

Écotoxicologie

BIOACCUMULATION DE CONTAMINANTS ET MESURE DE BIOMARQUEURS CHEZ LA MOULE ZÉBRÉE (*DREISSENA POLYMORPHA*) EN SEINE AVAL

par

A. JAOUEN¹, C. GALAP, C. MINIER, R. TUTUNDJIAN

et F. LÉBOULENGER

Des populations de dreissènes (*Dreissena polymorpha*) prélevées en Seine dans six stations situées en amont et en aval de Rouen (France) ont fait l'objet d'une étude de la contamination par les métaux (Cd, Cu et Zn), 20 congénères de polychlorobiphényles (PCB) et 14 formes d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Les résultats mettent en évidence une capacité particulière de ce bivalve à accumuler ces contaminants et permettent d'envisager son utilisation comme organisme sentinelle pour le suivi de la qualité du milieu. Deux sites se distinguent par les niveaux de contamination des dreissènes. Les animaux issus de La Bouille sont les plus contaminés en HAP, et les seconds en PCB et cadmium, indiquant vraisemblablement une contribution de l'agglomération rouennaise à leur contamination. Les dreissènes du site de Vieux-Port se distinguent par des profils en PCB et HAP sensiblement différents de celui rencontré chez les animaux prélevés dans les autres sites, avec notamment les teneurs les plus importantes en PCB les plus toxiques en terme d'équivalent dioxine. La mesure de l'expression des protéines de résistance multixénobiotique (MXR) dans les branchies des dreissènes montre que le site de La Bouille est celui dans lequel les contaminants induisent la réponse la plus forte. D'autre part, cette réponse met en opposition les sites localisés en aval de La Bouille, et ceux situés en amont. Les animaux vivant à La Bouille et en aval présentent des niveaux d'expression de protéines MXR supérieurs à ceux des autres dreissènes et semblent donc les plus exposés à différents toxiques.

Bioaccumulation of pollutants and measures of biomarkers in the Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) from downstream river Seine

Measurements of contamination by three heavy metals (Cd, Cu and Zn), 20 polychlorobiphenyls (PCB) and 14 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) were performed in Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) taken from the river Seine, in six populations located upstream and downstream from the city of Rouen (France). The results indicate that this bivalve species aggressively accumulates these contaminants and thus can be used as a sentinel organism for the monitoring of water quality in the Seine river. Two stations were of particular interest for the contamination pattern of mussels. Animals taken in the station La Bouille, located just downstream from Rouen harbour, exhibited the highest levels in PAH and the second highest in PCB and Cd, thus indicating that contaminants originating from the city and industrial zone of Rouen contribute to the contamination levels of biota in the Seine river. Mussels from the station Vieux-Port were characterised by PCB and PAH burdens noticeably different from those measured in animals originating from the other sites, especially as they had the highest levels in toxic PCB congeners in term of dioxin-equivalent toxicity.

Measurement by immunological methods of the expression of multixenobiotic resistance proteins (MXR) in the gills of Zebra mussels indicate that the animals from the station La Bouille had the highest concentrations of those proteins. Globally, animals living at and downstream from La Bouille exhibit higher levels of MXR proteins, suggesting therefore that they are more exposed to various toxing than those animals living upstream.

Introduction

Les groupes de recherche impliqués dans la thématique « Édifices Biologiques » du Programme scientifique Seine Aval ont pour objectif de mieux comprendre les relations entre les êtres vivants et leur biotope et les relations inter-organismes en estuaire de Seine, ceci afin de discerner comment ces relations et la physiologie des organismes sont affectées par les polluants du milieu. L'étude présentée ici s'inscrit totalement dans cette démarche. Elle vise à mettre en évidence des relations entre les contaminants chimiques présents et les changements dans les mécanismes vitaux d'une espèce particulière, la moule zébrée, *Dreissena polymorpha*.

En effet, s'il est important de connaître la nature et les concentrations des contaminants potentiellement toxiques dans le milieu, en l'occurrence l'eau de la Seine, ces données ne permettent pas à elles seules de tirer de conclusions sur la qualité du milieu pour les organismes vivants. Quelle importance qu'un composé soit présent en grande quantité s'il est sans conséquence pour les êtres vivants ?

Il est évident que la concentration dans les organes sensibles et le temps de résidence sont essentiels pour l'animal, d'où l'importance de la biodisponibilité, traduisant la part de contaminants interagissant avec l'organisme. Une approche possible permettant d'estimer cette biodisponibilité, est de doser chimiquement certains composés dans les tissus. Ceci a pour avantage de mettre en évidence que ces composés ont pu pénétrer et interagir avec l'organisme (et éventuellement conduire à des effets délétères).

Contaminants et biomarqueurs chez *Dreissena* en Seine aval

Ainsi, au cours de ce travail, les concentrations de 14 hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), de 20 polychlorobiphényles (PCB) et de trois métaux potentiellement toxiques, cuivre, cadmium et zinc, ont été mesurées dans les tissus de la dreissène.

Cependant cette présence n'est pas suffisante pour affirmer que ces composés ont un quelconque effet sur les dreissènes. La signification biologique de cette présence et de l'exposition à d'autres toxiques ne peut apparaître que lors de l'étude des organismes eux mêmes. Ainsi, cette étude a visé à intégrer différents biomarqueurs susceptibles d'apporter des informations sur les réponses des organismes au niveau moléculaire, tissulaire et de l'animal entier.

Des protéines membranaires impliquées dans le transport de composés toxiques (GOTTESMAN et PASTAN, 1993) ont été recherchées chez la dreissène. Ces protéines responsables du phénomène de résistance multixénobiotique (MXR) apparaissent comme un élément important permettant de réguler l'entrée de toxiques dans la cellule (TOOMEY et EPEL, 1993). Le niveau d'expression de ces protéines MXR est ainsi relié à l'exposition à de nombreux toxiques (MINIER *et al.*, 1993 ; MINIER et MOORE, 1996), ce qui fait potentiellement de ce biomarqueur un outil de diagnostic de l'état de santé de l'individu.

Cette étude avait donc pour objectif d'identifier les sites où la dreissène se développe dans la partie aval de la Seine afin de pouvoir effectuer des mesures à la fois chimiques et biologiques sur des individus prélevés *in situ*. L'ensemble de ces mesures visait à donner une signification biologique à la présence de contaminants dans le biotope et ainsi à aider au diagnostic de l'état de stress subi par les organismes.

Matériel et méthode

Échantillons biologiques

Pour chaque échantillon, 72 individus de *Dreissena polymorpha* d'une taille comprise entre 20 et 27 mm ont été prélevés, amenés au laboratoire dans leur milieu et immédiatement traités.

Les collectes ont été réalisées afin d'étudier les variations temporelles et spatiales des différents paramètres choisis. Des échantillons ont donc été prélevés en juin puis en septembre 1997, au niveau de 6 sites différents de l'amont vers l'aval (Fig. 1) : Poses, Oissel, Rouen, La Bouille, Le Landin (ou alternativement Villequier en juin) et Vieux-Port.

Trente individus ont été soumis à une épuration par incubation dans de l'eau de source pendant 24 heures puis congelés à -20°C. Quinze dreissènes ont été utilisées pour le dosage des métaux. Les 15 autres ont permis le dosage des concentrations en PCB et HAP.

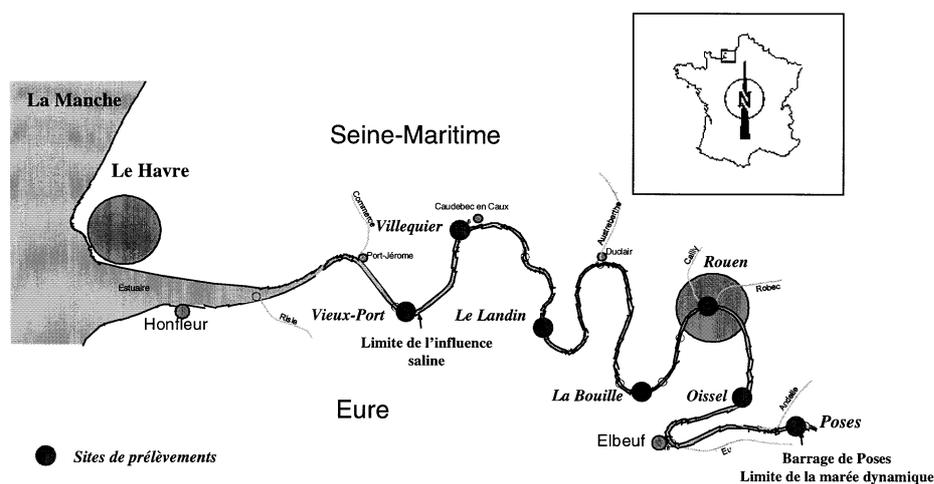


Figure 1

Sites de prélèvement des dreissenés dans la partie aval de la Seine.

Dosages des PCB et des HAP

Les échantillons ont été pesés puis lyophilisés et broyés. Ils ont ensuite été extraits suivant la technique Soxtec utilisant un mélange hexane/acétone. Ces extraits ont alors été purifiés par chromatographie d'absorption sur colonne d'alumine et de silice permettant de récupérer deux fractions: une fraction contenant les PCB (à la fois majoritaires et coplanaires) et une fraction contenant les HAP.

Les différents composés présents dans la fraction contenant les PCB ont ensuite été séparés par groupes par HPLC sur colonne PYE (colonne particulièrement efficace pour la préséparation des composés en fonction de la planarité de la molécule). Seule la fraction contenant les PCB a été fractionnée par HPLC de façon à séparer les PCB ortho-substitués des PCB non ortho-substitués ou coplanaires (CB 77, 126 et 169).

L'analyse instrumentale finale des différents composés a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Les composés PCB ortho-substitués et non ortho-substitués ont été quantifiés par couplage de cette chromatographie avec une détection en capture d'électron (CPG/DCE) tandis que la détermination des HAP a été réalisée par couplage CPG - spectrométrie de masse (CPG/SM).

Les concentrations en PCB et HAP sont exprimées en ng/g de poids sec et pour les métaux lourds en µg/g de poids sec.

Dosages des métaux

Les échantillons ont été décongelés, triés, divisés par groupes de 3 individus afin d'assurer une étude statistique. Les individus de chaque groupe ont alors été extraits, séchés puis homogénéisés par broyage. Les concentrations en cadmium, cuivre et zinc ont été mesurées par spectrophotométrie d'absorption atomique selon la technique décrite par MIRAMAND *et al.* (1995).

Contaminants et biomarqueurs chez *Dreissena* en Seine aval

Dosages immunologiques

Les branchies de dreissènes ont été homogénéisées par sonication dans un tampon contenant des détergents (triton X-100) afin de solubiliser les protéines membranaires. La partie soluble a alors été séparée par centrifugation et la concentration en protéines dosée par la méthode de BRADFORD (1976) en utilisant la sérum albumine bovine (SAB) comme référence.

Les protéines apparentées aux P-glycoprotéines (nom des protéines de type MXR) connues ont été recherchées par immunochimie après séparation dans un champ électrique (LAEMMLI, 1970), puis transfert sur membrane de nitrocellulose (TOWBIN *et al.*, 1979), à l'aide de l'anticorps monoclonal C219 reconnaissant toutes les protéines apparentées dont la séquence génique est connue (GEORGES *et al.*, 1990), dans les conditions décrites par MINIER *et al.* (1993).

Résultats - Discussion

PCB et HAP

Parmi les contaminants du milieu, les hydrocarbures aromatiques polyinsaturés (HAP) et les polychlorobiphényles (PCB) tiennent une place particulière puisqu'ils sont détectables dans tous les compartiments de l'écosystème et comportent des composés potentiellement toxiques. La présente étude montre que deux sites se distinguent pour leur teneurs en HAP et PCB (Fig. 2 et 3).

Le site de La Bouille apparaît au premier rang des sites les plus contaminés en HAP et au second rang pour les PCB, indiquant vraisemblablement un apport en contaminants de l'agglomération rouennaise (Fig. 2 et 3).

Le site de Vieux-Port se distingue par des profils en PCB et HAP sensiblement différents des autres sites étudiés. En effet, en exprimant les teneurs en PCB non-ortho-substitués comme les congénères 126 et 169 en « équivalents dioxine » d'après AHLBORG *et al.* (1994), le site de Vieux-Port montre des valeurs relativement élevées en PCB les plus toxiques. L'origine de cette particularité reste peu claire mais l'influence de la zone d'activité de Port-Jérôme située juste en aval est une piste parmi d'autres (Fig. 2 et 3).

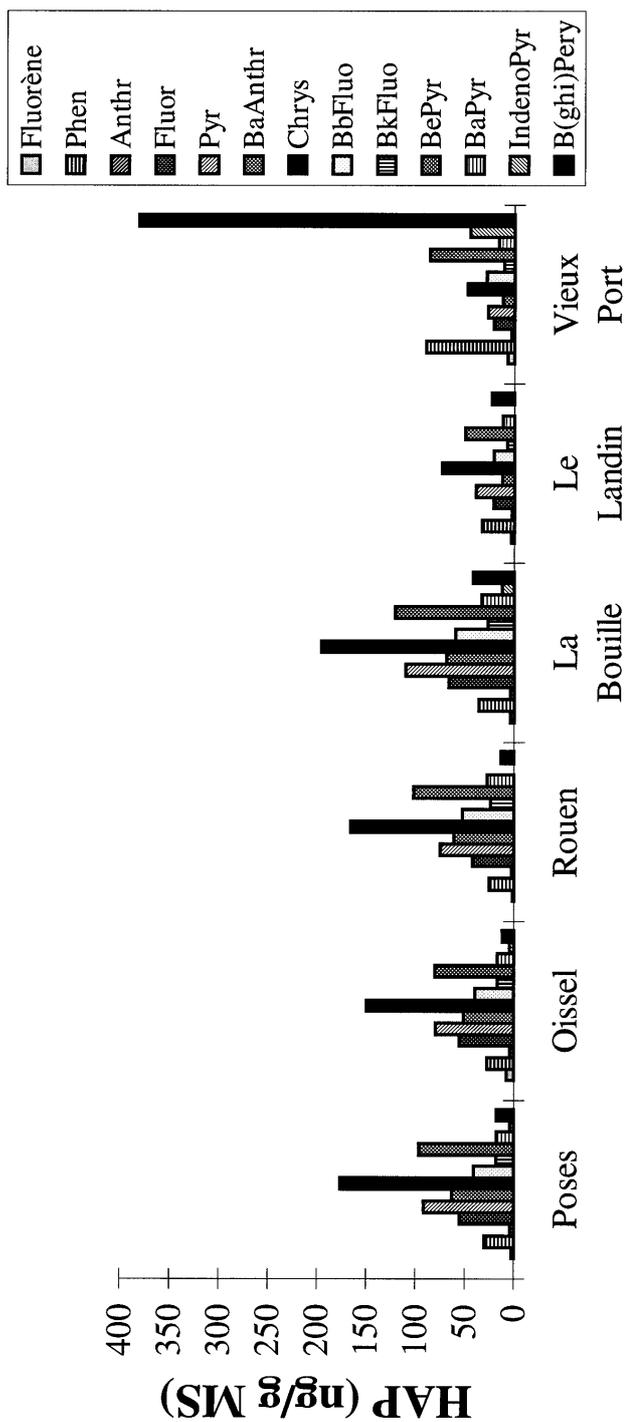


Figure 2

Profils de contamination en HAP des dreissènes prélevées en amont et en aval de Rouen en septembre 1997.

Les teneurs en HAP sont exprimées en ng/g de matière sèche.

Naphl : naphthalène, Fluorène, Phen : phénanthrène, Anthr : anthracène, Fluor : fluoranthène, Pyr : pyrène, BaAnthr : benzo(a)anthracène, Chrys : chrysène, BbFluo : benzo(b)fluoranthène, BkFluo : benzo(k)fluoranthène, BePyr : benzo(e)pyrène, BaPyr : benzo(a)pyrène, IndenoPyr : indeno(1,2,3-c,d)pyrène, B(ghi)Pery : benzo(g,h,i)perylène.

Contaminants et biomarqueurs chez *Dreissena* en Seine aval

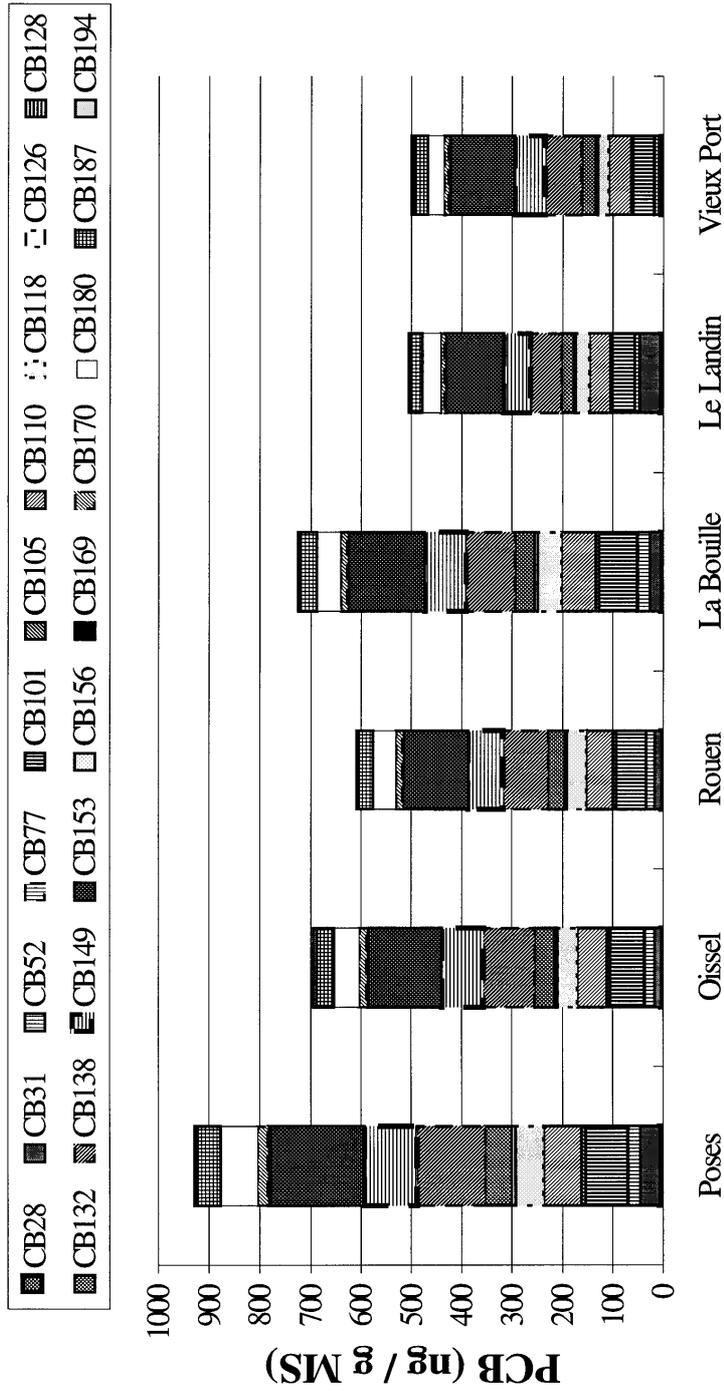


Figure 3
Concentrations des 20 PCB dosés dans les tissus des dreissenés prélevées le long de l'axe fluvial de la Seine. Les teneurs en PCB sont exprimées en ng/g de matière sèche.

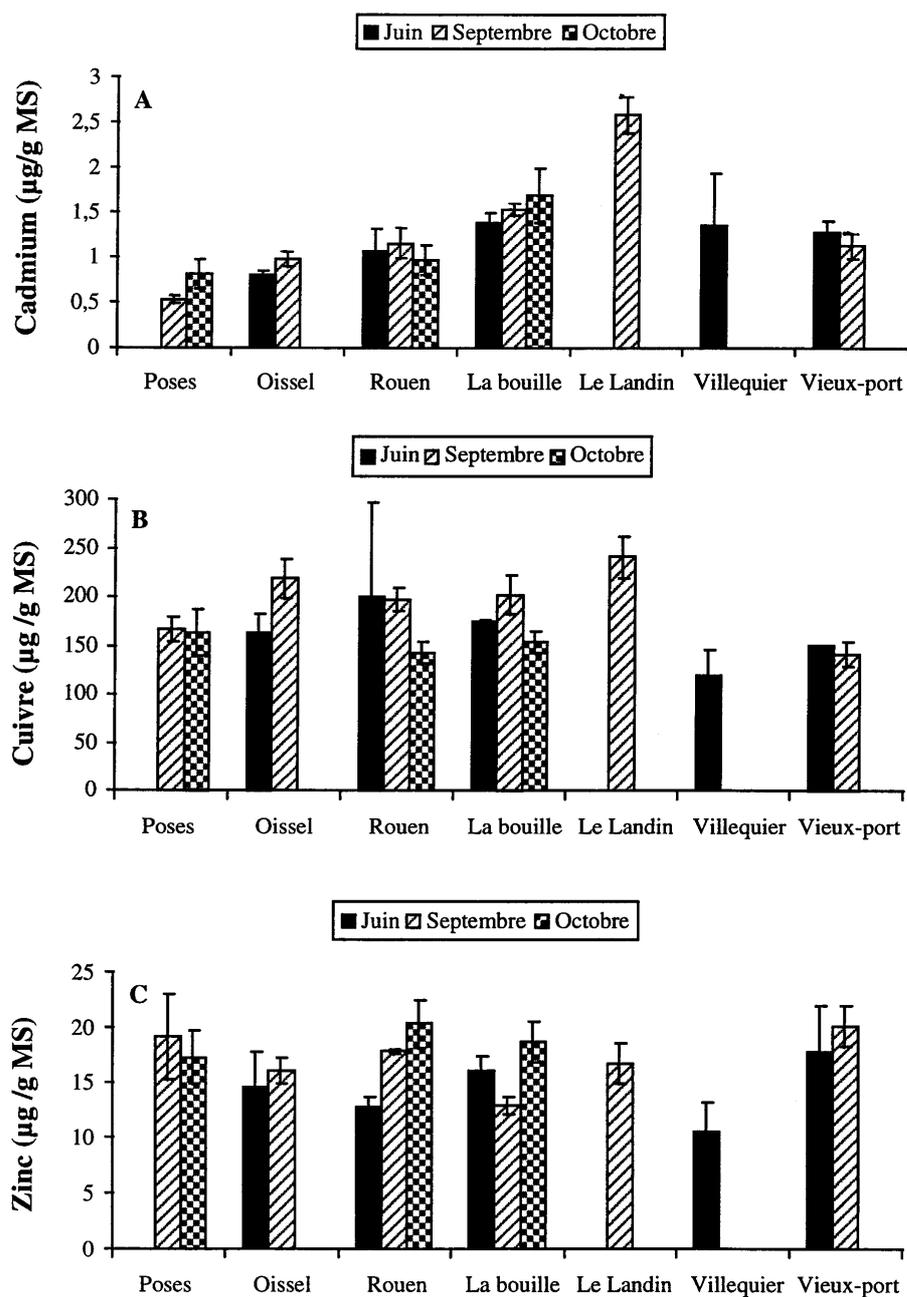


Figure 4

Concentration en cadmium (A), cuivre (B) et zinc (C) dans les tissus de dreissenès prélevées dans la partie aval de la Seine. Les barres représentent l'écart-type (n=5).

Contaminants et biomarqueurs chez *Dreissena* en Seine aval

Métaux

Les teneurs de métaux sont relativement élevées si on les compare à celles mesurées dans d'autres organismes de l'estuaire. En effet, les valeurs des concentrations en Cu, Cd et Zn des dreissènes sont toujours supérieures à celles trouvées chez différents crustacés et poissons, à l'exception de la teneur en Cd des copépodes qui est comparable (MIRAMAND *et al.*, 1997). Ainsi les concentrations sont généralement 2 à 100 fois supérieures selon l'élément et l'espèce comparée.

Aucune variation significative inter-site n'est observée pour les concentrations en Cu et Zn dans les zones étudiées. Par contre les concentrations en Cd sont multipliées par quatre entre Poses et Le Landin puis divisées par 2 jusqu'à Vieux-Port (Fig. 4). La concentration la plus importante en cadmium reportée jusqu'alors avait été obtenue à Jumièges tout près du Landin (Fig. 4).

Biomarqueur

La protéine MXR identifiée, d'une masse molaire moléculaire de 120 kDa, est exprimée plus fortement par les populations de dreissènes collectées en aval de Rouen (Fig. 5). Les plus hauts niveaux d'expression ont été mesurés à La Bouille corrélant les mesures chimiques et mettant en évidence l'effet de la contamination sur les organismes (Fig. 5).

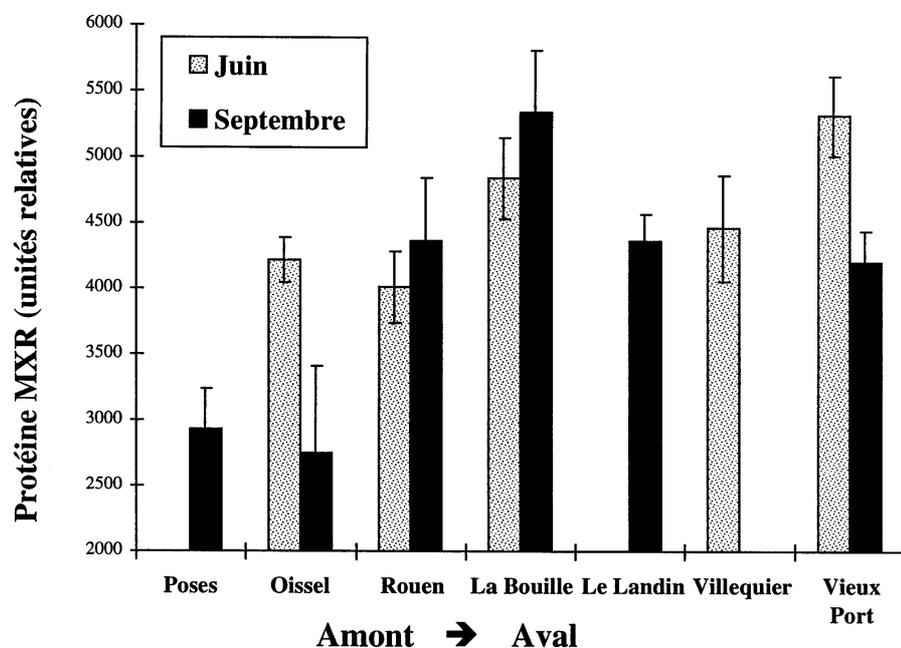


Figure 5

Niveaux d'expression de la protéine MXR chez les dreissènes en différents sites de la Seine.

Bulletin de la Société zoologique de France 125 (3)

Il est aussi notable que les niveaux d'expression de la protéine MXR sont significativement plus élevés de Rouen à Vieux-Port qu'en amont de Rouen (Fig. 5). Ceci indique que les dreissènes sont exposées à des niveaux supérieurs de polluants à l'aval de Rouen, polluants que les analyses chimiques ne sauraient tous détecter individuellement mais dont les effets sont intégrés dans la réponse biologique.

Conclusion

Les dreissènes apparaissent comme des organismes ayant une aptitude particulière à bioaccumuler les contaminants. Ces animaux sont ainsi particulièrement intéressants pour étudier les niveaux et les variations de la contamination du milieu car à ces capacités d'accumulation se superposent de faibles capacités de biotransformation et un mode de vie qui les rend représentatifs de leur lieu de prélèvement.

Remerciements

Ces travaux ont été effectués dans le cadre du programme de recherche « Seine-Aval ». Les auteurs tiennent à remercier vivement le Conseil Régional de Haute-Normandie ainsi que l'Agence de l'Eau Seine-Normandie de leurs soutiens financiers.

Laboratoire d'Ecotoxicologie, Université du Havre,
25 rue Philippe Lebon, 76058 Le Havre, France

* Laboratoire Eutrophisation et Bioaccumulation,
IFREMER, Centre de Brest, 29280 Plouzane, France

RÉFÉRENCES

- AHLBORG, U.G., BECKING, G.C., BIRNBAUM, L.S., BROUWER, A., DERKS, H.J.G.M., FEELY, M., GOLOR, G., HANDGERG, A., LARSEN, J.C., LIEM, A.K.D., SAFE, S.H., SCHLATTER, C., WAERN, F., YOUNES, M. & YRJÄNHEIKKI, E. (1994).- Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs. *Chemosphère*, **28**, 1049-1067.
- BRADFORD, M.M. (1976).- A rapid and sensitive assay of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal. Biochem.*, **772**, 248-264.
- GEORGES, E., BRADLEY, G., GARIEPY, J. & LING, V. (1990).- Detection of P-glycoprotein isoforms by gene-specific monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87**, 152-156.
- GOTTESMAN, M.M. & PASTAN, I. (1993).- Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 385-427.
- LAEMMLI, U.K. (1970).- Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, **227**, 680-685.
- MINIER, C., AKCHA, F. & GALGANI, F. (1993).- P-glycoprotein expression in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* in polluted seawater. *Comp. Biochem. Physiol.*, **106B**, 1029-1036.
- MINIER, C. & MOORE, M.N. (1996).- Rhodamine B accumulation and MXR protein expression in mussel blood cells: effects of exposure to vincristine. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **142**, 165-173.

Contaminants et biomarqueurs chez *Dreissena* en Seine aval

- MIRAMAND, P., BENTLEY, D., FICHET, D., CAURANT, F. & GUARY, J.C. (1995).- Concentration en métaux lourds (Cd, Cu, Pb, Zn) observés dans différents maillons du réseau trophique pélagique de l'estuaire de la Seine. *Rapport scientifique « Seine Aval »*, 121-129.
- MIRAMAND, P., GUYOT, T. & CAURANT, F. (1997).- Suivi mensuel de la bioaccumulation des métaux (Cd, Cu, Pb, Zn) dans le réseau trophique pélagique de la zone oligohaline de l'estuaire de la Seine. *Programme scientifique Seine Aval, thème édifices biologiques, rapport 1996, Rouen*. 189-198.
- TOOMEY, B.H. & EPEL, D. (1993).- Multidrug resistance in *Urechis caupo* embryos: Protection from environmental toxins. *Biological Bull.*, **185**, 355-364.
- TOWBIN, H.T., STAEHELIN, T. & GORDON, J. (1979).- Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**, 4350-4354.

(reçu le 11/01/99 ; accepté le 27/01/99)

