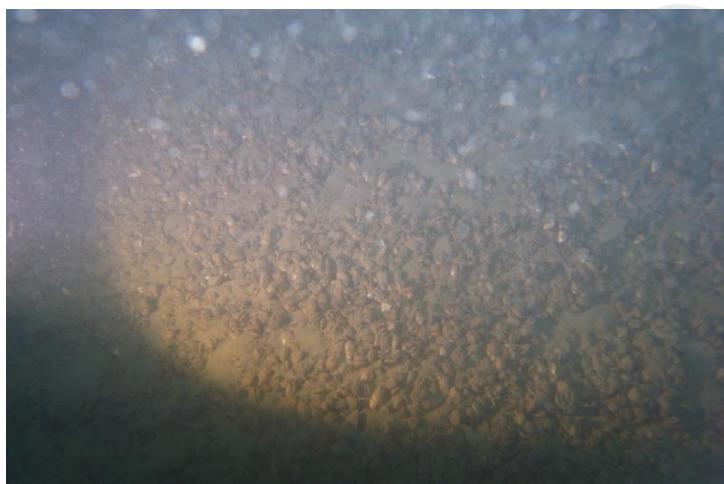


Master of Science in Environmental Science

Écotoxicologie lacustre : suivi de la bioaccumulation des métaux et de la dynamique des métallothionéines chez la moule Quagga.

Christophe Reis

Sous la direction de la Dre. Nathalie Chèvre



Moules Quagga dans la baie de Vidy (photo de Pascal Mulattieri).

août – 2023

Information importante: Le texte de ce travail n'a pas été rédigé en vue d'une publication ou dans l'optique d'une édition ou diffusion ; son format et tout ou partie de son contenu répondent donc à cet état de fait. Les contenus n'engagent pas l'Université de Lausanne.
Ce texte n'en est pas moins soumis aux règles et droits usuels sur les droits d'auteur. A ce titre, les citations tirées du présent mémoire ne sont autorisées que dans la mesure où la source et le nom de l'auteur.e sont clairement cités. La loi fédérale sur le droit d'auteur et les droits voisins (LDA) est en outre applicable.

Convention de transmission des travaux de master en Sciences de l'Environnement déposés dans les archives de la Bibliothèque des Sciences de la Terre

Les travaux de masters en Sciences de l'Environnement sont juridiquement considérés comme des copies d'examen et sont, à ce titre, confidentiels.

Cependant, la confidentialité peut être exceptionnellement levée avec l'accord de l'auteur du travail de master et du directeur du travail de master pour des **motifs de recherche scientifique, sans but commercial**.

- Par sa signature, l'auteur du travail de master en autorise la transmission sous format papier et électronique pour des motifs de recherche scientifique, par la bibliothèque des Sciences de la Terre.
- Le directeur du travail doit indiquer si le travail contient des données juridiquement confidentielles (par ex. des données de compagnies pétrolières ou minières) ne pouvant pas être diffusées.
- Le directeur du travail peut en outre décider d'une période d'embargo durant laquelle le travail ne sera pas transmis, même pour des motifs de recherche scientifique. La période d'embargo s'éteint automatiquement au plus tard à la retraite du directeur du travail ou lorsque le directeur quitte l'université de Lausanne.

Titre du travail : Écotoxicologie lacustre : suivi de la bioaccumulation des métaux et de la dynamique des métallothionéines chez la moule Quagga.

Auteur : Christophe Reis

Directeur : Nathalie Chèvre

J'autorise la transmission de mon travail de master pour des motifs de recherche scientifique sans but commercial.

Lausanne, le 05.09.23, signature de l'étudiant

Le travail contient des données confidentielles et ne peut pas être transmis oui / non

Le travail est soumis à un embargo jusqu'au (date)

L'embargo peut être levé avant la date indiquée moyennant mon accord oui / non

Lausanne, le 05.09.23, signature du directeur

Maîtrise universitaire ès sciences en sciences de l'environnement
Secrétariat du Master MSc | www.unil.ch/masterenvi

Résumé

En milieu urbanisé, l'impact des métalloïdes sur les organismes aquatiques peuvent être important. Dans le but d'évaluer la toxicité de ces métaux, des moules Quagga (*dreissena bugensis*) ont été prélevées à deux endroits : Baie de Vidy (site pollué) et St-Prex (site de référence). Les analyses de laboratoire ont permis d'extraire des indices de conditions, des concentrations en métallothionéines, ainsi que des concentrations de métaux dans la chair et dans la coquille.

Organisme filtreur d'exception, la moule Quagga accumule un nombre important de métaux dans son tissu mou. La quantité de métalloïdes va surtout dépendre de la disponibilité des métaux dans l'environnement où elle vit et est donc site/saison -dépendante. Une fois assimilé dans la chair, certains de ces métaux peuvent se retrouver dans la coquille. De par leur comportement dans l'organisme, deux métaux se distinguent fortement. Le cadmium, fortement毒ique pour le métabolisme semble s'accumuler plus facilement dans la coquille. Le mercure, quant à lui est fortement présent dans la chair et la coquille des moules, et ce, même si les concentrations dans les sédiments sont très faibles. Cette caractéristique ferait de la moule Quagga un excellent bioindicateur de ce métal. Finalement, le calcium est très certainement un métal clé puisqu'il semble jouer un rôle important dans le développement et la défense contre les métalloïdes.

Les résultats semblent montrer que la croissance des individus exposés aux métaux est fortement modifiée. En effet, à la même saison, les individus de Vidy sont généralement plus petit que ceux de St-Prex. Ce changement viendrait principalement d'une allocation différente de l'énergie chez les individus de Vidy qui doivent se protéger des métalloïdes et leur toxicité. Cependant, les variations saisonnières (notamment la température) obligeraient les individus à croître davantage. Finalement, il semblerait qu'un site pollué puisse également avoir des avantages comme l'apport de nutriments dans certains cas (par ex. : la présence d'une STEP).

Le taux de métallothionéine (MTs) est révélateur de la présence des métaux dans les organismes. Cependant, cette relation n'est pas toujours assurée. En effet, avec un taux plafond

qui ne peut être dépassé, les MTs ne pourraient pas traduire une augmentation, au-delà d'un certain seuil, des concentrations en métalloïdes dans le tissu. De plus, par manque de valeur seuil, les métallothionéines semblent être inefficaces pour l'évaluation d'un site considérée comme « modérément pollué ». Pour toutes ces raisons, les analyses en métaux doivent obligatoirement accompagner ceux des MTs. Sans quoi, les données pourraient être inutilisables.

Outre la gestion par les métallothionéines et le calcium, la moule Quagga semble pouvoir accumuler des métaux dans sa coquille afin de se défendre. Cette capacité dépend fortement du métal en question et est donc site-dépendant.

En résumé, afin de mieux comprendre la moule Quagga et son environnement, il est important de continuer à l'étudier. Ceci, afin de pouvoir l'utiliser de manière efficace dans les suivis écotoxicologique.

Mots clés : moules Quagga, métaux, métallothionéine, écotoxicologie, lac.

Abstract

In urban environments, the impact of metalloids on aquatic organisms can be significant. To assess the toxicity of these metals, Quagga mussels (*dreissena bugensis*) were collected at two sites : Baie de Vidy (polluted site) and St-Prex (reference site). Laboratory analyses extracted condition indices, metallothionein concentrations and metal concentrations in the flesh and shell.

An exceptional filter feeder, the Quagga mussel accumulates a large number of metals in its soft tissue. The quantity of metalloids depends above all on the availability of metals in the environment in which it lives, and is therefore site/season-dependent. Once assimilated in the flesh, some of these metals can end up in the shell. Two metals stand out for their behavior in the body. Cadmium, which is highly toxic to the metabolism, seems to accumulate easily in the shell. Mercury, on the other hand, is strongly present in mussel flesh and shell, even though concentrations in sediment are very low. This characteristic makes the Quagga mussel an excellent bioindicator for mercury. Finally, calcium is certainly a key metal, as it appears

to play an important role in development and defense against metalloids.

The results seem to show that the growth of individuals exposed to metals is strongly modified. In fact, during the same season, individuals from Vidy are generally smaller than those from St-Prex. This change is mainly due to a different allocation of energy in Vidy individuals, who need to protect themselves from metalloids and their toxicity. However, seasonal variations (notably temperature) would force individuals to grow more. Finally, it would seem that a polluted site can also have advantages, such as providing nutrients in certain cases (e.g. the presence of a WWTP).

Metallothionein (MTs) levels are indicative of the presence of metals in organisms. However, this relationship is not always certain. Indeed, with a ceiling level that cannot be exceeded, MTs may not reflect an increase in metalloid concentrations in the tissue. What's more, for lack of a threshold value, metallothioneins appear to be ineffective for assessing a site considered "moderately polluted". For all these reasons, it is essential that metal analyses accompany those of MTs. Otherwise, the data may be unusable.

In addition to management by metallothioneins and calcium, the Quagga mussel seems to be able to accumulate metals in its shell in order to defend itself. This ability is highly dependent on the metal in question and is therefore site-dependent.

In short, to better understand the Quagga mussel and its environment, it is important to continue studying it. This will enable us to use it effectively in ecotoxicological monitoring.

Key words : Quagga mussels, metals, metallothioneine, ectotoxicology, lake.

Remerciements

Je voudrais remercier toutes les personnes qui m'ont aidé au cours de cette dernière année et qui ont rendu ce travail possible.

Je remercie tout d'abord **Pascal Mulattieri**, **Christian** (son compagnon de plongé) et **Christian** (l'homme à la barre) pour ces deux escapades au large de la Baie de Vidy et ces deux belles pêches très fructueuses à quelques mètres de l'exutoire de la STEP de Vidy. Je remercie également **Floreana Miesen** et **Aurélien Ballu** pour leur disponibilité et leur aide dans la campagne de St-Prex, certes plus rudimentaire, mais diablement efficace (avec quelques gouttes de sueur tout de même). Je remercie également la **commune de St-Prex** et **Joris** pour leur accueil et le temps consacré à cet après-midi très instructif.

Je remercie **Micaela Faria** et **Laetitia Monbarron** pour leurs multiples soutiens méthodologiques/logistiques et leurs précieuses aides en laboratoire. Je tiens également à remercier **Jorges Spangenberg** pour sa grande disponibilité sans laquelle je n'aurai jamais pu extraire les métaux de la chair. Un remerciement particulier à **Dan Andersson** qui m'a aidé pendant des heures interminables pour la partie, peu sexy, mais essentielle : la dissection des moules.

Un grand merci à **Floriane Tisserand** pour m'avoir aidé à mettre en place le protocole de laboratoire pour la quantification des métallothionéines, pour ses conseils et son aide. Finalement, une reconnaissance infinie à **Nathalie Chèvre** avec qui j'ai eu le plaisir de développer ce projet depuis le stade larvaire et qui voit le jour aujourd'hui. Je la remercie également pour sa confiance, son encadrement, ses conseils et sa disponibilité au cours de ces deux dernières années.

Table des matières

Résumé	5
Remerciements	8
1 Introduction	15
2 Matériels et méthodes	20
2.1 Échantillonage - terrain	20
2.1.1 Sites d'échantillonage	20
2.1.2 Méthode de prélèvement	22
2.2 Analyses - laboratoire	23
2.2.1 Indices de condition	24
2.2.2 Métallothionéine	24
2.2.3 Métaux (chair et coquille)	27
2.3 Base de données	28
2.4 Analyses statistiques	29
3 Résultats	31
3.1 Analyses de variance	31
3.1.1 Indices de condition	31
3.1.2 Métallothionéine	33
3.1.3 Métaux	33
3.2 Tests de corrélation	37
3.2.1 Indices de condition - indices de condition	37
3.2.2 Indices de condition - métallothionéine/métaux	37
3.2.3 Métallothionéine - métaux	39
3.3 Statistiques multivariées	39
3.3.1 Analyses en composantes principales	39
3.3.2 Analyses discriminante linéaire	44
3.4 Comparaisons avec les métaux contenus dans les sédiments	46

4 Discussion	47
4.1 Indices de condition	47
4.2 Concentrations des métallothionéines	49
4.3 Concentrations des métaux	50
4.4 Analyses des relations entre morphologie et concentration	52
4.5 Dynamique des métaux dans les communautés de moule Quagga	53
4.6 Métaux dans les sédiments et dans les moules Quagga	55
4.7 Les limites de l'étude	56
5 Conclusion	57
5.1 Synthèse finale	57
5.2 Perspectives futures	59
5.2.1 Analyses de redondance	59
5.2.2 Régressions linéaires	59
5.2.3 Analyses des métaux en laboratoire	60
Références	61
Annexes	72
5.3 Annexe A : protocole d'extraction et de quantification de la métallothionéine.	72
5.4 Annexe B : points d'analyse des métaux dans les sédiments comparé au point de prélèvement des moules Quagga pour St-Prex.	77
5.5 Annexe C : métaux indépendant - chair.	78
5.6 Annexe D : métaux indépendant - coquille.	79
5.7 Annexe E : résultats complets des analyses de variance pour les indices de conditions.	80
5.8 Annexe F : études des corrélations entre les indices de condition	81
5.9 Annexe G : résultats de l'ACP pour tous les groupements de métaux.	82

Liste des acronymes

ACP : analyse en composantes principales

ADL : analyse discriminante linéaire

Ag : argent

Al : aluminium

As : arsenic

Ba : baryum

Ca : calcium

Cd : cadmium

Cr : chrome

Cu : cuivre

Do : déversoir d'orage

Fe : fer

Hg : mercure

IC : indices de condition

MéCa : métal calcium

MéCi : métaux cible

MéSCa : métaux sans calcium

MéTo : métaux totaux

Mi : métaux internes

Mn : manganèse

MTs : métallothionéines

Ni : nickel

OEaux : ordonnance sur la protection des eaux

Pb : plomb

RDA : analyse de redondance

RL : régression linéaire

Sb : antimoine

STEP : station d'épuration

Zn : zinc

Table des figures

1	Structure de la métallothionéine et les liens avec les ions métalliques. (Bensakhria dans Housecroft <i>et al.</i> , 2010).	19
2	Site de prélèvement - Vidy (cartes tirées de Google maps et map.geo.admin.ch).	20
3	Site de prélèvement - St-Prex (cartes tirées de Google maps et map.geo.admin.ch)	21
4	Répartition des échantillons.	23
5	Exemple de dissection réussie.	24
6	Conditionnement des échantillons pour l'analyse des métallothionéines.	25
7	Conditionnement des échantillons pour l'analyse des métaux.	28
8	Homogénéisation des coquilles par broyage manuel.	28
9	Résultats des analyses de variance pour les indices de condition (VD_A : Vidy en automne ; SP_A : St-Prex en automne ; VD_H : Vidy en hiver).	32
10	Résultats des analyses de variance pour les concentrations en métallothionéines.	33
11	Pourcentages des métaux présents dans la chair et la coquille.	34
12	Comparaisons des trois groupements différents possibles pour les métaux dans les coquilles.	35
13	Résultats des analyses de variance pour les concentrations en métaux.	36
14	Projections de tous les métaux et leur contribution aux deux dimensions.	40
15	Classification des individus en fonctions de la concentration en métalloïdes.	41
16	Contributions des 15 métaux les plus importants dans l'ACP.	42
17	Nouvelle classification des individus avec les métalloïdes les plus importants.	43
18	Résultats de l'ADL pour les métaux.	44
19	Résultat de l'ADL pour les métallothionéines.	45
20	Concentrations des métaux dans les sédiments et dans les moules - Vidy.	46
21	Concentrations des métaux dans les sédiments et dans les moules - St-Prex.	47

Liste des tableaux

1	Résumé des groupements selon les différences significatives.	35
2	Coefficients de corrélation pour les métaux dans la chair et la coquille (en orange : p-value <0.05).	38
3	Coefficients de corrélation pour les métallothionéines dans la chair (en orange : p-value <0.05).	38

1 Introduction

Bien de première nécessité, l'eau a toujours été un facteur important pour le développement des populations. Ainsi, les grandes villes fortement développées sont généralement proches d'un plan d'eau comme une rivière et/ou un lac. Au cours du temps, la densification de la population a donné lieu à une pression toujours plus importante sur les milieux aquatiques. En effet, il y a un lien très fort entre la densité d'une population et les impacts dont elle est responsable (Liyanage et Yamada, 2017). Ainsi, on peut citer les pesticides (Shefali *et al.*, 2021), les médicaments (Porretti *et al.*, 2022) et bien d'autres substances pouvant être problématiques pour la vie aquatique (Ji *et al.*, 2021, Kataoka et Kashiwada, 2021). Il devient donc important d'étudier ces impacts afin de mieux comprendre les effets que peuvent avoir nos activités sur la faune et la flore aquatique.

Parmi toutes les substances potentiellement problématique pour les espèces aquatiques, on peut citer les métaux. En effet, leur taux de dégradation étant nul, les concentrations en ions métaux augmentent de manière continue dans l'environnement (Kahlon *et al.*, 2018). Selon Zhang *et al.* (2018), les métaux présents dans le milieu naturel ont deux sources potentielles : la géologie du sol et l'activité anthropique. Ainsi, l'arsenic (As), l'aluminium (Al), le fer (Fe), le chrome (Cr), le nickel (Ni) et le manganèse (Mn) seraient plutôt d'origine naturelle alors que le cadmium (Cd), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le plomb (Pb) et le mercure (Hg) proviendraient plutôt de l'activité humaine (Ljung *et al.*, 2006). De plus, Ribeiro *et al.* (2012) ont identifié le Baryum (Ba), l'antimoine (Sb), le Cuivre et le Zinc comme étant des éléments fortement relié au trafic urbain alors que Rodríguez-Seijo *et al.* (2017) relient le Pb et le Cu aux zones industrielles. Tous ces métaux finissent pour la plupart, sans traitement préalable, dans les rivières et/ou les lacs à travers le réseau d'évacuation des eaux claires des villes. De plus, un traitement à travers une station d'épuration (STEP) ne permet pas d'éliminer systématiquement tous les métaux en suspension (Buzier *et al.*, 2006). Par conséquent, les sédiments près des zones urbanisées sont relativement plus chargés en métaux traces.

Pour citer quelques exemples, Wildi *et al.* (2004) ont démontré que les sédiments se situant en aval de quatre zones urbaines majeures sont considérées comme polluées selon l'ordonnance

sur les atteintes portées aux sols (OSol). En 2015, une campagne de prélèvements effectuée dans tout le Léman a permis de relever que les concentrations en métaux dans les sédiments sont deux à trois fois supérieures aux teneurs naturelles (Ferrari *et al.*, 2017). On retrouve par exemple 58 [mg/kg] de Cuivre, 146 [mg/kg] de Zinc et 0.61 [mg/kg] de Cadmium contre respectivement, 30, 60 et 0.2 [mg/kg] en milieu naturel. Cette même étude confirme que la Baie de Vidy est le point le plus contaminé du lac avec des concentrations de 298 (Cu), 715 (Zn), 2,64 (Cd) et 4,37 (Hg) [mg/kg]. Ce qui représente une augmentation moyenne d'un facteur 13 par rapport à la médiane de tous les autres points de prélèvement. Si l'ordonnance sur la protection des eaux (OEaux) précise que la qualité de l'eau doit être suffisante pour qu'aucune substance polluante ne s'accumule dans les sédiments et les organismes aquatiques (Annexe 1, art. 1, al. 3, let. c), aucune valeur seuil n'est fixée.

À noter que le terme «métaux lourds» («Heavy metals» en anglais), très répandu, ne sera pas utilisé dans ce présent document, et ce, pour deux raisons. D'une part, les métaux retenus pour les analyses ne sont pas tous des métaux lourds (Par exemple : fer et aluminium). D'une autre part, une étude de Pourret *et al.* (2021) montre que ce terme est trop souvent mal utilisé et ne répond pas à une définition scientifiquement claire des composés métalliques. C'est pourquoi, dans un souci de clarté, il sera question de «métaux» ou «métalloïdes». Deux termes suggérés par ces mêmes auteurs.

Une fois dans l'eau, la quantité de métalloïde pouvant être absorbé par les organismes est plus ou moins importante. C'est ce qu'on appelle la biodisponibilité. Elle va notamment dépendre de la forme ionique du métal, de son degré de solubilité, des interactions avec les autres solutés et des caractéristique de l'organisme. Si un métal est plus rapidement assimilé qu'il n'est éliminé par l'organisme, on parle alors de bioaccumulation. Ces ions métaux entrent dans les organismes vivants à travers l'alimentation, la respiration, etc. Une fois dans le corps, ces métaux peuvent alors créer une toxicité propre à chaque élément (Meador, 2006). L'assimilation et l'accumulation des métaux dans les tissus sont spécifiques à chacun (Li *et al.*, 2018) et ne sont pas nécessairement reliées à la biodisponibilité ou à la concentration dans les sédiments (Chen *et al.*, 2016). En d'autres termes, si l'on veut étudier l'impact des métaux sur la faune et la flore, l'analyse des métaux présents dans l'environnement (en suspension

dans l'eau et dans les sédiments) n'est pas suffisante. Il faut également évaluer les métaux présents dans les organismes (Giamberini *et al.*, 1996).

Les espèces pouvant être utilisé comme bioindicateur de la pollution sont nombreuses et variées. Dans cette étude, il a été décidé de s'orienter vers les moules. En effet, Diggins (2001) a observé un individu avec un taux de filtration maximal de 400 [ml/h]. Ce qui fait de la moule une filtreuse très efficace et assure une bioaccumulation assez élevée qui permet d'obtenir des résultats où d'autres types d'analyses (par exemple sédimentaire ou aquatique) n'en donnent pas toujours (Richman et Somers, 2005 ; Mueting et Gerstenberger, 2010 ; Zuykov *et al.*, 2013 ; Jaouen *et al.*, 2000). En effet, ces organismes sont ceux qui accumulent le plus de métaux loin devant les crustacés et les poissons (Liu *et al.*, 2018). Deuxièmement, les mollusques sont des organismes fixes qui ne se déplacent que peu ou pas après leur stade juvénile. Cette sédentarité fait qu'elles sont un moyen efficace d'évaluer l'impact des polluants dans le temps et pour un lieu donné (Roesijadi *et al.*, 1984 ; Richman et Somers, 2010).

À nouveau, les mollusques utilisés pour le suivi environnemental sont nombreux. Cependant, une moule de la famille des *dreissenidae* ressort comme étant la plus utilisée pour les analyses en eau douce : la moule Zébrée ou *Dreissena polymorpha* (Kerambrun *et al.*, 2018). Cette moule bivalve est originaire du bassin Ponto-Caspian (Stepien et Tumeo, 2006) et aurait colonisé le Nord et l'ouest de l'Europe durant le 19^{ème} siècle et l'Amérique du Nord durant le 20^{ème} siècle (Péden *et al.*, 2019). Selon Heiler *et al.* (2013), cette importante propagation est due à une accumulation de deux processus : la dispersion diffuse (dispersion active ou passive des adultes et/ou de larves) et la dispersion par « saut » (transport de bateau entre les lacs). Cette omniprésence fait que cette espèce est mondialement utilisée et qu'il existe plus de 2'000 publications en lien avec le domaine écologique et environnemental (McLaughlan *et al.*, 2014). Cependant, plus récemment, une autre espèce de la même famille a fait son apparition : la moule Quagga ou *Dreissena bugensis*. Elle serait le résultat d'une spéciation sympatrique : émergence d'une nouvelle espèce issue d'un ancêtre commun dans une même région géographique (Stepien *et al.*, 1999). La moule Quagga serait arrivée dans l'Ouest de l'Europe et dans le Nord de l'Amérique durant la dernière partie du 20^{ème} siècle (Péden *et al.*, 2019). Elle aurait ainsi colonisé l'Europe à une vitesse de 120 [km/an] (Matthews *et al.*, 2015)

en suivant les mêmes processus de déplacements que la moule Zébrée.

Aujourd’hui, nous remarquons que la moule Zébrée est dominée par la Quagga à certains endroits (Wilson *et al.*, 2006). C’est le constat qu’a pu faire Schäfer *et al.* (2012) pour une section du Rhin en Allemagne. Si on remarque encore une présence importante de la moule Zébrée dans les zones peu profondes, il se peut que le processus d’exclusion prenne plusieurs années. En effet, *D. polymorpha* préfère les zones proches du bord et peu profond alors que *D. bugensis* préfère d’abord coloniser les fonds (substrats mous et zones froides) avant de remonter vers les zones moins profondes où commence la cohabitation (Kerambrun *et al.*, 2018). Ainsi, il est possible que la moule Quagga remplace la moule Zébrée dans les études écotoxicologiques futures (Schäfer *et al.*, 2012).

Ce changement d’espèce peut avoir des aspects positifs, comme négatifs. Tout d’abord, *D. bugensis* à une niche écologique bien plus large puisqu’elle peut coloniser des substrats mobiles (comme le sable), des eaux bien plus profondes (plus de 130 mètres) et survivre à des températures en dessous des 5 [°C] (Mills *et al.*, 1993, Mills *et al.*, 1996). Cette étonnante capacité permet d’élargir les zones où les études écotoxicologiques sont envisageables. Cependant, les deux espèces ne réagissent pas de la même manière face à leur environnement. Des études démontrent que le système métabolique et physiologique des deux *Dreissena* présentent de nombreuses différences (Nalepa *et al.*, 2010). Ainsi, la concentration interne en métaux est constamment plus basse chez *D. bugensis* que chez *D. polymorpha* (Richman et Somers, 2005 ; Kerambrun *et al.*, 2018). Ce qui est assez étonnant lorsqu’on sait que la moule Quagga filtre plus efficacement l’eau à hauteur de 37 [%] que la moule Zébrée (Diggins, 2001). Cela montre bien que les processus qui gouvernent la bioaccumulation sont complexes et variables dans les milieux aquatiques (Langston et Bebianno, 1998). Il est donc nécessaire d’étudier la moule Quagga si l’on veut utiliser comme bio-indicateur d’une situation environnementale.

Les métallothionéines (MTs) sont très fréquemment utilisées lorsqu’il est question d’évaluer la présence des métaux dans les organismes aquatiques. (Péden *et al.*, 2019). En effet, cette protéine, de faible masse moléculaire, contient une proportion importante de cystéine qui permet la liaison avec des ions métalliques (voir Figure 1). Elle est notamment responsable de

(i) la régulation des métaux essentiels comme le cuivre ou le zinc et (ii) de la détoxicification des métaux toxiques comme le cadmium ou le mercure (Roesijadi, 1992 ; Viarengo et Nott, 1993 ; Geret et Cosson, 2000). On pourrait donc s'attendre à ce que le taux de MTs produit par un individu soit proportionnel à la quantité de métaux qu'elle accumule dans son tissu mou (Couillard *et al.*, 1995). En effet, Bordin *et al.* (1997) ont démontré par exemple que l'augmentation de la concentration du cuivre et du cadmium chez *Macoma balthica*, une moule bivalve, induit une augmentation de la quantité de métallothionéines afin de détoxifier l'organisme. Cependant, même si la relation métalloïde - métallothionéine existe, elle reste sujette à de fortes influences externes dues à des stresseurs environnementaux de nature différentes comme par exemple l'oxygène dissout ou la disponibilité des nutriments (Brix *et al.*, 2023).

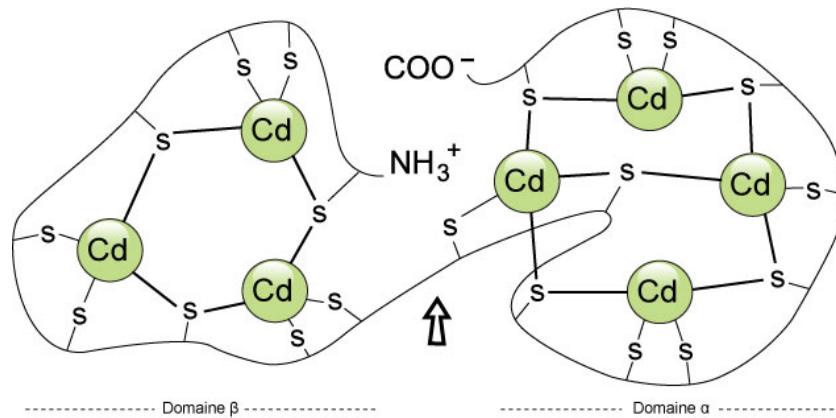


FIGURE 1 – Structure de la métallothionéine et les liens avec les ions métalliques. (Bensakhria dans Housecroft *et al.*, 2010).

Toutes ces observations nous montrent que la moule Quagga est une bonne candidate dans le domaine du suivi environnemental. Cependant, des recherches doivent encore être menées pour mieux comprendre son organisme et ses mécanismes biologiques. Le but principal de ce travail est de mieux comprendre, par des analyses en laboratoire et statistiques, la dynamique entre les métaux présents dans l'environnement /les moules Quagga et les métallothionéines. Il est notamment question de comprendre quels impacts ont les métalloïdes sur les populations de moules Quagga. De plus, est-ce que les MTs peuvent traduire un état anormal (biomarqueur) des individus dû à la présence des métaux ? Aussi, est-il possible de voir une différence en termes de métaux ou des MTs si deux analyses ont lieu à un moment différent de l'année

(variabilité saisonnière) et à des sites différents (variabilité inter-site) ? Finalement, en plus de la détoxicification par la métallothionéine, est-ce que la moule Quagga a d'autres mécanisme de défense afin de détoxifier son tissu mou (par exemple : accumulation des métaux dans sa coquille) ?

2 Matériels et méthodes

2.1 Échantillonage - terrain

2.1.1 Sites d'échantillonage

Le Léman est un lac subalpin qui est principalement alimenté par le Rhône dont l'eau provient de la chaîne des Alpes situé dans le canton du Valais. Le plan d'eau fait 72 [km] de long, pour une largeur maximale de 14 [km] et une profondeur maximale de 310 [m]. Sa superficie de 580 [km^2] offre une multitude d'espace aux caractéristiques très différentes.

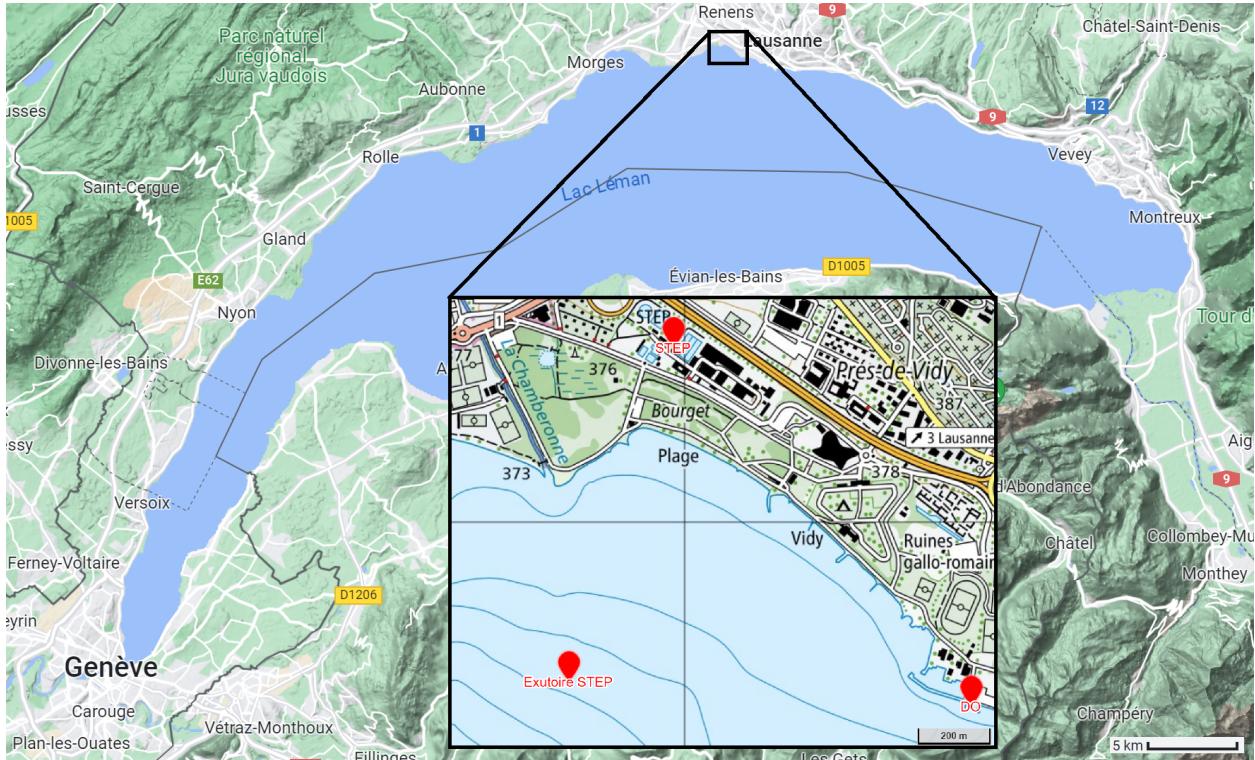


FIGURE 2 – Site de prélèvement - Vidy (cartes tirées de Google maps et map.geo.admin.ch).

Dans la partie nord du grand Lac, se situent la ville de Lausanne et la Baie de Vidy (voir

Figure 2). Ce dernier est le site le plus pollué du Léman tant en fonction de la bactériologie (Thevenon *et al.*, 2012) que des métaux (Thevenon *et al.*, 2011). Il existe, dans cette baie, trois sources de polluants. Il y a tout d'abord la station d'épuration de Vidy qui traite annuellement 32'300'000 [m³] d'eau usées. À l'est de cette station, se trouve le déversoir d'orage qui rejette annuellement 5'800'000 [m³] d'eau usées non-traitées. Finalement, la rivière "La Chamberonne" se jette dans la partie ouest de la baie. Ce cours d'eau reçoit des eaux usées non-traitées via (i) des déversoirs d'orage, (ii) des exfiltrations provenant des conduites situées dans le lit de la rivière, ainsi que des métaux issues de l'évacuation des eaux de chaussées. Cependant, l'apport des polluants par le déversoir d'orage et la rivière est négligeable en comparaison à celui de la station d'épuration de Vidy (Andersson, 2023), dont les concentrations de polluants trouvées dans les sédiments proche de l'exutoire sont proches des valeurs de concentrations avec des effets probables (Poté *et al.*, 2008).

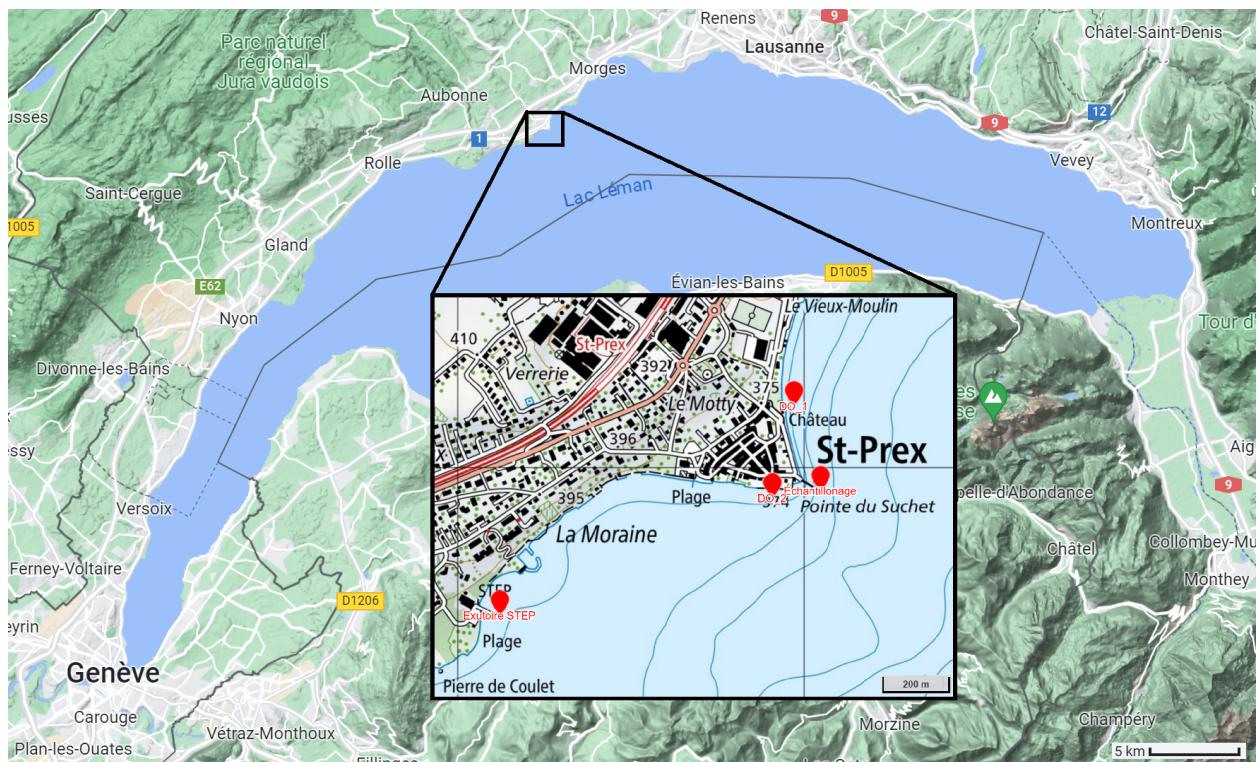


FIGURE 3 – Site de prélèvement - St-Prex (cartes tirées de Google maps et map.geo.admin.ch)

À l'inverse, St-Prex, le site de référence du Canton de Vaud, est très peu sujet à des pressions anthropiques (voir Figure 3). Tout d'abord, la STEP intercommunale (St-Prex, Buchillon, Etoy) n'a qu'un impact limité puisqu'elle se trouve à environ 1 [km] de distance et en aval du

courant par rapport au point de prélèvement. Les deux déversoirs d'orage situés à proximité de la Pointe du Suchet ne sont jamais actifs. De plus, le bassin-versant hydraulique (évacuation des eaux claires via le réseau de la ville) est relativement bien plus faible que celle représentée par la ville de Lausanne. Finalement, aucune rivière majeure, moyen de transport important de métaux vers les lacs (Vink et Behrendt, 2002; Jain et Sharma, 2006; Montuori *et al.*, 2013), ne se jette dans cette zone.

2.1.2 Méthode de prélèvement

L'exutoire de la STEP de Vidy se situe à environ 700 mètres du littoral et à 35 mètres de profondeur. Le site de prélèvement des individus se trouve à proximité de l'exutoire sans pour autant être trop près. En effet, les courants qui sont créés par le rejet peuvent avoir un impact trop important sur les populations de moules et leur capacité à s'installer (Chen *et al.*, 2011). C'est pourquoi les échantillons ont été prélevés, par deux plongeurs, au point GPS 46.5121, 6.5875 degrés décimaux (système géodésique WGS 84) et à environ 25 mètres de profondeur.

Le littoral de St-Prex est très différent de celui de Vidy de par sa bathymétrie. En effet, il ne faut qu'une distance de 40 mètres (contre 500 mètres pour Vidy) pour atteindre une profondeur d'environ 30 mètres. Le point de prélèvement a été choisi en fonction d'un travail de master précédent (Muller, 2022). Les prélèvements ont été effectués, à l'aide d'une benne Eckman, aux coordonnées 46.4780, 6.4623 degrés décimaux (système géodésique WGS 84) et à environ 25 mètres de profondeur.

Pour chaque site, deux campagnes de prélèvements étaient prévues. Les deux premières ont eu lieu comme prévu en automne : le 12 septembre 2022 pour Vidy et le 5 octobre 2022 pour St-Prex. Les deux dernières devaient avoir lieu en hiver. Celui de Vidy a effectivement eu lieu le 10 janvier 2023. Malheureusement, à cause de conditions météorologiques compliquées, la compagnie de prélèvements pour St-Prex a dû être reportée à maintes reprises. Finalement, il a été décidé de ne pas effectuer ce dernier prélèvement pour des raisons de temps restant avant la fin du master.

Excepté le moyen de prélèvement, la même méthode a été appliquée pour les trois compagnes. Une fois remontées à la surface, toutes les moules récoltées ont été conservées dans un seau en plastique contenant de l'eau de surface. En parallèle, un second bidon contenait de l'eau du lac en guise de réserve. Une fois au laboratoire, le bidon contenant les moules a été oxygéné à l'aide d'un bulleur en attendant le tri.

2.2 Analyses - laboratoire

Tout d'abord, les moules ont été triées en fonction de leur état. En effet, pour qu'elles soient utilisables dans l'étude, les individus devaient répondre à deux critères. Une moule ouverte et ne réagissant pas au touché était considérée comme morte et était retirée des individus à analyser. De plus, lors du prélèvement, il est possible que des parties de coquille se soit brisées ou fissurées. Si tel était le cas, l'individu en question était automatiquement mis de côté. Les individus sélectionnés ont été conservés dans des aquariums remplis d'eau du lac, oxygénée par un bulleur.

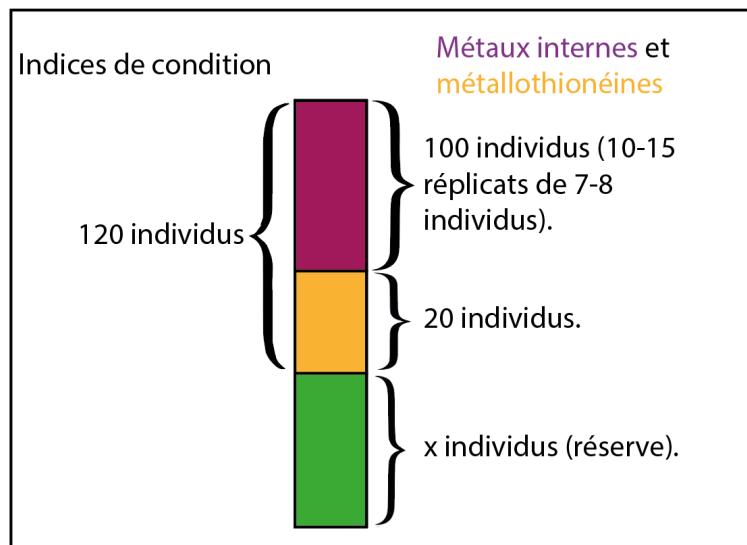


FIGURE 4 – Répartition des échantillons.

Le plan d'échantillonnage (voir Figure 4) prévoyait 20 individus pour la métallothionéine et environ 100 individus pour les métaux contenus dans la coquille et la chair. Tous ces individus ont été pesés et mesurés afin de récolter leurs indices de conditions. On compte alors 120 indices de conditions (IC), 20 données de métallothionéine et 20 à 30 données de

métaux (chair et coquille) par campagne. Une fois le conditionnement terminé, les individus restant dans le bac principal ont été congelés puis stocker à -70 [°C] afin de pouvoir les utiliser ultérieurement si nécessaire.

2.2.1 Indices de condition

Tous les individus ont été mesurés et pesés après que leur coquille ait été nettoyée de tous les éléments étrangers (par ex. algues ou cailloux) avec un bistouri en céramique. Concernant la taille, les trois dimensions (longueur, largeur et épaisseur) ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse avec une précision au centième. Les poids (masse totale, masse du tissu sans eau excédentaire et masse de la coquille) ont été pesés avec une balance analytique en [mg] avec une précision de l'ordre de la dixième. Finalement, la masse de l'eau résiduelle a été calculée en soustrayant le poids total (avant dissection) avec le poids de la coquille et de la chair (après dissection). Lors de cette étape, il est possible que la coquille se soit brisée. Ceci arrivait plus souvent pour les moules de Vidy que pour celles de St-Prex. Pour éviter toute erreur due à des pertes, seuls les individus dont la coquille est restée intacte (voir Figure 5) ont été conservés pour les analyses.



FIGURE 5 – Exemple de dissection réussie.

2.2.2 Métallothionéine

Pour la métallothionéine, un individu représentait un échantillon. Une fois disséquée, la chair était placée dans des tubes Eppendorf 2 [ml] contenant environ 10 billes de broyage en verre et 1 bille en métal. Le tube était ensuite plongé dans de l'azote liquide avant d'être conservé

à -70 [°C] (voir Figure 6) jusqu'à l'extraction et la quantification de la protéine. Ce processus a été répété jusqu'à avoir 20 réplicats. La méthode d'extraction et de quantification des MTs s'inspire du protocole de Joana Soares de l'Université de Porto et a été adaptée dans nos laboratoires (voir Annexe A).

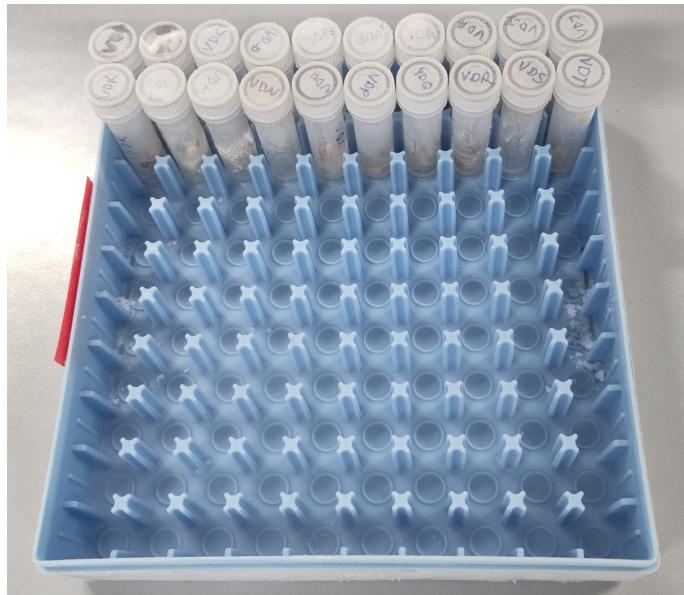


FIGURE 6 – Conditionnement des échantillons pour l'analyse des métallothionéines.

Les produits chimiques qui ont été utilisés sont : Tris(hydroxymethyl)aminomethane (cas n° : 77-86-1) ; Phenylmethane-sulfonyl fluoride (cas n° : 329-98-6), B-mercaptop-ethanol (cas n° : 60-24-2) ; Sodium phosphate monobasic monohydrate (cas n° : 10049-21-5) ; Disodium hydrogène phosphate heptahydrate (cas n° : 7782-85-6) ; Sodium chloride (cas n° : 7647-14-5) ; Na₂-EDTA (cas n° : 6381-92-6) ; L-Glutathione reduced (cas n° : 70-18-8) ; 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (cas n° : 69-78-3), Acide hydrochloride (cas n° : 7647-01-0) et l'éthanol (cas n° : 64-17-5).

Le tampon d'extraction se composait de (i) une solution Tris-HCl, (ii) du B-mercaptopéthanol et (iii) du PMSF dissout dans de l'éthanol. Les deux premiers composés avaient pour fonction de dénaturer les cellules afin de les détruire et de libérer les protéines qui étaient déformées par le B-mercaptopéthanol en cassant les ponts disulfure (liaison avec les métaux). Le PMSF agissait comme inhibiteur à protéase afin d'éviter que les protéines ne soient dégradées. Cette solution a été ajoutée dans le tube d'échantillon à une concentration de 500 [μl] pour 200

[mg] de chair fraîche. Les tubes ont ensuite été agités (2 cycles de 60 secondes à 7'500 [RPM]) afin de broyer le contenu. Les échantillons ont ensuite été centrifugés (15'000 RPM pendant 1 heure à 4 [°C]), les surnageants ont été transférés dans d'autres tubes puis incubés sur une plaque agitatrice (550 [RPM] pendant 30 minutes à 70 [°C]). Les échantillons ont été à nouveau centrifugés (15'000 [RPM] pendant 30 minutes à 4 [°C]) et les surnageants à nouveau transférés dans d'autres tubes. Les solutions finales, qui contenaient les métallothionéines, ont été analysées immédiatement.

Pour la quantification, deux volumes de 50 [μ L] d'échantillon ont été placés dans un tube de 2 [ml] brun (sensibilité à la lumière) et un tube de 2 [ml] classique (échantillon blanc). Par la suite, 50 [μ L] de HCl-EDTA ont été rajoutés dans tous les tubes afin de fixer les ions métalliques. Finalement, 1400 [μ L] de solution tampon-DTNB à 0.43 [mM] ont été ajoutés dans tous les tubes bruns et 1400 [μ L] de solution tampon (sans DTNB) ajoutés dans les blancs. La même procédure que pour les échantillons de moules (tubes bruns) a été appliquée à une gamme de 11 concentrations de GSH (de 0 à 1500 [μ M]). Tous les tubes (sauf les blanc) ont ensuite été incubés à température ambiante pendant 30 minutes afin que le DTNB se lie et se colore. Toutes les préparations (la gamme GSH, les échantillons et leur blanc) ont ensuite été disposées en triplicat sur une microplaquette, puis lue avec une longueur d'onde de 412 [nm].

La relation absorbance - concentration GSH a permis de définir la courbe d'étalonnage. Cette dernière a ensuite été utilisée pour convertir l'absorbance des échantillons corrigée en quantité de GSH (en [μ g]). Cette valeur a ensuite été utilisée dans l'équation 1 afin de déterminer la concentration en métallothionéine (en [μ g/g]).

$$C(MTs) = \frac{GSH * 8600}{307.3 * 21 * pf} \quad (1)$$

où :

C(MTs) : concentration en métallothionéine [$\mu\text{g/g}$]

GSH : concentration en glutathion [μg]

8600 : masse molaire des MTs [g/mol]

307.3 : masse molaire de la GSH [g/mol]

21 : nombre de groupement S-H par molécule de métallothionéine

pf : poids frais de l'individu [g]

2.2.3 Métaux (chair et coquille)

Contrairement aux MTs, il a fallu un pool de 7 à 8 individus pour un échantillon. Une fois bien séparée de la coquille, les chairs ont été pesées dans une boîte de pétri. Ce processus a été répété jusqu'à ce que le poids de toutes les chairs atteigne environ 3.3 [g]. La boîte était alors scellée puis congelée à -70 [°C]. En parallèle, les coquilles correspondantes aux chairs ont été séchées, conservées dans un tube Falcon et également congelées à -70 [°C]. Cette méthode a été répétée jusqu'à obtenir 15 réplicats (15 boîtes de pétri et 15 Falcons) (voir figure 7).

Une fois les tissus lyophilisés, les échantillons ont été digérés dans de l'acide nitrique (cas n° : 7697-37-2) à l'aide de l'"Anton Paar multiwave 5000". La solution résultante a été diluée dans de l'eau déminéralisée jusqu'à atteindre 25 [ml] et a été transféré dans un tube Falcon (réserve). Ensuite, 5 [ml] de cette solution ont été alors ajoutées à 5 [ml] d'eau déminéralisée afin de faire une dilution de facteur deux. Il a fallu faire une dilution plus importante (1 :120) pour certains métaux comme le calcium. Tous les tubes de réserve ont été conservés à 5 [°C] en cas de besoin.

En parallèle, les coquilles ont été broyées à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Une fois totalement homogène (voir Figure 8), 0.3 à 0.4 [mg] de coquille ont été mélangé avec de l'acide nitrique. Les échantillons ont alors été soumis à la même procédure que la chair jusqu'à la



FIGURE 7 – Conditionnement des échantillons pour l’analyse des métaux.



FIGURE 8 – Homogénéisation des coquilles par broyage manuel.

dilution. Les échantillons ont été ensuite analysés par spectrophotométrie (ICP-OES) afin de quantifier 29 métaux.

2.3 Base de données

La partie laboratoire de ce travail à permis d’extraire quatre tableaux de données. Les deux premiers tableaux récapitulent les indices de condition pour les pools d’individus et leur teneur en métaux dans la chair (1) et dans la coquille (2). Un troisième tableau reprend les

indices de conditions et les concentrations de métallothionéine (3). Finalement, un dernier tableau recense tous les indices de conditions des individus analysés (4).

En plus de ces données, des données de concentrations en métaux dans les sédiments ont été repris dans la littérature. Pour Vidy, les concentrations, au point de rejet de la STEP, proviennent d'un travail de Master sur les sédiments dans la Baie de Vidy (Sabaratnam, 2018). Concernant le site de St-Prex, les données proviennent d'une campagne de 2015 menée par Loizeau (Loizeau *et al.*, 2017) avec un point situé à 1.5 [km] du point de prélèvement (voir Annexe B).

Toutes les données et le script édité sur *RStudio*[®] sont disponibles au téléchargement sur la page GitHub¹.

2.4 Analyses statistiques

Les premières analyses consistaient à analyser la distribution des données continues (box-plot). Puisque les données regroupent plus de deux groupes indépendants (trois campagnes d'échantillonnages), le test adapté était celui de l'ANOVA (ANalysis Of VAriance en anglais). Cependant, plusieurs conditions doivent être remplies. C'est pourquoi une série de traitements et de tests ont été appliqués aux données. Tout d'abord, les "outlyers" ont été testés afin de savoir s'ils étaient extrêmes. Si tel était le cas, ces données étaient retirées. Ensuite, la distribution normale des données et l'homogénéité des variances ont été testées avec respectivement le test de Shapiro et celui de Levene. Si les deux conditions étaient remplies, alors le test d'ANOVA pouvait être appliqué suivit du test post-hoc des étendues de Tukey. Dans le cas contraire, l'alternative non-paramétrique de l'ANOVA, le test de Kruskal-Willis a été appliquée aux données suivies du test de Dunn afin d'identifier les groupes significativement différents. Tous ces tests ont permis d'analyser les variances entre les campagnes d'échantillonnage pour les indices de conditions, la métallothionéine, les métaux contenus dans la chair et dans la coquille.

La seconde approche s'est concentré sur les recherches de corrélation. Il existe principalement

1. https://github.com/CReis93/Master_thesis_2023

trois méthodes : le coefficient r de Pearson, rho de Spearman et Tao de Kendall. Les données ne suivant pas toujours la loi normale, le choix s'est porté sur les deux derniers qui sont des tests de corrélations non-paramétrique (Colwell et Gillett, 2016). Si les résultats des deux méthodes sont sensiblement les pareils, la méthode de Kendall est tout de même plus robuste et performante (Croux et Dehon, 2010). Le choix s'est donc porté sur le coefficient Tao de Kendall. Ce coefficient varie entre -1 et 1. Plus la valeur est proche de 1, plus la variation est fortement corrélée de façon positive. À l'inverse, plus la valeur est proche de -1, plus la variation est fortement corrélée de façon négative. Finalement, si le coefficient est plus proche de 0, on peut conclure qu'il n'y a pas de lien entre les deux variables. Pour chaque coefficient, la p-value a également été calculée. Cette valeur est l'expression de la signification dont le seuil a été fixé à 0.05.

La troisième approche se composait de deux tests statistiques multivariées. Le but de cette approche était de représenter des données multidimensionnelles sur deux dimensions afin de rendre la visualisation possible, et ce, en minimisant le plus possible les pertes d'informations. Deux techniques principales ont été utilisées : l'Analyse en Composantes Principales (ACP) ou l'Analyse Discriminante Linéaire (ADL). Si ces deux méthodes visent à diminuer la dimension des données et à les classifier, il reste que l'ADL, une méthode de classification supervisée, permet de mieux comprendre la distribution des données (Balakrishnama et Ganapathiraju, 1998). C'est pourquoi l'ADL a été préférée pour la classification des groupes alors que l'ACP a été utilisée afin de comprendre l'importance des différentes variables.

Pour finir, une approche supplémentaire consistait à comparer, à l'aide de "barplot", les métaux présents dans les sédiments et ceux dans la chair et la coquille des moules. Ces données de métaux dans les sédiments ont été comparées à la moyenne des données de métaux retrouvée dans la chair et dans la coquille des moules pour la campagne de Vidy et St-Prex (automne).

3 Résultats

3.1 Analyses de variance

3.1.1 Indices de condition

Parmi les 361 observations, 9 individus (campagne de Vidy en automne) avaient au moins un indice de condition extrême et ont été retirés des données. La distribution normale des données a été testée pour chaque IC avec le test de Shapiro. Certaines p-value étaient inférieures à 0.05. L'hypothèse nulle d'une distribution normale a donc dû être rejetée. Une ANOVA étant alors inapplicable, le test de Kruskal-Wallis, l'alternative non-paramétrique, a été appliquée. Les p-values de toutes les IC ont indiqués qu'au moins un groupe est significativement différent d'un autre. Le test de Dunn a permis de mettre en avant ces groupes (voir figure 9).

À la même saison, les individus de St-Prex sont nettement plus grands en longueur et plus lourds (poids total et poids de la coquille) que celle de Vidy. De plus, elles contiennent également plus d'eau. Dans une moindre mesure, elles sont plus épaisses. Finalement, il n'y a aucune différence significative pour la largeur et la masse de la chair. Si l'on compare le site de Vidy en automne et en hiver, il est possible de voir que les individus sont plus grands et plus lourds, et ce, pour toutes les IC sans exception. À présent, la comparaison des deux sites à des périodes différentes montre que les individus de Vidy en hiver ont une longueur, une masse totale et une masse d'eau égale avec celles de St-Prex en automne. Les autres IC sont significativement supérieures pour le site de Vidy.

Indices de conditions

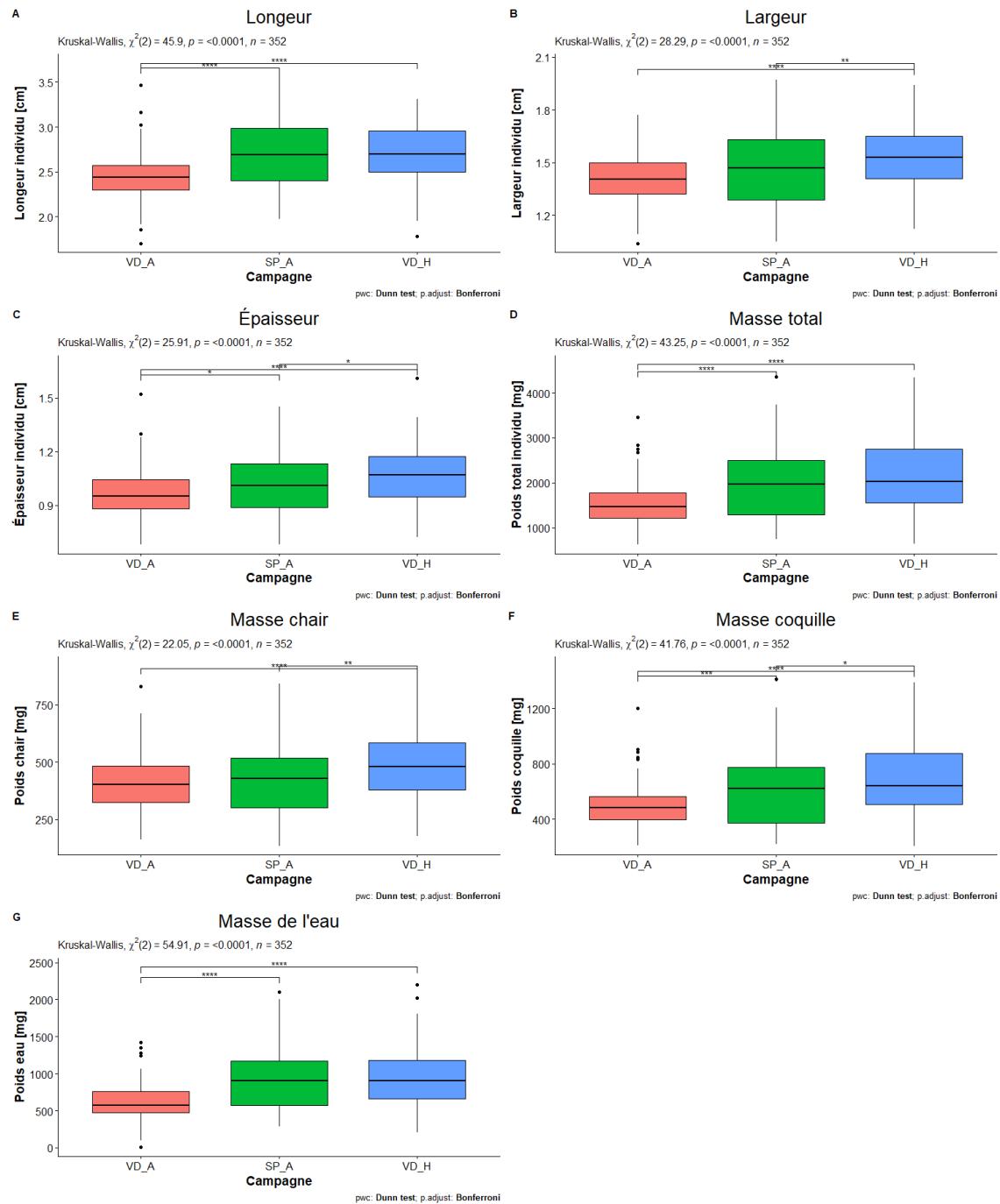


FIGURE 9 – Résultats des analyses de variance pour les indices de condition (VD_A : Vidy en automne ; SP_A : St-Prex en automne ; VD_H : Vidy en hiver).

3.1.2 Métaux

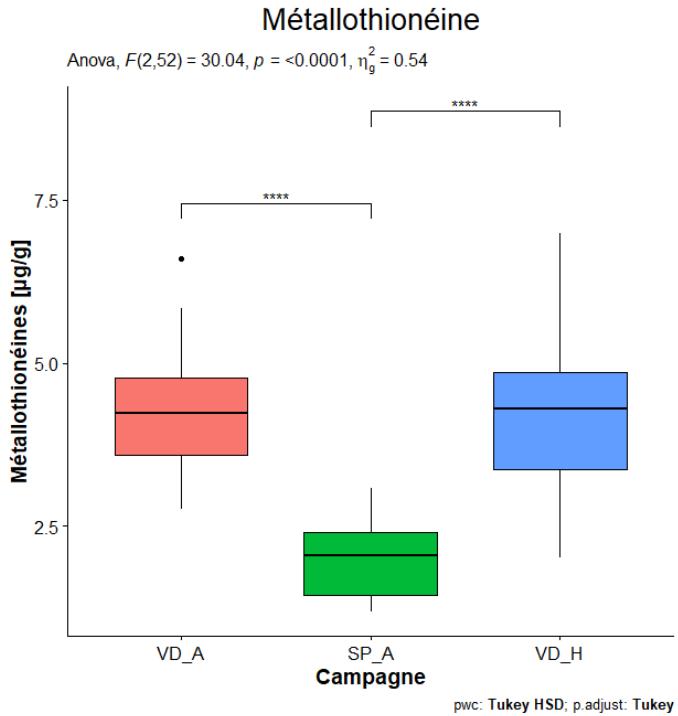


FIGURE 10 – Résultats des analyses de variance pour les concentrations en métallothionéines.

La même procédure a été appliquée aux données de métallothionéine. Un seul individu était extrême (campagne de Vidy en automne) et a été retiré des données. Le test de Shapiro a montré que les données sont normalement distribuées et le test de Levene a confirmé qu'il n'y avait pas de différences significatives entre les variances d'un groupe à l'autre. Par conséquent, toutes les conditions nécessaires pour effectuer un test ANOVA étaient remplies (voir Figure 10). Les individus prélevés dans la Baie de Vidy en automne et en hiver ont une concentration plus importante de métallothionéines (respectivement 4.31 et 4.30 [$\mu\text{g}/\text{g}$]) que celle récupérer à St-Prex (2.053 [$\mu\text{g}/\text{g}$]). À l'inverse, aucune variation n'est observable entre les deux saisons pour le site de Vidy.

3.1.3 Métaux

Une analyse visuelle rapide des métaux contenus dans la chair et la coquille (voir Figure 11) montre une forte proportion de calcium (respectivement 32.91 et 97.87 [%]). Cette forte présence peut inhiber l'effet des autres métaux lors des analyses des variances. De plus, chaque

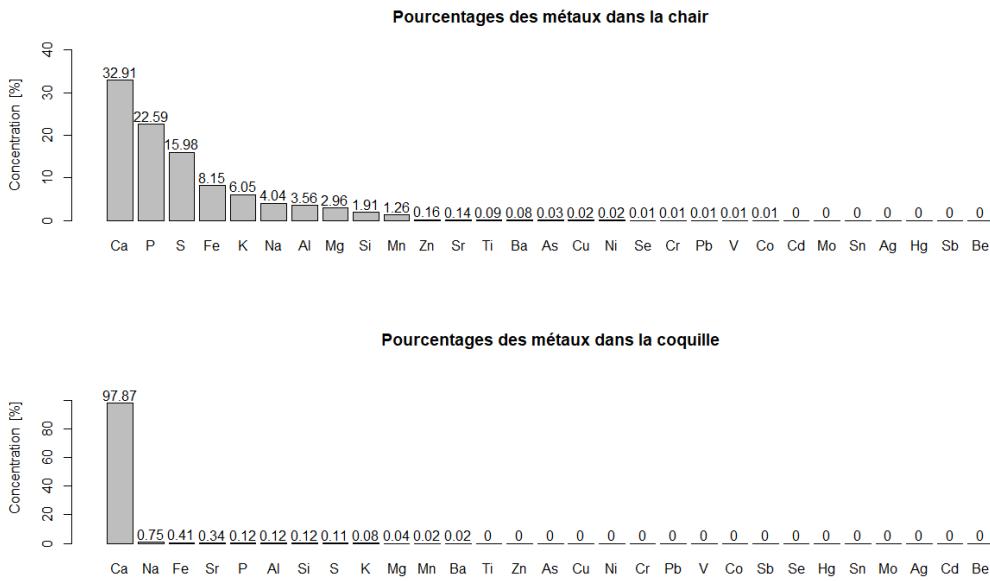


FIGURE 11 – Pourcentages des métaux présents dans la chair et la coquille.

métal a été analysé de manière indépendante afin d'analyser leur dynamique d'accumulation de façon individuelle dans la chaire et dans la coquille (voir Annexes C et Annexes D). La table 1 résume les différents groupes selon leur comportement qui sont annoté sur la base du code binaire (1 = positif, 0 = négatif) avec : premier digit = différence significative entre VD_A et SP_A ; second digit = différence significative entre SP_A et VD_H et troisième digit = différence significative entre VD_A et VD_H). Les métaux issues de sources principalement naturelles sont indiqués en vert alors que ceux principalement anthropique sont en bordeaux. Il est ainsi possible de regrouper le cadmium, le cuivre, le mercure, le plomb et le zinc pour la chair. Concernant la coquille, le cadmium, le mercure et le zinc n'ont aucune différence significative alors que le plomb à une dynamique différente. Cependant, les trois regroupements ont été testés (voir Figure 12). L'ajout des trois éléments (voir Figure 12B) a comme impact de (i) diminuer les différences entre le site de Vidy aux deux saisons différentes et (ii) augmenter la différence entre Vidy en hiver et St-Prex en automne. L'assimilation des métaux dans la coquille est un processus long et irréversible. Autrement dit, plus le nombre de métaux pris en compte augmente, plus la différence inter-saison diminue (équilibre avec le temps) et plus la différence inter-site augmente (déséquilibre avec le temps). Finalement, l'ajout du plomb (voir Figure 12C) ne fait qu'augmenter la différence statistique entre les deux

sites aux saisons différentes. Pour toutes ces raisons, et malgré la différence de dynamique d'accumulation, le même groupement que celui utilisé pour la chair a été appliqué à la coquille. Ceci a pour avantage (i) d'améliorer la pertinence des analyses de comparaison et (2) de prendre en compte l'effet cocktail des métaux sur les organismes.

En résumé, une première analyse portait sur tous les métaux sauf le calcium. Une seconde sur le calcium seul pour mieux comprendre son comportement dans l'organisme. Une troisième analyse (métaux cibles) était basée uniquement sur les métaux rattachés au milieu urbain et regroupé selon l'analyse individuelle. À noter que l'analyse des métaux totaux (MéTo) n'était pas pertinente et a été omise (voir Annexe E).

TABLE 1 – Résumé des groupements selon les différences significatives.

	110	101	011	010	001	000
Chair	Be; P	As; Mn	Ag; Al; Cd; Cr; Cu; Fe; Hg; Mg; K; Pb; S; Si; Ti; V; Zn	-	Ba; Co; Na; Ni; Sn; Sr	Ca; Mo; Sb; Se
Coquille	Ba; Co	-	Ca; Cr; Cu; Fe; Mg; Ni; P; Si; Ti	Al; As; Be; K; Pb; V	Na	Ag; Cd; Hg; Mn; Mo; S; Sb; Se; Sn; Sr; Zn

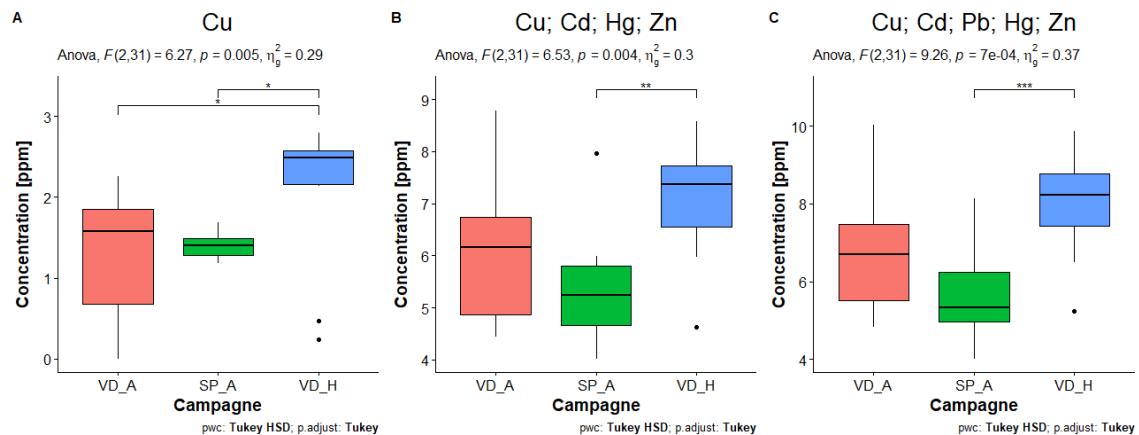


FIGURE 12 – Comparaisons des trois groupements différents possibles pour les métaux dans les coquilles.

Concernant les métaux sans le Calcium (MéSCa), un individu par campagne a été signalé comme extrême (campagne de Vidy en automne). Les conditions de normalité et de variance étaient respectées. Par conséquent, l'ANOVA a pu être réalisée sur ce groupe de métaux. Concernant le Métal Calcium (MéCa), il y a eu une valeur extrême (campagne de St-Prex en automne). La normalité des données n'étant pas respectée, cette dernière analyse a donc été

Analyse de variances des métaux

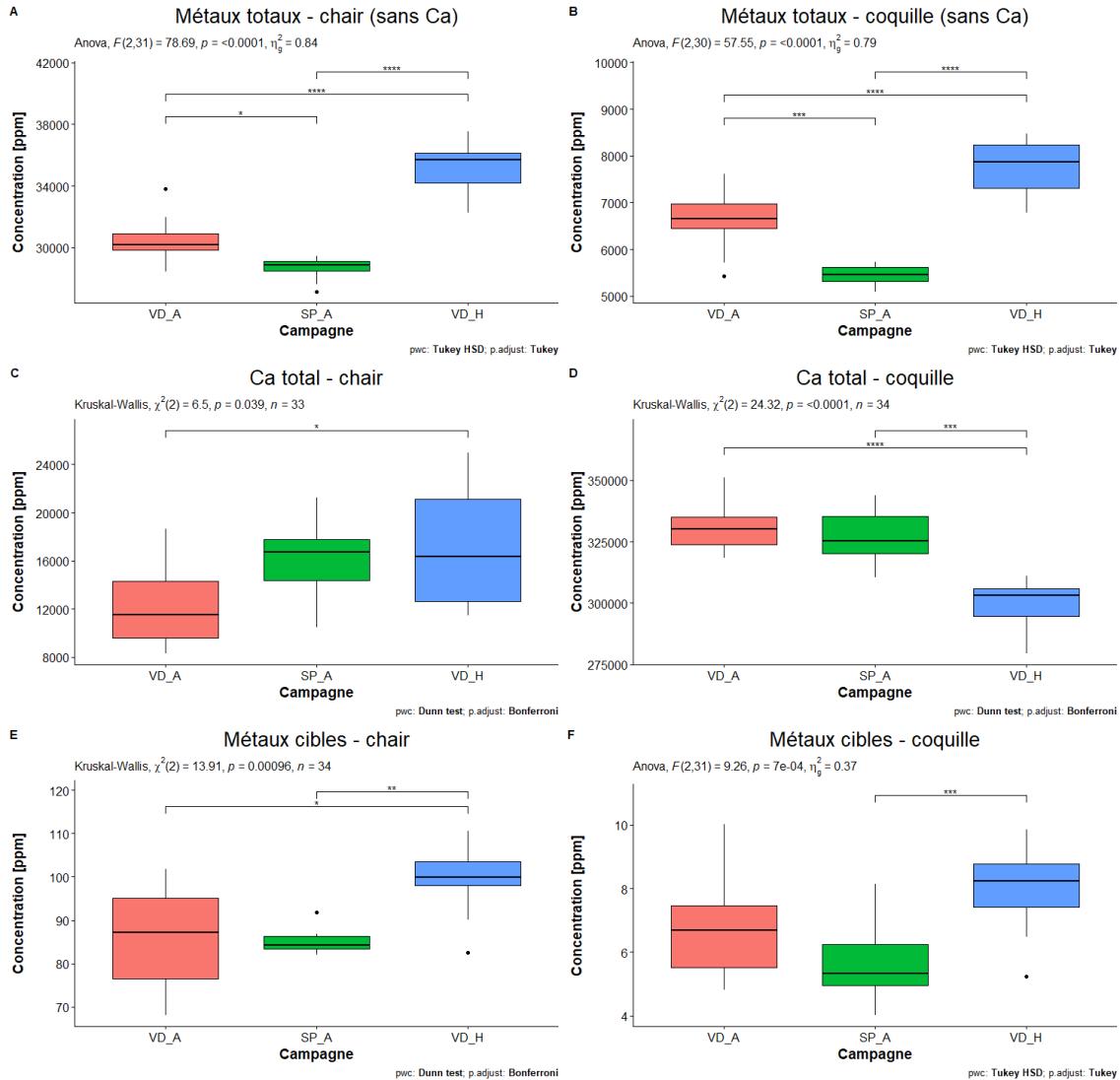


FIGURE 13 – Résultats des analyses de variance pour les concentrations en métaux.

effectuée avec le test de Kruskal-Wallis. Finalement, il n'y a eu aucune valeur extrême pour les métaux cibles (MéCi). La variance n'étant pas respectée pour la chair, l'analyse a donc été effectuée avec le test de Kruskal-Wallis (voir Figure 13).

Les moules de Vidy, en hiver comme en automne, ont plus de métaux totaux (sans calcium) dans la chair et dans la coquille que celle de St-Prex. On remarque également une différence importante entre les deux saisons avec une concentration bien plus importante en hiver.

Concernant le calcium, la concentration dans la chair est plus importante à Vidy en hiver et à St-Prex comparé à Vidy en automne. Cette différence est nulle entre les deux sites à des saisons différentes. Pour les coquilles, on voit une diminution de la concentration au cours du temps entre automne et hiver, mais une concentration semblable à la même saison et à deux endroits différents. Finalement, les concentrations en métaux cible dans la chair suivent exactement la même tendance que ceux des métaux totaux l'exception des deux sites à la même période qui n'est pas significativement différente. Concernant la coquille, la seule différence significative se situe entre les deux sites aux périodes différentes.

3.2 Tests de corrélation

3.2.1 Indices de condition - indices de condition

Les indices de condition ont été comparés entre eux (voir Annexe F). Les corrélations entre toutes les paires sont nettement élevées avec une valeur minimale de 0.77 entre l'épaisseur et la longueur pour les individus de Vidy (tant en automne qu'en hiver) et de 0.84 pour les individus de St-Prex. La comparaison entre les deux sites à la même saison ne donne pas une différence très importante avec une valeur écart maximale de 0.07 pour les mêmes paramètres. Finalement, la même observation peut être faite pour une comparaison entre les deux périodes. On peut donc conclure que les IC varient de manière égale entre tous les paramètres excepté l'épaisseur dont la relation avec les autres IC est moins claire.

3.2.2 Indices de condition - métallothionéine/métaux

Dans cette seconde approches, des études de corrélations entre les indices de conditions et les teneurs ont métaux/métallothionéines ont permis de mettre en avant quelques liens. Ainsi, les métaux totaux, les métaux totaux sans Ca, le calcium et les métaux cible présents dans la coquille ont été corrélés avec le poids des coquilles totales et ceux présent dans la chair avec le poids de la chair total (voir Table 2). De plus, la même étude a été effectuée entre les IC et la métallothionéine (voir Table 3). Les cases en évidence (en jaune) sont celles qui ont une p-value inférieure à 0.05 et qui rejette l'hypothèse nulle que la corrélation observée est dû au hasard.

TABLE 2 – Coefficients de corrélation pour les métaux dans la chair et la coquille (en orange : p-value <0.05).

	Métaux totaux			Métaux totaux (sans Ca)			Calcium total			Métaux cible		
	VD_A	SP_A	VD_H	VD_A	SP_A	VD_H	VD_A	SP_A	VD_H	VD_A	SP_A	VD_H
Poids tissus total	-0.51	-0.06	-0.43	-0.29	-0.28	0.03	-0.38	-0.06	-0.45	-0.33	0.00	0.20
Poids coquille total	0.02	-0.06	0.18	-0.07	0.00	0.14	-0.02	-0.06	0.16	-0.24	0.11	-0.03

Il n'existe aucune corrélation entre le poids total de la coquille et les métaux qui sont contenus à l'intérieur, et ce, quels que soient les métaux sélectionner. En revanche, trois corrélations significatives sont à relever entre le poids de la chair et les métaux présent dans cette dernière. Ainsi, on peut voir deux corrélations négatives entre les métaux totaux et le poids du tissu total (seulement pour Vidy). C'est-à-dire que plus un individu est lourd, plus la concentration totale diminue. Cette observation s'applique également au calcium seul. Cependant, n'ayant qu'une seule corrélation significative (Vidy en hiver), les métaux totaux restent tout de même une meilleure approche avec deux corrélations significatives pour le site contaminée de Vidy. Finalement, il n'existe aucune corrélation possible entre les métaux et les IC pour St-Prex.

TABLE 3 – Coefficients de corrélation pour les métallothionéines dans la chair (en orange : p-value <0.05).

	Longeur	Largeur	Épaisseur	Poids total	Poids eau	Poids tissus	Poids coquille
VD_A	-0.52	-0.51	-0.37	-0.52	-0.53	-0.52	-0.42
SP_A	-0.36	-0.30	0.09	-0.22	-0.24	-0.28	-0.21
VD_H	-0.37	-0.35	-0.42	-0.42	-0.48	-0.63	-0.42

Contrairement aux métaux, les métallothionéines ont une corrélation bien plus importante avec les indices de conditions. En effet, toutes les IC sont significativement corrélées à la concentration en MTs pour le site de Vidy, et ce, quelle que soit la saison. À l'inverse, les individus de St-Prex ont des coefficients de corrélation trop bas pour conclure qu'il existe un lien. Même si certains sont relativement élevés (par exemple la largeur), elle reste considérée comme une corrélation due au hasard. Finalement, la longueur est l'indice de condition qui peut être utilisée quels que soient le site de prélèvement et la saison. Toutes les corrélations qui ne sont pas rejetées par la p-value sont négatives. C'est-à-dire que plus un individu est grand ou lourd, plus les concentrations en métallothionéines sont faibles.

3.2.3 Métaux-MT

Une tentative de corrélation a été également menée entre les métaux dans la chair et la métallothionéine. Si quelques corrélations métaux-MTs étaient significatives pour la campagne de St-Prex (As, Ca, Cd, Cu, Mg, P et V), aucune corrélation ne l'étaient pour les deux compagnes de Vidy. Les données de métaux ont été récoltées sur des individus différents que ceux de la métallothionéine. Ceci ne permet donc pas de relever des corrélations de manière pertinente. Cette approche a donc été abandonnée.

3.3 Statistiques multivariées

3.3.1 Analyses en composantes principales

L'analyse en composantes principales permet de réduire le nombre de composantes. Cette réduction de dimension permet de représenter les données sur deux axes en conservant le maximum de l'information. Le but de cette analyse était de voir la contribution de chaque métal aux données de métaux observées dans la chair et dans la coquille. De plus, cette approche a permis de voir à quel point la diminution du nombre de métaux pris en compte influençait la répartition des différents groupes de prélèvement. La répartition des métaux comme fait précédemment n'étant plus applicable ici, l'analyse s'est concentrée sur le MéTo. En effet, le MéCa ne pouvait pas être utilisé puisqu'il fallait au moins deux composantes pour faire une ACP. Quant aux MéSCa et aux MéCi, ils n'apportaient pas d'éléments pertinents supplémentaires (voir Annexe G). Une fois l'ACP effectuée, il est possible de voir la contribution des différents métalloïdes pour les deux dimensions (voir Figure 14).

Sur cette figure, les métaux sont représentés selon trois critères. Il y a tout d'abord leur disposition horizontale et verticale. Plus l'angle entre le vecteur et l'horizontale du graphique est faible, plus le métalloïde en question contribue à la première dimension (ou à la deuxième dimension si on regarde l'angle avec la vertical). Il faut également prendre en considération la longueur du vecteur. Plus le vecteur est long, plus l'importance est grande. Finalement, une valeur relative de contribution permet de classer les métalloïdes en fonction de leur importance.

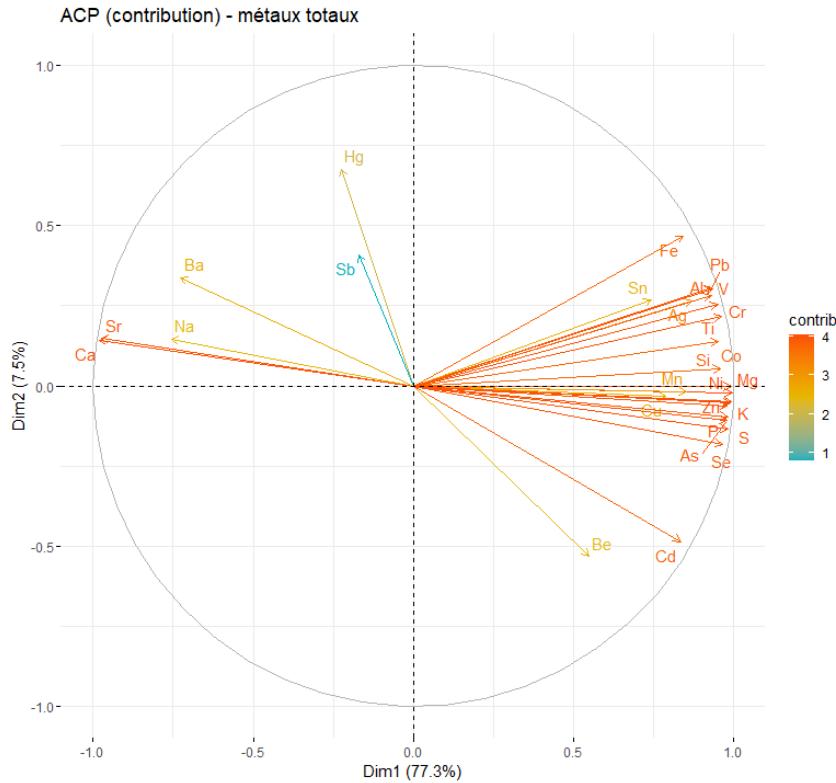


FIGURE 14 – Projections de tous les métaux et leur contribution aux deux dimensions.

Il est possible de voir que la plupart des métaux se trouvent le long de la première dimension avec une contribution relativement importante pour la plupart. On voit, par exemple, que le beryllium et l'étain jouent un rôle mineur le long de la première dimension. Dans le sens contraire, le calcium et le strontium jouent un rôle majeur. Par conséquent, nous avons un gradient d'importance horizontal qui va du couple Ca-Sr à la plupart des métaux. La seconde dimension est relativement dépendante du mercure et dans une moindre mesure du beryllium dans le sens inverse. Les deux dimensions représentent respectivement 77.3 [%] et 7.5 [%] de variation expliquée pour un total de 85.8 [%]. Ce qui est un bon résultat si on prend en compte la diminution importante de dimension. Une fois effectuée, l'ACP permet entre autres de classifier les individus en fonction de la campagne à laquelle ils appartiennent et de la partie de l'individu analysé (voir Figure 15).

On retrouve alors le gradient Ca - autres métaux évoqués précédemment. En effet, les coquilles sont toutes regroupées à gauche alors que la chair se trouve à droite du graphe. Ceci traduit bien la composition de la coquille (Ca, Sr, Na et Ba). Si les deux groupes chair-coquille sont

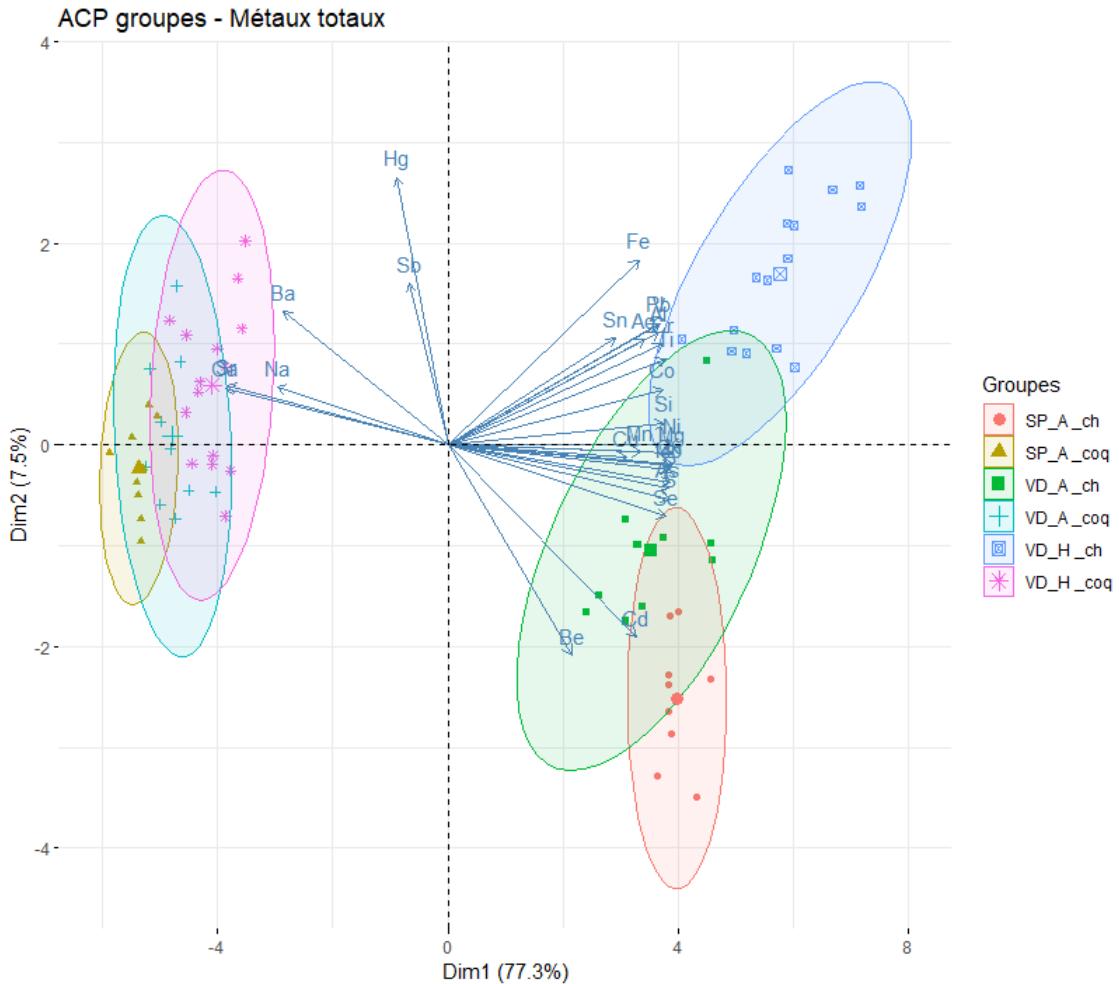


FIGURE 15 – Classification des individus en fonctions de la concentration en métalloïdes.

bien distinct, il est difficile de faire la distinction entre les sites et les périodes de prélèvement sur la base des concentrations en métaux dans la coquille. En effet, le faible pourcentage de la deuxième dimension et le peu de métaux jouant un rôle ne permet pas de discréteriser de manière efficace les groupes. On peut tout de même voir que les coquilles des moules de St-Prex ont globalement plus de calcium.

Concernant la chair, la distinction des groupes est légèrement plus claire. Alors que les individus de St-Prex se caractérisent surtout par une teneur élevée en cadmium et en beryllium, ceux de Vidy à la même période ont les mêmes influences, mais accumulent également un cocktail de métaux. Avec le temps, la chair des individus de Vidy se charge en métaux multiples et le groupement se déplace de manière significative vers le côté droit et la partie

supérieure du graphe.

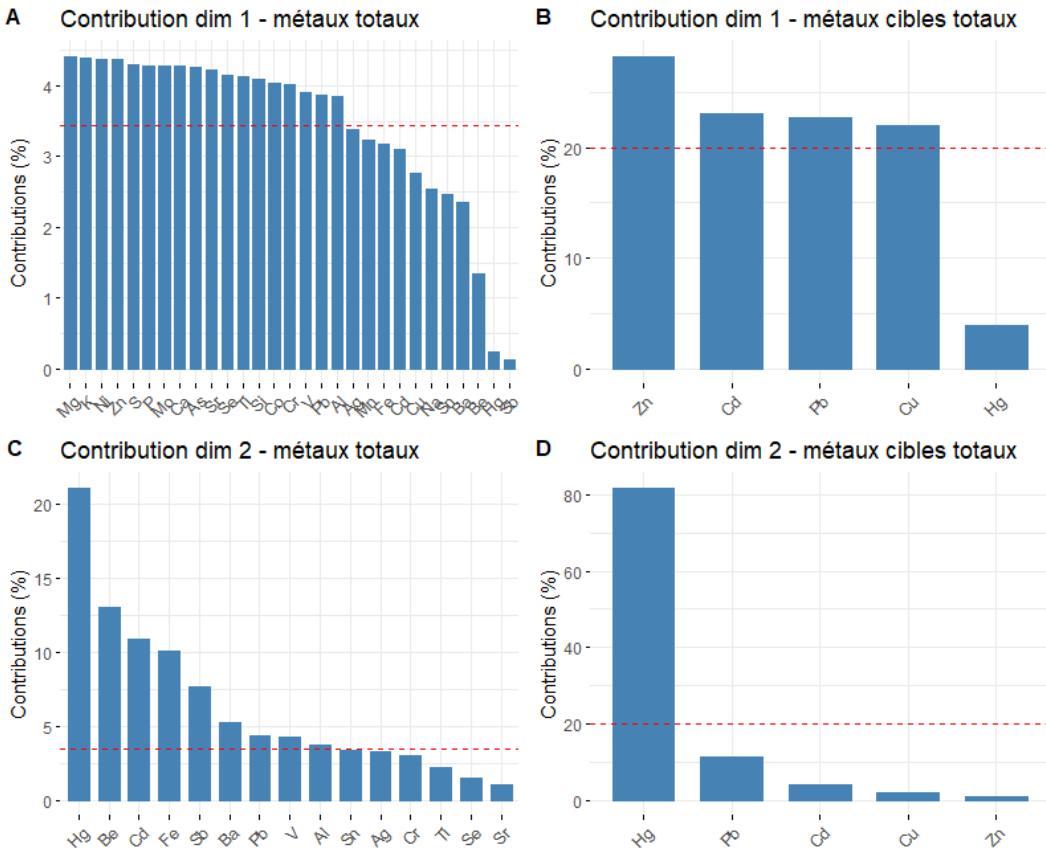


FIGURE 16 – Contributions des 15 métaux les plus importants dans l'ACP.

Il est difficile de voir graphiquement quels métalloïdes ont la plus grande contribution. C'est pourquoi il est possible de calculer et de représenter la contribution de chaque métal (voir Figure 16). La ligne rouge en traitillé représente la moyenne de la contribution attendue si tous les métaux avaient la même importance. Autrement dit, c'est le pourcentage total (100%) divisé par le nombre de métaux compté dans l'étude. Tous les métaux au-dessus de cette ligne sont considérés comme importants est doivent être prise en compte.

Cette représentation montre le nombre important de métaux avec une contribution non-négligeable pour la première dimension (Figure 16A). Il devient alors difficile de diminuer le nombre de métaux pris en compte. Il y a moins de métaux essentiels pour la seconde dimension et leur importance diminue de manière plus abrupte (Figure 16C). En diminuant le nombre de métaux prise en compte, on peut avoir une classification plus stricte des métaux

(Figure 16 B et D).

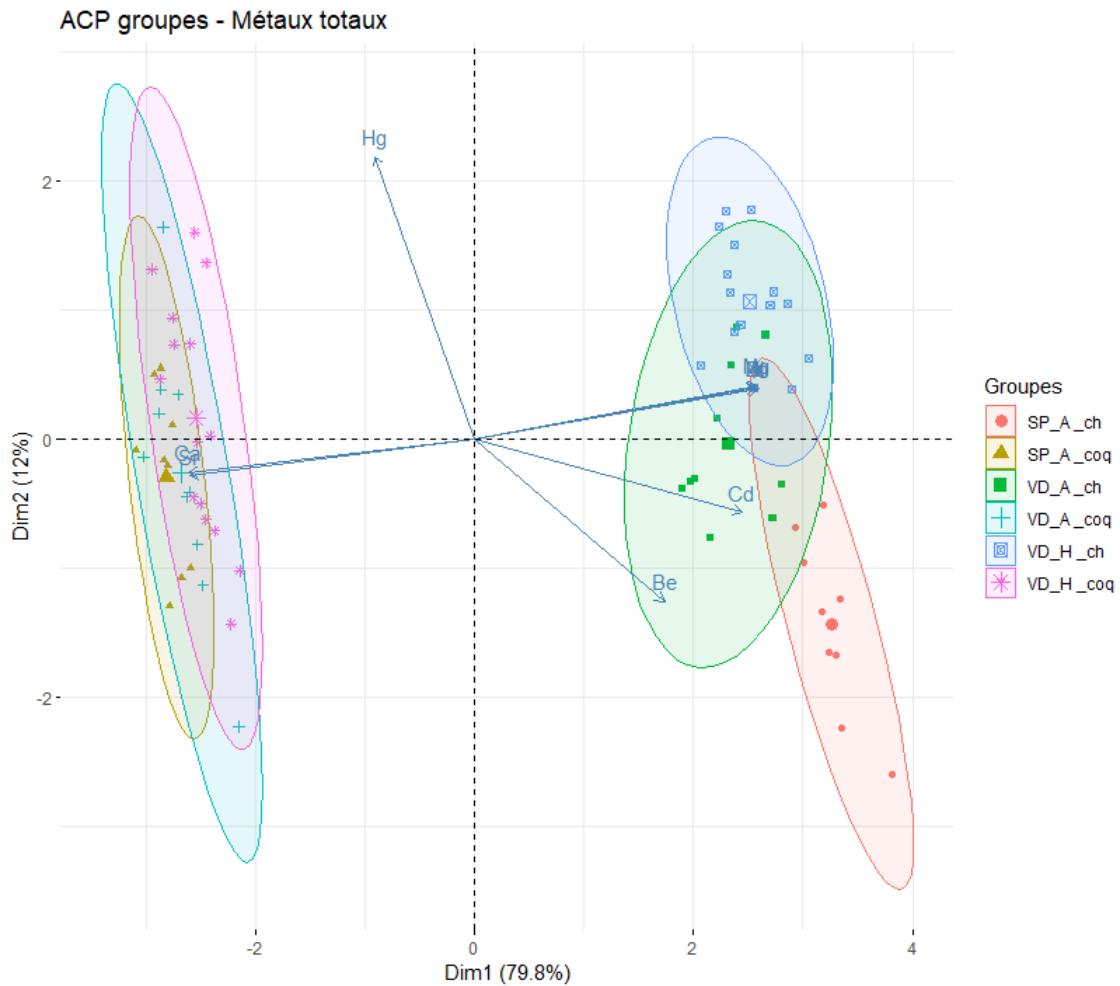


FIGURE 17 – Nouvelle classification des individus avec les métalloïdes les plus importants.

Cependant, cette classification plus claire peut également s'accompagner d'une perte d'information et donc de précision. Une nouvelle ACP composé que de quelques métaux les plus importants et sélectionner sans prendre en compte la moyenne de la contribution attendu illustre ce propos (voir Figure 17). Dans cette nouvelle classification, nous retrouvons nos six groupes, mais avec moins de précision. En ce qui concerne les coquilles, on ne distingue presque plus les différents groupes. Concernant les chairs, la classification est moins claire avec une confusion plus importante entre les deux campagnes de Vidy. Cependant, et malgré une diminution importante des données de métaux, il est possible de retrouver une bonne classification entre les individus de St-Prex et ceux de Vidy.

3.3.2 Analyses discriminante linéaire

L'analyse discriminante linéaire permet de prédire l'appartenance d'un individu à un groupe sur la base de données prédictives. Cependant, les sites de prélèvement pour chaque individu étant connu, le but premier de cette approche n'était pas de prédire la campagne sur la base des données de métaux. Il était plutôt question de s'assurer que les métaux dans la chair et la coquille sont de bonnes données prédictives pour une classification. Ainsi, un modèle avec une bonne précision démontrerait que les concentrations en métaux sont fortement reliées au site de prélèvement. Aussi, cette approche peut montrer quel(s) groupement(s) des métaux sont fiable dans des analyses inter-sites et inter-saisons.

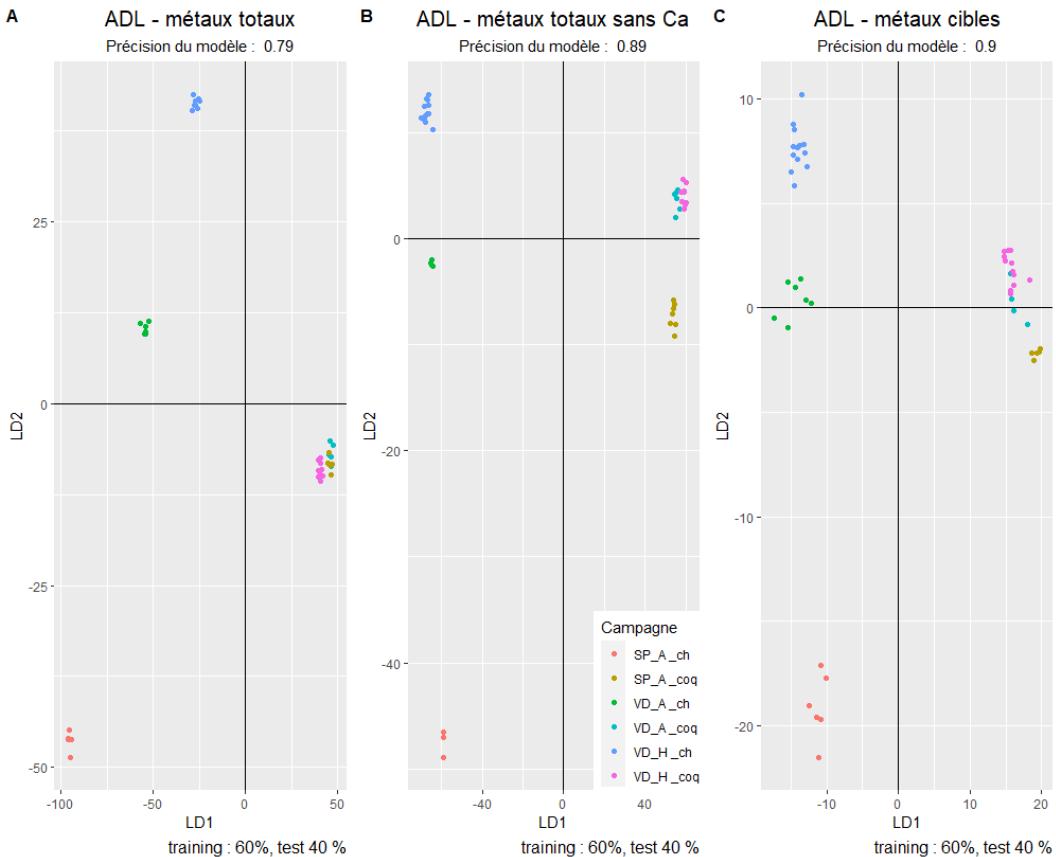


FIGURE 18 – Résultats de l'ADL pour les métaux.

Pour chaque ADL, les données de métaux et la campagne à laquelle ils appartiennent ont été isolées. Ensuite, la base de données a été découpée en deux, à savoir 60 [%] pour entraîner le modèle et 40 [%] pour le tester. Après avoir ajusté le modèle avec les premières données, ce dernier a été utilisé pour prédire la campagne en fonction des données de métaux. Il était

alors possible de calculer la précision du modèle. Cette opération a été répétée à trois reprises pour les trois jeux de données de métaux déjà vus précédemment (voir Figure 18).

Premièrement, L'ADL donne une classification bien plus nette que celle obtenue par l'ACP pour les chairs, et ce, pour les trois approches différentes des métaux. On peut alors remarquer trois groupements avec une proximité plus importante entre les deux campagnes de Vidy par rapport à St-Prex. Concernant les coquilles, la classification est bien moins nette. Pour le cas des métaux totaux, les différentes campagnes sont encore bien marquées. Pour les métaux cibles, les deux campagnes de Vidy commencent déjà à se mélanger. Il semblerait que ce soit le groupement MéSCa qui donne la meilleure classification pour la coquille. De manière globale, les modèles 2 et 3 donnent la meilleure précision (89 et 90 [%]) alors que l'ajout du calcium vient péjoré le modèle (79 [%]).

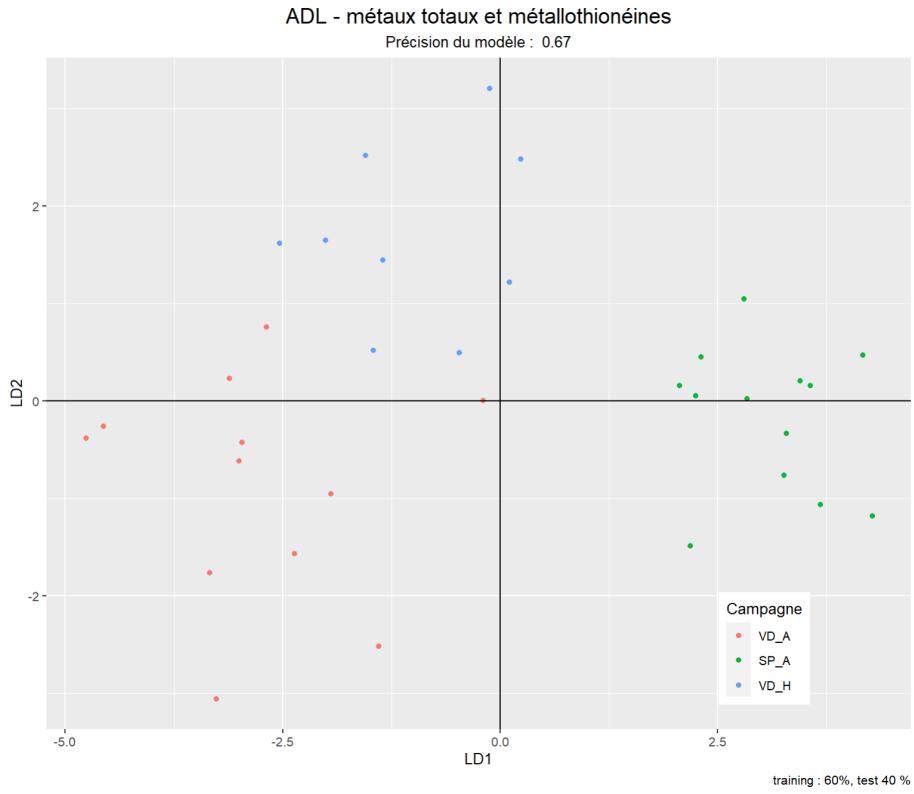


FIGURE 19 – Résultat de l'ADL pour les métallothionéines.

Cette même classification a été effectuée pour la métallothionéine et les ICs (voir Figure 19). À nouveau, il est possible de voir une classification relativement claire avec à droite la campagne de St-Prex et à gauche, celle de Vidy. Il est donc également possible de prévoir

les campagnes à l'aide des IC et des concentrations en métallothionéine. Cependant, les clusters sont moins clairs et la précision du modèle amoindri (67 [%]). Cette faible précision peut s'expliquer par le nombre de données faible. Avec plus de données, nous pourrions nous attendre à de meilleurs résultats avec une meilleure distinction des différents groupes.

3.4 Comparaisons avec les métaux contenus dans les sédiments

Les données de métaux correspondants proviennent de la campagne d'automne pour le site de Vidy et celui de St-Prex. Toutes les concentrations (sauf ceux des sédiments) sont moyennées et toutes les données sont transformées en \log_{10} (voir Figure 20 et Figure 21). À noter que la campagne de 2015 ne donne aucune valeur pour le fer et le manganèse.

Comparaison des concentrations des métaux - Vidy

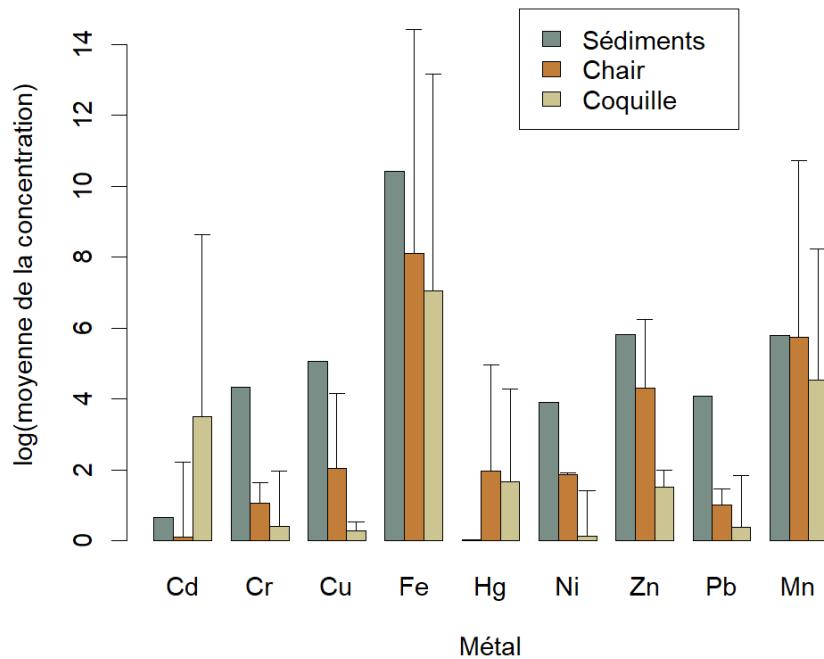


FIGURE 20 – Concentrations des métaux dans les sédiments et dans les moules - Vidy.

Cette comparaison permet de mettre en avant le lien entre les métaux présents dans l'environnement et leur devenir dans le métabolisme des moules Quagga. Dans la plupart des cas (Cr, Cu, Fe, Ni, Zn, Pb, et Hg pour St-Prex uniquement), les concentrations les plus importantes se trouvent dans les sédiments, puis dans la chair et finalement dans la coquille.

Comparaison des concentrations des métaux - St-Prex

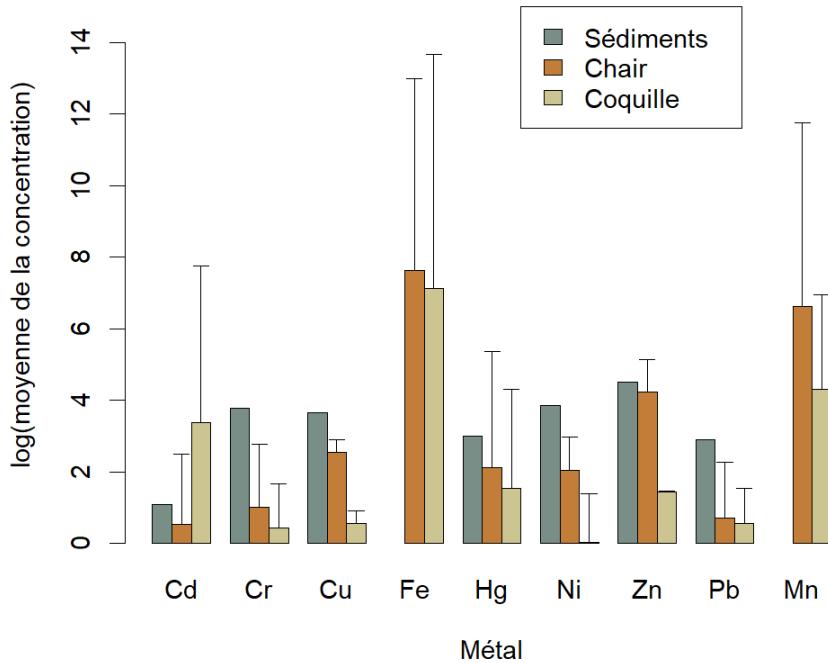


FIGURE 21 – Concentrations des métaux dans les sédiments et dans les moules - St-Prex.

De plus, certains de ces métaux sont présents en plus grande concentration que d'autres (par exemple manganèse par rapport au plomb). Pour le cas du cadmium, on retrouve une plus grande concentration dans la coquille, puis dans les sédiments et finalement, dans la chair. Les individus de St-Prex ont l'air d'accumuler plus facilement le Cd dans la chair que ceux de Vidy. Finalement, le mercure est également particulier pour le cas de Vidy. En effet, alors que la concentration dans les sédiments est très faible, celles retrouvées dans la chair et la coquille sont plus élevées.

4 Discussion

4.1 Indices de condition

Plusieurs études démontrent qu'une importante compétition pour les ressources et l'espace engendre une diminution du taux de croissance des moules (Cubillo *et al.*, 2012; Metz *et al.*, 2018). Cependant, les moules Quagga de St-Prex sont supérieures en taille (longueur et

épaisseur) et en masse (totale et coquille). Elles contiennent également plus d'eau à l'intérieur de leur organisme. Il semblerait donc que cette population importante n'engendre aucun problème de croissance. Ceci peut s'expliquer par l'environnement sain et peu sujet à des variations des conditions environnementales dans lequel elles vivent. En effet, à l'inverse des moules de Vidy, celles de St-Prex n'auraient pas besoin de se protéger de la pollution. Elles auraient alors la possibilité d'allouer plus d'énergie dans d'autres activités comme la croissance ou la reproduction. De leur côté, les moules de Vidy seraient dans l'obligation d'allouer de l'énergie pour se protéger contre les métaux comme le nickel par exemple. En effet, ce métal est le troisième le plus affluent dans la population de Vidy (voir Figure 16A) et est responsable d'une certaine mortalité chez la moule Quagga (Potet *et al.*, 2018).

Parmi les IC qui ne changent pas, il est intéressant de noter que la masse de la chair entre Vidy et St-Prex sont statistiquement semblables. La masse du tissu biologique des moules dépend notamment de la disponibilité des nutriments (Stadmark et Conley, 2011). Or, la sortie de la station d'épuration est une source majeure de nutriments dans les milieux aquatiques. Par conséquent, la taille plus petite des moules de Vidy par rapport à celles de St-Prex serait contrebalancée par une densité du tissu plus importante. Ceci expliquerait également la plus grande quantité d'eau contenue dans les moules de St-Prex. En effet, les individus de Vidy étant plus charnue, le volume dans la coquille disponible pour l'eau résiduelle est limité.

Si l'on compare à présent les moules de Vidy en été et en hiver, toutes les IC augmentent de manière significative pour finalement atteindre des traits morphologiques, très semblables avec les moules de St-Prex en automne. Selon Wong *et al.* (2011), le taux de croissance diminue avec l'augmentation de la taille. Autrement dit, la population de St-Prex étant déjà relativement élevé, leur croissance dans le temps est ralentie alors que les individus de Vidy, plus petit, ont encore une marge de croissance élevée. De plus, toujours selon les mêmes auteurs, les taux de croissance les plus faible se situent entre la fin de l'été et le début de l'automne. À cela, vient s'ajouter les observations de Karatayev *et al.* (2011) qui ont relevé que les moules plus grandes ont une chance de survie plus importante en hiver. On peut donc penser que les moules de la Baie de Vidy ont tendance à augmenter leur taux de croissance en fin d'année pour augmenter leur chance de survie.

4.2 Concentrations des métallothionéines

Comme le confirmaient déjà plusieurs études (Micovic *et al.*, 2009 ; Khati *et al.*, 2012), les concentrations de métallothionéine retrouvées dans les trois campagnes correspondent aux résultats attendus. En effet, la protéine est surtout présente dans les zones fortement polluées par les métalloïdes et très peu présente dans le site de référence. Cependant, même si les présents résultats montrent que la présence des métallothionéines est fortement reliée à celle des métaux, ce n'est pas toujours le cas. En effet, les résultats trouvés dans la littérature sont plus nuancés. Ainsi, Petrovic *et al.* (2001) ne trouvent aucune différence dans les concentrations de métallothionéine dans les glandes digestives d'individus exposées à des rejets urbains. À l'inverse, Tessier et Blais (1996) ont relevé que la protéine capte de manière importante des ions Cd^{2+} dans des conditions de nutrition et de température stable. De plus, alors que Ramsak *et al.* (2012) indiquent qu'il n'existe aucune corrélation entre la protéine et les métaux à travers les saisons, Geffard *et al.* (2001) nuancent en trouvant une corrélation en automne (de septembre à octobre), mais qui est inexistante au printemps et en été. Finalement, selon les mêmes auteurs, il faut également prendre en compte la variation saisonnière et les autres facteurs tant abiotiques (température, pH, vitesse du courant, etc.) que biotiques (disponibilité des nutriments, compétition, etc.).

Cette courte revue de littérature permet de mettre en avant la complexité des processus métaboliques qui gouvernent la dynamique de la métallothionéine. En réalité, la biocinétique de la métallothionéine est métal-dépendant (Wang et Rainbow, 2010). De plus, les métaux interagissent entre eux. Il devient alors compliqué de comprendre toutes les interactions dans un lieu où la contamination est aussi important que dans la Baie de Vidy. Cependant, au vu des résultats, il est possible de dire que les MTs sont de bons candidats lorsqu'il s'agit d'évaluer si une zone est polluée ou non.

Pour finir, il est intéressant de relever que la concentration des MTs pour les deux prélèvements de Vidy sont au même niveau à quatre moins d'intervalle alors que les métaux dans la chair augmentent entre les deux prélèvements (voir Figure 13 A, C et E). Cette limitation de la concentration en métallothionéine a déjà été observée chez des gastropodes exposés de manière prolongée au cadmium (Berger *et al.*, 1995). Ceci pourrait être le signe d'une satu-

ration de la protéine chez la moule Quagga qui est, dans le cas de la Baie de Vidy, exposée en continu à des métaux.

4.3 Concentrations des métaux

Le calcium est le métal le plus présent dans la chair, comme dans la coquille (voir Figure 11). À présent, si on néglige le calcium, la composition en métaux dans la chair et dans la coquille est légèrement différente avec la présence de Na, Fe et P dans les cinq métaux principaux, mais dans un ordre d'importance différent. Ainsi, le K et le S qui se trouve en grande proportion dans la chair se retrouvent en concentration très faible dans la coquille. Ceci indique qu'il y a une différence importante entre les métaux présents dans la chair et ceux présent dans la coquille. C'est notamment des différences dans le mécanisme de bioaccumulation des différents métaux entre la chair et la coquille qui peut engendrer ces écarts (Cravo *et al.*, 2004). Autrement dit, il est important de pratiquer ces deux analyses pour vraiment comprendre la dynamique qui régit les métaux dans les deux parties chez la moule Quagga.

Le calcium est analysé de manière individuelle (voir Figure 13 C et D) pour deux raisons. D'une part, sa forte concentration dans la chair et dans la coquille inhibe la différence entre les sites et les saisons. D'autre part, le calcium est un élément chimique essentiel dans les processus métabolique. Il va notamment définir le potentiel de développement des moules ainsi que sa durée de vie (Davis *et al.*, 2015). De plus, le calcium a également un rôle protecteur contre certains métaux comme le cadmium (Li *et al.*, 2016) à travers plusieurs stratégies. En effet, le Ca aurait un rôle important dans l'activation des transport des polluants métalliques et peut diminuer l'absorption du métal par concurrence direct des liaisons (Lavoie, 2012).

Le cas de St-Prex pourrait être considéré comme une situation normale dans laquelle les individus peuvent utiliser le calcium pour former leur coquille et pour leur métabolisme. À la même saison, les individus de Vidy semblent utiliser le calcium de la même manière pour la formation de la coquille. Ce qui aurait pour effet de diminuer le calcium disponible dans la chair. En revanche, l'hiver est synonyme pour elles de croissance et d'un taux de filtration supérieur. Ces changements s'accompagneraient d'une augmentation du taux de métaux dans

les tissus et donc d'une concentration en Ca supérieure dans la chair. Ceci afin de se protéger au maximum des métalloïdes qui ne peuvent plus être régulés par les MTs qui, comme évoqué précédemment, est déjà à saturation. Avec cette importante mobilisation du calcium dans les processus métabolique, on remarque que sa concentration dans la coquille diminue. En effet, les individus grandissent, mais ne peuvent plus utiliser tout le calcium disponible pour la formation de la coquille. Il y aurait donc accumulation d'autres métaux dans la coquille et diminution de la concentration relative du calcium dans les parties de coquille nouvellement formées. De plus, certains métaux comme le plomb et le zinc peuvent interagir de la même manière que le calcium lors de la biominéralisation chez les gastropodes (Jordaens *et al.*, 2006). Autrement dit, il se peut que certains métaux remplace totalement le calcium dans le processus de calcification. Ces observations pourraient expliquer la fragilité accrue de la coquille des moules de la baie de Vidy. En effet, le calcium est l'élément majeur qui améliore la solidité de la coquille (Czarnołęski *et al.*, 2006). Sans ce calcium, la coquille est certes formée, mais est plus fragile.

L'analyse des métaux totaux (sans Ca) contenus dans la chair et la coquille traduit la réalité du terrain avec des valeurs largement supérieures pour le site de Vidy que pour celui de St-Prex (Figure 13 A et B). Ces deux mêmes figures montrent également une accumulation importante de métaux dans les deux parties des moules entre les deux saisons. Cette observation pourrait s'expliquer par la taille qui augmente dans le temps. En effet, Tantanasarit *et al.* (2013) ont remarqué que les petits individus ont un taux de filtration plus important et que ce taux est en relation avec le nombre de nutriments assimilé. Ainsi, en grandissant, les individus filtreraient plus d'eau et donc accumuleraient plus de métaux. Concernant les coquilles, une étude de Bellotto et Miekeley (2007) a mis en évidence que les parties de coquilles nouvellement formées présentent des concentrations importantes de métaux auxquels elles ont été fraîchement exposées. Cette observation démontrerait la facilité et la rapidité à laquelle les moules sont capables d'utiliser les métaux de leur environnement pour former leur coquille et expliquerait cette augmentation de métaux dans le temps.

Concernant les métaux cibles (Cu, Cd, Pb, Hg et Zn) contenu dans la chair, nous voyons qu'il n'existe aucune différence significative entre les sites à la même période (voir Figure 13E).

Une étude de Scanes et Roach (1999) à permis de mettre en évidence un groupe de métaux (Cu, Zn, Pb, Hg, Ag et Se) qui pourrait être considéré comme une signature («footprint» en anglais) d'une pollution urbaine. En d'autres termes, la sélection de certains métaux permettrait de mettre en avant l'impact d'un facteur (ici, urbain) tout en excluant toutes les autres sources (Sanz-Prada *et al.*, 2022). Par conséquent, il semblerait que l'évacuation des eaux claires des deux villes (St-Prex et Lausanne) engendrerait un apport similaire en MéCi. À noter également que la variation est bien plus faible pour St-Prex que pour la baie de Vidy. Ceci est peut-être dû à la différente organisation des colonies d'individus avec plusieurs petites colonies pour Vidy contre un tapis de moule à St-Prex. En effet, la proximité importante des individus entre elles influerait sur les nutriments et l'oxygène disponible, ce qui diminuerait le taux de filtration (Tang et Riisgard, 2018) et donc la variabilité potentielle des métaux assimilés. Cette observation est confirmée par la baisse de la variabilité en hiver qui est la période de l'année où le taux de filtration est la plus faible (Diggins, 2001). Finalement, il est possible de relever une forte augmentation des métaux dans la chair entre les deux saisons pour le site de Vidy (voir Figure 13F). Cette tendance suit celles des métaux totaux.

4.4 Analyses des relations entre morphologie et concentration

L'analyse des corrélations entre tous les indices de conditions montre que la taille et le poids des individus évoluent de manière constante. Autrement dit, un individu plus grand en longueur sera probablement plus épais et plus large. Ces comparaisons n'avaient que pour but de s'assurer de l'homogénéité de l'évolution morphologique. Cette constance permet de mettre de côté toute anomalie qui serait dû à des différences dans la croissance comme par exemple l'augmentation de l'épaisseur de l'individu sans que le poids de la chair ne change.

Pour la plupart des paramètres testés, il n'existe aucune corrélation entre les concentrations de métaux et le poids de la chair/de la coquille. Cela est très certainement dû à l'impact important du calcium. En effet, nous avons vu une diminution de la concentration en Ca dans la coquille dû à une augmentation des métaux dans la chair. Ces interactions multiples rendent la comparaison entre les IC et les concentrations en métaux compliquée tant dans la coquille que dans la chair, et tant pour l'analyse des métaux cible, du calcium total que des

métaux totaux (sans et avec le calcium). Cependant, deux corrélations sont significatives : le poids du tissu total et les métaux totaux dans la chair. Puisqu'elles sont négatives, cela veut dire que plus la masse de l'individu est grande, plus la concentration en métaux totale diminue. Ceci est très certainement dû à un processus de dilution des métaux dans le corps et peut-être à une meilleure gestion des métaux toxiques, notamment à l'aide du calcium. Pour les mêmes paramètres, il n'existe aucune corrélation pour le site de St-Prex. Cela montrerait que sans impact de la pollution, le métabolisme des moules est très hétérogène et dépend de chaque individu.

Contrairement à ce qui a été observé pour les métaux, il y a une forte corrélation avec la métallothionéine. Ainsi, plus un individu est grand et lourd, plus la concentration en MTs diminue. Cela correspond aux observations précédentes. En effet, nous avons vu que (i) la concentration en MTs est stable dans le temps et que (ii) la croissance l'est également. Par conséquent, les concentrations en MTs diminueraient au fil du temps et de la croissance par effet de dilution. À l'inverse, il n'existe qu'une seule corrélation pour les individus de St-Prex. En effet, les concentrations en MTs n'étant pas à saturation, chaque individu aurait un taux de MTs ne répondant pas nécessairement à la situation de leur environnement, mais à l'état de leur métabolisme à l'instant présent. Cette variabilité individuelle ne permettrait pas d'obtenir une corrélation efficiente.

4.5 Dynamique des métaux dans les communautés de moule Quagga

La représentation en composante principale permet d'expliquer 84.3 [%] de la variance. Ce qui est un résultat particulièrement robuste pour une ordination sans contrainte et valide alors son utilisation. La plupart des métaux sont positivement corrélés et covarient avec la première dimension avec une contribution relativement importante. Le calcium, le strontium et le sodium quant à eux covarient de manière négative avec tous ces métaux. Dans une moindre mesure, le mercure et l'antimoine covarient avec la seconde dimension. À présent, l'ajout des scores pour chaque individu et leur classification permettent de mettre en avant deux groupes principaux. Ainsi, le calcium est principalement présent dans la coquille, alors qu'on retrouve la plupart des autres métaux dans la chair. Cela nous permet de conclure que les métaux

présents dans l'environnement se retrouveraient notamment dans les tissus de l'individu. Ce n'est seulement après qu'une partie de ces métaux se retrouveraient dans la coquille par transfert dans les tissus calcifiants. La principale composition de la coquille étant du calcium, il est compliqué de séparer les deux groupes de Vidy. À l'inverse, les chairs sont nettement plus évidentes à identifier pour les deux sites à la même saison. Ainsi, les individus du site de St-Prex seraient caractérisés par une concentration en Cd et Be plus importante alors que les individus de Vidy présenteraient un cocktail de métaux. La campagne de Vidy en Hiver est quant à elle plus particulière comme on a pu le voir précédemment. En effet, la croissance rapide fait qu'elles accumuleraient une quantité importante d'autres métaux présents dans l'environnement comme le mercure, qui est le métal le plus influent dans le sens de déplacement du groupe (dimension 2).

Comme nous l'avons vu, les métaux accumulés dans la chair sont nombreux et ont tous une contribution relativement élevée. Ainsi, si on enlève un certain nombre d'entre eux, le résultat reste pertinent avec une représentation de la variance qui est de 91.8 [%]. On voit donc qu'il est possible de ne sélectionner que quelques métaux qui vont en réalité représenter les autres métaux. Cependant, il faut faire attention aux choix faits, car ils risquent de fortement modifier la visualisation des données et donc l'information rendu.

Dans une autre approche plutôt axé sur l'efficacité des regroupements, l'analyse discriminante linéaire consiste à créer un modèle qui va prédire l'appartenance à un groupe en fonction des concentrations en métaux dans la chair et dans la coquille. Les résultats des prédictions sont très bons avec une précision des modèles variant entre 0.79 et 0.9 en fonction des métaux choisis. Cela permet de conclure qu'il existerait effectivement en lien fort entre les concentrations en métaux dans l'organisme et ceux présent dans l'environnement où elles vivent pour le cas de la chair. Dans le cas des coquilles, seul les sites peuvent être différenciés (pour MéSCa et MéCi). Cette même méthode appliquée aux MTs à permis d'obtenir un bon résultat de classification, mais avec une précision du modèle tout de même amoindrie. Cela serait notamment dû à (i) la saturation des MTs pour les deux campagnes de Vidy qui ne permet pas de les discriminer de manière efficace et (ii) de l'inconstance des MTs pour St-Prex qui est certes plus bas, mais aussi moins homogène (corrélation faible avec les IC par exemple).

Cependant, le modèle pourrait probablement être amélioré si le nombre de réplicats venait à augmenter.

4.6 Métaux dans les sédiments et dans les moules Quagga

La comparaison des métaux dans les sédiments et ceux contenus dans les chairs et dans les coquilles pour Vidy et St-Prex (automne) permettrait de mettre en avant le potentiel d'assimilation et le devenir de certains métaux une fois assimilés par les moules.

On remarque alors deux métaux avec une particularité propre à elles-mêmes. Il y a tout d'abord une accumulation importante du cadmium dans la coquille pour les deux sites et qui dépasse les concentrations trouvées dans les sédiments. Dans ce sens, Kraak *et al.* (1994) ont également relever que le Cd s'accumule de manière plus importante chez la moule Zébrée que le Cu et le Zn. La présence de cadmium dans la chair cause un stress oxydatif, perturbe l'activité des mitochondries (Banana *et al.*, 2019) et diminue la fonctionnalité des hémocytes (Evariste *et al.*, 2017). Cette forte accumulation dans la coquille pourrait alors être un système de défense efficace pour éviter ces impacts. Les individus de St-Prex sont moins exposés aux métaux et pourraient ainsi mieux gérer ce cadmium (notamment à travers les MTs). Ceci leur permettrait de contenir une concentration plus importante dans leur chair. C'est d'ailleurs en grande partie cette différence qui a permis de mettre en évidence la différence entre les moules de St-Prex et ceux de Vidy dans l'analyse de l'ACP.

Le second cas le plus intéressant est celui du mercure. Dans le cas de Vidy, la concentration dans les sédiments sont très bas comparé à celles trouvées dans la chair et dans la coquille. Cela confirmerait que les moules Quagga sont de très bons candidats pour le suivi environnemental du mercure (Coelho *et al.*, 2014).

Pour tous les autres métaux, les concentrations suivent l'ordre sédiment > chair > coquille avec des concentrations trouvées dans la chair généralement très proche de celle trouvée dans la coquille, mais avec tout de même des variations. Ainsi, on peut remarquer que le zinc et le manganèse s'accumulent plus facilement dans la chair et dans la coquille que le chrome ou le cuivre. Cela appuie le principe que le processus d'accumulation dépend des métaux qui sont

présent (Bourgeault *et al.*, 2011).

4.7 Les limites de l'étude

La grande partie des explications découlent de l'analyse visuelle des résultats en s'appuyant sur des processus biologiques connus. Cependant, les résultats (comme l'évolution de l'indice de condition entre automne et hiver) ne peuvent toutefois pas être confirmées. En effet, ils peuvent être le fruit du hasard, d'une mauvaise manipulation sur le terrain ou au laboratoire, ou encore du nombre d'individus analysés insuffisant. Il faudrait plus de données (à travers d'autres campagnes et d'autres analyses) pour pouvoir confirmer les observations faites durant ce travail. De plus, les valeurs extrêmes ont été enlevées des données de manière indépendante pour chaque test statistiques (par exemple entre l'analyse de variances des métaux et leur corrélation avec les indices de conditions). En effet, au vu du nombre relativement faible de données, exclure un individu (ou un pool) pour toutes la parties statistique dès qu'une valeur était extrême aurait diminuer de manière importante les données utilisables dans l'ensemble de l'étude.

Aussi, certains processus biologiques ayant un impact sur l'absorption des métaux ont été partiellement, voire pas du tout, traités. En effet, le métal peut s'accumuler dans les corps des bivalves à travers la filtration de l'eau, mais aussi au travers des nutriments contenant déjà des métaux (Wang et Fisher, 1999 ; Lee *et al.*, 2015). De plus, la plupart des effets externes comme la température, le pH (et bien d'autres) n'ont pas du tout été évoqués alors qu'ils jouent un rôle important (Baines *et al.*, 2005). Finalement, comme déjà vus à maintes reprises, les métaux interagissent entre eux une fois assimilés dans le corps d'une moule (Ng et Wang, 2007). Ces interaction, parfois complexe ont été évoquée à quelques reprises sans pour autant qu'elles soient étudiées ou évaluées. Toutes ces approximations font que les données récoltées et leurs analyses doivent être utilisées avec précaution.

5 Conclusion

5.1 Synthèse finale

La présence de métalloïdes ne serait pas nécessairement néfaste pour les moules et leur survie. Le cocktail de métaux aurait plutôt un impact sur leur régime de croissance. En effet, les concentrations en métallothionéines des moules de St-Prex montreraient que les individus ne sont pas stressés par les métalloïdes. Elles auraient donc la possibilité d'allouer de l'énergie dans d'autres activités comme la croissance et la reproduction. Les moules de la Baie de Vidy seraient, quant à elles, obligées de se protéger de cette pollution (haut taux de MTs) et alloueraient donc moins d'énergie à la croissance. Cependant, un milieu pollué n'est pas seulement synonyme de xénobiotique, mais également de nutriments. Ces derniers sembleraient avoir un impact positif sur le développement des moules de Vidy. Loin de voir leur développement ralenti ou arrêter, les moules de Vidy en hiver semblent se rapprocher morphologiquement de celle de St-Prex (à condition que la survie soit assurée). De plus, les individus de Vidy profiteraient d'une place illimitée et de ressources infinies. À l'inverse, les moules de St-Prex sont limitées en termes d'espace. Cependant, il semblerait que cela n'ait pas d'impact sur leur développement. Par conséquent, la pollution ne pourrait pas être systématiquement reliée à un état de santé détérioré des individus. On pourrait relever une gestion énergétique et une stratégie de développement différentes selon le site et son état de pollution. Finalement, l'analyse en composantes principales et l'analyse discriminante linéaire ont permis de voir que les métaux seraient de bons prédicteurs de groupement avec, par exemple, la classification claire entre la chair et la coquille.

Ce travail a aussi pu mettre en avant l'importance de certains métaux dans les processus biologiques. C'est le cas du calcium, qui semble être un élément majeur à analyser de manière individuelle puisqu'il est important dans la croissance, dans la défense de l'organisme et dans plusieurs processus métaboliques. De plus, l'analyse entre les métaux dans les sédiments et ceux contenus dans la chair/coquille ont montré des tendances très claires. Globalement, il y aurait une concentration plus faible dans la chair et encore plus faible dans la coquille. Cependant, ces analyses montreraient que certains métaux interagissent de manière différente

à l'image du cadmium et du mercure.

Les métaux, à condition qu'ils restent sous le seuil de toxicité mortel, s'accumuleraient de manière importante dans les tissus de la moule Quagga. À travers cette assimilation, les métallothionéines semblerait répondre de manière fiable avec des concentrations auxquelles on pourrait s'attendre. Cependant, cela ne veut pas nécessairement dire qu'elle peut être utilisée de manière isolée. En effet, les résultats montrent qu'une augmentation des concentrations de métaux au-delà d'un certain seuil n'engendrerait aucun changement dans la concentration en métallothionéines. Cela pourrait indiquer qu'il existe une concentration et/ou une production maximale des MTs qui est indépendant des métaux présents dans l'organisme. Dans le cas de figure où la présence de métaux est moins importante, la concentration en MTs varierait de manière aléatoire. Le taux de production de la protéine serait alors dépendant de l'individu et de ses besoins. Finalement, les MTs et leur dynamique sont fortement influencées par des facteurs externes (température, pH, etc.) comme interne (calcium). Par conséquent, les métallothionéines pourraient être utilisées comme biomarqueur, mais les résultats présentés ici ne permettrait qu'une évaluation relative. L'évaluation de la pollution d'un lieu modérément touché par les métalloïdes, sur la seule base des MTs, semblerait être encore inapplicable.

L'analyse saisonnière (en-tout-cas pour le cas de Vidy) a permis d'identifier des variations importantes. En effet, comme vu précédemment, l'état de l'environnement afflue sur la stratégie de développement et donc sur les processus d'assimilation. Il convient de prendre en compte ces dépendances lors du développement des sujets de recherches et de la stratégie d'échantillonnage. Malheureusement, ce travail n'aura pas permis de définir si le site de référence est astreint aux mêmes variations saisonnières. Il est cependant clair que le choix d'un bon site de référence est essentiel lors d'une étude d'impact comme celle réalisé ici.

Finalement, les moules ont clairement une tendance à accumuler les métaux dans la coquille, et ce, de manière rapide. Il serait possible d'interpréter ce phénomène comme une stratégie de défense et de détoxification complémentaire lorsque le calcium et les métallothionéines ne suffisent plus. Cependant, pas tous les métaux semblent s'accumuler de la même manière. Avec les résultats obtenus dans ce travail, il est difficile de cibler des métaux précis à l'exception

du calcium et du cadmium.

5.2 Perspectives futures

5.2.1 Analyses de redondance

L'analyse de redondance (RDA) est une extension de l'ACP. Cette fois-ci, les axes auraient été contraints de façon à ce que le premier axe soit une combinaison linéaire des variables explicatives. Il aurait permis d'obtenir la relation entre les variables réponses (caractéristiques des individus) et celles explicatives (paramètres environnementaux). Par exemple, il aurait été question de comprendre la relation entre la métallothionéine et les concentrations de métaux dans la chair ou dans les sédiments. Pour cela, il faudrait deux matrices, celle des variables explicatives et celle des variables réponses avec chaque ligne correspondant un individu (ou un pool). La première matrice se composerai des concentrations en métaux retrouvées dans la chair. Le seconde se composerai de la concentration en métallothionéines, mais également des indices de conditions.

5.2.2 Régressions linéaires

Dans la même idée, la méthode de la régression linéaire (RL) permettrait de prédire les concentrations de métaux et de métallothionéines dans la chair des moules en fonction des concentrations de métaux dans les sédiments. Cela permettrait d'identifier les métaux avec le plus fort impact sur les concentrations internes. Plusieurs modèles ont été tentés. Tout d'abord, tous les métaux ont été inclus dans le modèle de RL. Le modèle explique 28 [%] des variances, mais n'est pas significatif ($p\text{-value} = 0.39$). Dans un second modèle, un certain nombre de métaux sont conservés et d'autre enlevé (au hasard). Le modèle atteint une explication des variances de 46 [%] est devient significatif (0.035). Finalement, un dernier modèle ne comprenant que les métaux déjà vu dans la RDA expliquent 39.3 [%] des variances, mais est significatif (0.014). Le but final serait de comprendre, à nouveau, quels métaux ont le plus d'influence sur les individus de moules.

5.2.3 Analyses des métaux en laboratoire

Comme nous l'avons vu précédemment, les métaux interagissent entre eux lorsqu'il est question d'assimilation et d'accumulation. Il devient alors très compliqué de savoir quels métaux est assimilé par la moule, à quelle concentration et quels métaux interagit réellement avec la métallothionéine. Dans cette optique-là, plusieurs pools de moules, prélever en milieu naturel, pourraient être exposés à des métaux de manière indépendante (avec une population de référence). Après un temps d'exposition, les individus seraient alors analysés selon le plan d'analyse effectué durant ce travail. L'avantage de cette approche est qu'il serait possible de déceler la bioaccumulation dans la chair et dans la coquille pour les métaux testés sans avoir d'influence externe. Il serait également possible de faire une classification des métaux qui ont le plus tendance à être assimilé lors d'une exposition aux métaux et de relever leur affinité avec la protéine. Dans une autre perspective, il serait également possible d'exposer les individus à des cocktails de métaux pour voir les différentes interactions entre eux.

De plus, deux approches différentes pourraient être entreprises dans la perspective d'améliorer les liens entre sédiments et moules. En effet, il serait possible de prélever des sédiments en place et lieu où se trouvaient les individus. Il faudra cependant considérer les influences externes évoquées dans les limitations. Aussi, le plan d'échantillonnage présenté dans ce travail a séparer les trois composantes analysées : indices de condition, métaux internes (chair et coquille) et métallothionéines. Dans une autre approche, une partie de la chair des pools d'individus prévu pour l'analyse des métaux aurait pu être prélever après broyage.

Références

- ANDERSSON, D. (2023). Assessment of heavy metal pollution in surface sediments : case study of lake geneva. *Université de Lausanne, Faculté des Géosciences et Sciences de l'Environnement, Lausanne, Suisse.*
- BAINES, S. B., FISHER, N. S. et KINNEY, E. L. (2005). Influence of temperature on dietary metal uptake in arctic and temperate mussels. *Marine Ecology Progress Series*, 289:201–213.
- BALAKRISHNAMA, S. et GANAPATHIRAJU, A. (1998). Linear discriminant analysis—a brief tutorial. *Theory of LDA*, 11.
- BELLOTTO, V. R. et MIEKELEY, N. (2007). Trace metals in mussel shells and corresponding soft tissue samples : a validation experiment for the use of perna perna shells in pollution monitoring. *Anal Bioanal Chem*, 389(3):769–776.
- BERGER, B., DALLINGER, R. et THOMASER, A. (1995). Quantification of metallothionein as a biomarker for cadmium exposure in terrestrial gastropods. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14(5):781–791. Place : Hoboken Publisher : Wiley WOS :A1995QV45600007.
- BORDIN, G., MCCOURT, J., RAPOSO, F. C. et RODRIGUEZ, A. R. (1997). Metallothionein-like metalloproteins in the baltic clam macoma balthica : seasonal variations and induction upon metal exposure. *Marine Biology*, 129(3):453–463.
- BOURGEAULT, A., GOURLAY-FRANCÉ, C., PRIADI, C., AYRAULT, S. et TUSSEAU-VUILLEMIN, M.-H. (2011). Bioavailability of particulate metal to zebra mussels : Bio-dynamic modelling shows that assimilation efficiencies are site-specific. *Environmental Pollution*, 159(12):3381–3389.
- BRIX, K. V., BLUST, R., MERTENS, J., BAKEN, S., MIDDLETON, E. T. et COOPER, C. (2023). Evaluation of effects-based methods as monitoring tools for assessing ecological impacts of metals in aquatic ecosystems. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 19(1):24–31. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ieam.4645>.

BUZIER, R., TUSSEAU-VUILLEMIN, M.-H., dit MERIADEC, C. M., ROUSSELOT, O. et MOUCHEL, J.-M. (2006). Trace metal speciation and fluxes within a major french wastewater treatment plant : Impact of the successive treatments stages. *Chemosphere*, 65(11):2419–2426.

CHEN, C. Y., WARD, D. M., WILLIAMS, J. J. et FISHER, N. S. (2016). Metal bioaccumulation by estuarine food webs in new england, USA. *Journal of Marine Science and Engineering*, 4(2):41. Number : 2 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

CHEN, D., GERSTENBERGER, S., MUETING, S. A. et WONG, W. H. (2011). Environmental factors affecting settlement of quagga mussel (*dreissena rostriformis bugensis*) veligers in lake mead, nevada-arizona, usa. *Aquatic Invasions*, 6(2):149.

COELHO, J. P., DUARTE, A. C., PARDAL, M. A. et PEREIRA, M. E. (2014). Scrobicula plana (mollusca, bivalvia) as a biomonitor for mercury contamination in portuguese estuaries. *Ecological Indicators*, 46:447–453.

COUILLARD, Y., CAMPBELL, P. G. C., TESSIER, A., AUCLAIR, J. C. et PELLERIN-MASSICOTTE, J. (1995). Field transplantation of a freshwater bivalve, *pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. i. temporal changes in metallothionein and metal (cd, cu, and zn) concentrations in soft tissues. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 52(4):690–702. Publisher : NRC Research Press.

CRAVO, A., BEBIANNO, M. J. et FOSTER, P. (2004). Partitioning of trace metals between soft tissues and shells of *patella aspera*. *Environment International*, 30(1):87–98.

CROUX, C. et DEHON, C. (2010). Influence functions of the spearman and kendall correlation measures. *Stat Methods Appl*, 19(4):497–515.

CUBILLO, A. M., PETEIRO, L. G., FERNÁNDEZ-REIRIZ, M. J. et LABARTA, U. (2012). Influence of stocking density on growth of mussels (*mytilus galloprovincialis*) in suspended culture. *Aquaculture*, 342:103–111.

CZARNOŁESKI, M., KOZŁOWSKI, J., KUBAJAK, P., LEWANDOWSKI, K., MÜLLER, T., STAŃCZYKOWSKA, A. et SURÓWKA, K. (2006). Cross-habitat differences in crush re-

- sistance and growth pattern of zebra mussels (*dreissena polymorpha*) : effects of calcium availability and predator pressure. *Archiv für Hydrobiologie*, pages 191–208. Publisher : Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung.
- DAVIS, C. J., RUHMANN, E. K., ACHARYA, K., CHANDRA, S. et JERDE, C. L. (2015). Successful survival, growth, and reproductive potential of quagga mussels in low calcium lake water : is there uncertainty of establishment risk ? *PeerJ*, 3:e1276. Publisher : PeerJ Inc.
- DIGGINS, T. P. (2001). A seasonal comparison of suspended sediment filtration by quagga (*dreissena bugensis*) and zebra (*d. polymorpha*) mussels. *Journal of Great Lakes Research*, 27(4).
- EVARISTE, L., RIOULT, D., BROUSSEAU, P., GEFFARD, A., DAVID, E., AUFFRET, M., FOURNIER, M. et BETOULLE, S. (2017). Differential sensitivity to cadmium of immunomarkers measured in hemocyte subpopulations of zebra mussel *dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 137:78–85.
- FERRARI, B., CASADO-MARTINEZ, C., BENEJAM, T. et MARCHAND, P. (2017). Micropolluants métalliques et organiques dans les sédiments superficiels du léman. *Rapp. Comm. int. prot. eaux Léman contre pollut., Campagne 2016*.
- GEFFARD, A., AMIARD-TRIQUET, C., AMIARD, J.-C. et MOUNEYRAC, C. (2001). Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters (*crassostrea gigas*) from a clean and a metal-rich site. *Biomarkers*, 6(2):91–107. Publisher : Taylor & Francis _eprint : <https://doi.org/10.1080/13547500010000860>.
- GERET, F. et COSSON, R. P. (2000). Utilisation des métallothionéines comme biomarqueur de la contamination métallique : variabilité entre sites et organes chez l'huitre. *Oceanologica Acta*, page 11.
- GIAMBERINI, L., BEAUVAIIS, M. N. et PIHAN, J. C. (1996). Involvement of hémocytes and excretory organs in lead accumulation and detoxication in the freshwater mussel, *dreissena polymorpha pallas* : morphological and microanalytical studies. *Le patrimoine de l'écrit scientifique lorrain*.

- HANANA, H., KLEINERT, C., ANDRÉ, C. et GAGNÉ, F. (2019). Influence of cadmium on oxidative stress and NADH oscillations in mussel mitochondria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*, 216:60–66.
- HEILER, K., Bij de VAATE, A., EKSCHMITT, K., OHEIMB, P., ALBRECHT, C. et WILKE, T. (2013). Reconstruction of the early invasion history of the quagga mussel (*dreissena rostriformis bugensis*) in western europe. *Aquatic Invasions*, 8:53–57.
- HOUSECROFT, C. E., SHARPE, A. G. et POUSSE, A. (2010). *Chimie inorganique*. De Boeck.
- JAIN, C. K. et SHARMA, M. K. (2006). Heavy metal transport in the hindon river basin, india. *Environ Monit Assess*, 112(1):255–270.
- JAOUEN, A., GALAP, C., MINIER, C. et TUTUNDJIAN, R. (2000). Bioaccumulation de contaminants et mesure de biomarques chez la moule zébrée (*dreissena polymorpha*) en seine aval. *Bulletin de la Société zoologique de France*, page 12.
- JI, X., QIAN, W., QIU, X., YANG, Y., XU, P. et WANG, L. (2021). Environmental impact assessment of discharged heavy metals in textile production. *Fibres Text. East. Eur.*, 29(1):66–69. Place : Lodz Publisher : Inst Chemical Fibres WOS :000607833400010.
- JORDAENS, K., DE WOLF, H., VANDECASTEELE, B., BLUST, R. et BACKELJAU, T. (2006). Associations between shell strength, shell morphology and heavy metals in the land snail *cepaea nemoralis* (gastropoda, helicidae). *Science of the Total Environment*, 363(1-3):285–293.
- KAHLON, S. K., SHARMA, G., JULKA, J. M., KUMAR, A., SHARMA, S. et STADLER, F. J. (2018). Impact of heavy metals and nanoparticles on aquatic biota. *Environ Chem Lett*, 16(3):919–946.
- KARATAYEV, A. Y., MASTITSKY, S. E., PADILLA, D. K., BURLAKOVA, L. E. et HAJDUK, M. M. (2011). Differences in growth and survivorship of zebra and quagga mussels : size matters. *Hydrobiologia*, 668(1):183–194. Place : Dordrecht Publisher : Springer WOS :000290177300014.

KATAOKA, C. et KASHIWADA, S. (2021). Ecological risks due to immunotoxicological effects on aquatic organisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15):8305. Number : 15 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

KERAMBRUN, E., DELAHAUT, L., GEFFARD, A. et DAVID, E. (2018). Differentiation of sympatric zebra and quagga mussels in ecotoxicological studies : A comparison of morphometric data, gene expression, and body metal concentrations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 154:321–328.

KHATI, W., OUALI, K., MOUNEYRAC, C. et BANAOUI, A. (2012). Metallothioneins in aquatic invertebrates : Their role in metal detoxification and their use in biomonitoring. In SALAME, C., AILLERIE, M. et KHOURY, G., éditeurs : *Terragreen 2012 : Clean Energy Solutions for Sustainable Environment (cesse)*, volume 18, pages 784–794. Elsevier Science Bv. ISSN : 1876-6102 WOS :000305286700083.

KRAAK, M., LAVY, D., SCHOON, H., TOUSSAINT, M., PEETERS, W. et VANSTRAALLEN, N. (1994). Ecotoxicity of mixtures of metals to the zebra mussel dreissenapolymorpha. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13(1):109–114. Place : Hoboken Publisher : Wiley WOS :A1994MP59500015.

LANGSTON, W. J. et BEBIANNO, M. J. (1998). *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Springer Science & Business Media. Google-Books-ID : 9K5I0ZPQd54C.

LAVOIE, M. (2012). Effets des métaux traces essentiels et du calcium sur l'accumulation et la toxicité du cadmium chez l'algue verte chlamydomonas reinhardtii : Inclusion des interactions physiologiques algales dans le modèle du ligand biotique. *Ann Arbor, United States*. ISBN : 9798379462468.

LEE, J. H., BIRCH, G. F., CRESSWELL, T., JOHANSEN, M. P., ADAMS, M. S. et SIMPSON, S. L. (2015). Dietary ingestion of fine sediments and microalgae represent the dominant route of exposure and metal accumulation for sydney rock oyster (*saccostrea glomerata*) : A biokinetic model for zinc. *Aquatic Toxicology*, 167:46–54.

- LI, D., PI, J., WANG, J., ZHU, P., LEI, L., ZHANG, T. et LIU, D. (2016). Protective effects of calcium on cadmium accumulation in co-cultured silver carp (*hypophthalmichthys molitrix*) and triangle sail mussel (*hyriopsis cumingii*). *Bull Environ Contam Toxicol*, 97(6):826–831.
- LI, F., ZHANG, J., LIU, C., XIAO, M. et WU, Z. (2018). Distribution, bioavailability and probabilistic integrated ecological risk assessment of heavy metals in sediments from honghu lake, china. *Process Safety and Environmental Protection*, 116:169–179.
- LIU, Q., LIAO, Y. et SHOU, L. (2018). Concentration and potential health risk of heavy metals in seafoods collected from sanmen bay and its adjacent areas, china. *Marine Pollution Bulletin*, 131:356–364.
- LIYANAGE, C. P. et YAMADA, K. (2017). Impact of population growth on the water quality of natural water bodies. *Sustainability*, 9(8):1405.
- LJUNG, K., OTABBONG, E. et SELINUS, O. (2006). Natural and anthropogenic metal inputs to soils in urban uppsala, sweden. *Environ. Geochem. Health*, 28(4):353–364. Place : Dordrecht Publisher : Springer WOS :000239722300005.
- LOIZEAU, J.-L., CASADO-MARTINEZ, C., BENEJAM, T., MARCHAND, P., FERRARI, B., MAKRI, S. et ARPAGAUS, P. (2017). Micropolluants métalliques et organiques dans les sédiments superficiels du léman. *Rapp. Comm. int. prot. eaux Léman contre pollut.*
- MATTHEWS, J., SCHIPPER, A. M., HENDRIKS, A. J., YEN LE, T. T., bij de VAATE, A., van der VELDE, G. et LEUVEN, R. S. E. W. (2015). A dominance shift from the zebra mussel to the invasive quagga mussel may alter the trophic transfer of metals. *Environmental Pollution*, 203:183–190.
- MCLAUGHLAN, C., GALLARDO, B. et ALDRIDGE, D. C. (2014). How complete is our knowledge of the ecosystem services impacts of europe's top 10 invasive species ? *Acta Oecologica*, 54:119–130.
- MEADOR, J. (2006). Rationale and procedures for using the tissue-residue approach for toxicity assessment and determination of tissue, water, and sediment quality guidelines for aquatic organisms. *Human and Ecological Risk Assessment : An*

International Journal, 12(6):1018–1073. Publisher : Taylor & Francis _eprint : <https://doi.org/10.1080/10807030600801535>.

METZ, O., TEMMEN, A., von OHEIMB, K. C. M., ALBRECHT, C., SCHUBERT, P. et WILKE, T. (2018). Invader vs. invader : intra- and interspecific competition mechanisms in zebra and quagga mussels. *Aquat. Invasions*, 13(4):473–480. Place : Helsinki Publisher : Regional Euro-Asian Biological Invasions Centre-Reabic WOS :000452050100005.

MICOVIC, V., BULOG, A., KUCIC, N., JAKOVAC, H. et RADOSEVIC-STASIC, B. (2009). Metallothioneins and heat shock proteins 70 in marine mussels as sensors of environmental pollution in northern adriatic sea. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 28(3):439–447. Place : Amsterdam Publisher : Elsevier Science Bv WOS :000271178900019.

MILLS, E. L., DERMOTT, R. M., ROSEMAN, E. F., DUSTIN, D., MELLINA, E., CONN, D. B. et SPIDLE, A. P. (1993). Colonization, ecology, and population structure of the "quagga" mussel (bivalvia : Dreissenidae) in the lower great lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50(11): 2305–2314. Publisher : NRC Research Press.

MILLS, E. L., ROSENBERG, G., SPIDLE, A. P., LUDYANSKIY, M., PLIGIN, Y. et MAY, B. (1996). A review of the biology and ecology of the quagga mussel (*dreissena bugensis*), a second species of freshwater dreissenid introduced to north america. *Integr Comp Biol*, 36(3):271–286.

MONTUORI, P., LAMA, P., AURINO, S., NAVIGLIO, D. et TRIASSI, M. (2013). Metals loads into the mediterranean sea : estimate of sarno river inputs and ecological risk. *Ecotoxicology*, 22(2):295–307.

MUETING, S. A. et GERSTENBERGER, S. L. (2010). Mercury concentrations in quagga mussels, *dreissena bugensis*, from lakes mead, mohave and havasu. *Bull Environ Contam Toxicol*, 84(4):497–501.

MULLER, R. (2022). Biomonitoring of heavy metals using bivalves and application of this method to quagga mussels (*dreissena rostriformis*), with the comparison of different lo-

cations in geneva lake. *Université de Lausanne, Faculté des Géosciences et Sciences de l'Environnement, Lausanne, Suisse.*

NALEPA, T. F., FANSLOW, D. L. et POTHOVEN, S. A. (2010). Recent changes in density, biomass, recruitment, size structure, and nutritional state of dreissena populations in southern lake michigan. *Journal of Great Lakes Research*, 36:5–19.

NG, T. Y.-T. et WANG, W.-X. (2007). Interactions of silver, cadmium, and copper accumulation in green mussels (*perna viridis*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(8):1764–1769. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1897/06-456R1.1>.

PETROVIC, S., OZRETIĆ, B., KRAJNOVIĆ-OZRETIĆ, M. et BOBINAC, D. (2001). Lysosomal membrane stability and metallothioneins in digestive gland of mussels (*mytilus galloprovincialis lam.*) as biomarkers in a field study. *Mar. Pollut. Bull.*, 42(12):1373–1378. Place : Oxford Publisher : Pergamon-Elsevier Science Ltd WOS :000173052200026.

PORRETTI, M., ARRIGO, F., DI BELLA, G. et FAGGIO, C. (2022). Impact of pharmaceutical products on zebrafish : An effective tool to assess aquatic pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*, 261:109439.

POTET, M., GIAMBÉRINI, L., PAIN-DEVIN, S., LOUIS, F., BERTRAND, C. et DEVIN, S. (2018). Differential tolerance to nickel between *dreissena polymorpha* and *dreissena rostriformis bugensis* populations. *Sci Rep*, 8(1):700. Number : 1 Publisher : Nature Publishing Group.

POTÉ, J., HALLER, L., LOIZEAU, J.-L., GARCIA BRAVO, A., SASTRE, V. et WILDI, W. (2008). Effects of a sewage treatment plant outlet pipe extension on the distribution of contaminants in the sediments of the bay of vidy, lake geneva, switzerland. *Bioresource Technology*, 99(15).

POURRET, O., BOLLINGER, J.-C. et HURSTHOUSE, A. (2021). Heavy metal : a misused term ? *ACTA GEOCHIM.*, 40(3):466–471. Place : Cham Publisher : Springer Int Publ Ag WOS :000632846300001.

PÉDEN, R., POUPIN, P., SOHM, B., FLAYAC, J., GIAMBÉRINI, L., KLOPP, C., LOUIS, F., PAIN-DEVIN, S., POTET, M., SERRE, R.-F. et DEVIN, S. (2019). Environmental transcriptomes of invasive dreissena, a model species in ecotoxicology and invasion biology. *Scientific Data*, 6(1):234.

RAMSAK, A., SCANCAR, J. et HORVAT, M. (2012). Evaluation of metallothioneins in blue mussels (*mytilus galloprovincialis*) as a biomarker of mercury and cadmium exposure in the slovenian waters (gulf of trieste) : A long-term field study. *Acta Adriat.*, 53(1):71–85. Place : Split Publisher : Inst Oceanografiju I Ribarstvo WOS :000308008600005.

RIBEIRO, A. P., FIGUEIREDO, A. M. G., TICIANELLI, R. B., NAMMOURA-NETO, G. M., SILVA, N. C., KAKAZU, M. H. et ZAHN, G. (2012). Metals and semi-metals in street soils of são paulo city, brazil. *J Radioanal Nucl Chem*, 291(1):137–142.

RICHMAN, L. et SOMERS, K. (2005). Can we use zebra and quagga mussels for biomonitoring contaminants in the niagara river ? | SpringerLink. *Water, Air, and Soil Pollution*.

RICHMAN, L. A. et SOMERS, K. (2010). Monitoring metal and persistent organic contaminant trends through time using quagga mussels (*dreissena bugensis*) collected from the niagara river. *Journal of Great Lakes Research*, 36(1):28–36.

RODRÍGUEZ-SEIJO, A., ANDRADE, M. L. et VEGA, F. A. (2017). Origin and spatial distribution of metals in urban soils. *J Soils Sediments*, 17(5):1514–1526.

ROESIJADI, G. (1992). Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 22(2):81–113.

ROESIJADI, G., YOUNG, J. S., DRUM, A. S. et GURTISEN, J. M. (1984). Behavior of trace metals in *mytilus edulis* during a reciprocal transplant field experiment. *Marine ecology*.

SABARATNAM, S. (2018). Spatial distribution of trace metals and major elements in surficial sediments from the vidy bay. *Université de Lausanne, Faculté des Géosciences et Sciences de l'Environnement, Lausanne, Suisse*.

SANZ-PRADA, L., GARCIA-ORDIALES, E., ROQUEÑÍ, N., MANUEL RICO, J. et LOREDO, J. (2022). Heavy metal concentrations and dispersion in wild mussels along the asturias coastline (north of spain). *Ecological Indicators*, 135:108526.

SCANES, P. R. et ROACH, A. C. (1999). Determining natural ‘background’ concentrations of trace metals in oysters from new south wales, australia. *Environmental Pollution*, 105(3): 437–446.

SCHÄFER, S., HAMER, B., TREURSIĆ, B., MÖHLENKAMP, C., SPIRA, D., KORLEVIĆ, M., REIFFERSCHEID, G. et CLAUS, E. (2012). Comparison of bioaccumulation and biomarker responses in dreissena polymorpha and d. bugensis after exposure to resuspended sediments. *Arch Environ Contam Toxicol*, 62(4):614–627.

SHEFALI, KUMAR, R., SANKHLA, M. S., KUMAR, R. et SONONE, S. S. (2021). Impact of pesticide toxicity in aquatic environment. *Biointerface Res. Appl. Chem.*, 11(3): 10131–10140. Place : Bucuresti Publisher : Biointerface Research Applied Chemistry WOS :000591668100026.

STADMARK, J. et CONLEY, D. J. (2011). Mussel farming as a nutrient reduction measure in the baltic sea : Consideration of nutrient biogeochemical cycles. *Marine Pollution Bulletin*, 62(7):1385–1388.

STEPHEN, C. A., HUBERS, A. N. et SKIDMORE, J. L. (1999). Diagnostic genetic markers and evolutionary relationships among invasive dreissenoid and corbiculoid bivalves in north america : Phylogenetic signal from mitochondrial 16s rdna. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13(1):31–49.

STEPHEN, C. A. et TUMEO, M. A. (2006). Invasion genetics of ponto-caspian gobies in the great lakes : A ‘cryptic’ species, absence of founder effects, and comparative risk analysis. *Biol Invasions*, 8(1):61–78.

TANG, B. et RIISGARD, H. U. (2018). Relationship between oxygen concentration, respiration and filtration rate in blue mussel mytilus edulis. *J. Oceanol. Limnol.*, 36(2):395–404.

TANTANASARIT, C., BABEL, S., ENGLANDE, A. J. et MEKSUMPUN, S. (2013). Influence of size and density on filtration rate modeling and nutrient uptake by green mussel (*perna viridis*). *Marine Pollution Bulletin*, 68(1):38–45.

TESSIER, C. et BLAIS, J.-S. (1996). Determination of cadmium–metallothioneins in zebra mussels exposed to subchronic concentrations of cd²⁺. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 33(3):246–252.

THEVENON, F., GRAHAM, N. D., CHIARADIA, M., ARPAGAUS, P., WILDI, W. et POTÉ, J. (2011). Local to regional scale industrial heavy metal pollution recorded in sediments of large freshwater lakes in central europe (lakes geneva and lucerne) over the last centuries. *Science of The Total Environment*, 412-413:239–247.

THEVENON, F., REGIER, N., BENAGLI, C., TONOLLA, M., ADATTE, T., WILDI, W. et POTÉ, J. (2012). Characterization of fecal indicator bacteria in sediments cores from the largest freshwater lake of western europe (lake geneva, switzerland). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78:50–56.

VIARENGO, A. et NOTT, J. A. (1993). Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Comparative Pharmacology*, 104(3):355–372.

VINK, R. et BEHRENDT, H. (2002). Heavy metal transport in large river systems : heavy metal emissions and loads in the rhine and elbe river basins. *Hydrological Processes*, 16(16):3227–3244. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/hyp.1099>.

WANG, W.-X. et FISHER, N. S. (1999). Delineating metal accumulation pathways for marine invertebrates. *Science of The Total Environment*, 237-238:459–472.

WANG, W.-X. et RAINBOW, P. S. (2010). Significance of metallothioneins in metal accumulation kinetics in marine animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*, 152(1):1–8.

WILDI, W., DOMINIK, J., LOIZEAU, J.-L., THOMAS, R. L., FAVARGER, P.-Y., HALLER, L., PERROUD, A. et PEYTREMANN, C. (2004). River, reservoir and lake sediment conta-

mination by heavy metals downstream from urban areas of switzerland. *Lakes & Reservoirs : Science, Policy and Management for Sustainable Use*, 9(1):75–87. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1440-1770.2004.00236.x>.

WILSON, K. A., HOWELL, E. T. et JACKSON, D. A. (2006). Replacement of zebra mussels by quagga mussels in the canadian nearshore of lake ontario : the importance of substrate, round goby abundance, and upwelling frequency. *Journal of Great Lakes Research*, 32(1): 11–28.

WONG, W., GERSTENBERGER, S., BALDWIN, W. et MOORE, B. (2011). Settlement and growth of quagga mussels (*dreissenia rostriformis bugensis andrusov*, 1897) in lake mead, nevada-arizona, USA. *Aquatic Invasions*, 7(1):7–19.

ZHANG, X., ZHA, T., GUO, X., MENG, G. et ZHOU, J. (2018). Spatial distribution of metal pollution of soils of chinese provincial capital cities. *Science of The Total Environment*, 643:1502–1513.

ZUYKOV, M., PELLETIER, E. et HARPER, D. A. T. (2013). Bivalve mollusks in metal pollution studies : From bioaccumulation to biomonitoring. *Chemosphere*, 93(2):201–208.

Annexes

5.3 Annexe A : protocole d'extraction et de quantification de la métallothionéine.

Protocole de laboratoire : Extraction et quantification de la métallothionéine

1. Extraction de la métallothionéine

I. Solutions à préparer

- Solution Tris-HCl 20 [mM] (pH = 8.6) :

Tris(hydroxymethyl)amino-methane : Réf : 252859 (Sigma) PM : 121.14 [g/mol]

On veut une solution de 100 [ml] à 20 [mM] de Tris

$$0.020 \text{ [mol/l]} * 121.14 \text{ [g/mol]} = 2.4228 \text{ [g/l]}$$

Pour une solution de 100 [ml], il faut peser 242.28 [mg]

→ 242.28 [mg] dans 100 [ml] d'eau milliQ

- PMSF 250 [mM] :

Phenylmethanesulfonyl fluoride : Réf : P7626 (Sigma) PM : 174.19 [g/mol]

On veut une solution de 1 [ml] à 250 [mM] de PMFS

$$0.250 \text{ [mol/l]} * 174.19 \text{ [g/mol]} = 43.5 \text{ [g/l]}$$

Pour une solution de 1 [ml], il faut peser 43.5 [mg]

→ 43.5 [mg] dans 1 [ml] d'eau milliQ

II. Préparation du tampon de broyage

Dans un tube falcon 50 [ml] :

- Mettre 49'895 [μ l] de solution Tris-HCl 20 [mM] (pH = 8.6)
- Ajouter 100 [μ l] de PMSF (250 [mM])
- Mettre 5 [μ l] de β -mercaptoéthanol (**attention manipulation avec grande précaution : hotte + gant**).

III. Broyage des échantillons

- Ajouter 500 [μ l] de tampon d'extraction pour 200 [mg] de tissus. (rmq : noter poids et volume !)
- Broyer les échantillons (2 cycles de 60 secondes à 7'500 [RPM]).
- Centrifuger les échantillons à 15'000 [RPM] durant 1 heure à 4 [°C].
- Placer le surnageant dans des tubes Eppendorf (2 [ml]).
- Incuber le surnageant à 70 [°C] pendant 10 minutes à 550 [RPM].
- Centrifuger les échantillons à 15'000 [RPM] durant 30 minutes à 4 [°C].
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube Eppendorf (2 [ml]). (rmq : quantifier immédiatement ou reconditionner pour plus tard.)

2. Quantification de la métallothionéine

I. Solutions à préparer

- Solution tampon phosphate de sodium 0.2 [M] (pH = 8.0) :

Conservation : 6 mois

Na2HPO4.7H2O (0.2 [mol/l]) (solution 1) :

Di-sodium hydrogénophosphate heptahydrate : Réf : X987 (ROTH) PM : 268.03 [g/mol]

On veut une solution de 1 [l] à 0.2 [M] \leftrightarrow 0.2 [mol/l] * 268.03 [g/mol] = 53.6 [g/l]

→ 53'600 [mg] dans 1 [l] d'eau milliQ

NaH2PO4.H2O (0.2 [mol/l]) (solution 2) :

Sodium phosphate monobasic monohydrate : Réf : 71507 (Sigma) PM : 137.99 [g/mol]

On veut une solution de 1 [l] à 0.2 [M] \leftrightarrow 0.2 [mol/l] * 137.99 [g/mol] = 27.6 [g/l]

→ 2'760 [mg] dans 100 [ml] d'eau milliQ

Mélange des deux solutions pour avoir ~ 1 [l] de tampon à pH = 8.0

- Verser 947 [ml] de solution 1 dans un bécher.
- En prenant le mesure du pH, tamponner à un pH de 8.00 avec la solution 2.

- Solution de NaCl à 2 [M] :

Conservation : 6 mois

Sodium chloride : Réf : 39573 (Roth) PM : 58.44 [g/mol]

On veut une solution de 500 [ml] à 2 [M] \leftrightarrow 2 [mol/l] * 58.44 [g/mol] = 116.88 [g/l]

Pour une solution de 500 [ml], il faut peser 58.44 [g]

→ 58'440 [mg] dans 500 [ml] d'eau milliQ

- Solution de Na2EDTA.2H2O à 4 [mM] :

Conservation : 6 mois

Titriplex : Réf : K51661518 (Merck) PM : 372.24 [g/mol]

On veut une solution de 250 [ml] à 4 [mM] \leftrightarrow 0.004 [mol/l] * 372.24 [g/mol] = 1.489 [g/l]

Pour une solution de 250 [ml], il faut peser 0.37224 [g]

→ 372.24 [mg] dans 250 [ml] d'eau milliQ

- Solution de GSH à 10 [mM] :

À faire fraîchement

GSH : Réf : G4251 (Sigma) PM : 307.32 [g/mol]

On veut une solution de 5 [ml] à 10 [mM] \leftrightarrow 0.01 [mol/l] * 307.32 [g/mol] = 3.0732 [g/l]

Pour une solution de 5 [ml], il faut peser 0.0154 [g]

→ 15.4 [mg] dans 5 [ml] d'eau milliQ

- Solution de DTNB à 0.43 [mM] :

À faire fraîchement

Solution Tampon + NaCl :

Préparer une solution avec 50 [ml] de NaCl (2 [M]) et 50 [ml] de tampon (0.2 [M] et pH = 8.00)

DTNB : Réf : D8130 (Sigma) PM : 396.35 [g/mol]

On veut une solution de 100 [ml] à 0.43 [mM] \leftrightarrow 0.00043 [mol/l] * 396.35 [g/mol] = 0.17 [g/l]

Pour une solution de 100 [ml], il faut peser 0.017 [g]

→ 17 [mg] dans 100 [ml] de solution Tampon + NaCl

Note : préparer la même quantité de solution Tampon + NaCl (sans DTNB) pour les blancs !

- Solution de HCl_ Na₂EDTA :

À faire fraîchement

Solution HCl (37 [%]) :

Faire une solution de 100 [ml] : 37 [ml] de HCl concentré dans 63 [ml] d'eau milliQ

Solution de HCl_ Na₂EDTA

→ 49.3 [μl] d'HCl (37 [%]) dans 5 [ml] de Na₂EDTA

II. Quantification de la métallothionéine

- Préparer la gamme de concentration dans des tubes de 2 [mL] (dans la glace et sans lumière).

GSH [μl]	0	60	90	120	180	240	300	500	750	1000	1500
S.GSH à 10[mM] [μl]	0	6	9	12	18	24	30	50	75	100	150
Eau MilliQ [μl]	1000	994	991	988	982	976	970	950	925	900	850

- Placer 50 [μl] des 11 standards et des échantillons dans des tubes bruns de 2 [ml].
- Placer 50 [μl] des échantillons dans des tubes normaux de 2 [ml].
- Ajouter 50 [μl] de mélange HCl-EDTA dans tous les échantillons et les standards.
- Ajouter 1400 [μl] de Tampon+NaCl+DTNB dans tous les tubes bruns.

- Ajouter 1400 [μl] de Tampon+NaCl dans tous les tubes normaux.
- Incuber les échantillons pendant 30 minutes à température ambiante.
- Placer 300 [μl] de chaque tube (en triplicats) dans une microplaqué de 96 puits.
- Lire l'absorbance à 412 [nm].

3. Quantification de la métallothionéine

I. Calculs pour le dosage

Pour convertir les concentrations en GSH de [μM] à [μg], il faut tenir compte de la dilution de ls GSH avec le DTNB :

$$[\text{GSH}]_{\text{finale}} = \frac{[\text{GSH}]_{\text{initiale de la gamme}} * \text{Volume réactif}}{\text{Volume total}}$$

$$[\text{GSH}]_{\text{finale}} = \frac{[\text{GSH}]_{\text{initiale de la gamme}} * 50 [\mu\text{l}]}{1500 [\mu\text{l}]}$$

Avec la concentration qui a réellement réagit dans le milieu, on peut calculer la masse en GSH :

$$\text{masse}_{\text{GSH}} [\text{g}] = [\text{GSH}]_{\text{finale}} \left[\frac{\text{mol}}{\text{l}} \right] * \text{PM}_{\text{GSH}} \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right] * \text{Volume}_{\text{réactionnel}} [\text{l}]$$

$$\text{masse}_{\text{GSH}} [\text{g}] = [\text{GSH}]_{\text{finale}} \left[\frac{\text{mol}}{\text{l}} \right] * 307.22 \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right] * 0.0005 [\text{l}]$$

GSH final [μM]	0	2	3	4	6	8	10	16.66	25	33.33	50
M GSH [mol/l]	0.00E+00	2.00E-06	3.00E-06	4.00E-06	6.00E-06	8.00E-06	1.00E-05	1.67E-05	2.50E-05	3.33E-05	5.00E-05
GSH [g/l]	0.00E+00	1.72E-02	2.58E-02	3.44E-02	5.16E-02	6.88E-02	8.60E-02	1.43E-01	2.15E-01	2.87E-01	4.30E-01
GSH [g]	0.00E+00	8.60E-07	1.29E-06	1.72E-06	2.58E-06	3.44E-06	4.30E-06	7.16E-06	1.08E-05	1.43E-05	2.15E-05
GSH [μg]	0	0.86	1.29	1.72	2.58	3.44	4.30	7.17	10.75	14.32	21.50

- Tracer le graphique Absorbance = f(quantité de GSH [μl]).
- Obtenir la pente et l'intersection de la courbe linéaire.
- En déduire la quantité de GSH de chaque échantillon.
- Appliquer la formule pour le calcul des concentrations en MT.

$$[\text{MT}] = \frac{\text{GSH} [\mu\text{g}] * 8600}{307.22 * 21 * \text{Pf}}$$

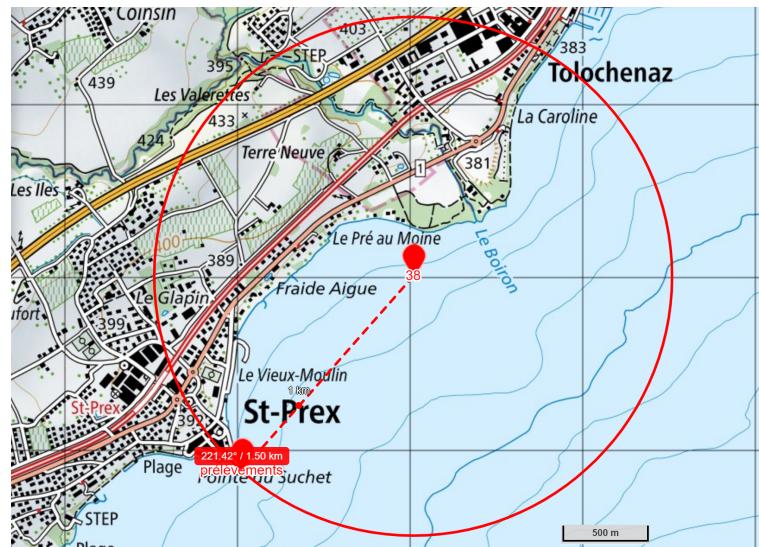
Où

[MT] : concentration en MT
 8600 : masse molaire de la MT
 307.22 : masse molaire de la GSH
 Pf : poids frais de l'organe [g]
 21 : nombre de groupement SH par molécule de MT

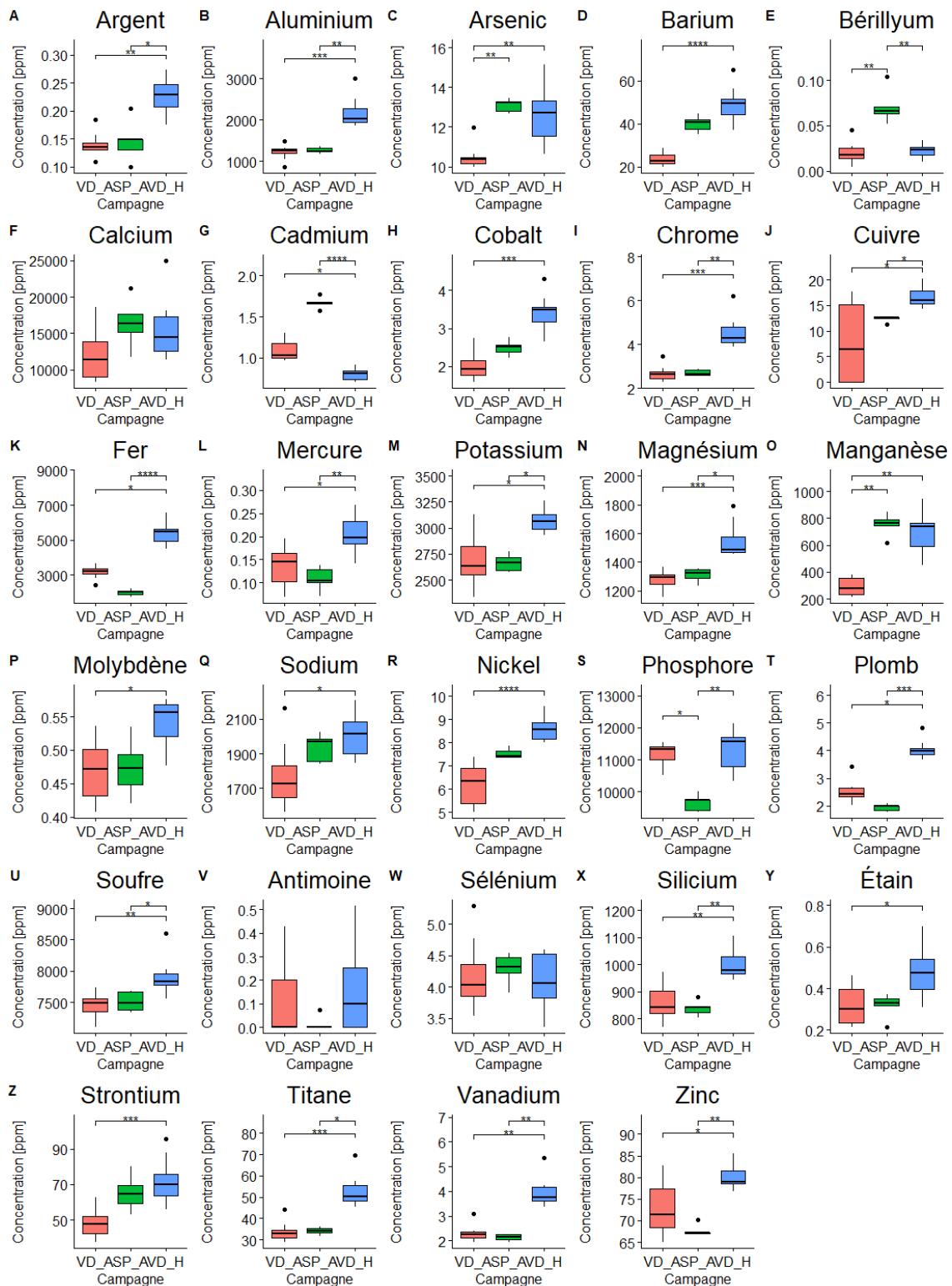
Traduit du protocole de **Joana Soares** (Université de Porto) par **Micaela Faria** (Université de Lausanne).

Adapté au laboratoire de l'UNIL par **Floriane Tisserand** et **Christophe Reis** (Université de Lausanne).

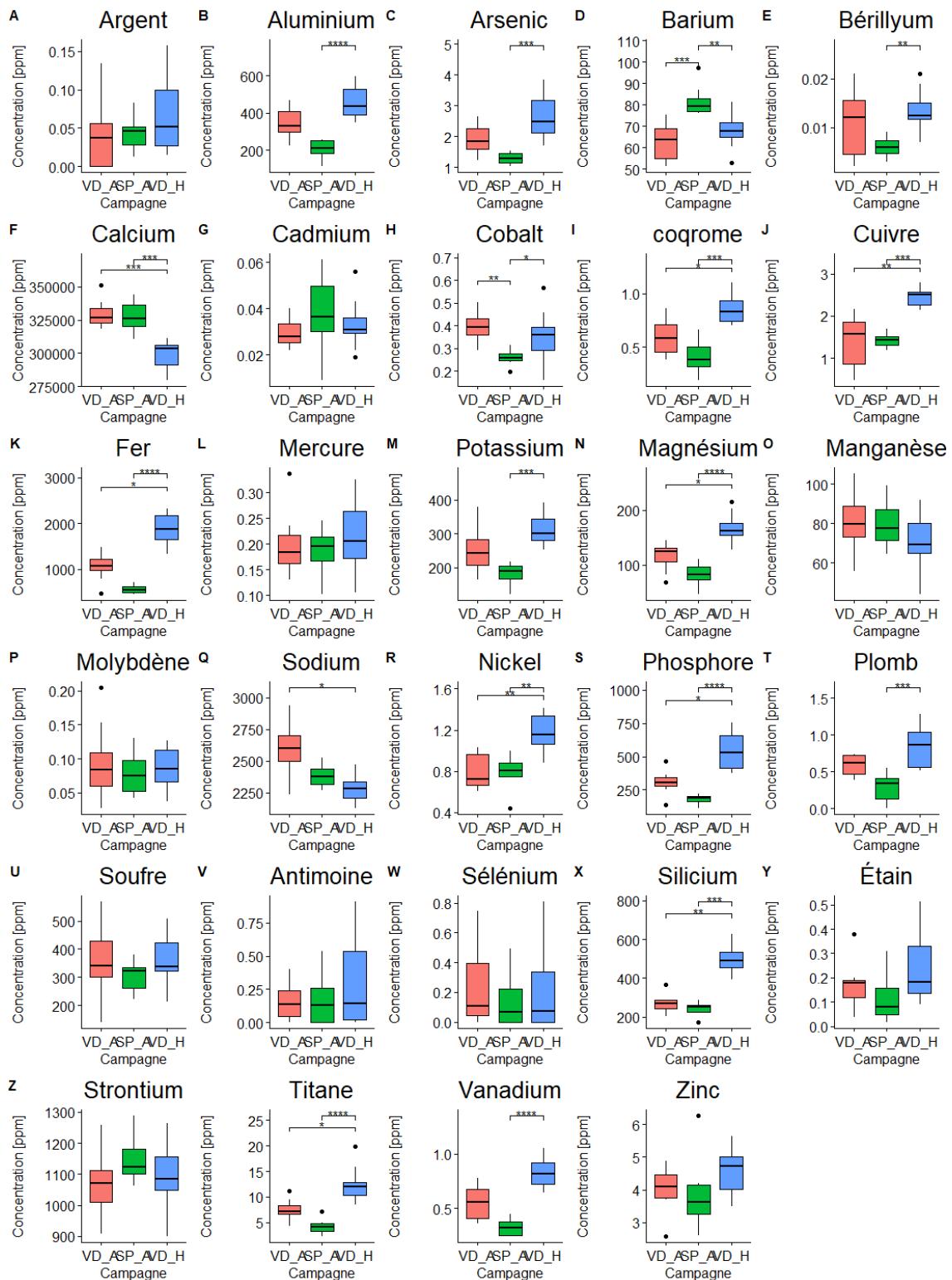
5.4 Annexe B : points d'analyse des métaux dans les sédiments comparé au point de prélèvement des moules Quagga pour St-Prex.



5.5 Annexe C : métaux indépendant - chair.

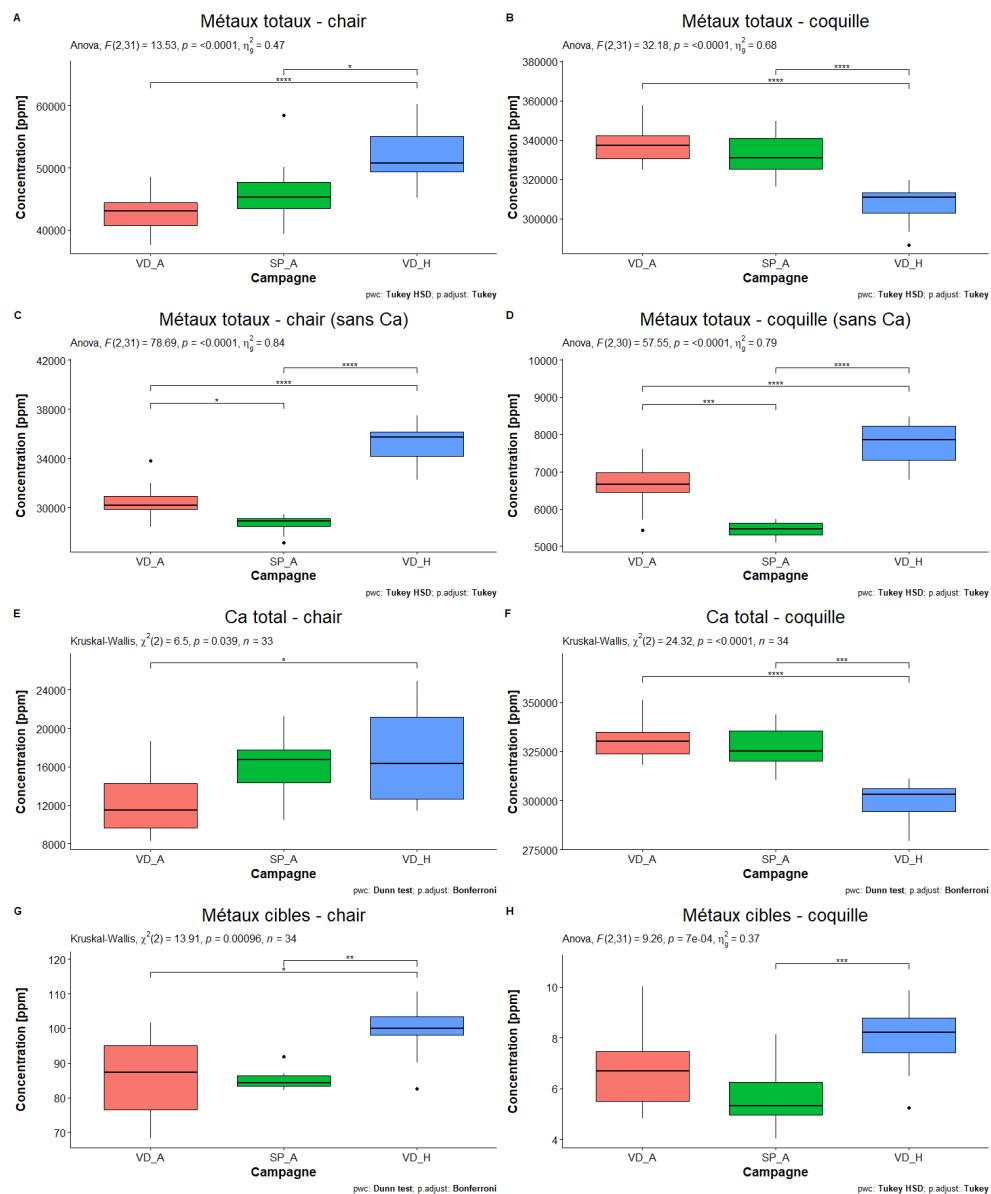


5.6 Annexe D : métaux indépendant - coquille.

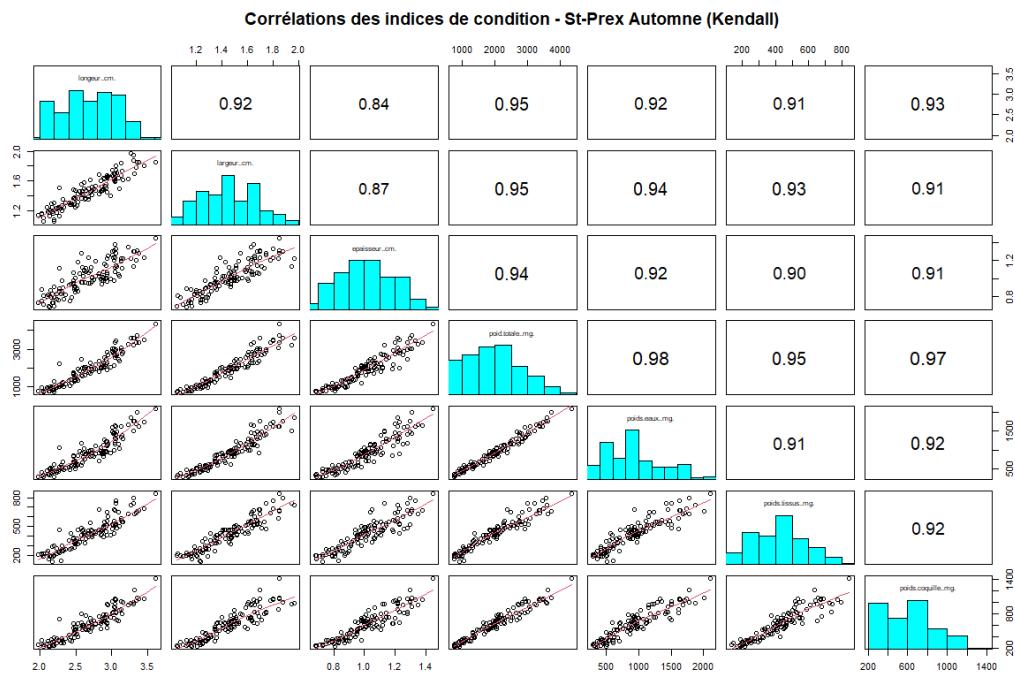
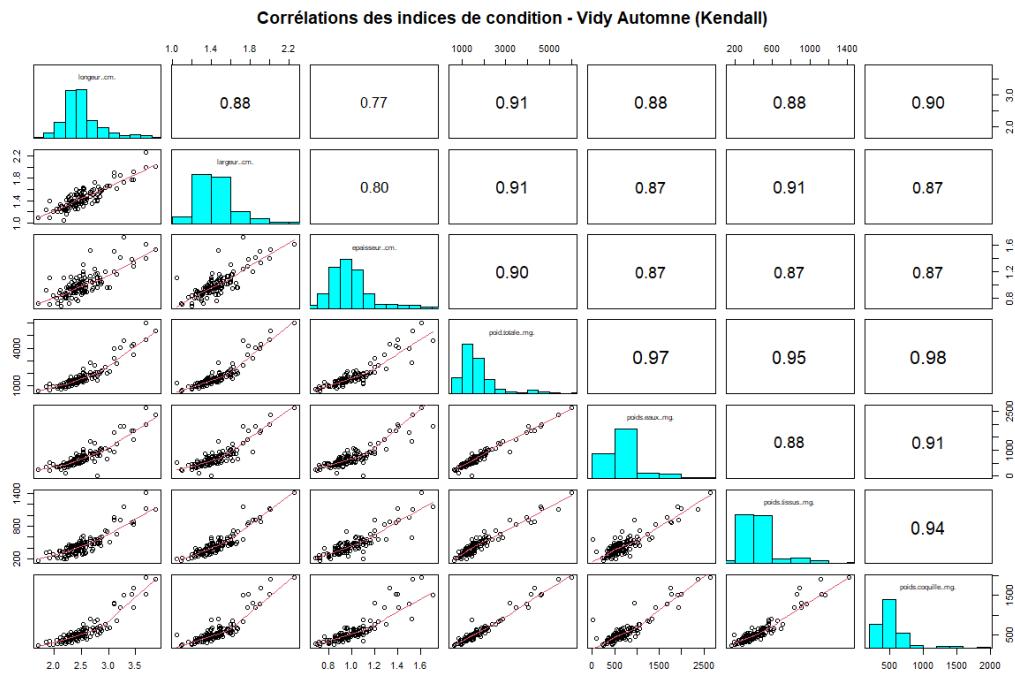


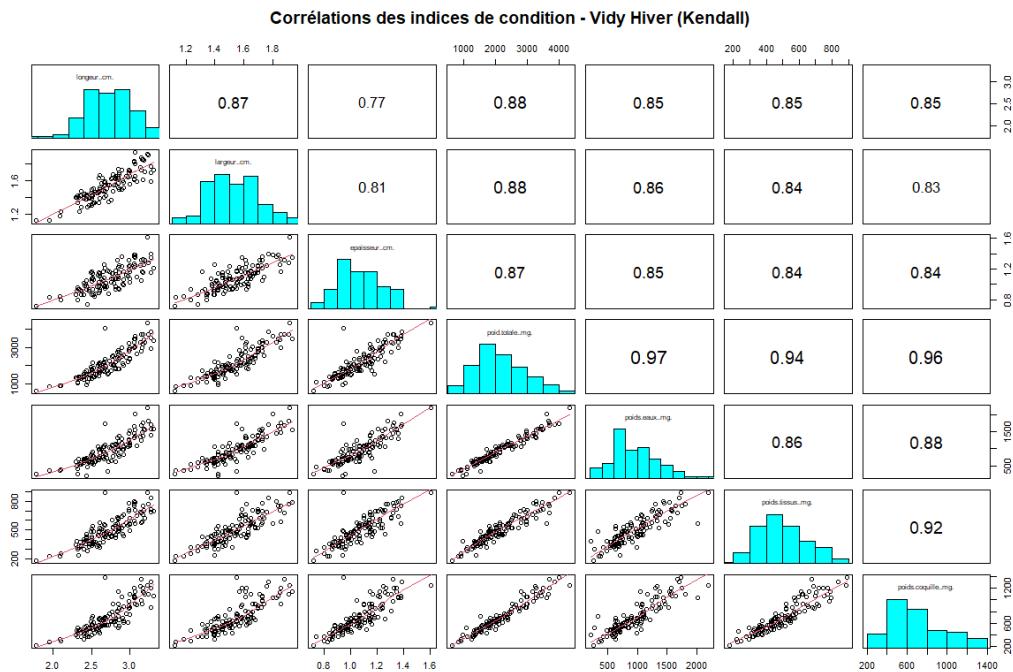
5.7 Annexe E : résultats complets des analyses de variance pour les indices de conditions.

Analyse de variances des métaux

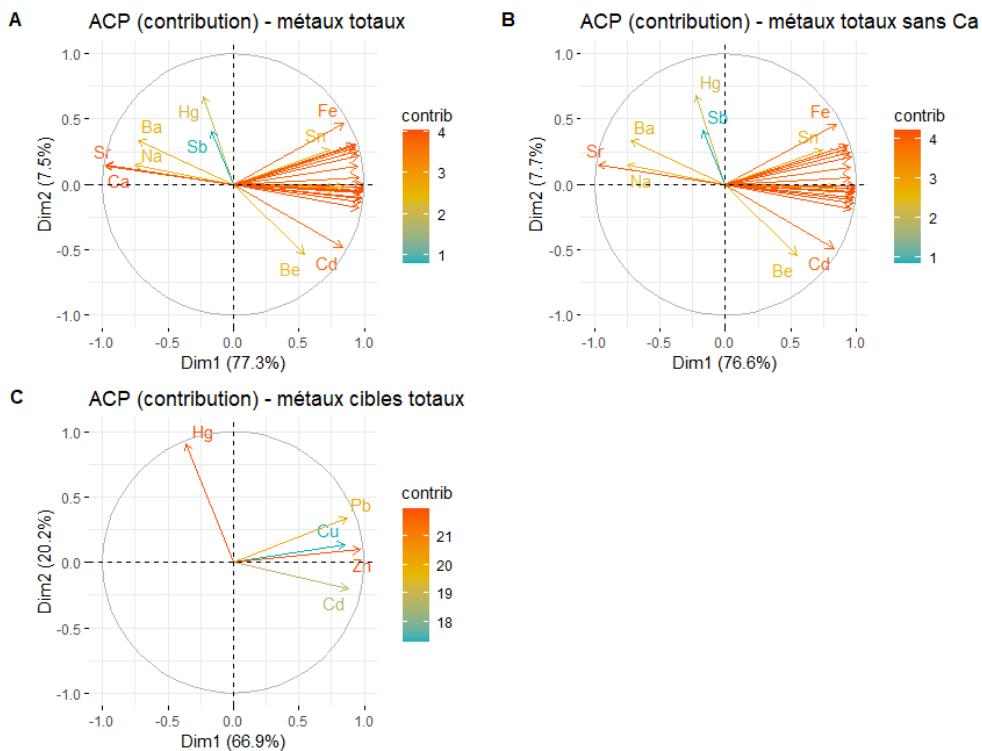


5.8 Annexe F : études des corrélations entre les indices de condition

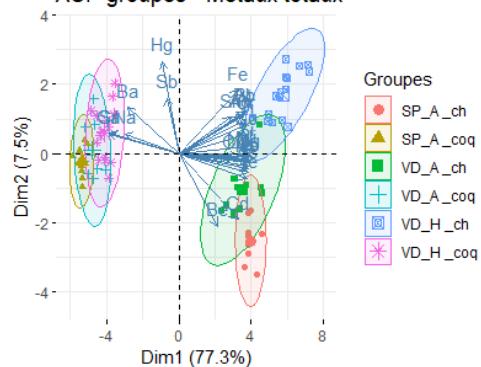




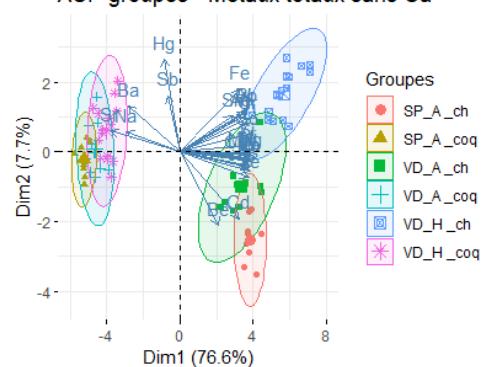
5.9 Annexe G : résultats de l'ACP pour tous les groupements de métaux.



A ACP groupes - Métaux totaux



B ACP groupes - Métaux totaux sans Ca



C ACP groupes - Métaux cibles totaux

