, sont localisées à la jonction entre la cuticule et la plaque ce qui permet une forte adhésion entre les deux structures. Les mfp-3, -5, -6, permettent à la plaque de s'ancrer à un support.

Les fils de byssus et la plaque suscitent un intérêt croissant en raison de leurs propriétés mécaniques uniques. Les propriétés chimiques sont également intéressantes dans la mesure où la composition des fils de byssus leur permet d'être insolubles dans l'eau, les détergents, les milieux dénaturants, les solvants organiques, les milieux acides dilués (Waite, 1992).

## Chapitre 2 – Contexte général

Les moules présentent une différenciation sexuelle, les gonades se développant à l'intérieur du manteau. Les gonades ont une couleur qui permet de distinguer les sexes : orangé pour les femelles et blanc crème pour les mâles. La fécondation est externe, les gamètes étant expulsés par le siphon exhalant. La maturité sexuelle intervient généralement vers la première année de vie, le cycle annuel sexuel comprenant quatre stades (Borcherding, 1991; Da Ros et al., 1985; Gosling, 2003):

Stade 1 : Ce stade se produit après une phase de ponte. Les gonades sont vides, les follicules sont en croissance augmentant leur taille, c'est une période de repos.

Stade 2 : Les gonades continuent leur croissance, les follicules se remplissent progressivement de gamètes (spermatozoïde ou ovocyte).

Stade 3 : Le développement des gonades se poursuit, elles deviennent plus épaisses et plus grandes. Les gamètes sont regroupés dans le lumen.

Stade 4 : Maturation /ponte. Les follicules ont leurs tailles maximales, les gamètes sont matures et prêts à être expulsés. Après la ponte, le tissu se gorge d'eau libre, les follicules sont plus ou moins occupés par des phagocytes suivant leur remplissage. Ensuite les follicules et se réorganisent en retournant au stade 1.

La période de reproduction des moules s'étend de février à juillet et plusieurs événements peuvent déclencher la ponte. La température et la nourriture sont les principaux facteurs qui contrôlent la ponte (Fong et al., 1995; Irisarri et al., 2015). Ces mêmes paramètres influencent également le cycle sexuel, le retardant ou l'accéléralant en fonction de la température. La gamétogenèse est un processus énergivore qui nécessite une quantité abondante de nourriture pour se dérouler correctement.

Le cycle de vie de la moule comprend une phase embryonnaire, une phase larvaire et une métamorphose au cours de laquelle la larve se fixe sur un support et les organes futurs commencent à se former. Pendant la phase juvénile, les naissains ne sont pas encore matures sexuellement, la maturité sexuelle apparaissant plus tard avec l'apparition des gonades. Les moules continuent de croître tout au long de leur vie et leur âge peut être estimé en comptant les stries présentes sur leur coquille. Sous des conditions optimales, la taille des moules de

l'espèce *M. galloprovincialis* peut atteindre 10-13 cm avec une durée de vie pouvant aller jusqu'à 40 ans (Hammond and Griffiths, 2004; Lutz, 1976).

### **b) La biosurveillance en milieu marin, cas particulier des mollusques**

La surveillance du milieu marin regroupe un large éventail de recherches visant principalement à étudier l'impact des activités humaines sur ce milieu et sa biocénose. Les études sur des organismes sélectionnés vivants dans les océans occupent une place prépondérante dans les programmes de surveillance. Ces organismes sont des marqueurs pour détecter et quantifier les changements dans le milieu marin, tels que la présence de produits chimiques (*e.g.*, métaux, pesticides), mais également l'acidification des océans ou les modifications de la température de l'eau. Le biote marin accumule de nombreux polluants connus pour leurs effets toxiques, cancérigènes ou étant des perturbateurs endocriniens tels que des métaux, des métalloïdes et des substances lipophiles persistantes. Ces organismes vivants peuvent également concentrer, c'est-à-dire bioaccumuler des substances ou contaminants qui ne sont pas nécessairement détectables dans l'environnement marin en raison de l'effet de dilution important.

Parmi tous les organismes marins étudiés, certains sont définis comme des bioindicateurs pertinents pouvant être utilisés comme sentinelle environnementale, et sont définis par des critères spécifiques ("OSPAR," 2018). Ces critères sont les suivants :

- bioconcentrer les polluants dans l'eau de mer ;
- être en abondance dans la zone étudiée ;
- représenter la zone d'étude ;
- accumuler des contaminants importants sans être significativement affecté par les concentrations de l'environnement marin ;
- avoir une taille raisonnable et un comportement permettant des études en laboratoire
- être facilement échantillonné avec des tissus en quantité suffisante pour des analyses chimiques, biochimiques et physiologiques.

Les invertébrés sont connus pour accumuler des concentrations importantes de métaux, notamment les mollusques qui sont remarquablement efficaces. Les moules sont des mollusques qui font l'objet d'une attention particulière ; elles sont largement étudiées dans des programmes de surveillance. La large utilisation des moules comme sentinelles s'explique par leurs caractéristiques biologiques et comportementales qui sont en accord avec la description de la commission OSPAR précédemment exposée. De nombreux pays utilisent cet organisme comme modèle dans leurs programmes de surveillance nationaux, et les données permettent de rendre compte des pollutions le long des côtes industrialisées (Farrington, John W. and Tripp, Bruce W., 1995; Kimbrough, K. L. et al., 2008).

Les États-Unis ont été pionniers quant à l'utilisation de ces organismes comme sentinelle (Goldberg, 1975). Des programmes internationaux se concentrent sur des zones géographiques bien définies ainsi que sur certains contaminants, tel que le programme de surveillance des moules en Méditerranée (CIESM) (Thébault et al., 2008). Les données issues de ces programmes sont facilement accessibles et permettent une intercomparabilité des résultats. Les laboratoires participant aux mesures effectuent régulièrement des intercalibrations avec des matériaux de références. Chaque programme met en place des guides permettant d'uniformiser la collecte des échantillons.

Dans le cadre de l'étude des radionucléides, deux types d'approches différentes peuvent être considérées par les radiobiologistes pour décrire leur l'accumulation dans les organismes vivants. La première approche permet d'analyser l'accumulation dans les espèces vivantes par prélèvement dans leur environnement naturel. Cette approche peut être assimilée à une surveillance du milieu marin, et plusieurs programmes participent à des campagnes dans des zones à risques (IAEA, 2010). Parmi ces zones, on peut citer les effluents des centrales nucléaires (ORANO, La Hague ; Sellafield Ltd, Sellafield), les anciennes zones d'essais nucléaires dans le Pacifique (Atoll de Bikini), les zones contaminées par les accidents de Tchernobyl et CNFD (IAEA, 2005).

La deuxième approche est réalisée en laboratoire, avec des paramètres contrôlés. Il est important de noter que des différences peuvent exister entre les données environnementales et les données issues du laboratoire. Le plus souvent, les biais du laboratoire sont connus et font l'objet d'études approfondies pour comprendre leur influence.

L'analyse des contaminants présents dans les mollusques s'effectue principalement sur les tissus mous (sans la coquille), un grand nombre de métaux et de composés organiques peuvent être mesurés. Cependant les données ne permettent pas de rendre compte des différences de concentration possibles dans les organes (branchie, manteau, glande digestive). Le manque d'harmonisation des méthodes de surveillance est une limite à l'intercomparaison des données entre les programmes. Par exemple, les points de mesure à proximité d'activités humaines ne sont pas standardisés. Certains programmes analysent des moules natives d'une zone, d'autres immergent des nacelles contenant des moules dans les zones polluées avec des temps d'immersion variables, modifiant ainsi l'état d'équilibre. De nombreux autres paramètres peuvent faire varier les concentrations accumulées par les mollusques, tels que la période de reproduction, la saison, la salinité et l'âge des individus. De plus, la mesure d'un contaminant représente uniquement sa partie biodisponible pour les moules, ce qui offre une vision limitée des quantités présentes dans l'eau environnante. Malgré toutes ces difficultés, les programmes de surveillance demeurent le meilleur moyen de répondre à la forte demande concernant la compréhension et la définition de la répartition spatiale des pollutions d'origine humaine.

### **c) Mécanisme général de l'accumulation des métaux dans les mollusques**

La spécification d'un métal, incluant sa valence et la nature de ses ligands (qu'ils soient libres ou formant des complexes), est essentielle pour déterminer son processus d'accumulation. La répartition subcellulaire des métaux est influencée à la fois par le type de métal et l'espèce de mollusques considérée. Nous l'avons dit, les mollusques sont des organismes filtreurs sédentaires d'une grande importance dans le milieu aquatique qui peuvent bioconcentrer des métaux. Grâce à leurs branchies, les moules peuvent filtrer de grands volumes d'eau dépassant les  $7 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ , ce qui les rend particulièrement efficaces pour l'accumulation de polluants soluble dans l'eau de mer, mais également de particules (Maire et al., 2007). Ce taux de pompage dépend de caractéristiques comme la taille de l'individu et la surface des branchies.

La distribution des métaux dans les tissus des mollusques est essentielle pour comprendre les mécanismes d'accumulation, de transport, d'élimination, et pour obtenir des informations sur leur spéciation. Les données issues de techniques d'imagerie spectroscopique (*e.g.*, microscopies ioniques, électroniques) sont indispensables pour comprendre ces processus en examinant la répartition des métaux au niveau cellulaire et organique.

Les mécanismes d'accumulation des métaux peuvent être dus à la diffusion passive depuis l'eau de mer (Hinkle et al., 1987), à l'accumulation active (Verbost et al., 1989), à la contamination des sédiments (Phelps, 1989) et à l'ingestion d'aliments. Les métaux peuvent être introduits dans le système digestif par la consommation de nourriture, puis être transportés vers d'autres organes. Les microalgues *Isochrysis* et *Rhodomonas* sont les principales sources de nourriture pour les moules (Fernández-Reiriz et al., 2015; Riisgård et al., 2013; Rouillon and Navarro, 2003). Selon la spéciation du métal, il peut être assimilé lors du passage dans l'intestin ou rapidement éliminé dans les fèces (Fisher et al., 1996; Wang et al., 1996). L'apport alimentaire joue un rôle crucial dans les processus d'assimilation des métaux, et la réduction de la disponibilité alimentaire entraîne la fermeture de la coquille et une diminution de l'activité de filtration pour réduire le métabolisme (Maire et al., 2007).

Les données sur la répartition des métaux dans les cellules et organes des mollusques bivalves dans l'eau de mer à l'aide de microscopie ionique ou électronique sont limitées à quelques exemples et à quelques métaux. La présence de métal à l'échelle subcellulaire fournit des informations sur leur transport à travers les parois cellulaires, que ce soit par des mécanismes passifs (diffusion) ou actifs (en fonction de l'énergie) (Furness and Rainbow, 1990; Luoma, 1983).

Par exemple le cadmium peut être accumulé dans les branchies par diffusion passive ou en traversant les canaux calciques (Roesijadi and Unger, 1993). Les ions métalliques peuvent traverser les membranes biologiques par l'intermédiaire de transporteurs qui facilitent leur internalisation.

Les différentes formes métalliques suggèrent des mécanismes de détoxification spécifiques. En effet, une forme condensée peut impliquer un mécanisme induit par des lysosomes ou une excrétion. Sous sa forme soluble, un métal peut être complexé par des protéines (*e.g.* les métallothionéines) et être détoxifié dans l'organisme. Les métaux insolubles peuvent être internalisés par des mécanismes d'endocytose dans la glande digestive (George et al., 1975) et stockés dans des vacuoles cellulaires sous forme de granules. Cette réserve de métaux permet de les maintenir sous forme insoluble et de les excréter par exocytose (Brown, 1982; Viarengo, 1989). La distribution de ces métaux dans les cellules dépend des caractéristiques des vacuoles (Hopkin, 1989).

Les fèces permettent aux mollusques d'éliminer les métaux non assimilés ainsi que les granules excrétés par la glande digestive (Viarengo and Nott, 1993; Wang and Fisher, 1997). Certains métaux semblent pouvoir être éliminés lors de la formation de la coquille et du byssus. Dans le byssus, la présence de métaux dans des concentrations importantes suggère qu'ils puissent participer à la détoxification. Dans la coquille, la présence de métaux pourrait résulter de phénomènes d'adsorption et d'accumulation médiés par le manteau.

Le plasma sanguin participe aux transports de métaux tels que le Zn et le Cd entre les différents organes des mollusques bivalves (George and Pirie, 1980). Les cellules hémocytaires jouent un rôle essentiel dans le processus de transport des métaux contenus dans les fractions cytosoliques ou lysosomales. Bien que la composition du plasma sanguin soit riche en ligands (*e.g.*, carbonate, phosphates) qui pourraient le rendre propice à la formation de complexes métalliques, il n'est pas un compartiment majoritaire du stockage des métaux (Robinson and Ryan, 1988).

La glande digestive des mollusques est désignée comme le site principal d'accumulation et de stockage des métaux (*e.g.*, Cu, Zn, Fe,...) et de radionucléides métalliques (*e.g.*, <sup>241</sup>Am, <sup>134</sup>Cs) (Metian et al., 2011; Miramand and Germain, 1986). La distribution subcellulaire dans la glande digestive du zinc dans deux espèces de palourdes indique une répartition différente. Dans *Macoma balthica*, le zinc est associé majoritairement aux débris cellulaires alors que chez *Potamocorbula amurensis*, il est majoritairement contenu dans les organelles (Wallace et al., 2003; Wallace and Luoma, 2003). Cette différence de répartition peut être liée aux processus de détoxification qui régulent les métaux dans les cellules et dépendent de l'espèce. Dans la glande digestive, les métallothionéines assurant un rôle de détoxification sont capables de lier une grande variété de métaux (Amiard et al., 2006).

Les métallothionéines sont des protéines non enzymatiques de poids moléculaires faibles (~ 10 kDa), solubles et thermostables (Kägi and Kojima, 1987; Webb, 1987). Les métallothionéines sont essentielles dans les invertébrés marins et ont un rôle important dans l'homéostasie des métaux essentiels et leur disponibilité. Ces protéines ubiquitaires ont la capacité de se lier à de nombreux métaux lourds grâce à la présence de cystéines et leurs fonctions thiols (-SH) (Binz and Kägi, 1999). Dans les moules, la glande digestive est l'organe qui est le plus pertinent pour analyser les métallothionéines et plus généralement dans les

mollusques bien que cette famille de protéines soit également produite dans les branchies (UNEP, 1999). La concentration de métallothionéines dans les tissus est comprise entre 1-10 mg.g<sup>-1</sup> (masse sèche) d'après des mesures réalisées sur des mollusques provenant de site non pollué (Bebianno and Machado, 1997; Langston and Bebianno, 1998; Rainlet, 1998). Ces protéines sont utilisées comme des biomarqueurs dans les études sur les contaminations métalliques. En effet, leurs concentrations augmentent en réponse à la présence de métaux, ce qui permet une tolérance accrue dans de nombreux cas. Les métaux lourds sont suspectés d'avoir une influence sur la régulation des gènes des métallothionéines qui sont contrôlés par un inhibiteur sensible au zinc (Palmiter, 1994). L'induction des métallothionéines semble dépendre de plusieurs facteurs (période d'exposition, dose, espèce, métal) qui ne sont pas totalement compris. Les métallothionéines participent également à la détoxification de métaux essentiels (lorsqu'ils sont en excès) et non essentiels. Les cellules digestives peuvent endocytter des formes métalliques insolubles à leurs surfaces (Marigómez et al., 2002). Une fois les métaux stockés dans le système endolysosomal, ils peuvent être éliminés de la cellule par exocytose dans des corps résiduels. La composition de ces corps résiduels dans les cellules digestives indique que plusieurs métaux qui y sont stockés (*e.g.*, Cu, Cd, Fe), une fois extrudés de la cellule, ils peuvent être incorporés dans les fèces.

Enfin la glande digestive participe au système de défense antioxydant à l'aide de molécules tel que le glutathion. L'influence de polluants tels que les métaux de transition sur les mollusques peut être quantifiée grâce aux biomarqueurs, parmi lesquels les biomarqueurs du stress oxydant (Viarengo, 1989). Ils reflètent un déséquilibre dans la capacité de l'organisme à réguler les espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'augmentation des ROS entraîne différents types de dommages aux échelles tissulaires, cellulaires et subcellulaires. Pour contrer les ROS, plusieurs enzymes jouent un rôle dans le système de défense antioxydant. Parmi ces enzymes, on peut citer la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion-S-transférase (Regoli et al., 2004).

Enfin et plus généralement, un large spectre de polluants est étudié et surveillé dans les moules, tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Kasiotis and Emmanouil, 2015), les nanoparticules (Rocha et al., 2015), et les polychlorobiphényles (Arnot and Gobas, 2006), pour n'en citer que quelques-uns. Depuis quelques années, des microplastiques sont également retrouvés dans les mollusques, montrant l'impact de la contamination anthropique du milieu

## Chapitre 2 – Contexte général

marin et les risques liés à la pollution de l'eau de mer (Sridhar et al., 2022). Actuellement, plus de 140 polluants prioritaires peuvent être recherchés lors de la surveillance des bivalves (Kimbrough, K. L. et al., 2008).

# **Chapitre 3 – Le cobalt, un métal essentiel**



## I. L'élément et le radionucléide

Le cobalt est un élément de transition ayant un numéro atomique de  $Z = 27$ . Naturellement présent uniquement sous la forme de  $^{59}\text{Co}$ , sa configuration électronique est  $[\text{Ar}] 3d^7 4s^2$ . Dans les océans, sa concentration moyenne est de 60 ppt (Saito and Moffett, 2002). L'industrie chimique a un besoin croissant de cobalt, principalement dû à l'augmentation de la production de batteries qui représente 80 % de la consommation totale de cobalt en 2020. Le marché du cobalt a enregistré une croissance de 22 % en 2021 et cette tendance devrait se pérenniser en augmentant d'environ 13 % par année pour les cinq prochaines années ("Cobalt Institute," 2021).

Le cobalt possède de nombreux isotopes instables, avec un nombre de masse compris entre 47 et 75. La plupart ont une demi-vie inférieure à une seconde, seuls quatre ont une demi-vie supérieure à un jour : le  $^{56}\text{Co}$ , le  $^{57}\text{Co}$ , le  $^{58}\text{Co}$  et le  $^{60}\text{Co}$ . Parmi eux, le  $^{60}\text{Co}$  a la plus longue durée de vie (5,27 ans) et une activité spécifique de  $4,2 \times 10^{13} \text{ Bq.g}^{-1}$ . Son origine est exclusivement anthropique, la production industrielle de  $^{60}\text{Co}$  est effectuée dans des réacteurs nucléaires par capture neutronique du cobalt stable. Dans les centrales, on retrouve également des radiocobalts dus à des phénomènes de corrosion-érosion de particules métalliques dans l'eau qui peuvent être activées lors de leurs passages dans le flux neutronique du réacteur. En 2003, les émissions des radiocobalts représentaient 39 % de l'activité gamma totale rejetée par les centrales nucléaires électriques de France dans les effluents sous forme liquide (Le Guen and Ansoberlo, 2006). Le rejet annuel de  $^{60}\text{Co}$  sur le site de La Hague en 2022 représente 129 GBq, bien en deçà de la limite fixée à 1 400 GBq. Le  $^{60}\text{Co}$  est produit pour des utilisations dans le domaine médical, industriel et de recherche. Sa désintégration donne du  $^{60}\text{Ni}$  par émission  $\beta^-$  (0,31 MeV), puis par émission de rayons gamma à 1,17 MeV et 1,33 MeV (Figure 31). La présence de  $^{60}\text{Co}$  dans l'environnement est limitée par sa durée de vie relativement courte, cependant, sa présence autour des usines de retraitement du combustible nucléaire usé (La Hague et Sellafield) est bien documentée.

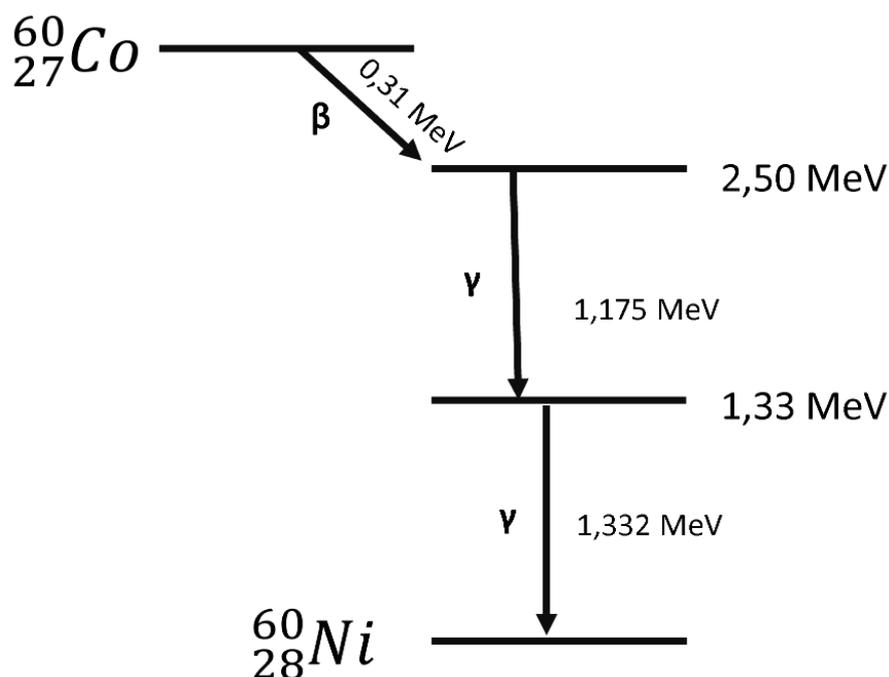


Figure 31. Simplification de la décroissance du  $^{60}\text{Co}$  en  $^{60}\text{Ni}$ .

Deux degrés d'oxydation sont majoritaires pour le cobalt, le Co (II) et le Co (III). Le potentiel standard du couple  $\text{Co}/\text{Co}^{2+}$  est de  $-0,28 \text{ V}$  et celui du couple  $\text{Co}^{2+}/\text{Co}^{3+}$  est de  $1,81 \text{ V}$ . En solution aqueuse, le  $\text{Co}^{2+}$  est le plus stable et majoritaire. Le  $\text{Co}^{3+}$  est peu soluble dans l'eau ( $K_{\text{sp}} \text{Co}(\text{OH})_3 = 10^{-44,5}$ ) et nécessite la présence de molécules organiques chélatantes pour être observé en solution (e.g., la cobalamine) (Smith, 1976). Selon le principe de HSAB, le  $\text{Co}^{2+}$  est un acide ambigu c'est-à-dire qu'il peut réagir comme un acide mou ou dur selon les réactions. L'espèce ( $\text{Co}^{2+}$ ) en solution aqueuse jusqu'à pH 8 est un complexe aquo,  $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ , noté  $\text{Co}^{2+}_{\text{aq}}$  et adoptant une conformation octaédrique. Le  $\text{Co}^{3+}$  est considéré comme un acide dur et réagissant avec des bases dures (Pearson, 1997, 1963).

Cependant, il est important de noter que le cobalt est fortement lié à des ligands dans l'eau douce, bien que la nature exacte des complexes formés ne soit pas toujours déterminée. Ces ligands peuvent donc impacter la spéciation du cobalt en solution (Albrecht, 2003). En effet, il existe des disparités importantes entre les données acquises à l'aide de code de simulation de spéciation et les données empiriques (Balistrieri et al., 1994; Qian et al., 1998). Dans l'eau de mer, la spéciation inorganique du cobalt peut être déterminée par des outils de modélisation et indique que les espèces  $\text{Co}^{2+}$  (45 %),  $\text{CoCl}^+$  et  $\text{CoSO}_4^-$  sont majoritaires (Figure 32) (Collins and Kinsela, 2010; Ćosović et al., 1982; Mubiana and Blust, 2007). Les

ligands complexés au cobalt dans l'eau de mer ne sont pas bien caractérisés, leur origine pourrait venir en partie de cyanobactéries (Saito et al., 2005).

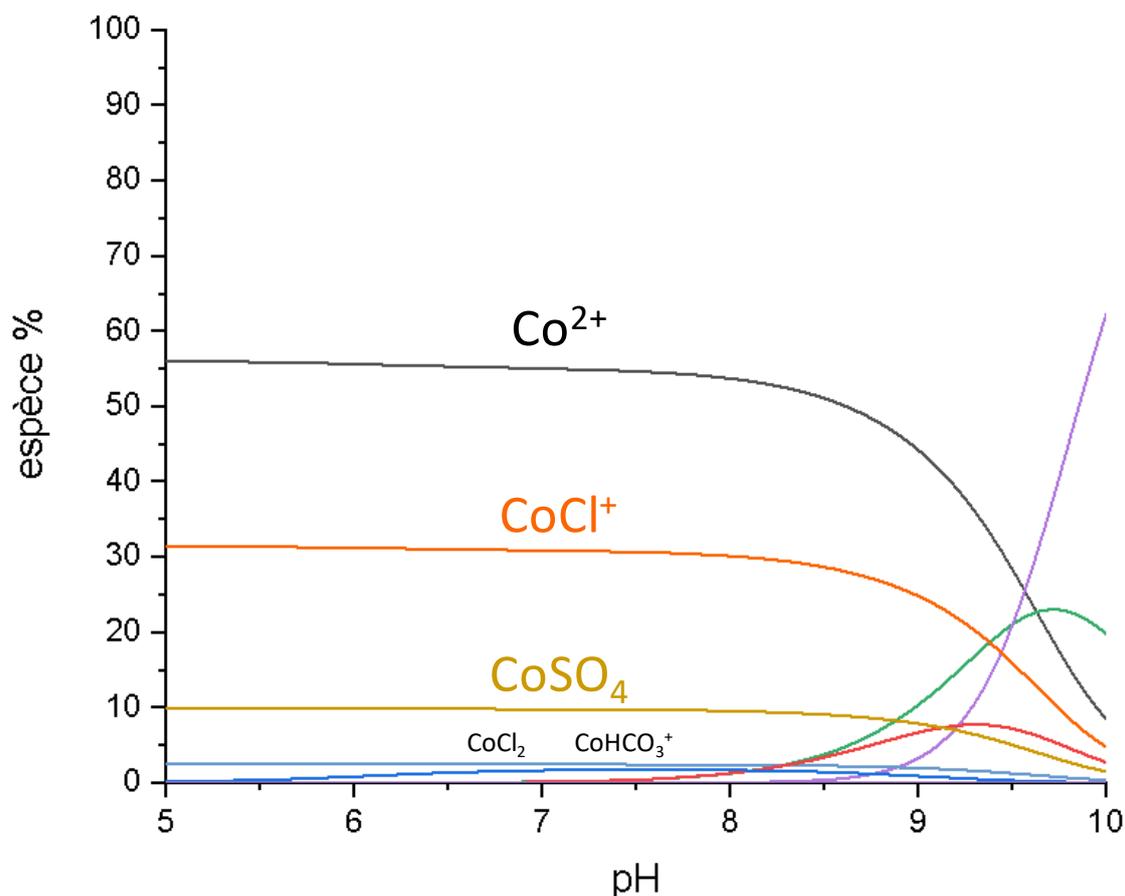


Figure 32. Diagramme de spéciation du  $Co^{2+}$  dans l'eau de mer ( $[Co]=10^{-6}M$ ) simulé par le logiciel JCHESS.

Dans les océans, la distribution du cobalt dissous varie en fonction de la profondeur. En effet, les eaux de surface ont tendance à avoir une concentration inférieure en cobalt dissous par rapport aux eaux profondes. Ce phénomène s'explique notamment par l'accumulation biologique du cobalt par des espèces planctoniques et de cyanobactéries qui produisent des ligands complexant le cobalt (Bown et al., 2011; Saito and Moffett, 2002). De plus, la concentration en cobalt inorganique est inversement proportionnelle à la concentration de ligands, ce qui concorde avec l'importance d'un contrôle biologique sur la spéciation du cobalt. La mesure des constantes de complexation conditionnelles de ces ligands avec le cobalt indique une forte stabilité des complexes formés ( $\log K_{CoL}'=15.6$  à  $16.8$ ) (Ellwood et al., 2005). Concernant la partie insoluble du cobalt, l'espèce  $CoFe_2O_4$  est considérée comme majoritaire dans les conditions compatibles avec l'eau de mer (Glasby and Schulz, 1999).

## II. Le cobalt dans les processus biologiques

### 1) Un métal essentiel

Le cobalt est un métal important dans le vivant et fait partie des 24 métaux essentiels dans les systèmes biologiques. Il est nécessaire à l'activité des animaux, mais nécessite une forme particulière pour être assimilé, la cobalamine (vitamine B<sub>12</sub>). Elle fait partie des vitamines B qui regroupent huit vitamines hydrosolubles (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>7</sub>, B<sub>8</sub>, B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub>). La vitamine B<sub>12</sub> est constituée d'un atome cobalt central (acide cobyrique) complexé à un noyau corrinnoïde tétrapyrrolique (Figure 33). Les ligands axiaux en position  $\alpha$  (inférieur) et  $\beta$  (supérieur) de la cobalamine peuvent varier. On retrouve en effet différentes formes de cobalamines, la notation diffère suivant le ligand en position  $\alpha$  :

5,6-diméthylbenzimidazole (DMB) : Cobalamine

Adénine : pseudo-cobalamine

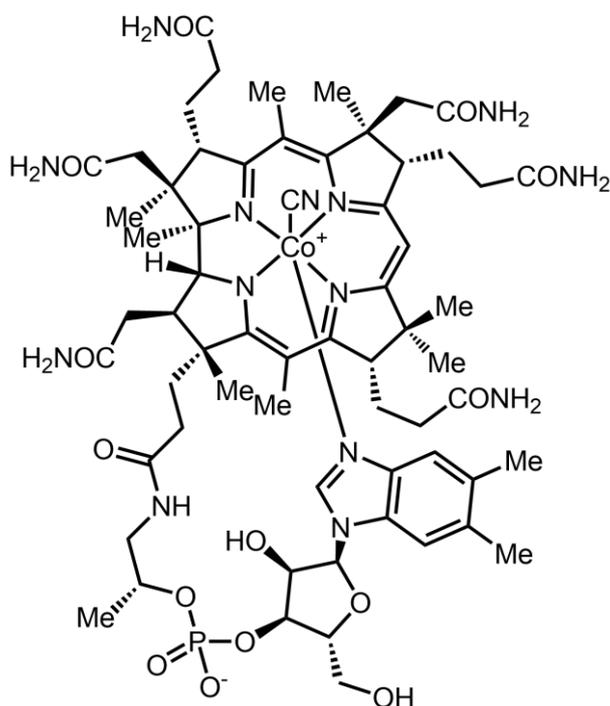


Figure 33. Structure moléculaire de la cyanocobalamine. (CNCbl-Vitamine B<sub>12</sub>)

Les ligands en position  $\beta$ -axial peuvent être les suivants : 5'deoxyadénosine (Ado), -CH<sub>3</sub> (Me), -CN, -OH avec les nomenclatures respectives Adénosylcobalamine (AdoCbl),

Méthylcobalamine (MeCbl), Cyanocobalamine (CNCbl), Hydroxycobalamine (OHCbl). La OHCbl est la forme la plus stable, elle est principalement formée à partir de la MeCbl et l'AdoCbl qui sont sensibles aux rayonnements UVA (Juzeniene and Nizauskaite, 2013). Les formes CNCbl et OHCbl sont principalement utilisées comme suppléments, agent thérapeutique, préparation de milieu nutritifs dans la culture des microalgues qui sont auxotrophes à ce micronutriment pour la moitié d'entre eux (Croft et al., 2005).

La CNCbl est une forme artificielle qui nécessite la présence de cyanure ( $\text{CN}^-$ ) dans le processus d'extraction. Cette forme (CNCbl) a une stabilité plus importante que les formes AdoCbl et MeCbl cependant seules ces dernières sont biochimiquement actives dans le corps humain (Taga and Walker, 2008). La cobalamine ne peut être synthétisée que par certains procaryotes dans l'environnement marin et nécessite plus de 30 gènes pour sa biosynthèse (Warren et al., 2002). Les algues ont besoin d'un apport en cobalamine pour synthétiser la méthionine synthase (Kazamia et al., 2012). Bien que les végétaux terrestres et mycètes n'aient pas besoin de vitamine B<sub>12</sub> pour leur croissance, les algues semblent avoir perdu au cours de l'évolution le gène codant une forme de la méthionine synthase indépendante de la vitamine B<sub>12</sub> (Helliwell et al., 2011). Chez les animaux, l'apport de cobalamine provient de la fermentation bactérienne chez les herbivores et de la consommation d'herbivore chez les carnivores.

Dans le milieu marin, la cobalamine ne représente qu'un millième du cobalt soluble (Nolan et al., 1992). Néanmoins, elle joue un rôle très important dans les processus d'assimilation du cobalt par les organismes vivants, comparé au  $\text{Co}^{2+}$ . L'apport de vitamine B<sub>12</sub> par l'alimentation améliore son assimilation par rapport à la cobalamine en solution (Amiard-Triquet and Amiard, 1975; Wang et al., 1996). Les processus d'assimilation du cobalt montrent également des différences lors de contaminations par des formes organiques et inorganiques, suggérant respectivement une distribution dans les branchies et dans les glandes digestives (Ueda et al., 1982).

## 2) Toxicité et bioaccumulation

La toxicité du cobalt dans le milieu marin est peu documentée et les études sur sa spéciation dans le biote marin sont encore plus limitées (Markich, 2002; Saili et al., 2021). Un grand nombre d'études ont permis d'élucider les mécanismes d'accumulation de certains métaux

à l'échelle cellulaire et tissulaire dans les mollusques. Cependant, ces données font défaut pour le cobalt qui n'a pas été cartographié dans les mollusques. Les travaux qui ont été effectués avec des organismes marins exposés à du cobalt portent essentiellement sur la mortalité, la quantification et la reproduction. La plupart des données et des méthodes ne sont pas assez robustes pour déterminer la toxicité du cobalt marin et comparer les études.

Le lien entre la toxicité et la concentration d'exposition peut être mesuré par la  $CL_{50}$  (Concentration Létale 50 %) qui désigne la concentration à laquelle 50 % des individus meurent ou par la CE (concentration efficace) qui indique le pourcentage de la population qui présente un effet pendant une période temporelle définie. Une étude comparative entre 10 espèces montre des différences de sensibilité au cobalt entre 1,23  $ng.mL^{-1}$  (algue rouge, Durée 9 jours dont deux 2 jours d'exposition) et 31,8  $\mu g.mL^{-1}$  (Vairon à tête de mouton, Durée 28 jours), la tolérance varie fortement en fonction de l'espèce étudiée (Saili et al., 2021). Le cobalt peut avoir un impact sur le développement embryonnaire avec une  $CL_{50}$  autour de 150  $ng.mL^{-1}$  dans plusieurs espèces telles que les moules ou les oursins (Rulon, 1956; Saidov and Kosevich, 2019). Le cobalt est un élément essentiel qui se trouve être toxique pour les animaux lorsqu'il n'est pas assimilé sous forme de cobalamine (Barceloux and Barceloux, 1999; Ménager et al., 2009).

Parmi les informations disponibles sur la quantification du cobalt marin, on retrouve des exemples dans des organismes tels que des phytoplanctons (*e.g. Thalassiosira pseudonana*), des mollusques (*e.g. Patella, Mytilus*) et des poissons (*e.g. Terapon jarbua*) (Olker et al., 2022). Des mollusques (*Patella*) et des algues (*Fucus*) ont été utilisés comme organismes sentinelles pour détecter les concentrations de cobalt stable près de La Hague. Les concentrations de cobalt stable accumulées chez les *Patella* dans leur environnement naturel varient entre 0,1-0,6  $\mu g.g^{-1}$  (masse sèche) ce qui est comparable avec d'autres études réalisées sur cet organisme (0,4  $\mu g.g^{-1}$ ) (Segar et al., 1971); 0,24-1,56  $\mu g.g^{-1}$  (Bryan and Hummerstone, 1977); 0,2-1,6  $\mu g.g^{-1}$  (Bryan, 1983; Miramand and Bentley, 1992).

Les isotopes radioactifs du cobalt ( $^{57}Co$ ,  $^{58}Co$  et  $^{60}Co$ ) ont toujours été étudiés pour comprendre leur devenir suite aux essais nucléaires et dans les effluents des centrales nucléaires (*Radioactive Contamination of the Marine Environment*, 1973). La mesure de ces radiocobalts dans les organismes vivants présente deux intérêts majeurs : permettre de comprendre le

transfert de cet élément dans les organismes marins et évaluer l'impact radiologique de la consommation de ces produits de la mer par l'Homme. Plusieurs études ont été menées sur les côtes du Nord Cotentin pour évaluer l'impact de l'usine de retraitement de La Hague, qui rejetait 385 GBq de  $^{60}\text{Co}$  en 1999 (Rivasi, 2000). Le  $^{60}\text{Co}$  a ainsi été détecté dans des algues attribuables à l'activité des usines de retraitement des déchets (Gaudaire, 1999). Afin de comprendre l'impact des radiocobalts sur la santé humaine, des analyses sont menées chaque année près de l'usine de retraitement. L'état de l'eau de mer côtière et au large des usines de retraitement est surveillé grâce à plusieurs espèces marines (*e.g.*, algues, coquillages, poissons) (*OSPAR commission*, 2010). Des bivalves (*Patella*) ont été collectés dans des zones proches de l'usine de La Hague. La quantification du cobalt montre que la concentration accumulée fluctue en fonction de la saison, la température de l'eau est corrélée négativement à la concentration dans les mollusques (Boalch 1981, Miramand 1992). L'exposition de moules en laboratoire effectué par Moleiro et ses collaborateurs a montré qu'une augmentation de la température de l'eau de mer de 17°C à 21°C n'induisait pas une augmentation significative ( $25,2 \pm 7,9$  à  $33,9 \pm 3,6 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) de cobalt accumulé chez *M. galloprovincialis*.

Dans les mollusques bivalves (*M. galloprovincialis*), les mesures dans les tissus mous ont révélé des concentrations de cobalt de quelques  $\mu\text{g.g}^{-1}$  ( $2,05$ - $2,54 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) (Szefer et al., 2002). Ces données sont cohérentes avec la valeur de CF du cobalt recommandé dans les mollusques qui est estimé à  $2 \times 10^4$  par l'AIEA (IAEA, 2004). Les résultats de plusieurs études s'accordent à dire que les tissus mous accumulant le plus de cobalt sont les branchies et la glande digestive (Ishii et al., 1986; Pentreath, 1973; Shimizu et al., 1971). Des extractions du cytosol des cellules de glandes digestives de moules indiquent une quantité importante de cobalt associée à des masses moléculaires faibles entre les métallothionéines (6,5 kDa) et la cystéine (<1 kDa) (Claudio Néstor Ferrarello et al., 2000a, 2000b).

La détection de  $^{60}\text{Co}$  à des concentrations environnementales est rendue possible grâce à la spectrométrie gamma, qui présente une sensibilité importante, pouvant atteindre  $200 \text{ mBq.kg}^{-1}$  (Renaud P., 2010). De plus, les radiotraceurs de cobalt ( $^{57}\text{Co}$ ,  $^{58}\text{Co}$  et  $^{60}\text{Co}$ ) permettent de travailler avec des concentrations très faibles et de suivre facilement sa répartition dans les différents organes. Une étude comparative a permis de mettre en évidence des différences dans l'accumulation du cobalt en fonction de sa spéciation (Nolan et al., 1992). Des phytoplanctons (*Dunaliella tertiolecta* et *Chaetoceros pseudocurvisetum*) ont été exposés à du

$^{60}\text{CoCl}_2$  et à de la cobalamine ( $^{57}\text{Co}$ ), montrant l'importance de la spéciation dans les processus de bioaccumulation. Les facteurs de concentration sont supérieurs lorsque les phytoplanctons sont exposés à de la cobalamine ( $\times 67$ ). L'assimilation diffère en fonction de la forme du cobalt, avec une demi-vie biologique de quatorze jours suite à l'exposition à la cobalamine et de quatorze heures avec la forme inorganique ( $\text{CoCl}_2$ ). Des résultats similaires ont été obtenus avec l'exposition de poissons (*Serranus scriba*) qui accumulent la cobalamine radiomarquée 21 fois plus rapidement que la forme inorganique. L'étude de la rétention du cobalt a permis de mettre en évidence deux cinétiques. La cobalamine est excrétée rapidement (66 %) avec une demi-vie biologique de huit jours, tandis qu'avec le  $\text{CoCl}_2$ , la majorité (95 %) est éliminée après onze heures de contamination. Cette excrétion rapide montre la non-assimilation du cobalt inorganique par les poissons. Le cobalt assimilé présente un temps de demi-vie biologique similaire, indépendamment de sa spéciation (47 jours / 54 jours). Une autre étude menée sur des moules a aussi mis en évidence l'importance de la spéciation du cobalt dans son accumulation. Nishiwaki et ses collaborateurs ont exposé des moules à du  $^{60}\text{CoCl}_2$  et à du  $^{57}\text{Co}$ -trisglycinate. Le facteur de concentration des moules exposés au  $^{60}\text{CoCl}_2$  est supérieur ( $\times 10$ ) à celui du complexe organique (Nishiwaki et al., 1981). De plus, le temps de vie biologique est plus long lors de l'exposition au  $^{60}\text{CoCl}_2$ , ce qui indique une meilleure assimilation du cobalt sous cette forme.

Notre laboratoire a étudié la spéciation du cobalt afin d'expliquer les mécanismes de son accumulation chez un animal marin, l'oursin, *Paracentrotus lividus* (Reeves et al., 2022). Les études menées sur cette espèce suggèrent que le cobalt est associé à des toposomes, qui sont des protéines riches en fonctions carboxyliques et majoritaires chez *Paracentrotus lividus*.

### III. Étude de l'accumulation du cobalt par les moules *M. galloprovincialis*

#### 1) Accumulation du cobalt à l'échelle des ultra-traces : contamination au $^{60}\text{Co}$

Une première étape de l'étude de la contamination des moules par le cobalt a consisté à considérer des concentrations de métal environnementales, c'est-à-dire à l'échelle des ultra-traces. Cette première approche qui ne permet pas d'étude spectroscopique permet néanmoins de faire le lien entre le milieu naturel et les études en laboratoire.

Le Tableau 8 synthétise les conditions expérimentales de contamination. Le byssus, la glande digestive ainsi que les autres tissus mous (comprenant le pied, le manteau, les branchies et le corps viscéral) ont été soumis à une analyse par spectrométrie gamma en vue de quantifier l'accumulation de  $^{60}\text{Co}$  dans les moules. Dans le cadre de cette expérience, le nombre d'organes et d'individus a été limité afin de s'adapter aux contraintes temporelles associées aux analyses gamma (voir partie Matériels et méthodes).

Tableau 8. Conditions expérimentales des contaminations pour la quantification du  $^{60}\text{Co}$  dans les moules.

Provenance des moules	Villefranche-sur-Mer
Nombre de spécimens	15
Volume	10 L
Analyse organe	Glande digestive, Tissus mous (incluant le pied, le manteau, les branchies et le corps viscéral), Byssus
Concentration d'exposition $^{60}\text{Co}$ + entraîneur $^{59}\text{Co}$	$^{60}\text{Co}$ : $95 \text{ Bq.L}^{-1}$ ( $4 \times 10^{-14} \text{ M}$ ) $^{59}\text{Co}$ : $\sim 5 \times 10^{-8} \text{ M}$
Durée	12 jours (changement d'eau à J+5)

La contamination de l'eau de mer au  $^{60}\text{Co}$  à l'échelle des ultra-traces à une concentration de  $95 \text{ Bq.L}^{-1}$ , (équivalent à  $4 \times 10^{-14} \text{ M}$ ) permet d'être en deçà de la concentration naturelle de cobalt dans l'eau de mer, qui se situe autour de  $10^{-11} \text{ M}$ . Cependant la solution commerciale de  $^{60}\text{Co}$  contient du  $^{59}\text{Co}$  ( $30 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) qui est utilisé comme entraîneur pour stabiliser le  $^{60}\text{Co}$ . La concentration finale de cobalt dans l'aquarium est principalement due à l'entraîneur et correspond à  $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ . Il convient de noter que le  $^{60}\text{Co}$  a une durée de vie relativement courte (5,27 ans), ce qui rend sa présence dans l'eau de mer indétectable (Annexe Figure 92). La Figure 34 illustre l'accumulation du  $^{60}\text{Co}$  dans les différents organes des moules. **Le byssus et la glande digestive s'avèrent être les compartiments qui accumulent la plus grande concentration de cobalt.**

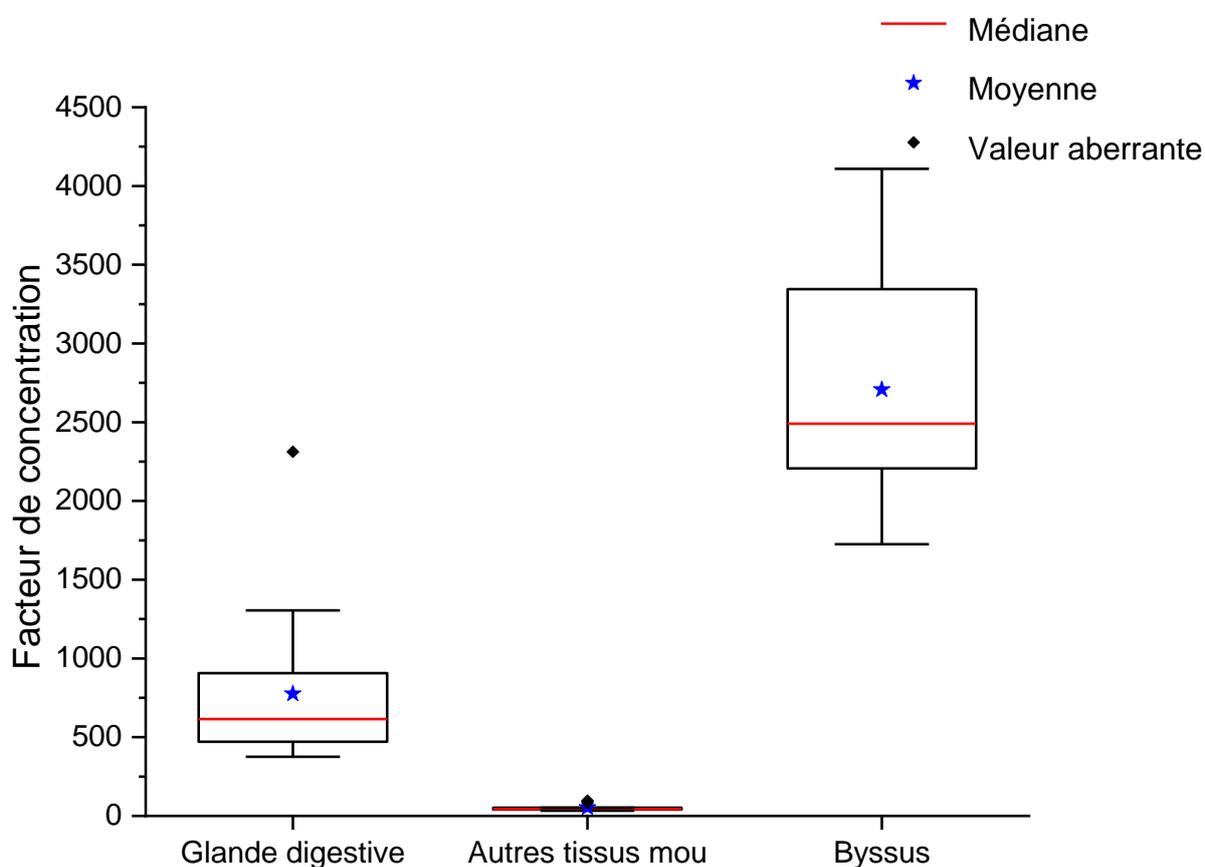


Figure 34. Accumulation du  $^{60}\text{Co}$  dans différents organes de la moule après 12 jours d'exposition à  $100 \text{ Bq.L}^{-1}$ .

Les facteurs de concentration dans le byssus ( $\bar{x} = 2707 \pm 439$  ;  $n = 12$ ), la glande digestive ( $\bar{x} = 775 \pm 261$  ;  $n = 15$ ) et les autres tissus mous ( $\bar{x} = 53 \pm 21$  ;  $n = 13$ ) semblent cohérents avec les tendances trouvées dans la littérature. Dans des expériences reportées par

Carvalho et ses collaborateurs avec également la moule *M. galloprovincialis* (exposé à du  $^{60}\text{Co}$   $74 \text{ kBq.L}^{-1}$ ) pendant 30 jours, un facteur de concentration de  $2699 \pm 441$  a été mesuré dans le byssus, et de  $170 \pm 82$  dans les viscères contenant probablement la glande digestive (Carvalho, 1987). On remarque que le facteur de concentration dans le byssus est proche de la valeur que nous avons pu obtenir.

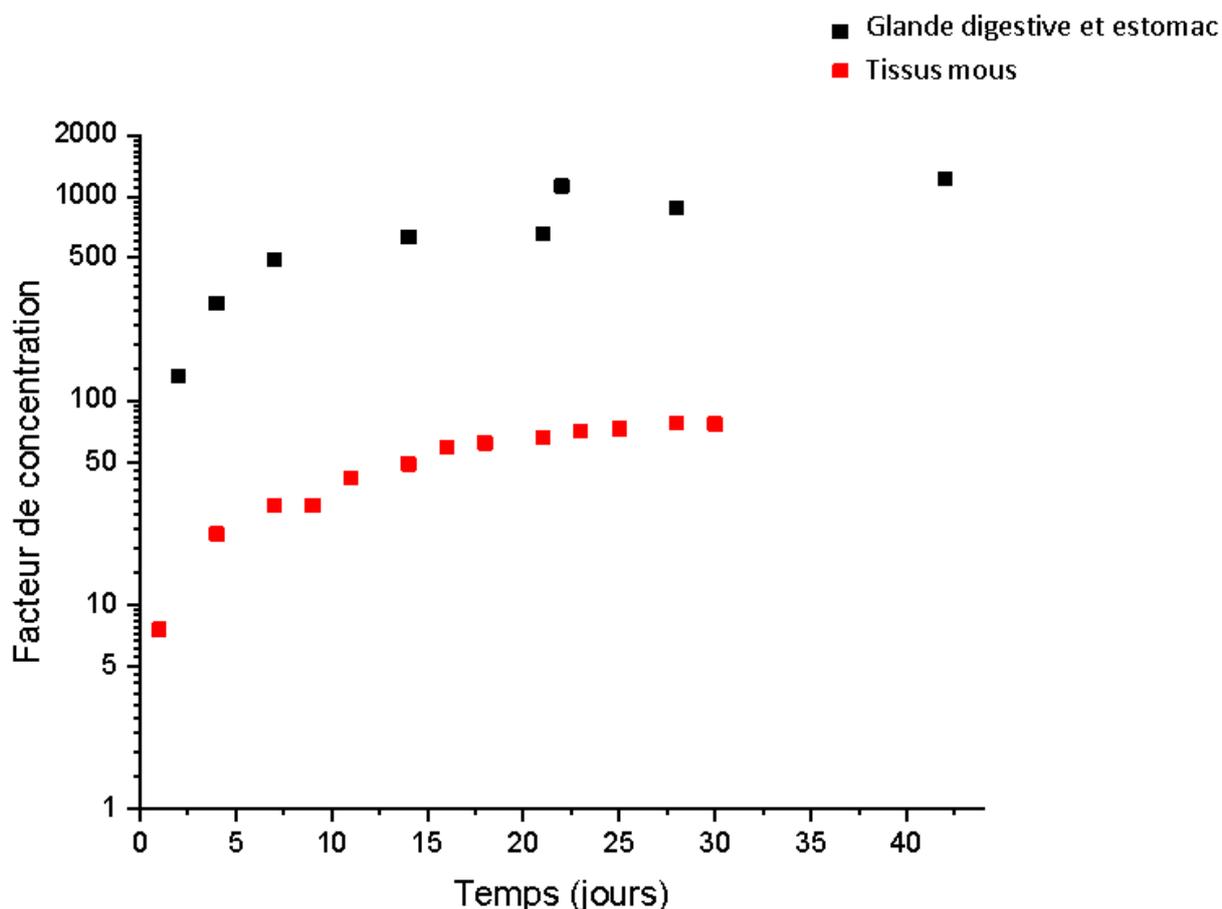


Figure 35. Comparaison des facteurs de concentrations du cobalt dans la glande digestive (carré noir) de moule exposée à de l'eau de mer dopée au  $^{58}\text{Co}$  pendant 42 jours et dans les tissus mous (carré rouge) de moule exposée à de l'eau de mer dopée au  $^{60}\text{Co}$  pendant 30 jours. Le graphique est reproduit d'après les figures de Pentreath et de Carvalho (Modifié d'après: Carvalho, 1987; Pentreath, 1973).

De plus, l'étude de Carvalho et ses collaborateurs, représentée Figure 35 semble montrer une première phase d'accumulation rapide du cobalt jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour, suivie d'une accumulation plus lente et d'une stabilisation de la courbe. Même après environ 30 jours d'exposition des moules, l'état d'équilibre n'est pas encore atteint. Dans le cas des éléments essentiels, les facteurs de concentration mesurés dans les tissus de moules après l'exposition à

des radionucléides sont toujours plus faibles que ceux de l'élément stable. En effet, la capacité d'échange entre le radionucléide et l'élément stable dépend notamment de la concentration dans l'eau de mer et de facteurs biologiques. **Ce qui implique que l'état d'équilibre est rarement atteint lors de contaminations en laboratoire avec des radionucléides.**

De plus, le facteur de concentration recommandé par le TRS 2004 pour les mollusques est de 20 000. Cette valeur est calculée à partir de la concentration moyenne de cobalt dans les mollusques ( $0,25 \text{ mg.kg}^{-1}$  de masse humide), en se basant sur des données relatives aux éléments stables provenant d'organismes prélevés dans des environnements non pollués. Les mollusques englobent un large éventail d'espèces, comprenant des gastéropodes, des organismes benthiques (épifaune et endofaune) tels que des bivalves. Par conséquent, les facteurs de concentration de notre étude doivent être comparés aux données des espèces étudiées les plus proches. Les facteurs de concentration issus d'expériences en laboratoire réalisées avec des organismes bivalves et des contaminations au  $^{60}\text{Co}$  présentent des valeurs comprises entre  $10^1$  et  $10^3$  (Carvalho, 1987; Gomez et al., 1987; Pentreath, 1973).

Une autre étude menée avec *M. eludis* exposée au  $^{58}\text{Co}$  ( $37 \text{ kBq.L}^{-1}$ ) pendant 42 jours a montré que la glande digestive accumule la plus grande quantité de cobalt, avec le facteur de concentration le plus élevé parmi les tissus mous analysés (Figure 35) (Pentreath, 1973). Les facteurs de concentration dans les autres organes sont similaires dans les deux études, malgré les différences de conditions expérimentales. Par exemple, le facteur de concentration reporté dans le manteau par Pentreath est de 27 et celui reporté par Carvalho est de 24.

Dans notre cas, le **facteur de concentration observé** dans les tissus mous et la glande digestive est **nettement inférieur à ceux disponibles dans la littérature**. Cependant, les deux expériences mentionnées précédemment ont utilisé le poids humide des mollusques pour calculer les facteurs de concentration, tandis que nous utilisons le poids sec. Pour convertir du poids humide au poids sec, une approximation consiste à diviser le facteur de concentration par 0,18 (IAEA, 2004). Mais l'absence d'information concernant les protocoles analytiques dans les études précédemment citées ne permet pas d'utiliser ce facteur de conversion avec confiance. La différence avec nos résultats a donc été attribuée en partie à la différence entre le poids humide et le poids sec. Contrairement aux tissus mous, le byssus étant une structure inerte,

il contient une plus faible proportion d'eau que les tissus mous. Dans les fils de byssus, la différence entre la masse humide et la masse sèche est relativement faible, ce qui explique que la valeur du facteur de concentration soit proche de celle obtenue dans la littérature (Ce travail  $\bar{x} = 2\,707 \pm 439$  ;  $n = 12$  ; Carvalho  $2\,699 \pm 441$  ;  $n = 5$ ).

## 2) Étude comparative de l'accumulation de cobalt stable chez les moules

Afin de pouvoir réaliser des études spectroscopiques sur le cobalt dans les moules, des concentrations supérieures de plusieurs ordres de grandeur à celles utilisées dans le paragraphe précédemment doivent être considérées. Dans ce cas, le  $^{59}\text{Co}$  (stable) peut être utilisé afin de contaminer les moules.

### a) Accumulation des métaux chez les moules de différentes origines : cas de Villefranche-sur-Mer et la petite rade de Toulon

L'accumulation du cobalt en fonction du site de prélèvement a été étudiée dans les moules provenant de Villefranche-sur-Mer et de la petite rade de Toulon. Les conditions d'exposition au cobalt sont résumées dans le Tableau 9 et la répartition des individus selon la taille est disponible dans la partie Matériels et méthodes (Figure 3). Chacune des deux cohortes de moules a été divisée en deux groupes distincts. Le premier groupe a été dédié à **l'analyse du cobalt présent dans la moule entière**, tandis que le second groupe a permis de **quantifier la présence de cobalt dans différents organes** (pied, manteau, glande digestive, corps viscéral, branchies).

Tableau 9. Conditions expérimentales des contaminations pour la quantification du cobalt dans les moules provenant de Villefranche-sur-Mer et la petite rade de Toulon.

Provenance des moules	Villefranche-sur-Mer	Petite rade de Toulon
Nombre de spécimens	45	45
Volume (L)	12	12
Répartition analyse moule entière/organe	21/24	29/16
Concentration d'exposition $^{59}\text{Co}$ (M)	$10^{-6}$ M	$10^{-6}$ M
Durée	12 jours (changement d'eau à J+5)	12 jours (changement d'eau à J+5)
Alimentation T. Iso $10^4$ cellules/moules	Tous les 3 jours	Tous les 3 jours

Dans un premier temps, à la fin de la période d'exposition de 12 jours, les moules ont été disséquées et les tissus mous quantifiés. Les données ont ensuite été traitées à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA), suivie d'un test post-hoc de Schéffé (Annexe VI). L'analyse des moyennes entre les deux groupes révèle des **différences significatives** ( $F=77$ ,  $p < 0.05$ ), permettant de conclure qu'il y a une variation de l'accumulation dans les tissus en fonction de l'environnement d'origine des moules. **Les moules provenant de la petite rade de Toulon ( $\bar{x} = 322 \pm 47$  ;  $n=29$ ) présentent une accumulation plus élevée de cobalt dans les tissus mous que les moules de Villefranche-sur-Mer ( $\bar{x} = 74 \pm 12$  ;  $n= 21$ )** (Figure 36).

Nos données sont cohérentes avec celles disponibles dans la littérature en termes d'ordres de grandeur. Cependant, il convient de noter que les données provenant de la littérature sont difficiles à comparer entre elles, ainsi qu'avec les données résultant de nos propres contaminations. En effet, les choix d'espèces, les durées d'exposition, les concentrations, les modes de nutrition et les changements d'eau diffèrent, et certaines données méthodologiques de la littérature sont lacunaires (*e.g.*, la concentration de contamination).

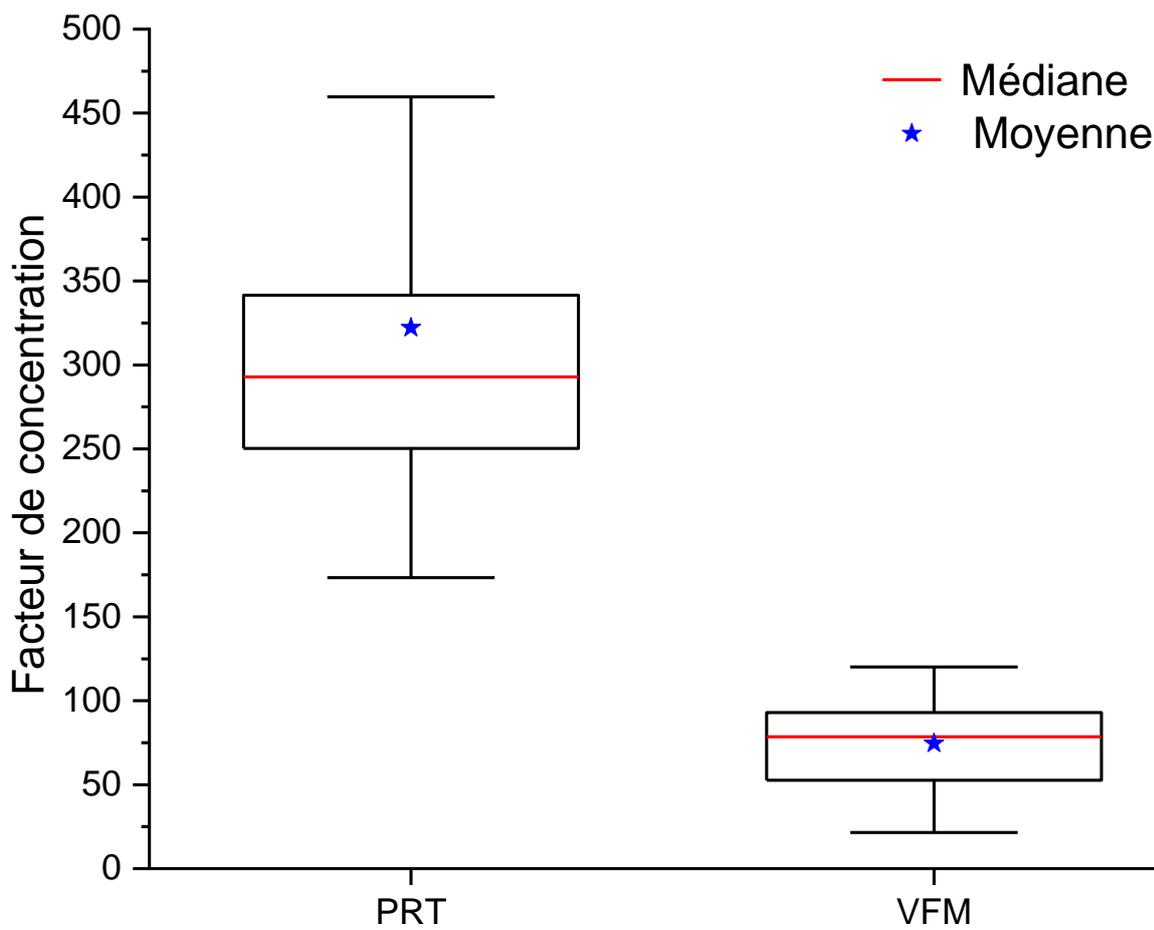


Figure 36. Facteur de concentration dans les moules entières (masse sèche) en fonction de leurs lieux de récolte (PRT : petite rade de Toulon ; VFM : Villefranche-sur-Mer)

Dans un deuxième temps, une seconde cohorte des moules exposées au cobalt pendant 12 jours a été disséquée et les organes séparés afin d'y quantifier la concentration de cobalt. Cette démarche a permis de déterminer dans quels organes le cobalt s'accumule, contribuant ainsi à une meilleure compréhension des mécanismes de bioaccumulation. Les facteurs de concentration observés dans les organes suivent une tendance relative similaire pour les moules de Villefranche-sur-Mer et de la petite rade de Toulon : **la glande digestive > les branchies > le corps viscéral > le manteau > le pied.**

La Figure 37 compare les facteurs de concentrations obtenues dans les différents organes de moules exposées à de l'eau de mer dopée en cobalt en fonctions de leurs origines. Les données issues de la quantification des organes de chaque cohorte ont été analysées de manière indépendante à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA), suivie d'un test post-hoc de Scheffé. Les résultats Figure 37 ont révélé une **différence significative du facteur de**

**concentration dans la glande digestive** par rapport aux autres organes, quelle que soit l'origine des moules (Villefranche-sur-Mer :  $F=80$ ,  $p < 0,05$  ; Toulon :  $F=68$ ,  $p < 0,05$ ).

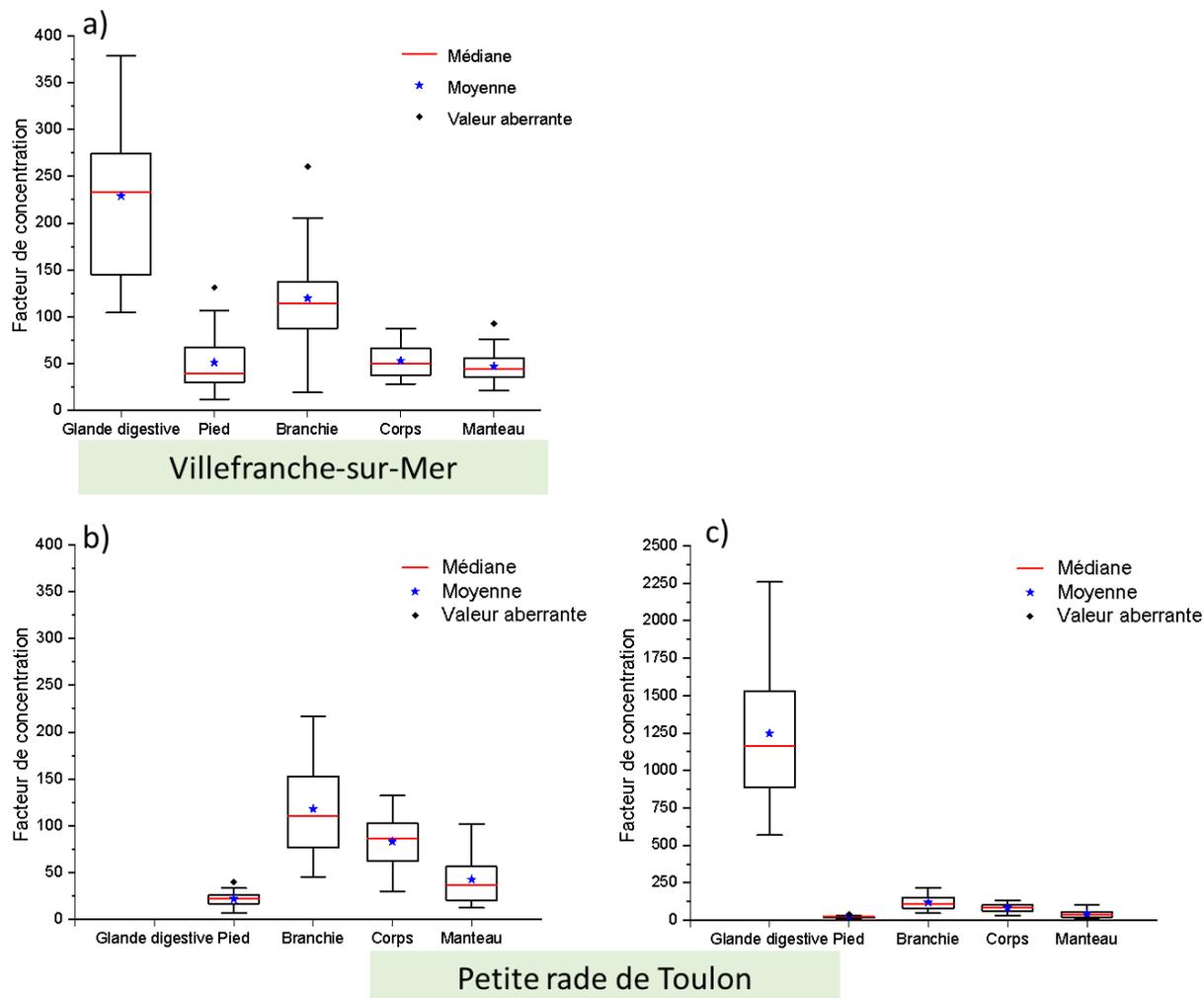


Figure 37. Facteur de concentration dans différents organes (masse sèche) de moules en fonction de leurs lieux de récolte. a) Moules provenant de Villefranche-sur-Mer, b,c) Moules provenant de la petite rade de Toulon. Sur c) l'échelle en ordonnée est dilatée.

La même procédure a été appliquée pour comparer les organes entre les deux cohortes, mettant en évidence que le **facteur de concentration de la glande digestive** ( $\bar{x} = 1\,247 \pm 242$  ;  $n = 16$ ) est **significativement plus élevé** chez les moules provenant de la **petite rade de Toulon** que chez les moules provenant de Villefranche-sur-Mer ( $\bar{x} = 229 \pm 32$  ;  $n = 24$ ).

Ces résultats pourraient s'expliquer par une adaptation des moules de la rade de Toulon, augmentant leurs capacités d'accumulation en présence de métaux lourds. En effet, ce site est reconnu pour ses concentrations élevées en métaux lourds (*e.g.*, Hg, Pb) dans l'eau et les sédiments (Léo Démoulin, 2014). De nombreuses études ont montré **l'adaptation des moules** lors de leur transfert d'une zone non polluée à une zone polluée, notamment dans les zones portuaires qui contiennent divers polluants, tels que les métaux lourds, les PCB et les HAP. Les moules s'adaptent à leur environnement et peuvent augmenter certains biomarqueurs en réponse aux polluants (*e.g.*, la glutathione S-transférase, les métallothionéines). Plusieurs métabolites sont d'ailleurs analysés en tant que biomarqueurs pour évaluer l'impact des polluants, tels que les dommages à l'ADN, les contaminations métalliques et le stress oxydatif. La présence prépondérante des métallothionéines dans la glande digestive est décrite dans de nombreuses études ainsi que leur rôle dans la détoxification des métaux.

Dans le contexte de nos expériences, il est plausible que les **différences observées** dans les concentrations de cobalt présentes dans les glandes digestives des moules provenant de zones polluées et non polluées soient attribuables à une **augmentation de la présence de protéines détoxifiantes ou permettant son stockage** chez les moules provenant de la petite rade de Toulon. Ces moules pourraient contenir une concentration supérieure de protéines leur permettant de stocker une plus grande quantité de métaux par rapport aux moules de Villefranche-sur-Mer. Cette adaptation pourrait donc faciliter la mobilisation du cobalt en excès dans le milieu marin et renforcer leur tolérance. Pour étayer cette hypothèse, il serait nécessaire de réaliser une analyse protéomique notamment des métallothionéines sur les moules de Villefranche-sur-Mer et de la rade de Toulon.

## b) Étude cinétique comparative de l'accumulation du cobalt chez les moules de Villefranche-sur-Mer

Tableau 10. Conditions expérimentales des contaminations pour la quantification du cobalt dans les moules en fonction de la durée d'exposition : 12 jours et 60 jours.

Provenance des moules	Villefranche-sur-Mer	Villefranche-sur-Mer
Nombre de spécimens	45	46 (5 décès)
Volume (L)	12	12
Répartition analyse moule entière/organe	21/24	13/28
Concentration d'exposition $^{59}\text{Co}$ (M)	$10^{-6}$ M	$10^{-6}$ M
Durée	12 jours (changement d'eau à J+5)	60 jours (changement d'eau tous les 5 jours)
Alimentation T. Iso $10^4$ cellules/moules	Tous les 3 jours	Tous les 3 jours

Le temps d'exposition joue un rôle crucial dans l'accumulation des métaux par les moules. Une cohorte d'une expérience de 12 jours a été comparée à une expérience de 60 jours, toutes deux menées sur des moules de Villefranche-sur-Mer exposées à la même concentration de cobalt. Les paramètres d'exposition sont synthétisés dans le Tableau 10.

La Figure 38 met en parallèle les facteurs de concentration dans différents organes (pied, manteau, glande digestive, corps viscéral, branchies) entre les deux cohortes de moules suivant la durée de l'exposition au cobalt. On peut observer une **différence significative du facteur de concentration du cobalt dans la glande digestive qui est plus important dans la cohorte exposée au cobalt pendant 60 jours** ( $\bar{x} = 4\,512 \pm 741$  contre  $\bar{x} = 229 \pm 32$ ), cette différence étant mise en évidence par une analyse de variance (ANOVA) et un test post-hoc de Schéffé (voir partie Matériels et méthodes). **Les autres organes ne montrent pas de variation significative du facteur de concentration en fonction du temps d'exposition.** L'analyse de

l'écart type des mesures dans les branchies et le corps révèle une plus grande dispersion des valeurs dans les moules exposées pendant 60 jours (*e.g.*, branchies  $\sigma=160$ ) par rapport à celles exposées pendant 12 jours (*e.g.*, branchies  $\sigma=51$ ). L'hypothèse la plus probable pour expliquer cette plus grande dispersion des valeurs est la différence intrinsèque entre les individus, qui pourrait générer des réponses physiologiques différentes. Les valeurs des facteurs de concentration dans la glande digestive après 60 jours sont en accord avec celles relevées dans la littérature, comme discuté précédemment. L'augmentation du facteur de concentration dans les moules exposées pendant 60 jours peut être attribuée à la capacité de la glande digestive à séquestrer et accumuler le cobalt. Toutefois nos mesures ne permettent pas de conclure sur un état d'équilibre après 60 jours de contamination.

Le facteur de concentration du cobalt dans le byssus après 60 jours de contamination s'élève à  $7\,173 \pm 70$ . L'analyse du byssus des moules exposées pendant 12 jours n'a pu être menée à terme en raison de problèmes de mesure.

La comparaison des moules entières exposées pendant 12 jours et 60 jours n'est pas incluse dans les résultats. Les données obtenues se sont révélées aberrantes par rapport à la tendance attendue et aux résultats généralement obtenus dans la littérature. En effet, les valeurs des moules contaminées pendant 60 jours sont globalement inférieures à celles des moules exposées pendant 12 jours. Lors de la préparation des échantillons de moules entières de la cohorte exposée 60 jours, des problèmes liés à la minéralisation ont entraîné la rupture des tubes de minéralisation et la perte des échantillons. C'est la raison pour laquelle les résultats ne sont pas cohérents et n'ont pas pu être répétés en raison de contraintes de temps.

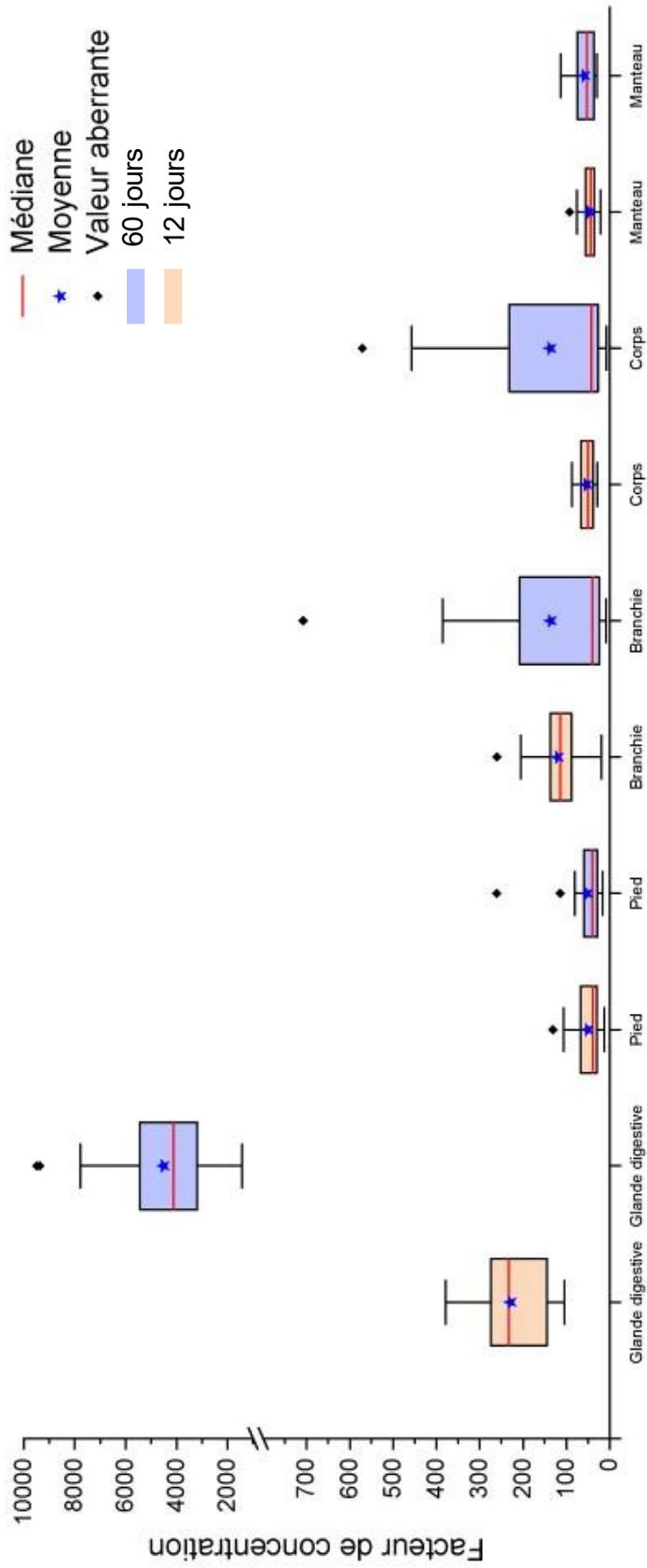


Figure 38. Comparaison des facteurs de concentrations dans différents organes de moules en fonction du temps d'exposition dans de l'eau de mer dopée en cobalt.

### 3) Distribution subcellulaire du cobalt dans la glande digestive des moules exposées au cobalt

Comme observé précédemment, la glande digestive semble jouer un rôle prépondérant dans l'accumulation du cobalt. Afin d'acquérir plus d'informations sur la distribution du cobalt dans cet organe, des expériences visant à séparer les compartiments subcellulaires ont été menées (voir partie Matériels et méthodes). Les résultats de ces études offrent un éclairage sur la manière dont les métaux sont traités à l'intérieur de la cellule. Les métaux peuvent être régulés ou détoxifiés grâce à des protéines comme la métallothionéine, ou encore par leur interaction avec des organites cibles sensibles (Simon et al., 2011; Wallace et al., 2003). Ces informations peuvent fournir des indications sur la toxicité d'un métal ou sur sa tolérance. Parmi les compartiments subcellulaires, l'association des protéines thermostables et des granules riches en métaux pourrait indiquer la présence de métaux séquestrés et une tolérance aux métaux. Les métaux présents dans ces fractions sont ainsi qualifiés de métaux détoxifiés biologiquement (MDB). Les conditions expérimentales sont détaillées dans le Tableau 11.

*Tableau 11. Conditions expérimentales des contaminations de moules au cobalt pour l'étude de la distribution subcellulaire du cobalt.*

Provenance des moules	Villefranche-sur-Mer
Nombre de spécimens	2
Volume (L)	2
Réplica	5
Analyse organe	Glande digestive
Concentration d'exposition $^{59}\text{Co}$ (M)	$10^{-6}$ M
Durée	12 jours (changement d'eau à J+5)

La Figure 39 illustre la répartition du cobalt au sein des différents compartiments subcellulaires. **La fraction associée aux métallothionéines est celle contenant la plus grande quantité de cobalt ( $42 \pm 12$  %).** Les fractions subcellulaires peuvent également être regroupées

en fonction de leurs relations avec les métaux dans un contexte d'écotoxicologie. Les organites sensibles aux métaux comprennent les mitochondries, les lysosomes/microsomes et les enzymes cytosoliques, tandis que les fractions participant à la détoxification sont représentées par les granules résistants à la soude et les protéines thermostables, dont les métallothionéines font partie.

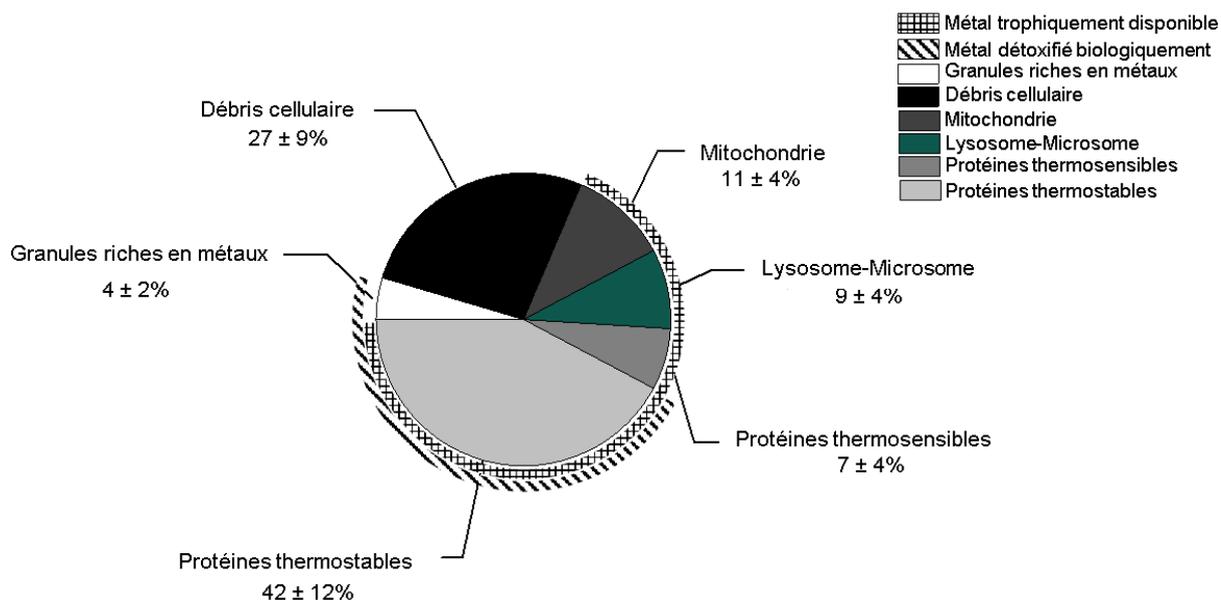


Figure 39. Diagramme de l'accumulation de cobalt dans différents compartiments de la glande digestive de moules exposées à  $[Co]=10^{-6}$  M.

Après 12 jours de contamination, le cobalt est principalement associé aux **voies de détoxification cellulaires** (granules résistants à la soude caustique et protéines thermostables), représentant **46 % de la quantité totale de cobalt**. Les organites (mitochondries et lysosomes/microsomes) ne représentent que 20 % du cobalt dans les cellules. Cette approche révèle l'association du cobalt avec les voies de détoxification, ce qui pourrait refléter la toxicité intrinsèque du cobalt. La répartition du cobalt entre la fraction contenant les granules riches en métaux et les protéines thermostables met en lumière le mécanisme préférentiellement utilisé pour sa détoxification. En outre, la présence de cobalt associé à ces compartiments témoigne de la **capacité de l'organisme à le détoxifier**.

La fraction contenant les débris cellulaires est complexe à interpréter en raison de sa nature hétérogène, englobant à la fois les membranes cytoplasmiques et nucléaires dans des proportions inconnues. De plus, cette fraction est difficile à classer en termes d'impact sur les

métaux, une interaction des métaux avec les membranes cellulaires pourrait induire une toxicité. L'interaction à des fractions moins sensibles à l'intérieur des débris cellulaires pourrait empêcher l'interaction avec les composants sensibles de la cellule (Lucu and Obersnel, 1996). De nombreuses études préfèrent donc ne pas prendre en compte cette fraction dans leur interprétation (Cain et al., 2004; Frelon et al., 2013).

### 4) Conclusion

Les deux expériences menées avec du cobalt stable et du  $^{60}\text{Co}$  conduisent à des conclusions similaires concernant les facteurs de concentration dans les moules. Les résultats obtenus dans les deux expériences montrent que ces derniers sont remarquablement similaires en ce qui concerne la glande digestive, ce qui met en évidence que l'exposition des moules à des concentrations environnementales ou pondérables n'a pas d'influence sur le facteur de concentration dans la glande digestive.

De plus, la répartition du cobalt dans la glande digestive est en cohérence avec sa fonction de stockage et de détoxification des métaux. Les lysosomes des cellules digestives jouent un rôle dans la digestion intracellulaire des nutriments ainsi que dans la défense antioxydante, mais ils sont également impliqués dans la séquestration et la détoxification des métaux toxiques (Marigómez et al., 2002; Pagano et al., 2017). La glande digestive est riche en métallothionéines, une protéine qui joue un rôle dans la régulation et la détoxification des métaux traces, qu'ils soient essentiels ou non-essentiels. Et l'induction de métallothionéine est associée à la tolérance des organismes vis-à-vis des métaux (Ritterhoff and Zauke, 1997; Wallace and Lopez, 1997).

Les moules provenant de la petite rade de Toulon évoluent dans un environnement où la concentration en métaux lourds est plus élevée que chez les moules de Villefranche-sur-Mer. Cette différence pourrait avoir induit une adaptation des moules de Toulon avec une augmentation de l'induction de métallothionéines dans la glande digestive. Cette augmentation de métallothionéines disponibles pourrait conférer une plus grande tolérance de ces moules aux métaux lourds dans leur milieu naturel et potentiellement influencer sur la bioaccumulation du cobalt. Quantifier les concentrations de métallothionéines dans les moules des deux sites

permettrait de tester la validité de cette hypothèse et de mieux comprendre le rôle de ces dernières dans la bioaccumulation du cobalt.

### IV. Détection et localisation du cobalt dans la moule

#### 1) Étude de la distribution du cobalt par $\mu$ -XRF

Les spécimens *M. galloprovincialis* ont été contaminés au laboratoire à différentes concentrations, comme indiqué dans le Tableau 12, et ensuite analysés en utilisant le rayonnement synchrotron après avoir été préparés conformément à la partie Matériels et méthodes.

Lors d'expérience sur le vivant, la mortalité peut survenir lorsque la concentration d'exposition se rapproche de la concentration létale ( $CL_{50}$ ), qui représente la concentration à laquelle 50 % des individus meurent lors de l'exposition. Cependant, il est souvent difficile de trouver des valeurs de  $CL_{50}$  pour les mollusques en milieu marin. Par exemple, dans la base de données "ECOTOX" (Olker et al., 2022) qui recense des données sur les contaminants chimiques dans les organismes marins à l'échelle mondiale, une recherche avec des critères comprenant les mollusques, le cobalt et la  $CL_{50}$  ne permet pas d'obtenir de résultats pertinents.

Il est courant d'utiliser des poissons dans de nombreuses études toxicologiques, bien que leur modèle d'étude soit différent du nôtre. Il est néanmoins intéressant d'avoir une idée approximative des valeurs de  $CL_{50}$  obtenues avec des organismes aquatiques. Les valeurs de  $CL_{50}$  peuvent varier de  $470 \mu\text{g.L}^{-1}$  ( $\sim 8 \times 10^{-6}$  M) pour *Oncorhynchus mykiss* (exposition sur 28 jours) à  $1\,875 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $\sim 3 \times 10^{-2}$  M) pour *Poecilia reticulata* (exposition sur 1 jour), en fonction de l'espèce et de la durée d'exposition. Ces valeurs illustrent la variation considérable de sensibilité des différentes espèces aux contaminants chimiques, y compris le cobalt.

Il est important de noter que les  $CL_{50}$  peuvent varier en fonction des conditions environnementales, des espèces étudiées, de la durée d'exposition et de nombreux autres facteurs. Dans le contexte de notre étude avec *M. galloprovincialis*, l'utilisation de concentrations variées pour les contaminations permettra de mieux comprendre les réponses de ces mollusques au cobalt dans différentes conditions expérimentales.

Tableau 12. Conditions expérimentales des contaminations au cobalt des moules provenant de Villefranche-sur-Mer pour les imageries synchrotrons.

Provenance des moules	Villefranche-sur-Mer
Nombre de spécimens	2
Volume (L)	2
Réplica	2 par concentration d'exposition
Analyse organe	Inclusion en résine
Concentration d'exposition $^{59}\text{Co}$ (M)	$10^{-7}$ M - $10^{-6}$ M - $10^{-5}$ M - $10^{-4}$ M
Durée	12 jours (changement d'eau à J+5)

Note : Dans les aquariums contaminés avec  $10^{-5}$  M de cobalt 3 individus sont décédés.

En ce qui concerne nos expérimentations, il est plausible que la concentration de contamination de  $10^{-4}$  M puisse provoquer le décès des individus. Aucune investigation n'a été entreprise pour déterminer la  $CL_{50}$  de *M. galloprovincialis* exposée au cobalt durant cette étude. Cette concentration de  $10^{-4}$  M a été exclusivement utilisée dans le contexte des imageries synchrotron afin d'obtenir, au final, des concentrations plus élevées de cobalt au sein des organismes. L'exposition des individus à diverses concentrations pour les imageries synchrotron a été motivée par deux objectifs :

- Observer différentes intensités au niveau des organes cibles en fonction de la concentration d'exposition.
- Compenser les limites de détection des détecteurs et le faible retour d'expérience associé à l'analyse du cobalt dans des échantillons biologiques sur la ligne de lumière MARS.

Bien que la relation entre le facteur de concentration et la concentration d'exposition ne soit pas strictement linéaire, on peut néanmoins anticiper l'obtention d'une concentration de cobalt dans les moules proportionnelle à la concentration d'exposition lorsque la saturation n'est pas atteinte. Dans le cadre de cette expérience, les mollusques ainsi que leurs organes n'ont pas

été soumis à une analyse par ICP-MS, étant donné que la procédure de préparation des échantillons en résine est de nature « destructive », ce qui rend impossible leur digestion pour la quantification en ICP-MS.

Les analyses par fluorescence X ont été effectuées sur les coupes contenant à la fois les fils de byssus et la glande digestive. Des spectres XANES (spectroscopie d'absorption des rayons X près du seuil d'absorption) ont été obtenus au seuil K du cobalt à partir de ces différentes coupes, après avoir réalisé les images X correspondantes. Les zones choisies pour les analyses ont été sélectionnées de manière à confirmer la présence de cobalt à différents endroits spécifiques des échantillons.

L'absence de signal de fluorescence X pour le cobalt dans la résine confirme la pureté de la résine utilisée et exclut la possibilité d'une diffusion du cobalt des échantillons vers la résine. La superposition des images optiques avec les images de fluorescence X permet de confirmer avec précision la localisation des zones analysées, et de montrer où le **cobalt est accumulé dans les organes**. De plus, les analyses  $\mu$ -XRF permettent de coupler l'imagerie avec la spéciation directement sur les échantillons. À la suite de l'acquisition des cartographies de fluorescences X il est possible de récupérer les coordonnées (X ; Y) et de réaliser des spectres XAS à l'aide du microfaisceau de lumière. Le flux de photon du microfaisceau ( $29 \times 25 \mu\text{m}$ ) est inférieur à celui du macrofaisceau ( $200 \times 200 \mu\text{m}$ ) ce qui peut être limitant pour l'acquisition des spectres EXAFS, mais permet l'acquisition de spectres XANES sans difficulté. **Ces analyses ont pour ambition de permettre une meilleure compréhension de la répartition spatiale et de la spéciation du cobalt dans les échantillons, en particulier dans les fils de byssus et la glande digestive.**

#### a) Byssus

La Figure 40 est consacrée au byssus et compare les images optiques avec les images de fluorescence X correspondantes qui ont été obtenues au seuil K du cobalt (7 709 eV).

Les cartographies du byssus mettent en évidence la **présence de cobalt dans les fils ainsi qu'au niveau de la tige du byssus**, quelle que soit la concentration d'exposition au cobalt ( $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-4}$  M). Étant donné qu'il n'est pas possible de normaliser l'intensité entre les différentes cartographies, la comparaison des images obtenues est purement qualitative.

L'observation des images semble indiquer tout de même une relation entre la concentration et l'intensité de la fluorescence X. Plus la concentration d'exposition est élevée, plus l'intensité de la fluorescence du cobalt dans les fils de byssus est importante.

La taille de la sonde  $29 \times 25 \mu\text{m}$  ne permet pas d'obtenir davantage d'informations sur la localisation précise du cobalt entre la cuticule ( $2\text{-}5 \mu\text{m}$  d'épaisseur) et la matrice des fils. La résolution doit être inférieure à  $2 \mu\text{m}$  pour distinguer les deux structures. Toutefois, compte tenu des paramètres d'acquisition et de préparation, on peut en déduire que le **cobalt est réparti de manière homogène dans les fils et dans la tige du byssus.**

La Figure 41 compare les spectres XANES qui ont été obtenus à partir des fils et de la tige, les numéros des spectres XANES correspondent aux numéros présents sur la Figure 40. La référence de  $\text{Co}^{2+}$  aquo est préparé à l'aide de  $\text{CoCl}_2$  et permet d'avoir un échantillon de cobalt à un degré d'oxydation +II que l'on peut confronter à nos mesures. Tous les spectres XANES révèlent la présence de **cobalt à un degré d'oxydation +II** dans toutes les zones du byssus analysées. La comparaison des spectres XANES montre de manière indiscutable qu'ils sont **identiques** en tous points, tant **au niveau des fils que de la tige**. On peut observer une différence au niveau de la raie blanche, caractérisée par son élargissement sur les spectres expérimentaux par rapport à la raie blanche du spectre de référence de  $\text{Co}^{2+}$  aquo. Il est à noter que le rapport signal sur bruit est élevé ( $\epsilon = 0,0014\text{-}0,258$ ), seulement deux scans ont été effectués à chaque position.

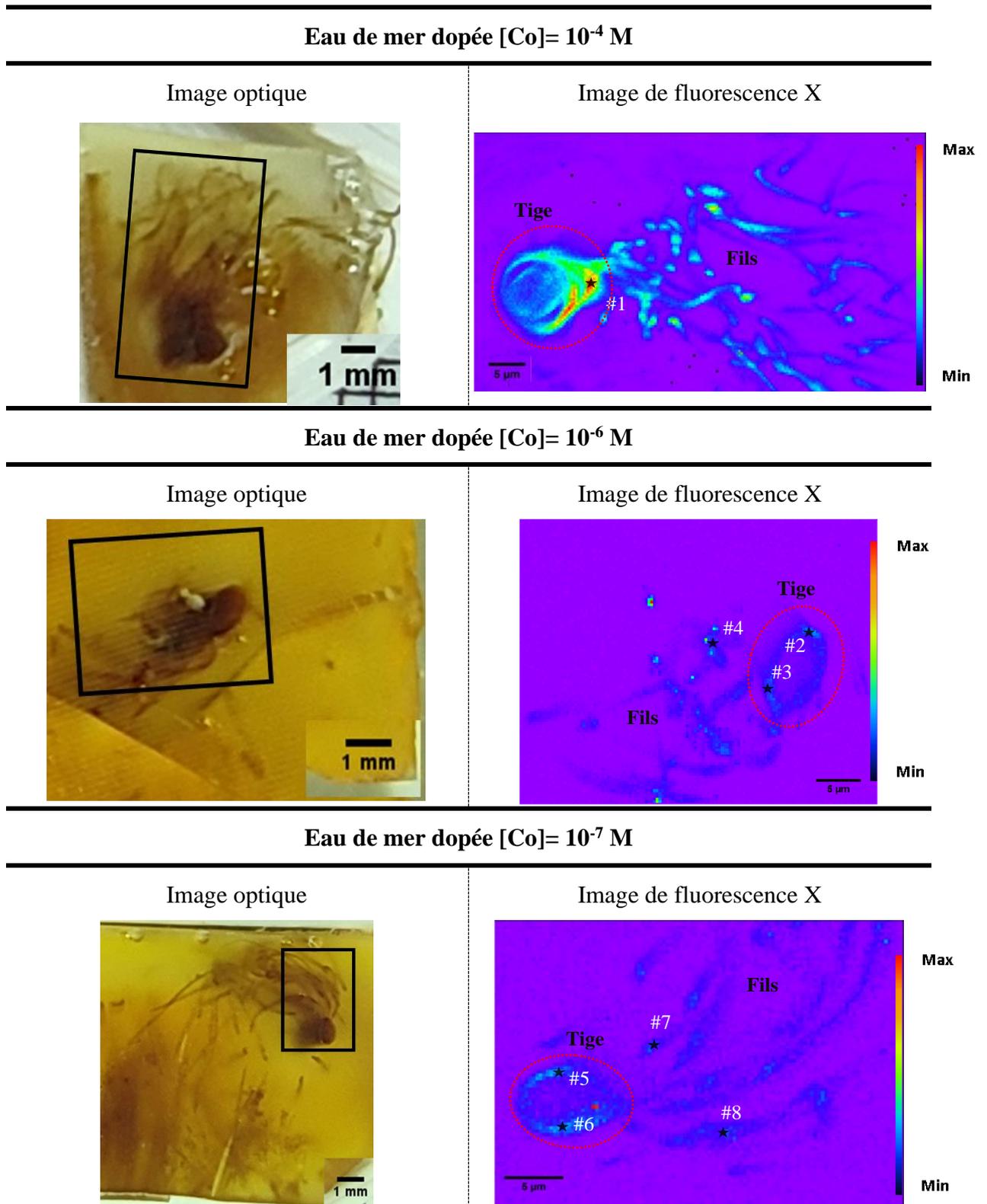


Figure 40. Comparaison des images optiques (barre d'échelle 1 mm) et des cartographies de la fluorescence X réalisée au seuil K du cobalt (Barre d'échelle 5 µm) du byssus. Le rectangle noir présent sur les images optiques localise la zone analysée en fluorescence X. Les zones délimitées par les cercles en pointillé rouges sur les cartographies de fluorescence X indiquent

la tige, le reste de l'image correspond au fils du byssus. Les étoiles noires sur les cartographies de fluorescence X montrent où ont été réalisés les spectres XANES au seuil K du cobalt. Les numéros associés correspondent aux spectres XANES Figure 41. Temps d'intégration 1s-5s par pixel.

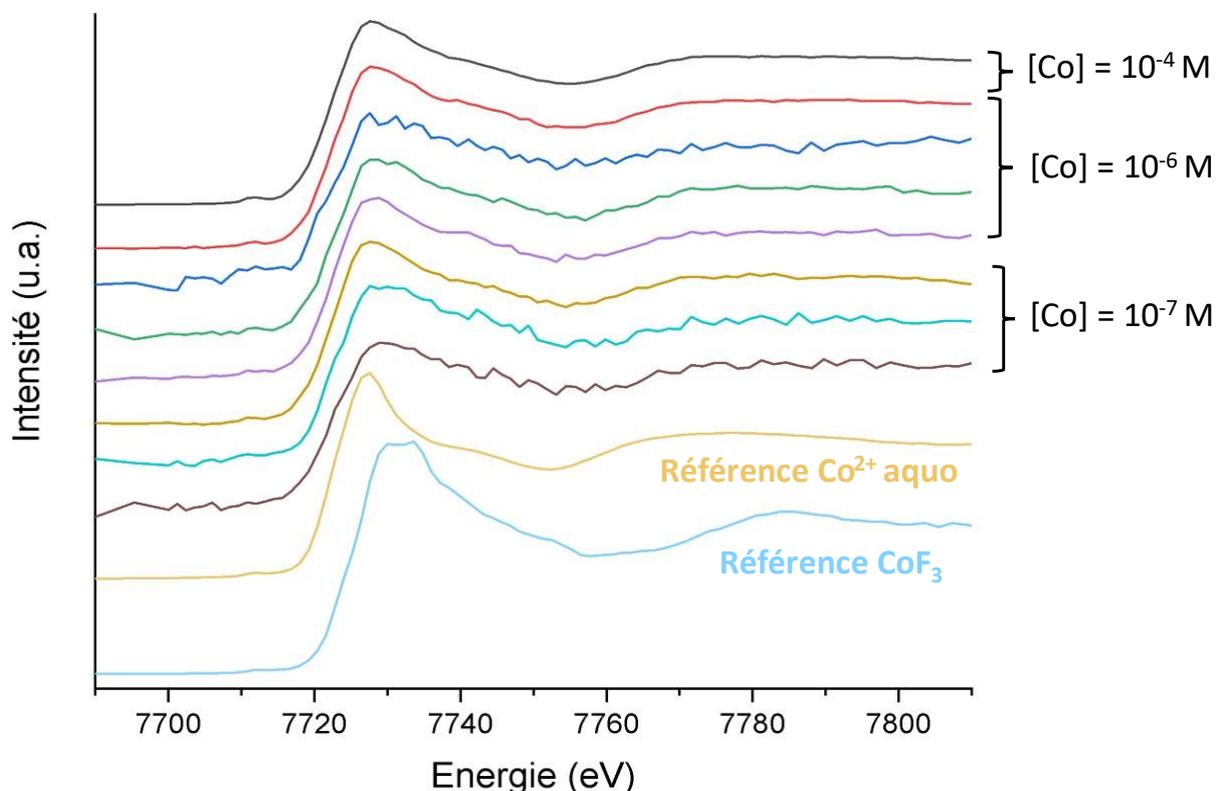


Figure 41. Comparaison des spectres XANES réalisés au seuil K du cobalt sur du byssus de moules exposées à différentes concentrations d'eau de mer dopée en cobalt. Les numéros des spectres sont associés aux numéros indiqués sur les cartographies de fluorescence X de la Figure 40. La « référence  $\text{Co}^{2+}$  aquo » a été réalisée avec une solution à 0,1 M de  $\text{CoCl}_2$ .

### b) Glande digestive

La Figure 42 compare les images optiques avec les cartographies de fluorescence X qui ont été acquises dans la glande digestive. Contrairement aux images que nous avons obtenues avec le byssus, les cartographies de fluorescence X ne permettent pas de visualiser des structures particulières dans la glande digestive. Les cartographies de fluorescence X à des concentrations de  $10^{-6}$  M et  $10^{-5}$  M de cobalt montrent une **répartition homogène du cobalt dans la glande digestive**. La Figure 43 compare les spectres XANES qui ont été réalisés à différentes positions sur deux glandes digestives issues de moules exposées à une concentration de  $10^{-5}$  M de cobalt. Tous les spectres XANES obtenus à partir de cet organe montrent que le

**cobalt est présent au degré d'oxydation +II.** La comparaison de ces spectres XANES montre leur similitude, quelle que soit la zone analysée. Une observation notable concerne l'élargissement de la raie blanche sur les spectres expérimentaux par rapport à celle du spectre de référence du  $\text{Co}^{2+}$  aquo.

Nous avons pu obtenir une cartographie en fluorescence X (image non fournie) d'un échantillon de moule exposée à une concentration de  $10^{-7}$  M de cobalt. Cette cartographie a montré un contraste très faible (environ trois fois le bruit de fond) entre la zone correspondant à la glande digestive et la résine. Cependant ce résultat est en accord avec les cartographies obtenues à  $10^{-6}$  M et  $10^{-5}$  M qui indiquent que le cobalt **est réparti de manière homogène dans la glande digestive**. Rappelons que la concentration de cobalt dans les organes n'a pas pu être déterminée suite à ces expériences, car il n'est pas possible de récupérer les organes après leur inclusion dans la résine. Une estimation basée sur les facteurs de concentrations précédemment obtenues suggère que la concentration dans les organes à la suite d'une exposition des moules de cobalt à  $10^{-7}$  M correspond à environ  $1 \mu\text{g.g}^{-1}$  ( $\mu\text{g}$  de cobalt par gramme d'organe sec) dans la glande digestive ce qui est relativement faible pour réaliser des cartographies. Ces résultats suggèrent qu'à l'échelle de l'organe **le cobalt présent dans la glande digestive ne subit pas de modification de son degré d'oxydation (+II)** quelles que soient les conditions de contaminations. De plus, la distribution uniforme du cobalt est en accord avec la structure de la glande digestive, qui présente une **homogénéité tissulaire**.

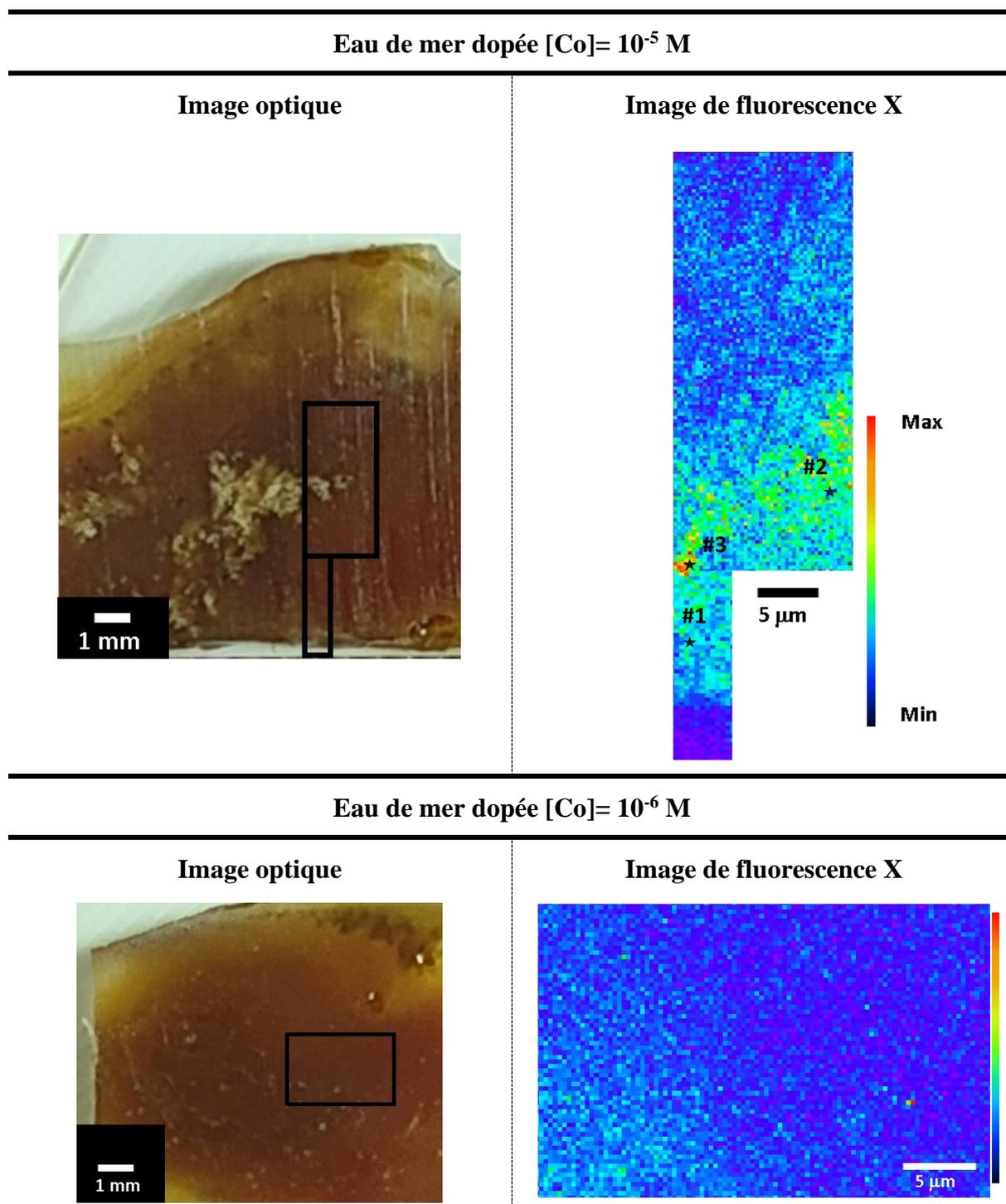


Figure 42. Comparaison des images optiques (barre d'échelle 1 mm) et des cartographies de la fluorescence X réalisée au seuil K du cobalt (Barre d'échelle 5 μm) de la glande digestive. Le rectangle noir présent sur les images optiques localise la zone analysée en fluorescence X. Les étoiles noires sur les cartographies de fluorescence X montrent où ont été réalisés les spectres XANES réalisés au seuil K du cobalt, les numéros associés correspondent aux spectres XANES de la Figure 43. Temps d'intégration 1 s par pixel.

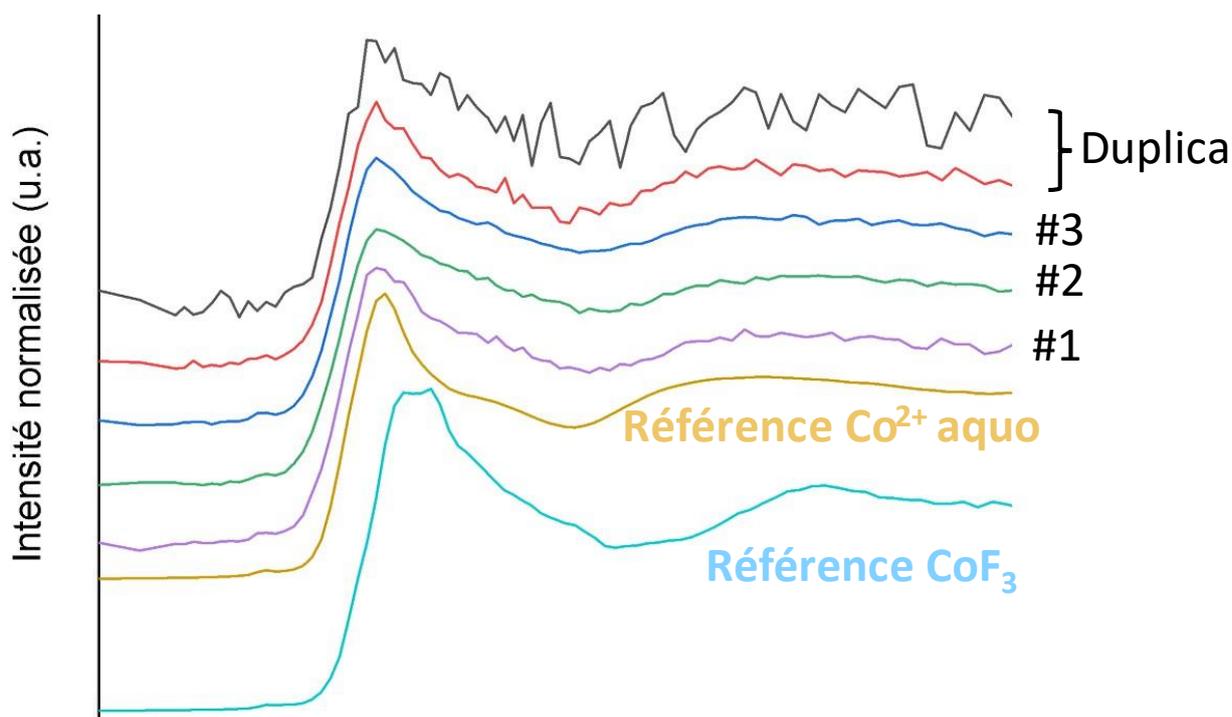


Figure 43. Comparaison des spectres XANES réalisés au seuil K du cobalt sur la glande digestive de moules exposées à de l'eau de mer dopée en cobalt  $10^{-5}$  M. Les numéros des spectres sont associés aux numéros indiqués sur les cartographies de fluorescence X.

## 2) Étude de la distribution du cobalt par SIMS

Des analyses SIMS ont été réalisées sur les moules exposées à une concentration de  $10^{-6}$  M de cobalt. Les conditions d'exposition des moules sont résumées dans Tableau 13. La résolution  $M/\Delta M=4000$  permet de distinguer différentes masses ioniques (par exemple,  $^{28}\text{Si}^{30}\text{Si}-^{59}\text{Co}$   $|M/\Delta M|=3452$ ). Bien que cette résolution permette la séparation des pics de masse de  $^{29}\text{Si}^{30}\text{Si}$  et du  $^{59}\text{Co}$ , la proximité entre le pic du cobalt et le pic de l'interférence peut engendrer des difficultés d'analyse lorsqu'ils se chevauchent. Les interférences avec le silicium sont importantes en raison de l'utilisation d'un support en silicium pur qui est communément utilisé lors d'analyse SIMS. Un support en carbone a pu être utilisé pour s'affranchir des interférences. La calibration de la masse du cobalt (Annexe Figure 94) a permis d'isoler l'ion  $^{59}\text{Co}^+$  et d'obtenir des données spécifiques au cobalt afin d'effectuer les images ioniques.

*Tableau 13. Conditions expérimentales des contaminations au cobalt des moules provenant de Villefranche-sur-Mer pour les imageries SIMS cobalt.*

<b>Provenance des moules</b>	<b>Villefranche-sur-Mer</b>
<b>Nombre de spécimens par aquarium</b>	2
<b>Volume (L)</b>	2
<b>Réplica</b>	2
<b>Analyse organe</b>	Inclusion en résine
<b>Concentration d'exposition <math>^{59}\text{Co}</math> (M)</b>	$10^{-6}$ M
<b>Durée</b>	12 jours (changement d'eau à J+5)

### a) Byssus

La Figure 44 présente les images ioniques obtenues à partir des échantillons de fils de byssus déposés sur des supports en silicium. Différents ions ont été utilisés pour obtenir des images afin de comprendre la répartition de certains éléments et d'identifier les structures présentes. Le sodium et le calcium ont été choisis en raison de leur importance en tant qu'éléments essentiels dans les organismes vivants, et leur présence permet de repérer facilement les structures. On peut observer que ces deux éléments sont présents à la fois dans la matrice et au niveau de la cuticule, avec une intensité plus élevée dans cette dernière. L'image ionique du  $^{28}\text{Si}$  montre sa répartition essentiellement dans la matrice des fils. L'intensité du signal est importante au niveau de la cuticule et peut s'expliquer par des trous entre l'échantillon et la résine. En effet, lors des inclusions en résine du byssus, cette dernière enrobe les fils sans pénétrer dans la matrice du byssus. Un espace peut se créer entre le fils et la résine lors des coupes expliquant la forte intensité. En ce qui concerne le fer, comme nous l'avons expliqué précédemment, sa présence est observée uniquement au niveau de la cuticule, ce qui est en accord avec d'autres études utilisant des images TEM-EDX et mettant en évidence la présence de DOPA capable de chélater le fer (Mesko et al., 2021). Le magnésium semble également suivre la même distribution que le fer, son rôle dans la structure du byssus n'est pas décrit, bien qu'il fasse partie des trois éléments les plus importants avec le fer et le calcium (Coombs and

Keller, 1981). Nous pouvons qualitativement à travers l'observation des intensités montrer que **la quantité du cobalt dans la cuticule est plus importante que dans la matrice**. La superposition de l'image ionique du cobalt avec l'image ionique du calcium confirme une **colocalisation au niveau de la cuticule**. D'autres images ioniques sont fournies en Annexe Figure 94 montrant la répartition des éléments sur une zone plus réduite ( $20 \times 20 \mu\text{m}$  ; 10 pA).

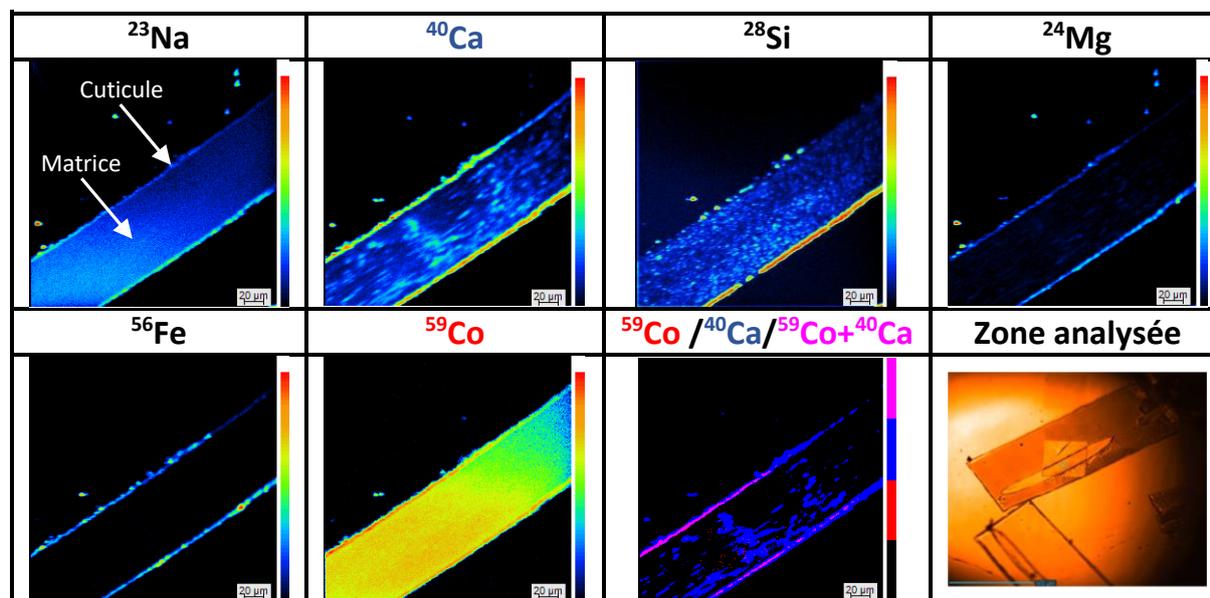


Figure 44. Images ioniques obtenues dans le byssus de moule exposée à de l'eau de mer dopée en  $^{59}\text{Co}$ . L'image ionique du  $^{23}\text{Na}$  permet de localiser la cuticule et la matrice (flèche blanche). Barre d'échelle  $20 \mu\text{m}$ . Paramètre d'acquisition :  $250 \times 250 \mu\text{m}$  ; 500 pA. L'image de la zone analysée est obtenue par une caméra optique. Barre d'échelle  $500 \mu\text{m}$ .

Selon Montroni et ses collaborateurs, la complexation du  $\text{Co}^{2+}$  à  $\text{pH}=7$  suit une isotherme de Freundlich, ce qui indique la présence de sites de liaison hétérogènes avec une accumulation non linéaire du cobalt (Montroni et al., 2020). Cependant, l'accumulation du  $\text{Co}^{2+}$  peut également être modélisée par une isotherme de Langmuir, qui suppose l'existence de sites de liaison homogène et monocouche en surface. Les analyses en imagerie électronique montrent que l'augmentation de la concentration de cobalt impacte la morphologie de la surface du byssus. Nos résultats indiquent que le cobalt est à la fois distribué au niveau de la cuticule et dans la matrice du byssus ce qui implique différents sites de liaisons. On peut formuler deux hypothèses sur les sites de complexation au niveau du byssus, en se basant sur les travaux de Montroni, ainsi que sur les différences de répartition du cobalt entre la matrice et la cuticule que nous avons observé.

- Le cobalt au niveau de la cuticule pourrait être modélisé par une isotherme de Langmuir, ce qui implique l'existence de sites de liaison homogène et monocouche en surface. La présence de protéines riches en fonctions DOPA telles que mfp-1 est connue pour être abondante à la surface de la cuticule, ce qui est cohérent avec les prérequis de ce modèle.
- La matrice et la cuticule pourraient contenir divers sites de liaison capables de complexer le cobalt. En effet, ces structures sont complexes et contiennent une grande variété de protéines chélatantes pouvant potentiellement lier le cobalt (mfp et domaines riches en histidine).

#### b) Glande digestive

La Figure 45 présente les images ioniques obtenues à partir des échantillons de la glande digestive déposés sur des supports en silicium. Les images ioniques du sodium et du calcium permettent de visualiser les structures histologiques, tandis que les images ioniques du cobalt permettent d'observer la répartition microscopique au sein de ces structures.

Les images ioniques du  $^{23}\text{Na}$  et  $^{40}\text{Ca}$  qui sont présentées Figure 45 permettent de distinguer les structures tubulaires de la glande digestive, car ils constituent des éléments essentiels participant à des processus physiologiques. On peut remarquer que la distribution du  $^{56}\text{Fe}$  et de  $^{24}\text{Mg}$  n'est pas associée à des structures particulières dans la glande digestive.

Les images ioniques du cobalt, en revanche, permettent d'observer une distribution qui suit les limites des tubules. **La superposition des images ioniques du cobalt et de calcium montre très nettement que le cobalt est associé aux cellules digestives des tubules.**

Les images ioniques disponibles Figure 46 correspondent à un agrandissement ( $\times 10$ ) de la zone délimitée par le carré rouge sur la Figure 45. Ces images permettent d'observer la présence de cobalt associé à des structures à l'intérieur des tubules, présentant une **répartition hétérogène**. On remarque une colocalisation entre le calcium et le cobalt, qui est associé à des structures attribuables à des cellules. Cette hétérogénéité indique que certaines **cellules ont la capacité de séquestrer le cobalt**. De plus, l'image ionique du cobalt montre qu'il est peu présent dans la lumière et totalement absent de l'espace intertubulaire ce qui souligne la

séquestration du cobalt par les cellules digestives. D'autres images ioniques sont fournies en Annexe Figure 95.

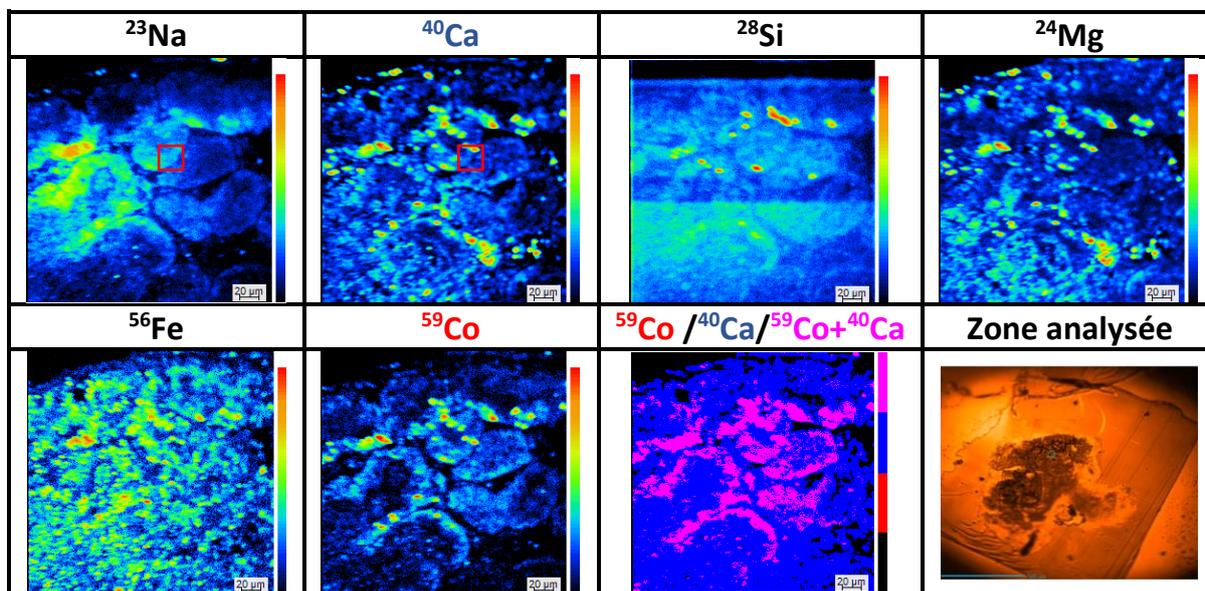


Figure 45. Images ioniques obtenues dans la glande digestive de moule exposée à de l'eau de mer dopée en  $^{59}\text{Co}$ . L'image ionique du  $^{23}\text{Na}$  et du  $^{40}\text{Ca}$  permet de localiser les structures subcellulaires. Le carré rouge sur les images ioniques du  $^{23}\text{Na}$  et  $^{40}\text{Ca}$  correspond à la zone analysée Figure 46. Barre d'échelle 20  $\mu\text{m}$ . Paramètre d'acquisition : 500  $\times$  500  $\mu\text{m}$  ; 10 pA. L'image de la zone analysée est obtenue par une caméra optique. Barre d'échelle 500  $\mu\text{m}$ .

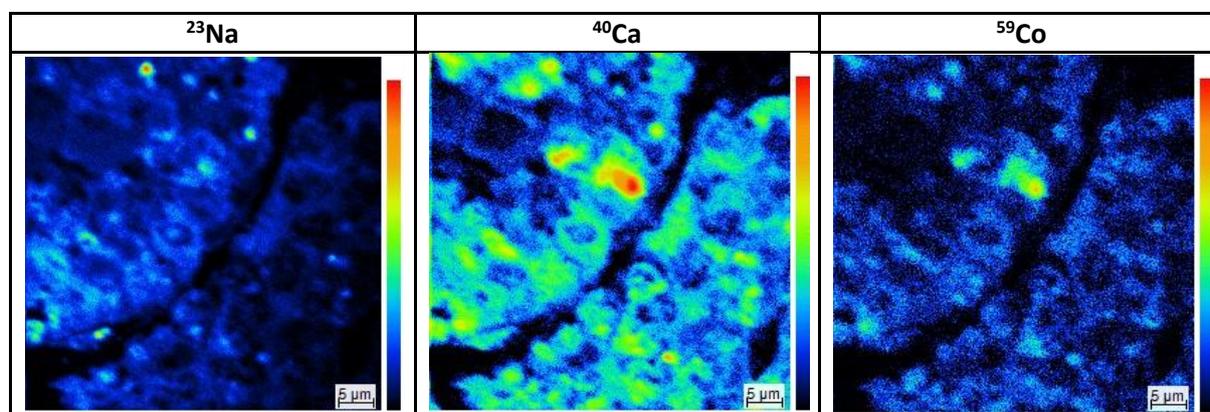


Figure 46. Images ioniques obtenues dans la glande digestive de moule exposée à de l'eau de mer dopée en  $^{59}\text{Co}$ . L'image ionique du  $^{23}\text{Na}$  et du  $^{40}\text{Ca}$  permet de localiser les structures subcellulaires. Cette zone correspond à un agrandissement de la zone définie par un carré rouge dans la Figure 45. Barre d'échelle 5  $\mu\text{m}$ . Paramètre d'acquisition : 50  $\times$  50  $\mu\text{m}$  ; 10 pA.

La Figure 47 présente les images ioniques obtenues à partir d'échantillons de la glande digestive déposés sur un support en carbone, améliorant ainsi la qualité des images en éliminant les interférences liées au silicium et en augmentant notablement la netteté. Les images ioniques

du cobalt et du calcium ont été superposées à l'image histologique de la zone analysée, confirmant la présence de ces éléments au niveau des tubules. L'image ionique révèle la présence de **cobalt sous forme d'amas**, coïncidant avec les limites cellulaires des tubules, comme illustré sur l'image histologique.

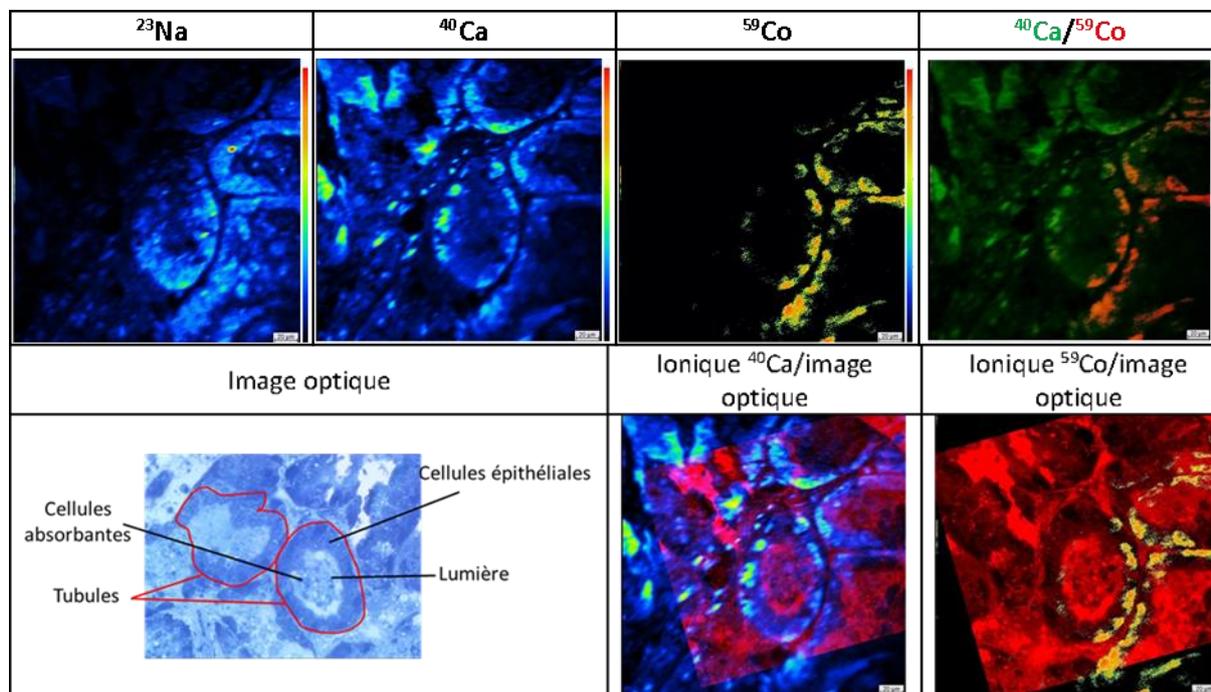
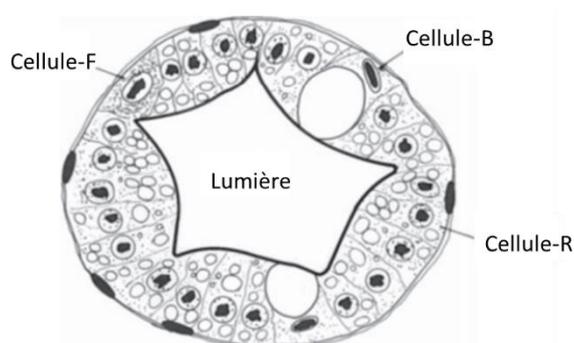


Figure 47. Images ioniques obtenues dans la glande digestive de moule exposée à de l'eau de mer dopée en  $^{59}\text{Co}$ . L'image ionique du  $^{23}\text{Na}$  et du  $^{40}\text{Ca}$  permet de localiser les structures subcellulaires de la glande digestive et superposition de l'image ionique du  $^{40}\text{Ca}$  et l'image ionique du  $^{59}\text{Co}$ . Barre d'échelle  $20\ \mu\text{m}$ . Paramètre d'acquisition :  $500 \times 500\ \mu\text{m}$  ;  $10\ \text{pA}$ . Image optique de la glande digestive montrant la présence des tubules et superposition de l'image optique et de l'image ioniques du  $^{40}\text{Ca}$  et du  $^{59}\text{Co}$ .

La distribution du cobalt dans l'échantillon analysé est surprenante, car on observe que la moitié gauche de l'image ionique ne présente pas de cobalt. Cette répartition n'est pas due à un problème d'acquisition, mais elle peut être attribuée à la coupe analysée. On remarque que la partie gauche ne forme pas de structures tubulaires, ce qui pourrait être dû à des dommages subis par l'échantillon lors de la préparation ou à une partie amorphe.

À l'échelle cellulaire, l'ion sodium permet de distinguer les limites cellulaires et le cytoplasme, tandis que la présence de calcium est colocalisée avec le noyau. Les images ioniques et histologiques révèlent les caractéristiques principales de la glande digestive, avec la présence de structures tubulaires séparées par l'espace intertubulaire. La zone à l'intérieur de

ces tubules, délimitée par les cellules, est appelée la lumière ou le lumen. Ces tubules sont constitués de plusieurs cellules alignées formant un épithélium qui n'est épais que d'une seule couche cellulaire (Gibson, 1979). La Figure 48 schématise la structure d'un tubule qui est composé d'un épithélium simple colonnaire et de quatre types cellulaires de bases : les cellules E, B, F et R (Franceschini-Vicentini et al., 2009). Les cellules-E sont de petites tailles et peuvent se différencier en cellules de types B, F et R. Les cellules-F sont caractérisées par un réticulum endoplasmique rugueux développé et une production de protéines et d'enzymes importante. Les cellules-B participent à la production d'enzymes digestives qui sont impliquées dans la digestion intracellulaire. Après le processus d'absorption des nutriments, elles sécrètent le contenu de leurs vacuoles dans la lumière tubulaire pour qu'il soit réabsorbé par les cellules-R.



*Figure 48. Schéma d'un tubule de la glande digestive avec les cellules F, B et R. (Modifié d'après :Johnson 1995 Handbook)*

L'hypothèse la plus plausible pour expliquer la localisation du cobalt dans la glande digestive est son **assimilation par les cellules digestives**. Cependant, malgré les images ioniques et optiques disponibles, il n'a pas été possible de déterminer de manière précise le type de cellules impliquées dans la séquestration du cobalt. Comme mentionné précédemment, les tubules hépatopancréatiques sont constitués de différents types de cellules alignées, et la distribution hétérogène du cobalt au sein de ces tubules suggère une possible implication d'un ou de plusieurs de ces types cellulaires. Ces cellules pourraient jouer un rôle dans l'accumulation du cobalt, que ce soit dans leur cytoplasme ou dans leur vacuole. Des investigations plus approfondies s'avèrent nécessaires pour identifier de manière plus précise les types cellulaires responsables de l'internalisation et de la séquestration du cobalt dans la glande digestive.

### 3) Analyse par microfaisceau d'ion du cobalt dans la moule par cartographie PIXE

Les analyses PIXE ont été réalisées sur des moules contaminées avec du cobalt à  $1,7 \times 10^{-5}$  M et  $8,5 \times 10^{-6}$  M pour être au-dessus de la limite de détection dans les échantillons (Tableau 14).

Tableau 14. Conditions expérimentales des contaminations au cobalt des moules pour les cartographies PIXE.

Provenance des moules	Villefranche-sur-Mer
Nombre de spécimens par aquarium	2
Réplica	2 par concentration d'exposition
Analyse organe	Inclusion en résine
Concentration d'exposition $^{59}\text{Co}$ (M)	$1,7 \times 10^{-5}$ M – $8,5 \times 10^{-6}$ M (1000 ppb – 500 ppb)
Durée	12 jours (changement d'eau à J+5)

L'analyse des échantillons par PIXE permet d'obtenir un spectre de fluorescence X des éléments chimiques présents dans le milieu. Cependant, le traitement des données se heurte à une difficulté majeure : la proximité des raies  $K_{\alpha 1}$  du cobalt (6 930 eV) et la  $K_{\beta 1}$  du fer (7 059 eV), la résolution du détecteur ne permettant pas de les distinguer clairement (Figure 49). Malgré cela, la présence du cobalt et du fer peut être confirmée grâce à la raie  $K_{\beta 1}$  du cobalt (7 649 eV) et à la raie  $K_{\alpha 1}$  du fer (6 405 eV) (bien que le rendement de la raie  $K_{\beta 1}$  soit plus faible (8 %) que celui de la  $K_{\alpha}$  (86 %)). L'observation des images de fluorescence X du cobalt offre des informations précieuses sur sa localisation dans les échantillons et permet de confronter ces données avec les images précédemment acquises.

### a) Byssus

La Figure 49 présente les résultats de fluorescence par PIXE de plusieurs éléments dans le byssus produit par des moules exposées à une concentration de  $1,7 \times 10^{-5}$  M de cobalt.

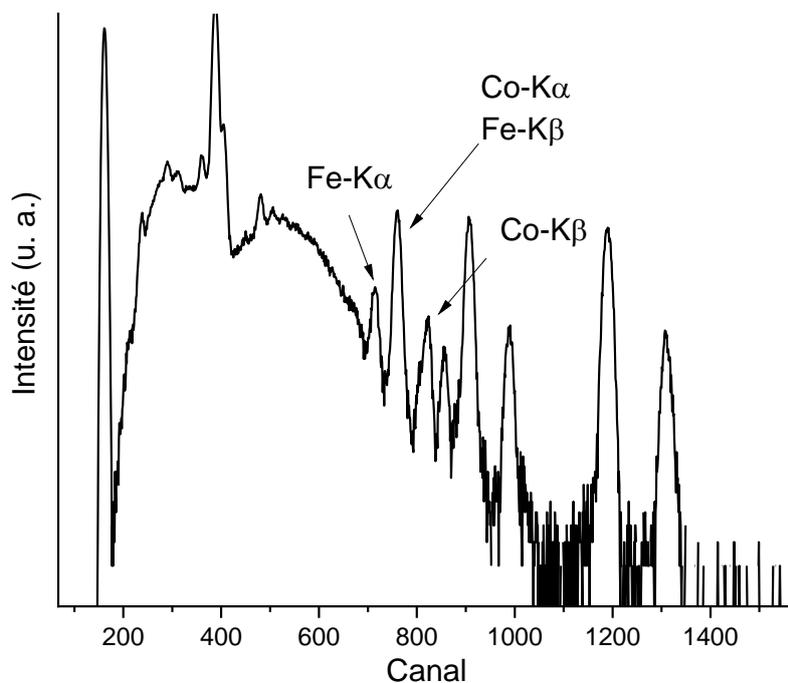


Figure 49. Spectre de fluorescence X du byssus réalisé par microfaisceau d'ion. Les pics de fluorescence X du cobalt et du fer ont été identifiés par rapport à un échantillon contrôle.

La fluorescence du brome a été utilisée pour repérer les échantillons, et l'on remarque sa présence au niveau de la cuticule des fils. La Figure 50 met en évidence une **colocalisation du fer ( $K_{\alpha}$ ) et du cobalt ( $K_{\beta}$ ) au niveau de la cuticule**. Ces observations permettent également de localiser une faible proportion du cobalt au sein de la matrice. **Ces résultats confirment donc les observations obtenues grâce à l'analyse des images ioniques en SIMS, où la présence de cobalt a été détectée à la fois dans la cuticule et dans la matrice**. Cependant, il est important de noter que la présence de cobalt dans la matrice n'est pas systématiquement détectée, ce qui pourrait être attribué à une limite de détection spécifique au cobalt dans les échantillons et aux conditions d'acquisition utilisées (voir partie Matériels et méthodes).

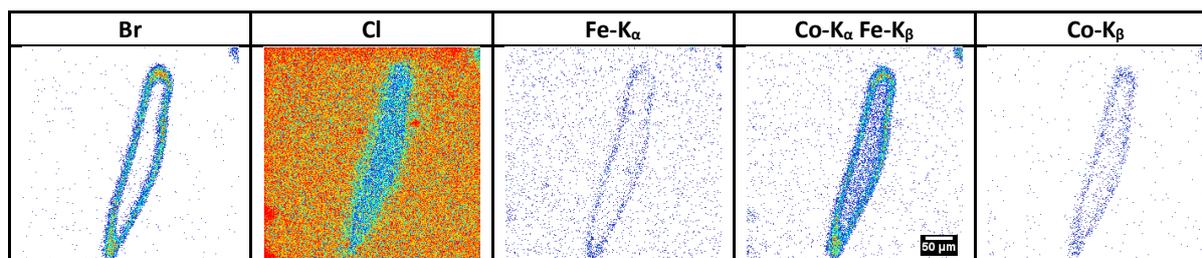


Figure 50. Cartographie de la fluorescence X par PIXE du byssus. Barre d'échelle 50  $\mu\text{m}$ .

Les analyses effectuées sur les fils de byssus provenant de moules exposées à une concentration de  $8,5 \times 10^{-6}$  M de cobalt présentent des résultats difficilement interprétables, bien que les paramètres d'acquisition et de préparation des échantillons soient similaires à ceux des moules exposées à une concentration de  $1,7 \times 10^{-5}$  M de cobalt. Par conséquent, on pourrait s'attendre à obtenir des spectres de fluorescence X similaires pour des éléments tels que le brome, dont la présence ne devrait pas être influencée par l'ajout de cobalt. Cependant, il est apparu que l'intensité de fluorescence du brome dans ces échantillons, qui ont été exposés à une concentration de cobalt plus faible, est également plus faible. Cette différence a été observée sur l'ensemble des fils de byssus provenant des échantillons exposés à  $8,5 \times 10^{-6}$  M de cobalt. De manière similaire, le chlore est présent dans la résine et permet, lors de nos analyses, de vérifier l'inclusion des échantillons en détectant sa fluorescence sur les spectres (Annexe Figure 96). À plusieurs reprises lors de nos analyses  $\mu$ -XRF et SIMS, nous avons observé que la résine utilisée pour les inclusions pénètre les tissus mous de la moule, mais ne pénètre pas les fils de byssus, comme en témoigne l'intensité plus faible de la fluorescence X du chlore au niveau de la matrice des fils (Figure 50). Cependant, les échantillons exposés à une concentration de  $8,5 \times 10^{-6}$  M de cobalt présentent une intensité de fluorescence du chlore plus élevée dans les fils, ce qui est surprenant et remarqué pour la première fois. À ce jour, aucune explication ne peut être fournie concernant le comportement de ces éléments dans les échantillons, en particulier en ce qui concerne les différences d'intensité observées et la présence de chlore dans les échantillons. Le protocole de préparation est similaire à celui utilisé pour les analyses SIMS.

### b) Glande digestive

Des coupes de la glande digestive ont également été analysées, mais aucune structure particulière n'a été observée dans les images de fluorescence du brome ou du calcium dans les échantillons exposés à des concentrations de  $1,7 \times 10^{-5}$  M et  $8,5 \times 10^{-6}$  M de cobalt. L'observation

des raies à basse énergie (comme le soufre et le phosphore) permet d'obtenir des images de la densité électronique des échantillons, révélant quelques structures similaires à celles visibles sur les images optiques. Cependant, les images de fluorescence du cobalt ne permettent pas de distinguer une accumulation localisée au sein d'une structure spécifique de la glande digestive (image non présentée).

Ces résultats, qui nous semblent incohérents, pourraient être attribués à la dégradation prononcée de la résine lors des analyses. Cela a conduit à l'apparition de brûlures à la surface des échantillons, nous obligeant ainsi à réduire le temps d'acquisition (voir la section Matériels et méthodes). Pour optimiser ces analyses, l'utilisation d'échantillons préparés par la cryofixation pourrait considérablement améliorer les résultats en permettant des acquisitions plus longues (Muggioli et al., 2018). De plus, cette méthode de préparation permettrait de figer les ions libres lors de la préparation, contrairement à l'inclusion en résine où les ions peuvent migrer plus facilement. Cependant, il est important de noter que la cryofixation est documentée principalement pour des cultures cellulaires, et son adaptation à des tissus biologiques nécessiterait une optimisation poussée que nous n'avons pas pu entreprendre.

## V. Étude de la spéciation du cobalt dans la moule par XAS

L'étude de la spéciation par XAS au seuil K du cobalt dans *M. galloprovincialis* a été réalisée après la contamination des individus avec une concentration de  $[Co] = 10^{-5}$  M pendant 12 jours, suivi du prélèvement de la glande digestive et d'une séparation sommaire permettant d'obtenir un culot et un surnageant (voir partie Matériels et méthodes). **Le byssus a été contaminé *ex vivo* avec une concentration de cobalt identique pendant 12 jours.** Ce choix de contamination pour le byssus a été fait en considération des résultats obtenus lors des expériences d'imagerie. Comme nous l'avons démontré, le cobalt est principalement associé à la cuticule du byssus. Bien que du cobalt ait été détecté au niveau de la matrice, une contamination *ex vivo* pourrait favoriser l'accumulation au niveau de la cuticule, qui semble être liée à des phénomènes de surface. La contamination *ex vivo* vise à éviter que les spectres intègrent le cobalt accumulé à la fois dans la cuticule et la matrice. Dans ce cas, les résultats

peuvent être interprétés comme reflétant une contribution majoritaire du cobalt associé à la cuticule.

De plus, les fils de byssus sont très résistants aux traitements chimiques et aux contraintes mécaniques, ce qui rend l'homogénéisation des échantillons difficile. Le protocole d'homogénéisation mis en place pour le byssus a également engendré des problèmes lors de l'acquisition des spectres XANES. Ces problèmes se caractérisent par une augmentation soudaine du signal incident, pouvant être dus à des phénomènes de diffraction à la surface de l'échantillon. Le traitement des données brutes a permis de normaliser le signal en utilisant l'intensité initiale et l'intensité mesurée. Les spectres EXAFS/XANES ont été acquis au seuil K du cobalt (7 706 eV). Afin de minimiser les effets d'oxydoréduction sous faisceaux, les mesures ont été **réalisées à basse température** (-160°C) pour assurer la stabilité des acquisitions dans le temps (voir partie Matériels et méthodes). Plusieurs échantillons de référence ont été mesurés pour être comparés aux spectres XANES provenant des échantillons de moules contaminées (Figure 51). Le Tableau 15 permet de résumer les caractéristiques des références.

*Tableau 15. Caractéristiques des échantillons de référence.*

Nom	CoF <sub>3</sub> Fluorure de cobalt	Co <sup>2+</sup> aquo Chlorure de cobalt	Cbl <sup>ox</sup> Cobalamine oxydée	Cbl <sup>red</sup> Cobalamine réduite
Degré d'oxydation du Co	+III	+II	+III	+II
Concentration	Solide	10 mM	5 mM	5 mM

Les échantillons de CoF<sub>3</sub> et Co<sup>2+</sup> aquo permettent d'avoir les spectres de références avec différents degrés d'oxydation du cobalt. Le spectre de CoF<sub>3</sub> est caractéristique de cobalt +III (7731 eV), on note cependant un phénomène d'autoabsorption (aplanissement de la raie blanche) due à l'utilisation du sel CoF<sub>3</sub> qui n'a pas été dilué lors de la préparation des pastilles. Le Co<sup>2+</sup> aquo a un spectre XANES typique du cobalt (+II) en solution (7 727 eV). Les références de cobalamine réduite (Cbl<sup>red</sup>) et oxydée (Cbl<sup>ox</sup>) montrent l'impact du degré

d'oxydation du cobalt sur le spectre XANES, on peut également remarquer des changements au niveau du pré-seuil caractéristique des métaux de transitions. La présence d'un pré-seuil à 7712 eV est caractéristique des métaux de transition dont la couche d n'est pas totalement remplie. La région du pré-seuil peut fournir des informations importantes sur les propriétés électroniques et la structure locale des atomes dans un environnement donné. En raison de la complexité de l'environnement considéré, le pré-seuil ne sera pas utilisé ici pour la spéciation du cobalt.

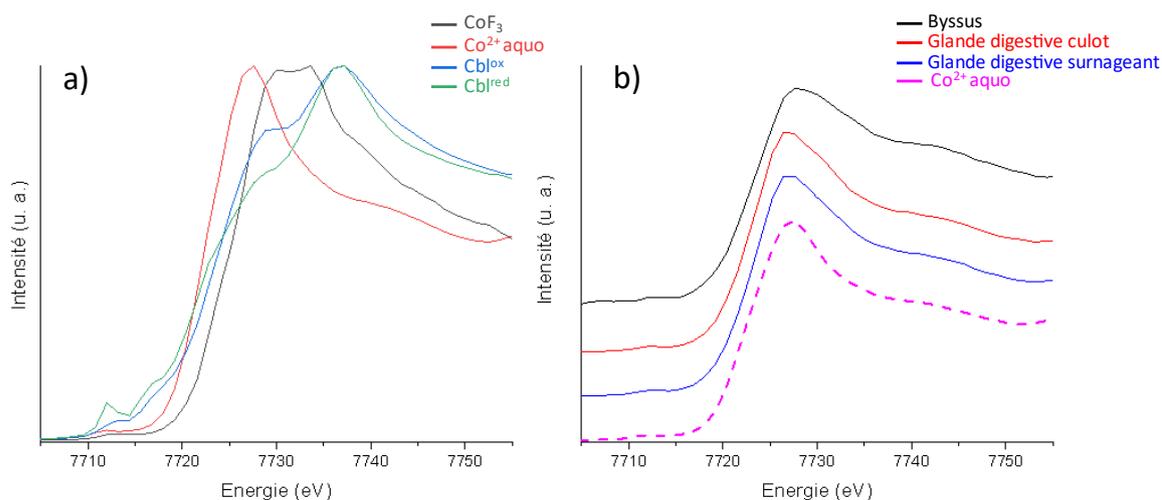


Figure 51. Spectres XANES au seuil K du cobalt. Comparaison des spectres XANES a) des références de cobalt, b) des spectres expérimentaux correspondant au surnageant, au culot de la glande digestive et au fils de byssus.

Les spectres XANES (Figure 51) indiquent la **présence de Co (+II) dans les échantillons correspondant au surnageant, au culot et au byssus**. L'analyse qualitative des spectres XANES des échantillons en les comparant avec les références de  $\text{Cbl}^{\text{red}}$  et  $\text{Cbl}^{\text{ox}}$  montre que les profils ne sont pas identiques. Les spectres XANES du surnageant et du culot se superposent, tandis que le spectre du byssus présente des différences significatives. Le rapport signal sur bruit est plus faible dans l'échantillon correspondant au surnageant ( $\epsilon = 0,027$ ). Le bruit plus important dans la fraction du culot ( $\epsilon = 0,040$ ) s'explique par la proportion moins élevée de cobalt dans ce compartiment. En effet, comme précédemment observé, cette fraction correspond aux granules riches en métaux et aux débris cellulaires, qui représentent environ 30 % du cobalt présent dans la glande digestive, tandis que le surnageant en contient 70 %.

Les ajustements des spectres EXAFS de la glande digestive et du byssus sont présentés Figure 52. Tout d'abord une approche qualitative montre des différences significatives des spectres au niveau des oscillations, ce qui reflète une différence sur l'environnement du cobalt. Nous détaillerons ci-dessous les modèles utilisés pour les ajustements des spectres de la glande digestive et du byssus.

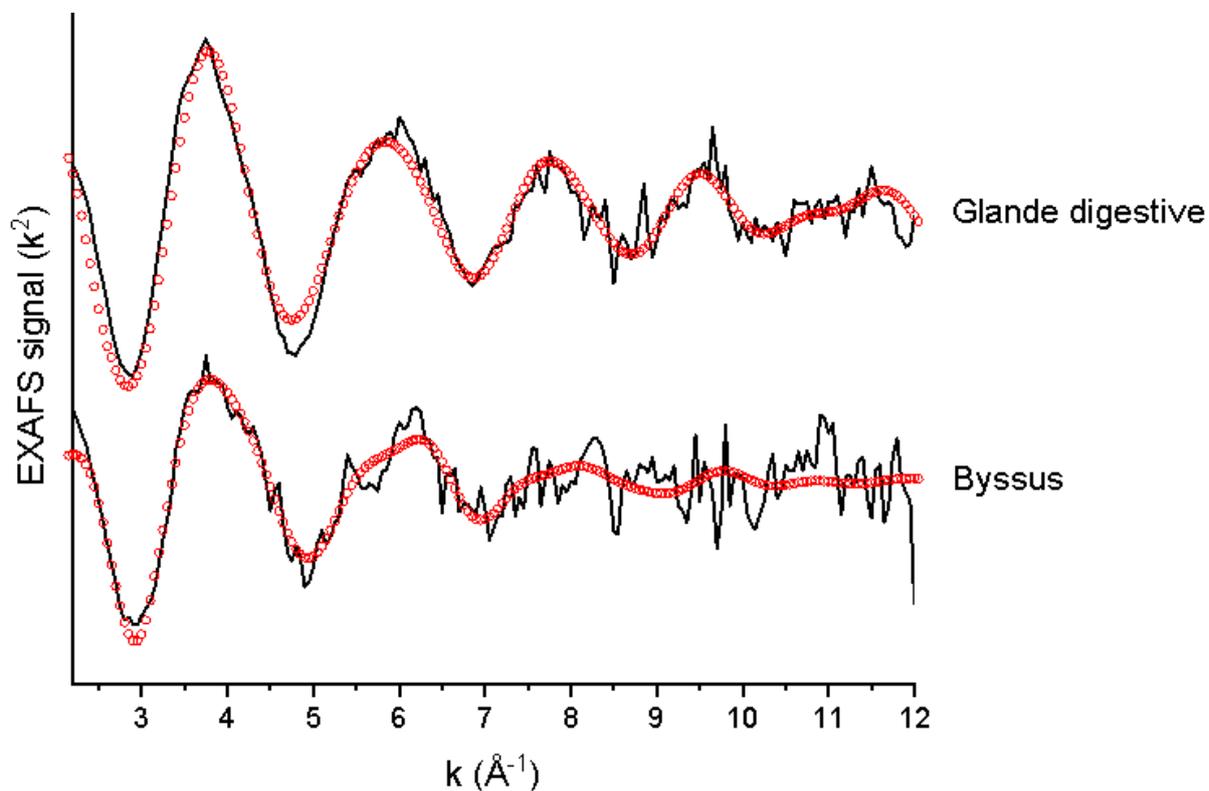


Figure 52. Spectres EXAFS expérimentaux de la glande digestive et du byssus (contamination *ex vivo*) au seuil K du cobalt. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (cercle).

### a) Glande digestive

La glande digestive a été ajustée en  $k^2$  dans l'espace R entre 1,2 et 5 Å après transformation de Fourier en utilisant une fenêtre de Hanning dans l'intervalle  $k$  (2,4-11,2 Å<sup>-1</sup>). Nous avons réalisé cet ajustement de la glande digestive en utilisant le **complexe [Zn (Cys)<sub>2</sub>]Na<sub>2</sub>** comme modèle dans lequel nous avons remplacé l'atome de zinc (Z=30) par un atome de cobalt (Z=27) dans le fichier Feff (Bell and Sheldrick, 1984). Ce modèle permet de refléter les nombreuses cystéines présentes dans les métallothionéines et participe à la formation de sites de complexation impliqués dans la chélation des métaux lourds. Les paramètres d'ajustement sont présentés dans le Tableau 16.

*Tableau 16. Paramètres structurels obtenus à partir de l'ajustement des données EXAFS dans la glande digestive.*

Échantillon	Première couche : N	Première couche : S	Deuxième couche : C	Paramètre d'ajustement
<b>Glande digestive</b>	3 (1) N à 2,09 (5) Å	3 (1) S à 2,38 (9) Å	3 (1) C à 2,86 (30) Å	$S_0^2 = 1,0$
	$\sigma^2 = 0,003 \text{ Å}^2$	$\sigma^2 = 0,025 \text{ Å}^2$	3 (1) C à 3,04 (15) Å	$e_0 = -3,16 \text{ eV}$
			$\sigma^2 = 0,0005 \text{ Å}^2$	Facteur R = 2 %

La transformée de Fourier du spectre résultant de l'ajustement est également fournie dans la Figure 52. La première sphère de coordination inclut les chemins de diffusion du soufre et de l'azote. La deuxième sphère de coordination comprend les chemins de diffusion des atomes de carbone. Lors de l'ajustement, les deux chemins de diffusion simples issus des atomes de carbone en position  $\alpha$  par rapport au soufre et à l'azote, ainsi que les deux chemins de diffusion triples issus des liaisons Co-N-C et Co-S-C, présentent le même facteur de Debye-Waller ( $\sigma^2$ ).

Lors de l'ajustement, nous avons obtenu 6 atomes dans la sphère de coordination du cobalt ce qui se conforte la présence d'une symétrie octaédrique. L'ajustement avec le même nombre de soufres(S) et d'azotes(N) a significativement amélioré la qualité des données. Nous avons testé plusieurs rapports S/N, bien que cela ait toujours entraîné une diminution de la qualité de l'ajustement.

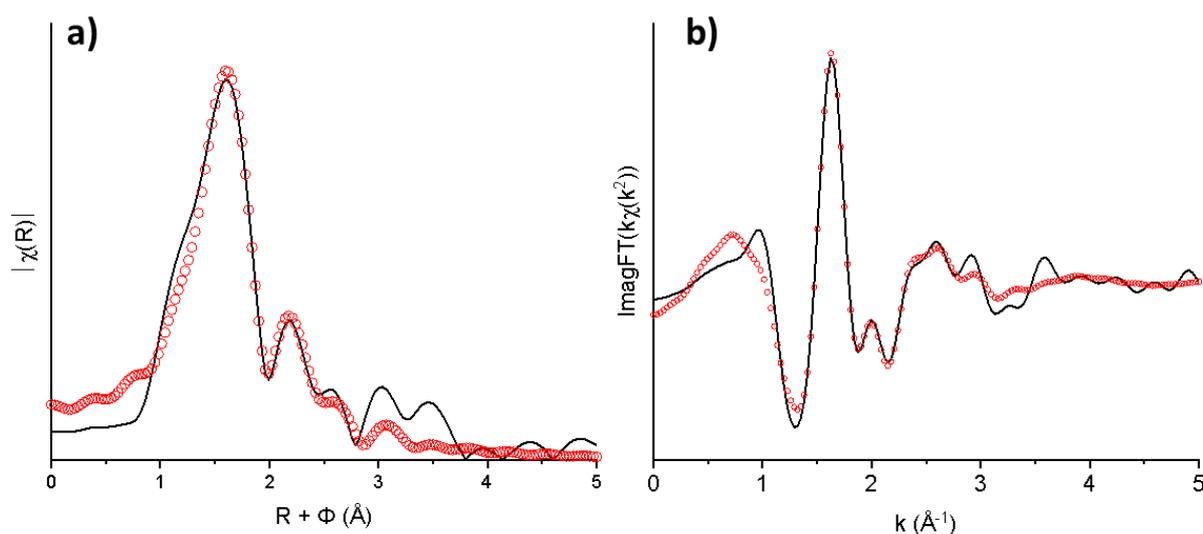


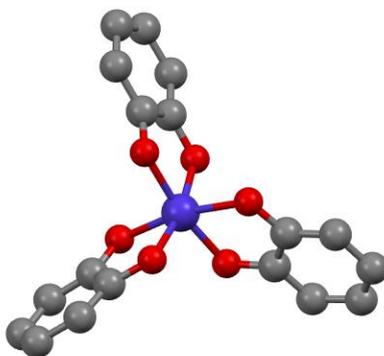
Figure 53. a) Module de la transformée de Fourier, et b) partie imaginaire de la transformée de Fourier en  $k^2\chi(k)$  de la glande digestive. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (cercle).

Les valeurs obtenues par l'ajustement des spectres EXAFS montrent que la première sphère de coordination est constituée de 3 (1) atomes de soufre à une distance moyenne de 2,38 (9) Å et de 3 (1) atomes d'azote à une distance moyenne de 2,09 (5) Å. La deuxième sphère de coordination est constituée de 3 (1) atomes de carbone à une distance moyenne de 3,04 (15) Å et de 3 (1) atomes de carbone à une distance moyenne de 2,86 (30) Å lié respectivement à l'azote et au soufre. Les ajustements suggèrent la coordination de trois cystéines avec le Co (+II). De plus, les données montrent que la présence de six atomes dans la première sphère de coordination du cobalt est indispensable pour obtenir des paramètres réalistes et suggèrent une géométrie octaédrique.

Cependant, en EXAFS, il est très difficile de distinguer l'azote de l'oxygène, et nous ne pouvons donc pas exclure la présence d'oxygène. Il n'existe pas de données cristallographiques correspondant à des complexes Co (+II)-cystéine pour comparer nos résultats. Il est plausible qu'un complexe de cobalt puisse impliquer des fonctions thiols dans la glande digestive. En effet, les métallothionéines sont présentes en grandes quantités dans cet organe et permettent la complexation des métaux grâce à leurs sites de complexation riche en cystéines. Il est très peu probable que le cobalt soit complexé de manière bidente par les cystéines dans la glande digestive, le groupe amine est impliqué dans la liaison peptidique.

## b) Byssus

Le signal EXAFS a été ajusté en  $k^2$  dans l'espace R entre 1 et 5 Å après transformation de Fourier en utilisant une fenêtre de Hanning dans l'intervalle  $k$  (2,4-10 Å<sup>-1</sup>) pour le byssus. L'ajustement du spectre EXAFS a été réalisé en utilisant la structure du **complexe tris(pyrocatecholato)ferrate** comme modèle, [Fe (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)<sub>3</sub>], dans lequel nous avons remplacé l'atome de fer (Z=26) par un atome de cobalt (Z=27) dans le fichier Feff (Anderson et al., 1982). La présence de cobalt au niveau de la cuticule pourrait être due à sa complexation par les protéines mfp-1 riche en DOPA. Ce modèle Co-catéchol permet donc de mimer le site de complexation des protéines mfp-1 et de le confronter avec les données expérimentales.



*Figure 54. Structure du complexe modèle pyrocatechol-cobalt. Les atomes d'hydrogène ont été omis pour plus de clarté.*

Les résultats obtenus à la suite des imageries SIMS nous ont permis de comprendre que le cobalt était associé au niveau de la cuticule des fils de byssus, nous fournissant des informations essentielles sur sa spéciation. Les protéines présentes au niveau de la cuticule sont connues pour complexer des métaux tels que le fer et le vanadium (Mesko et al., 2021). **Ces protéines, appelées mfp-1, sont uniquement présentes au niveau de la cuticule et sont riches en DOPA.**

Tableau 17. Paramètres structuraux obtenus à partir de l'ajustement des données EXAFS du byssus.

Échantillon	Première couche : Oxygène	Deuxième couche : Carbone	Paramètre d'ajustement
Fils de byssus	6 (1) O à 2,05 (1) Å $\sigma^2=0,014 \text{ \AA}^2$	6 (1) C à 2,93 (9) Å $\sigma^2=0,022 \text{ \AA}^2$	$S_0^2= 1,0$ $e_0= 0,78 \text{ eV}$ Facteur R = 3 %

Les paramètres d'ajustement sont décrits dans le Tableau 17 et l'ajustement est présenté à la Figure 55. **Les données EXAFS de l'ajustement sont satisfaisantes avec un facteur R de 3%.** La première sphère de coordination est composée de **6 (1) atomes d'oxygène** à une distance moyenne de **2,05 (1) Å**. La deuxième sphère est composée de **6 (1) d'atomes de carbone** à une distance moyenne de **2,93 (9) Å**. Deux chemins de diffusions multiples Co-O-C et Co-C-C ont été ajoutés et améliorent sensiblement la qualité de l'ajustement. Nous avons comparé la distance Co-O obtenue à partir de nos données avec celles de la littérature, en utilisant un complexe similaire impliquant des quinones, montrant des distances similaires comprises entre 2,028 et 2,196 Å. (Ribeiro et al., 2013).

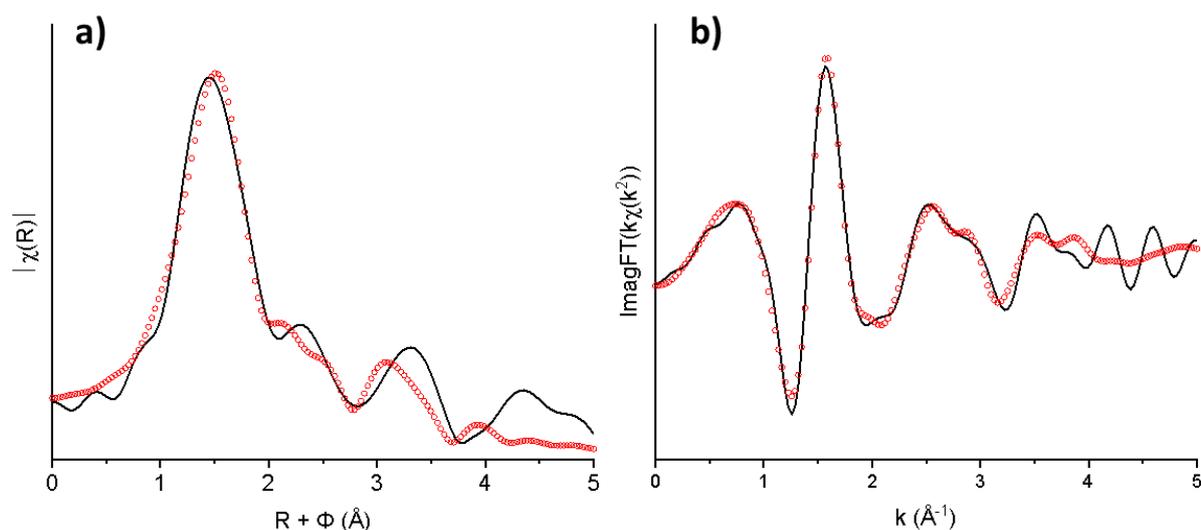


Figure 55. a) Module de la transformée de Fourier, et b) partie imaginaire de la transformée de Fourier en  $k^2\chi(k)$  du byssus. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (cercle).

On remarque toutefois que l'ajustement ne parvient pas à reproduire parfaitement le spectre expérimental. Les 6 oxygènes situés autour du cobalt semblent suggérer une géométrie octaédrique. En considérant le spectre XANES du byssus, on observe un pré-seuil de faible

intensité qui résulte d'une transition  $1s \rightarrow 3d$ . Cette transition peut suggérer une symétrie octaédrique ou pseudo-octaédrique (Sano, 1988; Westre et al., 1997). Le cobalt (+II) peut avoir une géométrie octaédrique bas spin avec une configuration électronique  $t^6_{2g} e^1_g$  impliquant une occupation asymétrique de l'orbitale  $eg$ , permettant une distorsion Jahn-Teller. Les distances moyennes que nous avons obtenues en EXAFS ne peuvent pas prendre en compte une distorsion de la géométrie octaédrique. Il est plausible que le complexe de cobalt dans le byssus soit asymétrique, ce qui pourrait expliquer les différences entre l'ajustement et le spectre expérimental. De plus, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'en fonction flexibilité des DOPA impliquées dans le site de complexation métallique, elles pourraient influencer la géométrie de coordination.

## VI. Les métallothionéines un candidat de choix pour la détoxification des métaux : Purification et complexation de la protéine

La purification des protéines issues de la glande digestive constitue une étape cruciale pour mieux comprendre la spéciation du cobalt dans *M. galloprovincialis*. Les métallothionéines sont des protéines privilégiées lors de l'étude des interactions entre les métaux et les mollusques. En raison de leur rôle dans le stockage et la détoxification des métaux, ces protéines sont pertinentes à étudier sous l'angle de la spéciation (Amiard et al., 2006; Rodriguez-zea et al., 2006; Rogival et al., 2007). Leur présence dans la glande digestive en fait un organe clé pour les processus liés au traitement des métaux (Geret and Cosson, 2000; Ivanković et al., 2005). L'extraction des protéines de la glande digestive peut être une procédure complexe nécessitant plusieurs étapes et pouvant rencontrer des difficultés pour obtenir une protéine purifiée. Les nombreuses cystéines présentes dans les métallothionéines permettent de chélater les métaux de transition (comme  $Zn^{2+}$  et  $Cu^{2+}$ ).

Les résultats présentés dans cette partie font partie d'un travail prospectif visant à comprendre l'interaction du matériel protéique de la glande digestive, en particulier les métallothionéines, avec les radionucléides. Ce travail pourrait être poursuivi ultérieurement dans le cadre du projet ESPERAME (Etude de la Spéciation des Radionucléides dans l'eau de MER) avec le CEA. Une méthode de purification développée par Honda en 2005 exploite le

pouvoir chélatant des métallothionéines pour les purifier à l'aide d'une chromatographie d'affinité chélatante des métaux (voir partie Matériels et méthodes).

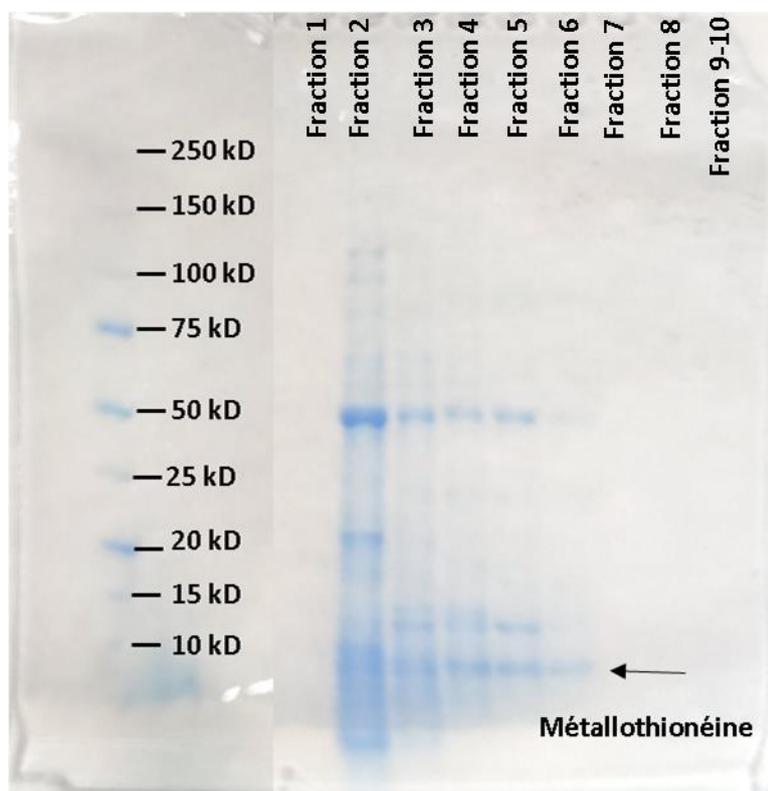
La quantification des protéines a été réalisée à l'aide de la méthode de Bradford (voir partie Matériels et méthodes). La concentration en protéines dans la glande digestive avant la purification était de 29,3 mg.g<sup>-1</sup> (mg de protéines par g de glande digestive humide). Après la purification par chromatographie d'affinité, les fractions obtenues ont été quantifiées, les résultats sont résumés dans le Tableau 18.

*Tableau 18. Concentration des protéines dans les différentes fractions d'élution de la chromatographie d'affinité. LD : limite de détection (0,1 mg.g<sup>-1</sup>)*

n° fraction	Concentration protéine (mg.g <sup>-1</sup> )
1	LD
2	20,8
3	4,1
4	2
5	1,8
6	0,6
7	LD
8	LD
9-10	LD

Les fractions ont été soumises à une analyse par SDS-PAGE dans des conditions réductrices, telles que décrites dans la section "Matériels et méthodes ". La Figure 56 montre la séparation des protéines sur un gel après l'électrophorèse. Le SDS-PAGE a permis de mettre en évidence la présence significative de protéines dans les fractions 2 à 4, ce qui correspond aux résultats obtenus lors des analyses par la méthode de Bradford. En se basant sur le poids moléculaire des **métallothionéines**, qui est d'environ 6,5 kDa, il est possible d'estimer leur

position sur les gels. De plus, cette observation souligne que les fractions 3, 4, 5, 6 et 7 ont été **partiellement purifiées à partir de la glande digestive**.



*Figure 56. Purification par chromatographie d'affinité. Les différentes fractions éluées ont été séparées par SDS-PAGE. La flèche indique la région dans laquelle les métallothionéines migrent.*

Cependant, l'une des difficultés de ces expériences réside dans la quantité de matière disponible pour réaliser les quantifications et les gels d'électrophorèse. Plusieurs autres chromatographies d'affinité ont été utilisées pour quantifier les protéines dans les fractions où les protéines ne sont pas visibles. Les fractions (1, 8, 9, 10) ne peuvent pas être quantifiées directement par la méthode de Bradford, on ne peut donc pas conclure entre l'absence de protéines ou une concentration de protéines inférieure à la limite de détection d'environ  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Ces fractions de concentrations inconnues ont été concentrées à l'aide d'un filtre à centrifuger (coupure à 3 kDa) puis analysées avec la méthode de Bradford. Les résultats sont purement prospectifs et qualitatifs, mais ils indiquent que des protéines sont également présentes dans les fractions 8 et 9, tandis que la fraction 1 ne contient pas de protéine, ce qui correspond au volume mort de la chromatographie d'affinité. La présence de protéines dans les

fractions finales pourrait contenir des métallothionéines purifiées. D'autres analyses seront nécessaires en utilisant une plus grande quantité de la glande digestive et des colonnes de chromatographie d'affinité disposant de capacité plus importante pour quantifier les protéines et les observer par électrophorèse sur gel.

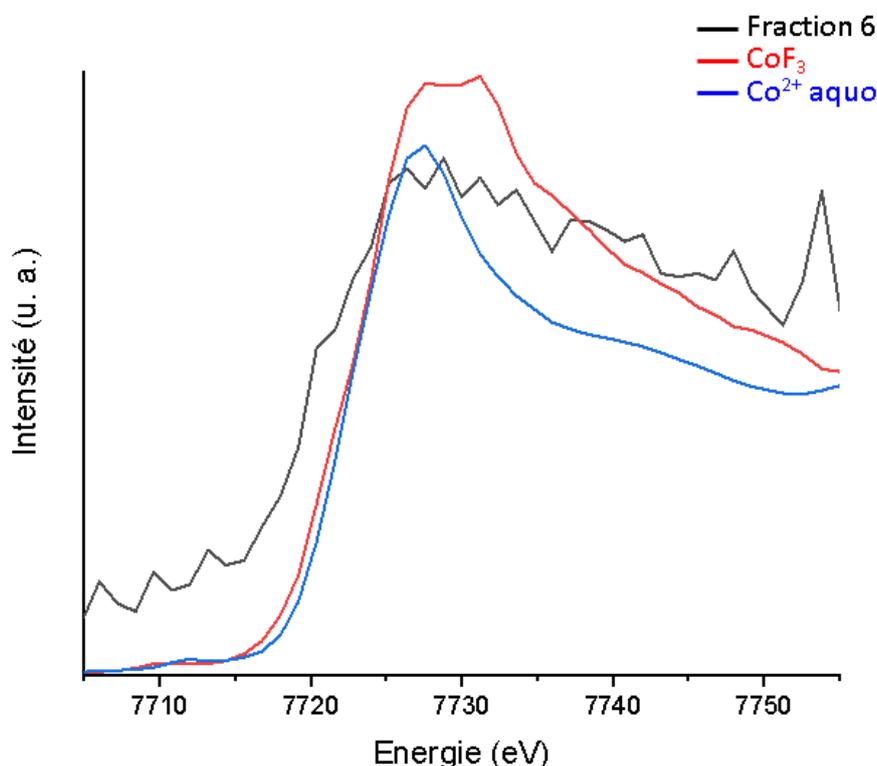


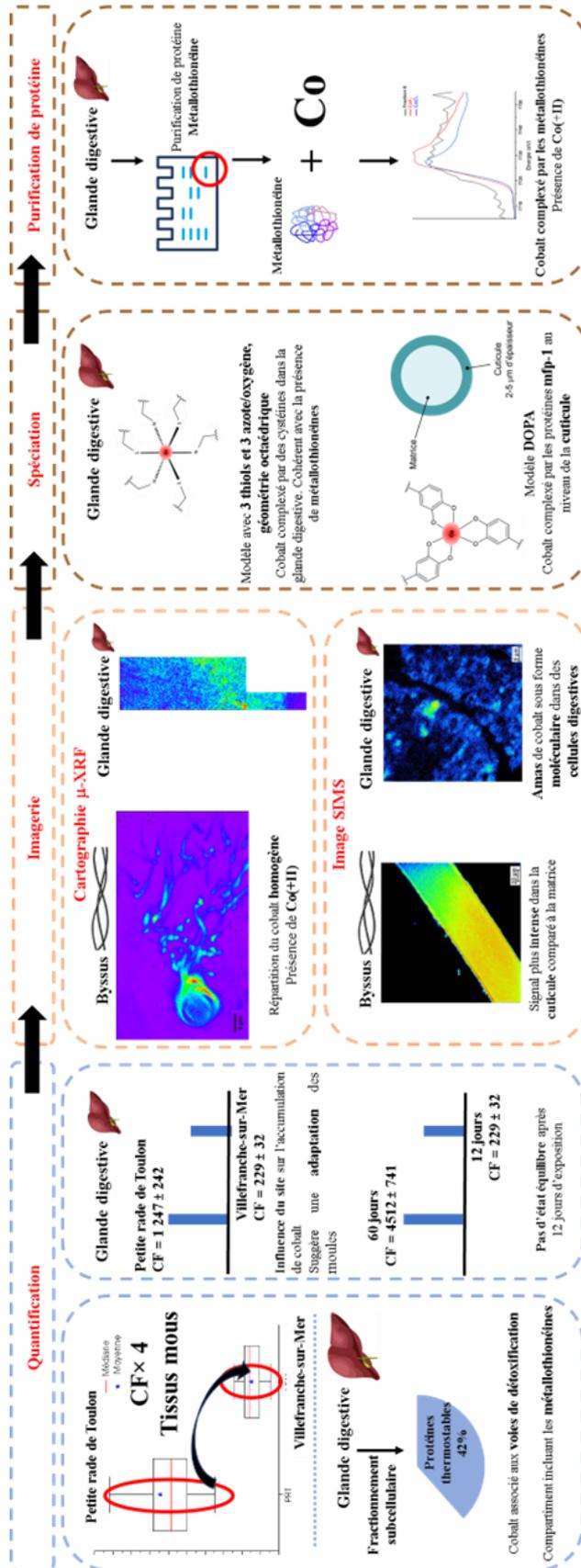
Figure 57. Spectres XANES de la fraction 6 et des références de  $\text{Co}^{2+}$  aquo et  $\text{CoF}_3$  (Co +III).

La **fraction 6** a été purifiée et a été chargée avec 25  $\mu\text{M}$  de cobalt dans un milieu tampon (50 mM HEPES, 150 mM NaCl). Ensuite, la fraction a été rincée à l'aide d'un filtre à centrifuger (coupure à 3 kDa) pour **éliminer le cobalt non complexé**, comme indiqué dans la section "Matériels et Méthode". Le choix de cette fraction a été effectué à la suite de purification de protéines dans des conditions identiques suivie par un SDS-PAGE. L'observation du gel a permis de montrer que la fraction 6 a été partiellement purifiée et que la région correspondant aux métallothionéines est relativement intense.

Le spectre XANES du cobalt a pu être obtenu à partir de la fraction 6 et est présenté Figure 57. Bien que le spectre soit extrêmement bruité ( $\epsilon = 0,40$ ), le **seuil du cobalt** est clairement visible. La présence du seuil de cobalt pourrait être le signe de sa complexation par les métallothionéines puisque le **cobalt libre a été éliminé par filtration**. La comparaison



## VII. Bilan





# **Chapitre 4 – L'Uranium un radioélément et un métal lourd**



## I. Généralités

### 1) Occurrence dans l'environnement

L'uranium est un métal de numéro atomique  $Z=92$  dans la classification du tableau périodique. Il appartient à la famille des actinides, qui comprend 15 éléments allant de l'actinium (89) au lawrencium (103) (Figure 59). Les actinides sont souvent désignés par la lettre "An" comme abréviation.

IA 1 H Hydrogène 1,0079																	VIIIA 2 He Hélium 4,0026
2 3 Li Lithium 6,941	4 4 Be Béryllium 9,0122											5 5 B Bore 10,811	6 6 C Carbone 12,011	7 7 N Azote 14,007	8 8 O Oxygène 15,999	9 9 F Fluor 18,998	10 10 Ne Neon 20,180
3 11 Na Sodium 22,990	12 12 Mg Magnésium 24,305											13 13 Al Aluminium 26,982	14 14 Si Silicium 28,086	15 15 P Phosphore 30,974	16 16 S Soufre 32,065	17 17 Cl Chlore 35,453	18 18 Ar Argon 39,948
4 19 K Potassium 39,098	20 20 Ca Calcium 40,078	21 21 Sc Scandium 44,956	22 22 Ti Titane 47,867	23 23 V Vanadium 50,942	24 24 Cr Chrome 51,996	25 25 Mn Manganèse 54,938	26 26 Fe Fer 55,845	27 27 Co Cobalt 58,933	28 28 Ni Nickel 58,693	29 29 Cu Cuivre 63,546	30 30 Zn Zinc 65,39	31 31 Ga Gallium 69,723	32 32 Ge Germanium 72,64	33 33 As Arsenic 74,922	34 34 Se Sélénium 78,96	35 35 Br Brome 79,904	36 36 Kr Krypton 83,80
5 37 Rb Rubidium 85,468	38 38 Sr Strontium 87,62	39 39 Y Yttrium 88,906	40 40 Zr Zirconium 91,224	41 41 Nb Niobium 92,906	42 42 Mo Molybdène 95,94	43 43 Tc Technetium (97)	44 44 Ru Ruthénium 101,0	45 45 Rh Rhodium 102,91	46 46 Pd Paladium 106,42	47 47 Ag Argent 107,87	48 48 Cd Cadmium 112,41	49 49 In Indium 114,82	50 50 Sn Étain 118,71	51 51 Sb Antimoine 121,76	52 52 Te Tellure 127,60	53 53 I Iode 126,90	54 54 Xe Xénon 131,29
6 55 Cs Césium 132,91	56 56 Ba Baryum 137,33	* 57 La Lanthane 138,91	72 72 Hf Hafnium 178,49	73 73 Ta Tantale 180,95	74 74 W Tungstène 183,84	75 75 Re Rhenium 186,21	76 76 Os Osmium 190,23	77 77 Ir Iridium 192,22	78 78 Pt Platine 195,08	79 79 Au Or 196,97	80 80 Hg Mercure 200,59	81 81 Tl Thallium 204,38	82 82 Pb Plomb 207,2	83 83 Bi Bismuth 208,98	84 84 Po Polonium (209)	85 85 At Astatine (210)	86 86 Rn Radon (222)
7 87 Fr Francium (223)	88 88 Ra Radium (226)	** 89 Ac Actinium (227)	104 104 Rf Rutherfordium (267)	105 105 Db Dubnium (268)	106 106 Sg Seaborgium (271)	107 107 Bh Bohrium (270)	108 108 Hs Hassium (277)	109 109 Mt Meitnium (276)	110 110 Ds Darmstadtium (281)	111 111 Rg Roentgenium (280)	112 112 Uub Ununbium (285)	113 113 Uut Ununtrium (287)	114 114 Uuq Ununquadium (289)	115 115 Uup Ununpentium (288)	116 116 Uuh Ununhexium (289)	117 117 Uus Ununseptium (291)	118 118 Uuo Ununoctium (293)
		* lanthanides	57 La Lanthane 138,91	58 Ce Cérium 140,12	59 Pr Praseodyme 140,91	60 Nd Néodyme 144,24	61 Pm Prométhium (145)	62 Sm Samarium 150,36	63 Eu Europium 151,86	64 Gd Gadolinium 157,25	65 Tb Terbium 158,93	66 Dy Dysprosium 162,50	67 Ho Holmium 164,93	68 Er Erbium 167,26	69 Tm Thulium 168,93	70 Yb Ytterbium 173,04	71 Lu Lutécium 174,97
		** actinides	89 Ac Actinium (227)	90 Th Thorium 232,04	91 Pa Protactinium 231,04	92 U Uranium 238,03	93 Np Neptunium (237)	94 Pu Plutonium (244)	95 Am Américium (243)	96 Cm Curium (247)	97 Bk Berkélium (247)	98 Cf Californium (251)	99 Es Einsteinium (252)	100 Fm Fermium (257)	101 Md Mendélévium (258)	102 No Nobelium (259)	103 Lr Lawrencium (262)

Figure 59. Tableau périodique de Mendeleïev et la place des actinides.

L'uranium est un radioélément, car tous ses isotopes sont instables. Dans la nature, l'uranium existe sous trois isotopes, avec la présence majoritaire du  $^{238}\text{U}$  (Tableau 19). Par une série de désintégrations (alpha, bêta), le  $^{238}\text{U}$  se stabilise en formant des noyaux fils jusqu'à atteindre un état stable, le  $^{206}\text{Pb}$ , comme décrit précédemment. La série de désintégration du  $^{235}\text{U}$  est communément appelée « série de l'actinium », cette série commence par le  $^{235}\text{U}$  jusqu'à atteindre l'isotope stable  $^{207}\text{Pb}$  (Figure 60a). Le  $^{238}\text{U}$  et le  $^{235}\text{U}$  représentent deux chaînes de

désintégrations radioactives naturelles encore présentes sur Terre en raison de leur longue durée de vie. La série du  $^{232}\text{Th}$  est également présente et se termine par le  $^{208}\text{Pb}$  (Figure 60b).

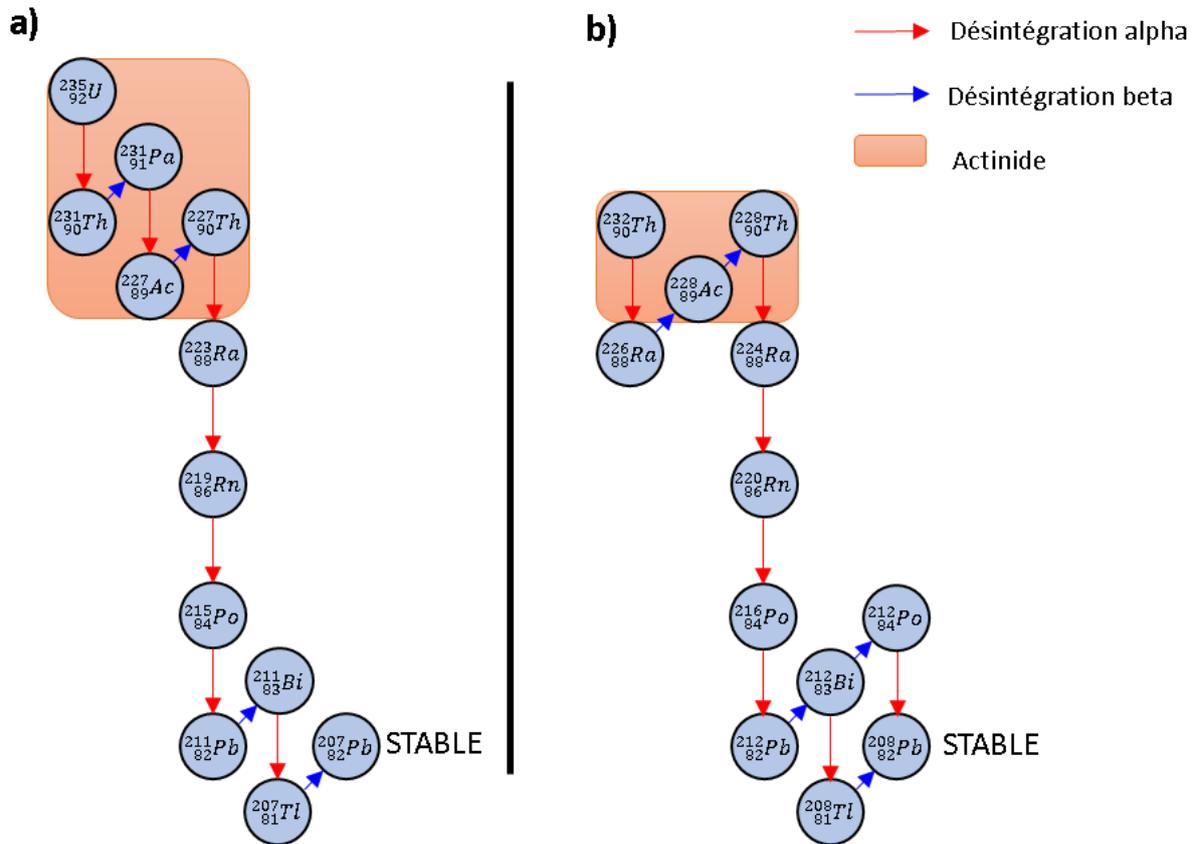


Figure 60. Chaînes de désintégration de l'uranium-235 (a) et du thorium-232 (b)

Tableau 19. Propriétés de l'uranium naturel.

Isotope	% en masse	Demi-vie (année)	Activité spécifique (Bq.g <sup>-1</sup> )
$^{234}\text{U}$	0,0055	$2,44 \times 10^5$	$2,31 \times 10^8$
$^{235}\text{U}$	0,72	$7,04 \times 10^8$	80 011
$^{238}\text{U}$	99,28	$4,46 \times 10^9$	12 445

L'uranium naturel ( $^{\text{nat}}\text{U}$ ) est présent naturellement dans la croûte terrestre à une concentration moyenne de 2,7 ppm bien qu'il y ait de nombreuses disparités géographiques

(0,5-4,7 ppm) (Lambert and Heier, 1968). Dans l'eau de mer, sa concentration est d'environ 3,3 ppb. La concentration d'uranium dans les océans augmente annuellement (8 500 tonnes) principalement en raison de l'apport d'uranium par les fleuves et l'érosion des sols (*e.g.*, Le Rhône contribue à un apport de 29 t d'uranium par an dans la mer). Bien que la concentration d'uranium dans l'eau de mer soit inférieure à celle présente sur Terre, la quantité y est mille fois plus importante que celle qui peut être extraite des mines d'uranium, avec une quantité totale estimée à 4,5 milliards de tonnes dans les océans. De nombreuses équipes cherchent des moyens efficaces et peu coûteux pour extraire sélectivement l'uranium dans les océans (Abney et al., 2017; Dungan et al., 2017). La distribution naturelle de l'uranium dans l'environnement peut être perturbée par l'action humaine (comme l'industrie minière). On appellera alors NORM (Naturally Occurring Radioactive Materials) les matériaux dont les concentrations en matière radioactive sont plus importantes que celles habituellement présentes dans l'environnement. Les NORM peuvent provenir d'activités humaines et industrielles telles que l'agriculture avec la production d'engrais phosphatés, le forage de carburant fossile et l'exploitation minière. La gestion de ces NORM a pour objectif de limiter les risques locaux pour la santé et l'environnement.

### a) Propriété de l'uranium

L'uranium est un métal de transition de configuration électronique  $[\text{Rn}]5f^36d^17s^2$ . L'uranium à quatre degrés d'oxydation, +III, +IV, +V et +VI avec comme configurations électroniques respectives :  $[\text{Rn}]5f^3$ ,  $[\text{Rn}]5f^2$ ,  $[\text{Rn}]5f^1$  et  $[\text{Rn}]5f^0$ . Dans les milieux anoxiques, l'uranium est principalement sous forme réduite U (IV), ce qui le rend généralement peu mobile. Dans les milieux oxydants, U (IV) est oxydé en U (VI) qui est majoritairement présent sous la forme d'oxycation  $\text{UO}_2^{2+}$  (appelé uranyle), qui est soluble et peut être complexé, ce qui le rend plus mobile que la forme U (IV). Le diagramme redox de l'uranium est présenté sur la Figure 61.

L'uranyle est un acide dur de Lewis avec deux oxygènes dans le plan axial, qui interagit préférentiellement avec l'oxygène, l'azote et le fluor, qui sont des donneurs d'électrons (Figure 62). La théorie HSAB (Hard and Soft Acids and Bases) peut être appliquée afin de comprendre la complexation de l'uranyle en solution (Pearson, 1997, 1963). Un acide (ou une base) dur est caractérisé par une petite taille (rayon atomique/ionique faible), des charges électroniques très localisées donc faiblement polarisables (*e.g.*,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{UO}_2^{2+}$ ). Les acides durs



l'instabilité des complexes formés. Dans l'eau de mer à pH 8, l'uranium est principalement sous forme d'uranyle, ayant une forte affinité pour les carbonates, représentant de 80 % à 100 % des complexes observés (Choppin and Wong, 1998). Deux techniques ont permis d'étudier la spéciation de l'uranium dans l'eau de mer. La première est la spectrofluorométrie laser résolue en temps (SLRT) et la deuxième est la spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS). Ces deux techniques permettent de travailler avec des concentrations relativement faibles,  $10^{-8}$  M et  $10^{-5}$  M, respectivement. Les récents progrès en spéciation de l'uranyle à des concentrations environnementales dans le milieu marin confirment la présence d'une espèce majoritaire  $(Ca/Mg)_2UO_2(CO_3)_3$  qui était jusqu'à présent supputée dans une gamme de pH comprise entre 5,5 et 8,5 (Maloubier et al., 2015). Des espèces minoritaires de complexes sont également rapportées en proportions plus faibles, telles que  $UO_2(CO_3)_2^{2-}$ ,  $UO_2(CO_3)_2^{4-}$  (Figure 63). Les constantes de formation des espèces uranyle-carbonate sont supérieures à 25 et varient légèrement en fonction du contre-ion associé (*e.g.*, Ca, Mg, Sr). La forte stabilité des complexes formés peut expliquer sa faible bioaccumulation dans le milieu marin.

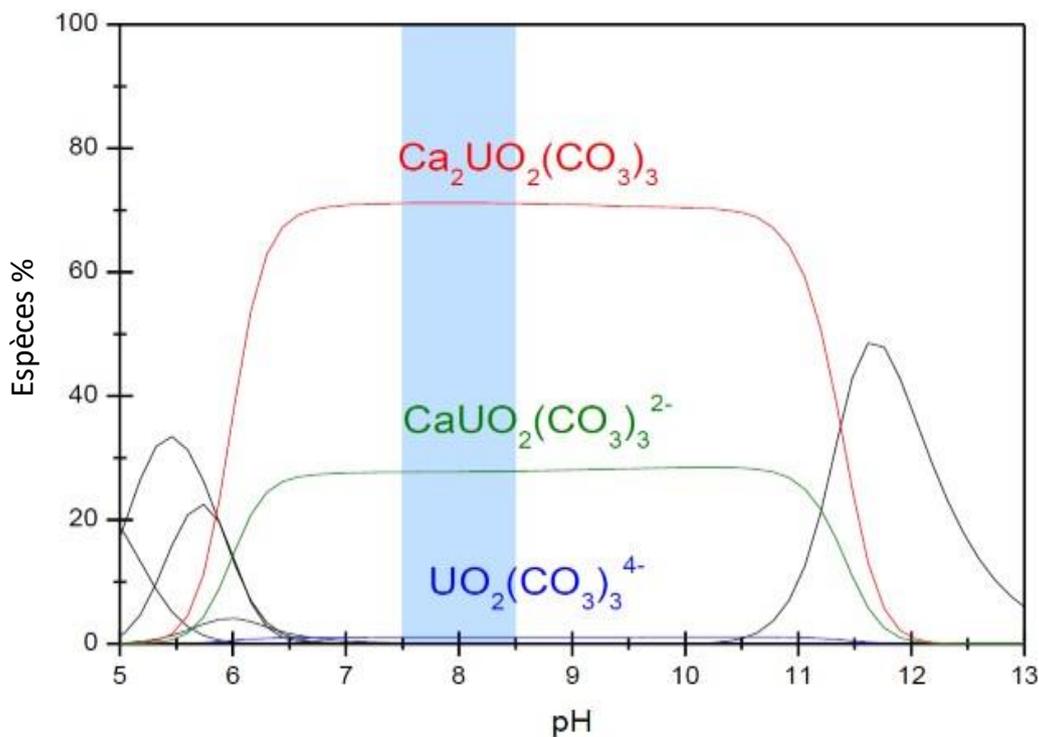


Figure 63. Diagramme de spéciation théorique de l'uranium (VI)  $5 \cdot 10^{-5}$  M dans l'eau de mer (JCHESS).

## 2) Bioaccumulation de l'uranium dans les mollusques bivalves

Dans les milieux aquatiques, la toxicité de l'uranium est principalement due à sa chimiotoxicité plutôt qu'à sa radiotoxicité (Sheppard, 2001; Wrenn et al., 1985). Bien que peu radiotoxique, son étude reste limitée, car il s'agit d'un radioélément ce qui nécessite des laboratoires autorisés à manipuler des matériaux radioactifs. Comme mentionné précédemment, la spéciation d'un élément est importante pour définir sa toxicité. Le pH, les complexes organiques ou inorganiques sont des facteurs qui peuvent modifier la toxicité de l'uranium dans l'eau en modifiant sa biodisponibilité (Sheppard, 2001). Par exemple, la modification de la concentration en dioxyde de carbone induit un changement de spéciation de l'uranyle en solution et la diminution du complexe uranyle-carbonate augmente la biodisponibilité de l'uranium. Chez *Corbicula fluminea*, cette variation induit une distribution différente de l'uranium qui décroît lorsque la concentration en dioxyde de carbone augmente (Tran et al., 2004).

Les données disponibles sur la bioaccumulation de l'uranium dans le biote marin sont peu connues. Un rapport AIEA permet d'estimer le facteur de concentration de l'uranium dans les mollusques en indiquant une valeur de 30 (sans unité) (IAEA, 2004). Parmi les espèces considérées, on y trouve des bio-indicateurs reconnus tels que les bivalves (*e.g.*, les moules) et des espèces de macroalgues (algue brune). Les bio-indicateurs comme les moules sont largement utilisés afin de détecter les contaminations environnementales. Cependant peu de données existent sur la quantification de l'uranium dans ces organismes sentinelles dans leurs milieux naturels. À proximité de Sellafield, l'analyse de *M. eludis* montre la présence d'uranium dans le périostracum (partie externe de la coquille), le byssus et dans des tissus mous tels que les branchies et la glande digestive (Hamilton, 1980). Quelques études réalisées dans des zones côtières industrialisées sans contamination notable de l'eau de mer par l'uranium ont montré des concentrations d'uranium dans les moules allant de 0,2 à 1,3 ppb (Assunta Meli et al., 2008; Cuculic et al., 2006).

L'étude de la spéciation de l'uranium dans les organismes marins est encore très limitée. Bien que la spéciation de l'uranium dans l'eau douce puisse différer de l'eau de mer, il est important d'obtenir des données sur l'interaction entre l'uranium et les mollusques bivalves dans ce compartiment. Parmi les espèces de bivalves, la moule d'eau douce a été utilisée pour

comprendre l'interaction de l'uranium avec le biote et a servi de bio-indicateur (Bilal et al., 2014). L'exploitation d'une mine de cuivre-uranium en Australie de 1953 à 1971 a pollué les cours d'eau et les sols par les résidus miniers, sa réhabilitation entre 1982 et 1985 a visé à réduire la présence de métaux dans l'environnement (*e.g.*, Cu, Zn, Mn, U). La coquille des moules d'eau douce (*Velesunio angasi*) peut en effet servir à quantifier l'uranium et obtenir des informations sur son évolution au fil du temps. La croissance de la coquille peut être visualisée par la stratification à la surface de la coquille et être corrélée avec l'âge de la moule. Ainsi une corrélation entre l'âge et la quantité d'uranium présente a été mise en évidence. De plus, cette espèce de moule a une espérance de vie de plus de 40 ans, ce qui a permis d'avoir des informations sur une période relativement longue (Markich, 2002).

Une autre moule, *Corbicula fluminea*, a été utilisée comme bio-indicateur dans les eaux douces. L'exposition en laboratoire à des concentrations d'uranium de 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  indique une répartition de l'uranium majoritairement dans les branchies et la glande digestive. L'accumulation d'uranium dans les branchies augmente de manière linéaire en fonction du temps d'exposition, contrairement à la glande digestive qui semble atteindre un état d'équilibre à 40 jours (Simon and Garnier-Laplace, 2004). L'accumulation de l'uranium dans les organes peut être imagée par microscopie électronique ou par imagerie ionique (SIMS : Secondary ion mass spectrometry) (Chassard-Bouchaud, 1996; Marigómez et al., 2002). Dans les branchies de *C. fluminea*, des images ioniques (SIMS) de l'uranium ont indiqué une répartition hétérogène dans les filaments (Tessier et al., 2009). D'autres images ont été réalisées sur des bivalves exposés à de l'uranium, les branchies ont montré la présence de forme condensée d'uranium. Ces granules d'uranium formant des aiguilles ont été corrélées avec la présence de phosphate pour lequel l'uranium a une forte affinité en se basant sur le principe d'HSAB. Des analyses SIMS et de l'imagerie électronique ont permis d'imager la répartition de l'uranium dans plusieurs organes de la moule, *M. eludis*. Des formes condensées ont également été observées avec la présence d'aiguilles de phosphate d'uranium dans des lysosomes de la glande digestive et une accumulation localisée dans les diverticules de la glande digestive. Dans le byssus, l'uranium semble être réparti de manière homogène dans le cœur fibreux des fils (Chassard-Bouchaud et al., 1992). Le fractionnement subcellulaire par ultracentrifugation apporte des informations complémentaires sur la répartition de l'uranium dans différents compartiments cellulaires. La partie non-cytosol (incluant le noyau, les lysosomes, les membranes, les

microsomes) contient la majorité (95 %) de l'uranium présent dans les branchies de *C. fluminea* (Markich, 2002; Simon and Garnier-Laplace, 2004). Plus précisément, l'uranium était associé aux fractions présentes dans le culot après la centrifugation, les organelles et les granules, qui constituent le compartiment principal du stockage de l'uranium (Simon et al., 2011). Les voies de détoxification connues pour les mollusques bivalves sont les granules riches en métaux (GRM) et les métallothionéines qui sont des protéines ubiquitaires riches en cystéine. L'association d'un métal avec les GRM est reliée à la précipitation du métal en des formes condensées insolubles. Les métallothionéines sont utilisées comme biomarqueurs dans de nombreuses études pour refléter la qualité de l'eau. Elles sont capables de reconnaître des métaux lourds et de les détoxifier (Amiard et al., 2006; Chan et al., 2002). La présence de certains métaux (*e.g.*, cadmium) peut induire une augmentation de métallothionéines et de la tolérance aux métaux des organismes.

Des concentrations des métallothionéines plus importantes ont pu être détectées dans des populations d'invertébrés (crabes et crevettes) vivant sur des sites pollués (Ross et al., 2002). La présence de mollusques bivalves dans des zones polluées tels que les ports a été liée avec l'augmentation de biomarqueurs (Arrighetti et al., 2019; Pillet et al., 2022; Regoli et al., 2004). L'exposition à l'uranium impacte également les comportements des moules qui peuvent être modifiés. Les moules sont capables de détecter des concentrations d'uranium anormales ( $0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) ce qui induit une modification des mouvements de la valve et entraîne la fermeture de la coquille (Fournier et al., 2004; Markich, 2003). Les résultats sont nécessaires pour avoir une idée des organes qui accumulent de l'uranium chez les mollusques bivalves.

## II. Étude de l'accumulation de l'uranium par les moules *M. galloprovincialis*

### 1) Étude de l'accumulation de l'uranium chez les moules à différentes échelles

#### a) Accumulation des métaux chez les moules de différentes origines : cas de Villefranche-sur-Mer et la petite rade de Toulon

Nous avons comparé l'accumulation de l'uranium pendant 12 jours dans les moules provenant de Villefranche-sur-Mer et de la petite rade de Toulon. Le Tableau 20 synthétise les conditions expérimentales de contamination. La répartition des individus selon leur taille est disponible dans la partie Matériels et méthodes. Les moules dont la longueur de la coquille était supérieure à 6,5 cm ont été disséquées en séparant les organes tandis que les moules dont la longueur était inférieure à 6,5 cm ont été gardées entières (sans la coquille).

Tableau 20. Conditions expérimentales des contaminations à l'uranium comparant les moules de Villefranche-sur-Mer et de la petite rade de Toulon.

Provenance des moules	Villefranche-sur-Mer	Petite rade de Toulon
Nombre de spécimens	83	79
Volume (L)	12	12
Répartition analyse moule entière/organe	54/28	55/24
Concentration d'exposition $^{238}\text{U}$ (M)	$6 \times 10^{-7}$ M	$6 \times 10^{-7}$ M
Durée	12 jours (changement d'eau à J+5)	12 jours (changement d'eau à J+5)
Alimentation T. Iso $10^4$ cellules/moules	Tous les 3 jours	Tous les 3 jours

Dans un premier temps, la quantification de l'uranium dans les moules entières (entre 6,5 et 2,5 cm) provenant des deux sites après la période de contamination de 12 jours a été réalisée (Figure 64). Les deux groupes ont été soumis à une analyse de variance ( $F = 4,3$ ,  $p > 0,05$ ) qui n'a pas révélé de différences significatives entre les moules de même taille, quelle que soit leur origine. Cependant, il est possible de remarquer que les moules de Villefranche-sur-Mer mesurant entre 2,5 et 3,5 cm présentent des facteurs de concentration supérieurs ( $\bar{x} = 45 \pm 9$  ;  $n=3$ ) à ceux des moules mesurant entre 6,5 et 3,5 cm ( $\bar{x} = 13 \pm 1$  ;  $n= 52$ ), ces moules ont été exclues de l'ANOVA. La présence de trois moules juvéniles mesurant entre 3,5 et 2,5 cm suggère que les cinétiques d'accumulation de l'uranium pourraient différer. Toutefois, aucune étude à plus grande échelle n'a été entreprise pour confirmer d'éventuelles différences entre les moules adultes et les moules juvéniles. Par ailleurs, une recherche menée sur d'autres bivalves, en l'occurrence les palourdes (*Gafrarium tumidum*) par Hédouin et ses collaborateurs, a révélé une relation inversement proportionnelle entre la taille et les facteurs de concentration pour certains éléments tels que le chrome, le cadmium, le cobalt et le zinc (Hédouin et al., 2006). Plusieurs autres études ont montré des résultats similaires avec des radionucléides (e.g.,  $^{210}\text{Po}$ ) (Bustamante et al., 2002; Lim and Mohamed, 2019). Comme décrit précédemment l'âge des individus est corrélé avec le nombre de stries présentes sur la coquille permettant d'estimer leurs âges. L'approfondissement des résultats concernant les variations d'accumulation de l'uranium en fonction de la maturité des individus n'a pas été poursuivi, et les moules juvéniles ont été délibérément exclues des expériences.

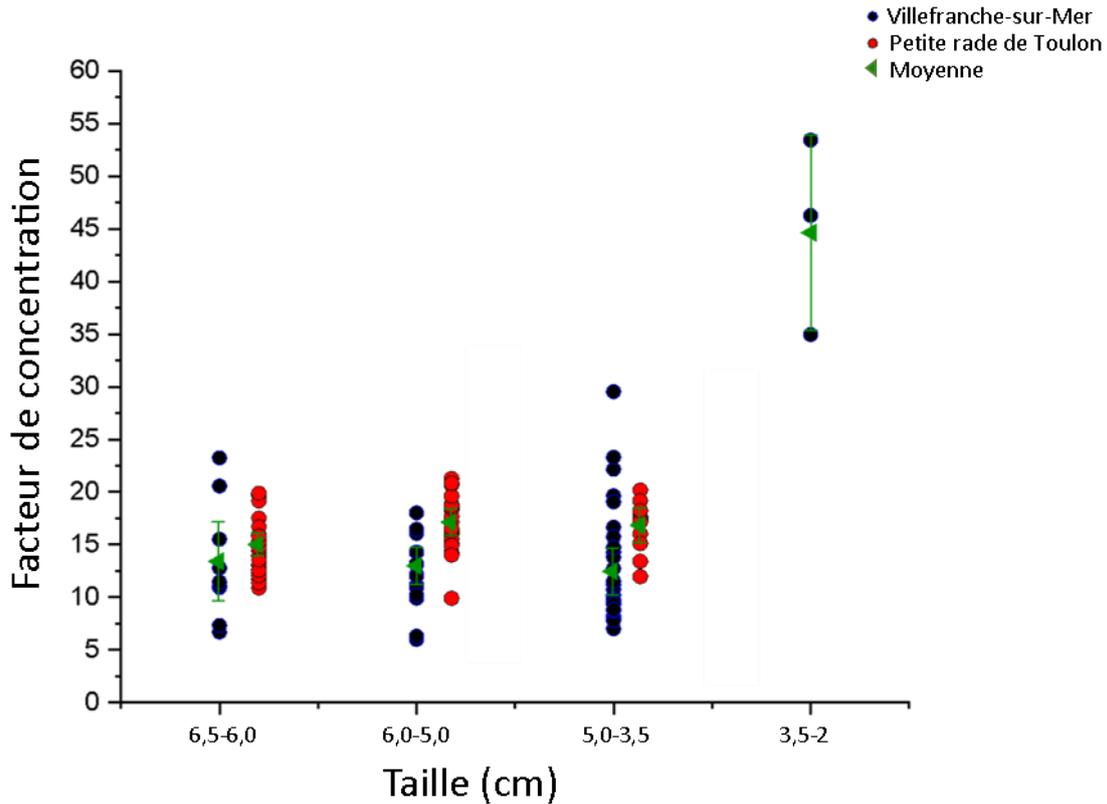


Figure 64. Comparaison des facteurs de concentrations des moules entières provenant de Villefranche-sur-Mer et de la petite rade de Toulon en fonction de la taille des individus.

Dans un second temps, l'uranium a été quantifié dans les organes des moules (entre 7,5 et 6,5 cm) après une période d'exposition de 12 jours à l'uranium (voir partie Matériels et méthodes). La Figure 65a présente les valeurs des facteurs de concentration obtenues dans les organes des moules provenant de Villefranche-sur-Mer : glande digestive ( $\bar{x} = 32 \pm 4$ ;  $n=28$ ), pied ( $\bar{x} = 6 \pm 3$ ;  $n=28$ ), branchies ( $\bar{x} = 17 \pm 4$ ;  $n=28$ ), corps viscéral ( $\bar{x} = 10 \pm 2$ ;  $n=28$ ), manteau ( $\bar{x} = 10 \pm 2$ ;  $n=28$ ). La Figure 65b présente, quant à elles les valeurs des facteurs de concentration obtenues dans les organes des moules provenant de la petite rade de Toulon (glande digestive ( $\bar{x} = 58 \pm 7$ ;  $n=28$ ), pied ( $\bar{x} = 2 \pm 1$ ;  $n=28$ ), branchies ( $\bar{x} = 9 \pm 2$ ;  $n=28$ ), corps viscéral ( $\bar{x} = 4 \pm 1$ ;  $n=28$ ), manteau ( $\bar{x} = 5 \pm 1$ ;  $n=28$ )).

Les données ont ensuite été soumises à une analyse de variance (ANOVA) ( $F=17,9$ ,  $p < 0,05$ ), suivie d'un test post-hoc de Scheffé. L'analyse indépendante des deux cohortes a montré que l'accumulation de l'uranium est significativement plus importante dans la glande digestive que dans les autres organes. Cette tendance a été constatée indépendamment de l'origine des moules.

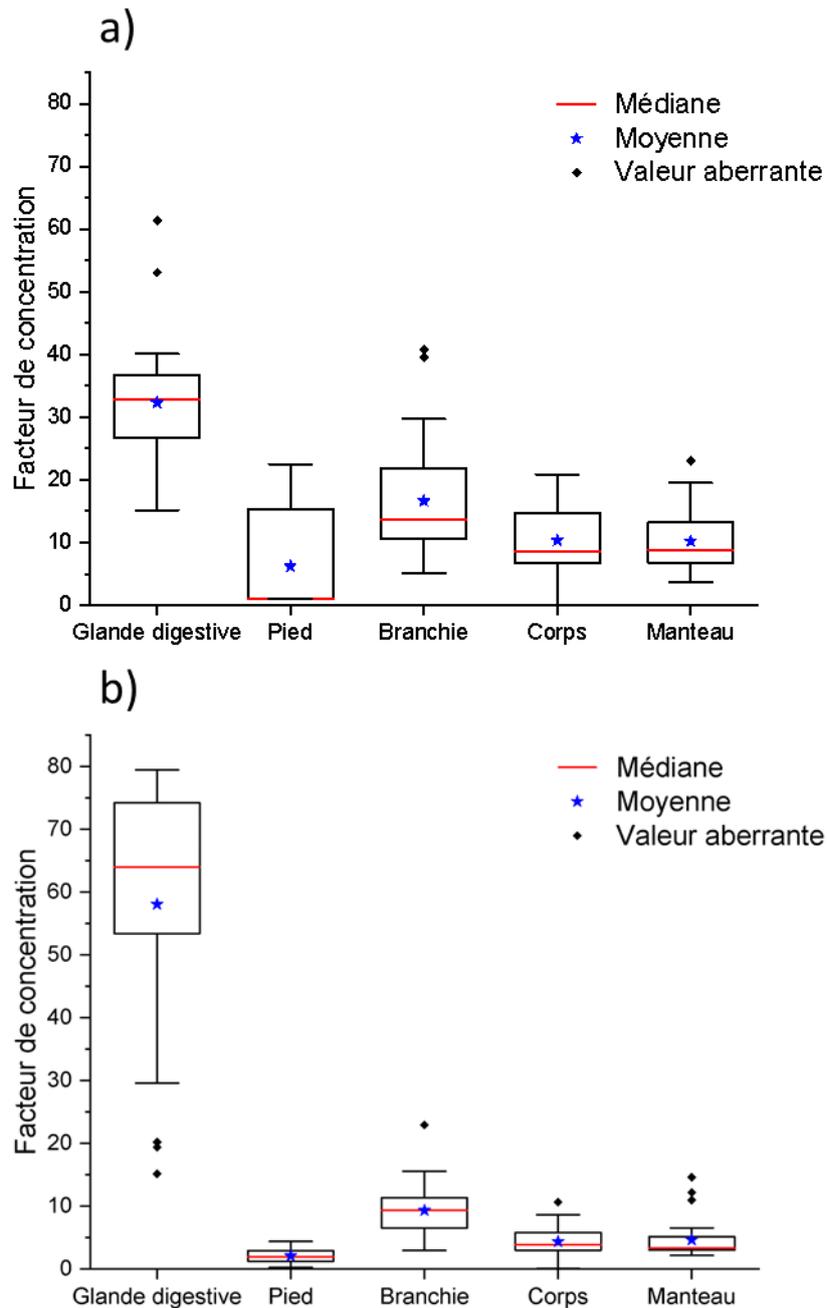


Figure 65. Comparaison des facteurs de concentrations dans les organes de moules en fonction de l'origine a) Villefranche-sur-Mer et b) Petite rade de Toulon.

L'analyse de la variance intergroupe des deux cohortes a permis de comparer le facteur de concentration en fonction de leur origine (Villefranche-sur-Mer et la petite rade de Toulon). La caractéristique principale distinguant les deux cohortes réside dans les valeurs du facteur de concentration significativement plus élevées (facteur de 2) observées dans la glande digestive des moules provenant de la petite rade de Toulon par rapport à celles des moules de

Villefranche-sur-Mer. De manière générale, les valeurs des facteurs de concentration dans les branchies, le corps et le manteau sont plus faibles pour les moules de la petite rade de Toulon que pour les moules de Villefranche-sur-Mer.

Ces résultats mettent en évidence que la bioaccumulation est similaire dans les moules lorsqu'on les considère dans leur ensemble, et ce indépendamment de leur origine, dans nos conditions expérimentales. Cependant, les analyses réalisées dans les organes révèlent des différences : la glande digestive, organe participant à la détoxification des métaux, bioaccumule une plus grande quantité d'uranium lorsque les moules proviennent d'un site pollué (petite rade de Toulon).

L'hypothèse la plus plausible pour expliquer ces résultats pourrait être une production accrue de protéines détoxifiantes telles que les métallothionéines ou la glutathionne chez les moules provenant de zones polluées. En effet, ces moules peuvent s'adapter à leur environnement et augmenter la production de certaines macromolécules, comme expliqué dans la partie précédente. La bioaccumulation inférieure dans les autres organes (pied, branchie, manteau, corps) lorsque l'on compare le site pollué au site non pollué pourrait être due à ce processus de détoxification/stockage des métaux lourds par la glande digestive. En effet, l'uranium étant un métal lourd non essentiel, sa présence dans les organes peut avoir des effets toxiques au niveau cellulaire, nécessitant une régulation pour réduire sa biodisponibilité. La présence d'uranium associée à la glande digestive suggère des mécanismes efficaces de séquestration intracellulaire réduisant l'uranium dans les autres organes. La glande digestive pourrait contenir des agents chélatants puissants pour l'uranium, qui pourraient avoir été surexprimés dans les zones polluées favorisant la détoxification des métaux lourds et leurs tolérances. Néanmoins, il faut souligner ici que les fractions chélatantes abondantes dans les métallothionéines ou le glutathion (les thiols) sont peu affines de l'uranyle (alors qu'elles le sont pour des métaux lourds comme le Cd ou le Hg). Comme expliqué précédemment avec le modèle HSAB, l'uranyle est un cation dur tandis que les fonctions thiols sont considérées comme des bases molles, de ce fait le recouvrement orbitalaire n'est pas propice à des interactions entre ces deux ions.

Le byssus a été récolté sur les individus de Villefranche-sur-Mer après une période d'exposition de 12 jours. La Figure 66 présente les résultats montrant une dispersion importante

des valeurs de facteur de concentration dans les fils de byssus analysés ( $\bar{x} = 384 \pm 136$  ;  $n= 19$ ). La variation des valeurs peut être associée à la faible quantité de matériau récolté (entre 26 et 1 mg) sur les mollusques après 12 jours d'exposition. Les barres d'erreur proviennent principalement des erreurs de la pesée des échantillons. Les fils de byssus produits par les moules de la petite rade de Toulon n'ont pas été analysés en raison des faibles quantités obtenues, lesquelles sont incompatibles avec la mesure de la masse.

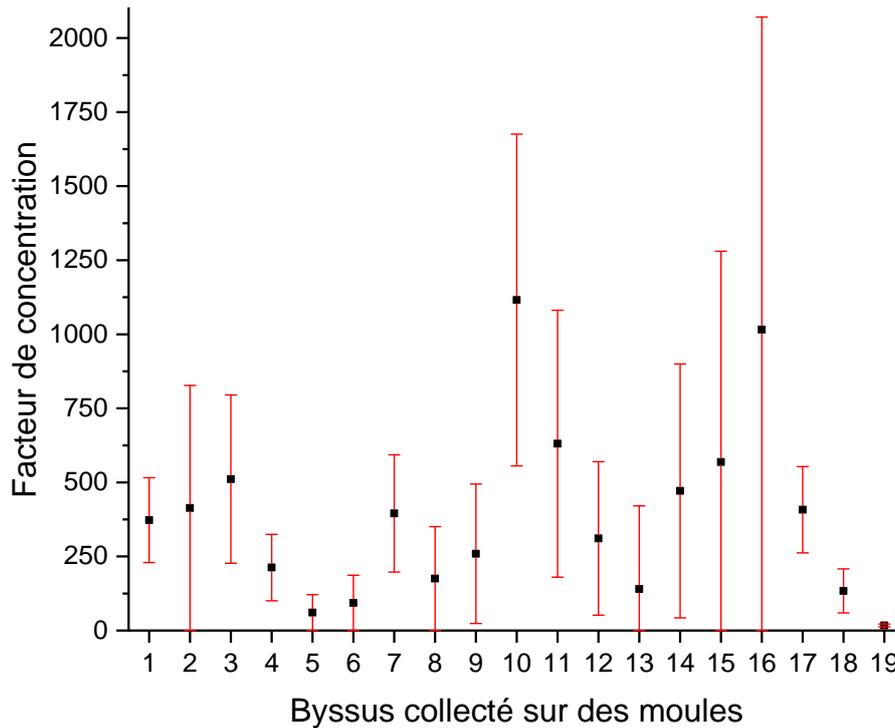


Figure 66. Facteur de concentration des byssus récoltés sur des moules de Villefranche-sur-Mer à la suite d'une exposition pendant 12 jours à une eau de mer dopée en uranium.

### b) Distribution subcellulaire de l'uranium dans la glande digestive des moules exposées à l'uranium

La distribution subcellulaire de l'uranium dans la glande digestive a été évaluée après une exposition des moules à l'uranium pendant 12 jours. Les détails expérimentaux sont présentés dans le Tableau 21, le protocole de séparation est décrit dans la partie « Matériels et méthodes ».

*Tableau 21. Conditions expérimentales des contaminations de moules à l'uranium pour l'étude de la distribution subcellulaire de l'uranium.*

<b>Provenance des moules</b>	Villefranche-sur-Mer
<b>Nombre de spécimens</b>	2
<b>Volume (L)</b>	4
<b>Réplica</b>	5
<b>Analyse organe</b>	Glande digestive
<b>Concentration d'exposition <sup>Nat</sup>U (M)</b>	10 <sup>-6</sup> M
<b>Durée</b>	12 jours (changement d'eau à J+5)

La répartition subcellulaire de l'uranium est présentée dans la Figure 67, les pourcentages expriment la quantité (en masse) d'uranium présent dans chaque fraction. Le cytosol représente la principale fraction de l'uranium accumulé par la glande digestive :  $92 \pm 22 \%$  (comprenant les organites et les fractions protéiques). Il convient également de noter que l'uranium est associé aux parties protéiques à hauteur de  $64 \pm 13 \%$  (comprenant les protéines thermostables + thermosensibles).

Comme nous l'avons vu précédemment, les métaux détoxifiés biologiquement sont inclus dans un compartiment subcellulaire qui est associé à la tolérance des métaux et correspond à  $37 \pm 8 \%$  (granules riches en métaux + protéines thermostables) de l'uranium accumulé dans la glande digestive.

L'association des compartiments incluant les protéines thermosensibles (comprenant les enzymes) et les organelles est considérée comme une fraction sensible aux métaux (FSM), ce qui décrit la toxicité potentielle des métaux. Cette fraction subcellulaire contient  $56 \pm 16 \%$  de l'uranium que nous avons retrouvé dans la glande digestive.

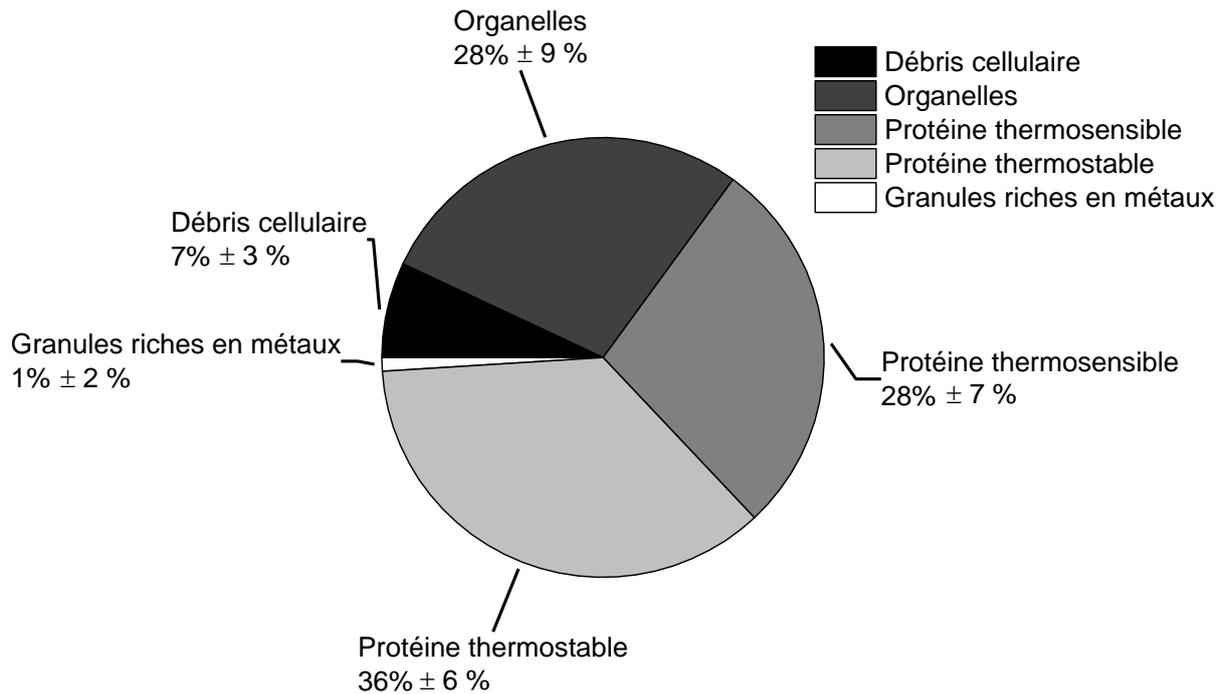


Figure 67. Diagramme de l'accumulation de l'uranium dans différents compartiments de la glande digestive de moules exposées à  $[U]=10^{-6} M$ .

La fraction contenant les granules riches en métaux, notamment décrits dans la littérature pour contenir les formes condensées des métaux, est très faiblement représentée dans notre étude (1 % de l'uranium), tandis que la fraction cytosolique contient la majorité de l'uranium. Les images obtenues en MET viennent appuyer nos résultats. En effet, l'analyse de plusieurs glandes digestives issues de moules exposées à l'uranium dans les mêmes conditions n'a pas révélé la présence d'aiguilles ou de granules denses à l'intérieur des tissus (image non fournie). L'uranium accumulé dans la glande digestive ne semble donc pas se trouver sous forme condensée (e.g., U-phosphate), ce qui suggère qu'il est complexé sous forme moléculaire et probablement associé à des protéines hydrosolubles.

La présence d'uranium dans plusieurs compartiments est particulièrement intéressante, car elle suggère la présence de divers mécanismes de détoxification au sein de la glande digestive. Les voies de détoxification sont nombreuses et existent à des niveaux subcellulaires différents (mitochondrie, lysosome, protéine cytosolique) (Ahearn et al., 2004). La voie de détoxification cytosolique se produit principalement par l'association de protéines ou d'autres

molécules organiques avec les métaux, mais les connaissances sur son rôle pour comprendre le devenir et la toxicité de l'uranium dans la glande digestive sont encore parcellaires. Par conséquent, l'uranium contenu dans ces différents compartiments subcellulaires pourrait entraîner des effets toxiques variés.

Peu d'études ont décrit l'accumulation d'uranium à l'échelle subcellulaire, et la plupart des expériences ont été menées avec des espèces vivant dans l'eau douce, où la spéciation de l'uranium diffère de celle dans l'eau de mer. Une étude rapporte une faible induction des métallothionéines après l'exposition de poissons à l'uranium (Cooley and Klaverkamp, 2000). Elle montre également que l'uranium peut être associé à la fraction riche en granules métalliques qui contient des phases condensées, notamment d'U-phosphate. Ces résultats s'appuient sur la forte affinité entre l'uranium et le phosphate, ainsi que sur l'observation de la colocalisation de l'uranium et du phosphate lors d'analyse élémentaire. Chassard et ses collaborateurs ont mis en évidence la présence de microaiguilles d'uranium phosphate au niveau de la glande digestive de *M. eludis*, tandis que Simon et ses collaborateurs ont trouvé plus de 80 % de l'uranium associé aux débris cellulaires, aux granules et aux organites dans ce même organe chez *C. fluminea* (Chassard-Bouchaud and Escaig, 1984; Simon and Garnier-Laplace, 2004).

Cependant, ces études ne concordent pas avec nos analyses réalisées lors de l'exposition de *M. galloprovincialis* à l'uranium. Dans notre cas, le radioélément est principalement associé à des compartiments trophiquement disponibles. Les métaux trophiquement disponibles sont définis comme les fractions cytosoliques, c'est-à-dire comprenant  $92 \pm 22$  % de l'uranium dans la glande digestive comme décrit précédemment (Wallace et al., 2003). Dans le cas où la voie de détoxification de l'uranium serait dominée par les métallothionéines ou similaire, cela pourrait influencer la biodisponibilité de l'uranium chez ses prédateurs (Roesijadi and Klerks, 1989; Wallace et al., 1998; Wallace and Lopez, 1997). Certaines preuves existent déjà pour la biomagnification du transfert trophique de métaux tel que le Cd due à l'induction des métallothionéines (Wallace et al., 2000).

### III. Détection et localisation de l'uranium dans la moule

#### 1) Étude de la distribution de l'uranium par $\mu$ -XRF

Les moules ont été exposées à des concentrations d'uranium de  $5 \times 10^{-5}$  M, les conditions expérimentales sont synthétisées dans le Tableau 22.

Tableau 22. Conditions expérimentales des contaminations à l'uranium de moules pour les analyses par  $\mu$ -XRF.

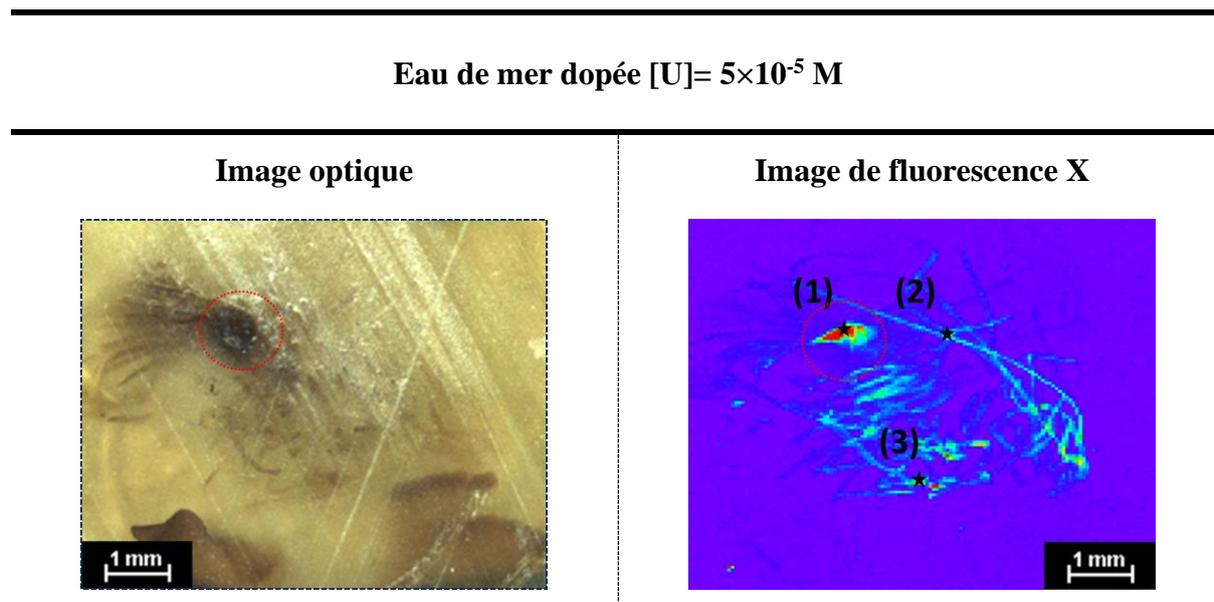
Provenance des moules	Villefranche-sur-Mer
Nombre de spécimens par aquarium	2
Volume (L)	2
Réplica	4
Analyse organe	Inclusion en résine
Concentration d'exposition $^{Nat}U$ (M)	$5 \times 10^{-5}$ M
Durée	12 jours (changement d'eau à J+5)

Les protocoles détaillés concernant la préparation d'échantillons et les paramètres d'acquisitions des images sont consultables en partie Matériels et méthodes. Les images ont été réalisées au seuil  $L_{II}$  de l'uranium (20 948 eV) pour s'affranchir des raies de fluorescence K du strontium présent dans l'eau de mer. Toutes les cartographies réalisées ont pu être superposées aux images optiques des zones correspondantes. Nous n'avons pas observé de diffusion d'uranium des structures cellulaires vers la résine.

Les mesures se sont focalisées sur l'obtention d'images permettant de cartographier le byssus ainsi que la glande digestive. Les mesures effectuées sur les branchies sont présentées en Annexe Figure 97. Pour des raisons de temps, nous n'avons pas pu nous attarder sur cet organe qui aurait nécessité des temps d'accumulation très importants au vu du faible contraste entre la résine et les branchies que nous avons observé (non compatible avec le temps de faisceau disponible). De plus, la taille de la sonde ne permet pas d'obtenir une résolution compatible avec le plan de coupe utilisé.

a) **Byssus**

La Figure 68 compare l'image optique du byssus et l'image de fluorescence X au seuil de l'uranium. L'image de fluorescence X permet d'observer la répartition de l'uranium dans la tige et dans les fils de byssus. On observe une répartition homogène de l'uranium dans les fils de byssus et la tige. Il est cependant impossible de pouvoir différencier la cuticule de la matrice, les caractéristiques de la sonde étant  $29 \times 29 \mu\text{m}$  nous n'avons pas la résolution nécessaire.



*Figure 68. Comparaison des images optiques et des cartographies de fluorescence X réalisées au seuil  $L_{II}$  de l'uranium du byssus. (Barre d'échelle 1 mm). La zone délimitée par le cercle en pointillé rouge indique la tige, le reste de l'image correspond au fils du byssus. Les étoiles noires sur les cartographies de fluorescence X montrent où ont été réalisés les spectres XANES au seuil  $L_{II}$  de l'uranium, les numéros associés correspondent aux spectres XANES Figure 69. Temps d'intégration de 500 ms par pixel.*

La présence d'uranium a été confirmée à partir de spectres XANES réalisés sur les échantillons cartographiés. Les zones ont été sélectionnées afin d'obtenir des spectres XANES de la tige et des fils de byssus. La Figure 69 compare les spectres XANES obtenus à différentes positions (les numéros correspondent aux zones indiquées sur la Figure 68), les spectres ont été normalisés en énergie et ne montrent pas de décalage de la raie blanche de l'uranium. Les spectres XANES ont donc permis de vérifier la présence d'uranium au degré d'oxydation +VI

dans toutes les zones analysées. Ces zones analysées n'ont pas permis d'obtenir un rapport signal sur bruit compatible avec l'acquisition de spectres EXAFS.

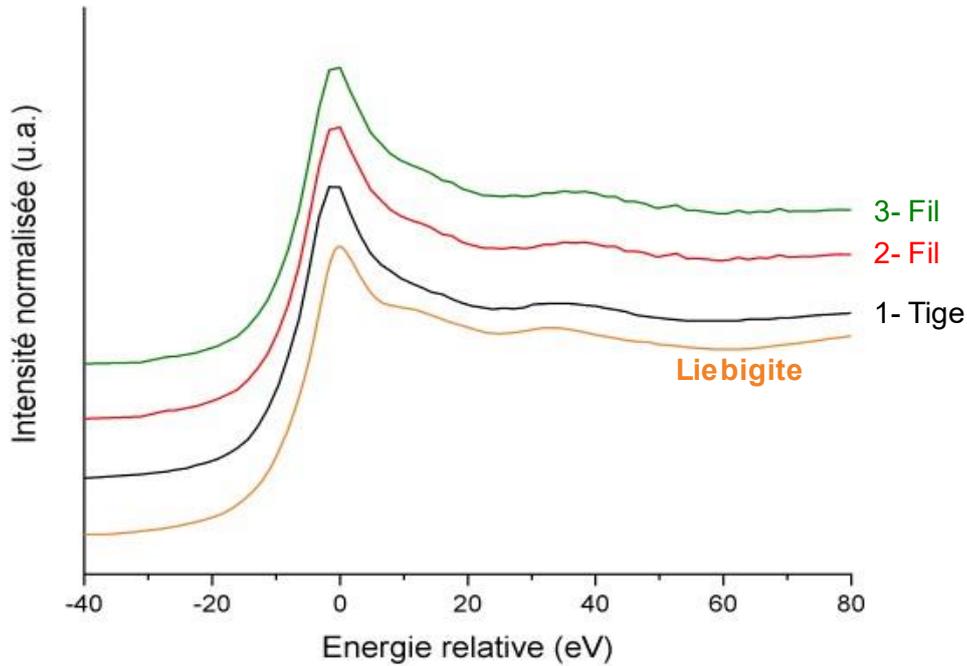


Figure 69. Comparaison des spectres XANES réalisés au seuil  $L_{II}$  de l'uranium sur le byssus cartographié par fluorescence X. Les numéros indiqués correspondent à ceux présents sur la Figure 68.

### b) Glande digestive

La Figure 70 compare l'image optique de la glande digestive à l'image de fluorescence X au seuil  $L_{II}$  de l'uranium. L'observation de l'image de fluorescence X met en évidence la distribution homogène de l'uranium dans cet organe. D'autres images d'analyse de fluorescence X ont permis de confirmer cette répartition (Annexe Figure 98). Des spectres XANES ont été réalisés sur différents échantillons afin de fournir davantage d'informations sur la spéciation de l'uranium dans la glande digestive. Les spectres XANES se sont avérés être particulièrement bruités, ce qui n'a pas permis d'obtenir de spectres EXAFS à partir des échantillons cartographiés.

Eau de mer dopée [U]=  $5 \times 10^{-5}$  M

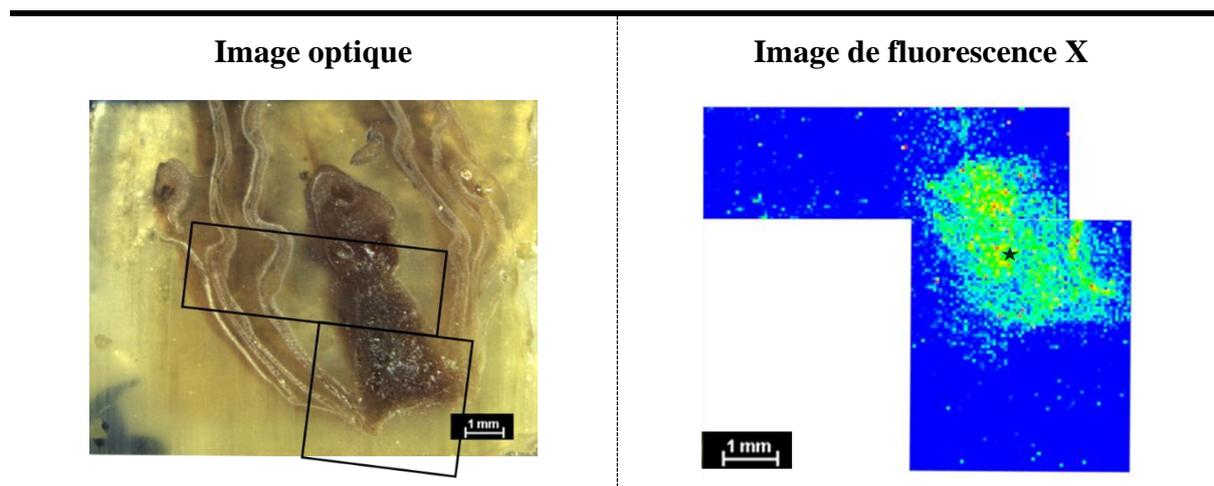


Figure 70. Comparaison des images optiques et des cartographies de la fluorescence X réalisée au seuil  $L_{II}$  de l'uranium de la glande digestive. (Barre d'échelle 1 mm). Le carré noir sur l'image optique représente la zone qui a été cartographiée par fluorescence X. L'étoile noire sur la cartographie de fluorescence X montre où a été effectué le spectre XANES réalisé au seuil  $L_{II}$  de l'uranium. Temps d'intégration de 500 ms par pixel.

Nous n'avons pas observé de décalage de la raie blanche sur les spectres XANES (20955 eV) de la glande digestive. De plus, le profil des spectres met en évidence la présence d'uranyle, de manière similaire au cas du byssus. Ceci constitue une indication claire qu'il n'y a pas de réduction de l'U (VI) en U (IV) dans la glande digestive. Les images obtenues au microscope électronique à transmission (Figure non montrée) d'une glande digestive issue d'une moule contaminée dans les mêmes conditions ne montrent pas non plus de zones denses en électrons pouvant être attribuées à une phase condensée de l'uranium.

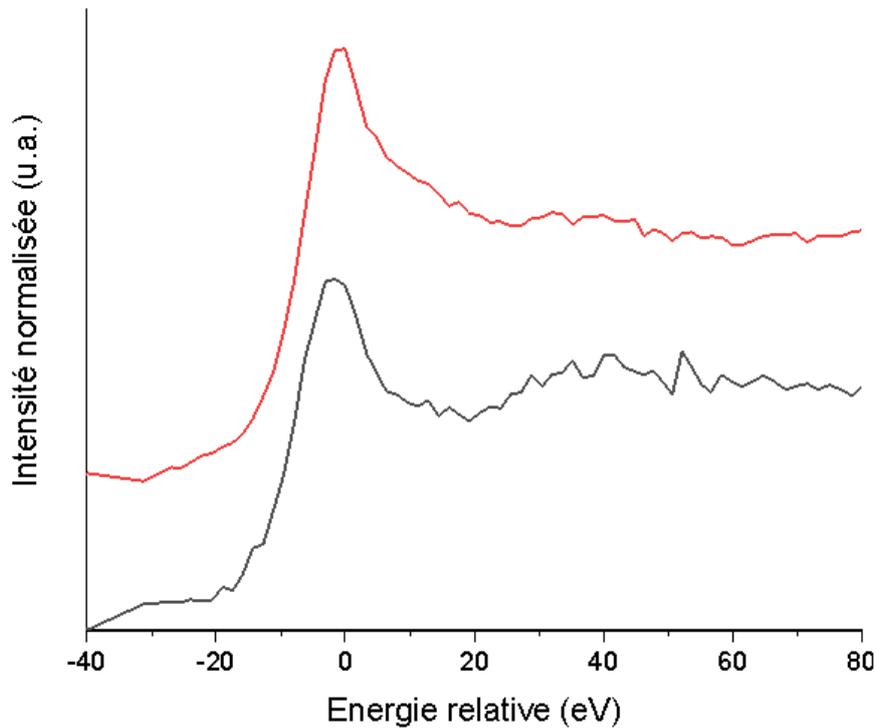


Figure 71. Comparaison des spectres XANES réalisés au seuil  $L_{II}$  de l'uranium sur des glandes digestives cartographiées par fluorescence X. Le spectre noir correspond à la zone indiquée par une étoile noire sur la Figure 70 et le spectre rouge correspond à une autre glande digestive analysée.

## 2) Caractérisation de la distribution de l'uranium par SIMS

Les analyses SIMS ont été effectuées sur les moules exposés à une concentration de  $5 \times 10^{-5}$  M d'uranium et ont débuté par l'analyse des branchies. Étant donné que l'utilisation de cette technique d'imagerie par notre équipe était nouvelle, la première étape a consisté à réaliser un test de faisabilité. Mais des échantillons de mollusques bivalves exposés à de l'uranium avaient déjà été analysés par SIMS sur la plateforme PATERSON, permettant de cartographier la répartition de l'uranium dans la branchie à l'échelle du micromètre (Holler et al., 2021; Tessier et al., 2009). Bien que la branchie ne soit pas l'organe dans lequel l'uranium soit le plus concentré, nous avons pu comparer nos résultats avec ceux disponibles dans la littérature. Les résultats obtenus ont permis de valider nos protocoles de préparation et nous avons pu réaliser des analyses sur la glande digestive ainsi que sur le byssus (voir partie Matériels et méthodes).

Les conditions d'exposition des moules sont résumées dans le Tableau 23.

Tableau 23. Conditions expérimentales des contaminations à l'uranium de moules pour les cartographies SIMS.

Provenance des moules	Villefranche-sur-Mer
Nombre de spécimens par aquarium	2
Volume (L)	2
Réplica	2
Analyse organe	Inclusion en résine
Concentration d'exposition <sup>Nat</sup> U (M)	5×10 <sup>-5</sup> M
Durée	12 jours (changement d'eau à J+5)

La résolution  $M/\Delta M=300$  a été choisie pour obtenir un compromis entre la résolution latérale (1,5  $\mu\text{m}$ ) et la sensibilité. La calibration de la masse d'uranium (Annexe Figure 99) a permis d'isoler l'ion  $^{238}\text{U}^+$  et d'obtenir des données spécifiques à ce dernier.

### a) Branchies

Des échantillons de branchies ont été utilisés pour valider les méthodes et les concentrations utilisées. L'image ionique du  $^{40}\text{Ca}^+$  a permis de localiser les structures histologiques des branchies. On peut observer que l'uranium est associé à ces structures. Les images SIMS révèlent la présence hétérogène de l'uranium au niveau des filaments, sous forme d'amas de quelques micromètres de diamètre, localisés dans la région abfrontale. On observe également la présence d'uranium dans la région frontale, bien qu'il ne semble pas y être concentré. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Tessier et ses collaborateurs, qui avaient déjà noté une distribution hétérogène de l'uranium dans les branchies de palourde d'eau douce (Tessier et al., 2009). Peu de données sont disponibles concernant la distribution de l'uranium dans la branchie, cependant la présence d'amas très localisés, comme observés sur la Figure 72 a été décrite pour d'autres métaux tels que le cadmium (Marigómez et al., 2002). Les analyses MET de la branchie n'ont pas permis de mettre en évidence la présence d'éléments denses aux électrons, suggérant ainsi que l'uranium est présent sous forme moléculaire dans ce tissu (Annexe Figure 107).

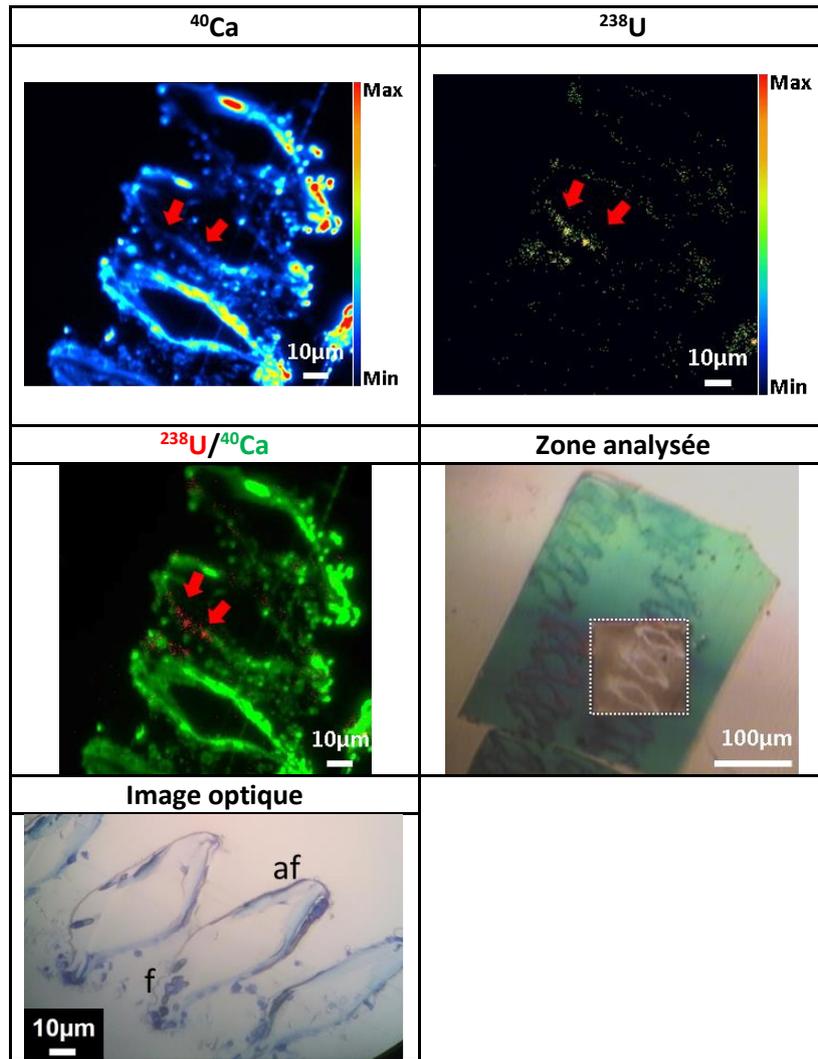


Figure 72. Comparaison des images ioniques réalisées au niveau de la branchie de moule exposé à de l'eau de mer dopée à l'uranium. Image ionique du  $^{40}\text{Ca}^+$ , image ionique du  $^{238}\text{U}^+$ , Superposition  $^{238}\text{U}^+$  (rouge)/ $^{40}\text{Ca}^+$  (vert), photographie de la zone analysée, image optique des branchies, af, abfrontale ; f, frontale. Les flèches rouges indiquent les amas d'uranium sur les images ioniques. Barre d'échelles 100 et 10  $\mu\text{m}$  (raster 200  $\mu\text{m}$   $\times$  200  $\mu\text{m}$  5nA)

En résumé, il est possible que l'uranium subisse des mécanismes de concentration similaires à ceux observés pour d'autres métaux tels que le cuivre, le cadmium et le plomb, qui se localisent dans les lysosomes ou les vacuoles des cellules épithéliales de la branchie (Hemelraad and Herwig, 1988). Cependant, il faut souligner que les processus d'accumulation sont spécifiques à un type cellulaire et dépendent du métal. Il est difficile dans le cas de nos

travaux de déterminer les mécanismes d'accumulation de l'uranium dans les branchies sans des analyses complémentaires.

### b) Byssus

L'analyse des fils de byssus par SIMS a été réalisée afin de compléter les résultats obtenus par les cartographies de fluorescence X. En effet, la sonde (1,5 µm de résolution latérale) utilisée lors des mesures SIMS permet de distinguer la cuticule de la matrice, ce qui permet une meilleure appréhension de la distribution de l'uranium (Figure 73). Les analyses du byssus ont été menées en suivant deux protocoles d'exposition différents (détails dans la section Matériels et méthodes).

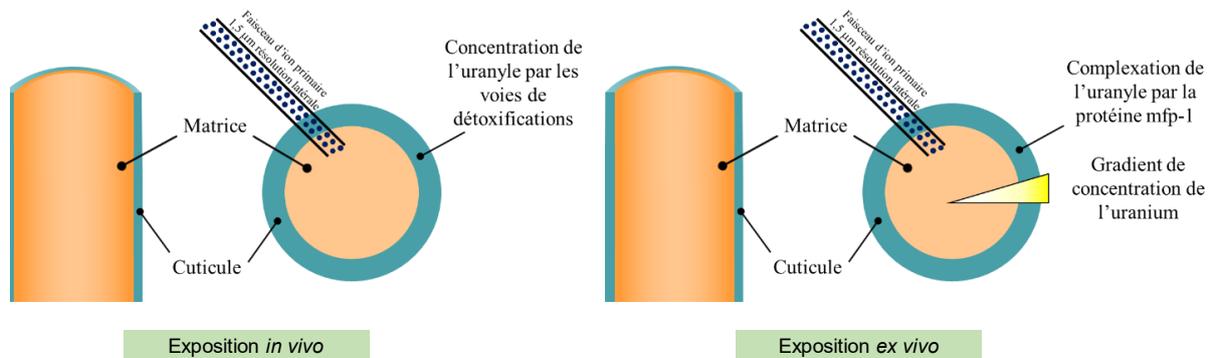


Figure 73. Schéma du byssus et de la répartition de l'uranyle en fonction de la méthode de contamination.

Le premier protocole a consisté à prélever les fils de byssus après avoir exposé les moules à une concentration de  $5 \times 10^{-5}$  M d'uranium pendant 12 jours. Le deuxième protocole a utilisé les fils de byssus contaminés *ex vivo* avec une concentration de  $10^{-3}$  M d'uranium (voir partie Matériels et méthodes).

Ces procédures d'exposition sur des byssus de nature différente ont été réalisées, car nous envisageons deux mécanismes d'accumulation différents qui pourraient expliquer la présence de l'uranium dans le byssus.

Tout d'abord, comme précédemment expliqué, le byssus peut être considéré comme un moyen de détoxification de plusieurs métaux chez les moules (Nicholson and Szefer, 2003;

Szefer et al., 1999, 1998). Il est ainsi possible que l'uranium puisse être transporté jusqu'à la glande byssogène et excréte lors de la synthèse des fils.

Ensuite, les protéines riches en mfp-1 présentes au niveau de la cuticule sont de bons candidats pour chélater des métaux durs (*e.g.*,  $\text{Fe}^{3+}$  ;  $\text{V}^{+}$ ) comme nous l'avons déjà expliqué. Des phénomènes de complexation de surface pourraient donc être responsables de l'adsorption de l'uranyle par les fils de byssus au niveau de la cuticule, par une complexation à l'aide des protéines de type mfp-1.

Ce sont ces deux hypothèses que nous cherchons à vérifier et qui sont présentées Figure 73.

i. Byssus récolté sur les moules après exposition à l'uranium

La Figure 74 (Annexe Figure 100) présente les images SIMS des fils de byssus récoltés sur les moules exposées à une concentration de  $5 \times 10^{-5}$  M d'uranium pendant 12 jours.

L'image ionique du  $^{23}\text{Na}^{+}$  permet de distinguer la cuticule, qui forme une membrane externe de quelques micromètres, et la matrice riche en collagène qui constitue le cœur du fil de byssus. La superposition de l'image ionique du  $^{238}\text{U}^{+}$  et du  $^{23}\text{Na}^{+}$  permet d'associer la présence d'uranium à la matrice. La présence d'uranium au niveau de la matrice nous fournit des informations cruciales sur les mécanismes d'accumulation chez les moules exposées à l'uranium. Comme nous l'avons suggéré précédemment, le byssus pourrait jouer un rôle dans la détoxification de certains métaux, et la présence d'uranium à ce niveau renforce cette hypothèse. Coombs et ses collaborateurs avaient déjà remarqué en 1981 la présence d'éléments métalliques dans les fils de byssus pouvant refléter les concentrations métalliques environnementales dans lesquelles les individus vivent (Coombs and Keller, 1981). Hodge et ses collaborateurs ont également mesuré l'accumulation de plusieurs actinides (U, Pu) dans divers organismes marins, montrant que les fils de byssus des moules contenaient les concentrations les plus élevées en uranium (Hodge et al., 1979). Une autre étude a également montré des résultats similaires en observant une concentration d'uranium dans les fils de byssus supérieure ( $3,21 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) à celle présente dans les tissus mous ( $0,24 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) (Hamilton, 1980).

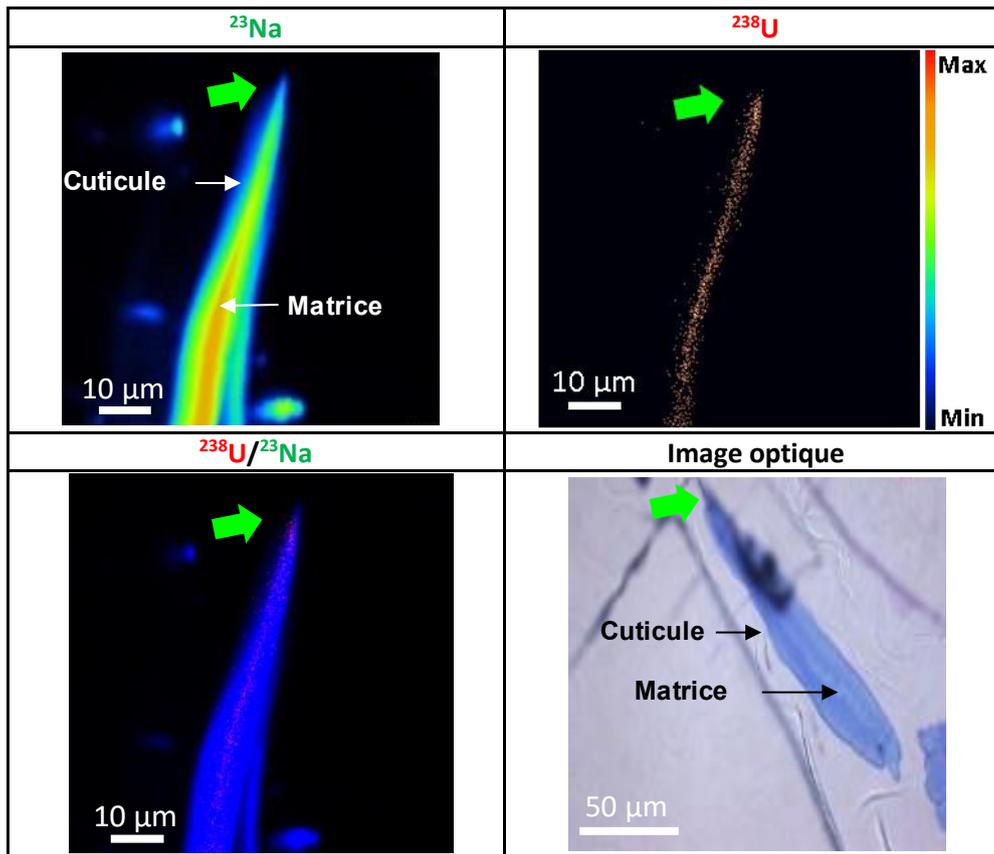


Figure 74. Comparaison des images ioniques réalisées au niveau du byssus de moule exposé à de l'eau de mer dopée à l'uranium, image ionique du  $^{23}\text{Na}$ , du  $^{238}\text{U}^+$ , superposition  $^{238}\text{U}^+$  (violet)/ $^{23}\text{Na}^+$  (bleu), Image optique du byssus. Les flèches vertes permettent de visualiser l'orientation des images. Barre d'échelles 50 et 10  $\mu\text{m}$  (raster 200  $\mu\text{m}$   $\times$  200  $\mu\text{m}$  5nA)

ii. Contamination du byssus *ex vivo*

La Figure 75 compare les images histologiques aux images ioniques obtenues à partir des échantillons de byssus contaminé *ex vivo*. Plusieurs fils de byssus ont été analysés en imagerie afin d'étudier la distribution de l'uranium. Comme décrit précédemment, les images ioniques  $^{23}\text{Na}^+$  et  $^{40}\text{Ca}^+$  permettent de distinguer la cuticule de la matrice, ces structures étant facilement identifiables sur les images. Les images de  $^{238}\text{U}^+$  permettent d'associer l'uranium accumulé dans les fils à la cuticule. Ces résultats sont aussi observés sur d'autres fils de byssus analysés (Annexe Figure 101). De plus, la Figure 75 met en évidence un gradient d'uranium dirigé de l'extérieur (cuticule) vers l'intérieur (matrice).

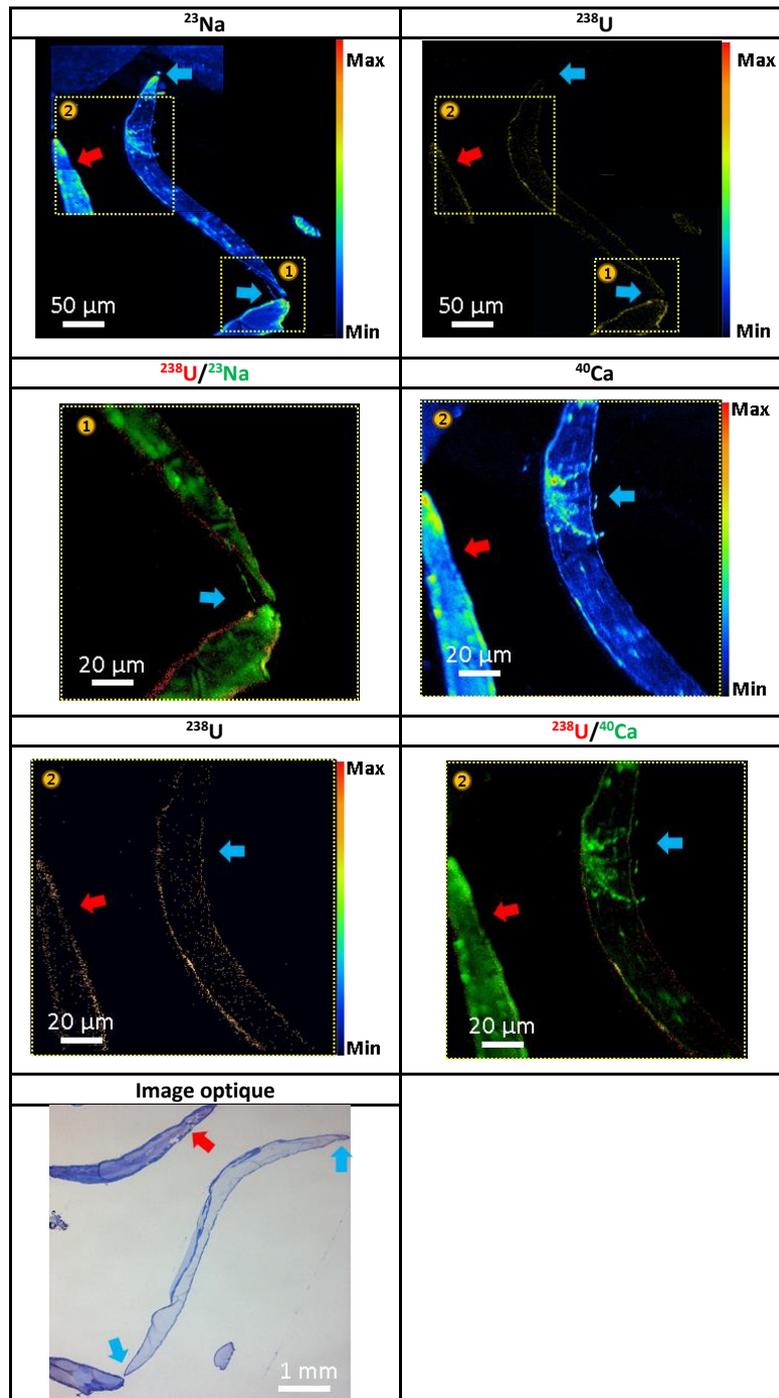


Figure 75. Comparaison des images ioniques réalisées au niveau du byssus à la suite d'une contamination ex vivo à l'uranium., image ionique du  $^{23}\text{Na}^+$ , du  $^{40}\text{Ca}^+$  et de  $^{238}\text{U}^+$ , superposition  $^{238}\text{U}^+$  (rouge)/ $^{23}\text{Na}^+$  (vert), et superposition  $^{238}\text{U}^+$  (rouge)/ $^{40}\text{Ca}^+$  (vert), Image optique les flèches vertes permettent de visualiser l'orientation des images. Les carrées et les numéros correspondent à différents agrandissements. Barre d'échelles 50 et 20  $\mu\text{m}$  (raster 200  $\mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$  5nA).

Ce phénomène pourrait indiquer une certaine perméabilité de la cuticule du byssus vis-à-vis du cation uranyle. En considérant la distribution de l'uranium dans le byssus ainsi que les conditions expérimentales, il est probable que cette répartition soit liée à la présence de molécules chélatantes, qui sont majoritairement présentes au niveau de la cuticule. L'hypothèse la plus plausible serait la complexation de l'uranium par les protéines mfp, principalement mfp-1, ce complexe peut être simplifié par un complexe catéchol-uranyle (Figure 76). Cette protéine, riche en groupes DOPA (jusqu'à 15 % molaire), est présente au niveau de la cuticule, et son rôle dans la complexation de métaux tels que le fer ou le vanadium a été démontré (McCartney, 2021; Mesko et al., 2021). La présence d'uranium en faible quantité dans la matrice pourrait s'expliquer par une perméabilité du collagène. De plus, la présence de groupes DOPA en très faible quantité (>1 % molaire) dans la matrice pourrait jouer un rôle dans sa séquestration.

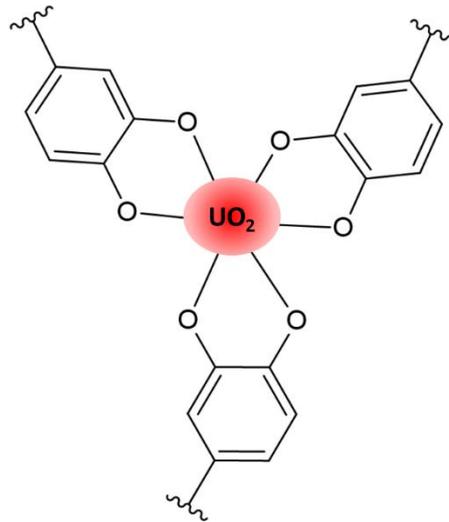


Figure 76. Complexe possible DOPA-uranyle ( $UO_2$ ) par la protéine mfp-1 au niveau de la cuticule du byssus.

### c) Glande digestive

Les structures de la glande digestive sont visibles sur la Figure 77 où l'on distingue comme précédemment décrit la présence d'une couche monocellulaire formant des tubules avec en leur centre la présence d'une lumière.

Les images ioniques de cette zone ont été obtenues dans un premier temps avec le  $^{40}Ca^+$  afin de pouvoir repérer les structures histologiques. L'image du  $^{238}U^+$  permet d'obtenir des

informations sur sa répartition dans la glande digestive à l'échelle cellulaire. On constate dans un premier temps que l'uranium est réparti de manière hétérogène sur les images ioniques. En effet, on distingue des zones dans lesquelles l'uranium est totalement absent, ce qui semble correspondre au « vide » observé sur l'image optique. Au niveau des structures tubulaires, on peut distinguer la présence d'uranium, sa répartition est définie par les mêmes limites que celles du calcium. On distingue également la présence de deux amas circulaires intenses sur l'image ionique du  $^{238}\text{U}^+$ , ces amas semblent corrélés avec la présence de ce qui pourrait être des vacuoles observables sur l'image histologique. La présence hétérogène de l'uranium dans la structure cellulaire pourrait être liée à des vacuoles dans un stade de maturité différent.

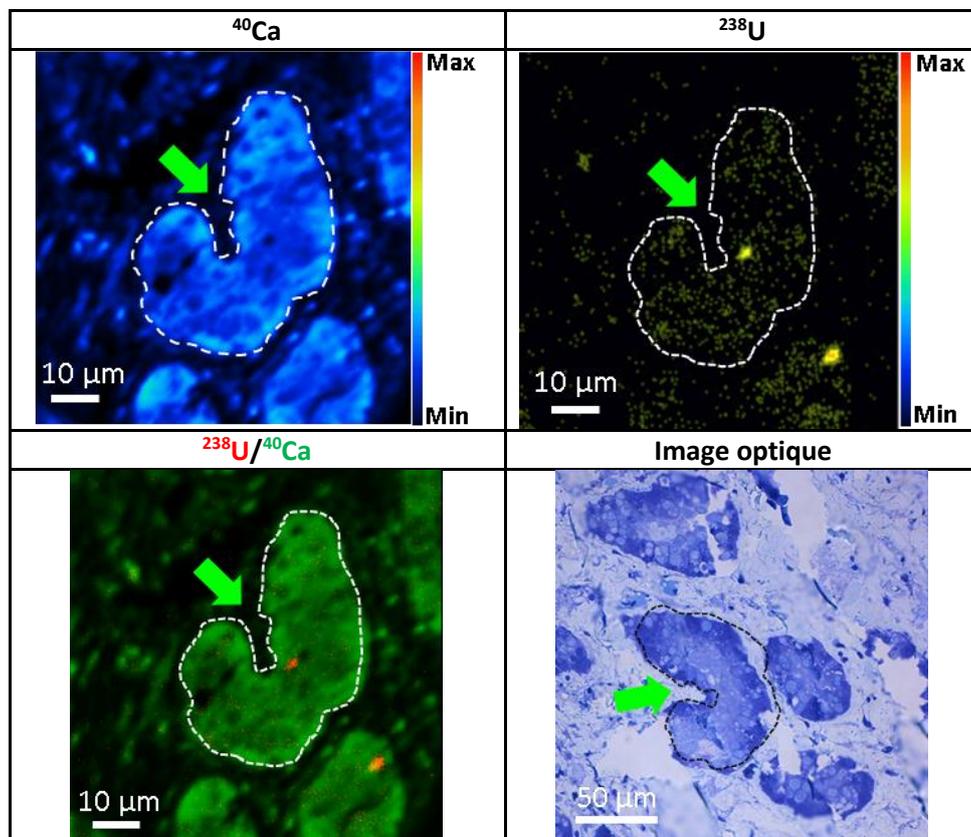


Figure 77. Comparaison des images ioniques réalisées au niveau de la glande digestive, moule exposée à de l'eau de mer dopée à l'uranium, image ionique du  $^{40}\text{Ca}^+$ , du  $^{238}\text{U}^+$ , superposition  $^{238}\text{U}^+$  (rouge)/ $^{40}\text{Ca}^+$  (vert), Image optique. Les flèches vertes permettent de visualiser l'orientation des images. Les pointillés repèrent la structure cellulaire Barre d'échelles 50 et 10  $\mu\text{m}$  (raster 200  $\mu\text{m}$   $\times$  200  $\mu\text{m}$  5nA)

Ces résultats mettent en évidence l'accumulation de l'uranium dans les cellules hépatiques. Nous avons pu démontrer la présence d'uranium au niveau des tubules hépatiques

lorsque les moules sont exposées à  $5 \times 10^{-5}$  M d'uranium pendant 12 jours. Ces résultats permettent de confirmer les observations de Chassard et ses collaborateurs qui avaient pu montrer la présence d'uranium au niveau des tubules chez *M. eludis*. contaminé avec une concentration d'uranium de  $10 \mu\text{g.g}^{-1}$  pendant 30 jours (Chassard-Bouchaud and Escaig, 1984). Notre travail apporte une meilleure résolution à l'échelle subcellulaire en observant la présence d'amas d'uranium très localisés et associés à certaines cellules. Cependant nous n'avons pas pu déterminer le type de cellule impliqué et d'autres analyses histologiques seraient nécessaires. De plus, les analyses MET (Image non fournie) n'ont pas permis d'observer la présence de formes denses aux électrons qui pourraient être associées à la présence de microaiguilles ou de granules de phase condensées d'uranium dans la glande digestive tel que décrit par Chassard et ses collaborateurs (Chassard-Bouchaud and Escaig, 1984). La synthèse de nos observations permet de nous diriger vers la présence d'une forme moléculaire de l'uranium dans les tubules hépatiques. Il n'est pas exclu que la formation de granules ou d'aiguilles puisse se produire lorsque les animaux sont exposés pendant des périodes plus longues.

### d) Conclusion

Ces travaux ont permis de cartographier l'uranium à plusieurs échelles. Les données issues de la spectrométrie sont essentielles pour localiser l'uranium dans les différentes structures cellulaires et comprendre les mécanismes d'accumulation.

Nous avons réussi à démontrer l'internalisation de l'uranium au niveau de la glande digestive, plus précisément au niveau des tubules hépatiques, grâce aux images ioniques et aux cartographies de fluorescence X. Cette internalisation hétérogène suggère l'implication de certaines cellules et indique la présence d'uranium sous forme moléculaire.

Les expériences menées sur le byssus ont révélé des différences dans la répartition de l'uranium entre la cuticule et la matrice. Ces différences de composition peuvent expliquer les variations de répartition. La présence d'uranium à la suite des contaminations *ex vivo* pourrait indiquer des mécanismes d'adsorption, avec la présence d'uranium au niveau de la cuticule. Les byssus issus des contaminations *in vivo* pourraient être liés à des processus de détoxification.

Ces données permettent de décrire les structures impliquées dans l'accumulation de l'uranium. Notre objectif est de coupler ces résultats avec des études de spéciation pour obtenir des informations sur la complexation de l'uranium dans la glande digestive et le byssus.

## IV. Étude de la spéciation de l'uranium chez la moule

### 1) Étude de la spéciation par XAS

Les échantillons de tissus mous de moules analysées ont été préparés à partir de moules exposées à des concentrations d' $[U] = 5 \times 10^{-5}$  M pendant 12 jours. Le byssus a été exposé *ex vivo* à plusieurs concentrations d'uranium :  $10^{-5}$  ;  $5 \times 10^{-4}$  ;  $5 \times 10^{-5}$  M pendant 12 jours. Cette contamination a été sélectionnée dans le but d'obtenir des spectres EXAFS susceptibles de refléter des mécanismes de surface, en se libérant de la présence d'uranium dans la matrice. De plus, cette méthode de contamination permet d'obtenir une quantité de matière suffisante pour l'étude de la spéciation.

Les analyses EXAFS ont été réalisées sur des pastilles au seuil  $L_{II}$  de l'uranium (20 948 eV), à température ambiante.

Les spectres XANES comparant le pied, les branchies et le manteau sont présentés Figure 78. Les résultats montrent des spectres similaires et caractéristiques de la présence de l'uranyle. Le bruit de ces spectres est important, ce qui est incompatible avec l'acquisition de spectres EXAFS.

Comme nous l'avons vu précédemment, la glande digestive et le byssus sont les deux structures qui d'une part accumulent le plus d'uranium et d'une autre part peuvent refléter des mécanismes d'accumulation impliquant des voies différentes. La Figure 79 compare les spectres XANES de la glande digestive et du byssus (contamination *ex vivo*) avec un profil typique de l'uranyle.

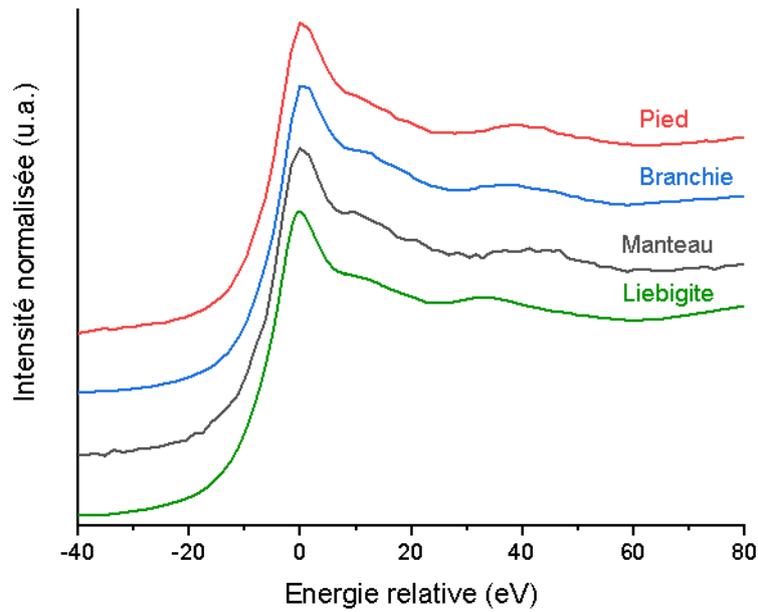


Figure 78. Comparaison des spectres XANES obtenus dans le pied, la branchie, le manteau et une référence de Liebigite.

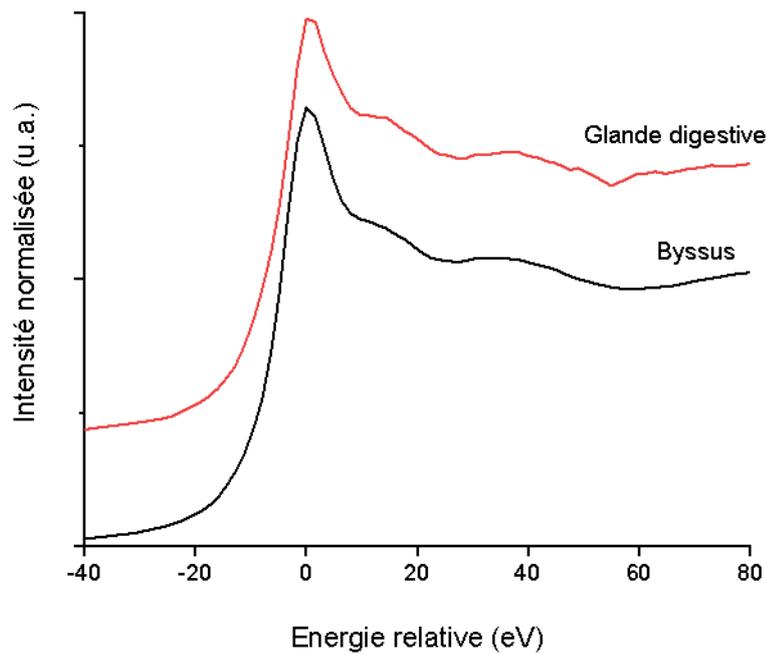


Figure 79. Comparaison des spectres XANES obtenus dans le byssus à la suite d'une contamination ex vivo  $[U]=5 \times 10^{-4} M$  et dans la glande digestive

Les ajustements des spectres EXAFS de la glande digestive et du byssus sont présentés Figure 80. Tout d'abord une approche qualitative montre des différences significatives des spectres au niveau des oscillations, ce qui reflète une différence sur l'environnement de

l'uranyle. Nous détaillerons ci-dessous les modèles utilisés pour les ajustements des spectres de la glande digestive et du byssus.

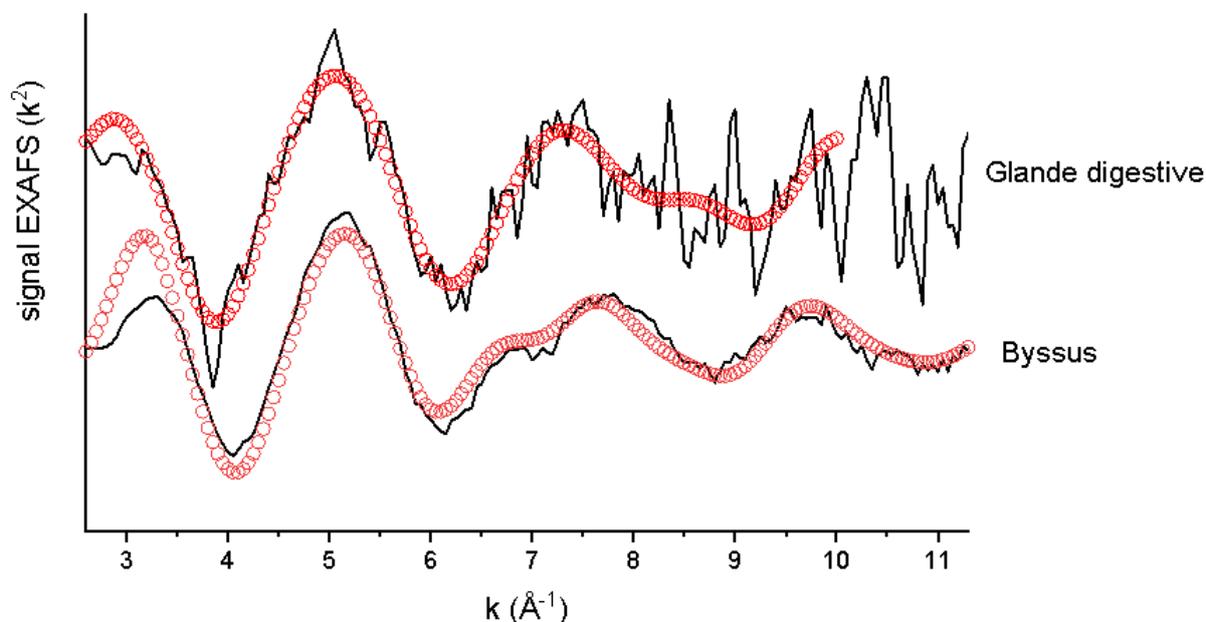


Figure 80. Spectres EXAFS expérimentaux de la glande digestive et du byssus (contamination *ex vivo*) au seuil  $L_{II}$  de l'uranium. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (cercle).

### a) Glande digestive

La glande digestive a été ajustée en  $k^2$  dans l'espace R entre 1 et 3,5 Å après transformation de Fourier en utilisant une fenêtre de Hanning dans l'intervalle  $k$  (3,3-10 Å<sup>-1</sup>). Nous avons réalisé cet ajustement de la glande digestive en utilisant trois modèles différents. Un modèle avec des fonctions thiolates permet de mimer le site de complexation des métallothionéines riches en cystéines, toutefois les thiols sont peu affins de l'uranyle. C'est pourquoi deux autres modèles avec des fonctions carboxylates et phosphate ont été utilisés en raison de leur importance dans la complexation de l'uranyle dans les matrices biologiques. Les paramètres d'ajustement sont présentés dans le Tableau 24. Les transformés de Fourier des spectres résultant des trois ajustements sont également fournis Figure 81.

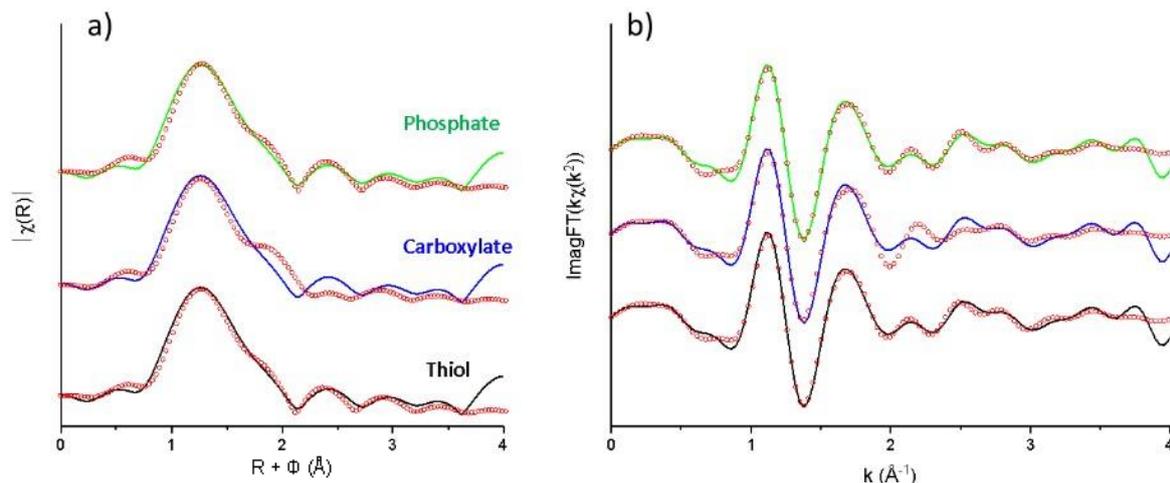


Figure 81. a) Module de la transformée de Fourier, et b) partie imaginaire de la transformée de Fourier en  $k^2\chi(k)$  ( $k$ ) de la glande digestive avec les différents modèles : vert Phosphate, bleu carboxylate, noir thiol. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (cercle).

i. Premier modèle : 4 oxygènes et 2 soufres

Le premier modèle a été ajusté au spectre expérimental en utilisant une structure basée sur un complexe  $\text{UO}_2(\text{S-2,6-Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3)_2(\text{C}_{12}\text{N}_1\text{O}_1\text{H}_{22})_2$  (Kannan et al., 2005). Ce complexe contient des fonctions thiols avec une distance  $\text{U-S}_{\text{eq}}$  moyenne de 2,71 Å ainsi des fonctions amides avec une distance  $\text{U-O}_{\text{eq}}$  moyenne de 2,33 Å. Il est à noter que ce complexe uranyle-amide avec une distance comparable aux distances que l'on peut retrouver avec de complexes uranyle-carbonate/carboxylate monodentes (2,31-2,61 Å).

La première sphère de coordination correspond aux deux atomes d'oxygène axiaux caractéristiques de l'oxocation uranyle, à une distance moyenne de 1,80 (2) Å. La deuxième sphère est composée d'un nombre d'atomes d'oxygène fixé à 4 à une distance moyenne de 2,30 (2) Å et d'un nombre d'atomes de soufre fixé à 2 à une distance moyenne de 2,83 (10) Å. La présence de thiol améliore considérablement la qualité de l'ajustement comme présenté Figure 83.

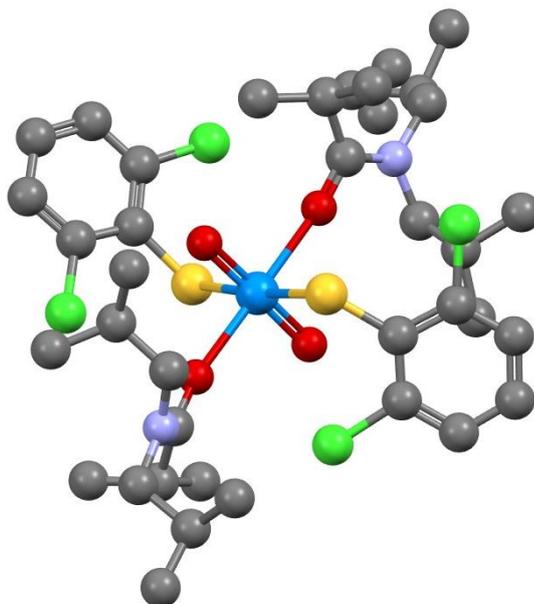


Figure 82. Schéma de la structure du complexe uranyle-thiol (sphère bleue : Uranium, sphère rouge : oxygène, sphère jaune : soufre, sphère grise : carbone)(Kannan et al., 2005).

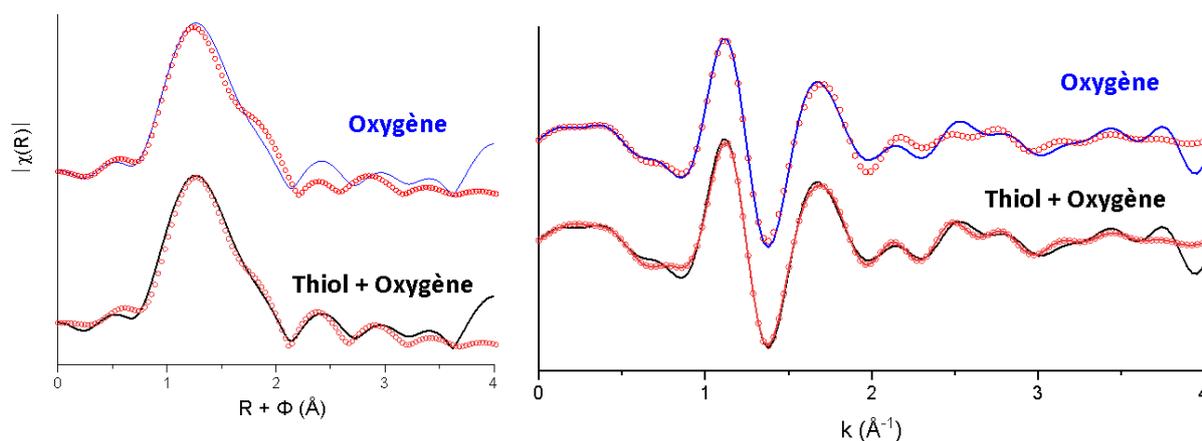


Figure 83. a) Module de la transformée de Fourier, et b) partie imaginaire de la transformée de Fourier en  $k^2\chi(k)$  de la glande digestive avec thiol (noir) et sans thiol (bleu). Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (cercle).

ii. Deuxième modèle : 6 oxygènes et 3 phosphores

Le deuxième modèle a été ajusté au spectre expérimental en utilisant une structure basée sur un complexe uranyle-phosphate (Kumar et al., 2019; Safi et al., 2013; Starck et al., 2017). La première sphère de coordination correspond aux deux atomes d'oxygène axiaux caractéristiques de l'oxocation uranyle, à une distance moyenne de 1,72(6) Å. La deuxième

sphère est composée d'un nombre d'atomes d'oxygène fixé à 6 à une distance moyenne de 2,25 (2) Å et d'un nombre d'atomes de phosphore fixé à 3 à une distance moyenne de 3,31 (30) Å.

iii. Troisième modèle : 6 oxygènes

Le troisième modèle a été ajusté en utilisant une structure simple composée uniquement d'atome d'oxygène comme dans le cas des carboxylates. La première sphère de coordination correspond aux deux atomes d'oxygène axiaux caractéristiques de l'oxocation uranyle, à une distance moyenne de 1,74 (1) Å. La deuxième sphère est composée d'un nombre d'atomes d'oxygène fixé à 6 à une distance moyenne de 2,29 (10) Å. D'autres tentatives d'ajustement en utilisant un modèle de carbonate avec de la Liebigite pur ( $\text{Ca}_2(\text{UO}_2)(\text{CO}_3)_3 \cdot 11 \text{H}_2\text{O}$ ) ont produit des résultats insatisfaisants.

*Tableau 24. Paramètres structurels obtenus à partir de l'ajustement des données EXAFS dans la glande digestive.*

Échantillon	Première couche : O <sub>ax</sub>	Deuxième couche		Paramètre d'ajustement
<b>1<sup>er</sup> modèle</b> <b>Oxygène + Thiol</b>	2 O <sub>ax</sub> (fixé) à 1,75 (2) Å $\sigma^2=0,0013 \text{ \AA}^2$	4 (fixé) O <sub>eq</sub> à 2,31 (3) Å $\sigma^2=0,0055 \text{ \AA}^2$	2 (fixé) S <sub>eq</sub> à 2,83 (1) Å $\sigma^2=0,011 \text{ \AA}^2$	$S_0^2= 1,1$ $e_0=-3,08 \text{ eV}$ Facteur R = 0,7 %
<b>2<sup>ème</sup> modèle</b> <b>Oxygène + Phosphate</b>	2 O <sub>ax</sub> (fixé) à 1,72 (6) Å $\sigma^2=0,0013 \text{ \AA}^2$	6 (fixé) O <sub>eq</sub> à 2,25 (3) Å $\sigma^2=0,001 \text{ \AA}^2$	3 (fixé) P à 3,31 (30) Å $\sigma^2=0,013 \text{ \AA}^2$	$S_0^2= 1,1$ $e_0=-11,1 \text{ eV}$ Facteur R = 0,9 %
<b>3<sup>ème</sup> modèle</b> <b>Oxygène</b>	2 O <sub>ax</sub> (fixé) à 1,74 (1) Å $\sigma^2=0,0013 \text{ \AA}^2$	6 (fixé) O <sub>eq</sub> à 2,29 (1) Å $\sigma^2=0,002 \text{ \AA}^2$		$S_0^2= 1,1$ $e_0=-3,63 \text{ eV}$ Facteur R = 4,4 %

iv. Synthèse

Un grand nombre de données existent concernant la complexation du cation uranyle avec des molécules bioorganiques (Pible et al., 2006). Les valeurs pour les distances U-O<sub>eq</sub> se situent entre 2,31 et 2,61 Å lorsque l'uranyle est complexé avec des carboxylates

monodentes, et entre 2,41 et 2,84 Å avec des carboxylates bidentés. Dans la littérature, nous n'avons pas pu trouver d'exemples de structures protéiques impliquant une fonction thiol dans la complexation de l'uranyle. En effet, comme expliqué précédemment, l'uranyle est un cation dur, tandis que les thiolates sont des bases molles, ce qui induit un mauvais recouvrement orbitalaire. Le choix de ce modèle composé de thiolate prend en considération à la fois des fonctions thiols et des amides qui, dans le cadre de notre ajustement, ne peuvent pas être distingués des carboxylates/carbonates.

Après l'ajustement du spectre expérimental avec les modèles thiolate et phosphate, nous pouvons mettre en évidence une spéciation différente de l'uranyle par rapport au complexe tricarbonato, qui est l'espèce majoritaire dans l'eau de mer. Le complexe uranyle-tricarbonato est considéré comme étant un complexe qui n'entre pas dans la bioaccumulation. Les résultats obtenus montrent que l'uranyle dans la glande digestive a une spéciation différente et pourrait être reconnu par des protéines. En effet, les ajustements comprenant les thiols et les phosphates sont les plus pertinents pour décrire le spectre expérimental de la glande digestive, tandis que le modèle contenant uniquement les atomes d'oxygène se révèle être moins représentatif. Toutefois, le modèle avec les ligands phosphates montre une distorsion relativement importante de la distance moyenne U-P, qui est plus courte que les distances moyennes reportées dans la littérature (3,61 Å) (Kumar et al., 2019; Safi et al., 2013; Starck et al., 2017). Les spectres étant relativement bruités, nous ne pouvons donc pas exclure la présence de ces phosphates bien que nous le jugions peu probable.

Ces analyses suggèrent que l'uranyle est coordonné dans la glande digestive par des molécules organiques pouvant impliquer des atomes d'oxygène et de soufre. On suppose que les métalloprotéines, qui sont des protéines riches en sulfhydryle, pourraient être impliquées dans la complexation de l'uranyle dans la glande digestive. De plus, le rôle de ces protéines est cohérent avec la complexation de métaux lourds et leurs implications dans les voies de détoxification.

## b) Byssus

Le signal EXAFS a été ajusté en  $k^2$  dans l'espace R entre 1 et 5 Å après transformation de Fourier en utilisant une fenêtre de Hanning dans l'intervalle  $k$  (3,2-11,3 Å<sup>-1</sup>) pour le byssus. L'ajustement du spectre EXAFS a été réalisé en utilisant la structure du complexe  $\text{UO}_2[\text{TAM}(\text{HOPO})_2]^{2-}$  comme modèle, et ce choix a été motivé par plusieurs raisons (Szigethy and Raymond, 2011). Tout d'abord, de nombreuses tentatives d'ajustement infructueuses ont été effectuées en utilisant divers types de ligands tels que les phosphates, les thiols, les histidines, les carbonates, les carboxylates, etc. Les résultats obtenus à la suite des imageries SIMS nous ont permis de comprendre que l'uranium pouvait être accumulé au niveau de la cuticule des fils de byssus, nous fournissant des informations essentielles sur sa spéciation. De plus, la présence de groupes DOPA au niveau de la cuticule est connue pour complexer des métaux tels que le fer et le vanadium (Mesko et al., 2021). Nous avons cherché une structure cristallographique proche des groupes DOPA présents dans les mfp-1 et contenant le cation uranyle pour l'utiliser comme modèle pour nos ajustements EXAFS. La Figure 84 permet de comparer le motif hydroxypyridinone-amide (HOPO) sélectionné pour les ajustements EXAFS au motif catécholamine (CAM) présent dans la protéine mfp-1 (Gorden et al., 2003; Priemel et al., 2020). Ces chélates similaires aux catéchols sont basés sur des groupements hydroxypyridinone, désignés sous le terme "HOPO" dans la littérature.

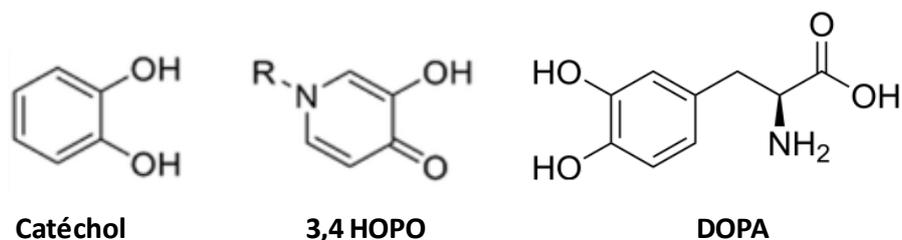


Figure 84. Exemple de motif catéchol et hydroxypyridinone et DOPA .

Tableau 25. Paramètres structuraux obtenus à partir de l'ajustement des données EXAFS du byssus.

Échantillon	Première couche : O <sub>ax</sub>	Deuxième couche	Troisième couche	Paramètre d'ajustement
Fils de byssus	2 O <sub>ax</sub> (fixé) à 1,80 (2) Å $\sigma^2=0,003 \text{ \AA}^2$	5 (1) O <sub>eq</sub> à 2,45 (5) Å $\sigma^2=0,013 \text{ \AA}^2$	5 (1) C à 3,5 (3) Å $\sigma^2=0,003 \text{ \AA}^2$	S <sub>0</sub> <sup>2</sup> = 1,1 e <sub>0</sub> = 5,53 eV Facteur R = 0,7 %

Les paramètres d'ajustement sont répertoriés dans le Tableau 25. Les valeurs obtenues par l'ajustement des spectres EXAFS montrent que la première sphère de coordination est constituée de 2 liaisons U-O<sub>ax</sub> à une distance typique de 1,80 (2) Å, et de 5 (1) atomes d'oxygène impliqués dans la liaison U-O<sub>eq</sub> à une distance moyenne de 2,45 (5) Å dans la deuxième sphère de coordination. La troisième sphère est composée de 5 (1) atomes de carbones à une distance U-C de 3,5 (2) Å. Deux chemins de diffusion multiples ont été inclus (liaisons O<sub>ax</sub>-U-O<sub>ax</sub> et U-O<sub>eq</sub>-C) pour significativement améliorer la qualité de l'ajustement. Les distances obtenues à partir de notre ajustement sont comparables aux distances U-O<sub>eq</sub> (2,40 Å) et U-C (3,24 Å) dans les structures cristallines du complexe UO<sub>2</sub>[TAM (HOPO)<sub>2</sub>]<sup>2-</sup>. Wang et ses collaborateurs ont calculé par DFT (density functional theory) la distance de la liaison entre l'uranyle et des groupes fonctionnels HOPO qui est comprise entre 2,41-2,42 Å (Wang et al., 2019). De plus, la constante de complexation U (VI)-catéchol est favorable à sa stabilité (log K<sub>ml</sub>=15,9) (Durbin et al., 1997). Plusieurs ligands contenant deux, trois ou quatre groupes de liaison métallique bidentate de type catécholate ou hydroxypyridonate, conçus pour la chélation *in vivo* d'autres actinides, ont montré leur efficacité lors d'évaluations chez la souris pour la chélation *in vivo* de l'U (VI) (Durbin et al., 2000). Ces résultats ne sont pas surprenants étant donné que des travaux ont montré qu'il était possible de réaliser l'extraction de l'uranium en solution à l'aide de catéchols modifiés. Deux résines préparées avec des CAM ont montré des capacités d'absorption de l'uranium (VI) allant jusqu'à 400 mg.g<sup>-1</sup> et des taux d'extraction de plus de 95 % dans des solutions riches en ions (Sr, Ca, Mg, K, Na) (Mossand et al., 2023).

En résumé, nos résultats ont permis de mettre en évidence une probable interaction entre l'uranium et les protéines présentes au niveau de la cuticule du byssus. Comme précédemment

décrite, la cuticule est riche en protéines de type mfp contenant une grande quantité de DOPA. On pourrait envisager la formation d'un complexe impliquant trois résidus DOPA bidentes. Ces résultats sont les premiers à pouvoir décrire la spéciation de l'uranyle dans le byssus.

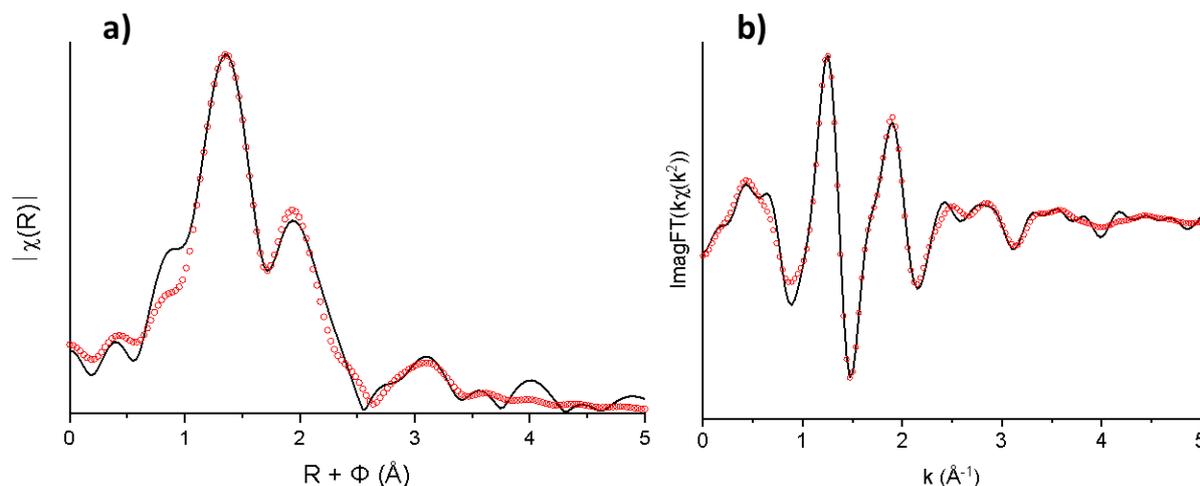


Figure 85. a) Module de la transformée de Fourier, et b) partie imaginaire de la transformée de Fourier en  $k^2\chi(k)$  du byssus. Courbe expérimentale (ligne continue), courbe ajustée (cercle).

## 2) Spectres SLRT de moules exposées à l'uranium

Les moules utilisées pour les analyses SLRT ont été contaminées selon les mêmes conditions que celles des expériences EXAFS, dans le but de permettre une comparaison des résultats. Les échantillons de la glande digestive ont été préparés à partir de moules exposées à une concentration de  $[U] = 5 \times 10^{-5}$  M pendant une période de 12 jours (voir les détails dans la section Matériaux et méthodes). Les données relatives au byssus n'ont cependant pas été mentionnées, puisque lors des mesures, nous n'avons pas réussi à résoudre les problèmes liés à la diffraction du faisceau sur les fils de byssus.

La Figure 86 présente les spectres SLRT de la glande digestive à différents temps de retard. Les spectres ont été acquis avec des délais variables de temps de retard et une ouverture de 100  $\mu$ s. Les résultats révèlent la présence d'espèces ayant une courte durée de vie ( $< 500$  ns) dans la plage de longueurs d'onde comprise entre 330 nm et 470 nm, correspondant à des espèces organiques fluorescentes présentes dans la matrice biologique (Annexe Figure 102). Malgré une ligne de base plus élevée à de faibles temps de retard, la présence de ces espèces à courte durée de vie est observée en dehors de la plage caractéristique des longueurs d'onde de

l'uranium. La présence d'espèces fluorescentes a été constatée quelles que soient les conditions expérimentales avec un temps de retard inférieur à 900 ns.

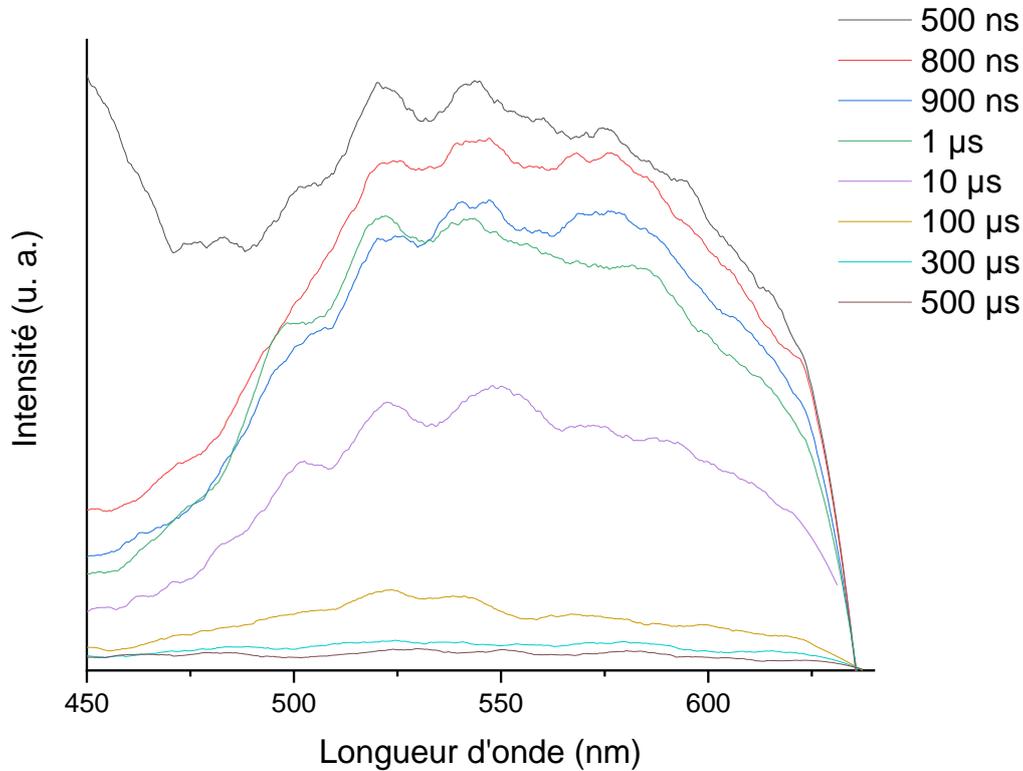


Figure 86. Spectres de fluorescence de la glande digestive de moule exposée à de l'eau de mer dopée.

Dans la glande digestive, les longueurs d'onde de fluorescence de l'uranium sont localisées à 502-520-544-575 nm (avec un temps de retard de 500 ns). Un léger décalage bathochrome entre le maximum des pics pour un temps de retard de 500 ns et un temps de retard de 100 µs s'observe, suggérant la présence d'au moins deux espèces possédant différentes durées de vie et longueurs d'onde dans la glande digestive. Afin de confirmer cette hypothèse, la durée de vie ( $\tau$ ) a été calculée en utilisant une équation de type décroissance monoexponentielle :  $I = A_0 e^{-\frac{x}{\tau}}$ . Mais cette démarche montre certaines limitations dans la description des résultats expérimentaux.

La Figure 87 montre l'ajustement des valeurs avec une équation de type décroissance à bi-exponentielle :  $A_1 \times e^{-\frac{x}{\tau_1}} + A_2 \times e^{-\frac{x}{\tau_2}}$ . Deux temps de vie  $\tau_1=0.7 \mu\text{s}$  et  $\tau_2=53 \mu\text{s}$  ont été

obtenus. En raison du bruit présent dans les spectres, l'utilisation d'un ajustement avec une tri-exponentielle n'a pas été envisagée.

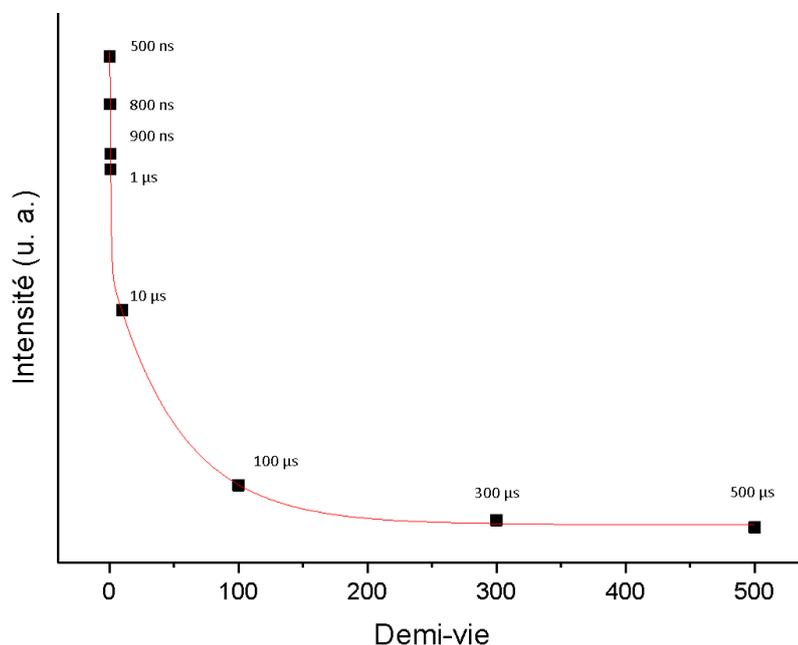


Figure 87. Ajustement de la décroissance de la fluorescence à l'aide d'une fonction bi-exponentielle.

Comme décrit précédemment, les spectres SLRT sont comparés à des références tirées de la littérature disponible dans le Tableau 26. Ces références contiennent des informations sur les durées de vie, les longueurs d'onde maximales et les espèces caractérisées. Ces informations constituent une "empreinte" moléculaire qui est liée à la spéciation.

Tableau 26. Données spectroscopiques (longueur d'onde, temps de vie) de la glande digestive provenant de moule exposée à de l'eau de mer dopée en uranium et la comparaison avec des données de la littérature (Liste non exhaustive).

Complexe U (VI)	Longueur d'onde (nm)					Temps de vie ( $\mu$ s)	Références
<b>Expérimental</b>	<b>502</b>	<b>520</b>	<b>544</b>	<b>571</b>		<b>0,7</b>	Ce travail
<b>Expérimental</b>	<b>503</b>	<b>523</b>	<b>549</b>	<b>575</b>		<b>54</b>	Ce travail
UO <sub>2</sub> (OH) <sub>3</sub> <sup>-</sup>	482	499	519	543	567	0,8	(Moulin et al., 1998)
Eau de mer dopée [U] = 5×10 <sup>-5</sup> M	465	485	505	526	551	2,9-9,5	(Maloubier et al., 2015)
UO <sub>2</sub> OSi (OH) <sub>3</sub> <sup>+</sup>		500	521	544	570	19	(Moll et al., 1998)
Montmorillonite		504	525	549	575	80-110	(Chisholm-Brause et al., 2001)
Liebigite	466, 9	483, 1	502, 8	524, 1	545, 9	571, 9	313 (Amayri et al., 2005)
UO <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>		499	520	544	571	24	(Scapolan et al., 1998)
Uranyle-HEDP (pH 5)		496	519	545	572	110	(Jacopin et al., 2003)
UO <sub>2</sub> (IO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		501	522	545	572	<2	(Karbownik et al., 2004)
Ca <sub>2</sub> UO <sub>2</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	465	484	504	526	555	0,043	(Ambe et al., 2014)

Les résultats démontrent que l'uranyle est complexé par plusieurs espèces différentes dans la glande digestive. Comme expliqué précédemment, la présence d'uranium dans divers

compartiments subcellulaires pourrait être liée à différentes formes chimiques. Nous avons confronté nos résultats à des données disponibles dans la littérature sans parvenir à trouver de similitudes. Néanmoins, la présence d'uranium sous forme de tricarbonatate peut être exclue, ce qui renforce l'idée d'un changement de spéciation de l'uranium dans la glande digestive. Une voie possible pour améliorer les résultats serait d'effectuer des étapes de fractionnement subcellulaire (voir partie Matériels et méthodes) et d'acquérir des spectres de fluorescence des espèces présentes. Ceci permettrait d'améliorer la déconvolution des spectres et d'observer si les espèces sont réparties de manière ubiquitaire dans les compartiments. Enfin, certains candidats intéressants pourraient être utilisés comme spectre de références tels que les métallothionéines pour comparer avec les résultats expérimentaux obtenus.

### 3) Spectres FTIR de byssus contaminés *ex vivo*

Des fils de byssus ont été récoltés à partir de moules non contaminées (*ex vivo*), puis exposés à différentes concentrations d'uranium ( $10^{-3}$  M et  $10^{-4}$  M) pendant 12 jours (voir partie Matériels et méthodes).

Les spectres infrarouges du byssus (Figure 88), bien que complexes, peuvent être comparés à des références de collagène ainsi qu'à d'autres spectres infrarouges du byssus disponibles dans la littérature. La région située entre 900 et 985  $\text{cm}^{-1}$  fournit des informations sur la présence de l'uranyle, cette fréquence correspond à la vibration asymétrique de la liaison  $\text{U-O}_{yl}$ . La fréquence de cette vibration est influencée à la fois par le nombre et la nature des ligands équatoriaux. Lorsque la contribution électronique des ligands est élevée, la fréquence de la vibration diminue ainsi que la force de liaison  $\text{U-O}_{yl}$ . On observe sur le spectre infrarouge du byssus exposé à  $10^{-3}$  M d'uranium la présence d'un pic à 907  $\text{cm}^{-1}$  correspondant à la vibration asymétrique de l'uranyle. Il est également à noter que les échantillons exposés à une concentration de  $10^{-4}$  M (spectres non présentés) sont comparables aux échantillons contrôles et ne montrent pas de pic attribuable à l'uranyle dans les spectres infrarouges.

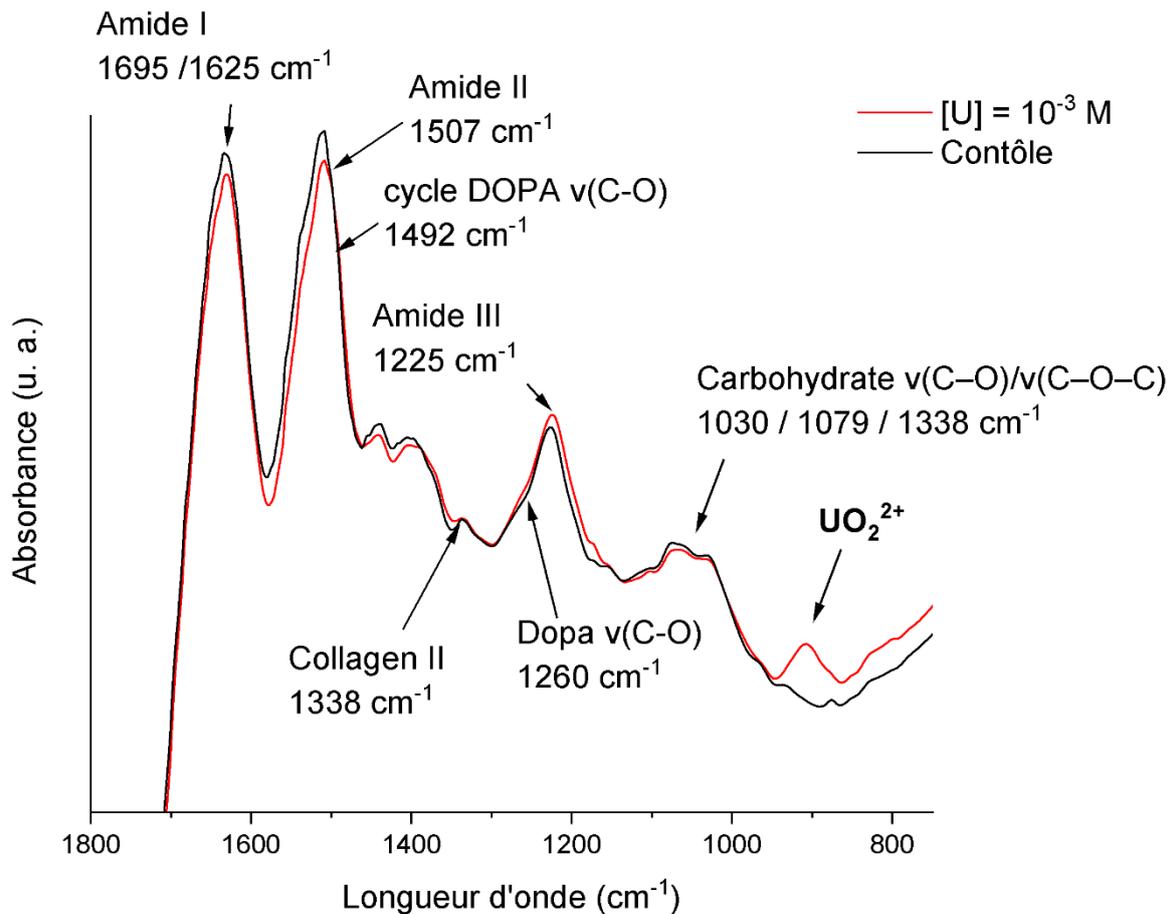


Figure 88. Spectres infrarouge (FTIR) du byssus (rouge) exposé *ex vivo* à de l'eau de mer dopée en uranium et byssus contrôlé.

Cette description semi-qualitative révèle un motif caractéristique du collagène, avec des régions correspondant à l'amine I autour de  $1630\text{ cm}^{-1}$ , à l'amide II à  $1507\text{ cm}^{-1}$  et à l'amide III à  $1225\text{ cm}^{-1}$  (Belbachir et al., 2009). Des épaulements observés à  $1260\text{ cm}^{-1}$  et  $1492\text{ cm}^{-1}$  au niveau de ces pics pourraient indiquer la présence de la DOPA, correspondant respectivement à l'étirement C-O et au cycle aromatique de la DOPA (Fant et al., 2010).

Cependant aucune différence significative dans la région attribuable au collagène n'indique la complexation de l'uranium avec certaines de ces fonctions chimiques.

#### 4) Conclusion

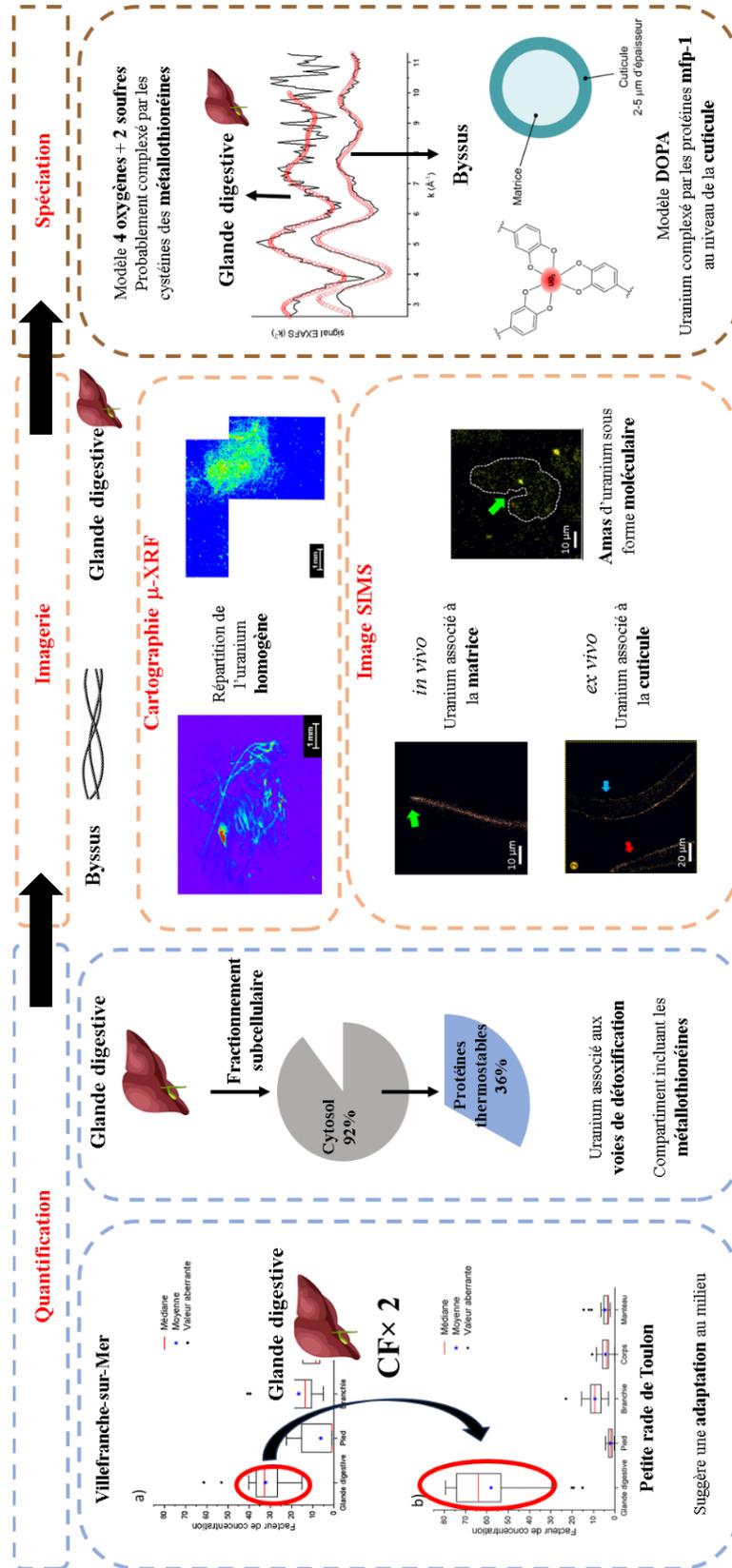
Ces travaux ont permis de déterminer la spéciation de l'uranium dans la glande digestive et le byssus de moules exposées à de l'eau de mer dopée à l'uranium. Les résultats de l'imagerie

ont été utilisés pour fournir des informations sur la localisation de l'uranium, permettant ainsi d'élucider sa spéciation dans la moule. Dans l'eau de mer, l'uranium se présente sous la forme du cation neutre  $(Ca/Mg)_2UO_2(CO_3)_3$ . Cependant, nous avons pu mettre en évidence une spéciation différente dans la glande digestive et le byssus.

Dans la **glande digestive**, les mesures SLRT suggèrent la présence de plusieurs espèces distinctes. De plus, les mesures XAS montrent la présence de complexes d'uranium contenant des **fonctions thiol** et des groupes oxygène qui pourraient être des **carboxylates**. Dans la glande digestive, la présence de protéines participant au processus de détoxification, telles que les **métallothionéines**, pourrait jouer un rôle dans la complexation de l'uranium. Les métallothionéines sont des **protéines chélatantes** riches en fonctions thiol, ce qui leur permet de complexer de nombreux métaux lourds, y compris potentiellement l'uranium.

Grâce à l'imagerie, nous avons pu associer l'accumulation de l'uranium à la partie externe correspondant à la cuticule du byssus. Cette structure est composée de la protéine mfp-1, riche en DOPA, ayant la capacité de chélater des métaux. Les **fonctions catéchols** sont connues pour leur capacité à séquestrer de nombreux actinides. L'étude de la spéciation de l'uranium dans le byssus suggère l'implication d'un **complexe catéchol-uranyle**. Il est plausible que les **mfp-1** puissent complexer l'uranium au niveau de la cuticule du byssus.

V. Bilan



# Conclusions et perspectives



## Conclusions et perspectives

L'objectif de cette thèse était de comprendre les **mécanismes d'accumulation des radionucléides** chez les organismes bivalves en utilisant la moule *Mytilus galloprovincialis* comme organisme modèle. Dans le cadre de ce projet, nous avons étudié deux métaux : le cobalt, un élément essentiel aux processus biologiques, dont le radioisotope ( $^{60}\text{Co}$ ) est couramment présent dans les effluents liquides des centrales nucléaires, et l'uranium, un métal de la famille des actinides qui intervient dans le cycle du combustible.

Le milieu marin est un **système complexe** en raison de la présence de nombreux ions, anions et de molécules qui ont la capacité de complexer les ions métalliques. Les radionucléides dans le milieu marin peuvent avoir une origine naturelle, mais ils peuvent également résulter des activités nucléaires humaines. Bien que les accidents nucléaires liés à ces activités soient rares, ils suscitent des préoccupations majeures et demeurent un sujet de société important. Le manque de données sur la spéciation des radionucléides chez les organismes marins limite notre compréhension des risques associés à leur présence dans les océans. Une réponse parcellaire à cette question consiste à utiliser des organismes modèles dans le cadre de programmes de biosurveillance du milieu marin afin de cartographier la pollution des océans.

L'accumulation des métaux chez les organismes marins dépend à la fois de l'espèce considérée et de la **forme chimique du métal**. Des facteurs biologiques, tels que la demi-vie biologique et la présence de métabolites spécifiques, peuvent favoriser la complexation des métaux et modifier les cinétiques d'accumulation. D'autres caractéristiques environnementales, comme le site de prélèvement des individus, peuvent également influencer l'accumulation de métaux, y compris les radionucléides. Les moules sont des organismes sentinelles qui accumulent un grand nombre de radionucléides, reflétant ainsi l'état de pollution de leur environnement. Cependant, les quantités accumulées dans leur environnement naturel ne sont bien souvent pas compatibles avec les mesures de spéciation, ce qui rend nécessaire la réalisation d'expériences en laboratoire.

Ces études de spéciation sont cruciales pour comprendre les mécanismes d'accumulation chez les organismes marins et la toxicité de ces éléments le long de la chaîne alimentaire. Bien que les formes physico-chimiques utilisées pour les contaminations lors de ce travail soient considérées comme relativement peu biodisponibles dans les organismes marins, elles représentent la majorité des composés présents dans l'eau de mer. Le cobalt se trouve

## Conclusions et perspectives

principalement sous forme libre à l'état d'oxydation (+II) dans l'eau de mer, tandis que l'uranium se présente sous forme d'oxocation  $\text{UO}_2^{2+}$ , dont le complexe  $(\text{Ca/Mg})_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3$  est la forme prédominante. L'assimilation de ces éléments par des organismes vivants peut entraîner un changement de spéciation et avoir un impact sur leur toxicité.

Les travaux menés au cours de cette thèse ont été réalisés **en combinant la quantification, l'imagerie et la spéciation**. Cette approche, peu fréquemment utilisée pour étudier les processus d'accumulation des radionucléides, permet de compenser le manque d'informations disponibles dans la littérature lié à l'utilisation de différents organismes et méthodes. Grâce à ce travail, nous avons pu partiellement **élucider la spéciation du cobalt et de l'uranium** dans certains organes de la moule *M. galloprovincialis*.

Nous avons effectué des prélèvements dans deux sites présentant des caractéristiques physico-chimiques environnementales différentes, ce qui nous a permis de comparer l'accumulation de ces éléments dans les moules et de comprendre leur impact. Le site de Villefranche-sur-Mer est considéré comme une zone non polluée, tandis que la petite rade de Toulon présente des concentrations élevées de métaux lourds.

**Pour le cobalt**, la forme stable ( $^{59}\text{Co}$ ) a été principalement utilisée pour éviter les difficultés liées à l'utilisation de l'isotope radioactif. Cependant, une étude expérimentale utilisant le radiocobalt ( $^{60}\text{Co}$ ) à des concentrations très faibles (autour de  $10^{-14}$  M) a permis de déterminer l'accumulation du cobalt dans la moule à des niveaux proches de ceux présents dans l'environnement. Les données obtenues à partir de différents organes (glande digestive, autres tissus mous, byssus) montrent que le **facteur de concentration est le plus élevé dans le byssus**, tandis que parmi les tissus mous, **la glande digestive** présente le facteur de concentration le plus élevé. Cette tendance est comparable à d'autres études réalisées sur des organismes bivalves. La glande digestive des mollusques participe aux **processus de détoxification** des métaux grâce à de nombreuses protéines détoxifiantes, telles que les **métallothionéines**.

Une étude comparative des moules en fonction de leur origine met en évidence une **accumulation significativement plus élevée** de cobalt dans les moules provenant de la **petite rade de Toulon** par rapport à celles de Villefranche-sur-Mer. Les moules ont la capacité de **s'adapter à leur environnement**, notamment en régulant la production de certains métabolites qui augmentent leur **tolérance à certains métaux** ou contaminants. Notre étude révèle une

## Conclusions et perspectives

bioaccumulation spécifique à chaque site de prélèvement, qui pourrait être liée à la capacité des moules à s'adapter à la présence de métaux lourds.

Nous avons également étudié la cinétique d'accumulation en comparant deux cohortes de moules exposées au cobalt pendant 12 jours et 60 jours. Ce type d'étude est très intéressant pour comprendre les cinétiques d'accumulation chez les mollusques. Nous avons pu montrer qu'après 12 jours, **les organismes n'avaient pas atteint un état d'équilibre**, et nous n'avons pas de preuve indiquant qu'un tel équilibre soit atteint après 60 jours d'exposition.

De plus, la fragmentation subcellulaire a fourni des informations sur les mécanismes d'accumulation au niveau cellulaire. La séparation des différents compartiments dans la glande digestive a permis d'associer 42% du cobalt disponible aux **protéines thermostables**, notamment les **métallothionéines**. Le cobalt est essentiellement associé au compartiment cellulaire participant aux processus de détoxification. La présence de cobalt dans le cytosol suggère la présence d'une **forme moléculaire** de ce dernier.

Afin de comprendre les processus d'accumulation des métaux dans la glande digestive et le byssus, il est nécessaire d'utiliser des outils spectroscopiques dédiés à l'imagerie pour étudier leur distribution. Des cartographies de fluorescence X ont révélé une distribution homogène du cobalt à l'échelle de l'organe dans la glande digestive et dans le byssus. La variation de la concentration de cobalt n'a pas eu d'impact sur la répartition dans les organes, qui est restée homogène. Le **degré d'oxydation +II** du cobalt a été déterminé en comparant les spectres XANES expérimentaux obtenus à partir des échantillons cartographiés avec plusieurs références de cobalt. L'assimilation du cobalt par les organismes vivants se fait préférentiellement sous forme de sa forme biologiquement active, la cobalamine. Cette vitamine contient un atome de cobalt au degré d'oxydation +III. L'approche utilisée pour les contaminations est basée sur la forme majoritaire du cobalt dans le milieu marin (Co+II), la cobalamine ne représentant qu'une petite fraction du cobalt disponible (1/1000). Par conséquent, il apparaît crucial d'approfondir les études de spéciation sur ces deux formes de cobalt, qui montrent des assimilations différentes pouvant être liées à des mécanismes d'accumulation distincts. Il serait ainsi intéressant dans le futur de déterminer plus précisément les différences de spéciation *in vivo* résultant de contaminations par des formes solubles (Co+II et cobalamine) et par l'alimentation en phytoplancton, qui est une source de cobalt.

## Conclusions et perspectives

Afin d'obtenir des informations à **l'échelle cellulaire**, des analyses SIMS ont été menées pour visualiser les **structures subcellulaires**. Dans le byssus, le **cobalt au niveau de la cuticule** (partie externe) apparaît plus concentré qu'au niveau de la matrice (partie interne). Ces observations sont cohérentes avec la présence de nombreuses protéines capables de chélater les métaux au niveau de la cuticule. La présence du cobalt dans la matrice pourrait être liée à des processus de détoxification.

Au niveau de la **glande digestive**, le cobalt est associé aux **tubules hépatiques**, et la présence d'amas intracellulaires pourrait être liée à certaines **cellules digestives** et à des fonctions de séquestration des métaux. Une étude préliminaire visant à la purification des métallothionéines par chromatographie d'affinité a confirmé leur présence dans la glande digestive des moules. L'exposition d'une fraction contenant les **métallothionéines** au cobalt a mis en évidence la **complexation du cobalt avec ces protéines**. Il faudrait purifier la protéine et étudier sa spéciation en utilisant des concentrations de protéines et de cobalt compatible avec les analyses EXAFS.

La spéciation a été étudiée avec des analyses EXAFS qui ont montré que le cobalt dans le byssus et dans la glande digestive est principalement au degré d'oxydation +II. **Dans le byssus**, les spectres EXAFS ont mis en évidence l'implication de **ligands catéchol bidentés**. Ces résultats sont cohérents avec l'accumulation du cobalt au niveau de la cuticule du byssus (partie externe) et la présence de nombreuses **protéines mfp-1** riches en DOPA (1-3,4-dihydroxyphénylalanine). Ces protéines ont la capacité de complexer des métaux tels que le fer, et les résultats suggèrent qu'elles peuvent également complexer le cobalt. **L'étude EXAFS** menée avec le byssus montre la présence de **ligands catéchol bidentés** formant des liaisons avec le cobalt. **Dans la glande digestive**, le cobalt est associé à des **ligands thiolates**. Ces résultats mettent en avant la formation d'un complexe de **géométrie octaédrique**. Il est probable que les **métallothionéines** de la glande digestive soient impliquées dans la séquestration du cobalt. En effet, la capacité des métallothionéines à complexer des métaux leur permet de former un complexe avec le cobalt dans ces sites de complexation **riches en cystéines**.

**Pour l'uranium, la forme stable de l'uranium dans l'eau de mer est le complexe  $\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3$** . L'uranium se présente au degré d'oxydation (+VI) sous la forme de l'oxocation uranyle

## Conclusions et perspectives

$\text{UO}_2^{2+}$ . Les expériences d'accumulation effectuées avec l'uranium mettent en évidence un **facteur de concentration important dans le byssus et dans la glande digestive**. Dans les expériences menées sur les moules provenant de Villefranche-sur-Mer et de la petite rade de Toulon, le facteur de concentration de l'uranium dans la glande digestive est significativement supérieur en comparaison des autres tissus mous. Cependant, il n'y a pas de différences entre les quantités totales d'uranium accumulées en fonction du lieu de prélèvement des individus. Les moules provenant de la petite rade de Toulon ont un facteur de concentration dans la glande digestive significativement plus important que les moules de Villefranche-sur-Mer. Ce comportement est attribué à l'adaptation des moules à leurs environnements, ce qui leur permet de concentrer efficacement l'uranium dans l'organe lié au processus de détoxification.

Les cartographies de l'uranium avec une faible concentration d'exposition ( $10^{-5}$  M), par fluorescence X, montrent une répartition homogène de l'uranium à l'échelle de l'organe dans la glande digestive et le byssus. Les images ioniques obtenues dans la **glande digestive** indiquent des amas colocalisés avec les structures des **tubules hépatiques**. Deux méthodes de contamination différentes du byssus (*in vivo* et *ex vivo*) ont permis de distinguer une distribution de l'uranium différente. **Lorsque la moule est exposée à de l'uranium et génère du byssus, ce dernier est concentré au niveau de la matrice**. Le byssus est suspecté d'avoir un rôle important dans la détoxification de certains métaux. Cependant, les mécanismes ne sont pas bien établis, et il n'est pas possible de conclure sur la nature exacte de l'uranium au sein de la matrice. En revanche, les **contaminations *ex vivo* du byssus permettent d'associer l'uranium à la cuticule du byssus** avec une faible diffusion dans la matrice. En effet, la cuticule du byssus est composée en partie de protéines mfp-1 qui sont riches en DOPA, ce qui leur procure la capacité de chélater des métaux en formant des complexes stables (Fe, V). Des molécules contenant des **catéchols ont permis de montrer leur capacité à pouvoir séquestrer des actinides** (Am, U). De plus, la constante de complexation U (VI)-catéchol est favorable à sa stabilité ( $\log K_{ML}=15,9$ ). Ces caractéristiques permettent alors d'expliquer la présence de l'uranium qui pourrait également être complexé par ces protéines à la surface des fils de byssus. En complément, les analyses de microscopies électroniques n'ont pas permis d'identifier la présence d'éléments denses aux électrons indiquant une forme moléculaire de l'uranyle.

L'étude de la spéciation de l'uranium dans la glande digestive et le byssus a permis de mettre en évidence la présence de l'uranyle ( $\text{UO}_2^{2+}$ ) avec un degré d'oxydation +VI. **L'étude**

## Conclusions et perspectives

**EXAFS** menée avec le byssus montre la présence de **ligands catéchol bidentés** formant des liaisons avec l'uranium. Ces résultats suggèrent que l'uranium est associé à la cuticule du byssus par la formation d'un complexe avec les **protéines mfp-1 riches en DOPA**. Ils indiquent que les DOPA peuvent chélater l'uranyle et le séquestrer au niveau de la cuticule. Approfondir ces mécanismes de chélation mfp-1-uranyle serait intéressant. **Dans la glande digestive**, l'étude EXAFS a mis en évidence la présence de **ligands thiolates** formant des complexes avec l'uranium. La présence de métallothionéines dans la glande digestive pourrait être responsable de la complexation de l'uranium. Les fonctions thiolates des **métallothionéines** leur confèrent la **capacité de lier des métaux lourds**. Il serait intéressant de poursuivre les études sur les mécanismes de chélation de l'uranyle par les métallothionéines.

Concernant les perspectives de cette thèse, elles sont nombreuses. Comme nous l'avons vu, l'accumulation de cobalt et d'uranium dans les moules se fait principalement au niveau de la glande digestive et du byssus. Des études visant à extraire et purifier les protéines présentes dans la glande digestive permettraient d'étudier les complexes formés. Parmi ces protéines, les métallothionéines semblent être des candidats pertinents en raison de leur activité détoxifiante envers les métaux lourds. Les métallothionéines disposent de nombreux sites de complexation impliquant des cystéines, il serait intéressant de pouvoir déterminer le nombre de sites impliqués dans la complexation du cobalt et de l'uranium. En effet, les données que nous avons obtenues semblent indiquer que des thiols sont impliqués dans la complexation du cobalt et de l'uranyle, bien que ce dernier soit peu affiné pour les thiols. Des études de modélisation moléculaire pourraient également permettre de mieux comprendre les sites de complexation. Ces résultats permettraient de confronter ces données théoriques avec des données expérimentales qui pourraient être effectuées avec des analyses EXAFS de ces protéines.

Les études d'imagerie ont permis de montrer la présence de cobalt et d'uranium à l'échelle cellulaire dans la glande digestive. Il se pourrait que la répartition de ces éléments dépende d'une cinétique de contamination et nécessiterait des études de toxicocinétique. Il faudrait refaire une série de contaminations avec différents temps d'exposition et effectuer des analyses d'imagerie. La répartition des éléments pourrait évoluer au cours du temps, et il se pourrait que la spéciation puisse changer. En effet, de nombreux articles ont montré la présence de métaux sous forme condensée dans la glande digestive.

## Conclusions et perspectives

Dans le byssus, les résultats convergent vers la complexation du cobalt et de l'uranium par les protéines mfp-1 riches en DOPA. Ces protéines sont d'efficaces chélateurs de métaux tels que le fer ou le vanadium. Il semble relativement difficile au vu des propriétés du byssus de pouvoir extraire ces protéines. Cependant, l'utilisation de protéines recombinantes permettrait d'obtenir des quantités compatibles avec des outils de spéciation (SLRT, XAS, UV). Ce type d'étude permettrait d'analyser plus précisément les mécanismes de complexation et, plus largement, mieux comprendre le rôle de cette famille de protéines de manière générale.

De manière générale, la méthodologie mise en place durant cette thèse, avec l'utilisation de techniques spectroscopiques et analytiques conjointement utilisées avec des sondes d'imagerie, peut être appliquée à d'autres radionucléides. Il serait intéressant de pouvoir étudier le plutonium, qui est un actinide très largement utilisé dans les activités nucléaires civiles et militaires, mais qui forme des hydroxydes insolubles dans l'eau de mer.



# Références



## Références

- Aarkrog, A., 2003. Input of anthropogenic radionuclides into the World Ocean. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, Worldwide Marine Radioactivity Studies (WOMARS)* 50, 2597–2606. [https://doi.org/10.1016/S0967-0645\(03\)00137-1](https://doi.org/10.1016/S0967-0645(03)00137-1)
- Abney, C.W., Mayes, R.T., Saito, T., Dai, S., 2017. Materials for the Recovery of Uranium from Seawater. *Chem. Rev.* 117, 13935–14013. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00355>
- Agüi-Gonzalez, P., Jähne, S., N. Phan, N.T., 2019. SIMS imaging in neurobiology and cell biology. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 34, 1355–1368. <https://doi.org/10.1039/C9JA00118B>
- Ahearn, G.A., Mandal, P.K., Mandal, A., 2004. Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. *J Comp Physiol B* 174, 439–452. <https://doi.org/10.1007/s00360-004-0438-0>
- Ahlenius, H., Eamer, J., Prestrud, P., United Nations Environment Programme (Eds.), 2007. Global outlook for ice & snow. Division of Early Warning and Assessment (DEWA), United Nations Environmental Programme, Nairobi, Kenya.
- Albrecht, A., 2003. Validating riverine transport and speciation models using nuclear reactor-derived radiocobalt. *Journal of Environmental Radioactivity* 66, 295–307. [https://doi.org/10.1016/S0265-931X\(02\)00133-9](https://doi.org/10.1016/S0265-931X(02)00133-9)
- Amayri, S., Reich, T., Arnold, T., Geipel, G., Bernhard, G., 2005. Spectroscopic characterization of alkaline earth uranyl carbonates. *Journal of Solid State Chemistry* 178, 567–577. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2004.07.050>
- Ambe, D., Kaeriyama, H., Shigenobu, Y., Fujimoto, K., Ono, T., Sawada, H., Saito, H., Miki, S., Setou, T., Morita, T., Watanabe, T., 2014. Five-minute resolved spatial distribution of radiocesium in sea sediment derived from the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant. *Journal of Environmental Radioactivity* 138, 264–275. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2014.09.007>
- Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76, 160–202. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.015>
- Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., 1975. Etude expérimentale du transfert du cobalt 60 dans une chaîne trophique marine benthique. *Helgolander Wiss. Meeresunters* 27, 283–297. <https://doi.org/10.1007/BF01611697>
- Anderson, B.F., Buckingham, D.A., Robertson, G.B., Webb, J., 1982. Structure of piperidinium tris(pyrocatecholato)ferrate(II) sesquihydrate. *Acta Crystallogr B Struct Sci* 38, 1927–1931. <https://doi.org/10.1107/S0567740882007614>
- ANDRA, 2017. dossier\_dechets\_immerges.pdf.

## Références

- Andral, B., Tomasino, C., 2010. RINBIO 2009 - Evaluation de la qualité des eaux basée sur l'utilisation de stations artificielles de moules en Méditerranée: résultats de la campagne 2009.
- Andral Bruno, 1996. RINBIO: RÉSEAU INTÉGRATEURS BIOLOGIQUES. <https://doi.org/10.18142/162>
- Arnot, J.A., Gobas, F.A.P.C., 2006. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environmental Reviews* 14, 257–297. <https://doi.org/10.1139/A06-005>
- Arrighetti, F., Landro, S.M., Lambre, M.E., Penchaszadeh, P.E., Teso, V., 2019. Multiple-biomarker approach in the assessment of the health status of a novel sentinel mussel *Brachidontes rodriguezii* in a harbor area. *Marine Pollution Bulletin* 140, 451–461. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.02.002>
- Assunta Meli, M., Desideri, D., Roselli, C., Feduzi, L., 2008. Natural Radioactivity in the Mussel *Mytilus Galloprovincialis* Derived from the Central Adriatic Sea (Italy). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 71, 1270–1278. <https://doi.org/10.1080/01932690801934562>
- Atwood, D.A. (Ed.), 2010. Radionuclides in the environment, 1. publ. ed, EIC books. Wiley, Chichester.
- Balistrieri, L.S., Murray, J.W., Paul, B., 1994. The geochemical cycling of trace elements in a biogenic meromictic lake. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58, 3993–4008. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(94\)90262-3](https://doi.org/10.1016/0016-7037(94)90262-3)
- Bandara, N., Zeng, H., Wu, J., 2013. Marine mussel adhesion: biochemistry, mechanisms, and biomimetics. *Journal of Adhesion Science and Technology* 27, 2139–2162. <https://doi.org/10.1080/01694243.2012.697703>
- Barberet, P., Jouve, J., Sorieul, S., Alfaut, P., Mathieu, L., 2021. AIFIRA: a light ion beam facility for ion beam analysis and irradiation. *Eur. Phys. J. Plus* 136, 67. <https://doi.org/10.1140/epjp/s13360-020-01045-9>
- Barceloux, D.G., Barceloux, D., 1999. Cobalt. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* 37, 201–216. <https://doi.org/10.1081/CLT-100102420>
- Baxter, M.S., McKinley, I.G., Mackenzie, A.B., Jack, W., 1979. Windscale radiocaesium in the Clyde sea area. *Marine Pollution Bulletin* 10, 116–120. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(79\)90104-8](https://doi.org/10.1016/0025-326X(79)90104-8)
- Bebianno, M.J., Machado, L.M., 1997. Concentrations of metals and metallothioneins in *Mytilus galloprovincialis* along the south coast of Portugal. *Marine Pollution Bulletin* 34, 666–671. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(97\)00036-2](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(97)00036-2)

## Références

- Belbachir, K., Noreen, R., Gouspillou, G., Petibois, C., 2009. Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* 395, 829–837. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3019-y>
- Bell, P., Sheldrick, W.S., 1984. Preparation and Structure of Zinc Complexes of Cysteine Derivatives. *Zeitschrift für Naturforschung B* 39, 1732–1737. <https://doi.org/10.1515/znb-1984-1220>
- Bilal, E., Guénole-Bilal, I., Bounahkla, M., Iatan, E.L., Mello, F.M. de, Doumas, M., Tahri, M., Gallice, F., Graillet, D., Piégay, H., Lassoued, N., 2014. The freshwater mussels are a good bioindicator for monitoring the water pollution by heavy metal (The Saint Victor Sur Loire Lake, France). *Banat's Journal of Biotechnology* 10, In press. [https://doi.org/10.7904/2068-4738-V\(9\)-5](https://doi.org/10.7904/2068-4738-V(9)-5)
- Binz, P.-A., Kägi, J.H.R., 1999. Metallothionein: Molecular evolution and classification, in: Klaassen, C.D. (Ed.), *Metallothionein IV*. Birkhäuser Basel, Basel, pp. 7–13. [https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8847-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8847-9_2)
- Blancheton, J.-P., Audineau, -, 1986. Production d'Algues unicellulaires.
- Borcherding, J., 1991. The annual reproductive cycle of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha Pallas* in lakes. *Oecologia* 87, 208–218. <https://doi.org/10.1007/BF00325258>
- Bouchoucha, M., Tomasino, C., Amouroux, I., Andral, B., Brach-Papa, C., Briand, M., Buchet, R., Delmas, L., Galgani, F., Gonzalez, J.-L., Grouhel-Pellouin, A., Mauffret, A., Mille, T., Munaron, D., Ponzevera, E., Wessel, N., Boissery, P., 2021. 20 ans de suivi de la contamination chimique des eaux côtières méditerranéennes. Résultats & perspectives.
- Bougaran, G., Le Dean, L., Lukomska, E., Picquet, M.-L., Kaas, R., Muller-Feuga, A., 2001. Culture en continu de *Isochrysis galbana affinis Tahiti*.
- Bown, J., Boye, M., Baker, A., Duvieilbourg, E., Lacan, F., Le Moigne, F., Planchon, F., Speich, S., Nelson, D.M., 2011. The biogeochemical cycle of dissolved cobalt in the Atlantic and the Southern Ocean south off the coast of South Africa. *Marine Chemistry* 126, 193–206. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2011.03.008>
- Brown, B.E., 1982. The form and function of metal-containing 'granules' in invertebrate tissues. *Biological Reviews* 57, 621–667. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1982.tb00375.x>
- Bryan, G.W., 1983. Brown seaweed, *fucus vesiculosus*, and the gastropod, *Littorina littoralis*, as indicators of trace-metal availability in estuaries. *Science of The Total Environment* 28, 91–104. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(83\)80010-2](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(83)80010-2)
- Bryan, G.W., Hummerstone, L.G., 1977. Indicators of heavy-metal contamination in the Looe Estuary (Cornwall) with particular regard to silver and lead. *J. Mar. Biol. Ass.* 57, 75–92. <https://doi.org/10.1017/S002531540002124X>

## Références

- Buesseler, K., Dai, M., Aoyama, M., Benitez-Nelson, C., Charmasson, S., Higley, K., Maderich, V., Masqué, P., Morris, P.J., Oughton, D., Smith, J.N., 2017. Fukushima Daiichi–Derived Radionuclides in the Ocean: Transport, Fate, and Impacts. *Annual Review of Marine Science* 9, 173–203. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010816-060733>
- Bustamante, P., Germain, P., Leclerc, G., Miramand, P., 2002. Concentration and distribution of  $^{210}\text{Po}$  in the tissues of the scallop *Chlamys varia* and the mussel *Mytilus edulis* from the coasts of Charente-Maritime (France). *Marine Pollution Bulletin* 44, 997–1002. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00135-2](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00135-2)
- Cain, R.J., Hayward, R.D., Koronakis, V., 2004. The target cell plasma membrane is a critical interface for *Salmonella* cell entry effector–host interplay. *Molecular Microbiology* 54, 887–904. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04336.x>
- Carpenter, J.H., Manella, M.E., 1973. Magnesium to chlorinity ratios in seawater. *Journal of Geophysical Research* (1966-1977) 78, 3621–3626. <https://doi.org/10.1029/JC078i018p03621>
- Carvalho, F.P., 2018. Radionuclide concentration processes in marine organisms: A comprehensive review. *Journal of Environmental Radioactivity* 186, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2017.11.002>
- Carvalho, F.P., 1987. Comparative Uptake From Sea Water and Tissue Distribution of  $^{60}\text{Co}$  in Marine Mollusks: *Health Physics* 53, 73–81. <https://doi.org/10.1097/00004032-198707000-00008>
- Chan, M.K., Othman, R., Zubir, D., Salmijah, S., 2002. Induction of a putative metallothionein gene in the blood cockle, *Anadara granosa*, exposed to cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 131, 123–132. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00293-9](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00293-9)
- Chassard-Bouchaud, C., 1996. Analytical microscopy and environment. Current developments using bioindicators of pollution by stable and radioactive elements. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 42, 361–383.
- Chassard-Bouchaud, C., Escaig, F., 1984. UPTAKE, STORAGE AND EXCRETION OF URANIUM BY MYTILUS EDULIS, A STRUCTURAL, ULTRASTRUCTURAL AND MICROANALYTICAL STUDY BY SECONDARY ION EMISSION AND X RAY SPECTROMETRY. *J. Phys. Colloques* 45, C2-545-C2-548. <https://doi.org/10.1051/jphyscol:19842124>
- Chassard-Bouchaud, C., Escaig, F., Boumati, P., Galle, P., 1992. Microanalysis and image processing of stable and radioactive elements in ecotoxicology. Current developments using SIMS microscope and electron microprobe. *Biology of the Cell* 74, 59–74. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(92\)90009-P](https://doi.org/10.1016/0248-4900(92)90009-P)

## Références

- Chen, J., Zeng, H., 2022. Mussel-Inspired Reversible Molecular Adhesion for Fabricating Self-Healing Materials. *Langmuir* 38, 12999–13008. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c02372>
- Chisholm-Brause, C.J., Berg, J.M., Matzner, R.A., Morris, D.E., 2001. Uranium(VI) Sorption Complexes on Montmorillonite as a Function of Solution Chemistry. *Journal of Colloid and Interface Science* 233, 38–49. <https://doi.org/10.1006/jcis.2000.7227>
- Choppin, G.R., Wong, P.J., 1998. The Chemistry of Actinide Behavior in Marine Systems. *Aquatic Geochemistry* 4, 77–101. <https://doi.org/10.1023/A:1009679303073>
- Claudio Néstor Ferrarello, Bayón, M.M., de la Campa, R.F., Sanz-Medel, A., 2000a. Multi-elemental speciation studies of trace elements associated with metallothionein-like proteins in mussels by liquid chromatography with inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometric detection. *J. Anal. At. Spectrom.* 15, 1558–1563. <https://doi.org/10.1039/B005080F>
- Claudio Néstor Ferrarello, de la Campa, M. del R.F., Muñiz, C.S., Sanz-Medel, A., 2000b. Metal distribution patterns in the mussel *Mytilus edulis* cytosols using size-exclusion chromatography and double focusing ICP-MS detection. *Analyst* 125, 2223–2229. <https://doi.org/10.1039/b008181g>
- Cobalt Institute: Pioneering Ethical Cobalt Production, 2021. URL <https://www.cobaltinstitute.org/> (accessed 10.12.23).
- Collins, R.N., Kinsela, A.S., 2010. The aqueous phase speciation and chemistry of cobalt in terrestrial environments. *Chemosphere* 79, 763–771. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.03.003>
- Cooley, null, Klaverkamp, null, 2000. Accumulation and distribution of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquat Toxicol* 48, 477–494. [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(99\)00058-2](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(99)00058-2)
- Coombs, T.L., Keller, P.J., 1981. *Mytilus* byssal threads as an environmental marker for metals. *Aquatic Toxicology* 1, 291–300. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(81\)90023-0](https://doi.org/10.1016/0166-445X(81)90023-0)
- Ćosović, B., Degobbis, D., Bilinski, H., Branica, M., 1982. Inorganic cobalt species in seawater. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 46, 151–158. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(82\)90242-3](https://doi.org/10.1016/0016-7037(82)90242-3)
- Croft, M.T., Lawrence, A.D., Raux-Deery, E., Warren, M.J., Smith, A.G., 2005. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature* 438, 90–93. <https://doi.org/10.1038/nature04056>
- Cuculić, V., Cukrov, N., Barišić, D., Mlakar, M., 2006. Uranium in sediments, mussels (*Mytilus* sp.) and seawater of the Krka river estuary. *Journal of Environmental Radioactivity* 85, 59–70. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2005.05.008>

## Références

- Culkin, F., Cox, R.A., 1966. Sodium, potassium, magnesium, calcium and strontium in sea water. *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts* 13, 789–804. [https://doi.org/10.1016/0011-7471\(76\)90905-0](https://doi.org/10.1016/0011-7471(76)90905-0)
- Da Ros, L., Bressan, M., Marin, M.G., 1985. Reproductive cycle of the mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) in Venice Lagoon (North Adriatic). *Bolletino di zoologia* 52, 223–229. <https://doi.org/10.1080/11250008509440522>
- Deidda, I., Russo, R., Bonaventura, R., Costa, C., Zito, F., Lampiasi, N., 2021. Neurotoxicity in Marine Invertebrates: An Update. *Biology* 10, 161. <https://doi.org/10.3390/biology10020161>
- Devès, G., Daudin, L., Bessy, A., Buga, F., Ghanty, J., Naar, A., Sommar, V., Michelet, C., Sez nec, H., Barberet, P., 2015. An ImageJ plugin for ion beam imaging and data processing at AIFIRA facility. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, Proceedings of the 14th International Conference on Nuclear Microprobe Technology & Applications 2014* 348, 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2015.01.024>
- Dungan, K., Butler, G., Livens, F.R., Warren, L.M., 2017. Uranium from seawater – Infinite resource or improbable aspiration? *Progress in Nuclear Energy* 99, 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.pnucene.2017.04.016>
- Durbin, P.W., Kullgren, B., Ebbe, S.N., Xu, J., Raymond, K.N., 2000. CHELATING AGENTS FOR URANIUM(VI): 2. EFFICACY AND TOXICITY OF TETRADENTATE CATECHOLATE AND HYDROXYPYRIDINONATE LIGANDS IN MICE: *Health Physics* 78, 511–521. <https://doi.org/10.1097/00004032-200005000-00008>
- Durbin, P.W., Kullgren, B., Xu, J., Raymond, K.N., 1997. New Agents for in Vivo Chelation of Uranium(VI): Efficacy and Toxicity in Mice of Multidentate Catecholate and Hydroxypyridinonate Ligands. *Health Physics* 72, 865–879. <https://doi.org/10.1097/00004032-199706000-00006>
- Eggermont, M., Cornillie, P., Dierick, M., Adriaens, D., Nevejan, N., Bossier, P., Van den Broeck, W., Sorgeloos, P., Defoirdt, T., Declercq, A.M., 2020. The blue mussel inside: 3D visualization and description of the vascular-related anatomy of *Mytilus edulis* to unravel hemolymph extraction. *Sci Rep* 10, 6773. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62933-9>
- Ellwood, M.J., Van Den Berg, C.M.G., Boye, M., Veldhuis, M., De Jong, J.T.M., De Baar, H.J.W., Croot, P.L., Kattner, G., 2005. Organic complexation of cobalt across the Antarctic Polar Front in the Southern Ocean. *Mar. Freshwater Res.* 56, 1069. <https://doi.org/10.1071/MF05097>
- Fant, C., Hedlund, J., Höök, F., Berglin, M., Fridell, E., Elwing, H., 2010. Investigation of Adsorption and Cross-Linking of a Mussel Adhesive Protein Using Attenuated Total Internal Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR). *The Journal of Adhesion* 86, 25–38. <https://doi.org/10.1080/00218460903417768>

## Références

- Farrington, John W., Tripp, Bruce W., 1995. International Mussel Watch Project : initial implementation phase, final report (No. 95). NOAA technical memorandum NOS ORCA.
- Fergusson, J.E., 1991. The heavy elements: chemistry, environmental impact and health effects, Repr. (with corr.). ed. Pergamon Pr, Oxford.
- Fernández-Reiriz, M.J., Irisarri, J., Labarta, U., 2015. Feeding behaviour and differential absorption of nutrients in mussel *Mytilus galloprovincialis*: Responses to three microalgae diets. *Aquaculture* 446, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.04.025>
- Fisher, N.S., Teyssié, J.-L., Fowler, S.W., Wang, W.-X., 1996. Accumulation and Retention of Metals in Mussels from Food and Water: A Comparison under Field and Laboratory Conditions. *Environ. Sci. Technol.* 30, 3232–3242. <https://doi.org/10.1021/es960009u>
- Fong, P.P., Kyojuka, K., Duncan, J., Rynkowski, S., Mekasha, D., Ram, J.L., 1995. The Effect of Salinity and Temperature on Spawning and Fertilization in the Zebra Mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas) from North America. *The Biological Bulletin* 189, 320–329. <https://doi.org/10.2307/1542149>
- Fournier, E., Tran, D., Denison, F., Massabuau, J.-C., Garnier-Laplace, J., 2004. Valve closure response to uranium exposure for a freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*): Quantification of the influence of pH. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1108–1114. <https://doi.org/10.1897/02-604>
- Fowler, W.A., 1967. Nuclear astrophysics, *Memoirs of the American Philosophical Society*. American Philosophical Soc, Philadelphia.
- Franceschini-Vicentini, I.B., Ribeiro, K., Papa, L.P., Marques Junior, J., Vicentini, C.A., Valenti, P.M.C.M., 2009. Histoarchitectural Features of the Hepatopancreas of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Int. J. Morphol.* 27. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022009000100022>
- Frelon, S., Mounicou, S., Lobinski, R., Gilbin, R., Simon, O., 2013. Subcellular fractionation and chemical speciation of uranium to elucidate its fate in gills and hepatopancreas of crayfish *Procambarus clarkii*. *Chemosphere* 91, 481–490. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.008>
- Furness, R.W., Rainbow, P.S. (Eds.), 1990. Heavy metals in the marine environment. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Gao, P., Liao, Z., Wang, X., Bao, L., Fan, M., Li, X., Wu, C., Xia, S., 2015. Layer-by-Layer Proteomic Analysis of *Mytilus galloprovincialis* Shell. *PLoS ONE* 10, e0133913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133913>
- Gaudaire, J.-M., 1999. Etude de la spéciation du <sup>60</sup>Co dans les effluents de l'usine de retraitement de combustibles irradiés de la Hague et de son devenir après rejet dans les eaux de la Manche (These de doctorat). Paris 11.

## Références

- George, S., Pirie, B., Coombs, T., 1975. Absorption, accumulation and excretion of iron-protein complexes by *Mytilus edulis* (L.). *Publ Natl Res Coun Can* 2, 887–900.
- George, S.G., Pirie, B.J.S., 1980. Metabolism of zinc in the mussel, *Mytilus edulis* (L.): a combined ultrastructural and biochemical study. *J. Mar. Biol. Ass.* 60, 575–590. <https://doi.org/10.1017/S0025315400040273>
- Geret, F., Cosson, R.P., 2000. Utilisation des métallothionéines comme biomarqueur de la contamination métallique: variabilité entre sites et organes chez l'huître *Crassostrea gigas*. *Oceanologica Acta* 23, 261–271. [https://doi.org/10.1016/S0399-1784\(00\)00118-3](https://doi.org/10.1016/S0399-1784(00)00118-3)
- Gibson, R., 1979. The decapod hepatopancreas. *Oceanogr. Mar. Biol. Ass. Rev.* 17, 289–294.
- Glasby, G.P., Schulz, H.D., 1999. Eh ph Diagrams for mn, fe, co, ni, cu and as Under Seawater Conditions: Application of two new Types of eh ph Diagrams to the Study of Specific Problems in Marine Geochemistry. *Aquatic Geochemistry* 5, 227–248. <https://doi.org/10.1023/A:1009663322718>
- Global Invasive Species Database, 2023. GISD [WWW Document]. URL [http://www.iucngisd.org/gisd/100\\_worst](http://www.iucngisd.org/gisd/100_worst) (accessed 10.11.23).
- Goldberg, E.D., 1975. The mussel watch — A first step in global marine monitoring. *Marine Pollution Bulletin* 6, 111. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(75\)90271-4](https://doi.org/10.1016/0025-326X(75)90271-4)
- Goldstein, B.D., M. Eisenbud, T.F. Gesell, S.A. Ibrahim, D.C. Kocher, E.R. Landa, A.S. Paschao, 1999. Evaluation of Guidelines for Exposures to Technologically Enhanced Naturally Occurring Radioactive Materials. National Academies Press, Washington, D.C. <https://doi.org/10.17226/6360>
- Gomez, L., Marietta, M., Jackson, D., 1987. Compilation of selected marine radioecological data for the US Subseabed Program: Summaries of available radioecological concentration factors and biological half-lives (No. SAND-86-2674, 6529448, ON: DE87008890). <https://doi.org/10.2172/6529448>
- Gorden, A.E.V., Xu, J., Raymond, K.N., Durbin, P., 2003. Rational Design of Sequestering Agents for Plutonium and Other Actinides. *Chem. Rev.* 103, 4207–4282. <https://doi.org/10.1021/cr990114x>
- Gosling, E.M., 2003. Bivalve molluscs: biology, ecology and culture. Fishing News Books, Oxford.
- Hamilton, E.I., 1980. Concentration and Distribution of Uranium in *Mytilus edulis* and Associated Materials. *Marine Ecology Progress Series* 2, 61–73.
- Hammond, W., Griffiths, C.L., 2004. Influence of wave exposure on South African mussel beds and their associated infaunal communities. *Marine Biology* 144, 547–552. <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1210-9>

## Références

- Harrington, M.J., Jehle, F., Priemel, T., 2018. Mussel Byssus Structure-Function and Fabrication as Inspiration for Biotechnological Production of Advanced Materials. *Biotechnol. J.* 13, 1800133. <https://doi.org/10.1002/biot.201800133>
- Hédouin, L., Metian, M., Teyssié, J.-L., Fowler, S.W., Fichez, R., Warnau, M., 2006. Allometric relationships in the bioconcentration of heavy metals by the edible tropical clam *Gafrarium tumidum*. *Science of The Total Environment* 366, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.10.022>
- Helliwell, K.E., Wheeler, G.L., Leptos, K.C., Goldstein, R.E., Smith, A.G., 2011. Insights into the Evolution of Vitamin B12 Auxotrophy from Sequenced Algal Genomes. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2921–2933. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr124>
- Hemelraad, J., Herwig, H.J., 1988. Cadmium kinetics in freshwater clams. IV. Histochemical localization of cadmium in *Anodonta cygnea* and *Anodonta anatina*, exposed to cadmium chloride. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 17, 333–343. <https://doi.org/10.1007/BF01055171>
- Hinkle, P., Kinsella, P., Osterhoudt, K., 1987. Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels. *Journal of Biological Chemistry* 262, 16333–16337. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)49259-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)49259-9)
- Hodge, V.F., Koide, M., Goldberg, E.D., 1979. Particulate uranium, plutonium and polonium in the biogeochemistries of the coastal zone. *Nature* 277, 206–209. <https://doi.org/10.1038/277206a0>
- Holler, V., Gourgiotis, A., Legrand, A., Suhard, D., Cazala, C., Bouvier Capely, C., 2021. PATERSON la plateforme analytique de spectrométrie de masse de haute technologie de l'IRSN.
- Honda, R., Araujo, R., Horta, B., Val, A., Demasi, M., 2005. One-step purification of metallothionein extracted from two different sources. *Journal of Chromatography B* 820, 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.03.017>
- Hopkin, S.P., 1989. *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*, Pollution monitoring series. Elsevier Applied Science, London.
- IAEA, 2010. *Programmes and Systems for Source and Environmental Radiation Monitoring (Text)*, Programmes and Systems for Source and Environmental Radiation Monitoring. International Atomic Energy Agency.
- IAEA, 2005. *Worldwide Marine Radioactivity Studies (WOMARS): Radionuclide Levels in Oceans and Seas (Text)*, Worldwide Marine Radioactivity Studies (WOMARS): Radionuclide Levels in Oceans and Seas. International Atomic Energy Agency.
- IAEA (Ed.), 2004. *Sediment distribution coefficients and concentration factors for biota in the marine environment*, Technical reports series / International Atomic Energy Agency. International Atomic Energy Agency, Vienna.

## Références

- Irisarri, J., Fernández-Reiriz, M.-J., Labarta, U., 2015. Temporal and spatial variations in proximate composition and Condition Index of mussels *Mytilus galloprovincialis* cultured in suspension in a shellfish farm. *Aquaculture* 435, 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.041>
- Ishii, T., Ikuta, K., Otake, T., Hara, M., Ishikawa, M., Koyanagi, T., 1986. High accumulation of elements in the kidney of the marine bivalve *Cyclosunetta menstrualis*. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI* 52, 147–154. <https://doi.org/10.2331/suisan.52.147>
- Ivanković, D., Pavičić, J., Erk, M., Filipović-Marijić, V., Raspor, B., 2005. Evaluation of the *Mytilus galloprovincialis* Lam. digestive gland metallothionein as a biomarker in a long-term field study: Seasonal and spatial variability. *Marine Pollution Bulletin* 50, 1303–1313. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.04.039>
- Jacopin, C., Sawicki, M., Plancque, G., Doizi, D., Taran, F., Ansoborlo, E., Amekraz, B., Moulin, C., 2003. Investigation of the Interaction between 1-Hydroxyethane-1,1'-diphosphonic Acid (HEDP) and Uranium(VI). *Inorg. Chem.* 42, 5015–5022. <https://doi.org/10.1021/ic0343509>
- Jakimska, A., Konieczka, P., Skóra, K., Namieśnik, J., 2011. Bioaccumulation of Metals in Tissues of Marine Animals, Part I: the Role and Impact of Heavy Metals on Organisms 50, 1117–1125.
- Jefferies, D.F., Preston, A., Steele, A.K., 1973. Distribution of caesium-137 in British coastal waters. *Marine Pollution Bulletin* 4, 118–122. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(73\)90185-9](https://doi.org/10.1016/0025-326X(73)90185-9)
- Juzeniene, A., Nizauskaite, Z., 2013. Photodegradation of cobalamins in aqueous solutions and in human blood. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 122, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.03.001>
- Kägi, J.H.R., Kojima, Y., 1987. Chemistry and Biochemistry of Metallothionein, in: Kägi, Jeremias H. R., Kojima, Yutaka (Eds.), *Metallothionein II, Experientia Supplementum*. Birkhäuser Basel, Basel, pp. 25–61. [https://doi.org/10.1007/978-3-0348-6784-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-0348-6784-9_3)
- Kannan, S., Barnes, C.L., Duval, P.B., 2005. Synthesis and Structural Characterization of a Uranyl(VI) Complex Possessing Unsupported Unidentate Thiolate Ligands. *Inorg. Chem.* 44, 9137–9139. <https://doi.org/10.1021/ic0517117>
- Karbowiak, M., Hubert, S., Fourest, B., Moulin, C., 2004. Complex formation of uranium(VI) in periodate solutions. *Radiochimica Acta* 92, 489–494. <https://doi.org/10.1524/ract.92.8.489.39277>
- Kasiotis, K.M., Emmanouil, C., 2015. Advanced PAH pollution monitoring by bivalves. *Environ Chem Lett* 13, 395–411. <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0525-3>
- Kazamia, E., Czesnick, H., Nguyen, T.T.V., Croft, M.T., Sherwood, E., Sasso, S., Hodson, S.J., Warren, M.J., Smith, A.G., 2012. Mutualistic interactions between vitamin B12-

## Références

- dependent algae and heterotrophic bacteria exhibit regulation. *Environmental Microbiology* 14, 1466–1476. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02733.x>
- Kimbrough, K. L., Lauenstein, G. G., Christensen, J. D., Apeti, D. A., 2008. An assessment of two decades of contaminant monitoring in the Nation's Coastal Zone. NOAA/National Centers for Coastal Ocean Science.
- Košler, J., Sylvester, P.J., 2003. 9. Present Trends and the Future of Zircon in Geochronology: Laser Ablation ICPMS, in: Hanchar, J.M., Hoskin, P.W.O. (Eds.), *Zircon*. De Gruyter, pp. 243–276. <https://doi.org/10.1515/9781501509322-012>
- Kryshev, I.I., 1995. Radioactive contamination of aquatic ecosystems following the Chernobyl accident. *Journal of Environmental Radioactivity* 27, 207–219. [https://doi.org/10.1016/0265-931X\(94\)00042-U](https://doi.org/10.1016/0265-931X(94)00042-U)
- Kumar, S., Creff, G., Hennig, C., Rossberg, A., Steudtner, R., Raff, J., Vidaud, C., Oberhaensli, F.R., Bottein, M.D., Den Auwer, C., 2019. How Do Actinyls Interact with Hyperphosphorylated Yolk Protein Phosvitin? *Chemistry A European J* 25, 12332–12341. <https://doi.org/10.1002/chem.201902015>
- Laclavetine, K., 2015. Treatment of data obtained with CXRF setups using PyMCA software. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3579.2245>
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lambert, I.B., Heier, K.S., 1968. Estimates of the crustal abundances of thorium, uranium and potassium. *Chemical Geology* 3, 233–238. [https://doi.org/10.1016/0009-2541\(68\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0009-2541(68)90030-2)
- Langston, W.J., Bebianno, M.J., 1998. *Metal metabolism in aquatic environments*. Springer Science & Business Media.
- Le Guen, B., Ansoborlo, E., 2006. Le cobalt et ses isotopes. *EMC - Pathologie professionnelle et de l'environnement* 1, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S1155-1925\(05\)39305-0](https://doi.org/10.1016/S1155-1925(05)39305-0)
- Leclercq, N., Berthault, J., Langlois, F., Le, S., Poirier, S., Bisou, J., Blache, F., Medjoubi, K., Mocuta, C., 2015. Flyscan: a fast and multi-technique data acquisition platform for the SOLEIL beamlines. Melbourne, Australia.
- Lee, H., Scherer, N.F., Messersmith, P.B., 2006. Single-molecule mechanics of mussel adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 12999–13003. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605552103>
- Léo Démoulin, 2014. Cartographie de la contamination chimique des sédiments de la Rade de Toulon (No. RST.ODE/LER-PAC/14-10).

## Références

- Lim, M.P., Mohamed, C.A.R., 2019. Radioactivity of  $^{210}\text{Po}$  in Green Mussels (*Perna viridis*) at the West Coast of Johore Straits, Malaysia. *Malaysian Journal of Analytical Sciences* 23, 980–990.
- L'Institut Agro Rennes-Angers : Formation, Recherche, Valorisation en agronomie, agroalimentaire, horticulture et paysage [WWW Document], n.d. URL <https://www.institut-agro-rennes-angers.fr/> (accessed 10.30.23).
- LLorens, I., Solari, P.L., Sitaud, B., Bes, R., Cammelli, S., Hermange, H., Othmane, G., Safi, S., Moisy, P., Wahu, S., Bresson, C., Schlegel, M.L., Menut, D., Bechade, J.-L., Martin, P., Hazemann, J.-L., Proux, O., Auwer, C.D., 2014. X-ray absorption spectroscopy investigations on radioactive matter using MARS beamline at SOLEIL synchrotron: *Radiochimica Acta* 102, 957–972. <https://doi.org/10.1515/ract-2013-2241>
- Lourenço, V., 2007. Etude de la spéciation des radionucléides avec les molécules d'intérêt biologique par approche spectrométrique (These de doctorat). Paris 11.
- Lucu, ?, Obersnel, V., 1996. Cadmium influx across isolated *Carcinus* gill epithelium interaction of lanthanum and calcium with cadmium influxes. *J Comp Physiol B* 166, 184–189. <https://doi.org/10.1007/BF00263981>
- Luoma, S.N., 1983. Bioavailability of trace metals to aquatic organisms — A review. *Science of The Total Environment* 28, 1–22. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(83\)80004-7](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(83)80004-7)
- Luoma, S.N., Rainbow, P.S., 2005. Why Is Metal Bioaccumulation So Variable? *Biodynamics as a Unifying Concept. Environ. Sci. Technol.* 39, 1921–1931. <https://doi.org/10.1021/es048947e>
- Lutz, R.A., 1976. Annual growth patterns in the inner shell layer of *Mytilus edulis* L. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 56, 723–731. <https://doi.org/10.1017/S0025315400020750>
- Mackay, E.A., Overnell, J., Dunbar, B., Davidson, I., Hunziker, P.E., Kagi, J.H.R., Fothergill, J.E., 1993. Complete amino acid sequences of five dimeric and four monomeric forms of metallothionein from the edible mussel *Mytilus edulis*. *Eur J Biochem* 218, 183–194. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18364.x>
- MAFF, 2015. (Minist. Agric. For. Fish.) Results of the monitoring on radioactivity level in fisheries products [WWW Document]. URL <https://www.jfa.maff.go.jp/e/inspection/index.html> (accessed 10.11.23).
- Maire, O., Amouroux, J.-M., Duchêne, J.-C., Grémare, A., 2007. Relationship between filtration activity and food availability in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Biol* 152, 1293–1307. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0778-x>
- Maloubier, M., Solari, P.L., Moisy, P., Monfort, M., Den Auwer, C., Moulin, C., 2015. XAS and TRLIF spectroscopy of uranium and neptunium in seawater. *Dalton Trans.* 44, 5417–5427. <https://doi.org/10.1039/C4DT03547J>

## Références

- Marcet, A., 1819. On the Specific Gravity, and Temperature of Sea Waters, in Different Parts of the Ocean, and in Particular Seas; With Some Account of Their Saline Contents. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 109, 161–208.
- Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Giamberini, L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microscopy Research and Technique* 56, 358–392. <https://doi.org/10.1002/jemt.10040>
- MARIS - Marine Radioactivity Information System [WWW Document], n.d. URL <https://maris.iaea.org/home> (accessed 10.11.23).
- Markich, S.J., 2003. Influence of body size and gender on valve movement responses of a freshwater bivalve to uranium. *Environmental Toxicology* 18, 126–136. <https://doi.org/10.1002/tox.10109>
- Markich, S.J., 2002. Uranium Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems: An Overview. *The Scientific World JOURNAL* 2, 707–729. <https://doi.org/10.1100/tsw.2002.130>
- Markich, S.J., Brown, P.L., 2018. Actinide Speciation and Bioavailability in Fresh and Marine Waters, in: Scott, R.A. (Ed.), *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 1–33. <https://doi.org/10.1002/9781119951438.eibc2559>
- Mauchline, J., 1980. Chapter 16 Artificial Radioisotopes in the Marginal Seas of North-Western Europe, in: *Elsevier Oceanography Series*. Elsevier, pp. 517–542. [https://doi.org/10.1016/S0422-9894\(08\)71361-8](https://doi.org/10.1016/S0422-9894(08)71361-8)
- McCartney, M.A., 2021. Structure, function and parallel evolution of the bivalve byssus, with insights from proteomes and the zebra mussel genome. *Phil. Trans. R. Soc. B* 376, 20200155. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0155>
- McKinley, I.G., Baxter, M.S., Jack, W., 1981. A simple model of radiocaesium transport from Windscale to the Clyde Sea area. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 13, 59–67. [https://doi.org/10.1016/S0302-3524\(81\)80105-3](https://doi.org/10.1016/S0302-3524(81)80105-3)
- Ménager, M.-T., Garnier-Laplace, J., Goyffon, M., 2009. *Toxicologie nucléaire environnementale et humaine*. Éd. Tec & doc Éd. médicales internationales, Paris Cachan.
- Mesko, M., Xiang, L., Bohle, S., Hwang, D.S., Zeng, H., Harrington, M.J., 2021. Catechol-Vanadium Binding Enhances Cross-Linking and Mechanics of a Mussel Byssus Coating Protein. *Chem. Mater.* 33, 6530–6540. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.1c02063>
- METI, 2023. Mid-and-Long-Term Roadmap towards the Decommissioning of TEPCO's Fukushima Daiichi Nuclear Power Station Units 1-4 / METI Ministry of Economy, Trade and Industry [WWW Document]. URL <https://www.meti.go.jp/english/earthquake/nuclear/decommissioning/index.html> (accessed 4.4.23).

## Références

- Metian, M., Warnau, M., Teyssié, J.-L., Bustamante, P., 2011. Characterization of <sup>241</sup>Am and <sup>134</sup>Cs bioaccumulation in the king scallop *Pecten maximus*: investigation via three exposure pathways. *Journal of Environmental Radioactivity* 102, 543–550. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2011.02.008>
- Miramand, P., Bentley, D., 1992. Heavy metal concentrations in two biological indicators (*Patella vulgata* and *Fucus serratus*) collected near the French nuclear fuel reprocessing plant of La Hague. *Science of The Total Environment* 111, 135–149. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(92\)90352-S](https://doi.org/10.1016/0048-9697(92)90352-S)
- Miramand, P., Germain, P., 1986. Données expérimentales et in situ (Goury, Nord Cotentin, France) sur la concentration et la distribution de l’Americium (<sup>241</sup>Am) dans les tissus de la coquille St-Jacques, *Pecten maximus* (L.). *Haliotis* (Paris) 15, 345–353.
- Moll, H., Geipel, G., Brendler, V., Bernhard, G., Nitsche, H., 1998. Interaction of uranium(VI) with silicic acid in aqueous solutions studied by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS). *Journal of Alloys and Compounds* 271–273, 765–768. [https://doi.org/10.1016/S0925-8388\(98\)00203-5](https://doi.org/10.1016/S0925-8388(98)00203-5)
- Montroni, D., Giusti, G., Simoni, A., Cau, G., Ciavatta, C., Marzadori, C., Falini, G., 2020. Metal ion removal using waste byssus from aquaculture. *Sci Rep* 10, 22222. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79253-7>
- Morris, K., Raiswell, R., 2002. Chapter 4 Biogeochemical cycles and remobilisation of the actinide elements, in: Keith-Roach, M.J., Livens, F.R. (Eds.), *Radioactivity in the Environment, Interactions of Microorganisms with Radionuclides*. Elsevier, pp. 101–141. [https://doi.org/10.1016/S1569-4860\(02\)80033-X](https://doi.org/10.1016/S1569-4860(02)80033-X)
- Mossand, G., Lelong, E., Xing, C., Ndebulia Watchou, F., Leydier, A., Arrachart, G., Pellet-Rostaing, S., 2023. Bis-Catecholamide-Based Materials for Uranium Extraction. *ChemPlusChem* 88, e202200412. <https://doi.org/10.1002/cplu.202200412>
- Moulin, C., Decambox, P., Mauchien, P., 1997. State of the art in time-resolved laser-induced fluorescence for actinides analysis: Applications and trends. *J Radioanal Nucl Chem* 226, 135–138. <https://doi.org/10.1007/BF02063637>
- Moulin, C., Laszak, I., Moulin, V., Tondre, C., 1998. Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence as a Unique Tool for Low-Level Uranium Speciation. *Appl Spectrosc* 52, 528–535. <https://doi.org/10.1366/0003702981944076>
- Moulin, V., Ansoborlo, E., Bion, L., Doizi, D., Moulin, C., Cote, G., Madic, C., J. Van Der Lee, 2005. Speciation needs in relation with environmental and biological purposes. *Radioprotection* 40, S11–S18. <https://doi.org/10.1051/radiopro:2005s1-003>
- Mubiana, V.K., Blust, R., 2007. Effects of temperature on scope for growth and accumulation of Cd, Co, Cu and Pb by the marine bivalve *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research* 63, 219–235. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2006.08.005>

## Références

- Muggioli, G., Simon, M., Lampe, N., Devès, G., Barberet, P., Michelet, C., Delville, M.-H., Seznec, H., 2018. In Situ Detection and Single Cell Quantification of Metal Oxide Nanoparticles Using Nuclear Microprobe Analysis. *JoVE* 55041. <https://doi.org/10.3791/55041>
- Najimi, S., Bouhaimi, A., Daubèze, M., Zekhnini, A., Pellerin, J., Narbonne, J.-F., Moukrim, A., 1997. Use of Acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a Biomarker of Pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco). *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 58, 901–8. <https://doi.org/10.1007/s001289900419>
- Nelson, D.A., Miller, J.E., Calabrese, A., 1988. Effect of heavy metals on bay scallops, surf clams, and blue mussels in acute and long-term exposures. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 17, 595–600. <https://doi.org/10.1007/BF01055828>
- Nicholson, S., Szefer, P., 2003. Accumulation of metals in the soft tissues, byssus and shell of the mytilid mussel *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) from polluted and uncontaminated locations in Hong Kong coastal waters. *Marine Pollution Bulletin* 46, 1040–1043. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(03\)00152-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00152-8)
- Nishiwaki, Y., Kimura, Y., Honda, Y., Katsurayama, K., 1981. Possible formation of organic cobalt complexes with amino acids and uptake by marine bivalve, in: *Impacts of Radionuclide Releases into the Marine Environment*.
- Nolan, C., Fowler, S., Teyssie, J.-L., 1992. Cobalt speciation and bioavailability in marine organisms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 88, 105–116. <https://doi.org/10.3354/meps088105>
- Nordberg, G., 2007. *Handbook on the toxicology of metals*, 3rd ed. ed. Academic Press, Amsterdam Boston.
- Olker, J.H., Elonen, C.M., Pilli, A., Anderson, A., Kinziger, B., Erickson, S., Skopinski, M., Pomplun, A., LaLone, C.A., Russom, C.L., Hoff, D., 2022. The ECOTOXicology Knowledgebase: A Curated Database of Ecologically Relevant Toxicity Tests to Support Environmental Research and Risk Assessment. *Enviro Toxic and Chemistry* 41, 1520–1539. <https://doi.org/10.1002/etc.5324>
- OSPAR CEMP Guidelines for Monitoring Contaminants in Biota, Agreement 1999-02 [WWW Document], 2018. . OSPAR Commission. URL <https://www.ospar.org/convention/agreements> (accessed 10.11.23).
- Pagano, M., Porcino, C., Briglia, M., Fiorino, E., Vazzana, M., Silvestro, S., Faggio, C., 2017. The Influence of Exposure of Cadmium Chloride and Zinc Chloride on Haemolymph and Digestive Gland Cells from *Mytilus galloprovincialis*. *Int J Environ Res* 11, 207–216. <https://doi.org/10.1007/s41742-017-0020-8>
- Palmiter, R.D., 1994. Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 1219–1223. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.4.1219>

## Références

- Pearson, R.G., 1997. Chemical Hardness, 1st ed. Wiley. <https://doi.org/10.1002/3527606173>
- Pearson, R.G., 1963. Hard and Soft Acids and Bases. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 3533–3539. <https://doi.org/10.1021/ja00905a001>
- Pentreath, R.J., 1973. The accumulation from water of  $^{65}\text{Zn}$ ,  $^{54}\text{Mn}$ ,  $^{58}\text{Co}$  and  $^{59}\text{Fe}$  by the mussel, *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Ass.* 53, 127–143. <https://doi.org/10.1017/S002531540005668X>
- Phelps, H.L., 1989. Clam burrowing bioassay for estuarine sediment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 838–845. <https://doi.org/10.1007/BF01702053>
- Pible, O., Guilbaud, P., Pellequer, J.-L., Vidaud, C., Quéméneur, E., 2006. Structural insights into protein–uranyl interaction: towards an in silico detection method. *Biochimie, Facets of Environmental Nuclear Toxicology* 88, 1631–1638. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.05.015>
- Pillet, M., Evensen, K.G., Marengo, M., Lejeune, P., Poynton, H.C., Thomas, H., 2022. First insight into the development of a new transcriptomic tool in French Corsica harbors. *Marine Pollution Bulletin* 184, 114173. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.114173>
- Pilson, M.E.Q., 2012. An Introduction to the Chemistry of the Sea, 2nd ed. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139047203>
- Priemel, T., Palia, R., Babych, M., Thibodeaux, C.J., Bourgault, S., Harrington, M.J., 2020. Compartmentalized processing of catechols during mussel byssus fabrication determines the destiny of DOPA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117, 7613–7621. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919712117>
- Qian, J., Xue, H.B., Sigg, L., Albrecht, A., 1998. Complexation of Cobalt by Natural Ligands in Freshwater. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2043–2050. <https://doi.org/10.1021/es971018l>
- Qin, X.-X., Coyne, K.J., Waite, J.H., 1997. Tough Tendons. *Journal of Biological Chemistry* 272, 32623–32627. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.51.32623>
- Radioactive Contamination of the Marine Environment, 1973. , Proceedings Series. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Vienna.
- Rainbow, P. S, 1988. The significance of trace metal concentrations in decapods. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 59, 291–313.
- Rainbow, P.S., 1995. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin* 31, 183–192. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(95\)00116-5](https://doi.org/10.1016/0025-326X(95)00116-5)

## Références

- Rainbow, P.S., Luoma, S.N., 2011. Metal toxicity, uptake and bioaccumulation in aquatic invertebrates—Modelling zinc in crustaceans. *Aquatic Toxicology* 105, 455–465. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.08.001>
- Rainglet, F., 1998. Biomarqueurs spécifiques de pollution: évaluation de l'exposition et des effets précoces des déchets solides (ordures ménagères, mâchefers) à l'égard du mollusque bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (doctorat: écotoxicologie).
- Ravel, B., Newville, M., 2005. ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *J Synchrotron Rad* 12, 537–541. <https://doi.org/10.1107/S0909049505012719>
- Reeves, B., Beccia, M.R., Jeanson, A., Solari, P.L., Siberchicot, B., Berthomieu, C., Marcellin, D., Bremond, N., Kerdikoshvili, T., Michel, H., Passeron Mangialajo, L., Monfort, M., Moulin, C., Den Auwer, C., 2022. Accumulation and Speciation of Cobalt in *Paracentrotus lividus*. *Environ. Sci. Technol.* 56, 3462–3470. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c06702>
- Regoli, F., Frenzilli, G., Bocchetti, R., Annarumma, F., Scarcelli, V., Fattorini, D., Nigro, M., 2004. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Aquatic Toxicology* 68, 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.011>
- Regulation (EC) No 1907/2006, 2014. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC (Text with EEA relevance).
- Renaud P., 2010. Avis de l'IRSN sur la pertinence des analyses radiologiques environnementales pour la surveillance réglementaire effectuée par les exploitants d'installations nucléaires de base. (No. SESURE/10-08). IRSN/DEI.
- REPORT ON THE IMPLEMENTATION OF PARCOM 91/4 ON RADIOACTIVE DISCHARGES Submitted by FRANCE under application of the OSPAR Convention for the protection of the marine environment of the North East Atlantic (No. 503), 2010.
- Ribeiro, M.A., Lanznaster, M., Silva, M.M.P., Resende, J.A.L.C., Pinheiro, M.V.B., Krambrock, K., Stumpf, H.O., Pinheiro, C.B., 2013. Cobalt lawsonite complexes: searching for new valence tautomers. *Dalton Trans.* 42, 5462. <https://doi.org/10.1039/c3dt32968b>
- Riisgård, H.U., Pleissner, D., Lundgreen, K., Larsen, P.S., 2013. Growth of mussels *Mytilus edulis* at algal (*Rhodomonas salina*) concentrations below and above saturation levels for reduced filtration rate. *Marine Biology Research* 9, 1005–1017. <https://doi.org/10.1080/17451000.2012.742549>

## Références

- Ritterhoff, J., Zauke, G.-P., 1997. Trace metals in field samples of zooplankton from the Fram Strait and the Greenland Sea. *Science of The Total Environment* 199, 255–270. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(97\)05457-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(97)05457-0)
- Rivasi, M., 2000. Les conséquences des installations de stockage des déchets nucléaires sur la santé publique et l'environnement (No. 2257).
- Robinson, W.E., Ryan, D.K., 1988. Transport of cadmium and other metals in the blood of the bivalve mollusc *Mercenaria mercenaria*. *Mar. Biol.* 97, 101–109. <https://doi.org/10.1007/BF00391250>
- ROCCH [WWW Document], n.d. . Envlit. URL <https://envlit.ifremer.fr/Surveillance-du-littoral/Contaminants-chimiques/Contaminants-suivis> (accessed 10.17.23).
- Rocha, T.L., Gomes, T., Sousa, V.S., Mestre, N.C., Bebianno, M.J., 2015. Ecotoxicological impact of engineered nanomaterials in bivalve molluscs: An overview. *Marine Environmental Research, Particles in the Oceans: Implication for a safe marine environment* 111, 74–88. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.013>
- Rodriguez- cea, A., Lindearias, A., Fernandezdelacampa, M., Costamoreira, J., Sanzmedel, A., 2006. Metal speciation of metallothionein in white sea catfish, *Netuma barba*, and pearl cichlid, *Geophagus brasiliensis*, by orthogonal liquid chromatography coupled to ICP-MS detection. *Talanta* 69, 963–969. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.11.045>
- Roesijadi, G., Klerks, P.L., 1989. Kinetic analysis of cadmium binding to metallothionein and other intracellular ligands in oyster gills. *J. Exp. Zool.* 251, 1–12. <https://doi.org/10.1002/jez.1402510102>
- Roesijadi, G., Unger, M.E., 1993. Cadmium uptake in gills of the mollusc *Crassostrea virginica* and inhibition by calcium channel blockers. *Aquatic Toxicology* 24, 195–205. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(93\)90071-8](https://doi.org/10.1016/0166-445X(93)90071-8)
- Rogival, D., Van Campenhout, K., Infante, H.G., Hearn, R., Scheirs, J., Blust, R., 2007. Induction and metal speciation of metallothionein in wood mice (*Apodemus sylvaticus*) along a metal pollution gradient. *Enviro Toxic and Chemistry* 26, 506–514. <https://doi.org/10.1897/06-351R1.1>
- Roméo, M., Bennani, N., Gnassia-Barelli, M., Lafaurie, M., Girard, J.P., 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology* 48, 185–194. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00039-9](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00039-9)
- Rosioru, D.M., Oros, A., Lazar, L., 2016. ASSESSMENT OF THE HEAVY METALS CONTAMINATION IN BIVALVE *Mytilus galloprovincialis* USING ACCUMULATION FACTORS. *Journal of Environmental Protection and Ecology* 17, 874–884.
- Ross, K., Cooper, N., Bidwell, J.R., John Elder, 2002. Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and

## Références

- reference sites. *Marine Pollution Bulletin* 44, 671–679. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00333-2](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00333-2)
- Rouillon, G., Navarro, E., 2003. Differential utilization of species of phytoplankton by the mussel *Mytilus edulis*. *Acta Oecologica, Proceedings of the Plankton Symposium, Espinho, Portugal* 24, S299–S305. [https://doi.org/10.1016/S1146-609X\(03\)00029-8](https://doi.org/10.1016/S1146-609X(03)00029-8)
- Rulon, O., 1956. Effects of Cobaltous Chloride on Development in the Sand Dollar. *Physiological Zoology* 29, 51–63. <https://doi.org/10.1086/physzool.29.1.30152380>
- Safi, S., Creff, G., Jeanson, A., Qi, L., Basset, C., Roques, J., Solari, P.L., Simoni, E., Vidaud, C., Den Auwer, C., 2013. Osteopontin: A Uranium Phosphorylated Binding-Site Characterization. *Chem. Eur. J.* 19, 11261–11269. <https://doi.org/10.1002/chem.201300989>
- Saidov, D.M., Kosevich, I.A., 2019. Effect of Heavy Metals (Cu, Co, Cd) on the Early Development of *Mytilus edulis* (Mollusca; Bivalvia). *Russ J Ecol* 50, 58–64. <https://doi.org/10.1134/S1067413619010077>
- Saili, K.S., Cardwell, A.S., Stubblefield, W.A., 2021. Chronic Toxicity of Cobalt to Marine Organisms: Application of a Species Sensitivity Distribution Approach to Develop International Water Quality Standards. *Environmental Toxicology and Chemistry* 40, 1405–1418. <https://doi.org/10.1002/etc.4993>
- Saito, M.A., Moffett, J.W., 2002. Temporal and spatial variability of cobalt in the Atlantic Ocean. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66, 1943–1953. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(02\)00829-3](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(02)00829-3)
- Saito, M.A., Rocap, G., Moffett, J.W., 2005. Production of cobalt binding ligands in a *Synechococcus* feature at the Costa Rica upwelling dome. *Limnol. Oceanogr.* 50, 279–290. <https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.1.0279>
- Sano, M., 1988. XANES study at the Co-K absorption edge in a series of cobalt(III) complexes. *Inorg. Chem.* 27, 4249–4253. <https://doi.org/10.1021/ic00296a033>
- Scapolan, S., Ansoborlo, E., Moulin, C., Madic, C., 1998. Investigations by time-resolved laser-induced fluorescence and capillary electrophoresis of the uranyl–phosphate species: application to blood serum. *Journal of Alloys and Compounds* 271–273, 106–111. [https://doi.org/10.1016/S0925-8388\(98\)00035-8](https://doi.org/10.1016/S0925-8388(98)00035-8)
- Schrapers, P., Mebs, S., Goetzl, S., Hennig, S.E., Dau, H., Dobbek, H., Haumann, M., 2016. Axial Ligation and Redox Changes at the Cobalt Ion in Cobalamin Bound to Corrinoid Iron-Sulfur Protein (CoFeSP) or in Solution Characterized by XAS and DFT. *PLOS ONE* 11, e0158681. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158681>
- Segar, D.A., Collins, J.D., Riley, J.P., 1971. The Distribution of the Major and Some Minor Elements in Marine Animals Part II. Molluscs. *J. Mar. Biol. Ass.* 51, 131–136. <https://doi.org/10.1017/S0025315400006524>

## Références

- Sheppard, S.C., 2001. 3 Toxicants in the environment: bringing radioecology and ecotoxicology together, in: *Radioactive Pollutants*. EDP Sciences, pp. 63–74. <https://doi.org/10.1051/978-2-7598-0137-4.c005>
- Shimizu, M., Kajihara, T., Suyama, I., Hiyama, Y., 1971. Uptake of  $^{58}\text{Co}$  by Mussel, *Mytilus edulis*. *JRR* 12, 17–28. <https://doi.org/10.1269/jrr.12.17>
- Shuhaimi-Othman, M., Yakub, N., Ramle, N.-A., Abas, A., 2015. Comparative toxicity of eight metals on freshwater fish. *Toxicol Ind Health* 31, 773–782. <https://doi.org/10.1177/0748233712472519>
- Simkiss, K., Taylor, MG, 1989. Metal fluxes across the membranes of aquatic organisms 173–188.
- Simon, O., Floriani, M., Cavalie, I., Camilleri, V., Adam, C., Gilbin, R., Garnier-Laplace, J., 2011. Internal distribution of uranium and associated genotoxic damages in the chronically exposed bivalve *Corbicula fluminea*. *Journal of Environmental Radioactivity* 102, 766–773. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2011.04.004>
- Simon, O., Garnier-Laplace, J., 2004. Kinetic analysis of uranium accumulation in the bivalve *Corbicula fluminea*: effect of pH and direct exposure levels. *Aquatic Toxicology* 68, 95–108. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.002>
- Sitaud, B., Solari, P.L., Schlutig, S., Llorens, I., Hermange, H., 2012. Characterization of radioactive materials using the MARS beamline at the synchrotron SOLEIL. *Journal of Nuclear Materials, Microstructure Properties of Irradiated Materials* 425, 238–243. <https://doi.org/10.1016/j.jnucmat.2011.08.017>
- Smith, R.M., 1976. Inorganic complexes. Critical stability constants 4.
- Solari, P.L., Schlutig, S., Hermange, H., Sitaud, B., 2009. MARS, a new beamline for radioactive matter studies at SOLEIL. *J. Phys.: Conf. Ser.* 190, 012042. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/190/1/012042>
- Sridhar, A., Kannan, D., Kapoor, A., Prabhakar, S., 2022. Extraction and detection methods of microplastics in food and marine systems: A critical review. *Chemosphere* 286, 131653. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131653>
- Starck, M., Laporte, F.A., Oros, S., Sisommay, N., Gathu, V., Solari, P.L., Creff, G., Roques, J., Den Auwer, C., Lebrun, C., Delangle, P., 2017. Cyclic Phosphopeptides to Rationalize the Role of Phosphoamino Acids in Uranyl Binding to Biological Targets. *Chemistry A European J* 23, 5281–5290. <https://doi.org/10.1002/chem.201605481>
- Structure d'une ligne de lumière | Centre de rayonnement synchrotron français [WWW Document], n.d. URL <https://www.synchrotron-soleil.fr/fr/structure-dune-ligne-de-lumiere> (accessed 10.17.23).
- Szefer, P., Frelek, K., Szefer, K., Lee, Ch.-B., Kim, B.-S., Warzocha, J., Zdrojewska, I., Ciesielski, T., 2002. Distribution and relationships of trace metals in soft tissue, byssus

## Références

- and shells of *Mytilus edulis trossulus* from the southern Baltic. *Environmental Pollution* 120, 423–444. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00111-2](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00111-2)
- Szefer, P., Geldon, J., Ali, A.A., Osuna, F.P., Ruiz-Fernandes, A.C., Galvan, S.R.G., 1998. Distribution and association of trace metals in soft tissue and byssus of *Mytella strigata* and other benthic organisms from Mazatlan Harbour, Mangrove Lagoon of the northwest coast of Mexico. *Environment International* 24, 359–374. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(98\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(98)00014-2)
- Szefer, P., Ikuta, K., Frelek, K., Zdrojewska, I., Nabrzyski, M., 1999. Mercury and other trace metals (Ag, Cr, Co, and Ni) in soft tissue and byssus of *Mytilus edulis* from the east coast of Kyushu Island, Japan 8.
- Szigethy, G., Raymond, K.N., 2011. Hexadentate Terephthalamide(bis-hydroxypyridinone) Ligands for Uranyl Chelation: Structural and Thermodynamic Consequences of Ligand Variation. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 7942–7956. <https://doi.org/10.1021/ja201511u>
- Taga, M.E., Walker, G.C., 2008. Pseudo-B12 Joins the Cofactor Family. *J Bacteriol* 190, 1157–1159. <https://doi.org/10.1128/JB.01892-07>
- Tanzer, M.L., 1973. Cross-Linking of Collagen: Endogenous aldehydes in collagen react in several ways to form a variety of unique covalent cross-links. *Science* 180, 561–566. <https://doi.org/10.1126/science.180.4086.561>
- Taylor, S.W., Chase, D.B., Emptage, M.H., Nelson, M.J., Waite, J.H., 1996. Ferric Ion Complexes of a DOPA-Containing Adhesive Protein from *Mytilus edulis*. *Inorg. Chem.* 35, 7572–7577. <https://doi.org/10.1021/ic960514s>
- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J., 2012. Heavy Metals Toxicity and the Environment. *EXS* 101, 133–164. [https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6)
- TEPCO, 2016. TEPCO : Result of Radioactive Analysis around Fukushima Daiichi Nuclear Power Station [WWW Document]. URL <https://www.tepco.co.jp/en/nu/fukushima-np/f1/smp/index-e.html> (accessed 10.11.23).
- Tessier, C., Suhard, D., Simon, O., Floriani, M., Rebière, F., Jourdain, J.-R., 2009. Detection and analysis of the microdistribution of uranium in the gills of freshwater *Corbicula fluminea* by SIMS technique. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 267, 1931–1935. <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2009.03.096>
- Thébault, H., Rodriguez y Baena, A.M., Andral, B., Barisic, D., Albaladejo, J.B., Bologna, A.S., Boudjenoun, R., Delfanti, R., Egorov, V.N., El Khoukhi, T., Florou, H., Kniewald, G., Noureddine, A., Patrascu, V., Pham, M.K., Scarpato, A., Stokozov, N.A., Topcuoglu, S., Warnau, M., 2008. <sup>137</sup>Cs baseline levels in the Mediterranean and Black Sea: A cross-basin survey of the CIESM Mediterranean Mussel Watch programme. *Marine Pollution Bulletin*, 5th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology 57, 801–806. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.11.010>

## Références

- Tran, D., Massabuau, J.-C., Garnier-Laplace, J., 2004. Effect of carbon dioxide on uranium bioaccumulation in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 739–747. <https://doi.org/10.1897/03-75>
- Triebkorn, R., Köhler, H.-R., Honnen, W., Schramm, M., Adams, S.M., Müller, E.F., 1997. Induction of heat shock proteins, changes in liver ultrastructure, and alterations of fish behavior: are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field? *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 6, 57–73. <https://doi.org/10.1023/A:1008224301117>
- Ueda, T., Suzuki, Y., Nakamura, R., Nakahara, M., 1982. Accumulation of Co by several species of marine bivalves. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI* 48, 993–997. <https://doi.org/10.2331/suisan.48.993>
- UNEP (Ed.), 1999. *Manual on the biomarkers recommended for the Med Pol Biomonitoring Programme*. United Nations Environment Programme, Athens.
- UNSCEAR, U.N.S.C. on the E. of A., 2012. *Sources, Effects and Risks of Ionizing Radiation, United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR) 2012 Report: Report to the General Assembly, with Scientific Annexes A and B*. United Nations. <https://doi.org/10.18356/2ed43f39-en>
- Uppström, L.R., 1974. The boron/chlorinity ratio of deep-sea water from the Pacific Ocean. *Deep Sea Research A* 21, 161–162. [https://doi.org/10.1016/0011-7471\(74\)90074-6](https://doi.org/10.1016/0011-7471(74)90074-6)
- Urien, N., Caron, A., Lerquet, M., Couture, P., Campbell, P.G.C., 2020. Optimization of a subcellular metal fractionation method for fish liver: Homogenization, subcellular separation, and trial isolation of nuclear materials. *Limnol Oceanogr Methods* 18, 398–410. <https://doi.org/10.1002/lom3.10371>
- Vasák, M., Kägi, J.H., 1981. Metal thiolate clusters in cobalt(II)-metallothionein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 6709–6713.
- Verbost, P.M., Van Rooij, J., Flik, G., Lock, R.A.C., Bonga, S.E.W., 1989. The Movement of Cadmium Through Freshwater Trout Branchial Epithelium and its Interference with Calcium Transport. *Journal of Experimental Biology* 145, 185–197. <https://doi.org/10.1242/jeb.145.1.185>
- Viarengo, A., 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *CRC Crit Rev Aquat Sci* 1, 295.
- Viarengo, A., Nott, J.A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 104, 355–372. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(93\)90001-2](https://doi.org/10.1016/0742-8413(93)90001-2)
- Vintró, L.L., Smith, K.J., Lucey, J.A., Mitchell, P.I., 2000. The environmental impact of the Sellafield discharges.

## Références

- Waite, J.H., 1992. The Formation of Mussel Byssus: Anatomy of a Natural Manufacturing Process, in: Case, S.T. (Ed.), Structure, Cellular Synthesis and Assembly of Biopolymers, Results and Problems in Cell Differentiation. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 27–54. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-47207-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-540-47207-0_2)
- Wallace, W., Lee, B., Luoma, S., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 249, 183–197. <https://doi.org/10.3354/meps249183>
- Wallace, W., Lopez, G., 1997. Bioavailability of biologically sequestered cadmium and the implications of metal detoxification. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 147, 149–157. <https://doi.org/10.3354/meps147149>
- Wallace, W., Lopez, G., Levinton, J., 1998. Cadmium resistance in an oligochaete and its effect on cadmium trophic transfer to an omnivorous shrimp. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 172, 225–237. <https://doi.org/10.3354/meps172225>
- Wallace, W., Luoma, S., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 257, 125–137. <https://doi.org/10.3354/meps257125>
- Wallace, W.G., Brouwer, T.M.H., Brouwer, M., Lopez, G.R., 2000. Alterations in prey capture and induction of metallothioneins in grass shrimp fed cadmium-contaminated prey. *Environ Toxicol Chem* 19, 962–971. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190425>
- Wang, W., 2002. Interactions of trace metals and different marine food chains. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 243, 295–309. <https://doi.org/10.3354/meps243295>
- Wang, W., Fisher, N., Luoma, S., 1996. Kinetic determinations of trace element bioaccumulation in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 140, 91–113. <https://doi.org/10.3354/meps140091>
- Wang, W.-X., Fisher, N.S., 1997. Modeling Metal Bioavailability for Marine Mussels, in: Ware, G.W. (Ed.), Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Springer New York, New York, NY, pp. 39–65. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1958-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1958-3_2)
- Wang, X., Dai, X., Shi, C., Wan, J., Silver, M.A., Zhang, L., Chen, L., Yi, X., Chen, B., Zhang, D., Yang, K., Diwu, J., Wang, J., Xu, Y., Zhou, R., Chai, Z., Wang, S., 2019. A 3,2-Hydroxypyridinone-based Decorporation Agent that Removes Uranium from Bones In Vivo. *Nat Commun* 10, 2570. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10276-z>
- Warren, M.J., Raux, E., Schubert, H.L., Escalante-Semerena, J.C., 2002. The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B12). *Nat. Prod. Rep.* 19, 390–412. <https://doi.org/10.1039/B108967F>
- Webb, M., 1987. Toxicological Significance of Metallothionein, in: Kägi, J.H.R., Kojima, Y. (Eds.), Metallothionein II: Proceedings of the «Second International Meeting on Metallothionein and Other Low Molecular Weight Metalbinding Proteins», Zürich,

## Références

- August 21–24, 1985, *Experientia Supplementum*. Birkhäuser, Basel, pp. 109–134.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-0348-6784-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-0348-6784-9_6)
- Wells, M.L., Goldberg, E.D., 1993. Colloid aggregation in seawater. *Marine Chemistry* 41, 353–358. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(93\)90267-R](https://doi.org/10.1016/0304-4203(93)90267-R)
- Westre, T.E., Kennepohl, P., DeWitt, J.G., Hedman, B., Hodgson, K.O., Solomon, E.I., 1997. A Multiplet Analysis of Fe K-Edge  $1s \rightarrow 3d$  Pre-Edge Features of Iron Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 6297–6314. <https://doi.org/10.1021/ja964352a>
- Wrenn, M.E., Durbin, P.W., Howard, B., Lipsztein, J., Rundo, J., Still, E.T., Willis, D.L., 1985. Metabolism of Ingested U and Ra: *Health Physics* 48, 601–633. <https://doi.org/10.1097/00004032-198505000-00004>
- Zehr, B.D., Savin, T.J., Hall, R.E., 1989. A one-step, low background Coomassie staining procedure for polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 182, 157–159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90734-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90734-3)

# Annexes



## I. Méthode de Griess : Quantification des nitrites

Les nitrites sont quantifiés par la méthode de Griess qui permet de détecter les nitrites jusqu'à 1.0  $\mu\text{M}$ . Cette méthode se base sur la diazotization en présence de l'ion  $\text{NO}_2^-$  puis copulation avec une amine aromatique (N- (1-naphthyl)-ethylenediamine) (Figure 89). Dans une cuvette de 3 mL, 100  $\mu\text{L}$  du réactif de Griess, 300  $\mu\text{L}$  de l'échantillon et 2,6 mL d'eau distillée sont ajoutés. Le mélange est incubé pendant 30 min à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 548 nm, une calibration externe avec une solution standard de nitrite permet de déterminer la concentration des échantillons.

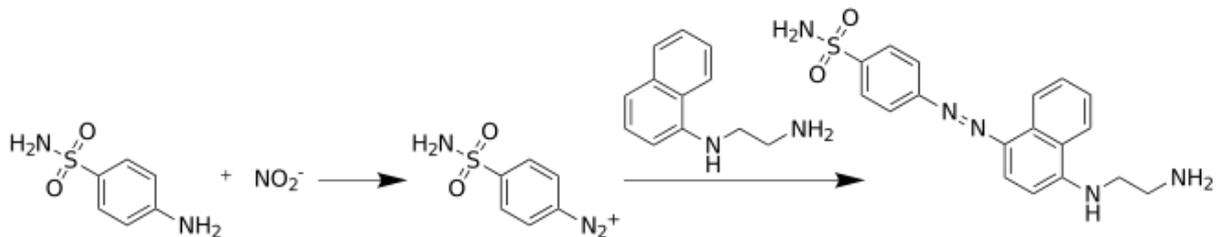


Figure 89. Réaction de Griess permettant le dosage du nitrite

Le contrôle des nitrites permet d'effectuer des changements d'eau dans le vivier et de suivre la qualité de l'eau de mer pendant les expériences. En bref, le taux de nitrites dans l'eau de mer est issu du cycle de l'azote constituant un cycle biogéochimique. La présence de substance organique va former de l'ammonium/ammonique qui est oxydé en nitrites par des bactéries puis des d'autres bactéries qui permettent de convertir les nitrites en nitrates. L'absence d'un nombre suffisant de bactéries permettant l'oxydation des nitrites provoque une augmentation de la concentration qui peut être nocive pour les individus. Bien que les nitrites ne soient pas toxiques pour les organismes marins, leurs présences en forte concentration perturbent l'équilibre des aquariums et provoquent l'apparition d'algue verte. Camargo 2005

## II. Table des principales énergies gamma observable

Tableau 27. Principaux éléments mesurables en spectrométrie gamma (source : Randolph S. Peterson).

Energie	Élément	Demi-vie	Energie	Élément	Demi-vie	Energie	Élément	Demi-vie	Energie	Élément	Demi-vie
35.5 (4.1)	Sb-125		277.4 (6.8)	Tl-208		723.3 (19)	Eu-154		723.3 (19)	Eu-154	
44.8 (3.1)	Pu-241		279.2 (77)	Hg-203		725.2 (4.5)	In-114 m		725.2 (4.5)	In-114 m	
46.5 (3.9)	Pb-210	22.3 an.	279.5 (25)	Se-75	46.61 j	727.2 (11.8)	Bi-212	60.6 m	727.2 (11.8)	Bi-212	60.6 m
56.3 (9)	Pu-241		284.3 (6)	I-131		778.9 (13)	Eu-152		778.9 (13)	Eu-152	
59.5 (3.5)	Am-241	433 an.	295.2 (19.2)	Pb-214		788.7 (32)	La-138	1.05 x 10 <sup>11</sup> an.	788.7 (32)	La-138	1.05 x 10 <sup>11</sup> an.
63.3 (3.8)	Th-234		300.1 (4)	Th-228		801.9 (8.7)	Cs-134	2.065 an.	801.9 (8.7)	Cs-134	2.065 an.
67.8 (4.2)	Ta-182		300.2 (16)	Ga-67		810.8 (99)	Co-58	70.88 j	810.8 (99)	Co-58	70.88 j
69.7 (2.6)	Gd-153		302.8 (19)	Ba-133		818.7 (15)	In-116	54.2 m	818.7 (15)	In-116	54.2 m
79.1 (7.1)	Ag-108m		308.9 (93)	Lu-176	3.6 x 10 <sup>10</sup> an.	834.8 (100)	Mn-54	312.2 j	834.8 (100)	Mn-54	312.2 j
80.1 (2)	Ce-144		320.1 (9.8)	Cr-51		860.4 (12.5)	Tl-208		860.4 (12.5)	Tl-208	
81.0 (3.3)	Ba-133		338.3 (11.4)	Ac-228		863.9 (1.8)	Co-58		863.9 (1.8)	Co-58	
84.4 (1.2)	Th-228	1.913 an.	344.3 (27)	Eu-152		873.2 (12)	Eu-154		873.2 (12)	Eu-154	
86.5 (3.1)	Eu-155	4.71 an.	351.1 (12.9)	Bi-211	2.14 m	889.3 (100)	Sc-46		889.3 (100)	Sc-46	
88.0 (3.7)	Cd-109	462.0 j	352.0 (37.2)	Pb-214	26.8 m	898.0 (93)	Y-88		898.0 (93)	Y-88	
88.4 (1.3)	La-138		356.0 (62)	Ba-133	8.04 j	911.1 (27.7)	Ac-228	6.15 h	911.1 (27.7)	Ac-228	6.15 h
92.6 (5.4)	Th-234	24.1 j	364.5 (81)	I-131		964.0 (15)	Eu-152		964.0 (15)	Eu-152	
93.3 (3.8)	Ga-67	3.260 j	383.9 (8.7)	Ba-133	1.658 hr	969.1 (16.6)	Ac-228		969.1 (16.6)	Ac-228	
93.4 (3.5)	Ac-228		391.7 (65)	In-113m		996.3 (11)	Eu-154		996.3 (11)	Eu-154	
97.4 (3.1)	Gd-153		393.5 (4.5)	Ga-67		1004.8 (18)	Eu-154		1004.8 (18)	Eu-154	
98.9 (1.1)	Au-195	241.6 j	400.7 (12)	Se-75		1063.6 (75)	Bi-207		1063.6 (75)	Bi-207	
100.1 (1.4)	Ta-182	186.12 j	401.8 (6.5)	Rn-219		1085.8 (10)	Eu-152		1085.8 (10)	Eu-152	
103.2 (2.2)	Gd-153		416.9 (32)	In-116		1097.3 (54)	In-116		1097.3 (54)	In-116	
103.7 (3.0)	Pu-241		427.9 (30)	Sb-125	2.758 an.	1099.2 (56)	Fe-59	44.51 j	1099.2 (56)	Fe-59	44.51 j
105.3 (2.0)	Eu-155		433.9 (90)	Ag-108m		1112.0 (13)	Eu-152		1112.0 (13)	Eu-152	
121.1 (1.7)	Se-75		442.9 (16)	I-128	25 m	1120.3 (15.1)	Bi-214		1120.3 (15.1)	Bi-214	
121.8 (2.8)	Eu-152		463.4 (10)	Sb-125	53.3 j	1120.5 (100)	Sc-46		1120.5 (100)	Sc-46	
122.1 (8.6)	Co-57	271.8 j	477.6 (10)	Be-7		1121.3 (35)	Ta-182		1121.3 (35)	Ta-182	
123.1 (4.0)	Eu-154	8.59 an.	510.8 (21.6)	Tl-208		1173.2 (100)	Co-60		1173.2 (100)	Co-60	
129.8 (0.8)	Au-195		511.0 (180)	Na-22		1189.1 (16)	Ta-182	114.43 j	1189.1 (16)	Ta-182	114.43 j
133.5 (1.1)	Ce-144	284.6 d	511.0 (30)	Co-58		1221.4 (27)	Ta-182		1221.4 (27)	Ta-182	
136 (5.7)	Se-75		511.0 (2.8)	Zn-65		1238.1 (5.9)	Bi-214		1238.1 (5.9)	Bi-214	
136.5 (1.1)	Co-57	6.01 h	511.0 (0.6)	Ag-108		1274.5 (100)	Na-22	2.605 an.	1274.5 (100)	Na-22	2.605 an.
140.5 (9.0)	Tc-99m		526.6 (1.5)	I-128		1274.5 (36)	Eu-154		1274.5 (36)	Eu-154	
148.6 (9.4)	Pu-241	14.4 an.	558.4 (4.5)	In-114 m		1291.6 (43)	Fe-59		1291.6 (43)	Fe-59	
176.3 (6.9)	Sb-125		563.2 (8.4)	Cs-134		1293.6 (75)	In-116	54.2 min	1293.6 (75)	In-116	54.2 min
184.6 (2.0)	Ga-67	3.260 j	569.3 (15.4)	Bi-207	38.0 an.	1332.5*(100)	Co-60	5.271 an	1332.5*(100)	Co-60	5.271 an
185.7 (5.4)	U-235	7.04 x 10 <sup>8</sup> an.	569.7 (98)	Tl-208		1368.2 (2.5)	Sb-124		1368.2 (2.5)	Sb-124	
190.3 (1.6)	In-114 m	49.51 j	583.1 (84.2)	Sb-125	60.2 j	1408.0 (21)	Eu-152	13.48 an.	1408.0 (21)	Eu-152	13.48 an.
192.3 (3.1)	Fe-59		600.6 (18)	Sb-124		1434.1 (100)	V-52	3.76 m	1434.1 (100)	V-52	3.76 m
201.3 (8.4)	Lu-176		604.7 (97.6)	Cs-134		1435.8 (68)	La-138	1.05 x 10 <sup>10</sup> an.	1435.8 (68)	La-138	1.05 x 10 <sup>10</sup> an.
209 (2.2)	Ga-67		606.6 (5)	Sb-125	19.9 m	1460.8 (11)	K-40	54.2 m	1460.8 (11)	K-40	54.2 m
209.3 (4.4)	Ac-228		609.3 (46.3)	Bi-214		1507.4 (10)	In-116		1507.4 (10)	In-116	
210.6 (11.3)	Th-227		614.4 (91)	Ag-108m		1691 (49)	Sb-124		1691 (49)	Sb-124	
222.1 (7.6)	Ta-182		633 (1.8)	Ag-108		1764.5 (15.8)	Bi-214		1764.5 (15.8)	Bi-214	
236 (11.5)	Th-227	18.72 j	635.9 (11)	Sb-125		1770.2 (6.8)	Bi-207		1770.2 (6.8)	Bi-207	
238.6 (4.5)	Pb-212	10.64 h	637.0 (7.3)	I-131		1779 (100)	Al-28		1779 (100)	Al-28	
241.0 (4)	Ra-226	3.66 j	645.9 (7.3)	Sb-124	24.6 s	1836.1 (99)	Y-88	2.25 m	1836.1 (99)	Y-88	2.25 m
244.7 (7)	Eu-152		657.8 (4.4)	Ag-110	2.55 m	2091 (5.7)	Sb-124		2091 (5.7)	Sb-124	
247.9 (6.6)	Eu-154		661.6 (90)	Ba-137m	30.17 an.	2112.1 (18)	In-116		2112.1 (18)	In-116	
255.1 (1.9)	Sm-113	115.1 j	661.6 (85)	Cs-137	17.3 m	2204.2 (5)	Bi-214		2204.2 (5)	Bi-214	
264.7 (6.0)	Se-75	119.78 j	696.5 (7.5)	Pr-144	130 an.	2614.7 (100)	Tl-208		2614.7 (100)	Tl-208	
269.5 (13.6)	Ra-223	11.433 j	722.8 (11)	Sb-124		2677.9 (2)	Rb-88		2677.9 (2)	Rb-88	
271.2 (10.6)	Rn-219	3.96 s	722.9 (1.8)	I-131							
276.4 (6.9)	Ba-133										

### III. Montage expérimental STLR

Le laser Nd-YAG émettant à 1064 nm (Surelite Quantel) permet de délivrer une énergie de 10 mJ avec une impulsion de 10 ns à 10 Hz (Figure 90). La longueur d'onde de travail correspond à la troisième harmonique du laser (355 nm). Un jeu de miroir permet au laser de traverser la cuve en quartz contenant l'échantillon. Pour supprimer l'intensité transmise à travers l'échantillon, le laser est positionné de manière orthogonale par rapport au détecteur. Un boîtier BNC assure la synchronisation de la caméra iCCD qui permet l'acquisition des spectres de fluorescence et la modification des paramètres pour la résolution temporelle (délais de retard ( $\mu$ s), largeur de la fenêtre ( $\mu$ s)).

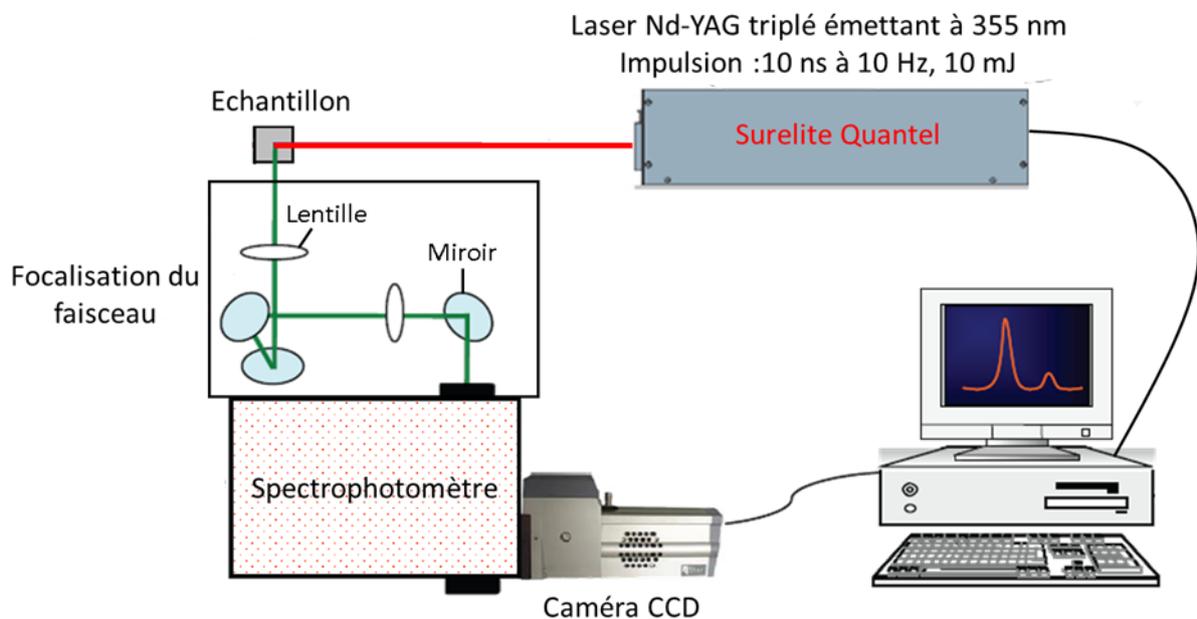


Figure 90. Schéma représentant un montage SLRT proche de celui utilisé.

#### IV. Porte-échantillons pour les analyses au synchrotron SOLEIL

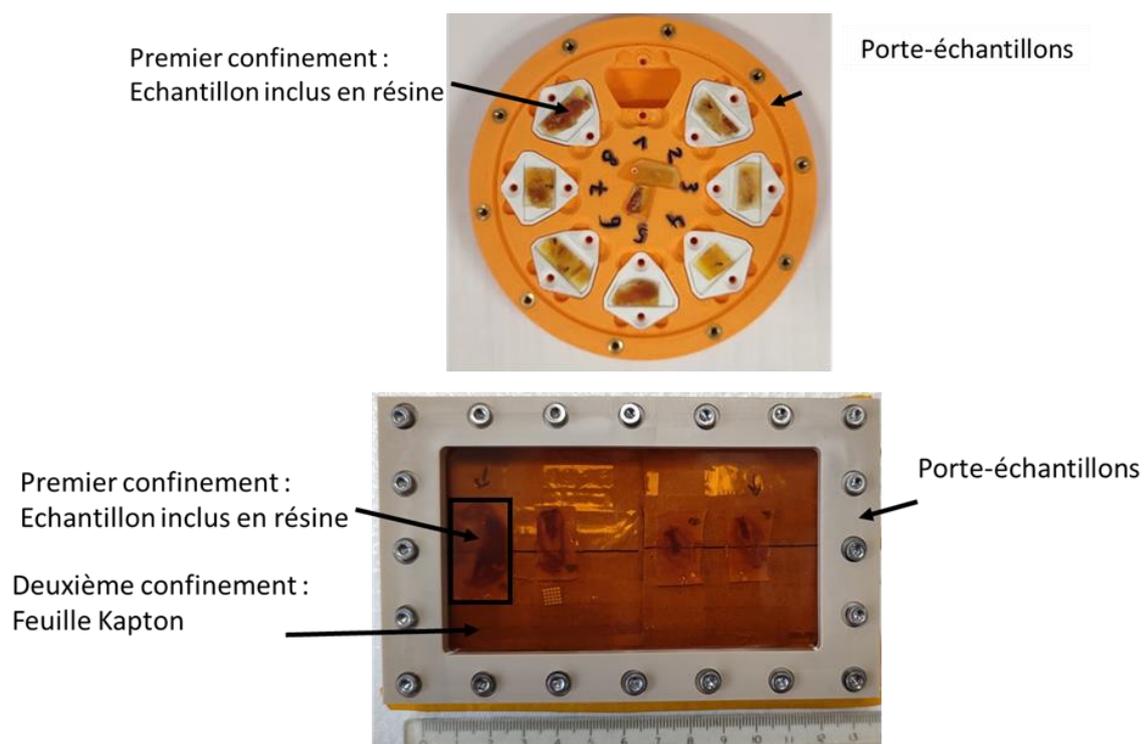


Figure 91. Haut : Porte-échantillons « roue » avec simple confinement pour les analyses  $\mu$ -XRF cobalt. Bas : Porte-échantillons avec double confinement pour les analyses  $\mu$ -XRF et XAS uranium

## V. Spectre gamma de l'eau de mer

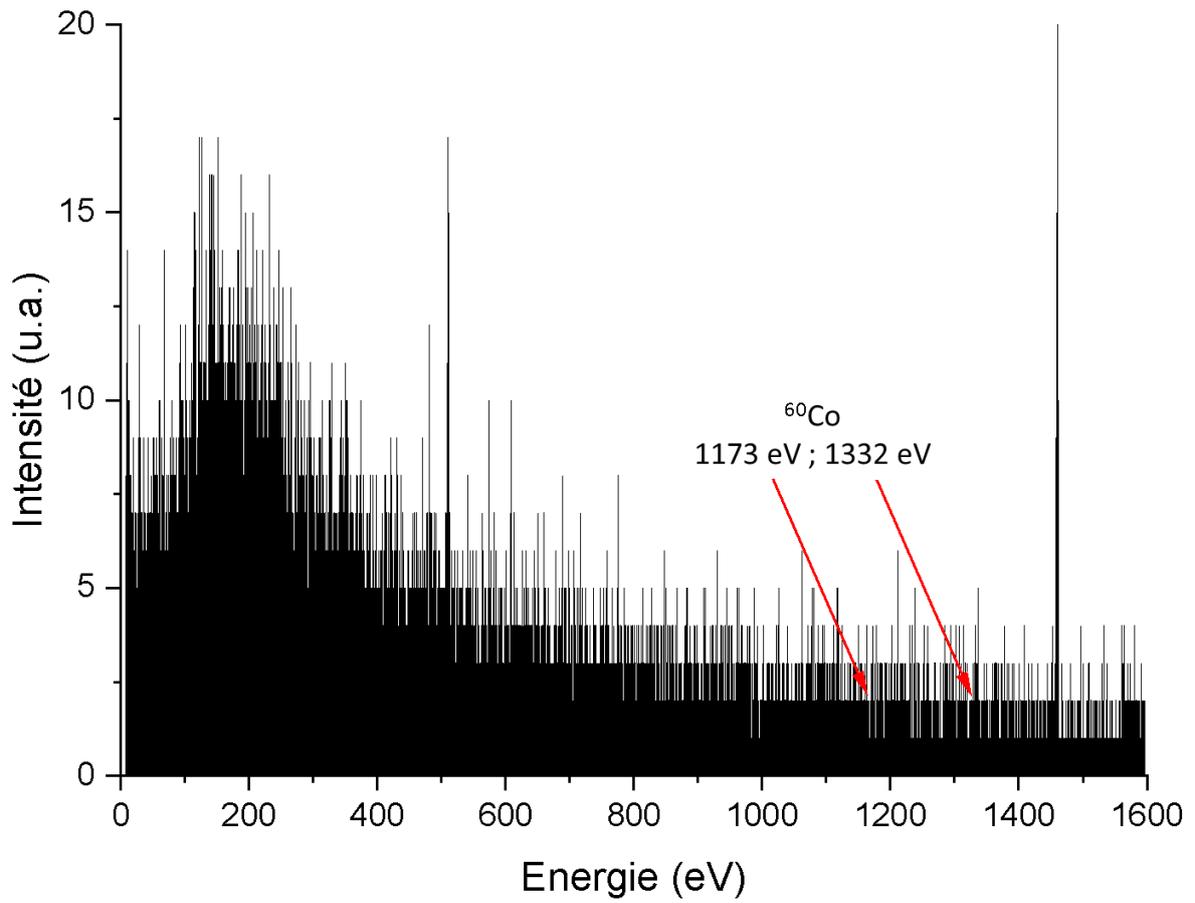


Figure 92. Spectre gamma de l'eau de mer.

## VI. Test statistique

### 1) Analyse de la variance ANOVA

L'objectif est de pouvoir comparer les moyennes du facteur de concentrations dans les organes ou dans les moules entières pour mettre en évidence des différences significatives suivant les organes ou l'origine des moules.

L'analyse de la variance (ANOVA) se concentre sur l'étude des différences de moyennes. L'utilisation d'une ANOVA permet d'identifier les différences entre deux groupes pour des variables de résultat spécifiques. L'analyse de la variance à un facteur (one-way) est appliquée lorsqu'un seul facteur de variation est pris en considération.

Initialement, les hypothèses  $H_0$  (hypothèse nulle) et  $H_1$  (hypothèse alternative) sont définies de la manière suivante :

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k = \mu$$

$H_1$ : Les moyennes ne sont pas toutes égales

Où  $\mu_x$  sont les moyennes des échantillons

La somme des carrés intragroupe ( $SS_w$ ) mesure la variance dans les groupes, ce qui correspond à la somme des carrés des différences entre chaque observation individuelle et la moyenne du groupe.

$$SS_w = \sum_{k=1}^G \sum_{i=1}^{N_k} (Y_{ik} - \bar{Y})^2$$

La somme des carrés inter-groupe ( $SS_E$ ) est calculée comme l'addition des carrés des différences entre la moyenne de chaque groupe et la moyenne globale.

$$SS_E = \sum_{k=1}^G \sum_{i=1}^{N_k} (Y_{ik} - \bar{Y}_k)^2$$

Où

## Annexes

$Y_{ik}$  = observation individuelle

$\bar{Y}$  = moyenne globale du groupe

$\bar{Y}_k$  = moyenne globale des groupes

$G$  = le nombre de groupe

$N_k$  = la taille de l'échantillon dans le groupe  $k$

La statistique de test pour  $H_0$

La somme des carrés est convertie en une valeur de « carrés moyens », en divisant la somme des carrés par les degrés de liberté :

$$d \, dl_B = G - 1$$

$$d \, dl_w = N - 1$$

$$MS_B = \frac{SS_B}{d \, dl_B}$$

$$MS_w = \frac{SS_w}{d \, dl_w}$$

Enfin le rapport  $F$  est obtenu en divisant le carré moyen intergroupe par le carré moyen intragroupe :

$$F = \frac{MS_B}{MS_w}$$

Une valeur élevée du rapport  $F$  indique l'existence d'au moins une différence significative entre les moyennes du groupe au contraire une valeur de  $F$  faible indique que les moyennes ne sont pas significativement différentes. La valeur  $F$  est utilisée pour mettre à l'épreuve l'hypothèse nulle, qui stipule qu'il n'y a pas de différences significatives entre les moyennes des groupes.

Pour simplifier, il est nécessaire de définir une valeur seuil afin de comparer le score  $F$  à cette valeur, permettant ainsi de rejeter ou non l'hypothèse nulle. Cette valeur seuil est généralement désignée par le terme "alpha" (e.g., 0,05 ou 0,01). Cette valeur seuil est utilisée pour évaluer la probabilité d'obtenir des résultats aussi extrêmes que ceux observés, si l'hypothèse nulle était vraie. Cette probabilité est représentée par la valeur  $p$ .

La valeur  $p$  peut être obtenue à partir de tables de valeurs statistiques, mais elle peut également être calculée facilement à l'aide de logiciels statistiques tels qu'IBM SPSS Statistics. Lorsque la valeur  $p$  est inférieure à la valeur alpha préalablement choisie, pour une certaine valeur de  $F$  et de degrés de liberté spécifiques, alors l'hypothèse nulle peut être rejetée. Cela est noté comme suit :  $p < \text{"valeur alpha"}$ , ce qui indique que les différences observées sont statistiquement significatives.

En résumé, l'ANOVA permet d'établir l'existence d'une différence significative entre les groupes, mais elle ne permet pas d'identifier spécifiquement quelles paires de groupes diffèrent en termes de moyennes. Toutefois, un test post hoc est requis afin de déterminer quelles paires de groupes manifestent des différences significatives.

## 2) Test post hoc

Les analyses post hoc permettent, après avoir effectué une analyse de variance, de déterminer quelles moyennes diffèrent entre elles. En d'autres termes, les tests post hoc autorisent des comparaisons multiples appariées afin de calculer les différences entre les moyennes appariées.

Dans le contexte de notre étude, nous avons employé le test de Scheffé, qui peut être considéré comme l'un des tests les plus conservateurs. Ce test permet d'effectuer des comparaisons multiples appariées simultanées pour toutes les paires de moyennes possibles en se basant sur la distribution d'échantillonnage  $F$ .

Le test de Scheffé (TS) est défini par la formule suivante :

$$TS = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}{\sqrt{\frac{MS_w}{n_1} + \frac{MS_w}{n_2}}}$$

## Annexes

Avec  $\bar{X}_1$  et  $\bar{X}_2$  les moyennes des deux groupes comparées,  $MS_w$  la moyenne des carrés,  $n_1$  et  $n_2$  la taille d'échantillons des deux groupes comparée.

Lorsque la valeur TS dépasse la valeur critique (TS') alors les moyennes des deux groupes sont significativement différentes. La valeur critique est calculée d'après la formule suivante :

$$TS' = (k - 1)(ANOVA C.V)$$

Avec  $k$  le degrés de liberté des échantillons,  $ANOVA C.V$  valeur critique de l'ANOVA

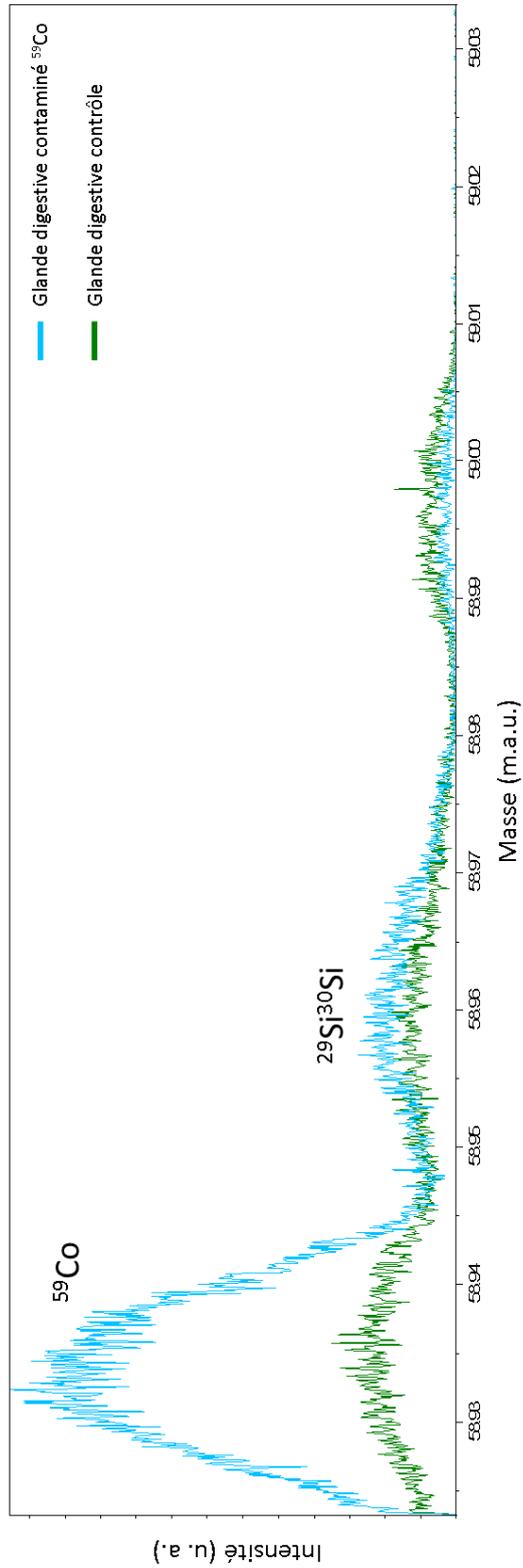
VII. Spectres de masse dans la région du  $^{59}\text{Co}$  de la glande digestive

Figure 93. Spectres de masse dans la région du  $^{59}\text{Co}$  effectuée sur la glande digestive d'une moule exposée à de l'eau de mer dopée en cobalt (bleue) et d'un échantillon contrôle (vert).

### VIII. Images ioniques obtenue dans le byssus de moule exposée à de l'eau de mer dopée en $^{59}\text{Co}$ .

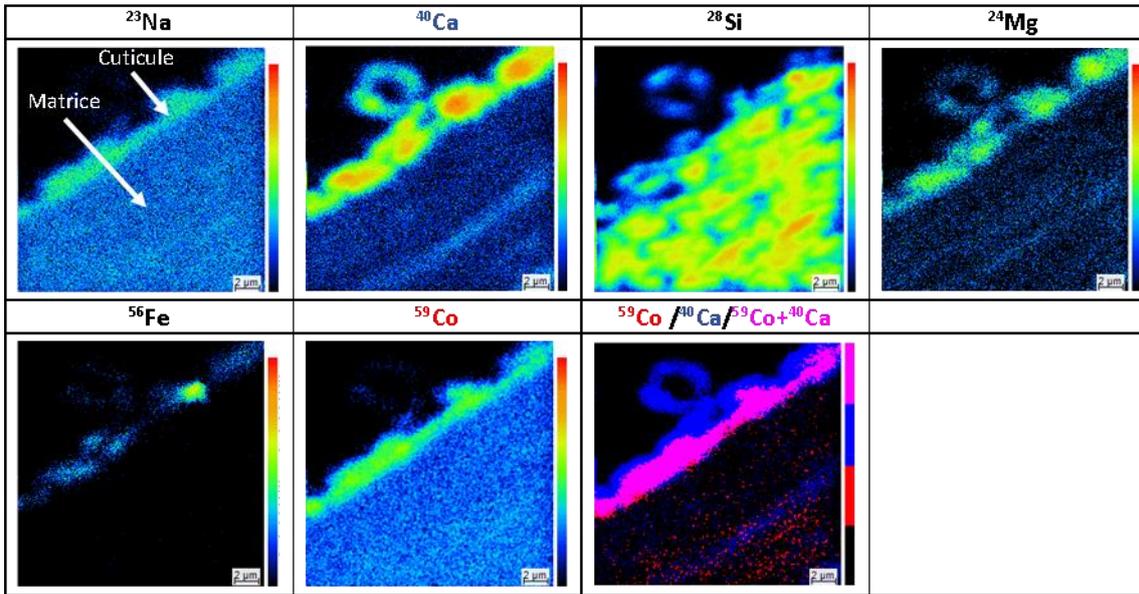


Figure 94. Images ioniques obtenues dans le byssus de moule exposée à de l'eau de mer dopée en  $^{59}\text{Co}$ . L'image ionique du  $^{23}\text{Na}$  permet de localiser la cuticule et le matrice (flèche blanche). Barre d'échelle 20  $\mu\text{m}$ . Paramètre d'acquisition : 250  $\times$  250  $\mu\text{m}$  ; 500 pA. L'image de la zone analysée est obtenue par une caméra optique. Barre d'échelle 500  $\mu\text{m}$ .

**IX. Images ioniques obtenue dans la glande digestive d'une moule exposée à de l'eau de mer dopée en  $^{59}\text{Co}$ .**

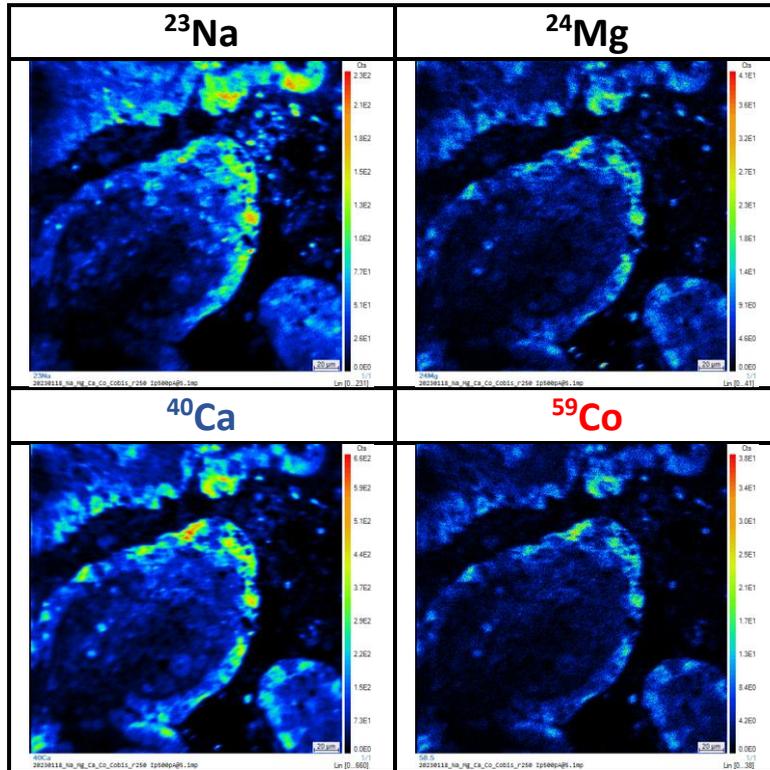


Figure 95. Images ioniques obtenues dans la glande digestive de moule exposée à de l'eau de mer dopée en  $^{59}\text{Co}$ . L'image ionique du  $^{23}\text{Na}$  permet de localiser la cuticule et le matrice (flèche blanche). Barre d'échelle  $20\ \mu\text{m}$ . Paramètre d'acquisition :  $250 \times 250\ \mu\text{m}$  ;  $500\ \text{pA}$ . L'image de la zone analysée est obtenue par une caméra optique. Barre d'échelle  $500\ \mu\text{m}$ .

## X. Spectres de fluorescence X du chlore

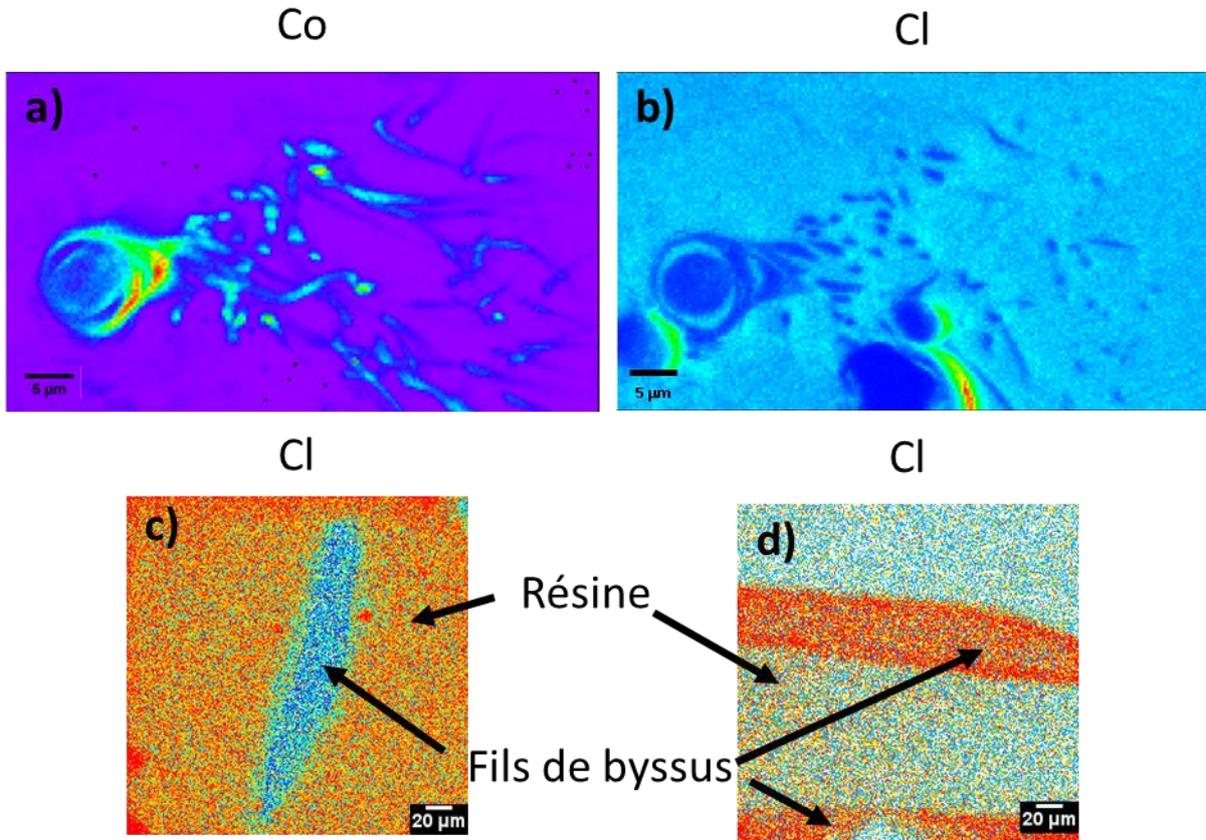
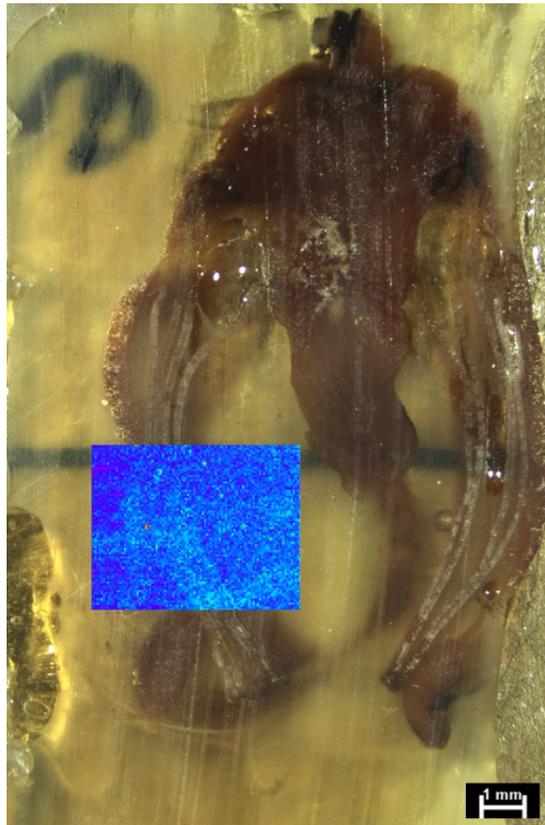


Figure 96. Comparaison des cartographies de fluorescence X du byssus par XAS et par PIXE. XAS : a) cartographies de fluorescence X du cobalt, b) cartographies de fluorescence X du chlore

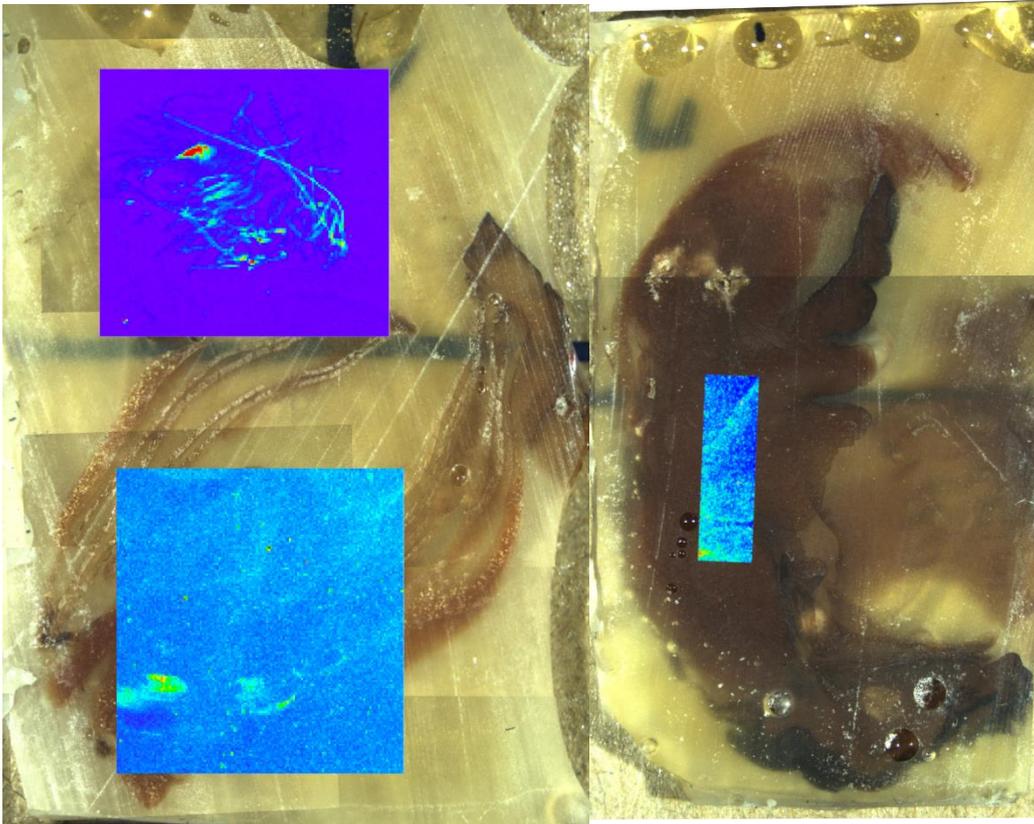
PIXE : b) cartographies de fluorescence X du chlore exposé à 1000 ppb de cobalt, d) cartographies de fluorescence X du chlore exposé à 1000 ppb de cobalt 500 ppb

## XI. Cartographie de l'uranium dans les branchies par $\mu$ -XRF

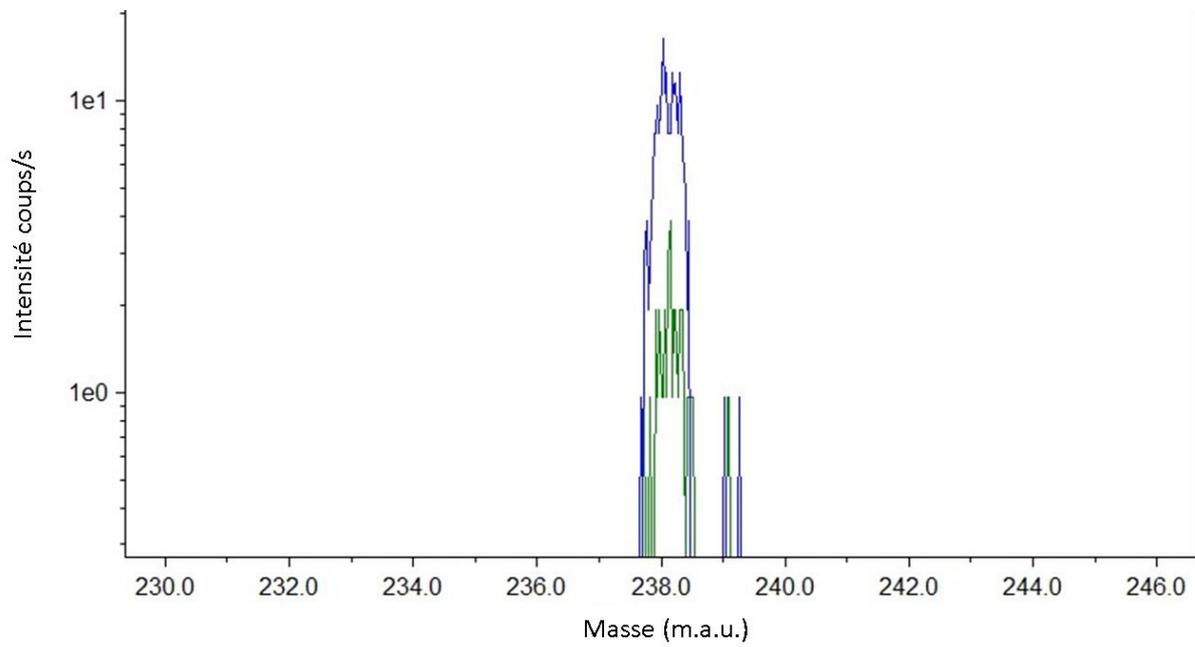


*Figure 97. Superposition de l'image optique d'une coupe de moules avec l'image de fluorescence X de l'uranium dans les branchies.*

## XII. Cartographie de l'uranium dans la glande digestive par $\mu$ -XRF



*Figure 98. Superposition de l'image optique d'une coupe de moules avec l'image de fluorescence X de l'uranium dans les branchies.*

**XIII. Spectres de masse dans la région du  $^{238}\text{U}$  du byssus**

*Figure 99. Spectre de masse de l'uranium.*

#### XIV. Images ioniques obtenues dans le byssus

Byssus récolté sur les moules après l'exposition à l'uranium

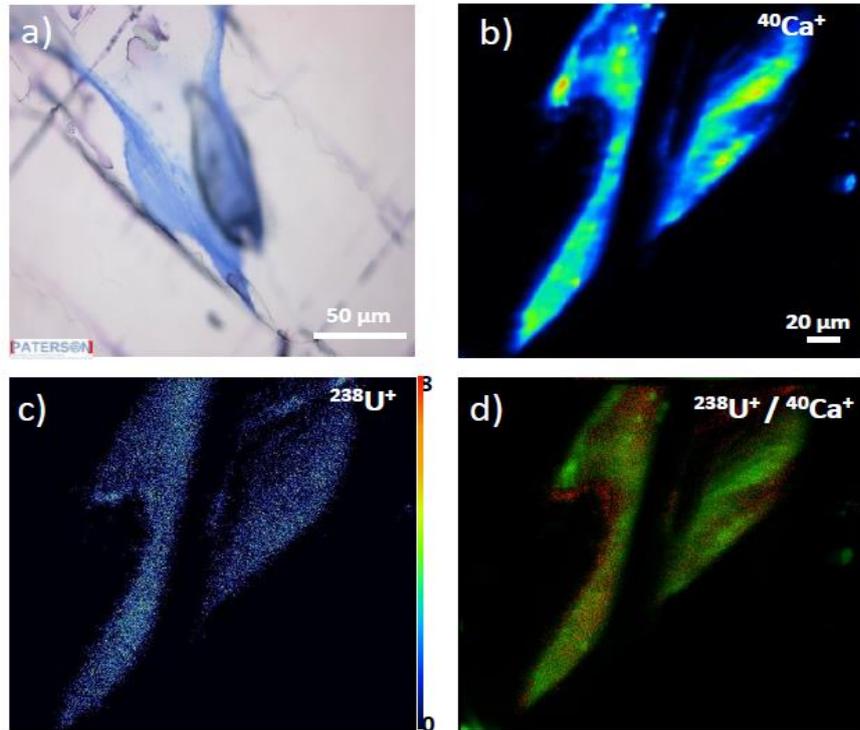


Figure 100. Comparaison des images ioniques réalisées au niveau du byssus à la suite d'une contamination *ex vivo* à l'uranium. Image ionique du  $^{40}\text{Ca}^+$  et du  $^{238}\text{U}^+$ , Superposition  $^{238}\text{U}^+$  (rouge)/ $^{40}\text{Ca}^+$  (vert), image optique du byssus. Barre d'échelles 250 et 20  $\mu\text{m}$  (raster 200  $\mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$  5 nA)

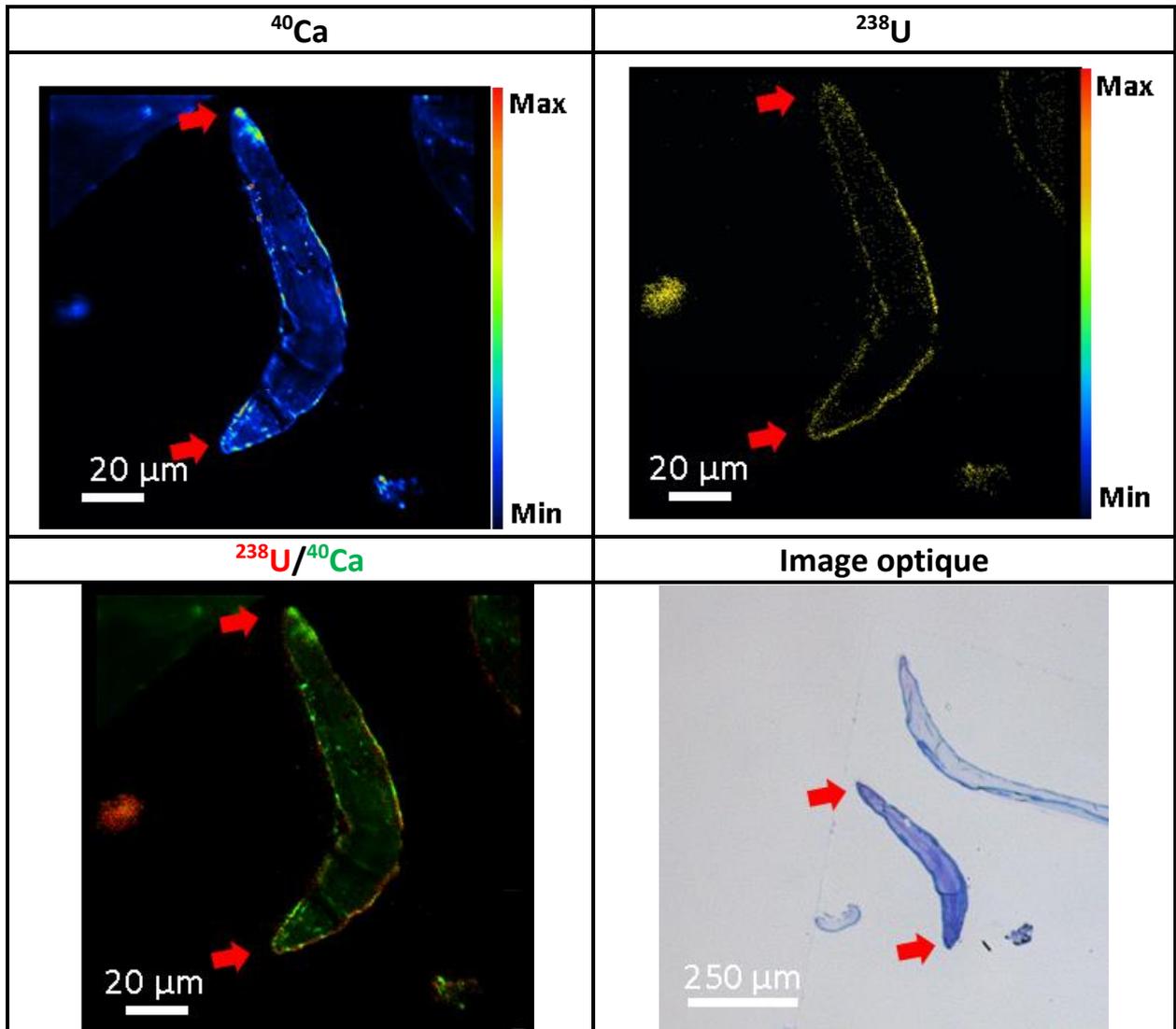
Contamination du byssus *ex vivo*

Figure 101. Comparaison des images ioniques réalisées au niveau du byssus à la suite d'une contamination *ex vivo* à l'uranium. Image ionique du  $^{40}\text{Ca}^+$  et du  $^{238}\text{U}^+$ , Superposition  $^{238}\text{U}^+$  (rouge)/ $^{40}\text{Ca}^+$  (vert), image optique du byssus. Barre d'échelles 250 et 20  $\mu\text{m}$  (raster 200  $\mu\text{m}$   $\times$  200  $\mu\text{m}$  5nA)

## XV. SLRT espèce fluorescente

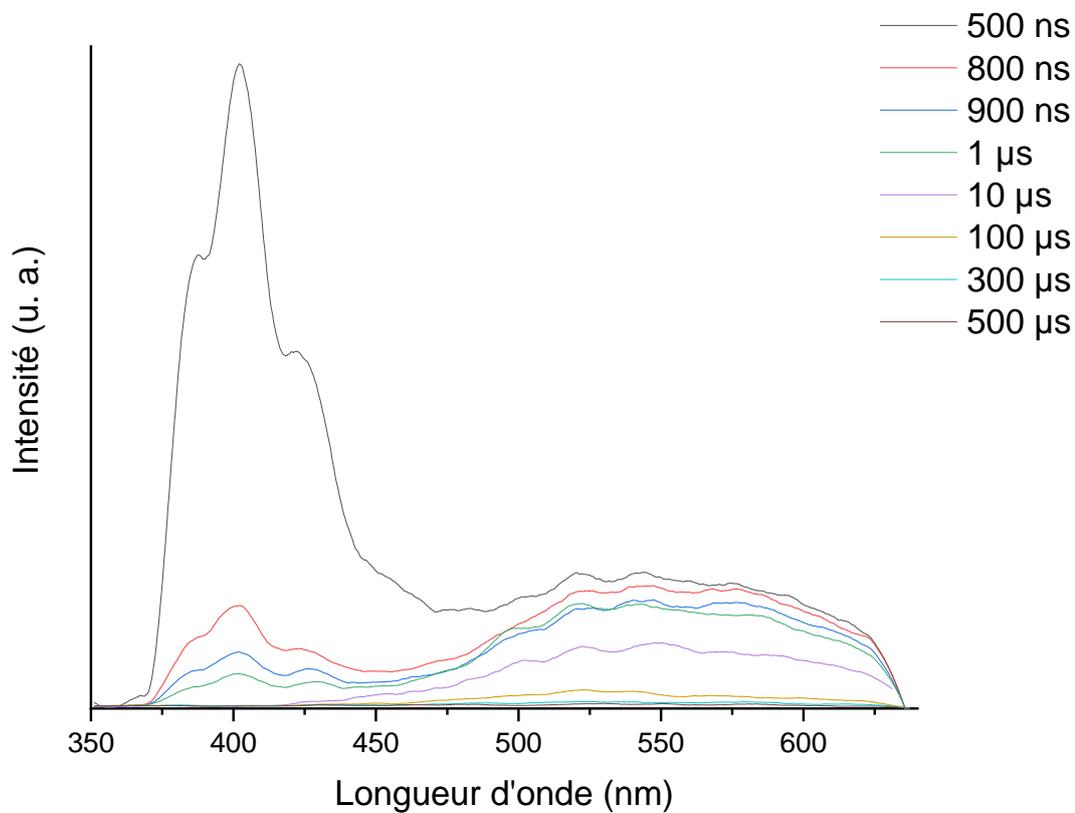


Figure 102. Spectre de fluorescence de la glande digestive de moule exposé à de l'eau de mer dopée en uranium.

## XVI. Culture des phytoplanctons *Isochrysis Galbana*

### 1) Préparation du milieu de Conway :

Le milieu de Conway est utilisé dans la culture d'algues, il permet d'enrichir l'eau de mer avec des éléments nutritifs indispensables à la croissance des organismes. Le milieu de Conway est composé d'une solution principale, d'une solution de métaux et d'une solution vitaminique. Afin de s'affranchir de tout problème lié à l'utilisation d'EDTA (éthylènediaminetétraacétique), les solutions n'en contiennent pas.

**Solution principale (1 000 mL):** Eau Milli-Q : 1000 mL ; Na NO<sub>3</sub> : 100 g ; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> : 33,75 g ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 26 g ; MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O : 0,36 g ; FeCl<sub>3</sub> H<sub>2</sub>O : 1,30 g

**Solution traces de métaux :** Eau Milli-Q : 100 mL ; ZnCl<sub>2</sub> : 2,10 g ; CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O : 2,00 g ; 6 (NH<sub>4</sub>) Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>4H<sub>2</sub>O (Ammonium heptamolybdate) : 0,90 g ; CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O : 2,00 g

**Solution vitaminique :** Eau Milli-Q : 100 mL ; vitamine B1 : 400 mg ; vitamine B12 : 20 mg

La solution de Conway est composée de la solution enrichie avec des métaux (1 mL de trace de métaux par litre de solution) et de vitamines (50 mL par litre de solution).

### 2) Entretien des cultures *Isochrysis galbana* comme source de nutriment pour les moules

Les phytoplanctons, *Isochrysis galbana* (*T. Iso*), ont été utilisés pour nourrir les moules. Ce sont des microalgues flagellées de la famille des Haptophycées mesurant 2 à 3 µm. Les microalgues sont la base de l'alimentation de nombreuses espèces marines dont les bivalves filtreurs. Leur utilisation permet de répondre aux besoins nutritionnels des moules non seulement pendant les phases de contamination, mais aussi lors de leur stockage dans les viviers. Les algues sont produites par un mode de culture dénommé cultures en lots dans lequel le milieu de culture est renouvelé de manière ponctuelle. Les algues sont placées dans des erlenmeyers stérilisés de 250 mL, la solution est agitée à l'aide d'un barreau aimanté à température ambiante et une canne en verre relié à une pompe à air permet d'ajouter de l'air

dans la solution. Un éclairage avec tube fluorescent de 18 W permet d'apporter suffisamment de lumière pour la photosynthèse des algues.

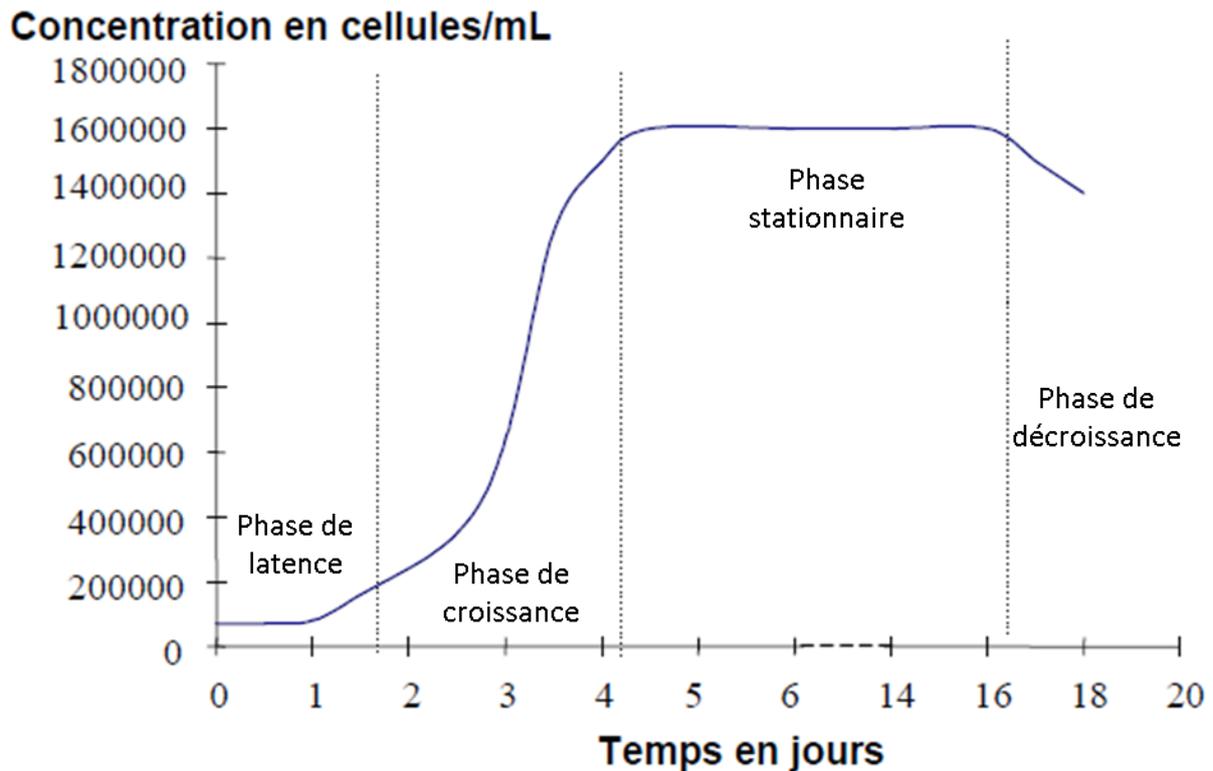


Figure 103. Courbe de croissance d'une culture de *T. Iso* (Modifié d'après: ("L'Institut Agro Rennes-Angers : Formation, Recherche, Valorisation en agronomie, agroalimentaire, horticulture et paysage," n.d.)

La culture des *T. Iso* est caractérisée par une phase de latence (Figure 103) durant laquelle la concentration des cellules reste stable. Ensuite, une étape de croissance, une fois que les cellules se sont adaptées, favorise une augmentation exponentielle de leur nombre. La phase stationnaire est marquée par l'apparition d'un plateau, notamment lié à l'appauvrissement du milieu de culture. Enfin, la phase de décroissance est caractérisée par la diminution de la concentration due à son vieillissement et la mort des cellules (Blancheton and Audineau, 1986; Bougaran et al., 2001).

Les conditions de culture utilisées au laboratoire ont entraîné un ralentissement de la croissance des microalgues. L'absence d'apport de CO<sub>2</sub> et de contrôle strict de la température a rendu le suivi de la croissance difficile. Les concentrations maximales obtenues ont été de 1 000 000 cellules.mL<sup>-1</sup>, avec des phases plus longues que celles indiquées Figure 103.

Les *T. Iso* ont été cultivées dans un milieu de culture de Conway qui a été réalisé à l'avance. La culture des microalgues nécessite un environnement stérile, car le milieu nutritif ajouté dans les solutions peut rapidement entraîner l'échec de la croissance des algues en cas de contaminations bactériennes. Il est nécessaire de travailler avec du matériel préalablement stérilisé à l'autoclave, ou par un mélange eau-éthanol. Toutes les manipulations se déroulent à proximité d'une flamme autour desquelles il est possible de travailler en condition stérile. Les souches ont été achetées à « Culture Collection of Algae and Protozoa » (CCAP). Une partie des souches est conservée en triplicata dans des tubes de 50 mL et repiquée toutes les semaines avec l'ajout du milieu de Conway (1 %) et de trois gouttes de vitamines. Ce repiquage permet de garder les souches en phase de croissance en les remettant dans un nouveau milieu nutritif. Les solutions d'algues sont obtenues à partir des souches par repiquage et ensemencement (Figure 104).

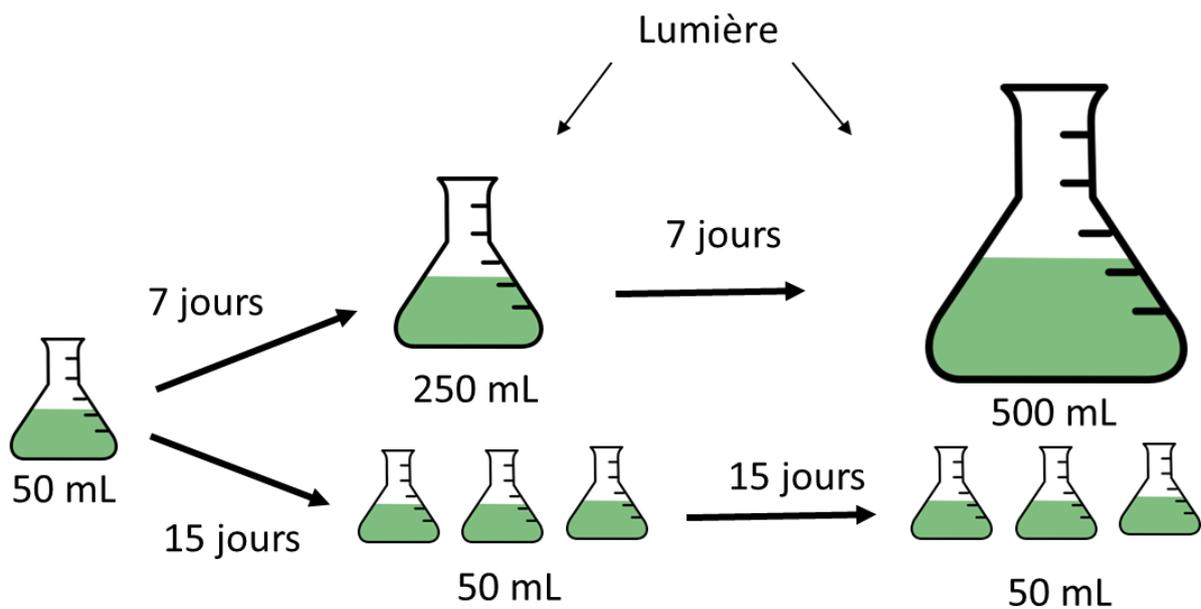


Figure 104. Déroulement schématique de l'ensemencement des souches *T. Iso*.

Pour nourrir les mollusques, le milieu de culture contenant les phytoplanctons est prélevé puis centrifugé à  $1\,500 \times g$  pendant 15 min. Le surnageant est enlevé et le culot est repris en solution dans quelques millilitres. Les algues sont comptées sur une cellule Malassez. Les solutions sont ensuite diluées pour atteindre  $10^4$  cellules par individus.

### 3) Protocole de comptage des phytoplanctons sur une cellule de Malassez :

La cellule de Malassez est une lame de verre quadrillée de volume connu ( $10^{-5}$  mL) composée de cases (4 lignes et 5 colonnes). Un échantillon de culture est prélevé (1 mL), pour faciliter le comptage 2 gouttes d'hypochlorite de sodium dilué sont ajoutées pour fixer les cellules flagellées et faciliter le comptage. Une lamelle en verre préalablement humidifiée est déposée sur la lame de Malassez. Ensuite, une goutte de l'échantillon est déposée sur le bord de la lamelle qui remplit la lame par capillarité. La lame est laissée 5 minutes au repos afin de laisser les microalgues sédimer. Les algues peuvent être diluées avant le comptage, la gamme de concentration optimale se situant entre 250 000 et 2 500 000 cellules.mL<sup>-1</sup>. La concentration est déterminée en comptant le nombre de cellules dans les rectangles (Figure 105). Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope TMS-F, Nikon. Le nombre de cellules est divisé par  $10^{-5}$  pour obtenir le nombre de cellules par mL de solution suivant la formule :

$$N = \frac{n}{a \times v} \times d$$

Avec  $N$  = Nombre de cellules par unité de volume ;  $v$  = Nombre de cellules comptées ;  $a$  = Nombre d'unités de comptage dénombrées ;  $v$  = Volume d'une unité de comptage ;  $d$  = Facteur de dilution

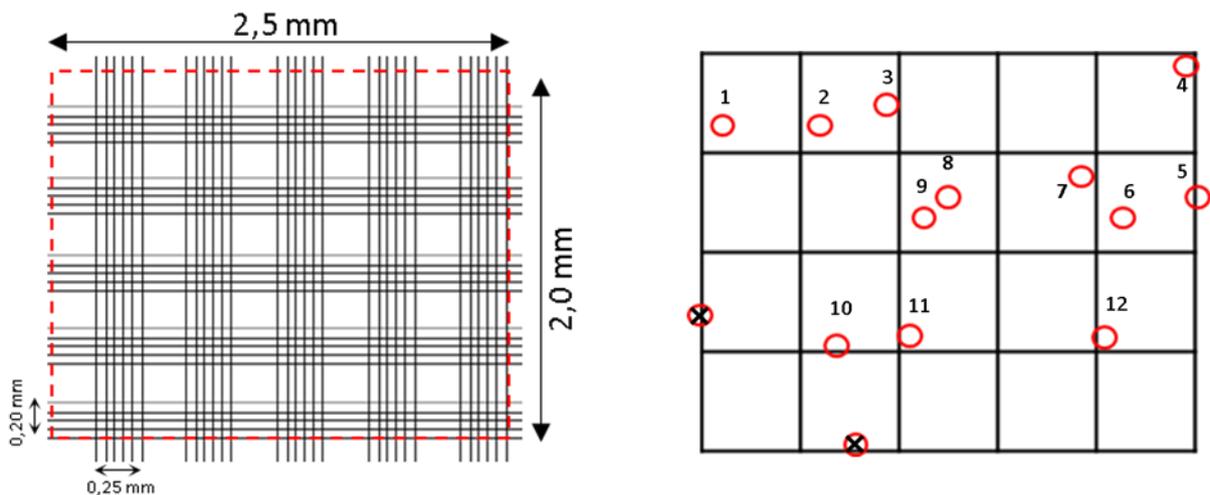


Figure 105. Détail de la cellule de Malassez (gauche) et comptage des cellules à partir d'un rectangle quadrillé (droite).

## XVII. Caractérisation des fractions protéiques après chromatographie d'affinité

Les différentes fractions obtenues après la chromatographie d'affinité ont été analysées directement dans le but d'obtenir une évaluation qualitative de la répartition des protéines (Figure 106). La présence de protéines a été détectée par le pic d'absorbance situé entre 275 et 280 nm, et il est à noter que les fractions contenant le plus de protéines sont les numéros 3 et 4. L'intensité de l'absorbance diminue à mesure que le numéro de la fraction augmente.

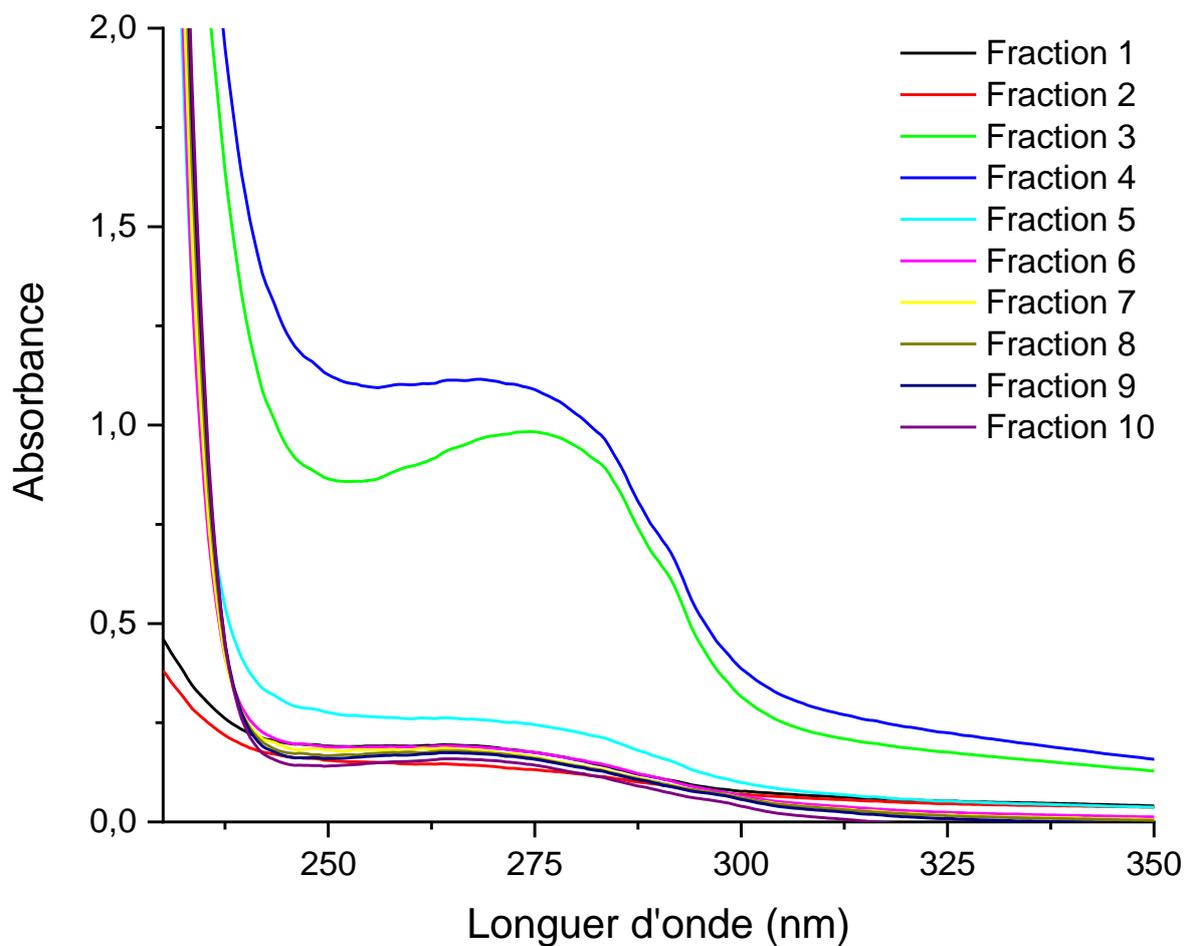


Figure 106. Spectres UV-visible issus de la purification des protéines contenues dans la glande digestive par chromatographie d'affinité

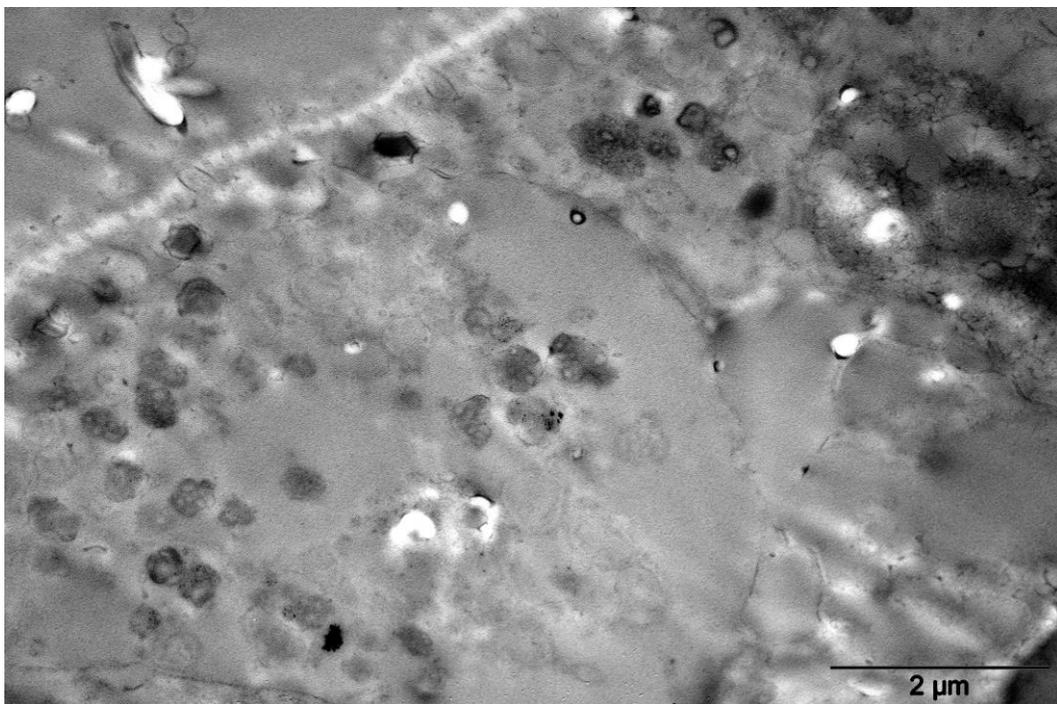
## XVIII. Autres techniques analytiques

### 1) Analyse par infrarouge

Les spectres ATR-FTIR ont été enregistrés sur un instrument Tensor 27 (Bruker) en utilisant un détecteur au tellure de mercure et de cadmium refroidi à l'azote.

### 2) Microscopie électronique en transmission (MET)

Les échantillons inclus en résine ont été coupés à l'aide d'un microtome à 10 nm puis déposés sur des grilles. Les échantillons ont été analysés avec un microscope électronique à transmission JEM-1400 (JEOL) (120 kV).



*Figure 107. Image de microscopie électronique à transmission de la glande digestive.*

L'absence d'agent de contraste ne permet pas de distinguer les compartiments subcellulaires.