

# Charte antiplagiat - Université d'Angers

## Préambule

Afin de garantir la qualité de ses diplômes et l'originalité des productions scientifiques et pédagogiques de ses étudiants et de ses personnels universitaires, enseignants, enseignants-chercheurs, chercheurs, l'Université d'Angers a mis en place une politique de lutte contre le plagiat. La présente charte en définit la philosophie et précise les règles, les outils et les mesures à mettre en œuvre pour s'assurer de la réalisation de travaux inédits, offrant une production originale et personnelle d'un sujet.

## Article 1<sup>er</sup>

Le plagiat est défini comme le fait, de s'approprier le travail créatif d'autrui et de le présenter comme sien ; de s'accaparer des extraits de textes, des images, des données provenant de sources externes et de les intégrer à son propre travail sans en mentionner la provenance ; de résumer l'idée originale d'un auteur en l'exprimant dans ses propres mots et en omettant d'en mentionner la source.

Toute édition d'écrits, de composition musicale, de dessin, de peinture ou de toute autre production, imprimée ou gravée en entier ou en partie, au mépris des lois et règlements relatifs à la propriété des auteurs est une contrefaçon (article L335-2 du code de la propriété intellectuelle).

La contrefaçon est considérée comme un délit au sens des articles L335-2 et L335-3 du code de la propriété intellectuelle.

## Article 2

Les étudiants et les personnels de l'Université d'Angers s'engagent à respecter les valeurs présentées dans cette charte et à ne pas commettre de plagiat, ni de contrefaçon, dans leurs travaux scientifiques et/ou pédagogiques.

Dans le strict respect de l'exception de courte citation, sont tolérées les reproductions de courts extraits de travaux préexistants en vue d'illustration ou à des fins didactiques, sous réserve que soit indiqué clairement le nom de l'auteur et la source (article L122-5 du code de la propriété intellectuelle), sans nécessité de demander le consentement de l'auteur.

Les étudiants sont tenus d'insérer et de signer l'engagement de non plagiat en première page de toutes leurs productions. Le libellé de cet engagement de non plagiat est défini dans la charte des examens de l'Université d'Angers.

## Article 3

Afin d'éviter le plagiat ou la contrefaçon, les étudiants et les personnels de l'Université d'Angers s'engagent à

indiquer clairement l'origine et la provenance de toute information prise dans des écrits, composition musicale, dessin, peinture ou toute autre production imprimée ou gravée. La citation des sources est, ainsi, à envisager dès qu'il est fait référence à l'idée, à l'opinion ou à la théorie d'une autre personne ; à chaque utilisation de données, résultats, illustrations d'autrui ; à chaque citation textuelle de paroles ou d'écrits d'autrui.

Dans le cadre de sa politique de lutte contre le plagiat, l'Université d'Angers propose des formations de sensibilisation à la recherche documentaire, à l'utilisation des documents trouvés et à la citation des sources.

#### **Article 4**

Afin de rechercher les éventuelles tentatives de plagiat ou de contrefaçon, l'Université d'Angers s'est dotée d'un logiciel de similitudes. Ainsi, les étudiants sont informés que leurs productions sont susceptibles d'être analysées par le dit logiciel. Ce logiciel compare les travaux rendus avec une vaste base de référence. Les rapports émis détaillent les similitudes repérées sans pouvoir les qualifier de plagiat ou de contrefaçon. Sur la base de ces rapports, l'appréciation du plagiat ou de la contrefaçon est laissée à l'appréciation des enseignants.

#### **Article 5**

Les manquements à la présente charte sont passibles de sanctions disciplinaires tant à l'égard des étudiants (Articles L. 811-6 et R.712-9 à R.712-46 du code de l'éducation et articles 40 et 41 du décret n°92-657 du 13 juillet 1992 – version consolidée du 21 août 2013) que des personnels (loi n°84-16 du 11 janvier 1984 et articles L952-8 et L952-9 du code de l'éducation). En cas de plagiat avéré ou de contrefaçon, la procédure disciplinaire ne préjuge pas d'éventuelles poursuites judiciaires.

## Engagement de non-plagiat

Je, soussigné(e),..... Bossard Evan .....

déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

Nom-Prénom : ..... Bossard Evan .....



Master Toxicologie Humaine et Environnementale – 2<sup>ème</sup> année

# **Transfert trophique du mercure :**

## **des microalgues à la moule zébrée**

Evan Bossard

Laboratoire Sebio UMR-I 02 : Stress Environnementaux et BIOSurveillance des milieux aquatiques

**Sous la direction de :**

Claudia Cosio | Professeure

Damien Rioult | Ingénieur de recherche

Clarisse Seguin | Doctorante

**Année 2023-2024**

## **Remerciement**

Je tiens à remercier dans un premier temps Clarisse Seguin qui m'a beaucoup aidé durant toute la durée de mon stage. J'ai également pu découvrir des manipulations qui sortaient du cadre de mon stage telles que des manip terrain grâce à Clarisse.

Je remercie également Claudia Cosio pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans le laboratoire Sebio et découvrir beaucoup de notions sur les mercures et l'écotoxicologie en général. Claudia a su répondre à l'ensemble de mes questions sur le sujet et m'a apporté une grande aide sur la conception et la correction de ce rapport !

Toutes les personnes qui m'ont aidé de façon directe ou indirecte pour la réalisation de mes manipulations, Véronique Gaillet, Laurence Delahaut, Isabelle Bonnard et Jérémy Delaunay m'ont été d'une grande aide et m'ont permis de réaliser mes manipulations dans les meilleures conditions.

Je remercie également beaucoup Dina Aggad pour avoir pris le temps de me former de la meilleure façon sur la biologie moléculaire. Dina m'a également montré et expliqué de nombreuses notions de biologie moléculaire ce qui m'a permis d'éveiller mon intérêt pour cette discipline.

Enfin, je remercie toutes les personnes du laboratoire Sebio (CDD comme stagiaires !) pour m'avoir permis de passer de bons moments.

## Liste des abréviations

Hg : Mercure

IHg : Mercure inorganique

MeHg : Méthylmercure

Hg(0) : Mercure élémentaire

THg : IHg + MeHg + Hg(0)

HgII : Hg divalent

PNEC : Concentration prédite sans effet

INERIS : Institut national de l'environnement industriel et des risques

PMSF : Fluorure de phénylméthylsulfonyl

GST : Glutathion S-Transférase

CAT : Catalase

GSH : Glutathion

CDNB : 2,4-Dinitrochlorobenzène

FD : Facteur de dilution

SOD : Superoxyde dismutase

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

EDTA : éthylènediaminetétraacétique

ERO : Espèces Réactives de l'oxygène

ADN : Acide désoxyribonucléique

LOOH : hydroperoxydes lipidiques

XO : o-cresosulfonephthalein-3,3'-bisméthylimino-diacétique

TBH : Tert-butylhydroperoxyde

MT : Métallothionéine

PCR : Polymerase Chain Reaction

FD : Facteur de dilution

ACP : Analyse en composante principale

PCB : Polychlorobiphényle

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

HCH : Hexachlorocyclohexane

ARN : Acide ribonucléique

SEM : Standard Error of the Mean

## Table des matières

1.	Introduction .....	1
1.1.	Le mercure, une utilisation historique .....	1
1.2.	Un polluant omniprésent.....	1
1.3.	Le cycle du mercure .....	2
1.4.	Le mercure, un élément problématique pour les écosystèmes .....	2
1.5.	La pollution au mercure, une problématique toujours d'actualité.....	3
1.6.	Focus sur le projet DiMer .....	3
1.7.	Réalisation des expositions et analyse des potentiels effets du mercure .....	4
1.8.	Focus sur les analyses biochimiques et moléculaire.....	4
1.9.	Objectifs du stage.....	6
2.	Matériels et méthodes.....	7
2.1.	Analyse biochimique.....	7
2.1.1.	Broyage des échantillons .....	7
2.1.2.	Dosage des protéines .....	7
2.1.3.	Activité de la catalase.....	7
2.1.4.	Activité de la GST.....	8
2.1.5.	Activité de la superoxyde dismutase .....	8
2.1.6.	Mesure de la peroxydation lipidique.....	8
2.1.7.	Quantification des métallothionéines .....	9
2.2.	Analyse de l'expression relative des gènes.....	9
2.3.	Analyse statistique.....	10
3.	Résultat.....	12
3.1.	Mise au point de la mesure de l'activité SOD .....	12
3.2.	Analyse biochimique.....	12
3.2.1.	Exposition en laboratoire .....	12
3.2.2.	Activité enzymatique de l'exposition <i>in situ</i> .....	16
3.3.	Analyse moléculaire <i>in situ</i> .....	20
4.	Discussion .....	21
4.1.	Exposition en laboratoire .....	21
4.1.1.	Analyse biochimique .....	21
4.1.2.	Analyse moléculaire .....	22
4.1.3.	Une approche réaliste.....	22
4.2.	Exposition <i>in situ</i> .....	23
4.2.1.	Analyse biochimique .....	23
4.2.2.	Analyse moléculaire .....	24
4.2.2.	Un milieu fortement contaminé .....	24
5.	Conclusion et perspective.....	25
6.	Références bibliographique.....	27
	Résumé.....	34
	Abstract .....	34
	Annexe 1.....	35
	Annexe 2.....	36

# **1. Introduction**

## **1.1. Le mercure, une utilisation historique**

Le mercure (Hg) est un métal lourd non essentiel présent naturellement dans l'environnement. Cet élément est utilisé depuis la nuit des temps par l'Homme. D'abord en tant qu'élément de décoration par les égyptiens, il y a plus de 3000 ans, et également dans la médecine comme antibactériens, antiseptiques ou encore laxatif (Clifton 2007). Le Hg est ensuite utilisé dans les industries en tant que catalyseur ou électrodes, et également émis comme déchet par les activités minières ou pétrolières (Hylander et Goodsite 2006; Gworek et al. 2016). Les premières suspicions de toxicité du Hg sont apparues entre les années 1800 et 1900 à la suite d'effets néfastes observés chez des travailleurs manipulant du Hg, et présentant un changement de comportement. Les mêmes symptômes ont été observés chez des patients ayant reçu comme traitement du calomel, une poudre blanche composé de Hg (Clifton 2007). Mais l'événement majeur ayant mis en lumière la dangerosité du Hg reste la catastrophe de Minamata dans les années 50. Une partie de la population de Minamata a montré des signes de trouble physiques et neurologiques après relargage de mercure inorganique (IHg) et organique dans l'eau par une usine utilisant cet élément comme catalyseur (Fujiki et Tajima 1992). Cette catastrophe sanitaire, et l'utilisation grandissante du Hg dans de nombreux pays, notamment la Chine, ont amplifié les préoccupations concernant ce métal lourd, ce qui a mené à la création de la convention de Minamata, régulant l'utilisation du Hg pour garantir la santé environnementale et humaine (Kessler 2013). L'application de cette convention a permis la fixation de valeurs seuil de Hg total, notamment dans les eaux de surface, pour préserver nos écosystèmes. En France, d'après la Directive Cadre sur l'eau, et plus précisément la directive 2013/39/UE, la valeur seuil dans les eaux de surface pour le Hg et ses composés est établie à 70 ng/L. Cependant, cette directive ne fait pas la distinction entre les différentes formes de Hg, à l'inverse des concentrations prédites sans effet (PNEC) de l'INERIS (Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques). Les PNEC concernant le IHg et MeHg sont respectivement de 80 ng/L et 3 ng/L (« Mercure (7439-97-6) | PSC », s. d.).

## **1.2. Un polluant omniprésent**

La capacité du Hg à se propager dans l'environnement à l'échelle mondiale représente un enjeu majeur. Deux processus interviennent dans la dissémination du Hg dans les écosystèmes : l'émission primaire et secondaire. L'émission primaire, à la fois naturelle et anthropique, correspond au dépôt de Hg de la lithosphère à l'atmosphère (Driscoll et al. 2013). Ce phénomène est possible grâce à la volatilisation du Hg réduit en mercure élémentaire Hg(0), qui, une fois dans l'atmosphère, possède un temps de résidence de plusieurs mois voire années (Driscoll et al. 2013). Hg(0) peut ensuite être transporté sur de grandes distances, on parle alors d'émission secondaire, deuxième processus responsable de la pollution au Hg dans l'environnement (Driscoll et al. 2013). Pour résumer, l'émission primaire de Hg est liée à sa concentration dans l'environnement, tandis que l'émission secondaire est responsable de sa dispersion. Ainsi, même l'Antarctique, continent considéré comme le plus isolé et relativement épargné par la pollution, présente une contamination au Hg (Subhavana et al. 2019). Les sources de pollutions au Hg sont multiples : le volcanisme et les sources hydrothermales



représentent 10% des émissions totales de Hg, les activités anthropiques actuelles 30% et enfin 60% sont liées au recyclage du Hg présent dans l'environnement et dont l'origine est majoritairement anthropique (Environment 2019). En effet, d'après le Global Mercury Assessment de 2018, l'émission primaire de Hg est principalement liée aux activités anthropiques historiques, telles que les émissions passées des usines à charbon et de l'exploitation minière d'or (Environment 2019). Il a été estimé que les activités anthropiques ont augmenté respectivement de 450% et 310% l'abondance de Hg dans l'atmosphère et dans les compartiments hydriques (Environment 2019).

### **1.3. Le cycle du mercure**

Une fois dans l'environnement, et plus particulièrement dans les compartiments hydriques, le Hg peut prendre différentes formes inorganiques et organiques. Dans un premier temps, le Hg élémentaire peut être oxydé en Hg divalent (HgII). La forme inorganique (IHg) peut former des sels solubles dans l'eau, biodisponible et toxique (Boening 2000; Bernhoft 2012). Ce Hg divalent peut ensuite être de nouveau réduit en Hg métallique et réémis dans l'atmosphère, participant ainsi au cycle du Hg (Boening 2000). Le Hg, majoritairement HgII, peut également être transformé sous l'action du métabolisme de micro-organismes en méthylmercure (MeHg). Cette méthylation est médiée par des micro-organismes comportant le cluster de gène nommé *hgcAB* (Parks et al. 2013). Sachant que l'ensemble des micro-organismes identifiés comme producteur de MeHg est anaérobie, il a été déterminé que cette réaction se produisait dans des conditions anoxiques, comme par exemple au niveau du sédiment (Bravo et Cosio 2020). Cependant, des études ont démontré que le sédiment n'était pas le seul environnement où la production de MeHg pouvait avoir lieu (Malcolm et al. 2010; Windham-Myers et al. 2014).

### **1.4. Le mercure, un élément problématique pour les écosystèmes**

Aucune des formes du Hg n'a démontré d'effets bénéfiques sur le plan biologique, bien au contraire, elles sont toutes considérées comme toxiques (Hylander et Goodsite 2006). Ce contaminant représente un enjeu majeur à la fois pour la santé humaine, mais également environnementale au point d'être placé troisième par l'Agence gouvernementale Américaine pour les substances toxiques et le registre des maladies parmi les substances les plus toxiques qui continuent d'être répandues dans l'environnement (Rice et al. 2014).

Les différentes formes du Hg, et notamment le MeHg, souvent considéré comme la forme la plus dangereuse malgré des concentrations relativement faible dans l'environnement (Kelly et al. 1995; Domagalski 2001; Lawson et Mason 2001), présentent une toxicité sur différentes cibles biologiques. En effet, il a été démontré que le Hg engendrait des effets neurotoxiques (Carocci et al. 2014; Mondal et al. 2018), reprotoxiques (Mondal et al. 2018; Henriques et al. 2019) ou encore génotoxiques (Aggarwal et al. 2014; Mondal et al. 2018). Concernant les effets cellulaires, un stress oxydant, en parti lié à une déplétion en glutathion (GSH), est souvent relatée suite à une exposition au Hg (Azar et al. 2021). Au niveau moléculaire, ce stress oxydant altère l'expression de gènes impliqués dans la défense antioxydante, notamment ceux codant pour la glutathion S transférase (GST), la superoxyde dismutase (SOD) ou encore la catalase (CAT) (Yang et al. 2020). Les effets varient selon les organismes (vertébré, invertébré, micro-organismes) et la forme de Hg

(IHg, MeHg), mais une tendance à la surexpression de la cat et la sod est observée à l'inverse d'une sous-expression de la gst probablement lié à la déplétion de glutathion (GSH) (Yang et al. 2020). Il est donc primordial de comprendre en détail les voies de contamination et les effets du Hg afin de limiter de façon plus précoce l'impact de cette contamination sur l'Homme et les écosystèmes.

### **1.5. La pollution au mercure, une problématique toujours d'actualité**

Malgré les nombreuses préoccupations concernant ce métal lourd, un manque de connaissances à son sujet est observé. Premièrement, même si la bioaccumulation du Hg, sous toutes ses formes, est souvent corrélée positivement à la taille et au rang de l'organisme dans la chaîne trophique (Chouvelon et al. 2018), il ne faut pas négliger l'importance de l'accumulation du Hg au niveau des maillons les plus bas du réseau trophique. Ceux-ci représentant le point de départ des contaminations des organismes supérieurs. De nombreuses études se concentrent sur l'analyse de la bioaccumulation chez des espèces de poissons consommés par l'Homme (Schmitt et Brumbaugh 1990; Cervený et al. 2016; Nawab et al. 2022). Or il est également intéressant d'étudier la bioaccumulation, ainsi que les réponses biologiques, sur des espèces de rang inférieur, tels que les bivalves, pour repérer plus précocement une contamination au Hg et les conséquences de celle-ci. C'est pourquoi de nombreuses études ont émergé en prenant comme modèle l'organisme sentinelle *Mytilus edulis* (Pelletier 1988; Riisgård et Hansen 1990; Duchemin et al. 2008), un bivalve caractéristique des milieux marins. Cependant, la contamination au niveau des compartiments dulcicoles est également importante et doit faire l'objet d'études. En effet, le Hg peut se retrouver dans ces compartiments via le relargage d'effluents, le lessivage ou encore les précipitations (Rudd 1995). Le Hg, ainsi déversé dans des rivières ou autres cours d'eau, peut ensuite se retrouver dans l'eau de boisson, les organismes dulcicoles consommés par l'Homme, ou se déverser dans des milieux marins via les estuaires. Il est donc nécessaire de multiplier les études portant sur la contamination au Hg de ces milieux via l'étude de bioaccumulation du Hg et de sa toxicité chez des espèces caractéristiques de celui-ci.

Deuxièmement, beaucoup d'études sur la bioaccumulation du Hg et ses effets négligent l'importance de la voie trophique et exposent les organismes directement via l'eau avec des concentrations non réalistes (Valenti et al. 2005; Y. Zhang et al. 2010; Oliveira et al. 2018). Il est donc nécessaire de remédier à ce manque d'informations via des études de bioaccumulation et d'évaluation des réponses biologiques sur des organismes en conditions plus réalistes.

### **1.6. Focus sur le projet DiMer**

Le projet DiMer vise à combler les lacunes concernant la contamination au Hg des milieux d'eau douce, notamment le manque de connaissances concernant cette contamination avec les biotes inférieurs tout en considérant le transfert trophique. L'objectif *in fine* étant d'améliorer l'évaluation des risques aux Hg dans ces milieux. Dans le cadre de ce projet, le bivalve *Dreissena polymorpha* ou moule zébrée, a été choisi comme organisme modèle. *D. polymorpha* est une espèce invasive de bivalve dulcicole fortement utilisée en écotoxicologie des milieux dulcicoles (Magni et al. 2017; Evariste et al. 2018; Klimova et al. 2019; Baratange et al. 2023). En effet, les moules zébrées sont largement utilisés comme organisme sentinelle de par leur large

répartition, leur vie sédentaire couplée à leurs capacités de filtration importante allant de 5 à 400 mL/bivalve/h (Baldwin et al. 2002). Ces caractéristiques leur permettent d'être représentatives de leur milieu. De plus, afin d'illustrer le transfert trophique, une algue dulcicole a été sélectionnée comme vecteur du Hg, *Chlorella vulgaris*, consommée par *D. polymorpha* (Baratange et al. 2022; 2023).

### **1.7. Réalisation des expositions et analyse des potentiels effets du mercure**

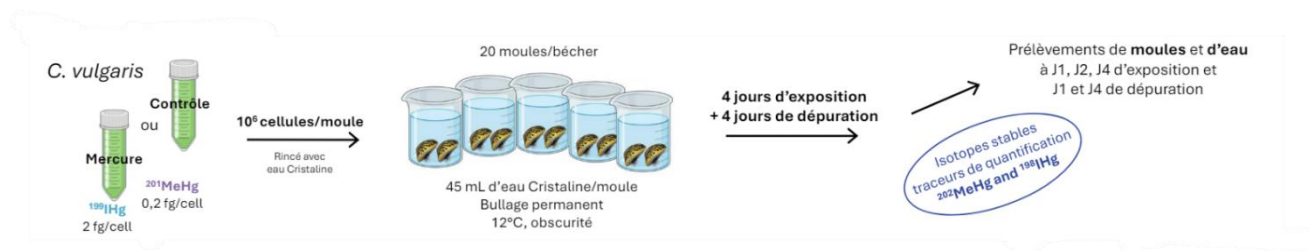
Des manipulations en laboratoire ont été réalisées dans le but de caractériser ce transfert et les effets potentiels du Hg dans des conditions contrôlées. Des expositions *in situ* de 3 semaines ont également eu lieu pour permettre une comparaison avec les données générées au laboratoire. Cette approche permet de prendre en compte un grand nombre de facteurs, rendant l'approche plus réaliste. Ces expositions *in situ* ont été réalisées sur la Seine, dont la qualité est souvent remise en question, notamment à l'approche des Jeux Olympiques et la Deûle, une rivière fortement contaminée en raison de sa proximité avec l'ancienne fonderie Métaleurop ayant fait polémique suite à une mauvaise gestion de l'exploitation.

Les expositions ont été réalisées en aval des sites durant le mois de janvier pour le site de la Seine et le mois de juillet pour les deux sites. Le choix des périodes d'expositions a été établi en supposant une plus grande abondance de microalgues au mois de juillet dû à la hausse des températures, et donc potentiellement des effets plus importants. Après exposition, la bioaccumulation en Hg total (THg = IHg + MeHg + Hg(0)) et MeHg, a été mesurée dans les branchies, les glandes digestives ainsi que le reste du corps. Le ratio  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  sera réalisé pour estimer l'implication de la voie trophique comme source de contamination. Enfin, une analyse de différents biomarqueurs biochimiques et biomoléculaires sera effectuée pour rendre compte des potentielles réponses biologiques face à cette bioaccumulation en Hg.

Concernant l'exposition en laboratoire (figure 1), les moules ont été nourries avec des solutions de *Chlorella vulgaris* ( $10^6$  cellules/moule/jour) contaminées au IHg et MeHg (respectivement 2 et 0,2 fg/cellules) afin de mimer des concentrations réalistes basées sur la Directive Cadre sur l'Eau. Cette exposition a été renouvelée toutes les 24h pendant 4 jours, suivie de 3 jours de dépurations pendant lesquels les moules ont été nourries chaque 24h avec des algues non contaminées. Un nombre de 20 individus a été prélevé à J1, J2, J4, J5 ainsi qu'à J7 et ont subis les mêmes analyses que pour l'exposition *in situ* à l'exception de la mesure du ratio  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ .

### **1.8. Focus sur les analyses biochimiques et moléculaire**

Plusieurs biomarqueurs bien connus ont été choisis pour évaluer le niveau de stress des individus. Pour rappel, un biomarqueur est un changement mesurable ou observable au niveau cellulaire, moléculaire, génétique, biochimique ou encore physiologique chez un organisme qui témoigne de l'exposition passée ou présente à au moins un facteur de stress. Les biomarqueurs caractéristiques du stress oxydant sont très utilisés quand il est question d'observer les effets potentiels d'un contaminant tel que le Hg (Faria et al. 2010; Teixeira et al. 2018; Klimova et al. 2019). Par conséquent, plusieurs biomarqueurs caractéristiques du stress oxydant et de défense ont été sélectionnés tels que l'activité de la CAT, la SOD, la GST, l'hydroperoxydes lipidiques (LOOH), les métallothionéines (MT) ainsi que leur gène associés.



**Figure 1** : Plan expérimental de l'exposition au IHg et MeHg par transfert trophique chez *D. polymorpha*.  
Clarisse Seguin

La CAT est une enzyme antioxydante largement répartie dans le monde du vivant (Aebi 1974). Elle est localisée principalement dans le peroxysome, et catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau et oxygène. Elle participe donc à la défense de l'organisme lors d'un stress oxydant.

La GST est une enzyme cytosolique de phase II impliquée dans la détoxification. Son activité consiste en la fixation d'un glutathion sur un xénobiotique pour augmenter son hydrosolubilité et faciliter son excrétion. De plus, la GST joue un rôle antioxydant via la réduction des hydroperoxydes. En effet, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) déclenchent la chaîne autocatalytique de peroxydation lipidique ce qui engendre la production de molécules électrophiles tels que les hydroperoxydes (Sharma et al. 2004). La GST permet donc de limiter cette peroxydation lipidique.

La SOD est une métalloenzyme clef dans la défense antioxydante au même titre que la catalase. Elle catalyse la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et oxygène. Le suivi de l'activité est basé sur l'inhibition de l'oxydation du NADH par la SOD (Paoletti et al. 1986).

La peroxydation lipidique est également mesurée afin d'illustrer cette fois-ci une dégradation ou non des composants cellulaires. En effet, les ERO peuvent induire des dommages cellulaires lorsqu'ils ne sont pas éliminés par les défenses antioxydantes de l'organisme. Ces ERO peuvent détériorer des protéines, de l'ADN ou encore les lipides via la peroxydation lipidique.

Un autre biomarqueur intéressant dans le cadre du projet sont les métallothionéines (MT). En effet, les métallothionéines représentent une superfamille de protéines de bas poids moléculaire, environ 10 kDa, contenant un grand nombre de cystéines allant de 15 à 30 % (Blindauer 2014). Ces protéines peuvent lier un grand nombre de métaux essentiels (Zn, Cu etc...) et non essentiels (Cd, Hg etc...) grâce à leur groupement thiols (Stillman 1995). Les MT jouent donc un rôle important dans le maintien de l'homéostasie des métaux essentiels et l'élimination des autres métaux. La régulation des MT est essentiellement médiée par leur ligand, une augmentation de la concentration ou de l'expression des MT témoigne donc d'une contamination aux métaux lourds (Blindauer 2014).

Enfin, une étude moléculaire des transcrits est également réalisée. Cette étude de l'expression génique permet de rendre compte des effets précoces suite à l'application d'un stress chez un individu. L'analyse de l'expression des gènes est souvent réalisée dans des études de réponse biologique à un stress quelconque, car cette technique est très sensible et spécifique des gènes recherchés, ici les gènes recherchés étant ceux impliqués dans la défense antioxydante (CAT, GST, SOD) et ceux en lien avec la défense aux métaux lourds (MT). Ces analyses pourront mettre en évidence la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la peroxydation lipidique qu'ils peuvent engendrer ainsi que les mécanismes de tolérance mis en place par *D. polymorpha*.

## 1.9. Objectifs du stage

Le stage consiste en l'analyse des différents biomarqueurs précédemment cité chez *D. polymorpha* dans l'objectif de caractériser les potentiels effets cellulaires et moléculaires témoignant du niveau de stress, résultant d'une exposition au IHg et MeHg par le biais de l'alimentation.

## **2. Matériels et méthodes**

### **2.1. Analyse biochimique**

#### **2.1.1. Broyage des échantillons**

Pour l'évaluation des différentes réponses biochimiques, les échantillons de tissus, préalablement congelés à -80 °C, subissent un broyage mécanique effectué via la succession de 3 cycles de 90 secondes à 30 Hz avec une bille en inox, dans 8 µL de tampon de broyage par mg de tissu. Le tampon de broyage est composé de tampon phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) à 50 mM pH 7.4 et d'inhibiteur de protéases (fluorure de phénylméthylsulfonyl ; PMSF à 1 mM et L-sérine borate à 1 mM). Les échantillons sont ensuite centrifugés à 3000 g pendant 15 minutes à 4 °C, le surnageant récupéré et séparé en plusieurs aliquots puis conservé à -80 °C. Pendant toute la procédure, les échantillons sont maintenus dans la glace pour préserver leur intégrité.

#### **2.1.2. Dosage des protéines**

Un dosage protéique des échantillons broyés permet de normaliser les résultats obtenus pour les différentes réponses biochimiques. La méthode consiste en la complexation du rouge de pyrogallol et du molybdate de sodium en milieu acide qui, en association avec les groupements aminés des protéines, prend une coloration bleue (Watanabe et al. 1986). Le dosage est automatisé via l'analyseur séquentiel Gallery. Une gamme étalon est réalisée par l'automate via un standard de protéines dilué au 50°, 80°, 120° et 200° puis les échantillons dilués au 6° sont comparés à cette gamme après ajout du réactif U/CSF. La longueur d'onde utilisée est de 600 nm correspondant à l'absorbance du complexe rouge de Pyrogallol/molybdate de sodium fixé aux groupements aminés des protéines.

#### **2.1.3. Activité de la catalase**

L'activité de la catalase peut être suivie via la disparition du  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans un échantillon, sachant que celui-ci absorbe dans l'UV à 240 nm (Aebi 1974). Pour ce faire, x µL de l'échantillon (10 µL ou 20 µL pour les échantillons ayant une plus faible concentration protéique  $\approx 2$  g/L) sont placés dans une cuve en quartz auquel sont ajoutés 990 µL ou 980 µL de tampon réactionnel d' $\text{H}_2\text{O}_2$  à 14.73 mM. La lecture à 240 nm est ensuite suivie pendant 120 secondes à l'aide du spectrophotomètre CARY. L'absorbance des échantillons est comparée à la gamme étalon préalablement réalisée allant de 0 à 20 U/mL de catalase (dilué dans du tampon phosphate 50 mM Ph 7.4) pour estimer la concentration initiale des échantillons. Les résultats sont exprimés en µmol de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consommés par minute (= 1 U de catalase).

#### 2.1.4. Activité de la GST

Le suivi de l'activité de la GST repose sur la disparition du 2,4-Dinitrochlorobenzene (CDNB) en présence de glutathion. Le suivi est réalisé par l'automate Gallery via l'ajout successif de 110  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate à 50 mM pH 6.5, 20  $\mu\text{L}$  de glutathion réduit à 10 mM, 3  $\mu\text{L}$  de CDBN et 5  $\mu\text{L}$  de l'échantillon. La réaction est ensuite suivie pendant 243 secondes à 340 nm (absorbance du CDBN). Le calcul de l'activité est ensuite réalisé comme suit :

$$GST (\mu\text{mol CDBN} \cdot \text{g prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}) = \left( \frac{\left( \frac{(\text{pente éch.} - \text{pente blanc}) \times 60}{9.6 \times 1} \right) \times FD \times 10^3}{[\text{prot}]} \right)$$

Avec la pente en  $\text{s}^{-1}$ , FD le Facteur de dilution, 9.6 le coefficient d'extinction molaire du CDBN, 1 le trajet optique du faisceau en centimètre, la concentration en protéine en g/L et  $10^3$  correspond au facteur de conversion des unités.

#### 2.1.5. Activité de la superoxyde dismutase

Le suivi d'activité est basé sur l'inhibition de l'oxydation du NADH par la SOD (Paoletti et al. 1986). Pour lancer la réaction, 10  $\mu\text{L}$  de l'échantillon dilué sont ajoutés (dilution au  $1/40$  pour les différents tissus), suivi de 86.58  $\mu\text{L}$  de mix préparé comme suit :

- 8007  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate 50 mM à pH 7.4
- 400  $\mu\text{L}$  de  $\beta\text{NADH}$  à 7,5 mM solubilisé dans de l'eau ultrapure
- 250  $\mu\text{L}$  de EDTA/ $\text{MnCl}_2$  à 100 mM/50 mM solubilisés dans de l'eau ultrapure

Enfin 10  $\mu\text{L}$  de 2-mercaptoéthanol sont ajoutés, puis la densité optique est relevée à 340 nm toutes les minutes pendant 30 à 40 minutes par un lecteur de plaque TECAN. Les résultats sont ensuite comparés à ceux de la gamme de SOD préalablement réalisée dans de l'eau ultrapure (0.7 U/mL, 0.5 U/mL, 0.35 U/mL, 0.25 U/mL, 0.125 U/mL et 0 U/mL).

#### 2.1.6. Mesure de la peroxydation lipidique

La méthode pour mesurer la peroxydation lipidique conçue par Jiang *et al.* (Jiang et al. 1992) et adaptée par Arab et Steghens (Arab et Steghens 2004) pour les automates quantifie les hydroperoxydes lipidiques (LOOH) produit par les lipides peroxydés. La méthode consiste en la complexation d'ions ferriques  $\text{Fe}^{3+}$ , produit via l'oxydation d'ions ferreux  $\text{Fe}^{2+}$  par les LOOH, avec du xylénol orange (o-cresosulfonephthalein-3,3'-bismethylimino-diacetic acide ; XO) absorbant entre 550 nm et 570 nm.

Pour ce faire, 5  $\mu\text{L}$  de l'échantillon sont ajoutés, suivi de 180  $\mu\text{L}$  de xylénol orange à 330 mM dilué dans le réactif FOX (glycérol, NaCl à 0,9 %,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , acide formique) puis 45  $\mu\text{L}$  d'ions ferreux à 0,371 mg/mL dilué dans le réactif FOX. Cette étape, ainsi que les suivis d'activité via l'absorbance à 620 nm pendant 300

secondes, sont automatisés par l'automate Gallery. Les résultats sont ensuite comparés à une gamme d'étalon composée de TBH (Tert-butylhydroperoxyde) allant de 800 à 6,25 µM, pour calculer la concentration en LOOH initiale selon l'équation suivante :

$$[LOOH]' \mu mol TBH.g\ prot^{-1} = \frac{(abs_{éch.} - abs_{blanc\ corr.}) - ORD}{\frac{Pente}{[prot]}}$$

Avec ORD correspondant à l'ordonnée à l'origine et la pente au coefficient directeur de la droite d'étalonnage du TBH. [prot] la concentration en protéine dans l'échantillon en g/L et  $abs_{blanc\ corr.}$  l'absorbance corrigée du tampon d'homogénéisation.

### 2.1.7. Quantification des métallothionéines

Le dosage des métallothionéines par polarographie conçue par Olafson est une méthode électrochimique reposant sur le principe d'oxydation et de réduction où le signal est enregistré grâce à une électrode à goutte de mercure (Olafson 1981). Le dosage des MT est donc indirect, car permet grâce à la réaction d'oxydoréduction entre l'oxydant, ici l'hexamine de cobalt, et le groupement SH très présent dans les MT.

Pour ce faire, les échantillons subissent un choc thermique à 75 °C pendant 15 minutes afin de dénaturer l'ensemble des protéines à l'exception des thermorésistantes dont font parties les MT, puis les échantillons sont replacés dans la glace. Les MT sont ensuite récupérées dans le surnageant après une centrifugation à 15 000 g pendant 10 minutes à 4 °C. Au sein du polarographe thermostaté à 4 °C, 10 mL de solution Bridcka (hexamine de cobalt, chlorure d'ammonium et hydroxyde d'ammonium) et 150 µL de Triton y sont introduit. Le rôle du Triton consiste à éliminer la vague négative engendrée par la présence du cobalt et ainsi limiter les biais de mesure. Après calibration du polarographe, l'échantillon est ajouté et une double mesure effectuée, le volume d'échantillon ajouté dépend de l'organe. La quantité de métallothionéines est ensuite déterminée en comparant les valeurs obtenues avec une droite d'étalonnage préalablement réalisée via une gamme de MT de concentration connue.

## 2.2. Analyse de l'expression relative des gènes

Afin d'analyser l'expression des gènes, les ARN totaux sont récupérés selon la méthode d'extraction au phénol-chloroforme. Pour ce faire, les échantillons sont broyés pendant 2 cycles de 30 secondes à 30 Hz dans 0.5 à 1 mL de Tri Reagent selon la biomasse de tissus récupérés. Après ajout de 0.1 à 0.2 mL de chloroforme et 15 minutes à température ambiante, les échantillons sont centrifugés à 12 000 g pendant 15 minutes à 4 °C et la phase aqueuse contenant les ARN est récupérée. Afin de faire précipiter ces ARN, 0.250 à 0.5 mL d'isopropanol sont ajoutés aux échantillons, suivi d'une incubation de 10 minutes à température ambiante et d'une centrifugation à 12 000 g pendant 8 minutes à 4 °C. Le culot est resuspendu dans 0.5 à 1 mL d'éthanol à 75 %, centrifugé à 7 500 g pendant 5 minutes à 4 °C, séché à l'air et resuspendu dans 50 µL d'eau RNase-free pour préserver l'intégralité des ARN.



Après l'extraction, les ARN sont quantifiés et la pureté vérifiée via le spectrophotomètre Genova Nano à 230, 260 et 280 nm puis dilués à 200 ng/μL.

Le niveau d'expression des gènes est ensuite analysé via une rt-qPCR. Dans un premier temps, les ARN totaux sont rétro-transcrit en ADNc à l'aide du kit Verso cDNA Synthesis. La réaction se déroule dans le milieu réactionnel (Tab I.) pendant 30 minutes à 42 °C suivie d'une inactivation pendant 2 minutes à 95 °C. Une fois les ADNc obtenus, une qPCR est réalisée pour amplifier les séquences d'intérêts sur l'appareil CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) avec comme programme : dénaturation pendant 15 minutes à 95 °C, 40 cycles d'amplification de 10 secondes à 95 °C et 1 minute à 60 °C ou 65 °C selon les amorces. Le mix réactionnel est composé de 4 μL de Mix (Absolute Blue qPCR SYBR Green ROX 1X et amorce à 0.3 ou 0.6 μM, Tab II), 1 μL d'ADNc dilué au 1/10. Des témoins négatifs sont également réalisés (ARN non rétro-transcrits et eau). Enfin, l'efficacité de la PCR est vérifiée à l'aide d'une gamme de dilution pour chaque gène étudié. L'expression relative de gène initialement présent dans l'échantillon est déterminée à l'aide de la méthode  $\Delta\Delta CT$ .

### **2.3. Analyse statistique**

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R version 4.2.1. Le test de Shapiro Wilk a été effectué pour déterminer la normalité des données, suivis du test de Brown-Forsythe pour vérifier l'homogénéité des variances entre les différents groupes. Après validation de ces deux conditions, un test Anova de type 2 est réalisé suivi d'un test post-hoc de Tukey. Dans le cas où une des deux conditions n'était pas validée, un test Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Wilcoxon avec correction de hochberg a été réalisé.

**Tableau I** – Milieu réactionnel de la reverse transcription

Composant	Volume
ARN calibré à 200 ng/mL	2 µL
Tampon Verso	4 µL
dNTP à 5 M	2 µL
Amorces (hexamères aléatoire et oligo-dt, v/v 3 :1)	1 µL
Activateur de rétrotranscription	1 µL
Reverse Transcriptase Verso	1 µL
Eau ultrapure	Qsp 20 µL

**Tableau II** – Couple d’amorces utilisés

Gène	Séquence 5' - 3'	Amplicon	Concentration finale	Température d'hybridation
actine-F	CCTCACCTCAAGTACCCCAT	153 pb	0.6 µM	65 °C
actine-R	TTGGCCTTTGGGTGAGTG			
protéine ribosomale S3-F	CACCGACCCGCACTGAGA	172 pb	0.3 µM	65 °C
protéine ribosomale S3-R	ATGGCACACAGACCACGAG			
cat-F	ACGGCTATGGAAGCCACACG	157 pb	0.3 µM	65 °C
cat-R	AGGTCGCGCATCGCATAGTC			
gst-F	TCCGCTATATCTGCCTGGAC	186 pb	0.6 µM	60 °C
gst-R	GCTCCTTCAGACCTGCTTTC			
mt-F	GCGTTGAAACCGGTGATTGC	104 pb	0.6 µM	60 °C
mt-R	GCCACAACAGTTGGGTTTGC			
sod-F	GACAGCATGGCTTCCATGTG	212 pb	0.3 µM	65 °C
sod-R	AGATTCTGGGCCAGTCAGAG			

### 3. Résultat

#### 3.1. Mise au point de la mesure de l'activité SOD

Une mise au point du protocole de dosage de l'activité SOD est nécessaire afin de déterminer la dilution optimale des échantillons. Une dilution inappropriée pouvant sous-estimer l'activité initiale des échantillons. On détermine la concentration enzymatique la plus faible donnant l'activité maximale (Tab III.).

**Tableau III :** Evolution de l'activité SOD en fonction du facteur de dilution appliqué aux échantillons testés

Facteur de dilution	Activité de la SOD (U/mM)			
	Branchies exposées au Hg	Branchies contrôles	Glandes digestives exposées au Hg	Glandes digestives contrôles
6	19,9	18,1	19,1	20,0
8	23,5	21,1	22,2	24,4
10	26,8	21,2	24,3	27,3
20	32,6	23,9	28,3	35,0
40	34,3	26,3	34,7	39,7
80	34,0	26,7	35,6	34,0
100	32,4	24,8	29,9	35,4

Cette analyse a permis de sélectionner un facteur de dilution optimal de 40x. Un facteur inférieur entraîne une sous-estimation de l'activité de la SOD, principalement liée à la présence d'inhibiteur enzymatique, et un facteur de dilution trop élevé engendre également une sous-estimation de l'activité causée par un signal trop faible.

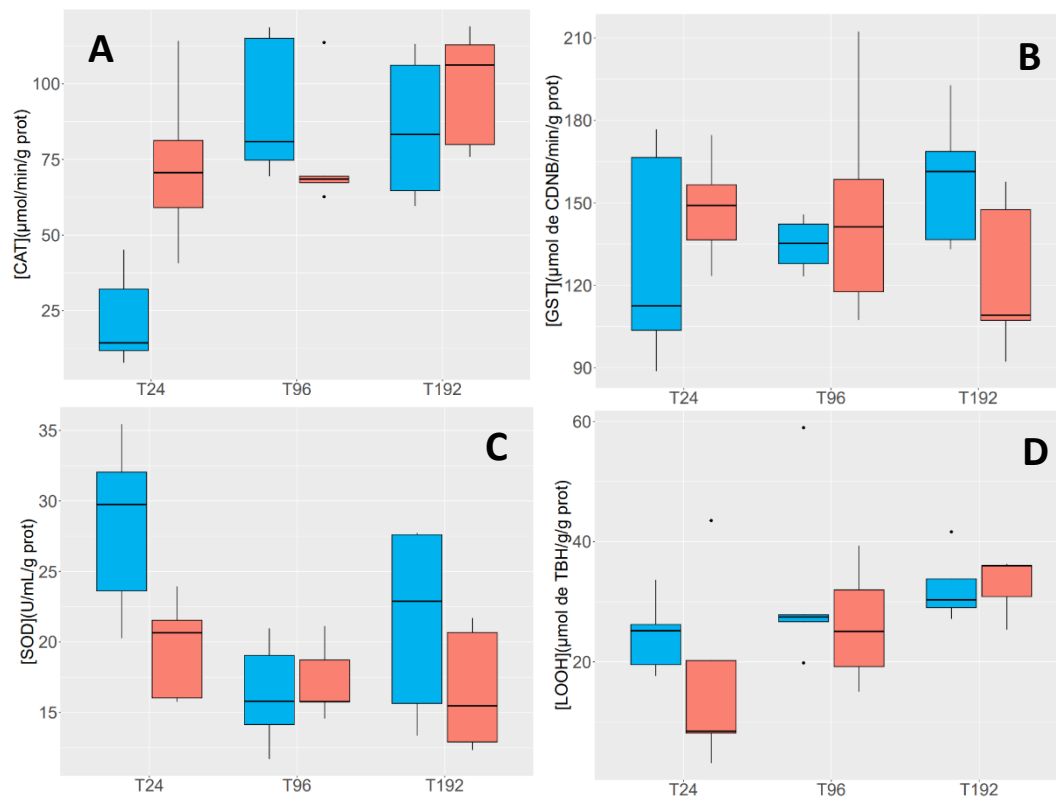
#### 3.2. Analyse biochimique

##### 3.2.1. Exposition en laboratoire

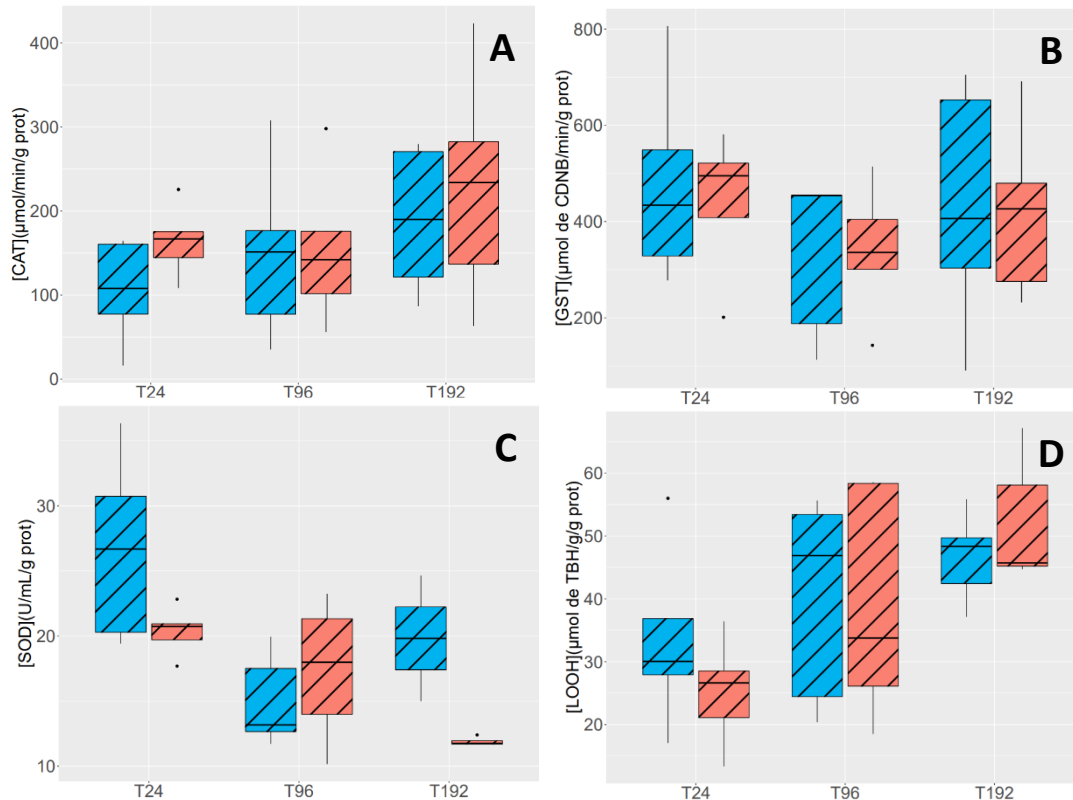
L'activité SOD, CAT, GST ainsi que la quantité de LOOH sont mesurés dans chaque organe à 24h et 96h d'exposition aux microalgues contaminées à l'IHg et MeHg (respectivement 2 et 0,2 fg/cellule) puis 96h après dépuración.

##### 3.2.1.1. Branchies

Après 24h d'exposition, une augmentation de l'activité de la CAT est observée dans les branchies (3,29x) comparée au contrôle. Cette augmentation n'est plus observée après 96h d'exposition et 96h de dépuración (figure 2A). Concernant l'activité de la GST, après exposition aux microalgues contaminées, peu d'effets sont observés en fonction du temps et des conditions d'expositions (figure 2B). Une diminution de l'activité de la SOD est observée à 24h d'exposition dans les branchies (0,69x) comparée aux individus contrôles (figure 2C). Enfin, la quantité de LOOH semble augmenter au cours du temps pour chaque condition sans différence marquée entre les exposés et les contrôles (figure 2D).



**Figure 2 :** Activité de la CAT (A), GST (B), SOD (C) et quantité de LOOH (D) dans les branchies de *D. polymorpha* en fonction du temps (24h, 96h d'exposition et 96h de dépuration notée 192h). Bleu : organismes contrôles, rouge : organismes exposés (n = 5).



**Figure 3 :** Activité de la CAT (A), GST (B), SOD (C) et quantité de LOOH (D) dans les glandes digestives de *D. polymorpha* en fonction du temps (24h, 96h d'exposition et 96h de dépuration notée 192h). Bleu : organismes contrôles, rouge : organismes exposés (n = 3 à 5).

### **3.2.1.2. Glandes digestives**

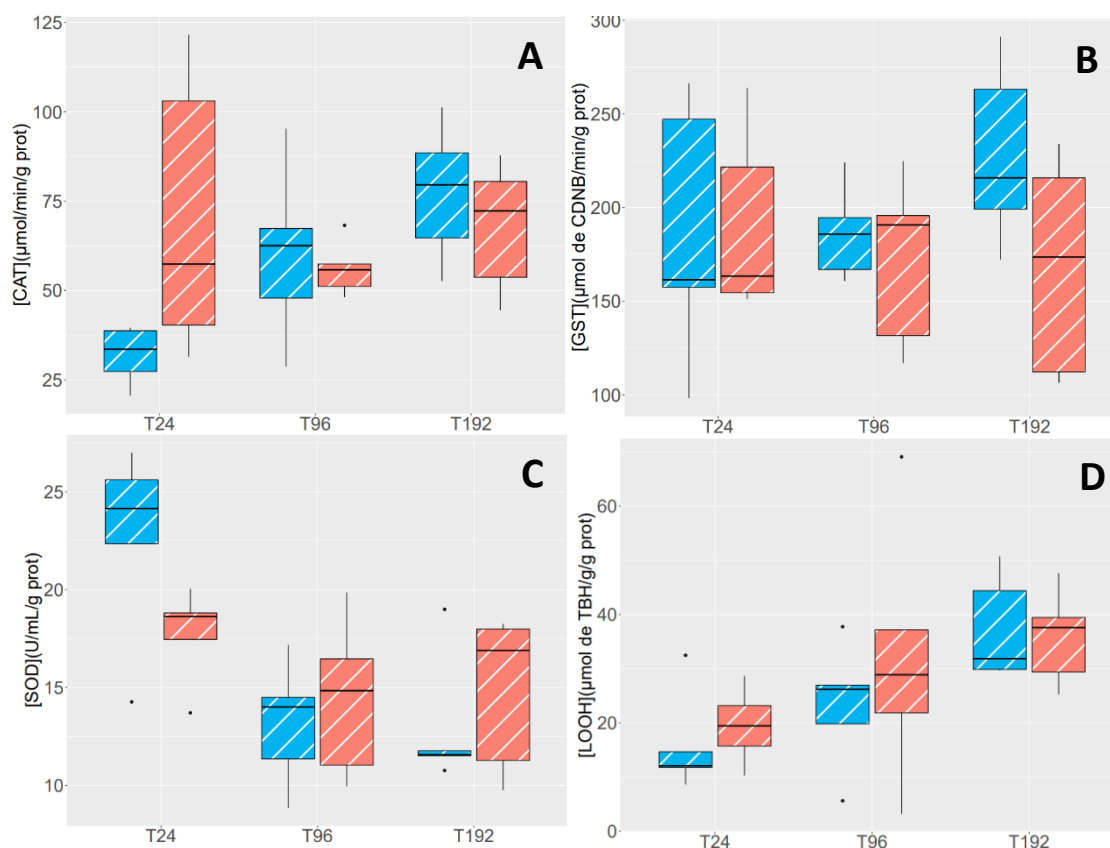
Une tendance à l'augmentation de l'activité de la CAT est observée dans les glandes digestives lors de la dépuración sans différence marquée entre les exposés et les contrôles (figure 3A). Pour la GST, une tendance à la diminution des écarts-types dans les glandes digestives est observée (figure 3B). Une diminution de l'activité de la SOD est observée à 24h d'exposition dans les glandes digestives (0,89x) comparée aux individus contrôles (figure 3C) et après dépuración (0,74x). Enfin, la quantité de LOOH augmente au cours du temps pour chaque condition sans différence marquée entre les exposés et les contrôles tout comme ce qui a été observé pour les branchies (figure 3D).

### **3.2.1.3. Restes**

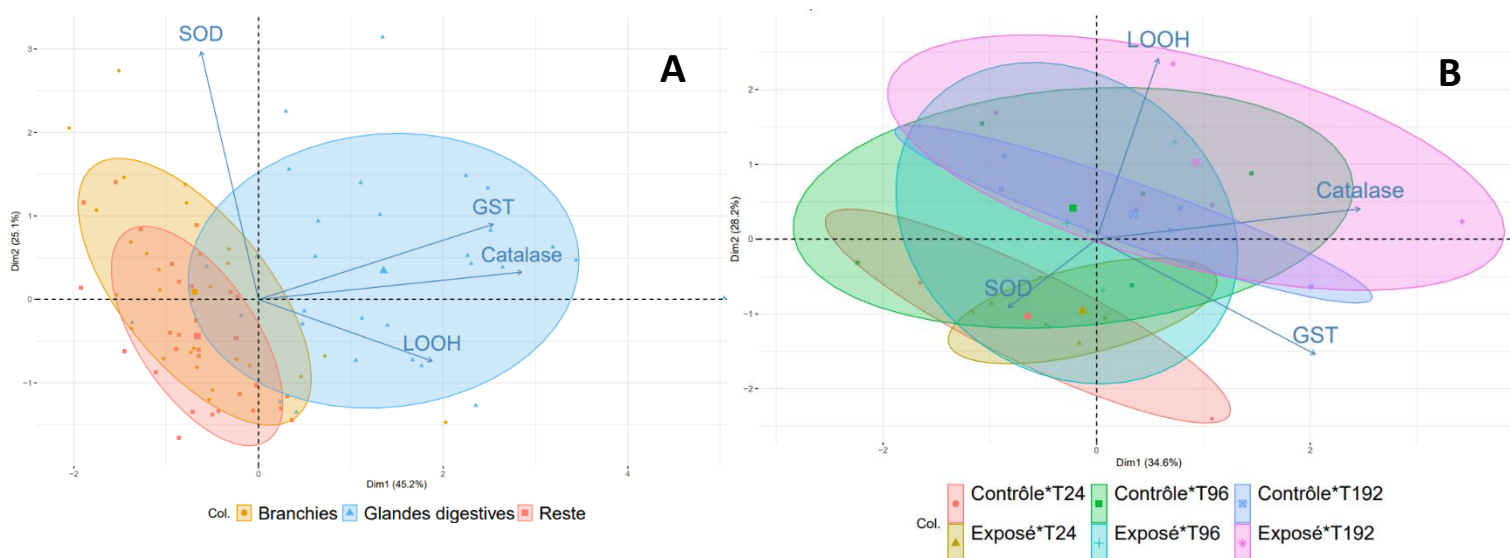
Après 24h d'exposition, une augmentation de l'activité de la CAT est observée dans les restes (2,21x) comparée au contrôle (figure 4A). Une diminution de l'activité de la GST est observée dans les restes pendant la dépuración (0,74x) à la suite d'une exposition aux algues contaminées aux mercures (figure 4B). Une diminution est observée dans les restes à 24h d'exposition (0,78x) comparée aux individus contrôles (figure 4C). Concernant la quantité de LOOH, le même comportement est observé que pour les autres tissus avec une tendance à l'augmentation au cours du temps sans différence marquée entre les exposés et les contrôles (figure 4D).

### **3.2.1.4. Analyse en composante principale**

Une analyse multivariée a été réalisée compte tenu de l'absence d'effet significatif obtenu précédemment par analyse univariée. L'ACP prenant en compte l'ensemble des données suggère une corrélation entre l'activité de la CAT et de la GST et l'abondance de LOOH (figure 5A). De plus, les biomarqueurs paraissent être plus actifs dans les glandes digestives (figure 5A). De ce fait, une analyse multivariée se concentrant sur les glandes digestives a aussi été réalisée (figure 5B). La corrélation entre l'activité de la CAT, de la SOD et l'abondance de LOOH semble plus faible au niveau des glandes digestives avec cette fois-ci une corrélation négative entre l'activité de la SOD et celle de la CAT. De plus, l'activité de la CAT et l'abondance de LOOH augmentent au cours du temps sans distinction entre le groupe contrôle et exposé, à l'exception d'une légère différence à T192 correspondant à la dépuración (figure 5B). L'exposition aux algues contaminées au Hg dans nos conditions expérimentales semble provoquer une production d'ERO, notamment dans les glandes digestives, qui altère légèrement les marqueurs biochimiques testés, sans que le Hg semble causer de stress oxydatif. Ainsi, l'exposition paraît tolérée et ne pas dépasser la capacité de tolérance de *D. polymorpha*.



**Figure 4 :** Activité de la CAT (A), GST (B), SOD (C) et quantité de LOOH (D) dans les restes de *D. polymorpha* en fonction du temps (24h, 96h d'exposition et 96h de dépuración notée 192h). Bleu : organismes contrôles, rouge : organismes exposés (n = 5).



**Figure 5 :** Analyse en composantes principales des différentes analyses biochimiques en laboratoire en fonction des organes (A) et sur les glandes digestives en fonction des différentes conditions d'expositions (B).

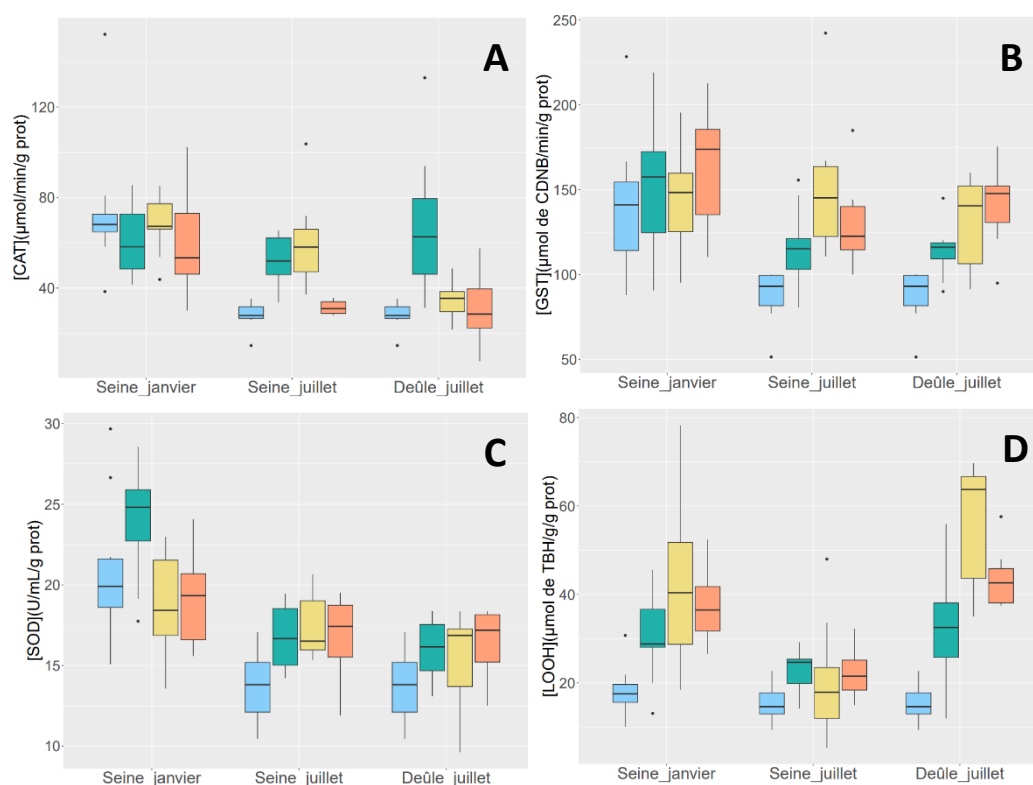
### **3.2.2. Activité enzymatique de l'exposition *in situ***

#### **3.2.2.1. *Les branchies***

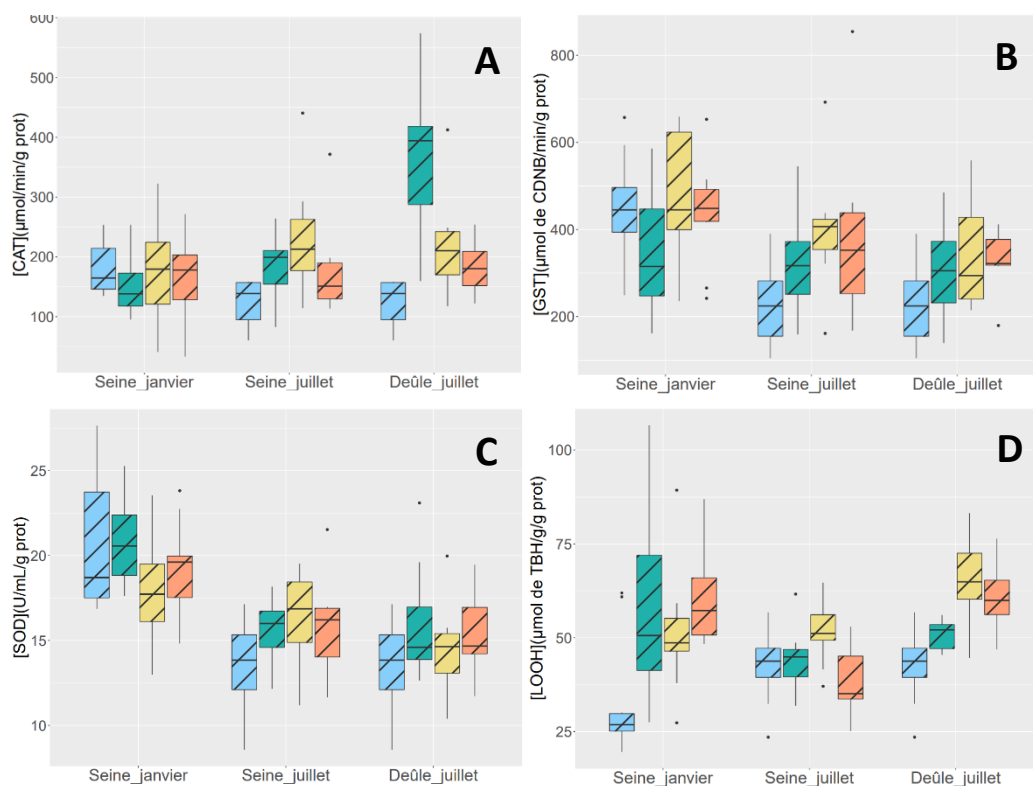
L'activité de la CAT après une semaine d'exposition dans la Seine et la Deûle en juillet est respectivement 1,86x et 2,43x plus élevée que le T0. Cette augmentation est maintenue après deux semaines pour la Seine (figure 6A). Une tendance à la hausse de l'activité de la GST est observée pour les expositions sur les deux sites en juillet jusqu'à atteindre une activité 1,51x plus élevée pour la Seine et 1,61x plus élevée pour la Deûle comparé au T0 (figure 6B). Concernant l'activité de la SOD, les effets sont également plus prononcés pour les deux sites en juillet avec une légère augmentation de l'activité à partir d'une semaine qui est maintenue le reste du temps (figure 6C). Le niveau d'activité de la CAT, GST et SOD est respectivement 2,66x, 1,60x et 1,53x supérieur en janvier qu'en juillet à T0. La quantité de LOOH est supérieure pour la Seine en janvier, et la Deûle en juillet jusqu'à atteindre après 3 semaines d'expositions une abondance 2,06x supérieure pour la Seine et 2,80x supérieure pour la Deûle (figure 6D).

#### **3.2.2.2. *Les glandes digestives***

L'activité de la CAT augmente en juillet dans la Seine et la Deûle. Elle est 2,92x plus élevée pour la Deûle après une semaine d'exposition, mais ne persiste pas au temps suivant (figure 7A). Concernant l'activité de la GST, une tendance à la hausse au cours du temps est observée pour les deux sites en juillet (figure 7B). Après 3 semaines, l'activité de la GST est 1,85x supérieure pour la Seine et 1,81x supérieur pour la Deûle en juillet. La même tendance est observée pour l'activité de la SOD avec une légère augmentation de l'activité à partir d'une semaine qui est maintenue au cours du temps pour la Seine et la Deûle en juillet (figure 7C). Enfin, la quantité de LOOH est 1,83x supérieure pour la Seine en janvier, et 1,44x supérieure pour la Deûle en juillet après 3 semaines d'exposition et une légère augmentation à T2 dans la Seine en juillet (figure 7D). Tout comme pour les branchies, le niveau basal de l'activité de la CAT, la GST et la SOD est supérieur (respectivement 1,46x, 1,95x et 1,53x) en janvier par rapport à juillet dans la Seine.



**Figure 6 :** Activité de la CAT (A), GST (B), SOD (C) et quantité de LOOH (D) dans les branchies en fonction des conditions d'exposition (Seine en juillet ou janvier et Deûle en juillet). Bleu : T0, vert : T1 semaine, jaune : T2 semaine, orange : T3 semaine (n = 6 à 10).



**Figure 7 :** Activité de la CAT (A), GST (B), SOD (C) et quantité de LOOH (D) dans les glandes digestives en fonction des conditions d'exposition (Seine en juillet ou janvier et Deûle en juillet). Bleu : T0, vert : T1 semaine, jaune : T2 semaine, orange : T3 semaine (n = 6 à 10).

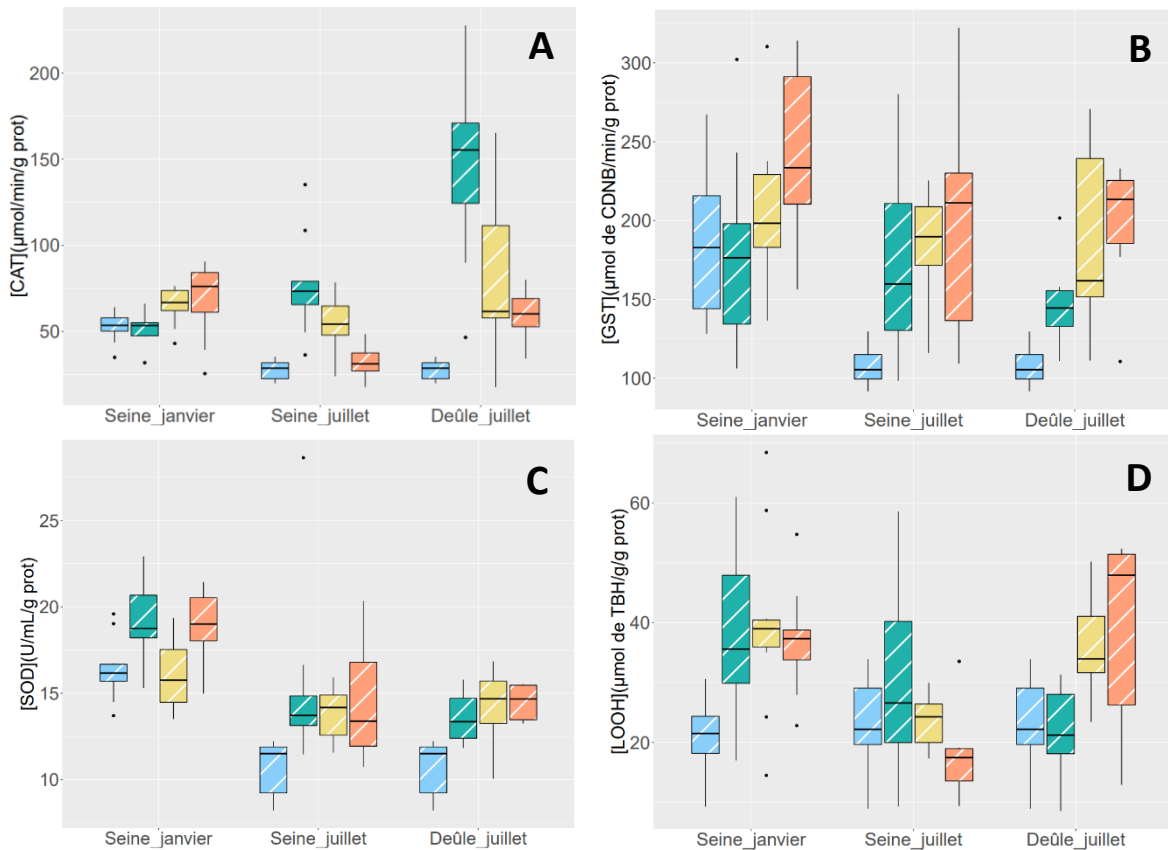


### 3.2.2.3. *Les restes*

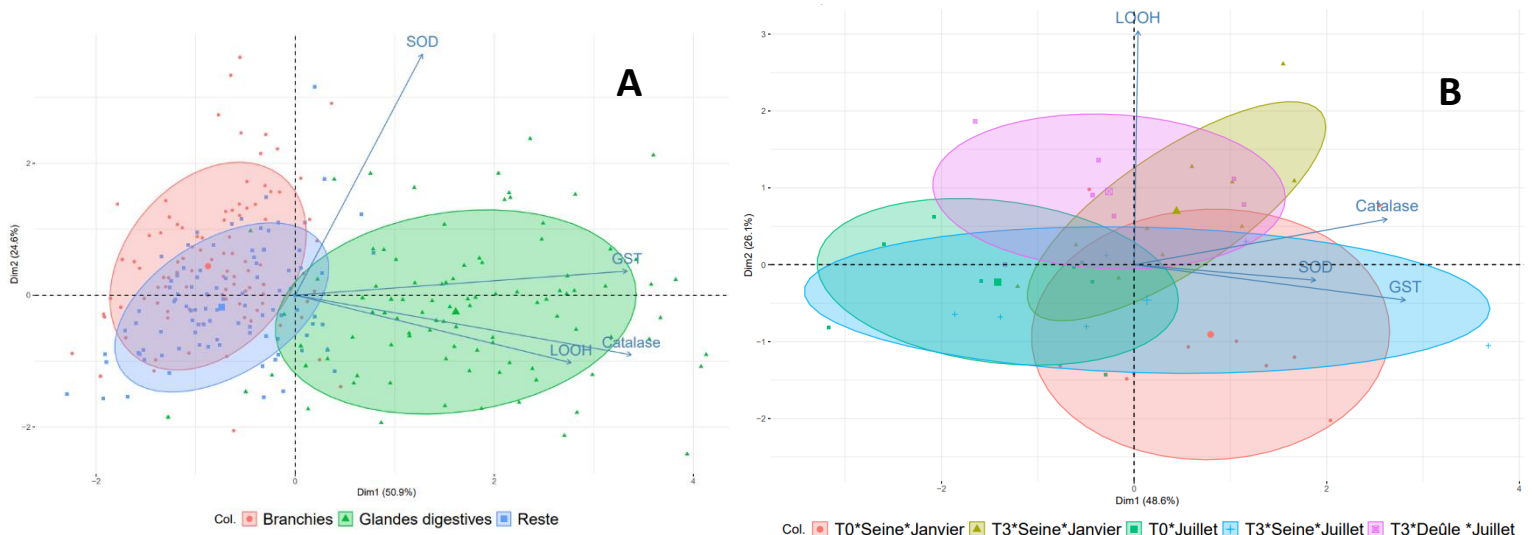
L'activité de la CAT est 2,76x supérieure pour la Seine en Juillet et 5,22x supérieure pour la Deûle en juillet après 1 semaine d'exposition, l'activité diminue ensuite progressivement au cours du temps (figure 8A). Pour la Seine en janvier, l'activité CAT est supérieure à T2 et T3. Pour l'activité de la GST, des écart-types importants sont observés ainsi qu'une augmentation au cours du temps. L'activité est 1,31x supérieure pour la Seine en janvier, 1,85x supérieure pour la Seine en juillet et 1,81x supérieure pour la Deûle après 3 semaines d'exposition (figure 8B). Comme pour les autres tissus, l'activité de la SOD augmente après une semaine d'exposition et se stabilise pour la Seine et la Deûle en juillet aux temps plus longs (figure 8C). La quantité de LOOH augmente de 1,76x pour la Seine en janvier et 1,68x pour la Deûle en juillet après 3 semaines d'exposition (figure 8D). Pour la Seine en juillet à T3, la quantité de LOOH diminue de 0,79x. Le niveau basal de l'activité de la CAT, GST, SOD est également plus élevé en janvier qu'en juillet pour la Seine (respectivement 1,90x, 1,72x et 1,54x).

### 3.2.2.4. *Analyse en composante principale*

Les analyses univariées n'ayant pour le moment pas été réalisées, nous avons choisi une analyse multivariée pour visualiser les différents organes, sites et dates. Les ACP sont représentatives de près de 60% de la variabilité. Les activités de la CAT et de la GST semblent être corrélées avec l'abondance de LOOH (figure 9A). De plus, les biomarqueurs semblent être plus marqués dans les glandes digestives (figure 9A). Nous avons donc choisi les glandes digestives pour représenter la variabilité des sites à 3 semaines (figure 9B). Au niveau des glandes digestives, une corrélation est observée entre l'activité des trois enzymes antioxydantes testées (figure 9B). C'est l'exposition Deûle juillet qui semble la plus différente de T0 juillet. Il apparaît également que les T0 juillet et T0 janvier sont distincts sur ces réponses biologiques. L'exposition *in situ*, dans nos conditions expérimentales, semble provoquer une production de ERO, notamment au niveau des glandes digestives, qui altère les marqueurs biochimiques testés et cause un stress oxydatif chez *D. polymorpha*, mais l'ACP suggère des différences assez faibles entre les groupes (figure 9B).



**Figure 8** : Activité de la CAT (A), GST (B), SOD (C) et quantité de LOOH (D) dans les restes en fonction des conditions d'exposition (Seine en juillet ou janvier et Deûle en juillet). Bleu : T0, vert : T1 semaine, jaune : T2 semaine, orange : T3 semaine (n = 6 à 10).



**Figure 9** : Analyse en composantes principales des différentes analyses biochimiques *in situ* en fonction des organes (A) et sur les glandes digestives en fonction des différentes conditions d'expositions à T0 et T3 semaines (B).

### 3.3. Analyse moléculaire *in situ*

Une analyse de la réponse moléculaire au niveau des gènes de défense a été réalisée par RT-qPCR. Les analyses statistiques étant en cours de réalisation, seules les tendances seront décrites avec un seuil  $\geq 2$  de régulation. Au niveau de la Deûle en juillet, une diminution de l'expression de la mt est observée pour tous les temps au niveau des branchies (Tab VI.). Cette diminution est également présente à T1 pour les restes. Une augmentation de l'expression relative de la cat est observée au niveau des glandes digestives à T2 et T3. Une tendance à l'augmentation de l'expression de la sod est observée pour tous les temps et tous les tissus avec des effets plus importants à T2 et T3 pour les glandes digestives. Enfin, l'expression de la gst semble augmenter à T2 et T3 pour les glandes digestives (Tab VI.).

Concernant la Seine en juillet, l'expression relative de mt diminue à T2 pour les branchies et les restes. L'expression de la cat semble faible notamment à T2 pour les glandes digestives. Concernant l'expression de la cat, celle-ci semble augmenter dans les glandes digestives principalement à T2. L'expression de la sod paraît supérieur à T1 également pour les glandes digestives. Enfin, l'expression de la gst semble décroître au cours du temps au niveau des branchies notamment à T3 alors qu'une forte augmentation est observée à T1 au niveau des glandes digestives (Tab VI.).

**Tableau VI** : Niveau d'expression relatif des gènes mt, cat, sod et gst au niveau des différents tissus de *D. polymorpha* en fonction des conditions d'expositions (mean  $\pm$  SEM, n = 3 à 5 ; en jaune  $\geq 2$ ).

	Seine juillet				Deûle juillet		
	T0	T1	T2	T3	T1	T2	T3
<b>Branchie</b>							
mt	1 (0,76-1,32)	0,71 (0,33-1,56)	0,47 (0,32-0,70)	0,65 (0,47-0,89)	0,31 (0,25-0,38)	0,51 (0,38-0,68)	0,45 (0,39-0,51)
cat	1 (0,82-1,22)	0,86 (0,62-1,20)	0,63 (0,54-0,73)	0,52 (0,44-0,61)	0,61 (0,48-0,77)	0,77 (0,68-0,88)	0,79 (0,67-0,93)
sod	1 (0,65-1,55)	2,55 (1,84-3,53)	1,68 (1,44-1,96)	1,54 (1,29-1,84)	1,31 (1,13-1,51)	3,66 (2,74-4,89)	1,57 (1,03-2,38)
gst	1 (0,62-1,62)	1,11 (0,88-1,40)	0,72 (0,54-0,96)	0,31 (0,26-0,37)	0,53 (0,41-0,68)	0,76 (0,64-0,89)	0,55 (0,49-0,61)
<b>Glande digestive</b>							
mt	1 (0,87-1,15)	0,82 (0,54-1,23)	0,61 (0,52-0,72)	0,71 (0,58-0,86)	0,52 (0,44-0,61)	1,11 (0,91-1,37)	0,98 (0,78-1,22)
cat	1 (0,83-1,20)	1,64 (1,26-2,14)	2,01 (1,62-2,49)	1,68 (1,62-1,75)	1,28 (1,09-1,52)	2,06 (1,81-2,35)	2,16 (1,73-2,69)
sod	1 (0,78-1,28)	0,87 (0,39-1,93)	1,60 (1,34-1,92)	1,30 (1,17-1,44)	1,24 (1,07-1,44)	3,39 (2,58-4,45)	2,65 (2,13-3,29)
gst	1 (0,83-1,20)	3,65 (2,26-5,91)	1,91 (1,46-2,49)	1,11 (0,97-1,27)	1,36 (1,01-1,84)	2,46 (1,95-3,10)	2,23 (1,75-2,83)
<b>Reste</b>							
mt	1 (0,85-1,17)	0,79 (0,45-1,37)	0,37 (0,28-0,50)	0,57 (0,40-0,80)	0,43 (0,39-0,48)	0,67 (0,53-0,85)	0,83 (0,76-0,91)
cat	1 (0,81-1,23)	1,35 (0,87-2,07)	1,06 (0,95-1,18)	0,99 (0,85-1,15)	0,63 (0,52-0,76)	1,59 (1,36-1,86)	1,56 (1,14-2,13)
sod	1 (0,81-1,24)	1,40 (1,01-1,94)	1,15 (1,04-1,28)	1,54 (1,23-1,91)	1,43 (1,23-1,66)	2,61 (1,98-3,43)	2,20 (1,81-2,66)
gst	1 (0,84-1,19)	2,11 (1,46-3,06)	1,36 (1,21-1,53)	0,94 (0,83-1,06)	1,15 (0,82-1,61)	2 (1,60-2,51)	1,88 (1,42-2,49)

## 4. Discussion

### 4.1. Exposition en laboratoire

#### 4.1.1. Analyse biochimique

Plusieurs études ont déjà été réalisées dans l'objectif de caractériser les effets délétères probables du IHg et MeHg chez quelques organismes aquatiques. Chez *Tigriopus japonicus*, une espèce marine de copépode, une exposition directe au MeHg allant de 1 à 1 000 ng/L a démontré une augmentation significative du niveau d'ERO dès la plus faible concentration (1,2x) et de façon dose dépendante. Concernant l'activité des enzymes antioxydantes, une augmentation significative de l'activité de la GST est observée dès la plus faible concentration (1,2x), tandis qu'une diminution également significative de la SOD apparaît après 500 ng/L de MeHg (0,8x) (Lee et al. 2017). La même tendance est observée chez une espèce de rotifères utilisée en écotoxicologie, *Brachionus plicatilis*. Chez cet organisme, une augmentation d'ERO significative survient à partir de 10 ng/L de MeHg (1,1x) également de façon dose dépendante. En parallèle, l'exposition à cette même concentration induit chez *B. plicatilis* une augmentation significative de l'activité de la GST (1,13x) (Lee et al. 2017). Des études ont également été réalisées chez des espèces de bivalve souvent utilisé comme espèce sentinelle. Chez *Mytilus galloprovincialis*, la moule méditerranéenne, une augmentation significative de l'activité de la SOD (2,17x) et de la CAT (3,57x) a été démontrée après exposition pendant 28 jours à 50 µg/L de Hg (Coppola et al. 2020). Chez *D. polymorpha*, une augmentation significative de l'activité de la SOD (1,5x) dans les branchies est relatée après 7 jours d'exposition à 280 ng/L de MeHg, sans aucun effet sur l'activité de la CAT et la GST, malgré une légère tendance à la hausse pour cette dernière dans les glandes digestives dès les premiers jours d'exposition. Il en a été conclu que la production d'ERO, engendrée par l'exposition au MeHg à la concentration de 280 ng/L, n'engendrait pas de peroxydation lipidique ou de dérégulation du système antioxydant (Baratange et al. 2022). Ces études suggèrent une variation des réponses enzymatiques en fonction de la forme de Hg, IHg ou MeHg, et également de l'organisme testé. Cependant, les expositions au Hg dans ces études sont faites par l'eau. Notre étude portant sur l'organisme *D. polymorpha* exposé par voie trophique, les réponses mesurées devraient se rapprocher de l'article Baratange et al. (2022) bien que nos conditions de départ varient.

Dans nos conditions d'exposition, une augmentation de l'activité de la CAT est observée après 24h, une diminution de celle de la SOD est également présente dans les premiers temps d'exposition comparés aux contrôles, et ce, pour les différents tissus. Peu d'effets sont observés concernant la GST également pour les différents tissus. Enfin, la tendance à l'augmentation de la LOOH au cours du temps ne semble pas liée à la présence de Hg, mais pourrait être davantage attribuée aux conditions d'expositions en elle-même. L'absence de différence entre les individus contrôles et exposés confortant cette hypothèse. Ainsi, l'exposition aux microalgues contaminées au IHg et MeHg dans nos conditions expérimentales semble provoquer une production d'ERO qui altère les marqueurs biochimiques testés à 24h, mais sans causer de stress oxydatif, ce qui est cohérent avec la concentration réaliste utilisée sur une durée de 4 jours. Les analyses suggèrent donc que l'exposition ne semble pas dépasser la tolérance de *D. polymorpha*. Concernant les différents tissus, il semble y avoir un niveau basal plus important des biomarqueurs testés au niveau des glandes digestives,

probablement due à l'activité enzymatique importante dans cette organe lié à sa fonction. Des variations dans les réponses sont également observées entre les différents tissus. Des études ont démontrées une plus grande sensibilité des branchies concernant les réponses antioxydantes chez *D. polymorpha* (Contardo-Jara et al. 2009). De plus, les différences de réponses entre les tissus pourraient être en partie liées au transfert trophique. En effet, le Hg contenu dans les microalgues entre en contact avec l'organisme après la digestion de ces microalgues au niveau des glandes digestives.

#### **4.1.2. Analyse moléculaire**

L'expression de gène étant souvent considérée comme plus sensible que l'analyse de l'activité enzymatique, cette méthode est souvent utilisée pour déterminer des effets précoces liés à la présence de contaminant en faible concentration. Cependant, il est important de noter que les réponses moléculaires des enzymes antioxydantes ne sont souvent pas corrélées avec les changements biochimiques observés (Regoli et al. 2011; Benedetti et al. 2015). Cette différence étant due à plusieurs facteurs tels que la stabilité des ARNm, ou encore le turnover des enzymes antioxydantes (Benedetti et al. 2015). L'influence du Hg sur l'expression de gène varie selon les conditions d'expositions, les organismes testés, mais également les organes. En effet chez le poisson zèbre, il a été démontré qu'une exposition au MeHg induit une augmentation de l'expression de sod dans les testicules, mais pas dans les ovaires (Q.-F. Zhang et al. 2016). Chez *D. polymorpha*, peu d'effet ont été relaté concernant l'expression de cat, gst et sod suite à une exposition au MeHg à hauteur de 460 ng/L (Baratange et al. 2023). Sachant que les concentrations en MeHg utilisées pour notre étude sont bien inférieures, peu d'effet sont attendu sauf en cas d'influence du transfert trophique. Les résultats portants sur l'expression de gène de l'exposition en laboratoire sont en cours de traitement. Cependant les résultats préliminaires, notamment biochimiques, suggèrent la mise en place d'une réponse antioxydante. Des effets de cette exposition sont donc probable au niveau des gènes étudiés, et plus particulièrement au niveau des glandes digestives.

#### **4.1.3. Une approche réaliste**

Des réponses biochimiques et moléculaires faibles étaient attendues compte tenu des concentrations choisies. En effet, les concentrations utilisées sont plus faibles que celles testées dans la grande majorité des études (Sarmiento et al. 2004; Lee et al. 2017; Coppola et al. 2020; Baratange et al. 2022), et la contamination au Hg a été réalisée par transfert trophique. En sachant que les microalgues étaient contaminées à hauteur de 2 fg d'IHg /cellule et 0,2 fg de MeHg/cellule avec une quantité de  $10^6$  algues par moule par jour, les individus ont été contaminés avec une valeur théorique équivalente à 2 ng d'IHg et 0,2 ng de MeHg par jours. La PNEC calculée par l'INERIS étant de 80 ng d'IHg/L et 3 ng de MeHg/L, dans nos conditions d'exposition avec un volume de 45 mL (figure 1), la PNEC correspond dans nos tubes à 3,6 ng d'IHg et 0,135 ng de MeHg. Nos conditions dépassent donc légèrement la PNEC pour le MeHg et s'approche de la PNEC pour IHg. Néanmoins, il est important de prendre en compte que la PNEC représente une concentration dans l'eau, alors que notre concentration a pour origine le transfert trophique. De plus, en prenant en compte la bioaccumulation des organismes, la plus forte concentration observée atteignait 0,02 µg de IHg/g de poids sec et 0,0025 µg de

MeHg/g de poids sec (Annexe 1, figure 10). Une étude ayant réalisé un suivi de la bioaccumulation de Hg chez *D. polymorpha* au niveau de plusieurs rivières d'EU a démontré des concentrations allant de 0,05 à 0,25 µg de THg/g de poids sec (Lepom et al. 2012). Les concentrations utilisées pour cette étude sont donc réalistes car proche de la PNEC et des concentrations environnementales retrouvées chez la même espèce. Cette étude, réalisée dans des conditions contrôlées en laboratoire, mais prenant en compte des concentrations réalistes en Hg et intégrant le transfert trophique, démontre des effets faibles chez *D. polymorpha* malgré quelques tendances observées au niveau des biomarqueurs analysés.

## **4.2. Exposition in situ**

### **4.2.1. Analyse biochimique**

Concernant les expositions *in situ*, les organismes ont été encagés sur deux sites et deux périodes. Des variations au sein des biomarqueurs analysés ont majoritairement lieu pendant la période de juillet comparé aux données obtenues pendant les expositions de janvier. Ainsi, pendant cette période, l'activité des trois enzymes antioxydantes testées semble augmenter après une semaine d'exposition. A l'inverse, de la peroxydation lipidique était observée pendant la période de janvier. Cette augmentation est probablement liée à la production d'ERO et donc à un stress oxydatif. L'absence de modulation des enzymes anti-oxydantes en janvier sous-entend l'absence de stress oxydatif pendant cette période, ce qui est contradictoire avec la présence de peroxydation lipidique. Plusieurs hypothèses existent pour expliquer la différence de réponse entre les expositions en juillet et en janvier. En effet, l'activité enzymatique des enzymes antioxydantes peut varier en fonction de plusieurs facteurs tels que la présence de contaminant, la température de l'eau ou encore la période de reproduction (Lam 2009). Il a été démontré chez *Semibalanus balanoides* que l'activité de la GST atteignait son maximum entre mars et juin et son minimum entre novembre et février. De plus, une meilleure corrélation positive était observée entre la présence de contaminant et l'activité de la CAT et la SOD lorsque l'activité de la GST était plus élevée. Ainsi pendant les périodes de faible activité des enzymes antioxydantes, la peroxydation lipidique était plus importante (Niyogi et al. 2001). En transposant ces observations à nos résultats, et en gardant à l'esprit qu'il existe sûrement des variations interspécifiques, et que nous n'avons qu'une vision partielle de l'exposome dans ces rivières, cela pourrait expliquer pourquoi les variations des activités antioxydantes sont observées en juillet et une peroxydation lipidique en janvier. Plusieurs études tendraient à renforcer cette hypothèse. En effet, il a été démontré chez *D. polymorpha* une corrélation positive entre la température et l'activité de la GST, et l'absence de variation de l'activité de la CAT et de GST à des températures inférieures à 20°C (Contardo-Jara et al. 2009; Palais et al. 2012), montrant potentiellement un lien entre activité métabolique et température.

L'activité antioxydante de *D. polymorpha* réagit à différents polluants communément retrouvés dans l'environnement tel que les PCB, le DDT, le HCH ou divers métaux (Contardo-Jara et al. 2009). Il est donc nécessaire d'établir une corrélation avec la bioaccumulation du Hg chez les organismes tout en déterminant l'origine de cette bioaccumulation. Les études préliminaires de bioaccumulation démontrent à la fois une diminution du IHg et une augmentation du MeHg dans les moules au cours du temps pour la Seine et la Deûle

au deux périodes (Annexe 1 et 2, figure 11 et 12). Le MeHg pourrait donc être impliqué dans les réponses observées bien qu'il soit prématuré de conclure. Dans ce but, la bioaccumulation d'autres polluants sera analysée prochainement pour mieux caractériser l'exposome.

#### **4.2.2. Analyse moléculaire**

Les résultats concernant l'expression relative des gènes testés suggèrent une réponse différente en fonction des tissus analysés. En effet, les gènes de la cat et la gst semblent sous-exprimés dans les branchies et sur-exprimés au niveau des glandes digestives. Une étude ayant porté sur les effets d'une exposition au MeHg (460 ng/L) pendant 24h et 72h a démontré qu'il n'y avait pas de différence d'expression de la cat et de la gst entre les branchies et la glande digestive de *D. polymorpha* (Baratange et al. 2023). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait qu'ils aient réalisé une exposition par l'eau sans prise en compte du transfert trophique. Le Hg, ainsi que d'autres contaminants, peuvent être contenus dans les microalgues, limitant ainsi le contact avec les branchies de *D. polymorpha*, à l'inverse des glandes digestives qui dégradent les microalgues et libèrent ainsi le Hg dans l'organisme. De plus, des effets plus importants concernant l'expression relative des gènes testés est observée à T2 pour la Deûle en juillet. Cela peut être mis en relation avec la quantité de MeHg qui est quasiment doublé à T2 par rapport à T0 (Annexe 2, figure 12). Cette observation semble établir un lien entre les effets observés sur les biomarqueurs testés et la contamination au MeHg chez *D. polymorpha*. Une étude similaire a été réalisée sur *D. polymorpha*, exposé pendant 1 à 2 mois au niveau de plusieurs site de la Seine. Une analyse moléculaire des différents gènes de défense a également été réalisée au niveau des branchies et des glandes digestives. Il a été constaté une diminution significative de l'expression relative de la sod et de la cat au niveau des branchies, à l'inverse d'une augmentation significative de celle de la gst. La même observation a été constatée pour la sod et la cat au niveau des glandes digestives, mais une diminution significative a été relevé concernant la gst (Châtel et al. 2015). Mise à part des effets similaires de la cat au niveau des branchies, les effets mesurés ne sont pas semblables à ceux de cette étude. Ces différences pourraient s'expliquer par l'évolution de la contamination de la Seine au fil des années ainsi que des modifications des caractéristiques physico-chimique du fleuve. Il est cependant intéressant de constater un différentiel de réponse entre les branchies et les glandes digestives qui pourrait s'expliquer par le transfert trophique (Châtel et al. 2015). A noter que les biomarqueurs analysés restent néanmoins peu spécifiques et seront complétés par des analyses moléculaires à haut-débit dans la thèse de Clarisse Seguin dans le but d'identifier les voies de toxicités moléculaires de ces concentrations environnementales en cocktail.

#### **4.2.2. Un milieu fortement contaminé**

La Seine et la Deûle sont deux milieux pollués de façon chronique et en cocktail par plusieurs contaminants, dont le Hg, malgré les réglementations mises en place par la convention de Minamata et la DCE. La concentration en Hg chez différentes espèces de poisson vivant dans la Seine a été analysée entre 1990 et 2013. Les concentrations allaient de 0,05 à 0,25 µg de Hg/g de poids frais. En partant du principe qu'il y a 80% d'eau dans les organismes, cela représente 0,25 à 1,25 µg de Hg/g de poids sec, ce qui démontre une

contamination de la Seine au Hg car dépassant les valeurs seuils (Azimi et Rocher 2016). En effet, la Commission Européenne a instauré des valeurs seuil en Hg pour les produits de consommation humaine tel que le poisson de 0,5 µg de THg/g ou 1 µg de THg/g pour certaines espèces de prédateurs (Union 1993). Concernant la moule zébrée, une étude a relaté des concentrations allant de 1,7 à 2,4 µg de Hg/g de poids sec chez *D. polymorpha* dans la Seine en juin 2003 (Rocher et al. 2006). Comparé aux concentrations de Hg chez *D. polymorpha* allant de 0,05 à 0,25 µg/g de poids sec dans d'autres rivières d'EU, cela démontre un état préoccupant de la qualité de la Seine concernant ce contaminant (Lepom et al. 2012). A titre de comparaison, les organismes utilisés pour cette étude provenant du lac du Der, un milieu moins contaminé, présentaient 0,1 µg de IHg/g de poids sec et 0,05 µg de MeHg/g de poids sec. Néanmoins, pour notre exposition *in situ* la DCE est respectée avec des concentrations de THg dissous dans l'eau de 1,6 à 1,8 ng/L pour la Seine et légèrement dépassée pour la Deûle avec des concentrations de THg dissous dans l'eau de 100 à 120 ng/L (Mariia Petrova, communication personnelle). Ainsi, il apparaît que la DCE ne protège pas efficacement le biote contre le Hg. Le transfert trophique devrait être mieux pris en compte lors de la mise en place de valeurs réglementaires concernant les contaminants environnementaux général.

## 5. Conclusion et perspective

Les effets du Hg en concentration réaliste par transfert trophique ont été analysés par le biais de différents biomarqueurs biochimiques et moléculaires chez *D. polymorpha*. Comme attendu du fait des faibles concentrations en IHg et MeHg utilisées, relativement peu d'effets sont observés. Le transfert trophique ne semble pas induire plus d'effet qu'attendu et sont cohérents avec les PNEC établies par l'INERIS. Cette étude a permis de démontrer les effets du Hg dans des conditions réalistes chez des biotes inférieurs. Il serait intéressant par la suite, d'exposer *D. polymorpha* en laboratoire de la même manière, mais sur des temps plus longs pour s'assurer que de faibles concentrations en Hg n'induisent pas d'effet délétère sur le long terme chez cet organisme. Dans le cas contraire, cela pourrait altérer l'environnement, *D. polymorpha* étant consommé par de nombreux organismes. De plus, il serait intéressant, à l'avenir, de prendre en compte le transfert trophique lors des calculs des PNEC notamment pour les contaminants bioamplifiables tels que le MeHg ou les PCB.

Concernant les effets de l'exposition de *D. polymorpha* pendant 3 semaines dans des milieux contaminés de façon chronique, la Seine et la Deûle, peu d'effets sur les biomarqueurs biochimiques et moléculaires sont observés. Malgré la présence avérée de MeHg dans les organismes après expositions et dans les eaux, les biomarqueurs ne semblent que peu réagir. Ainsi l'exposition semble être tolérée par *D. polymorpha*. Une analyse métabolomique et protéomique sera réalisée à la suite de cette étude pour mieux caractériser les effets de cette exposition. Les résultats obtenus démontrent que *D. polymorpha* résiste à des concentrations en Hg supérieures à la normale. Cela était attendu sachant que cet organisme est une espèce invasive souvent d'écrit comme plus résistante aux perturbations de son environnement que les espèces natives. Cela permet donc de suivre les réponses graduelles de tolérance corrélées à la bioaccumulation. Cependant, les biomarqueurs analysés, aussi bien biochimiques que moléculaires, ne sont pas spécifiques du Hg. Il serait



intéressant de rechercher des biomarqueurs plus sensibles, notamment basés sur les approches omics, spécifiques aux MeHg dans l'objectifs d'améliorer les missions de biosurveillance concernant ce contaminant.

## 6. Références bibliographique

- Aebi, Hugo. 1974. « Catalase ». In *Methods of Enzymatic Analysis (Second Edition)*, édité par Hans Ulrich Bergmeyer, 673-84. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.50032-3>.
- Aggarwal, Priyanka, Smriti Gaur, et Pammi Gauba. 2014. « Neurotoxic and Genotoxic Effects of Methylmercury ». *Environment, Development and Sustainability* 16 (1): 71-78. <https://doi.org/10.1007/s10668-013-9475-8>.
- Arab, Khelifa, et Jean-Paul Steghens. 2004. « Plasma lipid hydroperoxides measurement by an automated xylénol orange method ». *Analytical Biochemistry* 325 (1): 158-63. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.10.022>.
- Azar, Jihan, Mohamed H. Yousef, Hassan A. N. El-Fawal, et Anwar Abdelnaser. 2021. « Mercury and Alzheimer's Disease: A Look at the Links and Evidence ». *Metabolic Brain Disease* 36 (3): 361-74. <https://doi.org/10.1007/s11011-020-00649-5>.
- Azimi, Sam, et Vincent Rocher. 2016. « Influence of the water quality improvement on fish population in the Seine River (Paris, France) over the 1990–2013 period ». *Science of The Total Environment* 542 (janvier):955-64. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.094>.
- Baldwin, B.S., M.S. Mayer, J. Dayton, N. Pau, J. Mendilla, M. Sullivan, A. Moore, A. Ma, et E.L. Mills. 2002. « Comparative Growth and Feeding in Zebra and Quagga Mussels (*Dreissena Polymorpha* and *Dreissena Bugensis*): Implications for North American Lakes ». *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59 (4): 680-94. <https://doi.org/10.1139/f02-043>.
- Baratange, Clément, Hugo Baali, Véronique Gaillet, Isabelle Bonnard, Laurence Delahaut, Jean-Charles Gaillard, Dominique Grandjean, et al. 2023. « Bioaccumulation and molecular effects of carbamazepine and methylmercury co-exposure in males of *Dreissena polymorpha* ». *Science of The Total Environment* 897 (novembre):165379. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165379>.
- Baratange, Clément, Séverine Paris-Palacios, Isabelle Bonnard, Laurence Delahaut, Dominique Grandjean, Laurence Wortham, Stéphanie Sayen, et al. 2022. « Metabolic, cellular and defense responses to single and co-exposure to carbamazepine and methylmercury in *Dreissena polymorpha* ». *Environmental Pollution* 300 (mai):118933. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.118933>.
- Benedetti, Maura, Maria Elisa Giuliani, et Francesco Regoli. 2015. « Oxidative Metabolism of Chemical Pollutants in Marine Organisms: Molecular and Biochemical Biomarkers in Environmental Toxicology ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1340 (1): 8-19. <https://doi.org/10.1111/nyas.12698>.
- Bernhoft, Robin A. 2012. « Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature ». *Journal of Environmental and Public Health* 2012:1-10. <https://doi.org/10.1155/2012/460508>.
- Blindauer, Claudia A. 2014. « Metallothioneins », juillet. <https://doi.org/10.1039/9781849739979-00606>.
- Boening, Dean W. 2000. « Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review ». *Chemosphere* 40 (12): 1335-51. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00283-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00283-0).

- Bravo, Andrea G., et Claudia Cosio. 2020. « Biotic Formation of Methylmercury: A Bio–Physico–Chemical Conundrum ». *Limnology and Oceanography* 65 (5): 1010-27. <https://doi.org/10.1002/lno.11366>.
- Carocci, Alessia, Nicola Rovito, Maria Stefania Sinicropi, et Giuseppe Genchi. 2014. « Mercury Toxicity and Neurodegenerative Effects ». In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, édité par David M. Whitacre, 1-18. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-03777-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-03777-6_1).
- Cervený, Daniel, Sara Roje, Jan Turek, et Tomas Randak. 2016. « Fish fin-clips as a non-lethal approach for biomonitoring of mercury contamination in aquatic environments and human health risk assessment ». *Chemosphere* 163 (novembre):290-95. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.045>.
- Châtel, Amélie, Virginie Faucet-Marquis, Catherine Gourlay-Francé, Annie Pfohl-Leszkowicz, et Françoise Vincent-Hubert. 2015. « Genotoxicity and Activation of Cellular Defenses in Transplanted Zebra Mussels *Dreissena Polymorpha* along the Seine River ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 114 (avril):241-49. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.023>.
- Chouvelon, Tiphaine, Pierre Cresson, Marc Bouchoucha, Christophe Brach-Papa, Paco Bustamante, Sylvette Crochet, Françoise Marco-Miralles, Bastien Thomas, et Joël Knoery. 2018. « Oligotrophy as a major driver of mercury bioaccumulation in medium-to high-trophic level consumers: A marine ecosystem-comparative study ». *Environmental Pollution* 233 (février):844-54. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.015>.
- Clifton, Jack C. 2007. « Mercury Exposure and Public Health ». *Pediatric Clinics of North America*, Children's Health and the Environment: Part II, 54 (2): 237.e1-237.e45. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2007.02.005>.
- Contardo-Jara, Valeska, Angela Krueger, Hans-Juergen Exner, et Claudia Wiegand. 2009. « Biotransformation and Antioxidant Enzymes of *Dreissena Polymorpha* for Detection of Site Impact in Watercourses of Berlin ». *Journal of Environmental Monitoring* 11 (6): 1147-56. <https://doi.org/10.1039/B820734H>.
- Coppola, Francesca, Ana Bessa, Bruno Henriques, Tania Russo, Amadeu M. V. M. Soares, Etelvina Figueira, Paula A. A. P. Marques, et al. 2020. « Oxidative stress, metabolic and histopathological alterations in mussels exposed to remediated seawater by GO-PEI after contamination with mercury ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 243 (mai):110674. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110674>.
- Directive 2013/39/UE du Parlement européen et du Conseil du 12 août 2013 modifiant les directives 2000/60/CE et 2008/105/CE en ce qui concerne les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l'eau Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE. 2013. *OJ L*. Vol. 226. <http://data.europa.eu/eli/dir/2013/39/oj/fra>.
- Domagalski, Joseph. 2001. « Mercury and methylmercury in water and sediment of the Sacramento River Basin, California ». *Applied Geochemistry* 16 (15): 1677-91. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(01\)00068-3](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(01)00068-3).

- Driscoll, Charles T., Robert P. Mason, Hing Man Chan, Daniel J. Jacob, et Nicola Pirrone. 2013. « Mercury as a Global Pollutant: Sources, Pathways, and Effects ». *Environmental Science & Technology* 47 (10): 4967-83. <https://doi.org/10.1021/es305071v>.
- Duchemin, Matthieu B., Michel Auffret, Nathalie Wessel, Marlène Fortier, Yves Morin, Jocelyne Pellerin, et Michel Fournier. 2008. « Multiple experimental approaches of immunotoxic effects of mercury chloride in the blue mussel, *Mytilus edulis*, through in vivo, in tubo and in vitro exposures ». *Environmental Pollution* 153 (2): 416-23. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.08.015>.
- Environment, U. N. 2019. « Global Mercury Assessment 2018 ». UNEP - UN Environment Programme. 21 août 2019. <http://www.unep.org/resources/publication/global-mercury-assessment-2018>.
- Evariste, Lauris, Elise David, Pierre-Luc Cloutier, Pauline Brousseau, Michel Auffret, Mélanie Desrosiers, Paule Emilie Groleau, Michel Fournier, et Stéphane Betoulle. 2018. « Field biomonitoring using the zebra mussel *Dreissena polymorpha* and the quagga mussel *Dreissena bugensis* following immunotoxic reponses. Is there a need to separate the two species? » *Environmental Pollution* 238 (juillet):706-16. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.098>.
- Faria, Melissa, David Huertas, David X. Soto, Joan O. Grimalt, Jordi Catalan, Mari Carmen Riva, et Carlos Barata. 2010. « Contaminant accumulation and multi-biomarker responses in field collected zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and crayfish (*Procambarus clarkii*), to evaluate toxicological effects of industrial hazardous dumps in the Ebro river (NE Spain) ». *Chemosphere* 78 (3): 232-40. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.003>.
- Fujiki, M., et S. Tajima. 1992. « The Pollution of Minamata Bay by Mercury ». *Water Science and Technology* 25 (11): 133-40. <https://doi.org/10.2166/wst.1992.0284>.
- Gworek, Barbara, Olga Bemowska-Kałabun, Marta Kijeńska, et Justyna Wrzosek-Jakubowska. 2016. « Mercury in Marine and Oceanic Waters—a Review ». *Water, Air, & Soil Pollution* 227 (10): 371. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3060-3>.
- Henriques, Magda Carvalho, Susana Loureiro, Margarida Fardilha, et Maria Teresa Herdeiro. 2019. « Exposure to mercury and human reproductive health: A systematic review ». *Reproductive Toxicology* 85 (avril):93-103. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.02.012>.
- Hylander, Lars D., et Michael E. Goodsite. 2006. « Environmental costs of mercury pollution ». *Science of The Total Environment*, Selected papers from the 7th International Conference on Mercury as a Global Pollutant, Ljubljana, Slovenia June 27 - July 2, 2004, 368 (1): 352-70. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.11.029>.
- Jiang, Zhen-Yue, James V. Hunt, et Simon P. Wolff. 1992. « Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein ». *Analytical Biochemistry* 202 (2): 384-89. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90122-N](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90122-N).
- Kelly, Carol A., John W. M. Rudd, Vincent L. St.Louis, et Andrew Heyes. 1995. « Is Total Mercury Concentration a Good Predictor of Methyl Mercury Concentration in Aquatic Systems? » *Water, Air, and Soil Pollution* 80 (1): 715-24. <https://doi.org/10.1007/BF01189723>.

- Kessler, Rebecca. 2013. « The Minamata Convention on Mercury: A First Step toward Protecting Future Generations ». *Environmental Health Perspectives* 121 (10): A304-a309. <https://doi.org/10.1289/ehp.121-A304>.
- Klimova, Y. S., G. M. Chuiko, M. V. Gapeeva, D. S. Pesnya, et E. I. Ivanova. 2019. « The Use of Oxidative Stress Parameters of Bivalve Mollusks *Dreissena Polymorpha* (Pallas, 1771) as Biomarkers for Ecotoxicological Assessment of Environment ». *Inland Water Biology* 12 (2): 88-95. <https://doi.org/10.1134/S1995082919060063>.
- Lam, Paul K. S. 2009. « Use of biomarkers in environmental monitoring ». *Ocean & Coastal Management, Safer Coasts, Living with Risks: Selected Papers from the East Asian Seas Congress 2006*, Haikou, Hainan, China, 52 (7): 348-54. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2009.04.010>.
- Lawson, Nicole M., et Robert P. Mason. 2001. « Concentration of Mercury, Methylmercury, Cadmium, Lead, Arsenic, and Selenium in the Rain and Stream Water of Two Contrasting Watersheds in Western Maryland ». *Water Research* 35 (17): 4039-52. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00140-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00140-3).
- Lee, Young Hwan, Hye-Min Kang, Duck-Hyun Kim, Minghua Wang, Chang-Bum Jeong, et Jae-Seong Lee. 2017. « Adverse effects of methylmercury (MeHg) on life parameters, antioxidant systems, and MAPK signaling pathways in the copepod *Tigriopus japonicus* ». *Aquatic Toxicology* 184 (mars):133-41. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.01.010>.
- Lee, Young Hwan, Duck-Hyun Kim, Hye-Min Kang, Minghua Wang, Chang-Bum Jeong, et Jae-Seong Lee. 2017. « Adverse effects of methylmercury (MeHg) on life parameters, antioxidant systems, and MAPK signaling pathways in the rotifer *Brachionus koreanus* and the copepod *Paracyclopsina nana* ». *Aquatic Toxicology* 190 (septembre):181-89. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.07.006>.
- Lepom, Peter, Ulrich Irmer, et Jörg Wellmitz. 2012. « Mercury levels and trends (1993–2009) in bream (*Abramis brama* L.) and zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from German surface waters ». *Chemosphere* 86 (2): 202-11. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.10.021>.
- Magni, Stefano, Marco Parolini, Camilla Della Torre, Luciana Fernandes de Oliveira, Martina Catani, Roberta Guzzinati, Alberto Cavazzini, et Andrea Binelli. 2017. « Multi-biomarker investigation to assess toxicity induced by two antidepressants on *Dreissena polymorpha* ». *Science of The Total Environment* 578 (février):452-59. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.208>.
- Malcolm, Elizabeth G., Jeffra K. Schaefer, Eileen B. Ekstrom, Caroline B. Tuit, Amal Jayakumar, Haewon Park, Bess B. Ward, et François M. M. Morel. 2010. « Mercury methylation in oxygen deficient zones of the oceans: No evidence for the predominance of anaerobes ». *Marine Chemistry* 122 (1): 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2010.08.004>.
- « Mercure (7439-97-6) | PSC ». s. d. Consulté le 28 mai 2024. [https://substances.ineris.fr/substance/7439-97-6#ecotoxicology\\_entity\\_\\_ecotoxicology\\_values](https://substances.ineris.fr/substance/7439-97-6#ecotoxicology_entity__ecotoxicology_values).
- Mondal, Kausik, Sanjib Ghosh, et Salma Haque. 2018. « A review on contamination, bioaccumulation and toxic effect of cadmium, mercury and lead on freshwater fishes », mars.
- Nawab, Javed, Junaid Ghani, Syed Aziz Ur Rehman, Muhammad Idress, Muhammad Luqman, Sardar Khan, Ali Asghar, et Ziaur Rahman. 2022. « Biomonitoring of Mercury in Water, Sediments, and Fish

- (Brown and Rainbow Trout) from Remote Alpine Lakes Located in the Himalayas, Pakistan ». *Environmental Science and Pollution Research* 29 (53): 81021-36. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21340-5>.
- Niyogi, S, S Biswas, S Sarker, et A. G Datta. 2001. « Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons ». *Marine Environmental Research* 52 (1): 13-26. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(00\)00257-9](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00257-9).
- Olafson, R. W. 1981. « Differential pulse polarographic determination of murine metallothionein induction kinetics. » *Journal of Biological Chemistry* 256 (3): 1263-68. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)69958-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)69958-8).
- Oliveira, Patrícia, Luís Gabriel Antão Barboza, Vasco Branco, Neusa Figueiredo, Cristina Carvalho, et Lúcia Guilhermino. 2018. « Effects of microplastics and mercury in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774): Filtration rate, biochemical biomarkers and mercury bioconcentration ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 164 (novembre):155-63. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.062>.
- Palais, F., O. Dedourge-Geffard, A. Beaudon, S. Pain-Devin, J. Trapp, O. Geffard, P. Noury, et al. 2012. « One-Year Monitoring of Core Biomarker and Digestive Enzyme Responses in Transplanted Zebra Mussels (*Dreissena Polymorpha*) ». *Ecotoxicology* 21 (3): 888-905. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0851-1>.
- Paoletti, Francesco, Donatella Aldinucci, Alessandra Mocali, et Anna Caparrini. 1986. « A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts ». *Analytical Biochemistry* 154 (2): 536-41. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90026-6).
- Parks, Jerry M., Alexander Johs, Mircea Podar, Romain Bridou, Richard A. Hurt, Steven D. Smith, Stephen J. Tomanicek, et al. 2013. « The Genetic Basis for Bacterial Mercury Methylation ». *Science* 339 (6125): 1332-35. <https://doi.org/10.1126/science.1230667>.
- Pelletier, Emilien. 1988. « Acute toxicity of some methylmercury complexes to *Mytilus edulis* and lack of selenium protection ». *Marine Pollution Bulletin* 19 (5): 213-19. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(88\)90233-0](https://doi.org/10.1016/0025-326X(88)90233-0).
- Regoli, Francesco, Maria Elisa Giuliani, Maura Benedetti, et Augustine Arukwe. 2011. « Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues ». *Aquatic Toxicology* 105 (janvier):56-66. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.06.014>.
- Rice, Kevin M., Ernest M. Walker, Miaozong Wu, Chris Gillette, et Eric R. Blough. 2014. « Environmental Mercury and Its Toxic Effects ». *Journal of Preventive Medicine and Public Health* 47 (2): 74-83. <https://doi.org/10.3961/jpmph.2014.47.2.74>.
- Riisgård, Hans Ulrik, et Susanne Hansen. 1990. « Biomagnification of mercury in a marine grazing food-chain: algal cells *Phaeodactylum tricornutum*, mussels *Mytilus edulis* and flounders *Platichthys flesus* studied by means of a stepwise-reduction-CVAA method ». *Marine Ecology Progress Series* 62 (3): 259-70.

- Rocher, B, J Le Goff, L Peluhet, M Briand, H Manduzio, J Gallois, M H Devier, et al. 2006. « Genotoxicant Accumulation and Cellular Defence Activation in Bivalves Chronically Exposed to Waterborne Contaminants from the Seine River ». *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 79 (1): 65-77. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.05.005>.
- Rudd, John W. M. 1995. « Sources of Methyl Mercury to Freshwater Ecosystems: A Review ». *Water, Air, and Soil Pollution* 80 (1): 697-713. <https://doi.org/10.1007/BF01189722>.
- Sarmento, Amélia, Lúcia Guilhermino, et António Afonso. 2004. « Mercury chloride effects on the function and cellular integrity of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) head kidney macrophages ». *Fish & Shellfish Immunology* 17 (5): 489-98. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.05.004>.
- Schmitt, Christopher J., et William G. Brumbaugh. 1990. « National Contaminant Biomonitoring Program: Concentrations of Arsenic, Cadmium, Copper, Lead, Mercury, Selenium, and Zinc in U.S. Freshwater Fish, 1976–1984 ». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 19 (5): 731-47. <https://doi.org/10.1007/BF01183991>.
- Sharma, Rajendra, Yusong Yang, Abha Sharma, Sanjay Awasthi, et Yogesh C. Awasthi. 2004. « Antioxidant Role of Glutathione S-Transferases: Protection Against Oxidant Toxicity and Regulation of Stress-Mediated Apoptosis ». *Antioxidants & Redox Signaling* 6 (2): 289-300. <https://doi.org/10.1089/152308604322899350>.
- Stillman, Martin J. 1995. « Metallothioneins ». *Coordination Chemistry Reviews* 144 (octobre):461-511. [https://doi.org/10.1016/0010-8545\(95\)01173-M](https://doi.org/10.1016/0010-8545(95)01173-M).
- Subhavana, K. L., A. Qureshi, P. Chakraborty, et A. K. Tiwari. 2019. « Mercury and Organochlorines in the Terrestrial Environment of Schirmacher Hills, Antarctica ». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 102 (1): 13-18. <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2497-z>.
- Teixeira, Francisco B., Ana C. A. de Oliveira, Luana K. R. Leão, Nathália C. F. Fagundes, Rafael M. Fernandes, Luanna M. P. Fernandes, Márcia C. F. da Silva, et al. 2018. « Exposure to Inorganic Mercury Causes Oxidative Stress, Cell Death, and Functional Deficits in the Motor Cortex ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2018.00125>.
- Union, Publications Office of the European. 1993. « CELEX1, 93/351/CEE: Décision de la Commission, du 19 mai 1993, fixant des méthodes d'analyse, des plans d'échantillonnage et des niveaux à respecter pour le mercure dans les produits de la pêche ». Website. Publications Office of the EU. Publications Office of the European Union. 19 mai 1993. <https://op.europa.eu/fr/publication-detail/-/publication/30e42998-da97-4835-8a02-d8076cf0034c/language-fr>.
- Valenti, Theodore W., Donald S. Cherry, Richard J. Neves, et John Schmerfeld. 2005. « Acute and Chronic Toxicity of Mercury to Early Life Stages of the Rainbow Mussel, *Villosa iris* (Bivalvia: Unionidae) ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (5): 1242-46. <https://doi.org/10.1897/04-261R.1>.
- Watanabe, N, S Kamei, A Ohkubo, M Yamanaka, S Ohsawa, K Makino, et K Tokuda. 1986. « Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. » *Clinical Chemistry* 32 (8): 1551-54. <https://doi.org/10.1093/clinchem/32.8.1551>.

- Windham-Myers, Lisamarie, Jacob A. Fleck, Joshua T. Ackerman, Mark Marvin-DiPasquale, Craig A. Stricker, Wesley A. Heim, Philip A. M. Bachand, et al. 2014. « Mercury cycling in agricultural and managed wetlands: A synthesis of methylmercury production, hydrologic export, and bioaccumulation from an integrated field study ». *Science of The Total Environment* 484 (juin):221-31. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.033>.
- Yang, Lixin, Yuanyuan Zhang, Feifei Wang, Zidie Luo, Shaojuan Guo, et Uwe Strähle. 2020. « Toxicity of Mercury: Molecular Evidence ». *Chemosphere* 245 (avril):125586. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125586>.
- Zhang, Qun-Fang, Ying-Wen Li, Zhi-Hao Liu, et Qi-Liang Chen. 2016. « Reproductive Toxicity of Inorganic Mercury Exposure in Adult Zebrafish: Histological Damage, Oxidative Stress, and Alterations of Sex Hormone and Gene Expression in the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis ». *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 177 (août):417-24. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.06.018>.
- Zhang, Ying, Jinming Song, Huamao Yuan, Yayan Xu, Zhipeng He, et Liqin Duan. 2010. « Biomarker responses in the bivalve (*Chlamys farreri*) to exposure of the environmentally relevant concentrations of lead, mercury, copper ». *Environmental Toxicology and Pharmacology* 30 (1): 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2010.03.008>.



## Résumé

Le mercure (Hg) est considéré comme contaminant à haut risque pour la santé humaine et environnementale suite à la catastrophe de Minamata. Il doit être bien caractérisé dans le but de prévenir de potentiels effets délétères pour l'Homme et l'environnement. La connaissance des effets néfastes du Hg, sous forme organique et inorganique, a permis de déterminer des valeurs seuils dans l'environnement. Cependant, la plupart des études exposent des organismes au Hg dans des conditions non réalistes. En effet, les concentrations testées sont souvent bien supérieures à la réalité environnementale et plusieurs mécanismes naturels sont omis tel que le transfert trophique. Le Projet DiMer a pour objectif de clarifier les effets de ce polluant dans des conditions d'expositions réalistes, en se concentrant sur un environnement souvent délaissé dans les études, les compartiments d'eau douce. Pour ce faire, une espèce de bivalve dulcicole, *Dreissena polymorpha*, a été exposée à des microalgues, *Chlorella vulgaris*, contaminées au Hg inorganique (IHg) et méthylmercure (MeHg) à une certaine concentration, de sorte à mimer des conditions réalistes. Des expositions *in situ* dans la Seine et la Deûle ont également été réalisées en parallèle, de sorte à comparer les données générées en laboratoire et un contexte d'exposome. Plusieurs biomarqueurs ont ensuite été analysés puis comparés à la bioaccumulation de Hg dans les organismes testés afin de conclure quant aux effets du Hg dans ces conditions. Les résultats préliminaires montrent des effets faibles du Hg sur les biomarqueurs testés, pour les conditions testées confortant les valeurs seuils déjà établies. Cependant, le transfert trophique est un critère important à prendre en compte lors de l'établissement de ces valeurs.

**Mots clefs** : mercure, biomarqueurs, transfert trophique, *Dreissena polymorpha*, *Chlorella vulgaris*

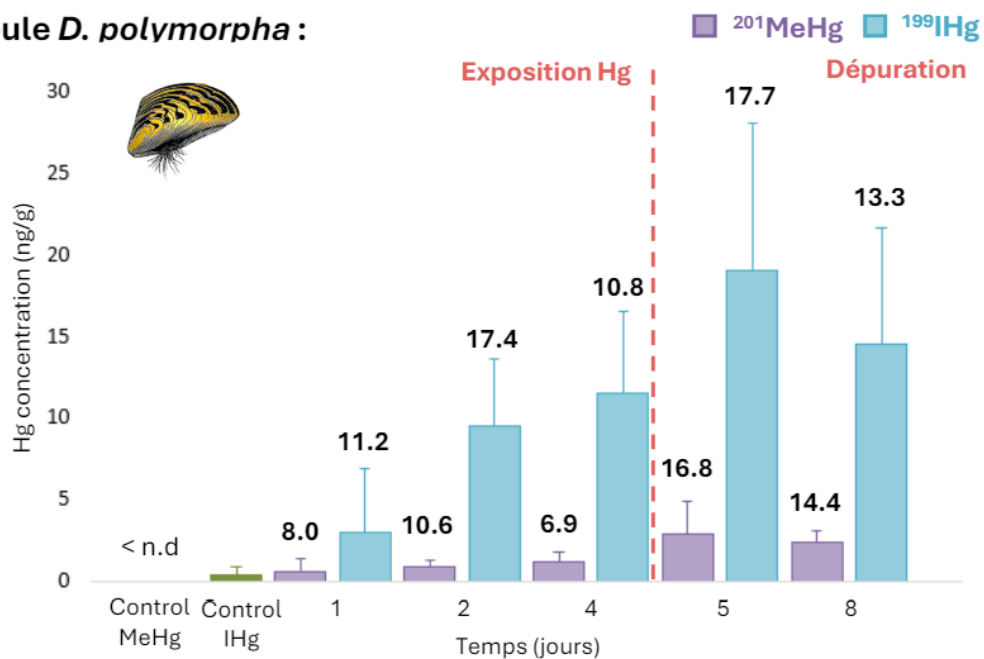
## Abstract

Mercury (Hg) is considered as a high-risk contaminant for human and environmental health, following the Minamata disaster. It must be well characterized to prevent potential toxic effects on humans and the environment. Yet, most studies expose organisms to Hg with unrealistic conditions. In fact, the concentrations tested are often much higher than the environment reality, and several mechanisms are omitted, such as trophic transfer. DiMer project aims to clarify the effects of this pollutant under realistic exposure conditions, focusing on an environment often forgotten in studies, freshwater compartment. To do this, a freshwater bivalve species, *Dreissena polymorpha*, was exposed to microalgae, *Chlorella vulgaris*, contaminated with inorganic Hg (IHg) and methylmercury (MeHg) at a realistic concentration. *In situ* exposition in the Seine and Deûle rivers were also carried out in parallel, to compare with data generated in the laboratory with an exposome context. Several biomarkers were then analyzed and compared with the bioaccumulation of Hg in the organism tested, to conclude on the effects of Hg under this condition. Preliminary results show weak effects of Hg on the biomarkers tested, for the conditions tested, confirming the threshold values already established. However, trophic transfer appears an important criterion to be taken into account when establishing these values.

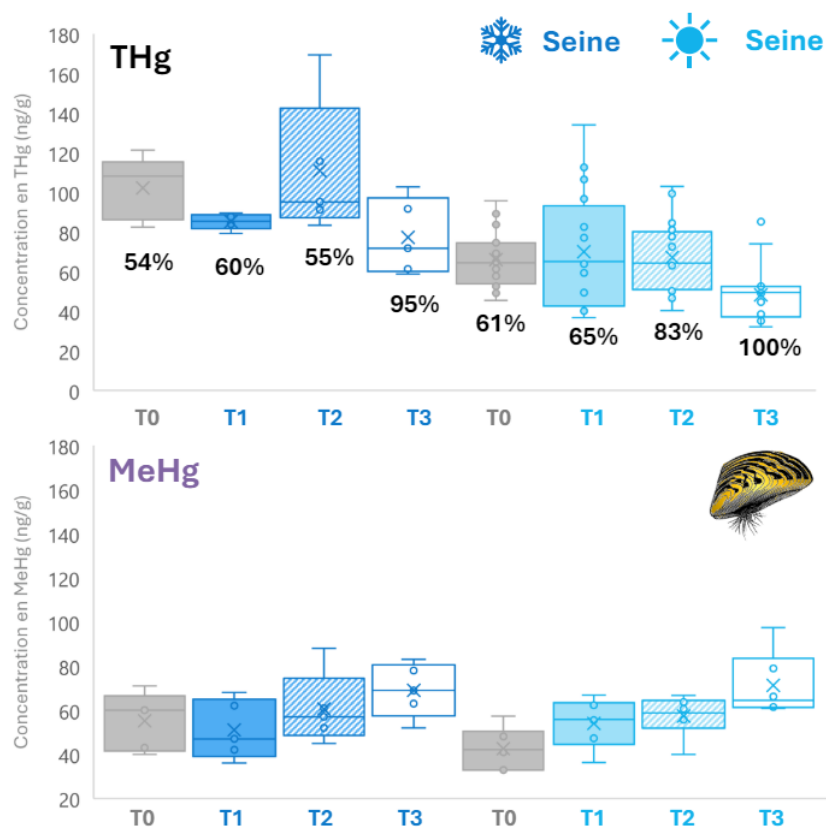
**Keys words** : mercury, biomarkers, trophic transfer, *Dreissena polymorpha*, *Chlorella vulgaris*

## Annexe 1

### Moule *D. polymorpha* :

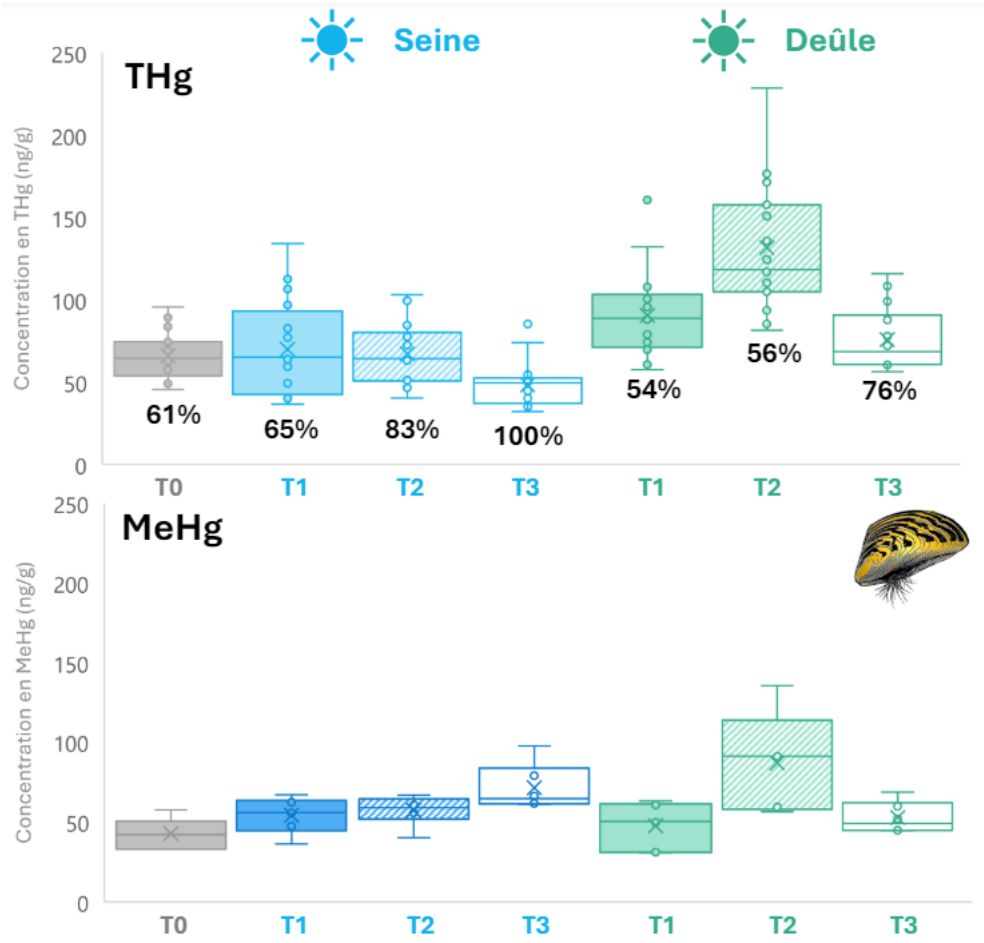


**Figure 10 :** Concentration en  $^{201}\text{MeHg}$  et  $^{199}\text{IHg}$ (ng/g) et BAF chez *D. polymorpha* après 4 jours d'exposition et 4 jours de dépuración (n = 4 à 5). n.d : non détecté. Analyses et graphiques réalisés par Clarisse Seguin.



**Figure 11 :** Concentration (ng/g) en THg, MeHg et % de MeHg retrouvés chez *D. polymorpha* (n = 5 à 20). Analyses et graphiques réalisé par Clarisse Seguin.

Annexe 2



**Figure 12 :** Concentration (ng/g) en THg, MeHg et % de MeHg retrouvés chez *D. polymorpha* (n = 14 à 20). Analyses et graphiques réalisés par Clarisse Seguin.