

Centre Eau Environnement

**Transfert trophique du Cd d'un biofilm de rivière à un gastéropode  
d'eau douce et évaluation des effets par une approche multimarqueur**

Par

**Marie Bonnet**

Mémoire présenté(e) pour l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M.Sc.)  
en sciences de l'eau

**Jury d'évaluation**

Président du jury et  
examinateur interne

Patrice Couture  
INRS-ETE

Examinatrice externe

Maeva Giraudo  
Division de la Recherche sur les  
Contaminants Aquatiques  
Environnement et Changement Climatique  
Canada

Examinatrice externe

Floriane Larras  
Université Lyon 1 et INRAE-Lyon  
Lyon, France

Directeurs de recherche

Isabelle Lavoie  
INRS-ETE

Patrice Gonzalez  
UMR CNRS 5805 EPOC, Université de  
Bordeaux, France

Codirecteur de recherche

Claude Fortin  
INRS-ETE

## REMERCIEMENTS

---

Tout d'abord, merci à Nathalie Geneste, Agnès Feurtet-Mazel, Isabelle Lavoie, Patrice Gonzalez et Claude Fortin de m'avoir accordé leur confiance pour ces deux années de biddiplomation.

Merci à Isabelle Lavoie, Claude Fortin et Patrice Gonzalez, mes encadrants à Québec et en France, pour m'avoir épaulée et guidée pendant ces très belles années d'étude.

Un merci tout particulier à Mariem Fadhlaoui et Maeliss Couturier pour leur aide, leurs conseils et leur patience. Merci d'avoir pris le temps de me former et me guider avec tant de gentillesse et d'encouragements.

Je tiens également à remercier Jérôme Cachot, Patrice Couture, Maeva Giraudo et Floriane Larras pour leur évaluation et leurs corrections. Leurs remarques et suggestions ont permis de faire avancer le projet et d'améliorer ce mémoire.

Un grand merci à tous les membres des différentes équipes pour leur aide et leur bonne humeur. Quel que soit le continent, j'ai pu profiter de votre esprit de collaboration et d'entraide. Et, quels que soient le temps et la température extérieure, vous avez toujours répondu présent aux pauses glaces.

## RÉSUMÉ

---

Les biofilms sont à la base de la chaîne alimentaire aquatique dans plusieurs milieux et produisent l'énergie primaire transférée vers les niveaux trophiques supérieurs. Un stress environnemental peut affecter la qualité nutritive des biofilms, ce qui peut ensuite entraîner des répercussions sur les niveaux trophiques supérieurs. Puisque les acides gras (AG) sont essentiels au fonctionnement métabolique des organismes (réserves énergétiques, constituants membranaires, hormones, etc.), une modification de leurs profils à la base de la chaîne alimentaire peut influencer la dynamique d'un écosystème.

L'objectif de ce projet était de déterminer les effets d'une contamination métallique sur la qualité nutritive des biofilms et leurs répercussions sur un consommateur primaire. Pour cela, les profils en AG, la bioaccumulation de métal et le niveau d'expression de gènes de réponse au stress et de détoxification ont été analysés pour le biofilm et un consommateur primaire. Des biofilms, cultivés en mésocosme, ont servi de source d'alimentation pour des escargots d'eau douce afin d'étudier les effets d'une nourriture altérée/contaminée sur un consommateur primaire.

Mots-clés : Transfert trophique, cadmium, gastéropodes, biofilm, acides gras, transcriptomique, bioaccumulation

## ABSTRACT

---

Biofilms are at the base of the aquatic food chain and produce the primary energy transferred to higher trophic levels. Environmental stresses can affect the nutritional quality of biofilms, which can then have an impact on higher trophic levels. Because fatty acids (FA) are essential for the metabolic functioning of organisms (energy reserves, membrane components, hormones, etc.), a modification in their profiles at the base of the food chain can influence the dynamics of an ecosystem.

The objective of this project was to determine the effects of metal contamination on the nutritional quality of biofilms and its subsequent impact on a primary consumer. For this purpose, FA profiles, bioaccumulation, expression level of stress response and detoxification genes were analyzed in biofilms and in snails. Biofilms cultured in mesocosms were used as the food source for snails with the purpose of studying the effects of an altered/contaminated food source on primary consumers.

Keywords : trophic transfer, cadmium, gastropods, biofilms, fatty acids, transcriptomics, bioaccumulation

# TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	II
RÉSUMÉ.....	III
ABSTRACT.....	IV
TABLE DES MATIÈRES .....	V
LISTE DES FIGURES.....	VII
LISTE DES TABLEAUX .....	IX
LISTE DES ÉQUATIONS .....	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	XI
<b>1 CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE, OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES.....</b>	<b>1</b>
1.1 CONTAMINATIONS METALLIQUES.....	1
1.1.1 <i>Le cadmium</i> .....	2
1.1.2 <i>Biodisponibilité des métaux</i> .....	4
1.1.3 <i>Devenir des métaux dans l'organisme</i> .....	6
1.1.4 <i>Toxicité du cadmium</i> .....	7
1.2 MODELES EXPERIMENTAUX .....	10
1.2.1 <i>Biofilm</i> .....	10
1.2.2 <i>Consommateurs primaires</i> .....	12
1.2.3 <i>Transfert trophique</i> .....	15
1.3 BIOMARQUEURS ETUDIÉS.....	16
1.3.1 <i>La bioaccumulation</i> .....	16
1.3.2 <i>La transcription de gènes</i> .....	18
1.3.3 <i>Les acides gras</i> .....	19
1.4 OBJECTIFS ET HYPOTHESES DE RECHERCHE .....	23
<b>2 CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>25</b>
2.1 DEMARCHE EXPERIMENTALE .....	25
2.2 TEST PRELIMINAIRE D'EXPOSITION DES ESCARGOTS AU CADMIUM.....	25
2.2.1 <i>Exposition des escargots</i> .....	25
2.2.2 <i>Résultats des tests d'exposition</i> .....	26
2.3 EXPOSITION DU BIOFILM AU CADMIUM .....	27
2.4 EXPERIENCE DE TRANSFERT TROPHIQUE DU CD.....	30
2.5 ANALYSES DES ECHANTILLONS .....	32
2.5.1 <i>Dosage du Cd dans l'eau par ICP-MS</i> .....	32
2.5.2 <i>Digestion et dosage du Cd dans les biofilms et les escargots</i> .....	32
2.5.3 <i>Analyses des acides gras</i> .....	33
2.5.1 <i>Détermination des gènes d'études pour le biofilm</i> .....	34
2.5.2 <i>Taxonomie moléculaire</i> .....	35
2.5.3 <i>Détermination des gènes d'études pour les escargots</i> .....	36
2.5.4 <i>Extraction de l'ARN-Escargots</i> .....	40
2.5.5 <i>Extraction de l'ARN-Biofilm</i> .....	41

2.5.6	<i>Transcription inverse</i> .....	41
2.5.7	<i>Amplification par PCR classique</i> .....	41
2.5.8	<i>Migration sur gel</i> .....	42
2.5.9	<i>Clonage — plasmide pGEM®-T Vector</i> .....	42
2.5.10	<i>Transformation bactérienne</i> .....	43
2.5.11	<i>Extraction sur gel des produits PCR</i> .....	44
2.5.12	<i>qPCR</i> .....	44
2.6	TRAITEMENTS STATISTIQUES.....	45
<b>3</b>	<b>CHAPITRE 3 : TEST PRÉLIMINAIRE POUR LE CHOIX DU MÉTAL D'EXPOSITION (NI)</b> .....	<b>47</b>
3.1	EXPOSITION DES ESCARGOTS AU NICKEL DE 10 A 70 µM.....	47
3.2	RESULTATS.....	47
3.3	DISCUSSION.....	50
<b>4</b>	<b>CHAPITRE 4 : EXPOSITION DU BIOFILM AU CADMIUM</b> .....	<b>53</b>
4.1	RESULTATS.....	53
4.1.1	<i>Concentration de Cd dans l'eau</i> .....	53
4.1.2	<i>Bioaccumulation</i> .....	53
4.1.3	<i>Analyse des acides gras</i> .....	54
4.1.4	<i>Étude transcriptionnelle</i> .....	56
4.2	DISCUSSION.....	57
4.2.1	<i>Bioaccumulation</i> .....	57
4.2.2	<i>Les profils en acides gras</i> .....	58
4.2.3	<i>Étude transcriptionnelle</i> .....	62
<b>5</b>	<b>CHAPITRE 5 : TRANSFERT TROPHIQUE</b> .....	<b>65</b>
5.1	RESULTATS.....	65
5.1.1	<i>Concentration du Cd dans l'eau</i> .....	65
5.1.2	<i>Suivi des escargots</i> .....	66
5.1.3	<i>Bioaccumulation</i> .....	66
5.1.1	<i>Analyse des acides gras</i> .....	67
5.1.2	<i>Étude transcriptionnelle</i> .....	71
5.2	DISCUSSION.....	72
5.2.1	<i>Bioaccumulation</i> .....	72
5.2.2	<i>Étude transcriptionnelle</i> .....	78
5.2.3	<i>Profils en acide gras des escargots</i> .....	79
<b>6</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>85</b>

## LISTE DES FIGURES

---

FIGURE 1 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DES ORDRES DE GRANDEUR DES CONCENTRATIONS EN METAUX TRACES DANS LES RIVIERES DU MONDE (GAILLARDET ET AL., 2003).....	3
FIGURE 2 : PRISE EN CHARGE DES METAUX PAR LES ORGANISMES AQUATIQUES I) TRANSPORT FACILITE DE CATIONS ; II) TRANSPORT ACCIDENTEL DE CATIONS LIES A DES ANIONS ; III) DIFFUSION PASSIVE DE COMPLEXES METALLIQUES LIPOPHILES (CAMPBELL ET AL., 2004).....	5
FIGURE 3 : DISTRIBUTION DE LA SENSIBILITE DES ESPECES (SSD) LORS D'EXPOSITIONS CHRONIQUES AU CADMIUM DANS L'EAU DOUCE EN UTILISANT UN MODELE LOG-LOGISTIQUE ET LES DONNEES DE TOXICITE CHRONIQUE DE 36 ESPECES AQUATIQUES (CCME, 2014). ....	8
FIGURE 4 : SCHEMA DE LA CHAINE D'ELECTRONS MITOCHONDRIALE ET EFFET DU Cd (WANG ET AL., 2008).....	10
FIGURE 5 : LE ROLE DES MACROINVERTEBRES BENTHIQUES DANS LE CYCLE DES NUTRIMENTS ET LE CONTROLE DES FLUX DE NUTRIMENTS DANS LES ECOSYSTEMES AQUATIQUES D'APRES COVICH ET AL. (1999). ....	13
FIGURE 6 : SCHEMA DE LA GESTION DU Cd CHEZ LE GASTEROPODE <i>L. LITTOREA</i> (MARIGOMEZ ET AL., 2002). ...	15
FIGURE 7 : LES PRINCIPAUX ACIDES GRAS (AG) ET LES BIOMARQUEURS POTENTIELS POUR CHAQUE CLASSE D'ALGUES IDENTIFIEE DANS L'ETUDE TAIPALE ET AL (2013). ....	20
FIGURE 8 : SCHEMA ET PHOTOS DU DESIGN EXPERIMENTAL DE L'EXPOSITION DU BIOFILM AU Cd.....	28
FIGURE 9 : SCHEMA ET PHOTOS DU DESIGN EXPERIMENTAL DE L'EXPOSITION DES ESCARGOTS SUR 21 JOURS. .	31
FIGURE 10 : ALIGNEMENT DE SEQUENCE ET CHOIX D'AMORCES DANS DES REGIONS CONSERVEES.....	37
FIGURE 11 : SCHEMA DU PLASMIDE pGEM-T FONCTIONNEL. ....	43
FIGURE 12 : POURCENTAGES DE SURVIE DES ESCARGOTS EN REPONSE A UNE EXPOSITION AU Ni EN MICROCOSMES EN FONCTION DU TEMPS.....	48
FIGURE 13 : : POURCENTAGE DE SURVIE DES ESCARGOTS A 96 H EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN Ni ( $R^2 = 0,98$ ET ERREUR STANDARD = 11,6). ....	49
FIGURE 14 : RESUME DES NOEC OU CE10 EN $\mu\text{G Ni/L}$ REPERTORIES POUR DIFFERENTES ESPECES (EUROPEAN UNION RISK ASSESSMENT REPORT - ECHA, 2008). ....	50
FIGURE 15 : CONCENTRATION MOYENNE $\pm$ ERREUR TYPE DE Cd (NMOL/G PS DE BIOFILM) SELON LES CONDITIONS D'EXPOSITION DU BIOFILM SUR 28 JOURS. LES LETTRES A ET B REPRESENTENT LA DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ( $P \leq 0,05$ ) DE CONCENTRATION EN Cd EXISTANT ENTRE LE BIOFILM DE LA CONDITION TEMOIN ET CONTAMINE AU Cd (TEST DE STUDENT). ....	54
FIGURE 16 : VOIE DE BIOSYNTHESE DES AGPI CHEZ LES ORGANISMES CHLOROPHYLLIENS, MODIFIEE D'APRES MONROIG ET AL. (2018). LES FLECHES REPRESENTENT UNE DIMINUTION OU UNE AUGMENTATION DE L'INDICE	

D'ACTIVITE DES ENZYMES (RAPPORT PRODUIT/SUBSTRAT). LES ASTERISQUES REPRESENTENT LES MODIFICATIONS DE POURCENTAGE EN AG SIGNIFICATIVES.....	60
FIGURE 17 : CONCENTRATION MOYENNE $\pm$ ERREUR TYPE SUR 21 JOURS DE Cd (NM) DANS L'EAU DES MICROCOSMES SELON LES CONDITIONS D'EXPOSITION DES ESCARGOTS. LES LETTRES A ET B REPRESENTENT LES DIFFERENCES SIGNIFICATIVES EXISTANTES ENTRE LES DIFFERENCES CONDITIONS (ANOVA A 2 FACTEURS SUIVIS D'UN TEST DE TUKEY). .....	65
FIGURE 18 : CONCENTRATION DE Cd $\pm$ ERREUR TYPE (NMOL/G PS D'ESCARGOT) SELON LES CONDITIONS D'EXPOSITION DES ESCARGOTS SUR 21 J. LES LETTRES A, B, C, REPRESENTENT LES DIFFERENCES SIGNIFICATIVES EXISTANTES ENTRE LES DIFFERENCES CONDITIONS (ANOVA A 2 FACTEURS SUIVIS D'UN TEST DE TUKEY.) .....	67
FIGURE 19 : ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE SUR LES CATEGORIES AGS, AGMI, AGPI, OMEGA 3, OMEGA 6 ET LE RATIO OMEGA 3/OMEGA 6.....	70
FIGURE 20 : FACTEURS POUVANT JOUER SUR LA BIOACCUMULATION DE Cd DANS NOTRE EXPERIMENTATION. ....	74
FIGURE 21 : EFFICACITE D'ASSIMILATION DE DIFFERENTS ELEMENTS PAR DES COPEPODES EN FONCTION DU POURCENTAGE DE CES ELEMENTS TROUVES DANS LES CYTOPLASMES DES DIATOMEES (QUI ONT SERVI DE NOURRITURE AUX COPEPODES)(REINFELDER ET FISHER, 1991). .....	76
FIGURE 22 : REPRESENTATIONS DES DIFFERENTES FRACTIONS SUBCELLULAIRES OU PEUVENT ETRE RETROUVES LES METAUX ACCUMULES PAR LES ORGANISMES ET DES MODELES D'ACCESSIBILITE TROPHIQUES DES ELEMENTS DANS CES FRACTIONS (RAINBOW ET AL., 2011). A = MODELE DE FRACTIONNEMENT DU METAL EN CINQ COMPOSANTES D'APRES WALLACE ET AL., 2003 ; B = MODELE D'ACCESSIBILITE TROPHIQUE DU METAL D'APRES REINFELDER ET FISHER (1991) ; C = MODELE D'ACCESSIBILITE TROPHIQUE PROPOSE PAR WALLACE ET LUOMA (2003). .....	77

## LISTE DES TABLEAUX

---

TABLEAU 1 : QUELQUES EXEMPLES DE NIVEAU DE BIOACCUMULATION DE Cd CHEZ LES GASTEROPODES. PS : POIDS SEC. ....	17
TABLEAU 2 : PROFILS EN ACIDES GRAS DE DIFFERENTES ESPECES DE GASTEROPODES.....	22
TABLEAU 3 : REAJUSTEMENT DES CONCENTRATIONS EN Cd DANS LES BACS DE CULTURE DE BIOFILM CONTAMINES AU Cd.....	29
TABLEAU 4 : AMORCES UTILISEES POUR LES ANALYSES TRANSCRIPTIONNELLES SUR LE BIOFILM. ....	35
TABLEAU 5 : RECHERCHE D'HOMOLOGIE SUR LES ECHANTILLONS D'ESCARGOTS.....	36
TABLEAU 6 : AMORCES POUR LA qPCR ACQUISE AVEC LE LOGICIEL PRIMER3PLUS POUR L'ANALYSE TRANSCRIPTIONNELLE CHEZ LES ESCARGOTS.....	39
TABLEAU 7 : POURCENTAGES MOYENS (N = 6) ± ERREUR TYPE DES ACIDES GRAS ANALYSES PAR CG-FID SELON LES CONDITIONS D'EXPOSITIONS DU BIOFILM SUR 28 JOURS. LES ACIDES GRAS PRESENTANT DES VALEURS SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTES (TEST DE STUDENT) DU TEMOIN SONT INDiques EN ROUGE.....	55
TABLEAU 8 : POURCENTAGES MOYENS ± ERREUR TYPE DES CLASSES D'ACIDES GRAS ANALYSES SELON LES CONDITIONS D'EXPOSITIONS DU BIOFILM SUR 28 J ET LES P-VALUE ASSOCIEES AUX TESTS DE STUDENT EFFECTUES. LES CATEGORIES PRESENTANT DES VALEURS SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTES PAR RAPPORT AU TEMOIN SONT INDiqueES EN ROUGE. ....	56
TABLEAU 9 : NIVEAU D'EXPRESSION DIFFERENTIELLE DES GENES ETUDIES CHEZ LE BIOFILM APRES UNE EXPOSITION DE 21 J AU Cd. LES RESULTATS SONT EXPRIMES SOUS FORME DE FACTEUR D'INDUCTION PAR RAPPORT A LA CONDITION TEMOIN.....	57
TABLEAU 10 : POURCENTAGES MOYENS (N = 6) DES ACIDES GRAS ± ERREUR TYPE SELON LES CONDITIONS D'EXPOSITIONS DES ESCARGOTS SUR 21 JOURS. LES ACIDES GRAS POUR LESQUELS UN DES FACTEURS DE L'ANOVA A UNE INFLUENCE SIGNIFICATIVE SONT INDiques EN ROUGE. LES LETTRES A ET B REPRESENTENT LES DIFFERENCES SIGNIFICATIVES EXISTANTES ENTRE LES DIFFERENCES CONDITIONS (TEST DE TUKEY).....	68
TABLEAU 11 : POURCENTAGES MOYENS DES DIFFERENTES CLASSES D'ACIDES GRAS DES ESCARGOTS SELON LES CONDITIONS. LES CATEGORIES POUR LESQUELLES UN DES FACTEURS DE L'ANOVA A UNE INFLUENCE SIGNIFICATIVE SONT INDiqueES EN ROUGE. LES LETTRES A ET B REPRESENTENT LES DIFFERENCES SIGNIFICATIVES EXISTANTES ENTRE LES DIFFERENCES CONDITIONS (TEST DE TUKEY).....	69
TABLEAU 12 : NIVEAU D'EXPRESSION DIFFERENTIELLE DES GENES ETUDIES CHEZ LES ESCARGOTS D'EAU DOUCE APRES UNE EXPOSITION DE 21 J AU Cd. LES RESULTATS SONT EXPRIMES SOUS FORME DE FACTEUR D'INDUCTION PAR RAPPORT A LA CONDITION TEMOIN. LES FACTEURS D'INDUCTION PRESENTANT DES VALEURS SIGNIFICATIVEMENT DIFFERENTES DE LA CONDITION TEMOIN SONT INDiques EN ROUGE .....	71

## LISTE DES ÉQUATIONS

---

ÉQUATION 1 : INTERACTION DE $M^{z+}$ ET DU LIGAND A LA SURFACE DE LA CELLULE. ....	4
ÉQUATION 2 : INTERACTION DE M-L ET DU LIGAND A LA SURFACE DE LA CELLULE.....	4
ÉQUATION 3 : INTERACTION DE ML ET DU LIGAND A LA SURFACE DE LA CELLULE.....	4
ÉQUATION 4 : CALCUL DE REAJUSTEMENT DES CONCENTRATIONS EN Cd DANS LES MESOCOSMES (BIOFILMS)...	28
ÉQUATION 5 : CALCUL DE LA DIFFERENCE ENTRE POINTS DE DEPASSEMENT (Ct) DES GENES D'INTERET ET DES GENES REFERENCES.....	45
ÉQUATION 6 : CALCUL DU FACTEUR D'INDUCTION D'UN GENE D'INTERET.....	45
ÉQUATION 7 : DETERMINATION DU POURCENTAGE DE SURVIE DES ESCARGOTS. ....	48

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

AGI : Acide gras insaturé

AGMS : Acide gras mono-insaturé

AGPI : Acide gras polyinsaturé

AGS : Acide gras saturé

MT : Métallothionéine

Ni : Nickel

Cd : Cadmium

BLM : *Modèle du ligand biotique*

FIAM : *Modèle de l'ion libre*

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

CE50 : Concentration efficace à 50 %

CE10 : Concentration efficace à 10 %

CE20 : Concentration efficace à 20 %

CL50 : Concentration létale à 50 %

IDEC : Indice diatomées de l'est du Canada

ICP-MS : Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif

PCR : *Réaction de polymérisation en chaîne*

MDA : Malondialdéhyde

PS : Poids sec

# 1 CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE, OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

---

## 1.1 Contaminations métalliques

La définition d'un contaminant donné par l'Office québécois de la langue française, (2002) est la suivante : un élément (matière solide, liquide ou gazeuse, une radiation, un son, une vibration, une chaleur ou une odeur) susceptible de nuire à la santé des êtres vivants ou d'altérer la qualité de l'environnement. Le devenir des contaminants dans un écosystème dépend de leurs transport, distribution, spéciation et dégradation (Walker et al., 2012). Parmi les nombreux contaminants retrouvés dans l'environnement, les métaux, éléments présents sur la terre depuis sa formation, ne subissent pas de processus de formation ou de biodégradation, mais sont sujets à des processus d'érosion, de transport et de changement de formes chimiques (défini sous le terme de spéciation chimique). Les trois réservoirs naturels de métaux que sont la géosphère, l'atmosphère et l'hydrosphère interagissent entre eux et assurent le transport des métaux dans l'environnement. Le rejet des métaux dans l'atmosphère, suivi de leur transport sur de longues distances par le vent et ensuite de dépôts par retombées atmosphériques (déposition sèche ou précipitation), confère une dimension globale au problème de contamination des écosystèmes par les métaux (Walker et al., 2012).

Il existe quelques cas de contamination résultant de processus naturels (ex., activité volcanique, altération naturelle des roches), mais la majeure partie vient de l'activité humaine. En effet, les propriétés des métaux (bons conducteurs de chaleur et d'électricité se combinant aisément avec d'autres éléments pour former des alliages) font de ceux-ci une ressource exploitée à grande échelle depuis le début de l'âge industriel. Parmi les activités industrielles métallurgiques, les extractions minières ont joué un rôle déterminant dans la pollution atmosphérique. En France, l'activité minière, ayant atteint son apogée entre 1945 et 1975, a marqué le territoire de contaminations aquatiques locales plus ou moins importantes. Par exemple l'étude de Blanc et al, (2007), réalisée de 1990 à 1999, a permis d'estimer que 70 à 80 % (7-8 t/an) du Cd transporté par la Garonne proviennent d'apports anthropogéniques dont la majorité (5-6 t/an) dérive du bassin de Decazeville (qui possède une zone minière) via l'affluent Riou-Mort (France). Dans l'étude de Arini (2011), réalisée dans la même région entre 2008 et 2009, les concentrations en Cd retrouvées sont de  $0,04 \pm 0,03 \mu\text{M}$  à  $0,20 \pm 0,01 \mu\text{M}$  et dépassent les seuils fixés par les normes environnementales françaises (d'après l'agence de l'eau Adour-Garonne, des eaux dont

les concentrations en Cd dépassent 0,27  $\mu\text{M}$  sont qualifiées comme étant de mauvaise qualité). Que ce soit dû aux rejets directs des effluents industriels ou aux retombées métalliques atmosphériques (fumées ou aérosols), l'effet visible sur l'environnement et la santé a permis d'alerter la communauté scientifique et d'inciter au développement de recherches scientifiques, notamment en chimie de l'environnement, afin de cerner le comportement des métaux dans l'environnement (flux entre compartiments, spéciation, interaction avec la biosphère, etc.).

Les métaux traces sont caractérisés par leur concentration inférieure à 8,89  $\mu\text{M}$  dans les eaux naturelles (Walker et al., 2012). La biogéochimie des éléments traces reçoit un intérêt croissant, entre autres suite aux progrès techniques (apparition de la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) au début des années 90), redéfinissant ainsi les seuils de détection des métaux dans l'environnement. Bien que présents en très faibles concentrations dans l'environnement, les métaux traces représentent parfois une menace pour les systèmes biologiques. En effet, certains éléments ne sont pas essentiels aux organismes ou peuvent avoir un seuil biologique, engendrant ainsi des perturbations lorsqu'ils atteignent des concentrations au-delà de ces seuils (Walker et al., 2012).

### 1.1.1 Le cadmium

Le Cd fait partie de la classe II B de la classification périodique. Si les rejets atmosphériques du Cd peuvent être naturels (dispersion des particules de la croûte terrestre, feu de forêt, éruption volcanique), les principales sources recensées dans la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement (Liste des substances d'intérêt prioritaire, rapport d'évaluation, Le cadmium et ses composés, 1994)* (Gouvernement du Canada, 1994) sont d'origine anthropique, telles que l'activité métallurgique, l'élimination des déchets solides et l'épandage des boues d'épuration. Le Cd est largement utilisé dans les piles, les conducteurs électriques, les alliages, les pigments et les stabilisants pour plastiques. Le gouvernement canadien fournit des données sur les rejets de Cd dans l'eau, permettant ainsi d'avoir une idée des différentes sources de rejet. Entre 2013 et 2016, on peut ainsi distinguer trois sources principales : le traitement des eaux usées et la gestion des déchets, l'industrie des pâtes et papiers et enfin l'industrie de la fonte et de l'affinage de métaux non ferreux. Ces secteurs représentaient à eux seuls 91 % (2 259 kg) des rejets de Cd dans l'eau au Canada en 2016 (Environnement et Changement climatique Canada, 2018).

Une base de données des éléments traces, compilée par Gaillardet et al. (2004), donne une représentation des concentrations dissoutes de Cd dans l'eau des grands fleuves du monde (Figure 1). Selon ces auteurs, la concentration en Cd dans les eaux de surface du Canada,

notamment dans les grands fleuves, varie entre 0,09 et 0,81 nM. En Europe, les concentrations atteignent 0,53 nM dans la Seine (France) et grimpent jusqu'à 3,74 nM dans la rivière Harz Mountains (Allemagne). En France, l'exploitation de zinc a conduit à une contamination sévère en Cd des eaux et des sédiments de la Garonne et de ses affluents (Riou-Mort et Lot), mais également de l'estuaire de la Gironde. Trente ans après l'arrêt des activités minières, les concentrations en Cd dans les affluents de la Garonne restent élevées atteignant la centaine de nM (Arini, 2011). Les gouvernements canadien et français ont fixé la concentration maximale acceptable de Cd dans l'eau potable à 50 nM (Tisisier et al., 2005 ; Gouvernement du Canada et al., 1994). Le Cd est considéré comme un métal non essentiel et aucun rôle métabolique ne lui est connu sauf quelques exceptions. En effet Lane et Morel (2000) ont montré que l'ajout de Cd (gamme de concentration comprise entre 7,5 et 45 pM) dans des cultures de diatomées marines de *Thalassiosira weissflogii* (en condition limitante en Zn et à faible pCO<sub>2</sub>) permettait d'améliorer le taux de croissance. Le rapport *Liste des substances d'intérêt prioritaire, rapport d'évaluation, Le cadmium et ses composés* (Gouvernement du Canada, 1994) fournit des exemples d'études de toxicité du Cd réalisées sur plusieurs espèces (terrestres, marines et dulcicoles), le classant ainsi sixième sur la liste des déchets dangereux prioritaires de l'Union européenne selon la directive 2008/105/CE. Il fait également partie des substances prioritaires classées par le gouvernement du Canada (Gouvernement du Canada, 1994).

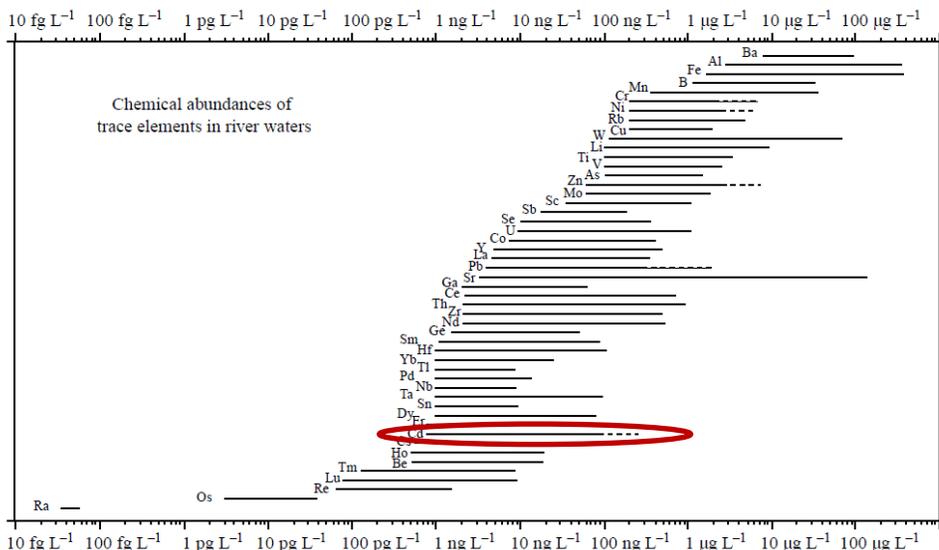
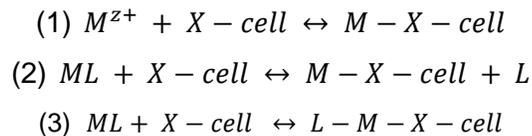


Figure 1 : Représentation graphique des ordres de grandeur des concentrations en métaux traces dans les rivières du monde (Gaillardet et al., 2003).

### 1.1.2 Biodisponibilité des métaux

Une substance présente dans l'environnement et détectée dans un organisme vivant (entier ou dans ses tissus) peut être qualifiée de biodisponible. La biodisponibilité d'un métal, sous une ou plusieurs formes (dissoute, particulaire), est sa capacité à accéder, à interagir (complexation du métal à des sites membranaires) et à traverser les barrières biologiques (Campbell et al., 2004). Le métal dissous sous forme ionique peut former des complexes avec de nombreux ligands inorganiques et organiques en solution. Les métaux dissous sont également en contact avec les sédiments et la matière en suspension, qui agissent comme des surfaces d'échange (Arini, 2011). Le modèle de l'ion libre (Free Ion Activity Model (FIAM)) définit en quatre étapes ce processus : (1) la diffusion du métal de la solution vers la surface biologique et (2) la diffusion du métal au travers de la couche protectrice externe. Lors de ces deux premières étapes, le métal peut être sous forme libre :  $M^{z+}$  ou lié à un ligand (ML). Lors de la troisième étape d'interaction métal-organisme, le processus d'interaction est rapide et engendre la formation d'un complexe de surface noté M-X (3), selon les équations suivantes :



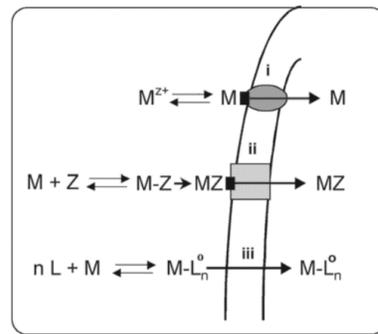
**Équation 1 : Interaction de  $M^{z+}$  et du ligand à la surface de la cellule.**

**Équation 2 : Interaction de M-L et du ligand à la surface de la cellule.**

**Équation 3 : Interaction de ML et du ligand à la surface de la cellule.**

où  $M^{z+}$  = métal libre en solution et — X-cell = ligand de la membrane cellulaire et L = ligand en solution et ML = le complexe métal-ligand en solution. Le modèle de l'ion libre pose l'hypothèse qu'à facteurs constants (pH, dureté), les interactions métal-sites membranaires dépendraient principalement de sa forme libre [ $M^{z+}$ ] (Campbell et al., 2002 ; Campbell, 1995). La dernière étape du FIAM est l'entrée du métal dans l'organisme (4). L'entrée du métal peut se faire directement (traversée de la bicouche membranaire en contact avec le milieu d'exposition) ou indirectement par l'intermédiaire de particules ingérées (alimentaire ou non). Les mécanismes de transfert des métaux essentiels ou non sont nombreux. Lorsque l'entrée du métal se réalise par transporteur

cationique, le modèle de l'ion libre peut s'appliquer. La figure 2 schématise les principales voies d'entrées des métaux qui peuvent être des transports facilités de cations ; des transports accidentels de cations liés à des anions ou des diffusions passives de complexes métalliques lipophiles (Campbell et al., 2004).



i) transport facilité de cations ; ii) transport accidentel de cations liés à des anions ;  
iii) diffusion passive de complexes métalliques lipophiles.

**Figure 2 : Prise en charge des métaux par les organismes aquatiques i) transport facilité de cations ; ii) transport accidentel de cations liés à des anions ; iii) diffusion passive de complexes métalliques lipophiles (Campbell et al., 2004).**

De façon générale, l'accumulation d'un métal sera donc liée à la concentration de métal libre en solution. Cependant, il existe certaines exceptions à cette règle. À titre d'exemple, dans l'étude de Campbell et al. (2002), pour deux milieux d'exposition contenant la même concentration en  $Cd^{2+}$ , mais contenant des ligands différents (du nitrilotriacétate ou de l'alanine), la toxicité était différente. En effet, en présence d'alanine, la toxicité du Cd sur la croissance de *Pseudokirchneriella subcapitata* était augmentée. Cette augmentation n'a toutefois pu être corrélée à une augmentation de l'internalisation du Cd chez les algues cultivées dans les milieux contenant l'alanine. Leur conclusion est que le Cd peut induire une toxicité en se fixant aux parois des cellules en formant un complexe membranaire à différencier du complexe M-X-cell du FIAM.

Des études de cinétique d'internalisation de Cd chez *C. reinhardtii* en présence d'autres métaux ont montré que le zinc et le calcium influencent la quantité de Cd internalisée. En effet, les auteurs ont observé une diminution de Cd internalisé lorsque la concentration de Zn et Ca dans les milieux de culture ont été augmentés (Lavoie et al., 2012, 2014). Dans leurs études, Roesijadi et Unger (1993) ont montré que chez l'huître *Crassostrea virginica*, l'inhibition des pompes calciques engendre une forte diminution de Cd internalisé. L'utilisation des pompes calciques serait une

voie d'entrée majeure du Cd chez cette espèce. Il a été montré que, de façon générale chez les mollusques, l'entrée des métaux se réalisait préférentiellement dans certains tissus :

- Via les branchies par canaux calciques comme reportés dans l'étude sur l'huître *C. virginica* (Roesijadi et Unger, 1993).
- Via l'intestin par ingestion de nourriture contaminée puis absorption par la glande digestive (Hobden, 1967).
- Via l'épithélium de surface en particulier au niveau du pied, qui possède un système d'irrigation performant comparable à un système circulatoire fermé (Ireland, 1981).

### 1.1.3 Devenir des métaux dans l'organisme

Le devenir d'un métal dans l'organisme dépend de quatre processus biologiques : l'absorption, la distribution, la biotransformation et l'excrétion. En milieu aquatique, il existe deux voies principales de contamination. La voie directe via l'eau et la voie trophique via l'alimentation. Chez les mollusques, l'élimination des métaux se fait essentiellement par voie rénale et digestive, mais également par diapédèse à travers l'épithélium du manteau (Marigómez et al., 2002).

- 1- Les organismes possèdent plusieurs mécanismes de détoxification des métaux. La liaison des métaux à des ligands cellulaires peut permettre leur gestion. L'affinité des métaux pour les différentes classes de ligands cellulaires dépend principalement de leurs caractéristiques physico-chimiques. Les processus suivants impliquent la gestion des métaux via leurs interactions avec des ligands cellulaires. Les métallothionéines (MT) et les phytochélatines : Les MT sont des protéines non enzymatiques ubiquitaires, riches en résidus cystéines, capables de fixer différents métaux chez les animaux. Leurs fonctions connues dans l'organisme incluent un rôle de maintien de l'homéostasie des métaux essentiels (ex., Cu, Zn), ainsi qu'une protection en cas de stress métallique (Capdevila et al., 2012). En effet, l'efficacité des MT dans la régulation des métaux non essentiels chez les invertébrés a été mise en évidence dans de nombreuses études (Amiard et al., 2006 ; Chabicozsky et al., 2003 ; Leung et al., 2003 ; Viarengo et Nott, 1993 ; Li et al., 2015). Par exemple, Ng et al. (2007) ont montré une corrélation entre l'accumulation de Cd et l'augmentation de la production de MT dans les branchies et dans le manteau des moules (*Perna viridis*) après traitement au Cd (exposition d'une semaine à une gamme croissante en Cd de 0,045 à 1,78 nM). La fixation des métaux se fait via les résidus cystéines de la protéine répartis au sein de deux domaines ;  $\alpha$  et  $\beta$ . Chez les plantes, ce rôle protecteur est assuré par les

phytochélatines qui sont de petits polypeptides intracellulaires pouvant lier les métaux à l'intérieur de la cellule (Lavoie et al., 2009 ; Le Faucheur et al., 2005 ; Cobbett, 2000).

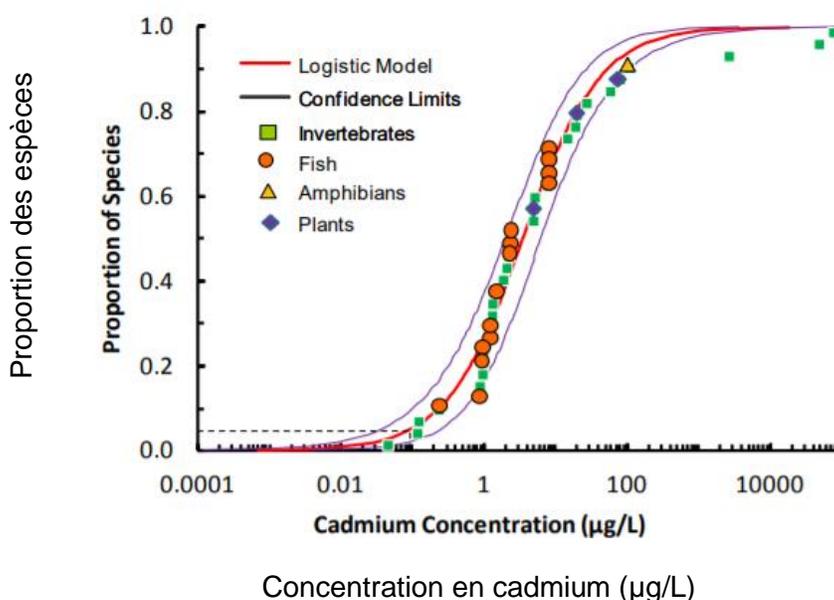
- 2- Les lysosomes : organites cellulaires possédant des enzymes hydrolytiques. Il a été montré qu'ils peuvent être impliqués dans le mécanisme de séquestration des métaux chez les invertébrés (Viarengo et Nott, 1993).
- 3- Les concrétions intracellulaires : inclusions cellulaires où sont stockés des composés inorganiques tels que les métaux. Il a été montré que ce mécanisme pouvait être prédominant chez certaines espèces, comme le gastéropode *Helix aspersa*, dont la nourriture a été pulvérisée avec une solution de 50 mM de  $MnCl_2$  sur une période de deux semaines et dont des concrétions cellulaires contenant des particules inorganiques ont pu être observées au niveau de la glande digestive (Greaves et al., 1984).

Tous ces mécanismes de détoxification peuvent cependant atteindre des limites lors d'exposition à de fortes concentrations, comme il a été montré pour le taux de synthèse et de fixation des métaux aux métallothionéines (Ng et al., 2007).

#### **1.1.4 Toxicité du cadmium**

Les effets inhibiteurs du Cd sur la croissance, le développement et la survie des organismes aquatiques (gastéropodes et diatomées) ont été démontrés dans plusieurs études (concentrations de l'ordre de la centaine de nM) (Das et Khangarot, 2010 ; Pais, 2012 ; Wang et al., 2008 ; Kimberly et Salice, 2014) mais les voies d'action du cadmium restent peu connues. Si le Cd ne produit pas d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) via des réactions d'oxydoréduction directes, comme le fer, sa présence peut toutefois induire leur augmentation de façon indirecte (Pinto et al., 2003). Dans l'étude de Jin et al. (2008), l'exposition de la plante *Sedum alfredii* au Cd (10 à 400  $\mu M$  Cd sur 4 semaines) montre une accumulation de  $H_2O_2$  et  $O_2$  parallèlement à une diminution de l'activité d'enzymes antioxydantes telles que la catalase (CAT, enzyme qui décompose  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $O_2$ ) et la glutathion peroxydase (GPX, qui utilise le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) afin d'oxyder le glutathion (Sies, 1986)). L'effet du Cd sur l'activité de ces deux enzymes antioxydantes pourrait expliquer l'augmentation d'ERO dans les feuilles de *S. alfredii*. Le Cd (comme les métaux de la classe II) se lierait, via sa charge cationique, aux groupements thiols et aux groupements sulfhydryles d'enzymes et de cofacteurs. Ses liaisons peuvent ensuite engendrer une modification de certaines activités biologiques comme la perte du potentiel membranaire (Li et al., 2003) ou une hépatotoxicité aiguë (Rikans et Yamano, 2000).

La toxicité du Cd est différente selon l'organisme considéré. Les gastéropodes semblent être très tolérants au Cd. En effet dans le document fournissant les informations de base et la justification du développement des recommandations canadiennes pour la qualité des eaux en ce qui concerne le cadmium (CCME, 2014), les auteurs ont colligé une grande base de données sur la toxicité chronique du Cd sur les organismes aquatiques. Une distribution (modèle log-logistique) de la sensibilité des espèces au cadmium a été élaborée pour l'exposition chronique d'organismes d'eau douce en fonction des données de toxicité pour 36 espèces aquatiques (Figure 3).



**Figure 3 : Distribution de la sensibilité des espèces (SSD) lors d'expositions chroniques au cadmium dans l'eau douce en utilisant un modèle log-logistique et les données de toxicité chronique de 36 espèces aquatiques (CCME, 2014).**

Pour des concentrations en Cd allant de 0,089 nM à 889,60 nM, les invertébrés (carrés verts sur la figure 3) semblent être distribués en dessous des poissons, des amphibiens et des plantes sur l'ensemble de la courbe. Au sein des espèces d'invertébrés sélectionnées pour la distribution de la sensibilité des espèces au Cd, les espèces les plus sensibles étaient les cladocères (par exemple, *Daphnia magna* avec un ordre de classement de 1 sur la distribution de sensibilité des espèces) et les amphipodes (par exemple, *Hyalella azteca* avec un ordre de classement de 3). Les plus tolérantes étaient les libellules avec des ordres de classement de 35 et 36 (pour *Erythemis simplicicollis* et *Pachydiplax longipennis*, respectivement). Parmi les invertébrés sélectionnés, le gastéropode (*Lymnaea stagnalis*) présentait un ordre de classement de 28

(tolérance relativement élevée) (CCME, 2014). La tolérance des gastéropodes au Cd pourrait être expliquée par la mise en place de mécanismes de détoxification et de gestion du Cd (voir section 1.3.3.), tels que la présence de cellules pores, capables de phagocyter des particules riches en métaux présentes dans le milieu interne (Sminia et al., 1979). Il a été démontré, chez le gastéropode *Littorina littorea* exposé à 11,12  $\mu\text{M}$  de Cd sur 27 j, que ces cellules pores contiennent des granules riches en Cd et en sulfure (S) (liaison du Cd avec le S) (Marigómez et al., 1990). Ces cellules (ainsi que les cellules digestives et les hémocytes) contribueraient à la séquestration du Cd chez les gastéropodes, leur attribuant ainsi une certaine tolérance (Marigómez et al., 1990).

La toxicité du Cd pourrait découler, entre autres, de son effet sur les systèmes métaboliques. Les mitochondries permettent la production d'énergie sous forme d'ATP via le transfert d'électron, permis par des complexes (I à IV), le long de leurs membranes cellulaires (Figure 4). Dans l'étude de Wang et al. (2004) réalisée sur des mitochondries (isolées sur des cochons d'Inde *Dunkin-Hartley*) exposées à une gamme de Cd (de 0 à 40  $\mu\text{M}$ ), les auteurs ont mis en évidence l'effet inhibiteur du Cd sur l'activité des complexes II (succinate:ubiquinone oxydoréductase) et III (ubiquinol:cytochrome c oxydoréductase) de la chaîne mitochondriale dans le foie, le cerveau et le cœur, accompagnée d'une augmentation de la production d'ERO dans les mitochondries de ces tissus.

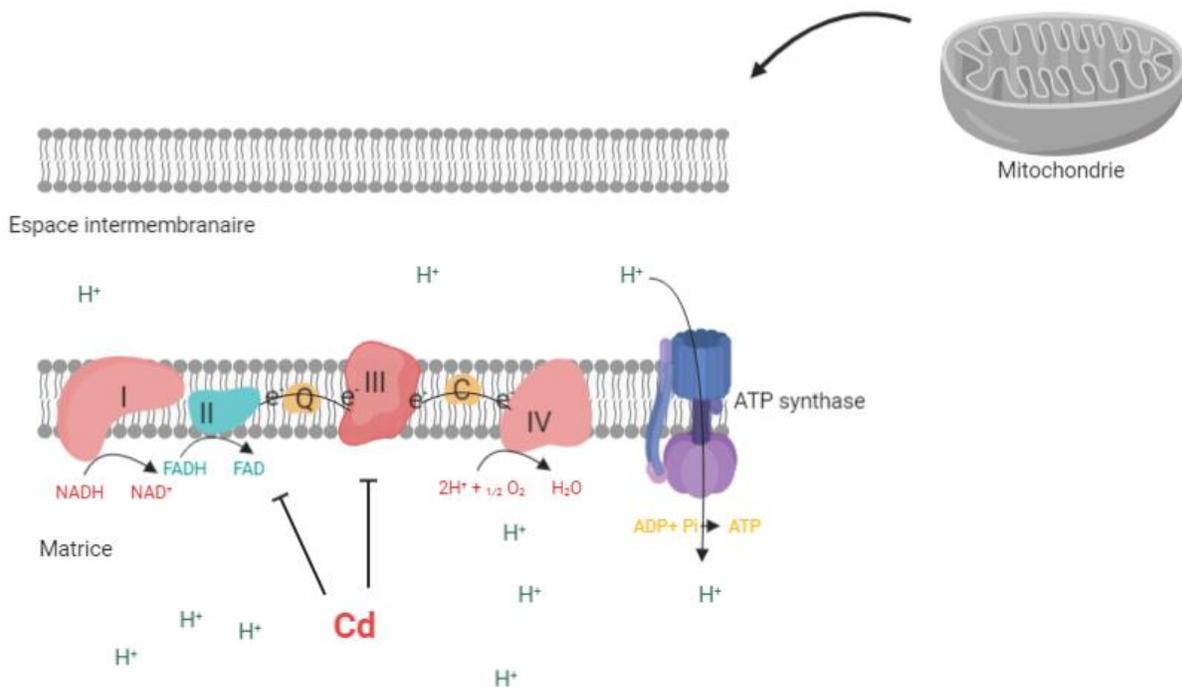


Figure 4 : Schéma de la chaîne d'électrons mitochondriale et effet du Cd d'après Wang et al. (2008).

## 1.2 Modèles expérimentaux

### 1.2.1 Biofilm

Le biofilm aquatique désigne l'ensemble des organismes (microalgues, bactéries, champignons et microméiofaune) se développant sur tout type de substrat immergé, vivant ou inerte (Vadeboncoeur et Power, 2017). Ce consortium de micro-organismes sécrète une matrice extracellulaire composée de polysaccharides, de glycolipides, d'acides nucléiques et de composés amphiphiles structurants (Flemming et Wingender, 2010). Les paramètres environnementaux tels que la température (Lambert et al., 2017), la saisonnalité (Arini, 2011), l'intensité lumineuse (Lange et al., 2011), les propriétés et la disponibilité du substrat (Barros et al., 2019) jouent sur la dynamique des organismes au sein des biofilms. Les interactions biotiques (compétition, parasitisme, prédation) ont également des effets directs et indirects sur les organismes du biofilm (Gambonnet, 2016 ; Liess et Hillebrand, 2004). Parmi les microalgues du biofilm, les diatomées sont très abondantes et peuvent même constituer la quasi-totalité du

peuplement végétal à certaines périodes de l'année (Guo et al., 2016). La haute sensibilité de certaines espèces et la forte tolérance d'autres permettent d'observer des modifications de structure du biofilm face à différents niveaux et types de perturbations. L'étude de ces changements de taxons de diatomée au sein du biofilm est utilisée pour suivre la qualité des cours d'eau au Canada avec l'IDEC (Indice Diatomique de l'Est du Canada) (Lavoie et al., 2006 ; Lavoie et al., 2014) et en France avec l'utilisation de l'IBD (Indice Biologique Diatomique) (Prygiel et al., 1996). Les diatomées peuvent aussi être utilisées pour le suivi de la contamination métallique en observant la composition spécifique des diatomées et la présence d'espèces tolérantes aux métaux (Lavoie et al., 2018). Morin et al. (2008) ont étudié l'accumulation en Cd et la composition taxonomique d'assemblages de diatomées prélevées en milieu naturel (sites contrôles et sites contaminés par des rejets directs d'eau d'une industrie de minerai de zinc) sur plusieurs saisons. Si la composition des diatomées a varié selon les saisons, elle a également varié selon les sites. Les auteurs ont ainsi pu identifier des espèces de diatomées résistantes au Cd (*Eolimna minima*, *Nitzschia palea*, *Encyonema minutum*, *Surirella angusta* et *Gomphonema parvulum*) et des espèces plus sensibles (*Cyclotella meneghiniana*, *Navicula gregaria*, *Navicula lanceolata*, *Melosira varians* et *Nitzschia dissipata*).

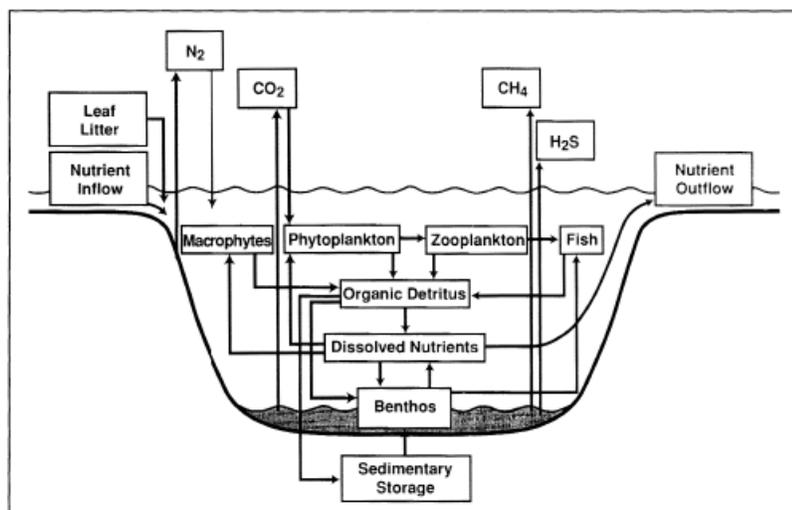
Les biofilms sont composés, d'une part, d'organismes autotrophes qui génèrent, à partir d'énergie lumineuse et de CO<sub>2</sub>, des molécules organiques et de l'oxygène utilisable par les organismes hétérotrophes (Roeselers et al. 2008), et d'autre part, d'organismes hétérotrophes détritivores qui décomposent la matière organique (allochtone et autochtone) jouant un rôle clé dans les flux de nutriments dans les réseaux aquatiques (Romaní et Sabater, 2001). L'importance du biofilm, et particulièrement de sa composante algale, comme source de carbone et d'énergie pour l'ensemble du réseau trophique aquatique a été soulignée dans plusieurs études. L'étude de Torres-Ruiz et al., (2007) dans la Croton River (sud-est de New York) a permis de caractériser les profils en acide gras des ressources autochtones (producteurs primaires aquatiques) et allochtones (matière terrestre, matière benthique et matière organique transportée), ainsi que les profils en AG d'un ensemble de macroinvertébrés (*Hydropsyche spp.*, *Ephemerella spp.*). Leurs données suggèrent que l'apport autochtone s'avère être une source plus riche en AG essentiels (définis comme étant les AG linoléique (18:2n6), arachidonique (ARA, 20:4n6), alpha linoléique (18:3n3), eicosapentaénoïque (EPA, 20:n3)) que l'apport allochtone pour les macroinvertébrés. De plus, leurs résultats indiquent que l'EPA et l'ARA sont abondants seulement dans les producteurs primaires aquatiques. Or, ces AG sont nécessaires à la croissance et au développement des organismes (ex., régulation et fluidité membranaire, précurseurs d'hormones (Schmitz et al., 2007). La revue de Brett et al. (2017) souligne également l'importance des

ressources autochtones dans les systèmes aquatiques en faisant référence notamment aux études de Mayer et Likens (1987) et de Bunn et al. (2013). Dans leur étude de terrain, Mayer et Likens (1987) ont étudié la densité et la répartition algale ainsi que l'abondance, la biomasse et le contenu digestif d'invertébrés benthiques (*Neo-phylax aniqua*) échantillonnés dans une rivière sur une période de trois mois. Les algues représentaient plus de la moitié de la nourriture consommée par *N. aniqua* et étaient responsables de 75 % de ses besoins énergétiques, même si la production d'algues ne représentait qu'une faible proportion de l'apport d'énergie totale dans cette rivière. Dans leur étude, Bunn et al. (2013) ont utilisé les isotopes  $\delta^{15}\text{N}$  et  $\delta^{13}\text{C}$  d'algues et de consommateurs recueillis dans plusieurs ruisseaux et rivières en Australie et en Nouvelle-Guinée afin de réaliser des régressions isotopiques proie/consommateur. Les régressions basées sur l'isotope  $\delta^{15}\text{N}$  avaient des pentes plus élevées ainsi qu'une significativité plus forte que les régressions basées sur l'isotope  $\delta^{13}\text{C}$  (par exemple la régression  $\delta^{15}\text{N}$  invertébrés/algues avait un  $R^2$  de 0,78 alors que la régression  $\delta^{13}\text{C}$  invertébrés/algues avait un  $R^2$  de 0,48). Les auteurs ont ainsi mis en évidence l'importance des algues pour l'apport en N des consommateurs.

### 1.2.2 Consommateurs primaires

La revue de Covich et al. (1999) souligne l'importance des macroinvertébrés benthiques dans les écosystèmes aquatiques et notamment leurs rôles dans le cycle des nutriments. Les macroinvertébrés benthiques peuvent être divisés en deux grandes catégories : (1) les espèces telles que les bivalves fouisseurs, les écrevisses, les vers, et les larves d'insectes qui transforment les débris organiques du compartiment sédimentaire en nutriments dissous qui peuvent être utilisés par les macrophytes et les algues ; (2) les espèces consommatrices de macrophytes, d'algues et de micromeiofaune, telles que les invertébrés brouteurs et déchiqueteurs (ex., gastéropodes, trichoptères et amphipodes) qui relarguent des nutriments par leurs activités d'alimentation et d'excrétion. L'ensemble de ces organismes benthiques peuvent, directement et indirectement, influencer la production microbienne (Figure 5). De plus, les consommateurs tels que les gastéropodes, influencent, via leur comportement alimentaire, la quantité et la distribution de leurs ressources. Par exemple, l'étude de Lamberti et Resh (1983) a mis en évidence un lien entre la croissance des brouteurs (*Helicopsyche borealis*) et la densité algale. En effet, le périphyton (développé sur des substrats artificiels installés dans une section d'un ruisseau) qui était en présence de larves de *H. borealis* montrait des quantités d'algues et de bactéries plus faibles que le périphyton témoin (exclusion des larves de *H. borealis*), mais présentait un taux de renouvellement des algues plus élevé que les témoins. De nombreux organismes benthiques

sont consommés par des espèces consommatrices telles que les poissons, faisant ainsi le lien entre la production primaire et les consommateurs de second ordre (Brown et DeVries, 1985).



**Figure 5 : Le rôle des macroinvertébrés benthiques dans le cycle des nutriments et le contrôle des flux de nutriments dans les écosystèmes aquatiques d'après Covich et al. (1999).**

Les gastéropodes représentent un maillon important des réseaux trophiques aquatiques. Par exemple, Habdija et al. (1995) ont étudié la présence et la répartition des escargots d'eau douce sur plusieurs types de substrat dans la rivière Kupa en Croatie (roches recouvertes de périphyton ou de mousse, galets recouverts de périphyton, graviers recouverts de périphyton et graviers recouverts de macrophytes). La biomasse humide d'escargots représentait de 6,4 % à 46,4 % du pourcentage de biomasse totale de macroinvertébrés (par unité de surface) selon les sites de prélèvement et le type de substrat. Une forte abondance (46,4 % du pourcentage de biomasse totale) a été retrouvée au niveau des roches recouvertes de périphyton. Ceci suggère que les escargots d'eau douce représentent un maillon important du réseau trophique au sein de cette rivière et que leur abondance relative semble être dépendante de l'habitat (et types de producteurs primaires).

Des expériences d'expositions de gastéropodes à des substances chimiques d'intérêt (Bouétard et al., 2013 ; Gust et al., 2013) ont montré qu'ils pouvaient être utilisés pour rendre compte de l'état chimique des masses d'eau, comme d'autres modèles utilisés en routine tels que le gammare (Besse et al., 2013). Les gastéropodes sont maintenant pris en compte lors de l'évaluation de l'état écologique des cours d'eau dans certains pays tels que la France (Borja et

al., 2007 ; Grall et Glemarec, 1997 ; Van Hoey et al., 2010). Les gastéropodes d'eau douce sont exposés aux contaminants via plusieurs voies :

– directe : via le milieu → les gastéropodes pulmonés ont un système de respiration double : un échange gazeux à travers la peau (respiration cutanée) et des échanges localisés au niveau de tissus pulmonaires (respiration aérienne). La respiration cutanée prédomine (60 %) en condition d'oxygénation normale (Lukowiak et al., 1996).

– trophique : aliment → si les glandes digestives sont le lieu de la digestion intracellulaire (Walker, 1972), la présence le long du tube digestif et de l'intestin de cellules spécialisées indique que ces tissus pourraient également être impliqués dans les processus de digestion et d'assimilation de la nourriture chez les limnées (Franchini et Ottaviani, 1992).

Les différentes stratégies connues de gestion des métaux par les gastéropodes sont répertoriées en détail dans les revues de Viarengo et Nott (1993) et Marigómez et al. (2002) dont est tirée la figure 6. Cette figure illustre la route et les tissus/cellules impliqués dans l'absorption, la séquestration et l'excrétion du Cd chez un gastéropode (*Littorina littorea*) exposé à des concentrations en Cd de 4,50 et 11,10  $\mu\text{M}$  Cd sur 3 ou 27 j (Marigómez et al., 1990). Le Cd dissous est absorbé dans les branchies, le manteau et le pied, alors que le Cd particulaire pénètre dans l'intestin où il sera majoritairement pris en charge par les cellules digestives. Dans les branchies, le manteau, le pied et l'estomac, le Cd est directement incorporé dans les hémocytes et les cellules poreuses et/ou associé aux ligands du plasma sanguin et ainsi transporté vers le rein et les glandes digestive. Le métal est ensuite éliminé par trois voies complémentaires : 1) avec les concrétions des néphrocytes dans l'urine ; 2) avec les lysosomes des cellules digestives dans les fèces ; 3) via diapédèse, à travers l'épithélium des glandes digestives, l'intestin et les reins, et avec les hémocytes et les cellules poreuses dans l'urine et les matières fécales (Marigómez et al., 2002).

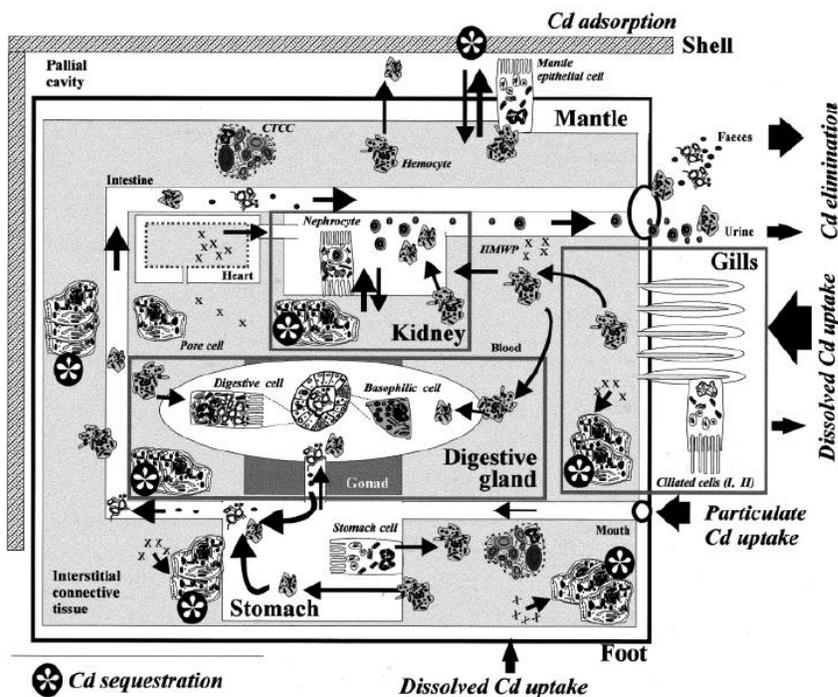


Figure 6 : Schéma de la gestion du Cd chez le gastéropode *L. littorea* (Marigómez et al., 2002).

### 1.2.3 Transfert trophique

Les transferts d'énergie qui se produisent entre un organisme et la base du réseau trophique déterminent sa place au sein de la chaîne alimentaire. Les écologues agrègent les producteurs primaires, producteurs de matière organique à partir d'énergie lumineuse et de carbone inorganique tels que les plantes et les algues, dans le premier niveau trophique. Les algivores et les herbivores qui consomment des producteurs primaires composent le deuxième niveau trophique (consommateurs primaires). Les prédateurs qui se nourrissent de consommateurs primaires constituent le troisième niveau trophique, etc. Une perturbation à la base de la chaîne trophique peut donc avoir un effet sur l'ensemble d'un écosystème. Le biofilm apporte des ressources uniques et indispensables (comme l'azote et le phosphore, leur teneur en protéines et en lipides) au réseau aquatique (Torres-Ruiz et al., 2007 ; Guo et al., 2016) et une modification de ces caractéristiques peut avoir des effets sur les consommateurs, et notamment sur les herbivores benthiques, consommateurs directs de biofilm. Ces effets peuvent se traduire par des modifications de croissance et/ou de reproduction, comme dans l'étude de Peltomaa et al. (2017) où des daphnies ont été nourries avec différentes classes de phytoplancton dont la composition en carbone (C), azote (N), phosphore (P), AG et protéines a été étudiée. La classe des cryptophytes (caractérisée par un pourcentage en AG oméga 3, protéine et stérols plus élevé que

les autres classes d'algues) favorisait la croissance et la reproduction des daphnies en comparaison aux cyanobactéries et aux dinoflagellés. Dans l'étude de Ahlgren et al. (1990), trois espèces de zooplancton (*Chydorus sphaericus*, *Eubosmina longispina* et *Daphnia longispina*) ont été nourris 10 j avec différentes algues (*Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria agardhii*, *Chlamydomonas* sp., *Chlorella homosphaera*, *Scenedesmus acutus* et *Scenedesmus quadricauda*) et leur taux de croissance a varié en fonction de l'alimentation. La qualité nutritive des ressources alimentaires, définie par la qualité et la quantité d'éléments essentiels (les lipides, les ratios C : N : P, les glucides et les protéines (Torres-Ruiz et al., 2007 ; Milinsk et al., 2006)), disponibles aux consommateurs peut affecter leur croissance, leur reproduction ainsi que d'autres réactions physiologiques.

Dans notre étude, différents aspects d'interaction trophique seront abordés en utilisant des approches complémentaires, dont la bioaccumulation, pour suivre le transfert du Cd d'un niveau trophique à l'autre, le suivi de la toxicité du Cd avec des marqueurs génétiques, et finalement l'évaluation des profils en AG afin de quantifier l'effet du Cd sur la qualité nutritive des biofilms et ses répercussions sur des consommateurs directs.

### **1.3 Biomarqueurs étudiés**

#### **1.3.1 La bioaccumulation**

La définition du processus de bioaccumulation de la Commission d'enrichissement de la langue française (France), FranceTerme, 2010, cité par l'Office québécois de la langue française, est la suivante : Processus biologique par lequel certaines substances se concentrent dans un organe, dans un organisme vivant, le long d'une chaîne alimentaire ou dans un écosystème. Plusieurs études ont montré une forte corrélation entre les métaux bioaccumulés dans les biofilms et la concentration de métaux (tels que le Cd) dans l'eau. Par exemple, Duong et al. (2008) ont étudié l'accumulation en Cd dans des biofilms prélevés sur des substrats artificiels installés dans deux sites de la rivière Riou-Mort (contaminée par des rejets directs d'eau provenant d'un site industriel de minerai de zinc (Sud-Ouest de la France)). Les concentrations en Cd mesurées dans l'eau sur les deux sites étaient de 210 à 240 nM pour le site le plus contaminé et inférieure à 0,89 nM pour le site contrôle. À la fin de l'expérience (20 j), l'accumulation du Cd par les biofilms était significativement supérieure au site contaminé par rapport au site contrôle ( $9,78 \pm 2,11$  nmol/cm<sup>2</sup> contre  $6,67 \pm 4,63$  pmol/cm<sup>2</sup>). Les analyses d'accumulation des métaux dans le biofilm se sont révélées être de bons indices pour estimer le niveau de contamination des écosystèmes d'eau douce. En effet, une étude de Lavoie et al. (2012) a estimé l'accumulation de Cd, cuivre (Cu),

plomb (Pb) et Zn ans les biofilms, ainsi que la composition taxonomique de diatomées dans des sites contaminés par des activités minières (région minière de Montauban, Québec, Canada). Des relations hautement significatives entre les concentrations intracellulaires en métaux dans le biofilm (quelle que soit sa composition taxonomique) et les concentrations calculées en ions libres dans le milieu ont été mises en évidence. Ces résultats suggèrent que la concentration de métal dans le biofilm récolté sur le terrain constitue un bon indicateur d'exposition et rend compte des concentrations de métaux biodisponibles. La plupart des études d'accumulation de Cd par les gastéropodes sont réalisées via une contamination de l'eau. Le tableau 1 est un récapitulatif de quelques études de bioaccumulation de Cd réalisées chez différentes espèces de gastéropodes. Si la gamme de concentrations en Cd mesurées chez les gastéropodes est large, un organotrophisme (présence préférentielle de contaminants dans certains organes) général a néanmoins pu être établi. En effet chez les différences espèces étudiées, le Cd était concentré dans la masse viscérale et plus précisément dans l'hépatopancréas et le rein (Huang et al., 2018 ; Roméo et al., 2006). L'accumulation de métaux chez les organismes consommateurs rend compte d'une contamination de l'eau, mais également de la nourriture. Cette dernière caractéristique permet d'étudier le comportement du Cd le long de la chaîne trophique. Plusieurs études ont examiné le devenir du Cd dans les réseaux aquatiques via des analyses de bioaccumulation (Canli et Furness, 1995 ; Cheung et al., 2006 ; Bonnineau et al., 2020 ; Farag et al., 2007 ; Golding et al., 2013 ; Ng et al., 2005 ; Verrengia Guerrero et al., 2000).

**Tableau 1 : Quelques exemples de niveau de bioaccumulation de Cd chez les gastéropodes. PS : Poids sec.**

<b>Espèces</b>	<b>Exposition au Cd</b>	<b>Bioaccumulation</b>	<b>Références</b>
<i>Pomacea canaliculata</i>	3,56 µM - 20 j	Viscère : 12,37 µmol/g PS Pied : 2,99 µmol/g PS Coquille : 0,68 µmol/g PS	(Huang et al., 2018)
<i>Sinotaia quadrata</i>	3,56 µM - 20 j	Viscère : 1,36 µmol/g PS Pied : 0,38 µmol/g PS Coquille : 0,41 µmol/g PS	(Huang et al., 2018)
<i>Lymnaea stagnalis</i>	0,89 µM- 56 j	Pied : 0,15 µmol/g PS Viscère : 1,45 µmol/g PS	(Reátegui-Zirena et al., 2017)

### 1.3.2 La transcription de gènes

La quantification du niveau de transcription de gènes cibles chez nos organismes d'études a été utilisée au cours de cette étude. Notre étude transcriptionnelle s'est basée sur un principe d'amplification de gènes *in vitro* extrêmement reproductible et spécifique : la qRT-PCR. La quantification du nombre d'ARNm transcrits à partir d'un gène au sein d'un échantillon est effectuée en suivant l'intensité de fluorescence des amplicons néoformés. En normalisant ces résultats avec des gènes de références (expression non variable et stable dans tous les types cellulaires et selon les conditions environnementales), on obtient une indication du niveau de traduction d'ARNm de gènes d'intérêt chez un individu. Dans l'étude de Galay-Burgos et al. (2003), les auteurs ont montré une modification de la transcription de gènes cibles (MT-2 qui code pour l'isoforme 2 de la métallothionéine et MLRS qui code la grande sous-unité ribosomique mitochondriale) chez des vers de terre (*Lumbricus rubellus*) exposés au Cd ou au Cu (contamination du sol). En effet les auteurs ont observé une augmentation de la transcription du gène MLRS chez les vers exposés à 10,70  $\mu\text{mol/g}$  de Cu et une augmentation de la transcription du gène MT-2 chez les vers exposés à 7,12  $\mu\text{mol/g}$  de Cd et à 10,70  $\mu\text{mol/g}$  de Cu.

L'efficacité de la quantification de certains gènes comme marqueurs d'exposition a également été mise en évidence dans l'étude de Simon et al. (2011) dans des cultures de *Chlamydomonas reinhardtii* en suspension dans de l'eau de rivière à des concentrations en Cd de 101 à 136 nM (30 min ou 5 h). Leurs résultats montrent une surexpression de quatre gènes impliqués dans les systèmes de détoxification pour les algues exposées pendant 5 heures : AOT4 (similarité avec un transporteur de perméase d'acide aminé auxine), SDC1 (sérine décarboxylase), PBD1 (une sous-unité du protéasome) et METE (biosynthèse de la méthionine). L'expression de ces gènes s'est avérée être le paramètre le plus corrélé à la concentration en  $[\text{Cd}^{2+}]$  du milieu, devant le Cd intracellulaire.

Plusieurs études ont mis en évidence la pertinence d'utiliser l'expression de gènes pour rendre compte d'effets précoces d'exposition de contaminants chez les gastéropodes. Une étude réalisée sur *Lymnaea stagnalis* a suivi l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans les mécanismes antioxydants (la catalase, la superoxyde dismutase, les glutathions peroxydases et les réductases) afin de déterminer des gènes marqueurs de réponses précoces. Tous les gènes étudiés ont montré une expression modifiée suite à une exposition à des herbicides. De plus, cette modification semblait dépendre des concentrations, des temps d'exposition et des tissus analysés (Bouétard et al., 2013). Par exemple, le gène cor (qui code pour le cortactin) a été induit dans l'hémolymphe seulement à la concentration de 22,2  $\mu\text{g/L}$  de

diquat après 24 h d'exposition, alors que dans le complexe gonado-digestif l'expression du gène a été induite à 5 h d'exposition pour les concentrations de 22,2, 44,4 et 222,2 µg/L de diquat. Il est donc important de souligner que la dose, le temps d'exposition et le tissu où l'expression est analysée sont des notions très importantes dans les études transcriptionnelles. Les choix des temps d'exposition et des concentrations sont des facteurs très importants car une réponse peut parfois être mesurable à l'intérieure une fenêtre temporelle spécifique, i.e., que des effets observés à faible dose peuvent ne plus être observés lorsque la dose est trop forte. L'analyse par tissus/organes est un choix méthodologique pertinent, car il peut permettre de mettre en avant des réponses de transcription tissus-spécifiques.

Lors d'expositions à des concentrations en-dessous des doses létales pour l'organisme, les études transcriptionnelles permettent de mettre en évidence des effets biologiques alors que des mesures de toxicité classiques (ex., mortalité) ne montrent aucun effet. Par exemple, Kim Tiam et al. (2012) ont exposé des cultures d'une diatomée (*Eolimna minima*) à 88,96 nM de Cd et n'ont observé aucune diminution significative de croissance, alors que des modifications dans l'expression de certains gènes (le gène *nad5* qui code pour la sous-unité 5 de la NADH déshydrogénase et les gènes *d1* et *psaA* qui codent respectivement pour les protéines *d1* et *psa*) ont été observées après 14 j.

Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis de détecter des effets biologiques à de faibles concentrations tout en ciblant des fonctions cellulaires importantes. Dans l'étude de Blaby-Haas et Merchant (2012), des études de génétique comparative ont permis de prédire la présence et la fonction de gènes impliqués dans les systèmes de transport de métaux chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, permettant ainsi aux auteurs de dresser un schéma théorique de la gestion intracellulaire des métaux chez *C. reinhardtii*. L'identification et la caractérisation de gènes codant pour des protéines et l'étude de leurs fonctions associées chez les organismes permettent de cerner les mécanismes mis en place chez ces derniers.

### **1.3.3 Les acides gras**

Les AG sont des molécules composées d'une chaîne carbonée de 12 à 24 atomes de carbone, possédant un groupe carboxyle (-COOH) en bout de chaîne. On peut répartir les AG en trois groupes selon leur niveau de saturation (présence de doubles liaisons entre atomes de carbone). Il y a les AG saturés (AGS) qui ne possèdent aucune double liaison au sein de leur chaîne carbonée. Parmi les AG insaturés (AGI) on peut distinguer encore deux catégories : les AG monoinsaturés (AGMI) qui possèdent une double liaison et enfin les AG polyinsaturés (AGPI) qui

possèdent *a minima* deux doubles liaisons. Les AGS sont généralement utilisés pour le catabolisme cellulaire et le stockage d'énergie alors que les AGPI régulent la fluidité membranaire et la synthèse hormonale chez les organismes (Brett et Müller-Navarra, 1997 ; Tocher, 2003). Si les AGPI sont impliqués dans plusieurs fonctions cellulaires, leurs proportions et leurs origines peuvent varier selon les espèces considérées. Par exemple, les organismes autotrophes possèdent des enzymes, les  $\Delta 12$  et  $\Delta 15$  désaturases, à l'origine de l'acide linoléique (LIN) et de l'acide alpha linoléique qui sont les points de départ de la formation des différents AGPI tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) (Dalsgaard et al., 2003). Chez les organismes hétérotrophes, plus particulièrement les animaux, ces AGPI sont essentiellement assimilés par l'alimentation, car leur synthèse *de novo* est coûteuse en énergie (Monroig et al., 2013 ; Monroig et Kabeya, 2018). Les AGPI représentent ainsi des nutriments essentiels pour les hétérotrophes. Ces acides gras que les animaux doivent ingérer pour le maintien de leur physiologie car ils ne peuvent généralement pas les synthétiser sont appelés AG essentiels. Les AG identifiés comme essentiels dans l'alimentation des vertébrés sont le 18:2n-6 et le 18:3n-3. La liste d'AG essentiels peut être rallongée, notamment avec les AGPI C20:4n6, C20:5n3 et C22:6n3, en fonction de la capacité de l'espèce considérée à convertir ces AGPI (Tocher, 2003).

La spécificité des profils d'AG des espèces peut être utilisée comme biomarqueur pour détecter et rendre compte des différents grands groupes algaux présents au sein d'un échantillon (Taipale et al., 2013 ; Lang et al., 2011). Dans leur étude, Taipale et al. (2013) ont identifié sept classes d'algues via leur profil en AG (Figure 7).

Phytoplankton group	Major FA	FA biomarker
Chlorophyceae	ALA, 16:0, 18:1 $\omega$ 9, LIN	16:4 $\omega$ 3, 16:3 $\omega$ 3, 16:2 $\omega$ 6
Trebouxiophyceae	ALA, 16:0, 18:1 $\omega$ 9, LIN	16:4 $\omega$ 3, 16:3 $\omega$ 3, 16:2 $\omega$ 6
Cryptophyceae	ALA, 16:0, SDA	22:5 $\omega$ 6, 18:4 $\omega$ 3
Synuraphyceae	SDA, 14:0, ALA, 16:0	22:5 $\omega$ 6, 18:4 $\omega$ 3
Ochromonadales	16:1 $\omega$ 7c, 16:0, LIN, 18:1 $\omega$ 7	16:3 $\omega$ 1, 18:4 $\omega$ 3, 22:5 $\omega$ 6
Raphidophyceae	16:0, EPA, SDA, ALA	16:2 $\omega$ 4, 16:3 $\omega$ 4*, 16:3 $\omega$ 1, 20:3 $\omega$ 3
Bacillariophyceae	16:1 $\omega$ 7c, EPA, 16:0, 14:0	16:2 $\omega$ 7*, 16:2 $\omega$ 4, 16:3 $\omega$ 4, 16:4 $\omega$ 1*, 18:4 $\omega$ 4*
Euglenophyceae	16:0, ALA, EPA, DHA	15:3 $\omega$ 3*, 15:3 $\omega$ 1, 15:4 $\omega$ 3, 17:3 $\omega$ 2*, 17:2 $\omega$ 7/5*, 20:4 $\omega$ 3, 20:2 $\omega$ 6, 20:3 $\omega$ 6, 22:4 $\omega$ 6

**Figure 7 : Les principaux acides gras (AG) et les biomarqueurs potentiels pour chaque classe d'algues identifiée dans l'étude Taipale et al (2013).**

Une étude menée par Genter et Lehman (2000) a examiné la réponse de biofilms à une contamination aux métaux. Ils ont étudié les structures des assemblages algaux et microbiens et leurs profils en acides gras en relation avec les concentrations de métaux retrouvées dans un

petit ruisseau de montagne proche d'une mine abandonnée (Idaho, USA). Des concentrations élevées d'arsenic et de cuivre sur le site minier ont été associées à des assemblages appauvris en diatomées et caractérisés par une faible diversité taxonomique. Ces changements dans la composition des espèces et des profils en AGPI ont été associés à des concentrations en métaux élevées dans le biofilm, mais une relation de cause à effet définitive n'a pu être déterminée (possible variabilité des conditions environnementales inter-sites).

Une étude de Chia et al., (2013) a montré que la composition en AG de *Chlorella vulgaris* était modifiée en réponse à différentes concentrations en Cd (0,20 et 2,00  $\mu\text{M}$ ) et en azote (2,60  $\mu\text{M}$  et 1,1 mM). Lors de contamination au Cd, sans limitation en azote, la composition lipidique de *C. vulgaris* était modifiée (avec une augmentation des triacylglycéroles et des stérols libres). La composition en AG du biofilm pourrait ainsi être modulée par des modifications au sein des organismes (variations physiologiques et métaboliques et régulation des voies de biosynthèse lipidiques) mais également par des modifications taxonomiques. En étudiant la composition taxonomique d'une part, et les profils en AG d'autre part, on devrait pouvoir rendre compte de la complémentarité de ces deux types de modifications affectant les profils en AG du biofilm lors d'une exposition à un métal en milieux contrôlés.

Peu de données existent sur la composition en AG d'espèces de limnées, mais des profils d'espèces de la grande famille des gastéropodes ont pu être répertoriés et sont disponibles dans le tableau 2. Il a été montré que les profils en AG des mollusques sont dépendants de plusieurs facteurs : leur cycle de reproduction (Galap et al., 1999), la quantité et la qualité de la nourriture et la température (Gardner et Riley, 1972 ; Sidwell et al., 1973 ; Galap et al., 1999 ; Chebotareva et al., 2011). Guo et son équipe (2016) ont comparé les profils d'AG d'organismes de différents niveaux trophiques (invertébrés, algues et quatre grands groupes taxonomiques de poissons) récoltés via deux bases de données (Web of Science et Google Scholar). Cette étude a également regardé l'assimilation d'AGPI à longues chaînes chez différents taxons de poissons et d'invertébrés. Il s'est avéré que les profils d'AG différaient entre les algues, les invertébrés et les poissons étudiés. Si les gastéropodes présentaient en effet une bonne corrélation entre leur profil d'AGPI et ceux de leur nourriture (biofilm), ils ont également été qualifiés « d'organisme intégrateur », car ils ont la capacité de retenir de manière sélective les AGPI ingérés ou de maintenir un profil en AGPI quasi homéostatique pour leur besoin physiologique (Guo et al., 2016).

**Tableau 2 : Profils en acides gras de différentes espèces de gastéropodes.**

<b>Espèces</b>	<b>AGS</b>	<b>AGMI</b>	<b>AGPI</b>	<b>Références</b>
<i>Patella depressa</i>	34,5 %	30 %	33,5 %	(Arts et al., 2009)
AG majoritaires	C16:0 (21 %), C14:0 (6 %) C18:0 (18 %)	C18:1n9 (10 %)	C20:5n3 (8,5 %) C20:4n3 (11 %)	
<i>Patella ulyssiponensis</i>	39 %	25,5 %	33,5 %	(Arts et al., 2009)
AG majoritaires	C16:0(16 %), C14:0 (6 %) C18:0 (18 %)	C18:1n9 (7 %)	C20:5n3 (13 %) C20:n3 (8 %)	
<i>Patella vulgata</i>	30 %	31 %	38 %	(Arts et al., 2009)
AG majoritaires	C16:0 (17 %), C14:0 (5 %) C18:0 (18 %)	C18:1n9 (9 %)	C20:5n3 (13 %) C20:4n3 (8 %)	
<i>Patella rustica</i>	31 %	31,5 %	31,5 %	(Arts et al., 2009)
AG majoritaires	C16:0 (18 %), C18:0 (18 %)	C18:1n7 (12 %)	C20:5n3(11 %) C20:4n3(9 %)	
<i>Biomphalaria glabrata</i>	23 %	23 %	41 %	(Fried et al., 1992)
AG majoritaires	C16:0 (12 %), C18:0 (7 %)	C18:1 (12 %), 20:1 (5,7 %)	C18:2 (9 %), C20:4 (10 %)	

## 1.4 Objectifs et hypothèses de recherche

Réalisé dans le cadre du programme de bidiplomation entre l'Université de Bordeaux (France) et l'Institut national de la recherche scientifique, centre Eau Terre Environnement (INRS-ETE) à Québec (Canada), ce projet d'étude avait les objectifs suivants :

- Objectif 1 : Déterminer s'il existe un transfert du Cd du premier maillon trophique au maillon supérieur dans une chaîne trophique aquatique.

Hypothèses : On s'attend à ce que le biofilm soit capable d'accumuler le Cd. Le Cd accumulé dans le biofilm serait alors disponible et transféré aux consommateurs supérieurs.

- Objectif 2 : Déterminer si et comment le Cd affecte la qualité nutritive du biofilm et celle des escargots.

Hypothèses : On s'attend à ce que le Cd modifie le profil en AG du biofilm avec une diminution des AGPI et une diminution du ratio AGI/AGS. Une telle modification pourrait découler d'une réponse directe, c'est-à-dire d'une modification des profils en AG des organismes présents dans les biofilms. Il pourrait par exemple survenir une augmentation de la peroxydation des AGPI au sein des organismes et/ou des modifications de la synthèse des AG et des voies métaboliques. La modification des profils en AG pourrait aussi découler d'une réponse indirecte, avec une modification de la composition taxonomique des biofilms. On s'attend à observer une différence de composition en espèces dans les biofilms exposés au Cd en comparaison aux biofilms témoins.

Pour les escargots exposés au Cd via l'eau, on s'attend à voir une modification des profils en AG, avec une diminution des AGPI. Comme pour le biofilm, les effets attendus du Cd sur les AG sont : une peroxydation lipidique et une modification de la voie de synthèse des AG. Suite à une exposition au Cd via l'alimentation (le biofilm contaminé), la modification des profils en AG pourrait découler d'un effet direct (comme avec la contamination via l'eau) et/ou d'un effet de l'alimentation (carence). On s'attend à ce que la réponse des escargots exposés via l'eau et l'alimentation soit supérieure à celle des individus contaminés par une seule voie. Il y aurait un effet additif ou synergique entre les voies d'exposition.

- Objectif 3 : Déterminer si les profils en AG sont de bons marqueurs de qualité nutritive.

Hypothèses : On s'attend à observer un lien entre les profils en AG des biofilms contaminés et ceux de leurs consommateurs. Une diminution des AGPI dans le biofilm aurait une répercussion sur le profil des gastéropodes (diminution des mêmes AGPI).

- Objectif 4 : Mesurer la transcription de gènes impliqués dans des processus cellulaires connus pour être sensibles au Cd.

Hypothèses : La présence de Cd induirait une augmentation d'ERO dans les cellules. Des systèmes de protection et de prise en charge des ERO se mettraient alors en place. On s'attend à voir une augmentation de l'expression des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la réponse au stress oxydant et la détoxification. Le Cd pourrait aussi affecter le métabolisme des organismes. On s'attend à voir une diminution de l'expression des gènes d'enzymes impliquées dans le métabolisme mitochondrial (le Cd pouvant affecter les mitochondries) et une diminution de l'expression des gènes liés aux enzymes du photosystème chez les organismes chlorophylliens. On s'attend aussi à ce que l'expression des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse des AG soit diminuée chez les individus exposés au Cd.

## 2 CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

---

### 2.1 Démarche expérimentale

Ce projet de recherche avait pour objectif d'étudier les effets du cadmium sur les biofilms algaux et sur un consommateur primaire par une approche multimarqueur. Il est à noter que des escargots d'eau douce (*Lymnaea* sp.) ont d'abord été exposés à différentes concentrations en Ni, métal qui avait été initialement sélectionné pour ce projet. Toutefois, le Ni s'est avéré être très toxique pour les limnées. En effet, les limnées exposées sont mortes rapidement suite aux effets du Ni, ce qui a rendu impossible la poursuite des expériences avec ce métal (voir étude préliminaire sur le Ni au chapitre 3)

Un plan expérimental en trois étapes a été mis en place pour réaliser ce projet :

- 1- Étant donné la toxicité élevée du Ni pour cette espèce, il a été décidé de changer de métal d'études (voir chapitre 3). Les escargots ont donc été exposés à des concentrations de Cd différentes afin de déterminer la concentration d'exposition adéquate pour la suite des expositions.
- 2- Exposition du biofilm à la concentration de Cd déterminée en (1). Les paramètres suivis lors de cette étude étaient les suivants : la détermination des profils en AG, de la bioaccumulation du Cd et de la réponse des gènes qui codent pour des enzymes impliquées dans la photosynthèse (*psa et d1*) et dans le métabolisme mitochondrial (*cox1, nd5 et 12s*).
- 3- Exposition des escargots (*Lymnaea* sp) au Cd par voie directe (dans l'eau) et/ou via la nourriture (biofilm) afin de suivre les profils en AG, la bioaccumulation du Cd et la réponse de gènes qui codent pour des enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse lipidique (*elvol6, fads1, scd, fasn*), de détoxification (*mdr-1*), du métabolisme mitochondrial (*cox1, acoa, 12s*) et de la réponse au stress oxydant (*cat et sod Cu*).

### 2.2 Test préliminaire d'exposition des escargots au cadmium

#### 2.2.1 Exposition des escargots

Les escargots (*Lymnaea* sp.) ont été commandés chez un fournisseur d'organismes aquatiques (Naïades aquariophilie) puis ont été acclimatés pendant 2 j dans un aquarium contenant de l'eau déchlorée. Après cette période d'acclimatation, dix escargots ont été placés dans chacun des 12 microcosmes en plastique de 2 L (17 x 24 x 12 cm) équipés de pompes à air. Les solutions

d'exposition au Cd (C1 = 10, C2 = 90 et C3 = 180 nM de Cd) ont été préparées à partir d'une solution mère de (1000 µg Cd/mL, 4 % HNO<sub>3</sub>, Plasma CAL). Les solutions d'exposition ont été neutralisées avec une solution de NaOH (augmentation du pH jusqu'à 7,2). Les escargots de poids moyen 230 ± 10 mg ont été ainsi exposés sur une période de 21 j. Il est à réitérer que cette expérience avait comme objectif de déterminer la concentration maximale de Cd que les limnées pouvaient tolérer afin de choisir une concentration d'exposition pour les biofilms (sachant que les biofilms peuvent généralement supporter des concentrations en métaux plus élevées que les limnées).

### 2.2.2 Résultats des tests d'exposition

Le pH des microcosmes a été vérifié à chaque changement d'eau (réalisé tous les deux jours) et il est resté constant tout au long de l'exposition (7,21 ± 0,03). Les concentrations moyennes (n = 9) ± erreur-type des microcosmes étaient respectivement de 0,54 ± 0,09 pour les témoins, de 9,7 ± 1,0 pour C1, de 90,8 ± 10,6 pour C2 et de 176,6 ± 14,5 nM Cd pour C3. Le pourcentage de survie sur 21 j était respectivement de 100 ± 0 % pour les témoins, de 100 ± 0 % pour C1, de 95,0 ± 4,6 % pour C2 et de 93,6 ± 4,2 % pour C3. Il n'y a pas de différences significatives de pourcentage de survie entre les différentes conditions. Aucun effet sur la mobilité, la prise alimentaire, la reproduction et la fécondation n'a été observé.

Plusieurs études ont déterminé les concentrations létales du Cd chez les gastéropodes :

*Physa gyrina* : La valeur de la CE50 pour les escargots matures était de 12,20 µM (96 h), alors que celle des escargots juvéniles était de 3,60 µM à 96 h (Wier et Walter, 1976).

*Lymnaea stagnalis* : La valeur de la CE50 pour les escargots matures était de 14,10 µM (96 h), alors que celle des escargots juvéniles était de 13,50 µM à 96 h (Coourdassier et al., 2004).

*Melanoides tuberculat* : La valeur de la CE50 pour les escargots matures était de 25,40 µM (96 h) (Shuhaimi-Othman et al., 2012).

En raison des résultats obtenus lors de ce test préliminaire d'exposition, confortés par les CE50 retrouvés dans la littérature, nous avons retenu la concentration de 180 nM de Cd pour notre étude de transfert trophique. Cette concentration semble être suffisante pour pouvoir modifier la structure du biofilm (Arini, 2011 ; Chia et al., 2013) sans être limitante pour la survie des escargots sur le long terme.

### 2.3 Exposition du biofilm au cadmium

La deuxième étape du projet a été l'exposition du biofilm au Cd (180 nM). Du biofilm a été prélevé dans des aquariums contenant des poissons ainsi que dans une rivière située à proximité de la ville de Québec (rivière du Cap Rouge, Québec, Canada). La biomasse ainsi récoltée a été homogénéisée, puis placée dans un mésocosme contenant 50 L d'eau déchlorée et enrichie avec 5 mL d'une solution de  $\text{NaSiO}_3$  (41 g/L), 10 mL de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (31,02 g/L) et 10 mL de  $\text{NaNO}_3$  (14,2 g/L). Ceci permet l'apport de nutriments essentiels au développement du biofilm (respectivement silice, phosphore et azote). Dans ce mésocosme, la biomasse algale croît rapidement, permettant d'obtenir une grande quantité de biofilm bien adapté à nos conditions de laboratoire en environ un mois. Le biofilm a alors été récolté et homogénéisé, puis l'inoculum a été réparti entre les différents bacs d'exposition pour une période de trois mois de colonisation afin d'avoir une quantité suffisante de biomasse (recouvrement des parois et des plaques) pour l'exposition. Le dispositif expérimental était constitué de huit bacs en plastique contenant chacun cinq plaques en acrylique suspendues dans la colonne d'eau pour maximiser la surface de colonisation. Chaque bac était muni d'une pompe permettant d'oxygéner l'eau et de créer une certaine circulation. Lors du premier jour d'exposition, quatre bacs ont été contaminés (Bacs 5, 6, 7 et 8) par l'ajout de 680  $\mu\text{L}$  d'une solution de Cd concentrée (solution mère 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dans les milieux d'exposition (34 L d'eau déchlorée) afin d'atteindre une concentration finale de 180 nM de Cd. Les quatre autres bacs (Bacs 1, 2, 3 et 4) représentent les témoins (Figure 8).

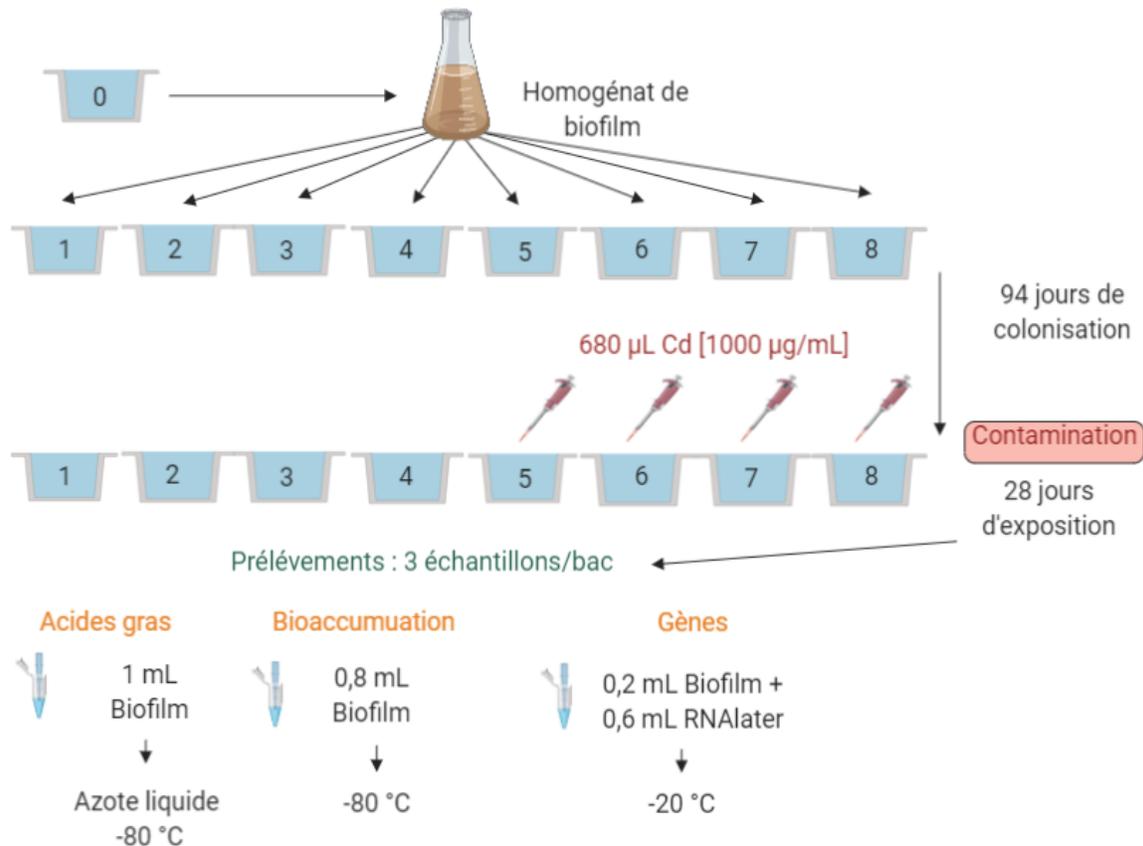
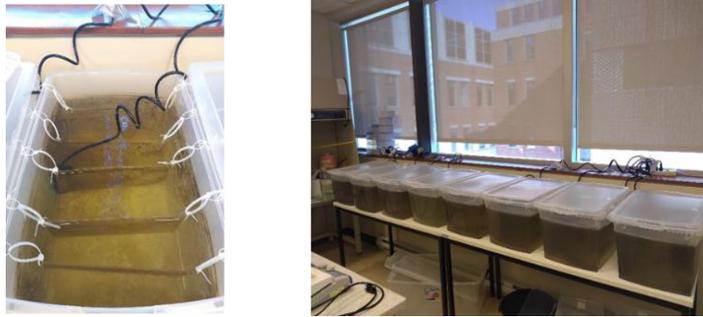


Figure 8 : Schéma et photos du design expérimental de l'exposition du biofilm au Cd.

La concentration en Cd dans les bacs a été analysée par ICP-MS (tous les 7 j). Après la première analyse, les bacs 5 et 6 présentaient une concentration en Cd inférieure à la concentration attendue de 180 nM. Une étape de réajustement de la concentration a été réalisée au 21<sup>ème</sup> j d'exposition (Tableau 3). Le calcul des concentrations de Cd à ajouter afin d'ajuster les concentrations en Cd est basé sur l'équation suivante :

$$C_f = \frac{C_a.v_a + C_b.v_b}{v_f}$$

Équation 4 : Calcul de réajustement des concentrations en Cd dans les mésocosmes des biofilms.

**Tableau 3 : réajustement des concentrations en Cd dans les bacs de culture de biofilm contaminés au Cd.**

	<b>Concentration finale Cd (Cf)</b>	<b>Volume final (Vf)</b>	<b>Concentration initiale des bacs en Cd (Ca)</b>	<b>Concentration en Cd réajustement (Cb = inconnue)</b>	<b>Volume bac (Va)</b>	<b>Volume changement d'eau (Vb)</b>
Bac 5	180 nM	34 L	125 nM	729 nM	31 L	3 L
Bac 6	180 nM	34 L	153 nM	426 nM	31 L	3 L

Au 29<sup>e</sup> j d'exposition, le biofilm a été récolté puis centrifugé (Sorvall RC5C Plus 6000 rpm 5 min, 4 °C) afin de concentrer le biofilm et d'éliminer l'excès d'eau. Plusieurs études ont mis en évidence un plateau dans l'accumulation du Cd à partir de quatre semaines d'exposition. Par exemple, dans l'étude de Morin et al. (2008), les concentrations en Cd augmentent dans le biofilm jusqu'à la quatrième semaine d'exposition avec l'apparition d'un plateau. Selon ces résultats, la période d'exposition de quatre semaines a été choisie pour ce projet, car elle a été jugée suffisante pour induire des effets significatifs d'accumulation du Cd au sein du biofilm.

La biomasse ainsi obtenue a été conservée sur la glace et répartie dans des tubes pour les différentes analyses (plusieurs répliquas pour chaque type d'analyse par bac de cultures ont été réalisés) :

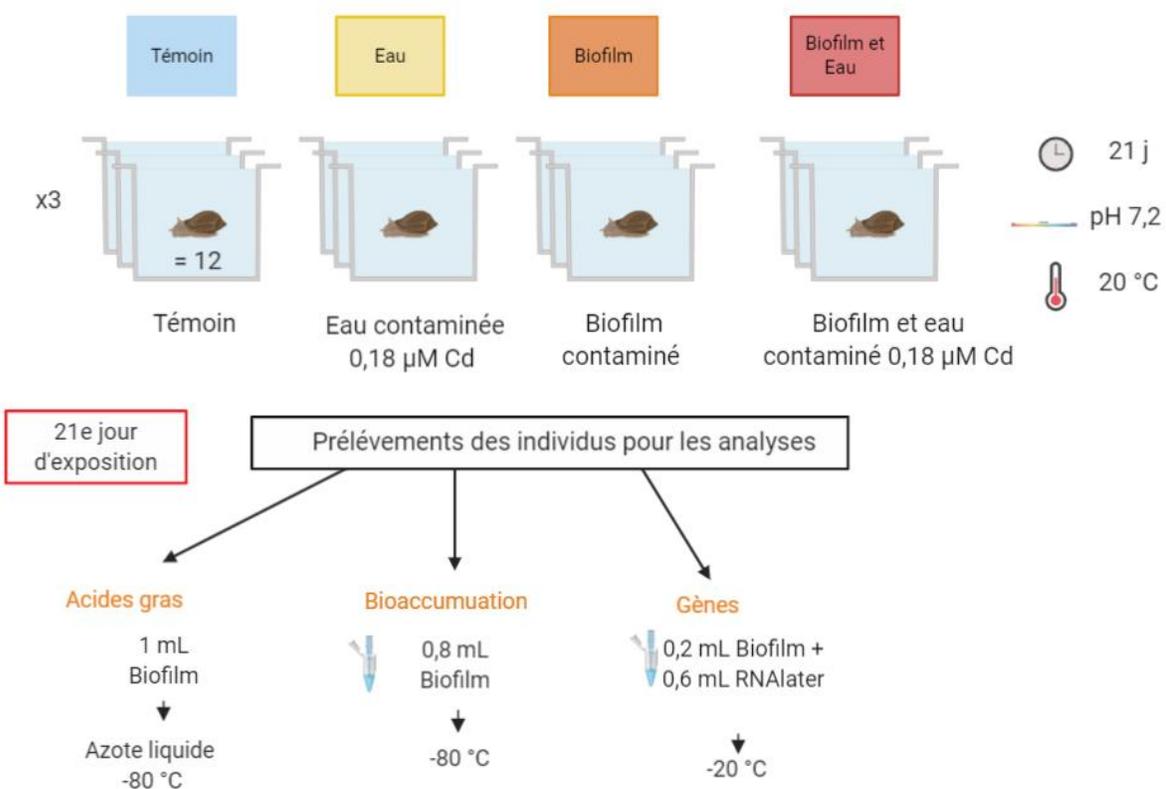
- Une première partie dans des tubes 1,5 mL (lavés au préalable dans une solution d'acide nitrique pour éliminer toute traces de métaux) pour les analyses de bioaccumulation et conservée à -20 °C.
- Une deuxième partie dans des cryotubes pour les analyses des profils en AG conservée dans l'azote liquide puis à -80 °C.
- Une dernière partie conservée dans une solution RNeasy lysis buffer puis laissée une nuit à 4 °C avant d'être stockée à -20 °C pour les analyses transcriptomiques.

Les protocoles ainsi que les détails de ces analyses sont situés dans la section 2.5 du chapitre 2 de ce mémoire. Le restant du biofilm a été conservé à -20 °C et a servi de nourriture aux escargots pour l'expérience de transfert trophique.

## 2.4 Expérience de transfert trophique du Cd

La troisième grande étape du projet est l'évaluation des effets du biofilm exposé au Cd sur les consommateurs primaires, c'est-à-dire la bioaccumulation du Cd ainsi que les effets du biofilm altéré sur la composition en AG des escargots. Pour la réalisation de cette expérience de transfert trophique, quatre conditions d'exposition ont été mises en place : témoin (**Témoin**), une contamination par voie directe (Cd dans l'eau) (**Eau**), via la nourriture (biofilm exposé au Cd) (**Biofilm**) et une exposition par les deux voies de contamination (directe et via la nourriture) (**Biofilm et Eau**) (Figure 9).

Pour chaque condition, trois microcosmes de 2 L contenant chacun 12 escargots (de poids moyen  $278 \pm 50$  mg) et 1,5 L d'eau déchlorée (pH = 7,2, T = 20 °C) ont été préparés. Avant le début des expositions, les escargots ont été acclimatés pendant 2 j. Les escargots des conditions **Eau** et **Biofilm et Eau** ont été exposés à 180 nM de Cd pendant 21 j et les escargots des conditions **Témoin** et **Biofilm** ont été maintenus dans des milieux sans Cd dans l'eau pendant 21 j. Les solutions d'exposition de l'eau ont été préparées à partir d'une solution stock de Cd (1000 µg/mL, 4 % HNO<sub>3</sub>, Plasma CAL). Lors du renouvellement des milieux d'exposition, réalisé tous les 2 j, 20 mL d'eau ont été prélevés dans chaque microcosme pour une analyse de pH et 500 µL pour une analyse des concentrations en Cd par ICP-MS. Les escargots ont été nourris une fois par jour avec 1,5 mL de biofilm témoin (non contaminé) pour les conditions **Témoin** et **Eau** et avec 1,5 mL de biofilm contaminé pour les conditions **Biofilm** et **Biofilm et Eau**. Toutes les 12 h (toutes les 4 h en journée) la présence d'individu mort était vérifiée. Les escargots morts étaient retirés des microcosmes. À la fin de la période d'exposition, le corps mou des escargots a été extrait pour les analyses de bioaccumulation, d'AG et d'expression de gènes (plusieurs individus par aquariums ont été dédiés à chaque type d'analyse).



**Figure 9 : Schéma et photos du design expérimental de l'exposition des escargots sur 21 jours.**

## **2.5 Analyses des échantillons**

### **2.5.1 Dosage du Cd dans l'eau par ICP-MS**

L'appareil pour les mesures du Cd dans les milieux d'exposition et dans le biote était de la marque Thermo instrument, modèle Xseries2 (usiné en 2011). La spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) est une technique d'analyse permettant de détecter la plupart des éléments du tableau périodique et de les quantifier. Elle est composée de deux parties : la chambre à plasma et le spectromètre optique. Dans la chambre à plasma se situe une torche faite de trois tubes en quartz concentriques, un plasma est créé en utilisant de l'argon (Ar) avec une température de torche qui varie entre 1000 et 6000 K. Dans ce plasma, l'échantillon est injecté sous forme de nuage de fines gouttelettes grâce à un nébuliseur et se heurte aux électrons et ions chargés et se brise en éléments constitutifs. Ensuite, ces éléments perdent et récupèrent des électrons de façon répétée, émettant ainsi une radiation caractéristique de l'élément. La deuxième partie, soit le spectromètre, permet de séparer les ions en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ) et un détecteur reçoit un signal proportionnel à la concentration en ions. L'appareil utilisé comprend une pompe d'injection de l'échantillon, couplé à un échantillonneur automatique. La pompe travaille à un débit constant et préalablement fixé. Un étalon interne est ajouté dans une concentration fixe et connue en même temps que l'échantillon afin de vérifier le bon fonctionnement de l'appareil. Ici, les étalons internes sont du rhodium (Rh) et du rhénium (Re). Afin de réaliser ces analyses convenablement, une gamme étalon a été mise en place. Toutes les solutions étaient acidifiées à 0,2 % HNO<sub>3</sub>. Les concentrations de Cd dans l'eau ont été mesurées (en triplicatas) par ICP-MS afin de vérifier les concentrations d'exposition, la limite de détection calculée pour le Cd est de 0,085 nM. La gamme standard est réalisée à partir d'une solution mère de Cd (PlasmaCAL, 1002 ± 4 µg/mL) par dilution. Des contrôles de solutions certifiées (900Q30- 100, Plasma CAL, SCP Science) et des blancs analytiques sont analysés tous les 12 échantillons afin de détecter des éventuelles variations de sensibilité de l'appareil pendant les analyses et ainsi de normaliser le signal via une macro sous Excel.

### **2.5.2 Digestion et dosage du Cd dans les biofilms et les escargots**

Douze échantillons de biofilm par condition (n=12) (trois échantillons par microcosme) ainsi que des échantillons de référence certifiés d'algues IAEA-450 (International Atomic Energy Agency Department of Nuclear Sciences and Applications) ont été utilisés pour doser la quantité de Cd bioaccumulé. Pour les escargots, six échantillons par condition ainsi que des échantillons de références certifiés de mollusque TORT-1 (hépatopancréas de Homard, Conseil national de

recherches Canada) ont été analysés. Les échantillons congelés ont été lyophilisés puis digérés d'après le protocole adapté de Borgmann et al. (2001) et Croteau et al. (2001). Brièvement, 100  $\mu\text{L}$  d'acide nitrique par mg de poids sec ont été ajoutés pour une période de 48 h, puis 40  $\mu\text{L}$  de peroxyde d'hydrogène par mg de poids sec ont été ajoutés pendant 24 h. Les digestats ainsi obtenus ont été dilués par ajout de 1 mL d'eau ultra-pure par mg de poids sec. Les échantillons ont été conservés à 4 °C jusqu'au jour de l'analyse à l'ICP-MS. Les concentrations totales en Cd dans le biofilm et dans les tissus d'escargots ont été dosées et la concentration finale de Cd par volume de digestat a été divisée par le poids sec de biomasse afin d'obtenir la concentration molaire par gramme de poids sec. Les échantillons de références certifiés ainsi que des blancs de digestions ( $n = 3$ ) ont subi le même processus de digestion. La récupération moyenne ( $n = 3$ ) de Cd dans les échantillons de TORT-1 était de  $77 \pm 18 \%$  et de  $68,8 \pm 0,8 \%$  pour les échantillons IAEA-450. Aucune correction n'a été réalisée.

### **2.5.3 Analyses des acides gras**

Pour une biomasse de 100 mg (biofilm ou corps mou des escargots), 21 mL d'un mélange chloroforme/méthanol (2 V : 1V) ont été ajoutés. Pour des biomasses inférieures à 100 mg, le volume chloroforme/méthanol a été ajusté. Avant l'homogénéisation des échantillons (deux minutes à l'UltraTurrax), 20  $\mu\text{L}$  de standard interne (C23:0) ont été ajoutés afin de contrôler les pertes au cours des différentes étapes d'extraction. L'ajout de 5 mL de NaCl (0,73 %) a ensuite permis la précipitation des protéines et des débris cellulaires. Après une centrifugation (Sorvall RC5C Plus, 3000 rpm, 4 °C, 15 min), la phase inférieure contenant les lipides totaux a été transférée dans des tubes de Turbovap (Zymark) pour concentrer les échantillons sous un flux d'azote (40 °C à 14 psi). La solution ainsi obtenue a été transférée dans des tubes avec 2 mL de Boron trifluoride ( $\text{BF}_3$ ) puis incubée dans un bain-marie à 75 °C pendant 60 min. Cette étape de méthylation rend les AG plus volatils et facilite leur analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID, Agilent 7890B -FID).

Une série de trois extractions des esters méthyliques d'AG (EMAG) par échantillon (un échantillon = un individu = un répliqua) a été réalisée par ajout de 3 mL d'eau ultra pure et 3 mL d'éther de pétrole pour récupérer le maximum des EMAG (contenus dans la phase supérieure). La totalité de l'échantillon obtenu a été évaporée au Turbovap (TurboVap II, Caliper Life Science) (40 °C à 14 psi) et les EMGA ont été suspendus dans 450 mL (ou 250 mL pour le biofilm) d'hexane pour être ensuite analysés par GC-FID muni d'une colonne Agilent DB-FATWAX UI (30 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$ ). Le programme de température du GC-FID suivait différents paliers : 40 °C pendant 2

min, 175 °C pendant 20 min à un taux de 55 °C/min, puis jusqu'à 275 °C pendant 25 min à un taux de 10 °C/min. L'hélium ou l'hydrogène ont été utilisés comme gaz porteur. Les pics obtenus ont été identifiés en fonction de leur temps de rétention en les comparant à des échantillons de référence (*mixtures of 37 fatty acids, NHI-F, fatty acid methyl ester mix, AGPI NO.2, animal source and fatty acid methyl esters kit* (Sigma-Aldrich, Canada)). Le profil en AG d'un échantillon est présenté sous forme de pourcentage par rapport à la totalité des AG identifiés.

### **2.5.1 Détermination des gènes d'études pour le biofilm**

L'effet du Cd au niveau cellulaire a été étudié en déterminant le niveau d'expression d'ARNm de certains gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, la photosynthèse ainsi que deux gènes de référence qui codent respectivement pour l'actine (*act*) et la protéine 7 de la grande sous-unité ribosomale 60S (*rpl7*). Des amorces universelles, préalablement conçues pour une étude réalisée au sein du laboratoire EPOC, ont été utilisées. Ces amorces (Tableau 4) généralistes, déterminées dans des régions très conservées, ciblent les espèces de diatomées et d'algues vertes présentes au sein du biofilm. Les amorces utilisées lors des analyses qPCR sur les échantillons de biofilm ont été préalablement testées. Pour cela, une plaque test de qPCR a été réalisée en utilisant une série de dilutions (de 10 à 100 000) d'un groupe ADNc comme cible. L'efficacité (E) est définie par  $E = 10^{-1/p}$  avec une pente (p) obtenue par la fonction linéaire suivante : nombre de cycle = p\*log (concentration en ADNc) + b. Nos amorces avaient toutes des efficacités comprises entre 74 et 105 %. Les gènes de référence avaient des temps de sortie similaires entre les conditions témoin et contaminée au Cd et semblent donc être des gènes de référence pertinents.

Tableau 4 : Amorces utilisées pour les analyses transcriptionnelles sur le biofilm.

Gènes	Numéro d'accension GenBank	Efficacité
<b>Reference</b>		
<i>act</i>	HM449707	105
<i>rpl7</i>	CM000639	78
<b>Photosystème</b>		
<i>psa</i>	HM449705	87
<i>d1</i>	HM449711	103
<b>Métabolisme mitochondrial</b>		
<i>cox1</i>	HM449704	105
<i>nad5</i>	HM449708	/
<i>12s</i>	HM 449710	90

### 2.5.2 Taxonomie moléculaire

Ne connaissant pas avec certitude l'espèce d'escargot d'eau douce utilisée dans ce projet, une démarche de phylogénie moléculaire a été réalisée. Trois régions de l'ADN classiquement utilisées en phylogénie moléculaire ont été ciblées ; une portion du gène de l'ARN 18S, la région ITS (*Internal Transcribed Spacer*) et le gène mitochondrial *cox1* codant pour la sous-unité 1 de la cytochrome c oxydase. Dans un premier temps, les séquences de ces gènes disponibles dans les banques de données pour des espèces phylogénétiquement proches ont été rapatriées en interrogeant le site du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Les séquences obtenues ont été alignées grâce au logiciel ClustalW. Nous avons déterminé, dans les régions conservées mises en évidence par ces alignements, des couples d'amorces utilisables en PCR. Ces couples d'amorces ont été utilisés pour obtenir les régions correspondantes aux gènes ciblés chez notre escargot. Les amplifications PCR ont été séquencées par la société Eurofins Genomics (plateforme GATC Biotech, Europe). Les séquences nucléotidiques de ces régions obtenues à partir de nos échantillons ont été soumises à une recherche d'homologie via les algorithmes Blastn et Blastx. Les résultats d'homologie sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Recherche d'homologie sur les échantillons d'escargots.

Espèce	Pourcentage d'homologie	Numéro d'accèsion séquence
<b>Séquence du gène 18s</b>		
<i>Lymnaea diaphana</i>	98,38	JF909497.1
<i>Lymnaea cousini</i>	98,38	FN598151.1
<i>Pseudosuccinea columella</i>	98,38	JN614358.1
<i>Radix peregra</i>	98,38	JN614356.1
<i>Radix natalensis</i>	98,38	JN614355.1
<b>Séquence du gène Cox1</b>		
<i>Radix natalensis</i>	98,04	JN614403.1
<i>Radix rubiginosa</i>	95,84	MH189925.1
<i>Radix sp.</i>	95,35	MH319870.2
<i>Lymnaea natalensis</i>	90,95	HG977206.1
<b>Séquence ITS</b>		
<i>Radix natalensis</i>	96,55	HQ283257.1
<i>Radix auricularia</i>	96,55	HG932019.1
<i>Radix labiata</i>	96,55	HG932023.1

Les espèces présentant les plus forts pourcentages d'homologies nous permettent de déterminer que notre espèce d'escargot n'est pas une espèce du genre *Physa* comme nous le pensions initialement, mais qu'elle appartient plutôt à la famille des Limnées (genres *Lymnea* et *Radix*). Cependant, nous ne pouvons pas déterminer précisément le nom de notre espèce, car ces séquences pour les gènes 18S, ITS et *cox1* ne sont actuellement pas disponibles dans les banques de données.

### 2.5.3 Détermination des gènes d'études pour les escargots

L'effet du cadmium au niveau cellulaire a été étudié en déterminant la surexpression ou la sous-expression de certains gènes impliqués dans les voies de synthèse d'AG et la réponse au stress oxydant. Les séquences nucléiques des gènes d'intérêt que nous avons ciblées n'étant pas disponibles pour notre espèce dans les banques de données, nous avons réalisé leur caractérisation chez notre espèce d'escargot. Pour cela, les séquences des gènes d'intérêt



Les amorces déterminées ont été utilisées sur de l'ADNc obtenu à partir des ARN totaux extraits des échantillons d'escargots. Une migration des produits PCR sur un gel d'agarose à 1 % a été réalisée. Si la bande observée était suffisamment forte et de taille attendue, le produit d'amplification PCR était envoyé pour être séquencé par la plateforme GATC Biotech. Les séquences ainsi obtenues ont été comparées aux banques de données via l'algorithme Blast afin de vérifier qu'elles correspondaient aux gènes ciblés. Pour les gènes correctement caractérisés, des amorces spécifiques utilisables en PCR quantitative ont été déterminées à l'aide du logiciel Primer3plus (Tableau 6). Les amorces utilisées lors des analyses qPCR sur les échantillons d'escargots ont été au préalable testées. Une plaque test de qPCR a été préparée en utilisant une série de dilutions (de 10 à 100 000) d'ADNc témoin comme cible. Nos amorces avaient toutes des efficacités supérieures à 95 %. De plus, les gènes de référence choisis avaient des temps de sortie similaires entre les témoins et les différentes conditions et semblent donc être des gènes de référence pertinents. Les séquences sont en cours de dépôt dans la GenBank (nous n'avons pas encore de numéros d'accession).

**Tableau 6 : Amorces pour la qPCR acquise avec le logiciel Primer3plus pour l'analyse transcriptionnelle chez les escargots**

Gènes	Amorce sens	Amorce anti-sens	Taille amplicon	Efficacité
<b>Gènes de références</b>				
Protéine ribosomale L13 de la sous-unité 60S ( <b>rpl13</b> )	GCTCCAAGACCTGTAGCTGG	GATGCCAATAGTGCGTGCA G	506 pb	96
Facteur d'élongation alpha-1 ( <b>ef1-α</b> )	CCTTGCCTACACCCTTGAG	TACGTTCAATGGACCAGCC C	799pb	97
Actine ( <b>act</b> )	TCTGGTCGTACCACCGGTAT	TCAAGGGCAACGTAGCAGA G	578 pb	95
Petite sous-unité ribosomale 40S ( <b>18 s</b> )	GAAGGAATCAGCGTGGATG C	GCCCGTCGCTACTATCGAT T	432 pb	97
<b>Métabolisme mitochondrial</b>				
Sous unité 1 cytochrome C oxydase ( <b>cox1</b> )	AAGAGCTGTCCATTCTGGG	CAGTATGGCCTGGTCAGCA A	410 pb	105
Aconitate hydratase ( <b>acoa</b> )	TCCCTTTATTAATTGGGGCT CCA	TGGACCTCTTAGTGGCGGA T	782 pb	101
Petite sous unité ribosomale mitochondriale ( <b>12s</b> )	AAAAGACGAGAAGACCCTTA GAA	AGTCCAACATCGAGGTCAC A	375 pb	96
<b>Réponse au stress oxydant</b>				
Catalase ( <b>cat</b> )	GGTAACTGGGACCTTGTGG G	GTACAGGAATGCCAGCTGG T	444 pb	Aucune amplification
Superoxyde dismutase Cuivre ( <b>sod Cu</b> )	ATAAGGCTCATGGGGTCTCT	GCACCACTAAACTCTGCC A	276 pb	97
<b>Détoxication</b>				
Multi-Drogue-Résistance 1 ( <b>mdr</b> )	TGGGGACAATTCACGAGTGG	TCTCTGTTTCTGCCACCAC	1114 pb	95
<b>Synthèse des Acides gras</b>				
Élongation d'acides gras a longues chaînes 6 ( <b>elvol6</b> )	AACCATGAACCATCACGGAT	CCCCTGCAACACACTTCT T	359 pb	100
Acyl-CoA désaturase 1 ( <b>fads1</b> )	TCTTCTTGACCACCGCTTC	GCAATAGCTTGCCAATCC C	498 pb	95
Stearoyl-CoA désaturase ( <b>scd</b> )	GACGGGGCATGCAAAACATT	ACGTATGCCACATCCACAG G	449 pb	96
Acide gras synthétase ( <b>fasn</b> )	AAGCCAGATTGCCACTGAGA	AGCCAGCCCATATGAGCAA A	735 pb	96

#### 2.5.4 Extraction de l'ARN-Escargots

L'extraction des ARN totaux des échantillons d'escargots a été réalisée avec un kit SV *Total RNA Isolation System* de chez Promega. Entre chaque étape de la manipulation, les tubes ont été conservés dans la glace. La moitié du corps mou des escargots a été récupérée afin d'être broyée dans des tubes de broyage (*RNase* et *Dnase free*) remplis avec 0,5 mg de billes en céramique (MP Biomedicals™, *Lysing Matrix Bulk*) dans lesquelles étaient ajoutés 500 µL de *RNA Lysis Buffer* (contenant du Thiocyanate de guanidine qui permet de protéger les ARN en inhibant les *Rnase* et de β-mercapto-éthanol qui linéarisent les protéines en cassant les ponts disulfure). Le broyage a été réalisé avec un Fast-prep (Biorad, 4 mouvements/s, 40 s). Puis, 500 µL de phénol-chloroforme-alcool isoamylique 25:24:1 (Fisher Chemicals) ont été déposés et les tubes ont été homogénéisés 10 s au vortex avant d'être centrifugés (Eppendorf 5417, 13500 rpm, 5 min, 25 °C). Cette étape permet de séparer les protéines hydrophobes et amphiphiles (phases inférieures) de l'ADN génomique et des ARN totaux présents dans la phase supérieure. Cette phase aqueuse contenant les acides nucléiques a ensuite été mélangée (Vortex 1x10 s) avec 450 µL d'éthanol (75 %, *RNase free*) dans de nouveaux tubes, puis transférée sur colonne d'affinité. L'éthanol permet ici de favoriser les liaisons ioniques entre l'ARN/ADN et la colonne d'affinité. Une centrifugation (Eppendorf 5417, 13 500 rpm, 5 min, 25 °C) est ensuite réalisée (ADN/ARN sur la colonne et filtrat retenu dans le réceptacle).

Un lavage a ensuite été effectué avec 600 µL de solution de *RNA Wash*, suivi d'une centrifugation à 13 500 rpm (1 min, 25 °C). Une centrifugation (13 500 rpm, 2 min, 25 °C) permettait enfin de sécher les colonnes avant l'ajout de 50 µL de mix *DNase* (40 µL de *Yellow Buffer* + 5 µL de  $MnCl_2$  [25 mM] + 5 µL de *DNase* [1 U/µL] par échantillon). Les échantillons ont ensuite été placés 15 minutes au bain-marie à 37 °C, température optimale pour l'activité de dégradation de l'ADN par la *DNase*. Un volume de 200 µL de solution de *DNase stop* a été ajouté afin d'arrêter la réaction. Une centrifugation (13500 rpm, 1 min, 25 °C) a ensuite été réalisée afin d'éliminer les débris d'ADN et la *DNase*. Puis, une succession de deux lavages *RNA Wash* et d'une centrifugation (13 500 rpm, 1 min, 25 °C) a été effectuée. Au final, l'ARN total a été élué de la colonne avec 50 µL de *Nuclease-Free Water* et centrifugé (13 500 rpm, 1 min, 25 °C). La concentration en ARN purifié a été lue par spectrophotométrie (Biotek®) afin d'estimer la pureté des acides nucléiques et la quantité d'ARN extraits. L'absorbance à 260 (absorbance de l'ADN) et à 280 nm (absorbance de l'ARN) a été mesurée simultanément pour chaque échantillon (goutte de 2 µL). L'ARN est jugé pur lorsque le ratio de l'absorbance à 260 nm sur l'absorbance à 280 nm est supérieur à 1,8. Les ARN purifiés récoltés ont été stockés à -80 °C.

### 2.5.5 Extraction de l'ARN-Biofilm

L'extraction des échantillons de biofilm a été réalisée avec un kit SV *Total RNA Isolation System* de chez Promega. Entre chaque étape de la manipulation, les tubes ont été conservés dans la glace. Une première centrifugation (6000 rpm, 5 min, 25 °C) a permis d'extraire le liquide de conservation (*RNA/ater*) des échantillons de biofilm. Le culot de biofilm a été repris dans des tubes de broyages *safelock* (*RNase* et *Dnase free*) avec 1 mL de Trizol (*TRI reagent solution*, Invitrogen). Un volume de 200 µL de billes en verre (0,10 à 0,11 mm de chez B. Braun Biotech International) a été ajouté avant l'étape de broyage au Fastprep (Biorad, 4 mouvements/s, 1 x 40 s). Puis, 200 µL de chloroforme (Fisher Chemicals) ont été déposés et les contenus des tubes ont été homogénéisés 10 s au vortex avant d'être centrifugés (13 500 rpm, 5 min, 25 °C). La suite des étapes est détaillée dans le protocole d'extraction d'ARN des escargots (2.5.4).

### 2.5.6 Transcription inverse

La transcription inverse a été réalisée à partir d'un kit *GoScript Reverse Transcription System* de chez Promega. Entre chaque étape de la manipulation, les tubes ont été conservés dans la glace. Une étape préliminaire de dilution dans de l'eau (*Nuclease Free*) pouvait s'appliquer si la concentration en ARN dépassait 0,1 µg/µL. Par la suite, 1 µL d'oligodT et 1 µL d'hexaprimer (amorces se fixant sur l'ADNc, chacune étant à 10 µM) ont été déposés dans des microtubes contenant les ARN purifiés (1 µg dans 10 µL). Les ARN ont été placés 5 min à 70 °C et 5 min à 4 °C dans un thermocycleur afin de les linéariser. Ont ensuite été ajoutés 8 µL de solution contenant 4 µL de *Goscript 5x reaction buffer* (tampon d'activité 5x), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (à 25 mM), 1 µL de *PCR Nucleotide Mix* (dNTP à 10 mM), 0,5 µL de *Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor* et 1 µL de *GoScript Reverse Transcriptase* (1 U/µL). Au thermocycleur, un cycle à 25 °C pendant 5 min permet l'hybridation des amorces et un cycle à 42 °C pendant une heure permet la synthèse du brin complémentaire. Les ADNc ont été conservés à -20 °C pour la recherche de gènes en PCR classique ou une quantification du niveau d'expression de gènes cibles par qPCR.

### 2.5.7 Amplification par PCR classique

L'amplification a été réalisée à partir d'un kit GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase de chez Promega. Les ADNc (1 µL à 1 µg/mL) obtenues à partir des ARN extraits des échantillons d'escargots/biofilm ainsi que les amorces sens et anti-sens (1 µM/amorce) ont été repris dans un mélange contenant 1 µL de dNTP (10 mM), 3 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 10 µL de tampon d'activité 5X, 0,2 µL d'enzyme *Taq* polymérase (5 U/µL) et 33,8 µL d'H<sub>2</sub>O. Les échantillons ont été placés

au thermocycleur pour suivre un cycle classique de PCR : une étape de dénaturation à 95 °C pendant 1 min (passage de double brin à simple brin), une étape d'hybridation des amorces au  $T_m$  (-2 °C) pendant 1 min et enfin une étape d'élongation à 72 °C (température optimale pour la *Taq*) durant 1 min. Ce cycle était répété 40 fois.

### **2.5.8 Migration sur gel**

Un gel d'agarose 1 % p/v a été réalisé en faisant chauffer 1,5 g d'agarose (Sigma) et 150 mL de tampon TAE 1X, jusqu'à l'obtention d'un liquide parfaitement homogène. Lorsque la température du liquide était proche de la température ambiante, 1,6 µL de BET (Promega, *Ethidium Bromide Solution*) a été ajouté. Une fois le gel refroidi, 5 µL de marqueur de taille (Promega, 1 Kb DNA Ladder) ont été ajoutés dans les puits situés en début, milieu et fin de gel. Dans les autres puits ont été ajoutés un mélange de 7 µL de produits PCR et 3 µL de tampon de migration (Promega, *Blue/Orange Loading Dye*, 6X). Après une migration (Biorad–PowerPar200, 100 V, 60 min), le gel a été visualisé sous UV (Biorad-Universal Hood II, Trans UV), et pris en photo via le logiciel Quantity One. Lors des tests d'amorces qui ont été effectués, certaines bandes étaient trop faibles pour être séquencées. Une PCR avec une étape d'hybridation moins spécifique ( $T_m$  -4 °C) a permis d'augmenter l'amplification. Lorsque l'amplification n'était toujours pas suffisante, une PCR sur les produits de PCR ou un clonage par plasmide pGEM T (voir section 2.5.9) et transformation bactérienne a été réalisée (voir section 2.5.10). Lorsque plusieurs bandes étaient observées, la température d'hybridation était augmentée, ou bien la bande d'intérêt était extraite du gel et purifiée (voir protocole chapitre 2 section 2.5.11). Si aucune bande n'était observée après avoir appliqué ces méthodes, de nouvelles amorces étaient conçues.

### **2.5.9 Clonage — plasmide pGEM®-T Vector**

Les fragments obtenus par extraction et purification des bandes d'intérêt sur gel ont été clonés à l'aide du Kit Ligation pGEM®-T Vector de chez Promega. Dans un tube de 0,2 mL, 5 µL de tampon d'activité 2X, 1 µL de T4 ligase (1 U) et 3 µL de fragments purifiés ont été mélangés aux plasmides (1 µL de pGEM-T à 50 ng/µL). Une incubation pendant une heure à température ambiante et une nuit à 4 °C ont été nécessaires. Le plasmide pGEM-T est schématisé à la figure 11.

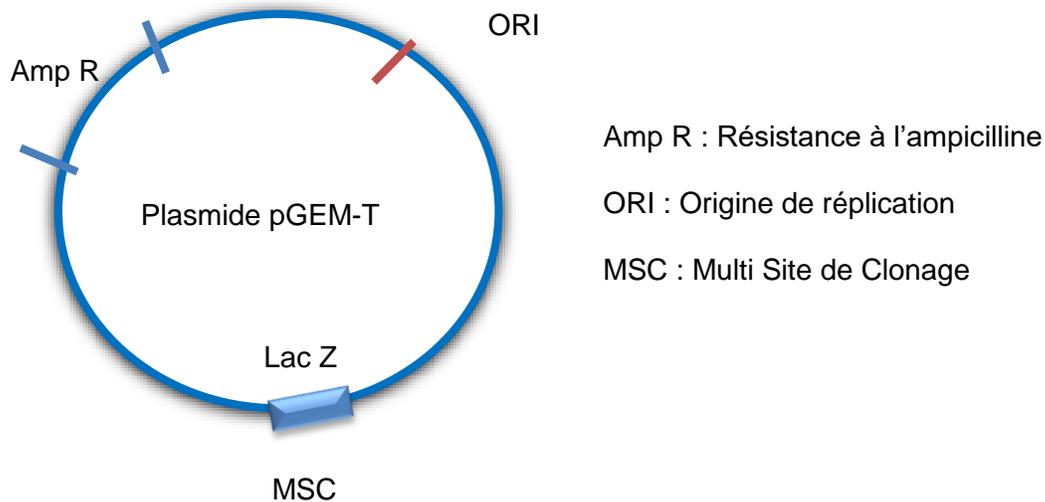


Figure 11 : Schéma du plasmide pGEM-T fonctionnel.

### 2.5.10 Transformation bactérienne

Dans un tube eppendorf de 1,5 mL, 50  $\mu$ L de bactéries (TOP10, bactérie compétente dont la paroi est fragilisée par un traitement au chlorure de rubidium) ont été incubés 30 min sur glace avec 2  $\mu$ L de mélange de ligature (contenant des plasmides pGEM-T avec insert). Un choc thermique (30 s à 42 °C) permet l'internalisation des plasmides dans les bactéries, qui sont piégés lorsque la température diminue (incubation 2 min sur glace). L'expression phénotypique (multiplication du plasmide et expression du gène de résistance à l'ampicilline) a lieu lors de l'incubation (Stuart Scientific, Orbital Incubator, à 37 °C, 60 min) dans 950  $\mu$ L de milieu de culture LB (Conda, LB Broth Lennox).

Sur boîte de pétri (Conda, LB Agar à 35 g/L + milieu de culture Conda, LB Broth + Sigma, Ampicilline à 100  $\mu$ g/L), 200  $\mu$ L de solution de bactéries ont été étalés. Pour que la croissance bactérienne soit optimale, elles ont été incubées une nuit à 37 °C (Jouan Paris, série E1). Le lendemain, les colonies ont été récoltées et remises en cultures dans 3 mL de milieu de culture LB liquide + ampicilline (100  $\mu$ g/L) puis incubées 37 °C, 3 h (Stuart Scientific, Orbital Incubator S150). Une PCR avec 5  $\mu$ L de culture et des amorces T7 et Sp6 a été réalisée (Promega, kit *GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase*). Une migration sur gel d'agarose a permis d'identifier les cultures ayant intégré l'insert.

### 2.5.11 Extraction sur gel des produits PCR

Les produits PCR ont été extraits du gel à l'aide d'un kit d'extraction (QIAquick® *Gel Extraction kit*). Les bandes d'intérêt ont été excisées du gel d'agarose avec un scalpel puis pesées. Dans un tube eppendorf, trois volumes de tampon QG pour un volume de gel ont été ajoutés, puis les tubes ont été incubés à 50 °C pendant 10 min. Les solutions auxquelles a été ajouté un volume de gel d'isopropanol ont été insérées dans un tube contenant une colonne d'affinité puis centrifugées (13000 rpm, 1 min, 25 °C). Les étapes de lavage ont été réalisées avec 750 µL de tampon PE suivi d'une centrifugation (13000 rpm, 1 min, 25 °C). L'ajout de 50 µL de tampon EB (10 mM Tris-Cl) et une centrifugation (13000 rpm, 1 min, 25 °C) ont permis l'élution de l'ADN.

### 2.5.12 qPCR

La PCR quantitative mesure en continu la quantité d'ADN formés en utilisant un agent intercalant ; le SybrGreen (seules les molécules intercalées dans les brins fluorescent). Au fil des amplifications, le nombre de doubles brins d'ADN formés augmente, entraînant une augmentation de molécules intercalées. Il y a ainsi un lien proportionnel entre la quantité de fluorescence émise et la quantité d'amplicons produits lors de la PCR. La qPCR a été réalisée avec un kit GoTaq®qPCR *Master Mix* de chez Promega. Un puits de la plaque (96 puits) contenait :

- 5 µL d'ADNc dilués au 10e dans de l'eau (*Nuclease Free*).
- 13 µL de réactif (10 µL de tampon 2X et 3 µL d'eau ultra pure).
- 2 µL de solution amorce [2 µM] (2 µL amorce sens + 2 µL anti-sens et 96 µL d'eau ultra pure).

La plaque remplie a été centrifugée (maximum de 15 s) puis placée dans l'appareil de mesure. Le LightCycler 480 (Roche) commence par chauffer la plaque à 95 °C pendant 2 min afin d'activer la *Taq* polymérase. Cet instrument de mesure permet d'une part la réalisation de cycle de PCR (95 °C, 15 s ; 60 °C, 1 min) et d'autre part de mesurer l'émission de fluorescence à la fin de chaque cycle. Ceci permet de déterminer, pour chaque gène à amplifier, le nombre de cycles nécessaires pour atteindre un signal de fluorescence significativement plus élevé que le bruit de fond (le point Ct). Si la quantité de matrice à amplifier au départ est élevée, il y a aura besoin de moins de cycle de PCR pour atteindre ce point. Donc en théorie  $N_n = N_0 \cdot 2^n$  avec  $n$  = le nombre de cycles PCR et  $N_0$  = la quantité de matrices initiales. A la fin de chaque PCR et pour chaque gène d'intérêt, l'allure de la courbe de fusion du produit PCR obtenu a été vérifiée. Celle-ci est obtenue par une montée en température graduelle de 60 à 95 °C avec une prise de fluorescence

continue. L'amplification est spécifique si la courbe est unimodale et qu'à partir de la dérivée primaire de la courbe on peut retrouver le  $T_m$  spécifique du gène. Le niveau d'expression de chaque gène a été déterminé par rapport à celui de gènes de référence (*βact*, *ef1α* et *rpL13*) dont l'expression est stable et ne présente pas de variation en fonction des traitements expérimentaux appliqués. La différence de  $C_t$  références (moyenne des gènes de référence) et le  $C_t$  des gènes d'intérêts a été calculée selon la méthode décrite par Livak et Schmittgen (2001) (Équation 5).

$$\Delta C_t = C_t \text{ gène ciblé} - C_t \text{ gène de référence}$$

**Équation 5 : Calcul de la différence entre les points de dépassement ( $C_t$ ) des gènes d'intérêt et des gènes références.**

La comparaison des  $\Delta C_t$  des conditions exposées aux  $\Delta C_t$  des conditions témoins permet de mettre en évidence une possible perturbation de processus biologiques suite à ces expositions. Le calcul d'un facteur d'induction rend compte de ces perturbations (Équation 6).

$$FI = \frac{2 - \Delta C_t \text{ contaminé}}{2 - \Delta C_t \text{ témoin}}$$

**Équation 6 : Calcul du facteur d'induction d'un gène d'intérêt.**

## 2.6 Traitements statistiques

Les logiciels Sigma Plot et XLSTAT ont été utilisés pour toutes les analyses statistiques de ces travaux. Pour comparer les niveaux de bioaccumulation et les pourcentages en AG du biofilm entre la condition témoin et exposée au Cd, des tests de Student à variance égale ou inégale ont été utilisés. Lorsque la distribution des données ne suivait pas une loi normale (tests de Kolmogorov-Smirnov) un test non paramétrique de Mann Whitney a été appliqué.

Afin de comparer les concentrations en métaux mesurées dans l'eau des microcosmes des escargots, des ANOVA sur les rangs ont été utilisées (test non paramétrique de Kruskal-Wallis). L'analyse du Cd bioaccumulé et des profils en AG des escargots a été réalisée en utilisant une ANOVA à deux facteurs. Lorsqu'un facteur est significatif, une comparaison multiple par paires est appliquée (test de Tukey). Ceci permet de déterminer quels traitements sont significativement différents les uns des autres.

Enfin, pour les analyses transcriptomiques, des tests non paramétriques de Mann Whitney ont été utilisés afin de mettre en évidence des différences significatives d'expression des gènes cibles par rapport aux individus de la condition témoin.



### **3 CHAPITRE 3 : TEST PRÉLIMINAIRE POUR LE CHOIX DU MÉTAL D'EXPOSITION (Ni)**

---

La première étape du projet a été le choix du métal d'exposition et la détermination de la concentration d'exposition. Cette dernière doit être une concentration sublétale permettant d'observer des effets sur le biofilm et les escargots (comme la modification des profils en AG, l'expression de certains gènes, etc.). Ce projet fait suite aux travaux de Mariem Fadhlouï, qui ont mis en évidence les effets d'une exposition à un gradient de concentrations de nickel (de 0,5  $\mu\text{M}$  à 105  $\mu\text{M}$ ) sur les profils en AG du biofilm (Fadhlouï et al., 2020). Les effets du Ni, à une gamme de concentrations similaire aux travaux précédemment effectués sur le biofilm, ont été étudiés sur les escargots via des expositions chroniques en microcosmes.

#### **3.1 Exposition des escargots au Nickel de 10 à 70 $\mu\text{M}$**

Le dispositif expérimental de cette première exposition consiste en trois microcosmes indépendants par concentration testée (10, 20, 30, 50 et 70  $\mu\text{M}$  de Ni), ainsi que trois microcosmes témoins. Chaque microcosme contenait dix escargots de poids moyen de  $180 \pm 6$  mg de poids frais. Les solutions d'exposition au Ni ont été préparées à partir d'une solution mère ( $1002 \pm 4$   $\mu\text{g Ni/mL}$ , 4 %  $\text{HNO}_3$ , PlasmaCAL). Les solutions d'expositions ont été neutralisées avec une solution de NaOH. Les témoins ont été maintenus dans 1,5 L d'eau déchlorée (pH = 7,2, T = 20 °C, 7 j). Lors du renouvellement des milieux d'exposition, réalisé tous les 2 j, 20 mL d'eau ont été prélevés dans chaque microcosme pour une analyse de pH et 500  $\mu\text{L}$  pour une analyse des concentrations en Ni par ICP-MS. Toutes les 12 h (toutes les 4 h en journée) la présence d'individu mort était vérifiée. La mortalité est définie comme un manque de réactivité après une légère poussée avec une spatule et aucune mobilité observée après une isolation de 5 min dans un réceptacle rempli d'eau déchlorée. Les escargots morts étaient retirés des microcosmes.

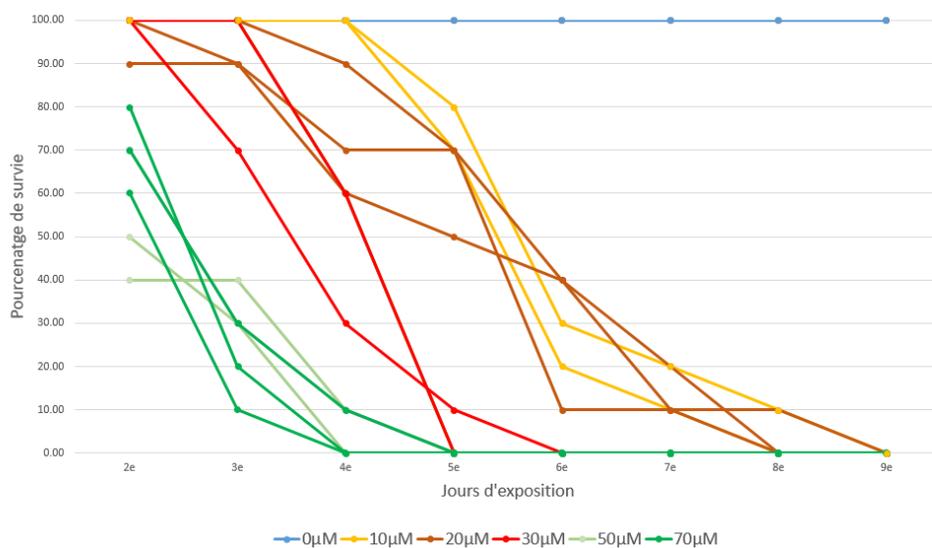
#### **3.2 Résultats**

Aucune mortalité n'a été relevée dans les microcosmes témoins tout au long de l'expérience. En condition contaminée, les premières mortalités ont été observées quelques heures après l'exposition au Ni aux concentrations les plus élevées (Figure 11). La formule appliquée pour calculer le taux de survie des escargots est la suivante :

$$\% \text{ Survie} = \frac{\text{Nombre initial d'individus} - \text{Nombre de morts cumulés}}{\text{Nombre total d'individus}}$$

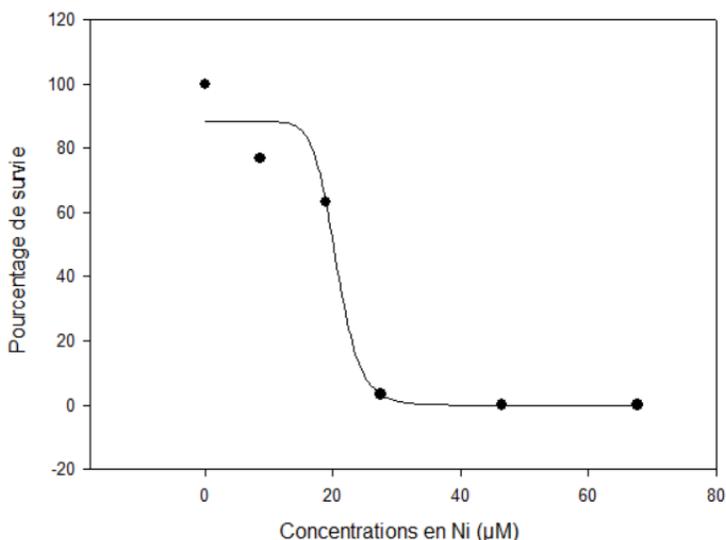
**Équation 7 : Détermination du pourcentage de survie des escargots.**

Le taux de survie des conditions témoin, 10 et 20  $\mu\text{M}$  de Ni étaient respectivement de 100 %, 76,7 % et de 63,3 % à 96 h. Le taux de survie des escargots exposés à la concentration de 30  $\mu\text{M}$  de Ni était de 3,3 %, et pour les concentrations de 50 et 70  $\mu\text{M}$  de Ni les taux de survie étaient de 0 % à 96 h. Afin de simplifier l'interprétation des observations, deux groupes ont été créés en fonction du niveau d'exposition au Ni : le groupe « témoin et 10 ; 20  $\mu\text{M}$  = stress au Ni inexistant à faible » et le groupe « 30, 50 et 70  $\mu\text{M}$  = stress au Ni élevé ». Une différence significative de survie entre ces deux groupes a été observée. La p-value étant inférieure à 0,05 ( $p = 0,0001$ ), on peut affirmer qu'il existe bien une différence significative entre le groupe « témoin/faible exposition » et le groupe exposé à un stress au Ni plus élevé.



**Figure 12 : Pourcentages de survie des escargots en réponse à une exposition au Ni en microcosmes en fonction du temps.**

La CL50 calculée à partir des taux de survie a été réalisée avec le logiciel Sigma Plot selon l'équation de Hill permettant de déterminer la concentration létale à 50 % (Figure 13). La CL50 à 96 h est de 20,5  $\mu\text{M}$  de Ni et l'erreur-type est de 2,2  $\mu\text{M}$  de Ni.



**Figure 13 : Pourcentage de survie des escargots à 96 h en fonction de la concentration en Ni ( $R^2 = 0,98$  et erreur standard = 11,6).**

Plusieurs effets sublétaux ont pu être observés au cours de l'expérience. Les limnées exposées au Ni montraient une diminution de la prise alimentaire par rapport aux témoins ; le reste de nourriture prélevée chaque jour était nettement plus important dans les microcosmes contaminés. Cette tendance s'avérait être accentuée avec des concentrations croissantes en Ni. Ce comportement peut être expliqué par une nette diminution de la mobilité des escargots placés dans l'eau contaminée. En effet, les escargots avaient un comportement d'échappement au Ni, c'est-à-dire qu'ils se retrouvaient au-dessus du niveau d'eau, fixés aux parois des microcosmes (et ne semblaient pas redescendre pour se nourrir).

Le nombre d'œufs par microcosme contaminé était nettement diminué par rapport aux témoins. Dans les microcosmes contaminés où les escargots vivaient assez longtemps pour pondre ou se reproduire (10 et 20  $\mu\text{M}$ ), quelques petits sacs d'œufs nettement plus petits que chez les témoins ont pu être récoltés. Aucun sac d'œufs n'a pu être observé dans les microcosmes dont les concentrations de Ni étaient de 30, 50 et 70  $\mu\text{M}$ .

### 3.3 Discussion

Les résultats de toxicité du Ni sur les escargots sont en accord avec la littérature, où les gastéropodes d'eau douce, en particulier les limnées, font partie des espèces d'invertébrés les plus sensibles au Ni. Dans le rapport de l'European Union Risk Assessment (2008), les concentrations efficaces à 10 % (CE10) de plusieurs espèces aquatiques ont été répertoriées (Figure 14). L'espèce de limnée *L. stagnalis* présente une des CE10 les plus faibles parmi les espèces répertoriées (European Union Risk Assessment Report - ECHA, 2008).

Taxonomic group	Species	Most sensitive endpoint	Species mean NOEC/EC10 value (µg/l)
Algae	<i>Scenedesmus accuminatus</i>	Growth rate	12.3
	<i>Desmodesmus spinosus</i>	Growth rate	22.5
	<i>Pediastrum duplex</i>	Growth rate	23.8
	<i>Chlamydomonas</i> sp <i>Ankistodesmus</i>	Growth rate	27.9
	<i>falcatus</i>	Growth rate	28.4
	<i>Chlorella</i> sp	Growth rate	42.0
	<i>Coelastrum microporum</i>	Growth rate	46.2
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Growth rate	92.7
Higher plants	<i>Lemna minor</i>	Growth	27.9
	<i>Lemna gibba</i>	Growth rate	50.0
Rotifer	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Intrinsic rate of growth	633.2
Molluscs	<i>Lymnea stagnalis</i>	Growth	6.8
	<i>Juga plicifera</i>	mortality	124.0
Cladocerans	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Reproduction	6.9
	<i>Ceriodaphnia quadrangula</i>	Mortality	7.4
	<i>Peracantha truncata</i>	Reproduction	8.0
	<i>Simocephalus vetulus</i>	Reproduction & mortality	16.3
	<i>Ceriodaphnia pulchella</i>	Reproduction & mortality	16.7
	<i>Alona affinis</i>	Mortality	25.0
	<i>Daphnia longispina</i>	Mortality	27.8
	<i>Daphnia magna</i>	Reproduction	35.6
Insects	<i>Clistronia magnifica</i>	Mortality	66.0
	<i>Chironomus tentans</i>	Biomass	458.9
Hydrozoans	<i>Hydra littoralis</i>	Growth	60.0
Amphipods	<i>Hyalella azteca</i>	Mortality	29.0
Fish	<i>Brachydanio rerio</i>	Hatchability	40.0
	<i>Pimephales promelas</i>	Growth	57.0
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Growth	134.0
Amphibians	<i>Xenopus laevis</i>	Malformation	171.6
	<i>Gastrophryne carolensis</i>	Mortality	184.9
	<i>Bufo terrestris</i>	Growth	640.0

Figure 14 : Résumé des NOEC ou CE10 en µg Ni/L répertoriés pour différentes espèces (European Union Risk Assessment Report - ECHA, 2008).

L'étude de Hommen et al. (2016) a démontré la sensibilité des gastéropodes d'eau douce au Ni lors d'exposition chronique en microcosmes. Une diminution de l'abondance des escargots totaux (*L. stagnalis* et autres espèces de petits escargots présents, mais non identifiés) a été observée à 0,43 µM et 0,85 µM de Ni après quatre semaines d'exposition et une disparition totale des escargots a été observée à 12 semaines d'exposition.

L'étude de Niyogi et al. (2014) a également montré la sensibilité de *L. stagnalis* via une exposition chronique au Ni. Au 14<sup>ème</sup> jour et 21<sup>ème</sup> jour de l'exposition, un effet sur la croissance dépendant de la concentration en Ni a été observé (avec une diminution significative de la masse corporelle). La concentration efficace à 20 % (sur la croissance des escargots) au jour 21 était inférieure à la plus faible concentration testée lors de l'exposition (0,02 µM Ni). Les auteurs ont également observé une diminution de l'internalisation de Ca<sup>2+</sup> à la plus haute concentration de Ni testé (0,29 µM) au 14<sup>ème</sup> jour et 21<sup>ème</sup> jour, ainsi qu'une concentration en Ca<sup>2+</sup> dans l'hémolymphe plus faible chez les escargots exposés à 0,29 µM de Ni en comparaison aux témoins au jour 21. Le pH de l'hémolymphe relevé chez ces escargots était nettement supérieur à celui des témoins au 21<sup>ème</sup> jour. La perturbation de l'homéostasie du Ca<sup>2+</sup> et de l'équilibre acido-basique pourrait expliquer la toxicité du Ni chez les gastéropodes. Toutefois, l'observation de ces modifications après un certain temps et l'utilisation probable par le Ni d'autres voies d'absorption que le Ca<sup>2+</sup>, laisse présager que le bouleversement de l'homéostasie du Ca<sup>2+</sup> serait un des effets secondaires du Ni. Les mécanismes impliquant le Ni de manière directe restent à étudier.

L'étude de Crémazy et al. (2020) met en lumière une variation dans les résultats de toxicité du Ni obtenus sur l'espèce de gastéropodes *L. stagnalis*. Ces études permettent de confirmer la forte sensibilité des escargots au Ni et mettent également en évidence l'importance des caractéristiques physico-chimiques de l'eau telles que la dureté et le pH dans l'évaluation de la toxicité du Ni (Crémazy et al., 2020). Afin d'investiguer les effets du Ni sur notre espèce d'escargots, il aurait été intéressant de réaliser des expositions à de plus faibles concentrations en Ni, mais également à des duretés et pH variables. Lors de ces tests de toxicité, des effets sublétaux ont pu être observés. L'observation de la nette diminution de ponte en réponse à l'exposition au Ni peut être expliquée par une diminution de la reproduction (pas d'observation de comportement reproductif au cours de l'expérience dans les conditions de stress au Ni) ou bien par une altération de la fécondité. En effet, les sacs d'œufs récoltés aux faibles concentrations (10 et 20 µM) présentaient un nombre d'œufs par sac restreint et aucun sac n'a pu être récolté aux concentrations supérieures. Suite au stress métallique, l'énergie disponible, habituellement attribuée aux processus de reproduction, pourrait être redirigée vers des processus de survie comme les mécanismes de détoxification.

Pour évaluer le transfert du Ni entre générations, une mesure de bioaccumulation de Ni par sac d'œufs pourrait être réalisée. Il serait également intéressant d'évaluer la capacité reprotoxique du Ni en réalisant un suivi quantitatif de la fécondité, comme il a pu être fait dans une étude évaluant l'effet d'un herbicide (Diuron) sur des embryons de *Physella acuta* (Lopez-Doval et al., 2014).

Dans cette étude, les auteurs ont mesuré le nombre de sacs d'œufs et le nombre d'œufs par sac et ont quantifié les malformations notoires par observations au microscope. Ces dernières pourraient même être quantifiées via un logiciel de traitement d'image tel qu' *Image J* afin d'obtenir un pourcentage de déformations par concentration de métal. Si nos résultats présentaient des effets qualitatifs de la contamination au Ni sur la mobilité des escargots, il serait également intéressant de réaliser des mesures de mobilité quantitative comme ce qui a pu être réalisé avec l'étude de Lopez-Doval et al. (2014). Les auteurs ont estimé la mobilité via la distance couverte par un escargot, placé dans une eau contaminée au Diuron, dans un temps fixe. Leur mouvement dans un périmètre de 5x5 mm (petit carré placé sous la base transparente de l'aquarium) a été surveillé et enregistré pendant 60 s.

Lors de notre expérience, nous n'avons pas pu atteindre une durée d'exposition de 28 j. Le but premier de ce projet était d'évaluer l'effet d'une contamination métallique sur le biofilm ainsi que sur un consommateur primaire. Si la période d'exposition est courte, l'évaluation de transfert métallique via la voie de contamination trophique peut être compromise. De plus, l'exposition au Ni semble avoir une influence sur le comportement des escargots, notamment sur le comportement alimentaire. Une réduction de la concentration d'exposition aurait pu compromettre nos objectifs, car d'après l'étude de Fadhlouli et al. (2020), les modifications significatives de profils en AG dans les biofilms n'apparaissent qu'à partir d'une concentration de 25  $\mu\text{M}$  de Ni dans le milieu d'exposition. Les concentrations létales à 50 % (CL50) déterminées étant inférieures à la concentration de Ni souhaitée pour la contamination des biofilms, il a été convenu de changer de métal et de se tourner vers le Cd pour lequel le biofilm semble présenter une réponse à de faibles concentrations (Arini, 2011 ; Chia et al., 2013).

## 4 CHAPITRE 4 : EXPOSITION DU BIOFILM AU CADMIUM

---

Les biofilms ont été exposés au Cd selon le protocole décrit dans la section 2.3 du document.

### 4.1 Résultats

#### 4.1.1 Concentration de Cd dans l'eau

Des prélèvements d'eau ont été effectués toutes les semaines afin de vérifier les concentrations de Cd à l'ICP-MS. La concentration moyenne ( $n = 16$ )  $\pm$  erreur type sur 28 j des quatre bacs contaminés était de  $158,3 \pm 6,7$  nM de Cd. Cette valeur est proche de la concentration nominale que nous avons choisie (180 nM).

#### 4.1.2 Bioaccumulation

La concentration moyenne ( $n = 12$ ) de Cd dans le biofilm témoin était de  $19,6 \pm 2,1$  nmol Cd/g de poids sec (PS) après 28 j d'exposition. Le biofilm contaminé au Cd (180 nM) sur 28 j présentait une concentration moyenne ( $n = 12$ ) de  $5594 \pm 582$  nmol Cd/g PS, ce qui est significativement supérieur à celle du biofilm témoin ( $p < 0,001$ ) (Figure 15).

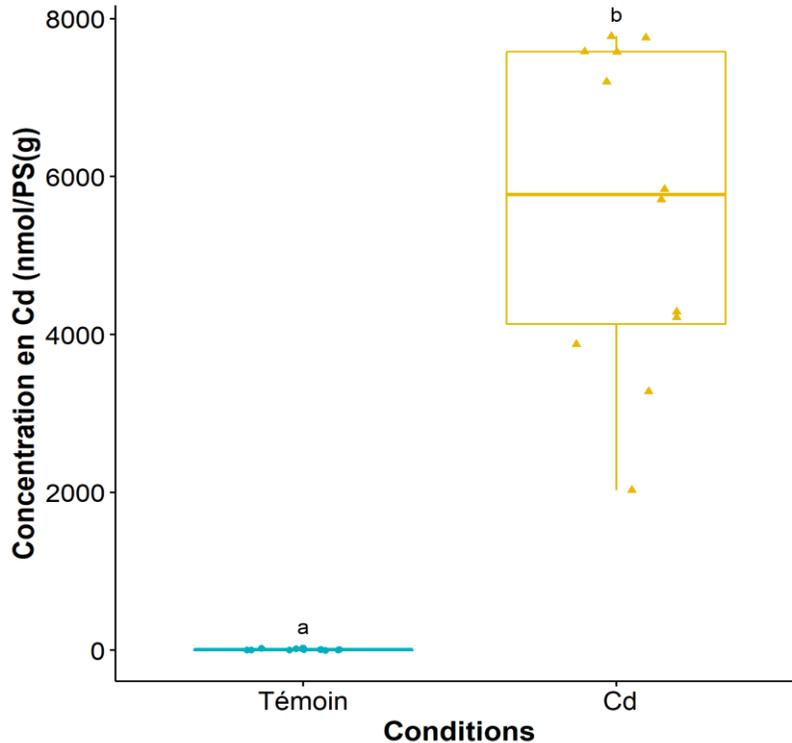


Figure 15 : Concentration moyenne  $\pm$  erreur type de Cd (nmol/g PS de biofilm) selon les conditions d'exposition du biofilm sur 28 jours. Les lettres a et b représentent la différence significative ( $p \leq 0,05$ ) de concentration en Cd existant entre le biofilm de la condition témoin et contaminé au Cd (test de Student).

#### 4.1.3 Analyse des acides gras

Le tableau 7 représente le pourcentage moyen (six échantillons/condition) de chaque AG analysé. Le biofilm exposé à 180 nM de Cd, en comparaison au biofilm témoin, présentait une différence significative ( $p$  value  $< 0,05$ ) du pourcentage des AG suivants :

- acide stéarique (C18:0) (AGS), augmentation d'un facteur de 1,5 pour le biofilm contaminé au Cd.
- (C15:1) (AGMI), augmentation d'un facteur de 2,8 pour le biofilm contaminé au Cd.
- acide  $\delta$ -linoléique (C18:3n6) (AGPI), augmentation d'un facteur de 4,5 pour le biofilm contaminé au Cd.
- acide (C18:3n4) (AGPI), augmentation d'un facteur de 3,5 pour le biofilm contaminé au Cd.
- acide eicosapentaénoïque (C20:5n3) (AGPI), diminution d'un facteur de 2,4 pour le biofilm contaminé au Cd.

Tableau 7 : Pourcentages moyens (n = 6) ± erreur type des acides gras analysés par CG-FID selon les conditions d'expositions du biofilm sur 28 jours. Les acides gras présentant des valeurs significativement différentes (test de Student) du témoin sont indiqués en rouge.

	Témoin	Cd	p-value
<b>AGS</b>			
C14:0	1,5 ± 0,2	1,8 ± 0,2	0,170
C15:0	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,0	0,649
C16:0	20,3 ± 1,6	21,0 ± 0,6	0,673
C17:0	2,1 ± 0,7	1,9 ± 0,2	0,805
C20:0	1,8 ± 0,6	1,7 ± 0,4	0,918
<b>C18:0</b>	<b>11,1 ± 1,6</b>	<b>16,1 ± 0,7</b>	<b>0,018</b>
C21:0	0,6 ± 0,3	1,0 ± 0,3	0,445
C22:0	1,6 ± 0,3	1,3 ± 0,2	0,525
C24:0	1,7 ± 0,5	1,4 ± 0,3	0,638
<b>AGMI</b>			
C14:1n5	1,3 ± 0,7	0,9 ± 0,1	0,612
<b>C15:1</b>	<b>0,4 ± 0,2</b>	<b>1,1 ± 0,2</b>	<b>0,041</b>
C16:1n7	8,7 ± 4,0	6,6 ± 0,2	0,615
C17:1	1,1 ± 0,8	1,2 ± 0,2	0,849
C18:1n9	10,3 ± 3,5	3,1 ± 0,7	0,098
C20:1n9	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,789
C18:1n7	9,2 ± 5,4	6,3 ± 0,4	0,624
C22:1n9	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,4	0,291
C24:1n9	0,3 ± 0,3	0,4 ± 0,4	0,896
<b>AGPI</b>			
C16:2n4	0,5 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,158
C18:2n6	2,7 ± 0,3	6,0 ± 1,8	0,124
C20:2n6	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,248
C22:2n6	0,4 ± 0,4	0,5 ± 0,2	0,875
C16:3n4	0,3 ± 0,1	0,9 ± 0,4	0,215
<b>C18:3n6</b>	<b>0,6 ± 0,1</b>	<b>2,7 ± 0,7</b>	<b>0,020<sup>T</sup></b>
<b>C18:3n4</b>	<b>0,2 ± 0,1</b>	<b>0,7 ± 0,2</b>	<b>0,032</b>
C18:3n3	4,4 ± 1,1	5,3 ± 1,8	0,690
C20:3n6	1,1 ± 0,6	2,4 ± 1,1	0,328
C20:3n3	3,3 ± 1,7	3,0 ± 0,6	0,872
C18:4n3	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,688
C20:4n6	0,8 ± 0,7	1,5 ± 0,9	0,561
C20:4n3	0,7 ± 0,6	0,2 ± 0,1	0,510
C16:4n1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,000
<b>C20:5n3</b>	<b>9,0 ± 1,3</b>	<b>3,7 ± 0,9</b>	<b>0,009</b>
C22:5n3	1,5 ± 0,9	1,9 ± 0,5	0,733
C22:6n3	0,6 ± 0,2	1,4 ± 0,6	0,279

<sup>T</sup> Paramètre de normalité ne correspondant pas aux exigences d'un test paramétrique de Student. Test non paramétrique de Mann-Whitney appliqué.

L'ensemble des AG mesurés a ensuite été regroupé en six catégories, selon leur degré d'insaturation (AG saturés, mono-insaturés et polyinsaturés) ou en fonction de la position de leurs doubles liaisons (oméga 3, 6 et 9).

Le tableau 8 représente le pourcentage de chaque classe d'AG dans le biofilm témoin ou contaminé, ainsi que les p-value associées. Le biofilm exposé au Cd présentait un pourcentage total en AGS plus élevé que le biofilm témoin et un pourcentage AGMI significativement plus faible. Les pourcentages d'oméga 3 étaient plus faibles dans le biofilm contaminé que dans le biofilm témoin. Le pourcentage d'oméga 6 était significativement plus élevé dans le biofilm contaminé au Cd. Les ratios AGI/AGS et oméga 3/oméga 6 étaient significativement plus faibles dans le biofilm contaminé au Cd.

**Tableau 8 : Pourcentages moyens  $\pm$  erreur type des classes d'acides gras analysés selon les conditions d'expositions du biofilm sur 28 j et les p-value associées aux tests de Student effectués. Les catégories présentant des valeurs significativement différentes par rapport au témoin sont indiquées en rouge.**

Catégories	Témoin	Cd	p-value
AGS	41,6 $\pm$ 2,3	47,6 $\pm$ 1,3	0,02
AGMI	32,2 $\pm$ 3,4	20,9 $\pm$ 1,4	0,01
AGPI	26,2 $\pm$ 2,2	31,5 $\pm$ 2,3	0,07
Oméga 3	19,7 $\pm$ 1,4	15,8 $\pm$ 1,4	0,04
Oméga 6	7,7 $\pm$ 1,6	19,3 $\pm$ 3,4	0,01 <sup>T</sup>
Oméga 9	21,8 $\pm$ 7,1	7,9 $\pm$ 1,7	0,05
AGI/AGS	2,55 $\pm$ 0,56	0,82 $\pm$ 0,18	0,03
oméga 3/oméga 6	1,41 $\pm$ 0,12	1,10 $\pm$ 0,06	0,01

<sup>T</sup> Paramètre de normalité ne correspondant pas aux exigences d'un test paramétrique de Student. Test non paramétrique de Mann-Whitney appliqué.

#### 4.1.4 Étude transcriptionnelle

Le tableau 9 représente les différents gènes analysés sur les échantillons de biofilm avec des amorces génériques. Aucune différence significative de transcription pour les gènes étudiés n'a été observée entre les conditions témoin et contaminée au Cd pour les biofilms (Tableau 9).

Tableau 9 : Niveau d'expression différentielle des gènes étudiés chez le biofilm après une exposition de 21 j au Cd. Les résultats sont exprimés sous forme de facteur d'induction par rapport à la condition témoin.

Gènes	Facteur d'induction
<b>Photosystème</b>	
<i>Protéine psa du photosystème I (psa)</i>	0,7
<i>Protéine d1 du photosystème II (d1)</i>	0,6
<b>Métabolisme mitochondrial</b>	
<i>Cytochrome C oxydase sous- unité 1 (cox1)</i>	3
<i>NADH-ubiquinone oxydoréductase chaîne 5 (nd5)</i>	0,8
<i>Petite unité du ribosome mitochondriale (12s)</i>	0,9

## 4.2 Discussion

### 4.2.1 Bioaccumulation

Le biofilm exposé à 180 nM de Cd sur 28 j a accumulé en moyenne  $5593,71 \pm 581,63$  nmol Cd/g PS. Cette concentration est en accord avec des résultats retrouvés dans la littérature. Par exemple, dans l'étude de Duong et al. (2010), du biofilm récolté en rivière et exposé en laboratoire à 890 nM de Cd a présenté une accumulation de Cd de 26110 nmol/g PS après quatre semaines d'exposition. Dans l'étude de Morin et al. (2008b), des biofilms récoltés en rivière, exposés en laboratoire à 89 et 890 nM de Cd, présentaient respectivement des concentrations en Cd de 2930 et 32920 nmol/g PS après six semaines d'exposition. Que ce soit dans des études de terrain ou de laboratoire, une étape préalable de lavage à l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) (complexant des métaux pour désorber le Cd de la surface des cellules) peut être réalisée avant l'étape de digestion. Ce lavage permet de rendre compte du Cd internalisé par les organismes du biofilm. Par exemple, dans l'étude de Morin et al. 2008b, le ratio Cd non échangeable/Cd total était de l'ordre de 0,4 pour du biofilm contaminé à 89 et à 890 nM de Cd sur 28 j. La portion du Cd non internalisé (adsorbé sur les cellules et présent dans la matrice extracellulaire) était majoritaire. Dans notre étude de transfert trophique, les escargots ingérant l'intégralité du biofilm (matrice extracellulaire comprise), il a été admis que le Cd disponible est approximé par la

quantité de Cd totale par gramme de PS de biofilm. La biodisponibilité du Cd (capacité à être accumulé et à avoir des effets biologiques) dépend principalement de sa forme chimique. Toutefois, pour la présente étude, la spéciation du Cd n'a pas été déterminée. L'accumulation du Cd et les réponses de toxicité mesurées ne seront alors pas reliées à la concentration en ion libre puisque ce sont les concentrations en Cd totales qui seront utilisées. L'importance dans cette étude était de mettre en place des conditions d'exposition du biofilm et des escargots identiques. En effet, dans un milieu naturel, une proie et un prédateur (benthiques) seront exposés aux mêmes caractéristiques physico-chimiques du milieu. Dans notre étude, la lumière, le pH et la température, variables identifiées dans la littérature comme pouvant moduler la bioaccumulation chez les organismes des biofilms (Lange et al., 2011 ; Faburé et al., 2015 ; Lambert et al., 2017 ; Leguay et al., 2016), ont été uniformisées entre nos bacs de culture. L'homogénéat de culture mère a été inoculé le même jour dans les bacs (donc même niveau de maturité) (Duong et al., 2010). La variabilité de bioaccumulation entre les différents bacs de culture serait donc principalement due aux différences de concentrations en Cd dans l'eau.

#### **4.2.2 Les profils en acides gras**

L'analyse des AG du biofilm (AG totaux) permet de cerner la réponse globale des différents compartiments du biofilm (autotrophe comme hétérotrophe). Trente-cinq AG ont été détectés et quantifiés lors de l'analyse des échantillons de biofilm. Les AG majoritaires étaient : les acides palmitique (16:0), palmitoléique (16:1n7), stéarique (C18:0), oléique (18:1n9), octadécénoïque (C18 : 1n7), linoléique (18:2n6), linoléique (18:3n3), eicosatriénoïque (C20:3n3) et eicosapentaénoïque (C20:5n3). Ces AG composaient en moyenne  $78,9 \pm 3,8$  % des AG totaux analysés dans les échantillons de biofilm témoin et  $71,1 \pm 1,9$  % dans les échantillons de biofilm contaminé au Cd. Des profils similaires peuvent être retrouvés dans la littérature pour du biofilm cultivé en laboratoire (non exposé à des contaminants) (Fadhlaoui et al., 2020). Une estimation de la composition taxonomique du biofilm peut être réalisée à partir de sa composition en AG (Honeyfield et Maloney, 2015). L'étude de Torres-Ruiz et al. (2007), portant sur les AG dominants d'échantillons de périphyton récoltés dans une rivière, a montré que les diatomées étaient caractérisées par de forts pourcentages de C20:5n3, C16:1n7 et C16:n4, que les algues vertes étaient riches en C18:3n3 et C18:2n6 et que les champignons et bactéries contenaient beaucoup de C18:1n9, C18:1n7, C16:1n7, C16:0 et C18:0. Le profil en AG du biofilm témoin suggère que notre biofilm cultivé était constitué d'algues appartenant aux trois grands groupes algaux (cyanobactéries, diatomées, algues vertes).

Le biofilm témoin présentait une plus grande proportion d'AGMI et d'AGPI que d'AGS, notamment avec beaucoup de C16:1n7, C18:1n9, C18:1n6, C18:3n3 et C20:5n3. Le C18:3n6 et le C20:5n3 peuvent être qualifiés d'AG essentiels (voir section 1.3.3). Un pourcentage élevé de ces AG essentiels semble montrer une bonne qualité nutritionnelle du biofilm non contaminé au Cd.

La contamination au Cd sur 28 j a modifié les profils en AG du biofilm. Ainsi, le ratio oméga 3/oméga 6 a significativement diminué. Cette diminution était principalement due à une augmentation de l'acide  $\delta$ -linoléique (C18:3n6) et à une diminution de l'acide eicosapentaénoïque (C20:5n3). Dans l'étude de Fadhlouï et al. (2020), une diminution des oméga 3 a également été observée suite à une contamination du biofilm au Ni à 105  $\mu$ M (quatre semaines), avec notamment une forte diminution du C18:3n3.

Suite à l'exposition au Cd, une diminution significative du ratio AGI/AGS a également été observée. Cette diminution du rapport est principalement expliquée par une diminution de l'AGPI C20:5n3 et par une augmentation de l'AG saturé C18:0. Cette modification du ratio AGI/AGS a également été observée suite à une contamination du biofilm au Ni à 105  $\mu$ M (quatre semaines) (Fadhlouï et al., 2020), ainsi que dans des monocultures d'algues rouges (*Gracilaria tenuistipitata*) exposées à 1,78  $\mu$ M de Cd (sur 6 ou 18 h) (Pinto et al., 2011) et d'algues vertes (*C. vulgaris*) exposées à 0,10  $\mu$ M de Cd sur 19 jours (Chia et al., 2013). Une modification de la composition en acide gras du biofilm implique une diminution de la disponibilité d'AGPI et d'oméga 3 pour les escargots. Ces AG étant reconnus pour être une des composantes importantes pour les consommateurs (Guo et al., 2017 ; Guo et al., 2016), leur diminution pourrait suggérer une diminution de la qualité nutritive du biofilm.

Ces modifications de profil en AG du biofilm suite à un stress métallique peuvent être expliquées par plusieurs processus intervenant simultanément :

#### 1-Modification de la voie de synthèse des AG insaturés :

Au début de la chaîne de biosynthèse, chez les organismes chlorophylliens, la  $\Delta$ 9-désaturase permet l'insertion d'une double liaison et ainsi le passage de l'acide saturé stéarique (18:0) à l'acide insaturé oléique (18:1n9) (Figure 16). Dans notre étude, le pourcentage d'acide stéarique a significativement augmenté et celui de l'acide oléique a significativement diminué en présence de Cd. Dans la littérature (Fadhlouï et al., 2016 ; Cormier et al., 2014), l'activité de la  $\Delta$ 9-désaturase est estimée grâce au rapport produit/substrat (18:1n9/18:0). L'activité de la  $\Delta$ 9-désaturase semble ainsi avoir diminué en présence de Cd, le rapport 18:1n9/18:0 étant significativement diminué ( $0,96 \pm 0,30$  contre  $0,18 \pm 0,04$ ). Il aurait été intéressant d'analyser la

transcription et l'activité de la  $\Delta 9$ -désaturase au sein du biofilm. En effet on ne peut savoir si le Cd joue sur l'activité de l'enzyme (liaisons directes sur l'enzyme, liaisons à un cofacteur), sur l'expression des gènes, ou s'il amène la cellule à mettre en place des stratégies de défense (amenant à une régulation endogène de l'expression des désaturases) (Byfield & Upchurch, 2007). La  $\Delta 12$ -désaturase permet le passage de l'oméga 9 (C18:1n9) à l'oméga 6 (C18:2n6). Le rapport produit/substrat (C18:2n6/C18:1n9) a significativement augmenté en présence de Cd ( $0,53 \pm 0,19$  contre  $3,5 \pm 2,0$ ). Ceci suggère une augmentation de l'activité de la  $\Delta 12$ -désaturase suite à une exposition au Cd (Figure 16).

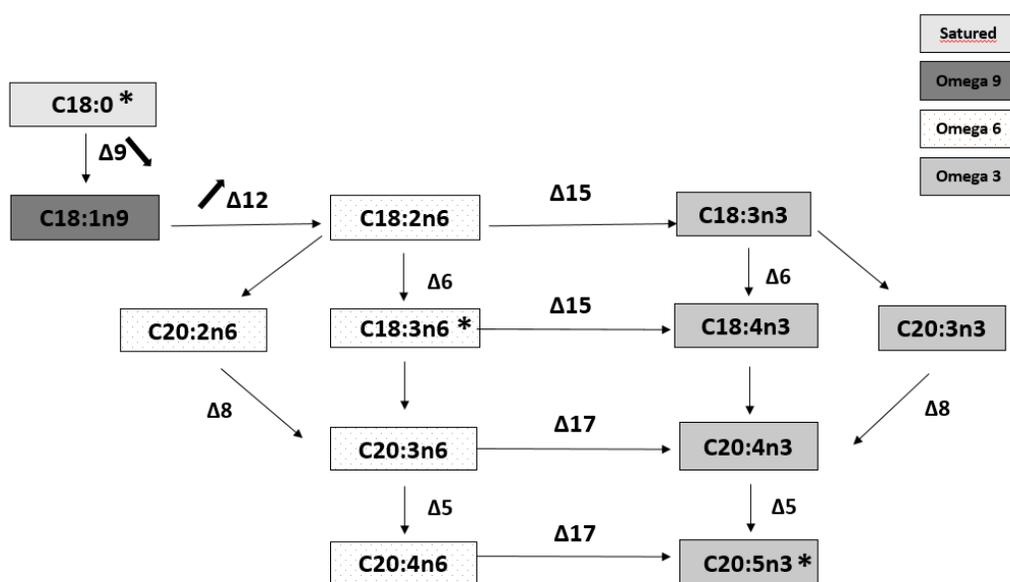


Figure 16 : Voie de biosynthèse des AGPI chez les organismes chlorophylliens, modifiée d'après Monroig et al. (2018). Les flèches représentent une diminution ou une augmentation de l'indice d'activité des enzymes (rapport produit/substrat). Les astérisques représentent les modifications de pourcentage en AG significatives.

## 2-Peroxydation lipidique :

Les métaux peuvent altérer la structure des membranes, via le processus de peroxydation lipidique où les espèces réactives de l'oxygène et/ou les radicaux libres affectent les chaînes d'AG polyinsaturés (Barata et al., 2005). Ce mécanisme conduit à la formation de radicaux lipidiques ainsi que de produits de dégradation lipidique dont le malondialdéhyde (MDA), connu pour être rapidement toxique (Jomova et Valko, 2011 ; Valko et al., 2005). Dans l'étude de Tang et al. (2015), une augmentation de MDA a été observée suite à une contamination à  $6,23 \mu\text{M}$  de

Cd (48 h) dans des monocultures de cyanobactéries (*Microcystis aeruginosa*). Une oxydation des AGPI pourrait expliquer la diminution observée suite à l'exposition au Cd dans notre étude. La diminution du ratio AGI/AGS pourrait être également expliquée par une stratégie de conservation mise en place par les cellules. L'étude de Gonçalves et al. (2018) a montré que la diminution des AGPI chez *Tabellaria flocculosa* contaminée au Cu entraîne une baisse de la fluidité membranaire ainsi qu'une augmentation de la tolérance à l'oxydation. Certains auteurs ont montré, chez les organismes phytoplanctoniques, une capacité de contrôle des ratios AGI/AGS comme stratégie d'acclimatation aux variations thermiques (Honeyfield et al., 2015 ; Hixson et Arts, 2016). Suite à une augmentation de température, il a été observé une réduction des proportions d'AGPI chez l'algue verte *Scenedesmus obliquus* (Fuschino et al., 2011).

### 3-Demande en énergie plus forte et stratégie de conservation des lipides de réserve :

Certains auteurs ont montré que les contaminations métalliques conduisent à des bouleversements énergétiques. Par exemple, chez *T. flocculosa* exposée au cuivre sur 96 h (à la plus haute concentration testée de 157,36 nM), il a été observé une diminution de la croissance accompagnée d'altérations physiologiques et métaboliques dont une augmentation du glycérol cellulaire. Le glycérol, molécule utilisée dans le cycle de Krebs pour produire de l'énergie sous forme d'ATP, est principalement stocké sous forme de triacylglycérols. Cette augmentation de glycérol laisse ainsi présager une modification de la stratégie énergétique qui serait alors tournée vers le catabolisme des lipides de réserve (Gonçalves et al., 2018). Dans l'étude de Pinto et al. (2011), une augmentation des AGMI chez l'algue *Gracilaria tenuistipitata* exposés au Cd (1,78 µM sur 6 h ou 18h) a été observée. Ces AG sont des lipides de stockage dans les algues dont la proportion peut varier selon la saison (Olofsson et al., 2012).

### 4-Changement taxonomique :

Il est également possible que la modification de profil en AG observée dans le biofilm suite à une contamination au Cd découle d'une modification de structure taxonomique. En effet, il a été montré qu'une exposition au Cd pouvait engendrer une modification de la composition taxonomique, avec une sélection d'espèces résistantes (Morin et al., 2008a ; Arini, 2011). Une modification de structure du biofilm peut jouer sur sa composition en AG (Guo et al., 2016 ; Taipale et al., 2013). Une analyse taxonomique des grands groupes algaux (prévue par la suite) pourrait permettre de distinguer si la variation des ratios AGI/AGS et oméga 3/oméga 6 découle d'une modification taxonomique. Il se peut également que la modification de profil observée découle de plusieurs processus intervenant simultanément, ce qu'il ne sera pas possible de départager.

#### 5-Variation entre échantillons :

Les paramètres tels que l'intensité lumineuse, les nutriments disponibles et la température sont reconnus pour affecter la composition en AG (Arts et al., 2009 ; Guo et al., 2015). Dans notre expérience, ils ont été maintenus constants tous au long de l'exposition. Même si une attention particulière a été portée au maintien d'une solution d'inoculation primaire homogène, il se peut que les proportions de taxons inoculées dans les microcosmes aient été légèrement différentes (influençant par la suite la colonisation et le développement du biofilm). Ceci pourrait expliquer les variations observées entre les microcosmes d'une même condition (Taipale et al., 2013 ; Dunstan et al., 1993). Des observations au microscope permettraient de vérifier cette hypothèse. La présence de petits macroinvertébrés pourrait également fortement influencer les profils en AG.

#### 4.2.3 Étude transcriptionnelle

La toxicité du Cd dans le biofilm a aussi été investiguée par une étude du niveau de transcription de gènes cibles, avec l'utilisation d'amorces génériques. Ces amorces ont été déterminées à partir de séquences disponibles dans les banques de données ainsi que de séquences déterminées au laboratoire EPOC. Les régions consensus des gènes cibles, régions identiques entre espèces plus ou moins proches phylogénétiquement, ont été choisies et retranscrites en amorces de PCR quantitative. Ne connaissant pas les espèces présentes au sein du biofilm, ces amorces ciblant un maximum d'espèces nous ont permis d'étudier l'expression de gènes cibles pour un ensemble d'organismes du biofilm.

Dans notre étude, aucune différence significative d'expression des ARNm des gènes *cox1*, *nad5*, *12S*, *d1* et *psaA* n'a été observée. La sous-unité 1 de la cytochrome C oxydase (*cox1*), dernier complexe de la chaîne de transfert d'électron mitochondrial (CTE) et la sous-unité 5 de la NADH déshydrogénase (*nad5*) sont connues pour être impliquées dans le métabolisme mitochondrial. La sensibilité du métabolisme mitochondrial au stress métallique, notamment au Cd, a été mise en évidence dans l'étude de Kim Tiam et al. (2012). Les auteurs ont montré une surexpression des gènes *cox1* et *nad5* chez la diatomée *Eolimna minima* exposée à 889,60 nM de Cd jusqu'au 14<sup>e</sup> jour de contamination, après quoi, le niveau d'expression est redevenu comparable à ceux des cultures non contaminées au Cd. Selon les auteurs, ceci pourrait être dû à un dépassement de ce système de survie. En effet, il a été démontré que le Cd pouvait avoir un effet sur les fonctions mitochondriales (Wang et al., 2004). Un suivi de la variation de transcrits de l'enzyme antioxydante sod Mn, présente au sein de la mitochondrie, aurait pu permettre de faire le lien entre induction d'ERO et l'hyperactivité mitochondriale. L'augmentation d'ERO aurait pu être mise

en évidence via une analyse de la concentration en peroxyde d'hydrogène et anion superoxyde et de l'activité d'enzymes antioxydantes, tel qu'il a été fait dans l'étude de Cheng et al. (2016). En effet, les auteurs ont montré une augmentation croissante des concentrations en peroxyde d'hydrogène et anion superoxyde chez *C. vulgaris* exposée à des concentrations allant de 4,45 à 62,27  $\mu\text{M}$  de Cd. Les auteurs ont également mis en évidence une augmentation de l'activité des enzymes CAT et SOD à la plus faible concentration en Cd (4,45  $\mu\text{M}$ ) et une diminution de leurs activités aux concentrations d'exposition élevées en Cd (44,48 et 62,27  $\mu\text{M}$ ). L'effet inhibiteur du Cd sur l'activité de ces enzymes pourrait en partie expliquer l'augmentation d'ERO dans les cellules.

Les gènes codant pour des composantes du photosystème *d1* et *psaA* ne présentaient pas de modification d'expression suite à l'exposition au Cd. Cependant, dans l'étude de Kim Tiam et al. (2012), des monocultures de diatomées (*E. minima*) exposées à 89 et 890 nM de Cd ont montré une induction de l'expression de *d1* et *psaA* après 14 j d'exposition. Selon la littérature, le Cd peut affecter le système photosynthétique par une inhibition de l'activité du PS2/PS1 tel qu'exposé dans les études d'Overnell (1975a) (sur des monocultures de *C. reinhardtii* exposées à 1,50  $\mu\text{M}$  de Cd), de Nováková et al. (2004) (chez la cyanobactérie *Synechococcus elongatus* exposées à 1 M de Cd sur 30 minutes) ainsi que dans l'étude de Tůmová et Sofrová (2002) (chez *S. elongatus* exposée à 1 mM de Cd sur 24 h). Des dommages structurels observés sur les chloroplastes peuvent également affecter le système photosynthétique, tel que mis en évidence dans l'étude de Ouzounidou et al. (1997) chez *Triticum aestivum* exposé au Cd (de 265  $\mu\text{M}$  à 1 mM sur 7 j). Finalement, une diminution de la teneur en chlorophylle *a*, telle qu'observée dans l'étude de Cheng et al. (2016) sur des monocultures de *C. vulgaris* exposées à une gamme de Cd allant de 4,50 à 62,30  $\mu\text{M}$  suggère aussi un effet sur le système photosynthétique.

Notre analyse transcriptomique étant en point final, les résultats présentés ici reflètent le programme génétique mis en place après 21 j d'exposition au Cd. Si au 21<sup>ème</sup> jour, aucune modification d'expression de gènes n'a été observée, une étude de la variation des transcrits de ces gènes à plusieurs temps d'exposition aurait pu nous permettre d'observer une réponse cellulaire graduelle suite à la contamination au Cd. En effet, les résultats mis en évidence par ce genre d'études montrent que, suite à un stress, l'acclimatation mise en place, modifiant le programme d'expression, se déroule généralement en trois temps. Une première réponse primaire se met alors en place, où un/plusieurs ensembles de gènes sont (re)programmés afin de fournir une réponse immédiate au stress. Lors de la deuxième phase, cette modification atteint généralement un palier, où de nouveaux ensembles de gènes sont utilisés pour répondre

aux effets de la contamination. La dernière phase de réponse est la mise en place d'une stratégie de survie sur le long terme et représente une réponse adaptative (De Nadal et al., 2011).

Le manque de significativité des réponses observées pourrait être expliqué par une grande variabilité entre les échantillons d'une même condition ( $n = 12$ ). Les résultats prennent en considération la réponse des quatre microcosmes témoins ou contaminés. Toutefois, ces microcosmes de cultures présentent des différences en termes de concentration en Cd (voir partie 2.3) et possiblement de structure des assemblages d'espèces. En effet, certains microcosmes étaient de couleurs plutôt marron, caractéristique de la présence de diatomées, et d'autres verts, indiquant le développement plus important d'algues vertes dans la culture. Le biofilm étant une communauté d'organismes, l'utilisation d'amorces généralistes permet certes de refléter la réponse globale du biofilm, mais entraîne également une variabilité plus forte, chaque espèce étant à même d'avoir une signature transcriptionnelle différente. Lors de l'analyse, la réponse génétique observée peut être dépendante des proportions d'espèces dans l'échantillon qui ne reflète alors pas la totalité de la culture. Il aurait été également intéressant de faire des mesures sur des monocultures afin d'avoir une réponse plus ciblée de la toxicité engendrée par la contamination au Cd dans le biofilm.

Il aurait finalement été intéressant de compléter ces travaux avec d'autres techniques d'analyse de toxicité des différentes composantes du biofilm. Pour les organismes autotrophes, les caractéristiques les plus couramment mesurées sont : la teneur en chlorophylle *a* (Corcoll et al., 2011 ; Duong et al., 2010 ; Cheng et al., 2016) ou l'activité photosynthétique (Guanzon et al., 1994 ; Overnell, 1976 ; Pinto et al., 2003). Dans l'étude de Morin et al. (2008b), l'effet du Cd a été mis en évidence avec un suivi de la biomasse du biofilm et de la densité de diatomées. La modification taxonomique du biofilm a également permis de suivre des contaminations métalliques dans de nombreuses études (Morin et al., 2008a ; Lavoie et al., 2012). Dans notre étude, tel que mentionné précédemment, il est prévu de faire une analyse taxonomique du biofilm témoin et exposé au Cd. Pour les organismes hétérotrophes, la méthode SIR (*Substrate induced respiration*) permettrait de mesurer le CO<sub>2</sub> produit par la respiration des organismes du biofilm (Tiili et al., 2011).

### 5.1 Résultats

#### 5.1.1 Concentration du Cd dans l'eau

Le Cd a été mesuré toutes les semaines afin de vérifier les concentrations. La figure 17 représente les concentrations obtenues en nM à l'ICP-MS (n = 22). Il y avait une différence significative entre la concentration de Cd dans l'eau des microcosmes **Témoin et Biofilm** par rapports aux microcosmes **Eau et Biofilm** et **Eau** ( $p < 0,05$ ).

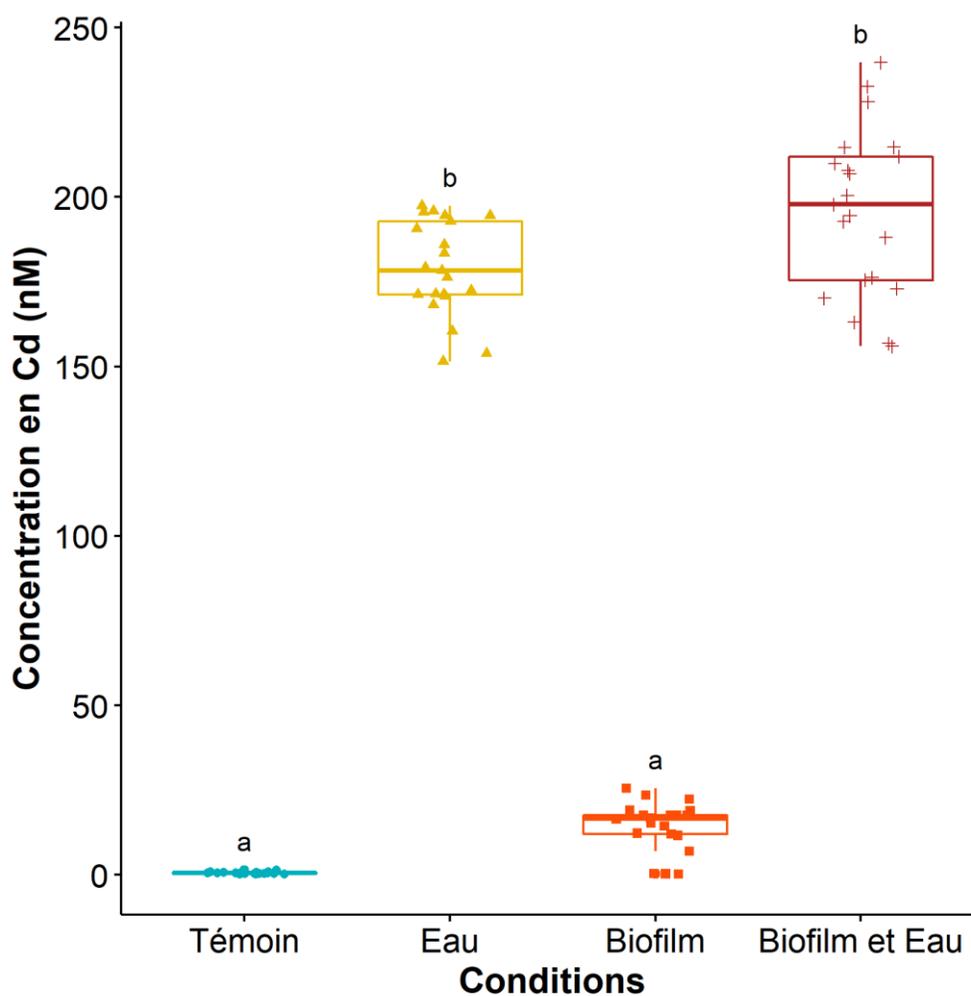


Figure 17 : Concentration moyenne  $\pm$  erreur type sur 21 jours de Cd (nM) dans l'eau des microcosmes selon les conditions d'exposition des escargots. Les lettres a et b représentent les différences significatives existantes entre les différences conditions (ANOVA à 2 facteurs suivis d'un test de Tukey).

### 5.1.2 Suivi des escargots

La survie moyenne sur 21 j des trois microcosmes pour la condition **Témoin** est de  $92 \pm 0 \%$ , de  $97 \pm 5 \%$  pour la condition **Biofilm**, de  $94 \pm 5 \%$  pour la condition **Eau** et de  $92 \pm 8 \%$  pour la condition **Biofilm et Eau**.

### 5.1.3 Bioaccumulation

La figure 18 représente la concentration moyenne ( $n = 6$ ) en  $\text{nmol} \pm$  erreur type de Cd par gramme de PS d'escargots. La concentration en  $\text{nmol}$  de Cd par gramme de PS d'escargots **Témoin** était de  $45,40 \pm 8,45$ , de  $955,78 \pm 89,94$   $\text{nmol Cd/g PS}$  pour la condition **Eau**, de  $1741,61 \pm 125,14$   $\text{nmol Cd/g PS}$  pour la condition **Biofilm**, et de  $2310,47 \pm 430,27$   $\text{nmol Cd/g PS}$  pour la condition **Biofilm et Eau**. Une ANOVA à deux facteurs a été réalisée afin de déterminer si les traitements avaient un effet. Les facteurs identifiés sont le facteur EAU qui a deux modalités (contaminé ou non contaminé au Cd) et le facteur BIOFILM qui a également deux modalités (contaminé ou non contaminé au Cd). Il n'y avait pas d'interaction significative entre les deux facteurs ( $p = 0,464$ ). Le facteur BIOFILM ainsi que le facteur EAU ont induit un effet significatif sur la bioaccumulation de Cd par les limnées.

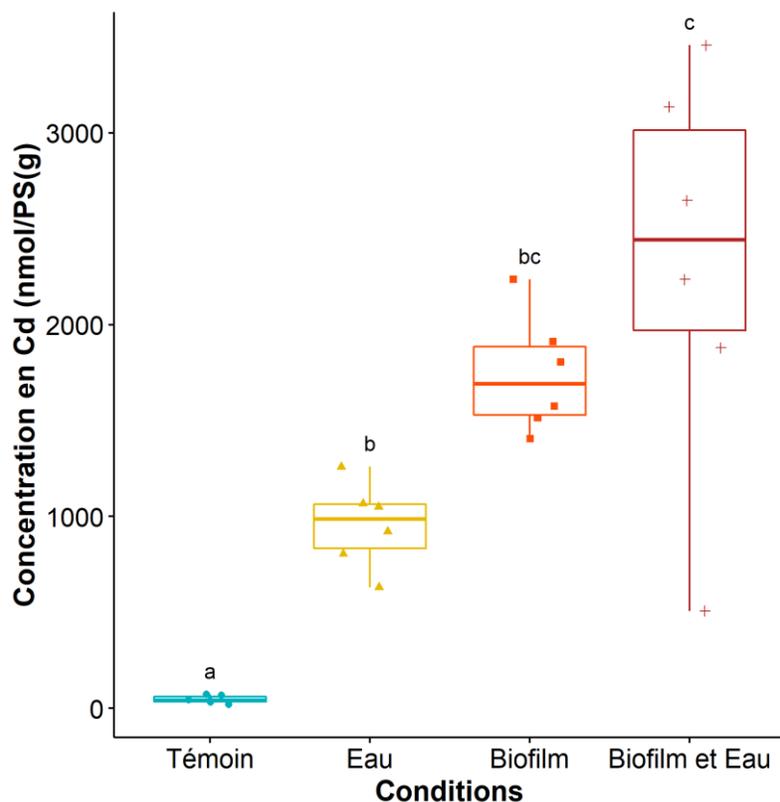


Figure 18 : Concentration de Cd  $\pm$  erreur type (nmol/g PS d'escargot) selon les conditions d'exposition des escargots sur 21 j. Les lettres a, b, c, représentent les différences significatives existantes entre les différences conditions (ANOVA à 2 facteurs suivis d'un test de Tukey.)

### 5.1.1 Analyse des acides gras

Le tableau 10 représente les AG analysés et détectés dans les échantillons d'escargots. Pour chaque condition, le pourcentage d'un AG représente la moyenne des valeurs obtenues sur six individus. Un test ANOVA à deux facteurs a été effectué pour chaque AG. Les AG pour lesquels un des facteurs (ou l'interaction entre les facteurs) était significatif apparaissent en rouge dans le tableau et sont accompagnés de la p-value associée. Ainsi, suite aux tests statistiques appliqués à chaque AG, les AG suivants ont été significativement affectés par le facteur BIOFILM : C20:0, C22:2n6 et C20:5n3. Le facteur EAU ne semblait pas avoir d'effet sur les différents AG. L'interaction des facteurs EAU et BIOFILM a eu un effet significatif sur l'AGMI C18:1n9.

Tableau 10 : Pourcentages moyens (n = 6) des acides gras  $\pm$  erreur type selon les conditions d'expositions des escargots sur 21 jours. Les acides gras pour lesquels un des facteurs de l'ANOVA a une influence significative sont indiqués en rouge. Les lettres a et b représentent les différences significatives existantes entre les différences conditions (test de Tukey).

AG	Témoin	Biofilm	Eau	Biofilm et Eau	ANOVA 2 Facteurs
<b>AGS</b>					
C10:0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	
C11:0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	
C12:0	0,4 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	
C13:0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	
C14:0	0,7 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,1	
C15:0	0,4 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,0	
C16:0	7,1 $\pm$ 0,7	5,5 $\pm$ 0,9	5,7 $\pm$ 0,8	6,8 $\pm$ 0,6	
C17:0	0,9 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	
<b>C20:0</b>	<b>0,1 <math>\pm</math> 0,1a</b>	<b>7,3 <math>\pm</math> 1,6b</b>	<b>3,9 <math>\pm</math> 1,9a</b>	<b>5,5 <math>\pm</math> 1,9b</b>	<b>Biofilm = 0,01</b>
C18:0	10,0 $\pm$ 1,0	8,0 $\pm$ 1,1	8,6 $\pm$ 1,3	9,4 $\pm$ 0,9	
C:21	2,7 $\pm$ 0,5	2,8 $\pm$ 0,9	3,1 $\pm$ 0,5	2,8 $\pm$ 0,3	
C22:0	2,0 $\pm$ 1,9	6,4 $\pm$ 1,1	3,8 $\pm$ 1,4	5,7 $\pm$ 1,4	
C24:0	4,7 $\pm$ 0,5	4,6 $\pm$ 0,7	3,2 $\pm$ 0,7	3,0 $\pm$ 0,6	
<b>AGMI</b>					
C14:1n5	0,3 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	
C15:1	0,5 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,2	
C16:1n7	2,7 $\pm$ 0,7	1,5 $\pm$ 0,5	1,3 $\pm$ 0,4	1,9 $\pm$ 0,4	
C17:1	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	
<b>C18:1n9</b>	<b>13,3 <math>\pm</math> 0,7</b>	<b>9,0 <math>\pm</math> 1,6</b>	<b>9,3 <math>\pm</math> 1,1</b>	<b>11,2 <math>\pm</math> 0,9</b>	<b>Biofilm*Eau = 0,01</b>
C20:1n9	1,4 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,2	
C18:1n7	0,9 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,8	1,1 $\pm$ 0,1	
C22:1n9	0,4 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,3	
<b>AGPI</b>					
C16:2n4	0,7 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	
C18:2n6	3,2 $\pm$ 0,4	3,0 $\pm$ 0,4	3,8 $\pm$ 0,5	2,8 $\pm$ 0,5	
C20:2n6	0,2 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,2	
<b>C22:2n6</b>	<b>0,0 <math>\pm</math> 0,0a</b>	<b>5,2 <math>\pm</math> 1,8b</b>	<b>1,5 <math>\pm</math> 1,0a</b>	<b>2,7 <math>\pm</math> 1,2b</b>	<b>Biofilm = 0,01</b>
C16:3n4	0,03 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	
C18:3n3	1,1 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,4	1,2 $\pm$ 0,2	
C20:3n6	0,6 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 5,2	0,7 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,2	
C20:3n3	11,1 $\pm$ 1,6	9,7 $\pm$ 0,8	14,2 $\pm$ 2,0	12,2 $\pm$ 1,0	
C18:4n3	0,4 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,01	0,4 $\pm$ 0,1	
C20:4n6	0,0 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,7	3,0 $\pm$ 1,9	1,1 $\pm$ 0,4	
C20:4n3	0,7 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,6	0,5 $\pm$ 0,05	0,6 $\pm$ 0,1	
C16:4n1	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	
<b>C20:5n3</b>	<b>9,5 <math>\pm</math> 2,6a</b>	<b>3,8 <math>\pm</math> 0,5b</b>	<b>8,2 <math>\pm</math> 2,0a</b>	<b>4,8 <math>\pm</math> 1,3b</b>	<b>Biofilm = 0,02</b>
C22:5n3	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	
C22:6n3	1,2 $\pm$ 0,3	2,6 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 0,7	1,9 $\pm$ 0,3	

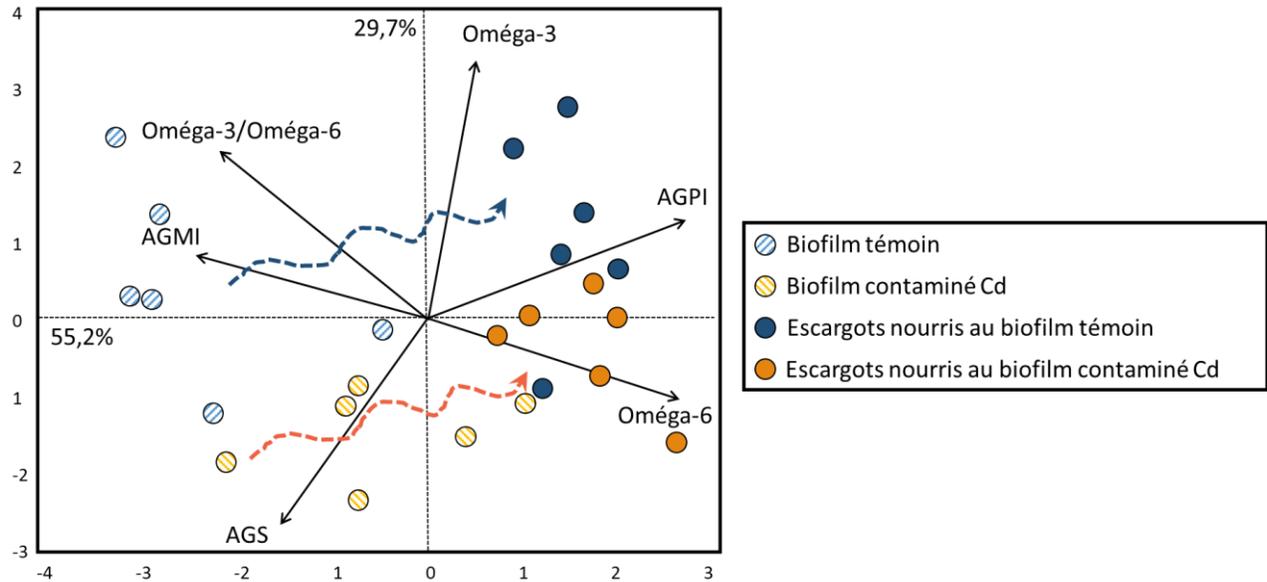
Le tableau 11 représente le pourcentage de chaque classe de lipides, déterminée selon le degré de saturation de l'AG ou la position de la double liaison, pour les différentes conditions expérimentales. Le facteur BIOFILM a eu un effet significatif sur la somme des AGS, des AGPI, des oméga 3 ainsi que sur le ratio AGI/AGS. Le facteur EAU ne semblait pas avoir d'effet sur les différentes catégories d'AG. L'interaction des facteurs EAU et BIOFILM a eu un effet significatif sur la somme des AGMI.

**Tableau 11 : Pourcentages moyens des différentes classes d'acides gras des escargots selon les conditions. Les catégories pour lesquelles un des facteurs de l'ANOVA a une influence significative sont indiquées en rouge. Les lettres a et b représentent les différences significatives existantes entre les différentes conditions (test de Tukey).**

Catégories	Témoin	Biofilm	Eau	Biofilm et Eau	ANOVA 2 Facteurs
$\Sigma$ AGS	29,1 ± 1,5a	36,4 ± 2,0b	29,9 ± 1,7a	34,9 ± 1,6b	Biofilm = 0,002
$\Sigma$ AGMI	18,9 ± 0,8	14,5 ± 1,7	15,5 ± 0,4	19,1 ± 1,5	Biofilm*Eau = 0,002 †
$\Sigma$ AGPI	50,1 ± 1,4a	47,7 ± 1,4b	53,3 ± 1,4a	46,0 ± 0,3b	Biofilm = 0,001 †
$\Sigma$ Oméga 3	24,0 ± 3,0a	18,9 ± 1,5b	27,2 ± 3,8a	21,2 ± 1,6b	Biofilm = 0,05
$\Sigma$ Oméga 6	23,1 ± 1,9	27,1 ± 2,5	25,2 ± 2,7	22,8 ± 1,6	
$\Sigma$ Oméga 9	29,5 ± 1,6	21,6 ± 3,0	22,4 ± 2,2	26,5 ± 1,9	
Oméga 3 / Oméga 6	1,1 ± 0,2	0,7 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,1	
AGI/AGS	0,5 ± 0,2a	0,4 ± 0,1b	0,4 ± 0,2a	0,5 ± 0,2b	Biofilm = 0,004

† Paramètre de normalité ne correspondant pas aux exigences d'un test paramétrique ANOVA 2F, une transformation des données (ARCSIN) a été réalisée.

Afin de visualiser les effets de la composition en AG de la nourriture (les différents biofilms) sur les consommateurs, une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée. Cette analyse a pris en considération la somme des pourcentages moyens des AGS, AGMI, AGPI, oméga 3 et oméga 6. Cette analyse prend en considération quatre groupes : le biofilm témoin (bleu hachuré), le biofilm contaminé à 180 nM de Cd sur 28 j (orange hachuré), les escargots qui ont été nourris avec du biofilm témoin (bleu) et les escargots qui ont été nourris avec du biofilm contaminé au Cd (orange) (Figure 19).



**Figure 19 : Analyse en composante principale sur les catégories AGS, AGMI, AGPI, oméga 3, oméga 6 et le ratio oméga 3/oméga 6.**

Les deux premiers facteurs (F1 et F2) de l'ACP expliquent respectivement 55 % et 30 % de la variance. Le facteur F1 est positivement corrélé aux catégories AGPI et oméga 6 et est associé négativement aux AGMI. Le facteur F2 est positivement corrélé à la catégorie oméga 3 et est associé négativement à la catégorie AGS. La composition en AG du biofilm (contaminé ou non) varie principalement le long de l'axe F2, le biofilm témoin étant caractérisé par un ratio oméga 3/oméga 6 plus élevé que celui du biofilm contaminé. Le biofilm contaminé au Cd est caractérisé par des proportions plus élevées d'AGS comparativement au biofilm témoin. Les profils en AG des escargots varient principalement selon le facteur F2. Les escargots nourris aux biofilms témoins sont caractérisés par de plus grandes proportions d'oméga 3 en opposition aux escargots nourris aux biofilms contaminés qui sont caractérisés par des proportions plus élevées d'oméga 6. Les escargots nourris au biofilm témoin et contaminé au Cd ont des proportions similaires en AGPI. De plus, la variabilité dans la composition en AG des biofilms est plus importante (données plus dispersées) que la variabilité observée dans les profils en AG des escargots. Cette grande variabilité pourrait découler du facteur "composition en espèces" dans les biofilms (voir section 1.3.3). De façon générale, les profils en AG des escargots se distinguent de ceux des biofilms et profils en AG des organismes en conditions contaminées se distinguent également des conditions témoins.

### 5.1.2 Étude transcriptionnelle

Le tableau 12 représente les différents gènes analysés sur les échantillons de limnées pour les quatre conditions d'exposition. Les résultats d'expression de gènes sont présentés sous forme de facteurs d'induction. Une induction significative des gènes *mdr-1* (x4), *cox1* (X10,5) et *12s* (x4) chez les escargots de la condition Biofilm a été observée. La transcription des gènes *Fasn*, *Fads*, *Elov16*, *Scd*, *Cat*, *Sod Cu* et *Acoa* étaient similaires à celle des témoins. Pour les escargots exposés aux conditions Eau ainsi que Eau et Biofilm, aucune modification significative d'expression de gènes n'a été observée.

**Tableau 12 : Niveau d'expression différentielle des gènes étudiés chez les escargots d'eau douce après une exposition de 21 j au Cd. Les résultats sont exprimés sous forme de facteur d'induction par rapport à la condition témoin. Les facteurs d'induction présentant des valeurs significativement différentes de la condition témoin sont indiqués en rouge**

Fonctions et Gènes	Eau 180 nM Cd		Biofilm et Eau 180 nM Cd		Biofilm 180 nM Cd	
Synthèse des acides gras						
<i>fasn</i>	0,3	<i>p</i> >0,05	1	<i>p</i> >0,05	0,4	<i>p</i> >0,05
<i>fads</i>	0,8	<i>p</i> >0,05	1	<i>p</i> >0,05	1	<i>p</i> >0,05
<i>elov16</i>	5	<i>p</i> >0,05	4	<i>p</i> >0,05	0,4	<i>p</i> >0,05
<i>Scd</i>	4	<i>p</i> >0,05	3	<i>p</i> >0,05	0,4	<i>p</i> >0,05
Réponse au stress oxydant						
<i>Cat</i>	0	<i>p</i> >0,05	0	<i>p</i> >0,05	0,00	<i>p</i> >0,05
<i>Sod Cu</i>	15	<i>p</i> >0,05	1	<i>p</i> >0,05	2	<i>p</i> >0,05
Détoxification						
<i>mdr</i>	8,5	<i>p</i> >0,05	1	<i>p</i> >0,05	4	<i>p</i> = 0,017
Métabolisme mitochondrial						
<i>cox1</i>	6,5	<i>p</i> >0,05	2	<i>p</i> >0,05	10,5	<i>p</i> = 0,022
<i>Acoa</i>	3,5	<i>p</i> >0,05	1	<i>p</i> >0,05	0,3	<i>p</i> >0,05
<i>12S</i>	3	<i>p</i> >0,05	0,3	<i>p</i> >0,05	4	<i>P</i> = 0,044

## 5.2 Discussion

### 5.2.1 Bioaccumulation

Les paramètres physico-chimiques, tels que le pH, la concentration en Cd total, la lumière et la température étaient similaires entre l'expérience d'exposition du biofilm et l'expérience d'exposition des escargots. En effet, le problème souvent soulevé en lien avec les expériences de transfert trophique en laboratoire est le manque de similarité entre l'exposition des proies et celle des consommateurs, menant éventuellement à une difficulté d'extrapolation en milieu naturel (Hare, 1992 ; Bonnineau et al., 2020). Dans notre étude, le biofilm et les escargots ont été exposés à des concentrations similaires en Cd dans l'eau, cependant ils n'ont pas été exposés au Cd simultanément dans un même milieu de culture. Or, il a été montré que l'activité des brouteurs pouvait influencer la biomasse et l'activité algale (Swamikannu et Hoagland, 1989 ; Arakelova, 2010 ; McCornick et Stevenson, 1991 ; McCollum et al., 1998). Cette interaction entre le biofilm et ses consommateurs n'a toutefois pas pu être investiguée dans notre expérience.

Dans notre étude de transfert trophique, les voies d'exposition au Cd étudiées étaient la voie directe (forme dissoute dans l'eau), la voie trophique (forme particulaire via l'alimentation) ou les deux. Dans ces trois conditions, notre espèce d'escargot a accumulé le Cd, rendant ainsi compte de la contamination de son milieu. Cette accumulation diffère cependant selon les conditions d'exposition ( $p < 0,05$ ). Une analyse de variance à deux voies (ANOVA 2 facteurs) a permis de tester l'effet des deux facteurs (BIOFILM et EAU) sur l'accumulation de Cd par les escargots. Les deux facteurs ont eu un effet significatif sur la bioaccumulation du Cd par les escargots (BIOFILM  $p < 0,001$  ; EAU  $p = 0,004$ ). Malgré une tendance suggérant une bioaccumulation plus importante sous la condition BIOFILM et EAU, il n'y avait pas d'interaction significative (effet additif ou synergique) entre le facteur BIOFILM (voie trophique) et le facteur EAU (voie directe) ( $p = 0,464$ ). Afin de rendre compte de l'importance de ces variables sur le niveau de bioaccumulation des escargots, une expérience d'exposition utilisant différentes concentrations en Cd connues dans le biofilm et dans l'eau pourrait être mise en place.

Dans notre étude, il semble que le facteur BIOFILM expliquait au mieux la bioaccumulation observée chez les escargots (la significativité de ce facteur était supérieure au facteur EAU). L'importance de la voie trophique dans le processus d'accumulation du Cd chez les escargots a également été mise en évidence dans l'étude de Wang et Ke (2002) où la majeure partie de la bioaccumulation du Cd retrouvé chez deux espèces d'escargots marins était expliquée par le facteur alimentation. En effet, les escargots étaient exposés au Cd via le média (gamme de Cd

allant de 4,5 à 446 nM sur 30 h) et/ou nourris avec des palourdes (placées dans un milieu radiomarké au Cd et/ou nourries avec des diatomées radiomarkées au Cd (4-5 j)). Munger et Hare (1997) ont étudié le transfert trophique du Cd en impliquant des producteurs primaires ainsi que des consommateurs de premier et second ordre. Des larves d'insectes (*Chaoborus punctipennis*) ont été nourries pendant 14 j avec des crustacés (*Ceriodaphnia dubia*) qui avaient été élevés en présence de Cd dans leur milieu (eau) et dans leur nourriture (monoculture d'algue *Selenastrum capricornutum*). Les larves d'insectes ont été exposées au Cd soit via l'eau soit via la nourriture et l'eau. Il n'y a pas eu de différence significative entre les concentrations de Cd retrouvées chez les larves exposées au métal via la nourriture, par rapport à celles exposées au Cd via la nourriture et l'eau. La bioaccumulation via l'eau était négligeable. Cependant, il ne semble pas y avoir de consensus existant dans la littérature sur l'importance d'une voie de contamination plutôt que l'autre chez les organismes aquatiques (Bonnineau et al., 2020 ; Flessas et al., 2000). Les concentrations de métal, ses formes chimiques, sa distribution intracellulaire dans la nourriture, ainsi que les caractéristiques de la proie et du consommateur semblent être des facteurs déterminants dans les processus de bioaccumulation et de toxicité (Hare, 1992 ; Ng et al., 2005 ; Cheung et al., 2006 ; Dubois and Hare, 2009).

La figure 20 représente une synthèse des facteurs pouvant jouer sur la quantité de Cd accumulé par les escargots dans notre étude :

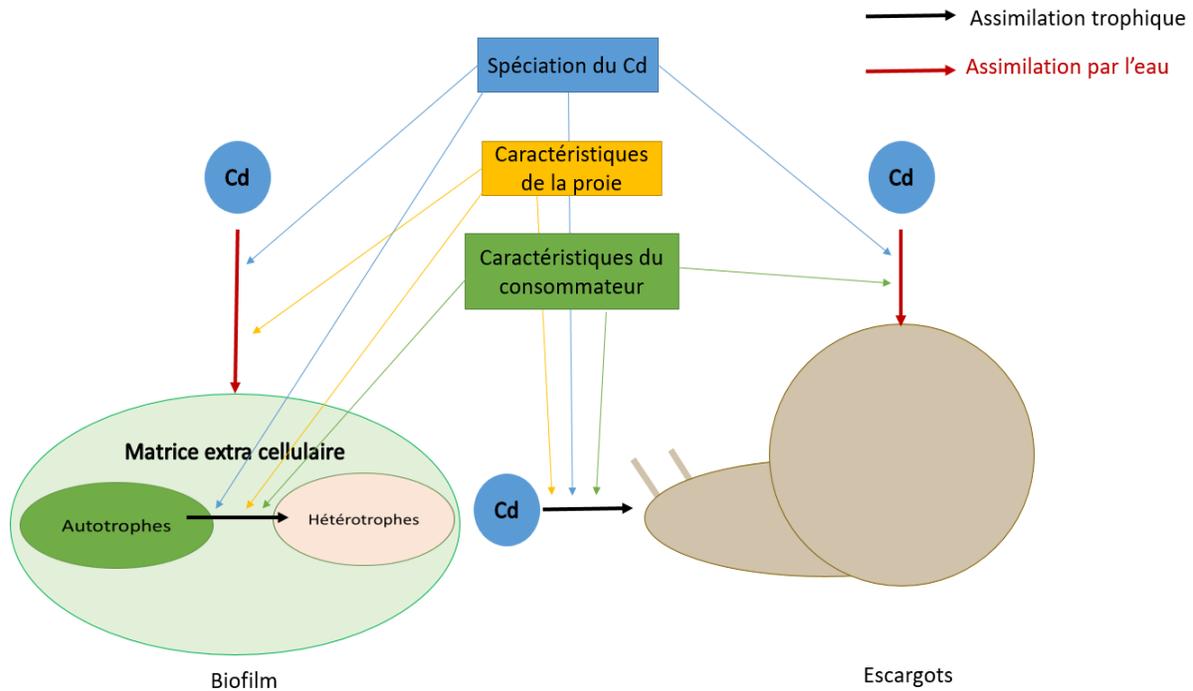


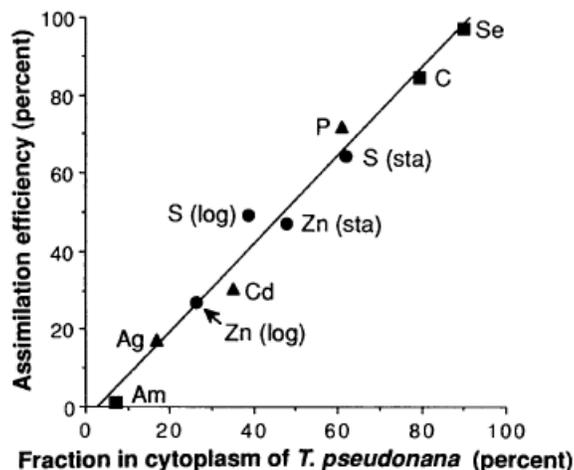
Figure 20 : Facteurs pouvant jouer sur la bioaccumulation de Cd dans notre expérimentation.

#### 1- La concentration et les différentes formes chimiques du Cd dans l'eau :

Dans l'eau, il a été montré que le Cd accumulé par les invertébrés benthiques était fortement corrélé à la concentration en ion libre à des pH neutres (Hare et Tessier, 1996, 1998). Toutefois, la spéciation du Cd n'a pas été étudiée dans notre étude bien que peu de complexation du Cd soit anticipée dans notre milieu d'exposition simple. Les différences de concentrations en Cd auxquelles les escargots ont été exposés entre les conditions pourraient expliquer les différences d'accumulation observées. Dans l'eau, la concentration moyenne en Cd total était de  $178,87 \pm 5,72$  nM pour la condition **Eau** et de  $195,74 \pm 10,00$  nM pour la condition **Biofilm et Eau**. Les analyses de concentration en Cd dans l'eau des microcosmes révèlent un faible relargage de Cd du biofilm vers l'eau avec une concentration de  $14,45 \pm 2,94$  nM pour la condition **Biofilm**. Afin de contourner cet effet, le biofilm pourrait être mis à disposition des escargots dans un récipient en dehors du microcosme (les escargots seraient alors sortis des microcosmes le temps qu'ils s'alimentent).

## 2- La répartition et la disponibilité du Cd dans l'alimentation :

La différence de bioaccumulation observée entre les individus des conditions **Eau** et **Biofilm et Eau** pourrait être expliquée par un effet prédominant de la présence de Cd dans la nourriture par rapport au Cd présent dans l'eau. L'étude de Reinfelder et Fisher (1991) a mesuré l'efficacité d'assimilation de plusieurs éléments (essentiels et non essentiels) présents dans la nourriture (diatomée *Thalassiona pseudonana*) de copépodes (*Acartia torua*, *Acartia hudsonica* et *Temova longicornis*). Les diatomées ont été cultivées en présence des radionucléides  $^{110m}\text{Ag}$ ,  $^{241}\text{Am}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{109}\text{Cd}$ ,  $^{32}\text{Pb}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{75}\text{Se}$ ,  $^{65}\text{Zn}$  (expositions en paires ou individuelles à des concentrations traces) pendant trois jours. La distribution cellulaire des radionucléides dans les diatomées était différente selon les éléments considérés. Généralement, la proportion des éléments non essentiels (Ag, Am et Cd) dans la fraction cytoplasmique des diatomées était plus faible que celles des éléments essentiels. Les efficacités d'assimilation observées variaient selon les éléments considérés. Par exemple, pour les mesures réalisées avec des copépodes nourris avec des diatomées en phase exponentielle de croissance, l'efficacité d'assimilation du Cd était de 30,4 %, de 17,4 % pour l'Ag et de 26,8 % pour le Zn. Les efficacités d'assimilation ont été directement corrélées au pourcentage des éléments dans le cytoplasme des diatomées (Figure 21). Cette relation suggère que, chez les copépodes, l'assimilation des éléments se ferait principalement via les métaux présents dans le cytoplasme algal. L'efficacité d'assimilation dépendrait également de l'âge des diatomées. En effet, pour le Zn et le S, l'efficacité d'assimilation était plus élevée chez les copépodes se nourrissant de cellules en phase stationnaire que de cellules en phase exponentielle de croissance.

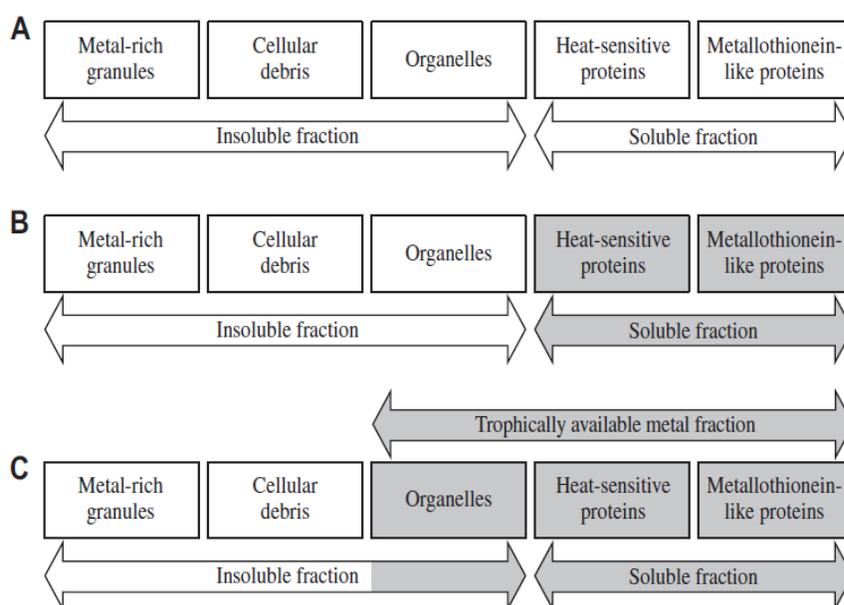


**Fig. 1.** Assimilation efficiency (in percent) of ingested elements in copepods fed *Thalassiosira pseudonana* as a function of the cytoplasmic fraction (percent of total cell content) of those elements in the diatoms. (■) *Acartia tonsa*, (●) *Acartia hudsonica*, (▲) *Temora longicornis*.  $y = (1.131 \pm 0.061) x - (3.503 \pm 4.929)$ . The grazing rates varied with each batch of animals; mean rates (milligrams of algal dry weight per gram dry weight of animal per hour) were  $39 \pm 19$  for *Acartia* spp. and  $5.3 \pm 3.5$  for *T. longicornis*; sta, stationary growth phase; log, logarithmic growth phase.

Figure 21 : Efficacité d'assimilation de différents éléments par des copépodes en fonction du pourcentage de ces éléments trouvés dans les cytoplasmes des diatomées (qui ont servi de nourriture aux copépodes)(Reinfelder et Fisher, 1991).

Selon les auteurs, la période de résidence de l'alimentation dans l'intestin des copépodes ne dépasse pas 30 minutes. Ceci pourrait expliquer que les molécules insolubles associées aux membranes ne puissent pas être assimilées aussi efficacement que les plus petites molécules du cytoplasme. Le principe exposé dans cette étude, où le métal de la fraction soluble subcellulaire des diatomées représente la fraction disponible pour les copépodes qui s'en nourrissent, a été testé sur d'autres organismes aquatiques. La revue de la littérature de Rainbow et al. (2011) répertorie des études ayant examiné la disponibilité des métaux dans des proies pour leurs consommateurs et explique que ce principe est sûrement trop simplifié pour être applicable de façon générale. Cette revue met également en lumière la complexité de créer un modèle pouvant expliquer l'efficacité d'assimilation d'un métal par un consommateur selon sa distribution cellulaire dans la proie. Wallace et Luoma (2003) proposent une distribution des

métaux en cinq fractions subcellulaires : les granules riches en métal (MRG), les débris cellulaires, les organelles, les protéines semblables aux métallothionéines (MTLP) et les protéines sensibles à la chaleur (HSP) (Figure 22). La distribution du Cd dans les fractions organelles, HSP et MTLP du bivalve *Potamocorbula amurensis* permettraient d'expliquer au mieux l'efficacité d'assimilation du Cd par son consommateur, la crevette *Palaemon macrodactylus*. Cependant, selon les auteurs, l'importance de cette distribution subcellulaire pourrait varier en fonction des espèces, des proies et des métaux. Ce modèle ne semble pas pouvoir être généralisable. Par exemple, Cheung et al. (2006) ont constaté que le mollusque *Thais clavigera* pouvait assimiler le Cd dans différentes fractions subcellulaires de son alimentation y compris dans les fractions insolubles telles que les MRG.



**Figure 22 : Représentations des différentes fractions subcellulaires où peuvent être retrouvés les métaux accumulés par les organismes et des modèles d'accessibilité trophiques des éléments dans ces fractions (Rainbow et al., 2011). A = modèle de fractionnement du métal en cinq composantes d'après Wallace et al., 2003 ; B = modèle d'accessibilité trophique du métal d'après Reinfelder et Fisher (1991) ; C = modèle d'accessibilité trophique proposé par Wallace et Luoma (2003).**

S'il semble difficile d'estimer la disponibilité du Cd provenant du biofilm pour les escargots, la différence significative de bioaccumulation observée entre les conditions **Eau et Biofilm et Eau** montre que la prise en compte de la contamination de la nourriture dans les processus d'accumulation du Cd chez les escargots d'eau douce ne peut pas être négligée.

### 3- Les caractéristiques des consommateurs :

Dans la littérature, la gamme de concentration de Cd par gramme de poids sec d'escargots est extrêmement variable entre espèces (Tableau 1). L'étude de Huang et al. (2018) a montré que la différence de bioaccumulation du Cd entre espèces de gastéropodes serait principalement due à leur capacité à détoxifier le Cd. Chez l'espèce *P. canaliculata*, la concentration en Cd dans les organes spécialisés dans la détoxification, tels que l'hépatopancréas et le rein, étaient plus élevée en comparaison à *S. quadrata*. Huang et al. (2018) ont également mis en évidence une modification de l'activité de certaines enzymes anti-oxydantes (telles que SOD et CAT) chez *P. canaliculata*. Cette gestion du Cd pourrait découler d'une adaptabilité environnementale au stress métallique acquise par l'espèce expliquant que sa tolérance soit plus élevée que celle de l'espèce *S. quadrata* (CE 50 respective de 37,90 et 13,30  $\mu\text{M}$  à 48 h).

#### 5.2.2 Étude transcriptionnelle

Les mécanismes d'action du Cd au sein des cellules ont été étudiés par analyse d'expression de gènes cibles. Le gène *mdr1* (transporteurs ABC, ATP dépendants), codant pour un système d'efflux actif connu pour être impliqué dans l'excrétion des xénobiotiques (Bodó et al., 2003 ; Whalen et al., 2010), a été surexprimé de manière significative chez les individus nourris au biofilm contaminé. La mise en place de ces systèmes d'efflux permettrait de réguler le Cd intracellulaire.

L'augmentation de l'expression du gène *cox1*, qui code pour la dernière enzyme de la chaîne de transfert d'électron mitochondriale, et du gène 12s codant pour la petite sous unité des ribosomes mitochondriaux, laisse présager une augmentation du métabolisme mitochondrial chez les individus de la condition **Biofilm**. La fixation des métaux au niveau des groupements sulfhydryles libres des protéines enzymatiques de la chaîne respiratoire entraînerait une inhibition de l'activité des enzymes de la CTE (Hödl et al., 2010 ; Li et al., 2003). Afin de compenser cette perte d'activité et de maintenir une production d'énergie suffisante, il y aurait une augmentation du nombre de mitochondries et d'enzymes de la CTE. Une augmentation du métabolisme pourrait être expliquée par une demande en énergie accrue lors d'un stress. L'énergie allouée aux mécanismes de défense serait augmentée suite à une contamination métallique (Sokolova et Lannig, 2008). Les individus exposés à une eau contaminée au Cd ne présentaient pas de modification d'expression des gènes. Si la mise en place des systèmes est organe-spécifique, il se peut que le signal ne soit pas perceptible (effacé par la réponse générale). Une analyse

transcriptomique par organe aurait peut-être permis de distinguer une réponse significative dans le foie ou le rein. De plus, la transcription étant fortement dépendante du facteur temps, des analyses à différents temps d'exposition, comme réalisées dans l'étude de Bouétard et al. (2016), auraient été pertinentes. En effet, les auteurs ont mis en évidence que la transcription de gènes, tels que *sod*, était dépendante de la concentration en diquat (herbicide) mais également du temps d'exposition chez *L. stagnalis*. Les auteurs ont observé une induction de *sod* à 24 h à la plus faible concentration testée de 190 nM alors qu'à 48 h aucune modification de transcription n'a été observée.

Aucune modification d'expression de gènes n'a été observée chez les individus exposés au Cd par l'eau et la nourriture. Une grande variabilité des données au sein de cette condition pourrait expliquer le manque de significativité. En effet, la variabilité inter-individuelle est un facteur très important qui pourrait être expliqué par des différences de comportement, comme une modification de la prise alimentaire suite au stress métallique (Taylor et al., 1998). Les individus de cette condition sont doublement exposés et présentent des concentrations de Cd intracellulaire plus élevées, mais une expression d'ARNm pour les gènes étudiés comparable à celle des témoins. La notion de dépassement de seuil (dose et temps) est également un facteur très important à prendre en compte dans l'interprétation des réponses transcriptionnelles. Dans l'étude de Hödl et al. (2010), une altération de l'intégrité cellulaire (augmentation du renouvellement cellulaire et détérioration des membranes mitochondriales) accompagnée d'une saturation des MT a permis de déterminer le passage de l'état « résistance au stress » de gastéropodes exposés au Cd à l'état « épuisement de la capacité de résistance ». Un déclin de la capacité de résistance en présence de Cd dans l'eau et la nourriture pourrait expliquer, chez les individus exposés aux conditions **Biofilm et Eau**, que l'augmentation de l'expression des gènes *cox-1* et *12s* mitochondriaux ne soit pas visible au 21<sup>ème</sup> j d'exposition.

### 5.2.3 Profils en acide gras des escargots

Les AG majoritaires dans les échantillons d'escargots témoins étaient le C18:3n6, le C18:1n9, le C18:0, le C20:5n3 et le C16:0. Ces AG composaient en moyenne  $66,9 \pm 2,5$  % des AG totaux analysés dans les échantillons. Des profils similaires peuvent être retrouvés dans la littérature (Tableau 2). Les escargots témoins présentaient un pourcentage d'AGI plus grand comparativement aux AGS, dominés par les acides C18:1n9, C18:3n6, C20:3n3 et C20:5n3. Le C18:3n6 et le C20:5n3 peuvent être qualifiés d'AG essentiels (voir section 1.3.3). Un pourcentage

élevé de ces AG essentiels semble montrer une bonne qualité nutritionnelle des escargots (disponibilité de ces AG pour les consommateurs).

Le facteur BIOFILM est le facteur qui semble avoir eu l'effet le plus marqué sur les profils en AG des escargots. Il a influencé la somme des AG saturés et polyinsaturés ainsi que la somme des oméga 3. La variation des AGS était principalement expliquée par une influence du facteur BIOFILM sur les AG C20:0 et C22:0. Le facteur BIOFILM a influencé les AGPI C22:2n6 et C20:5n3.

L'importance du facteur explicatif BIOFILM sur les profils en AG des escargots laisse présager que la diminution de la qualité nutritive du biofilm (moins d'AGPI essentiels) que nous avons observée pourrait engendrer des carences chez les escargots. Torres-Ruiz et al. (2007) ont mis en évidence une corrélation entre la composition en AG de l'alimentation (biofilm de rivière) et la composition en AG des consommateurs (macroinvertébrés). En effet, la variation saisonnière du profil en AG du biofilm était corrélée à celle retrouvée chez les macroinvertébrés. Cette corrélation a également été observée chez d'autres organismes brouteurs (Guo, et al., 2016). Il a été montré que la différence de profils en AG entre les espèces découle principalement de leur comportement alimentaire et de leurs positions trophiques. On peut ainsi distinguer des catégories de profils en AG, par exemple, pour les gastéropodes herbivores et les prédateurs (Zhukova, 2019).

L'ACP réalisée à partir des profils en AG des biofilms et des escargots semble montrer une certaine correspondance entre le profil en AG de la nourriture et celui du consommateur dans la condition témoin (avec une variation entre échantillons expliquée par l'axe 1 de l'ACP) (Figure 19). Cette correspondance de profil est également observée en condition d'exposition au Cd le long de l'axe 1 de l'ACP. Les conditions témoins et contaminées au Cd (biofilms et escargots) se distinguent principalement sur l'axe 2 de l'ACP. Il semblerait ainsi qu'une modification du profil en AG du biofilm suite à une exposition au Cd ait un effet sur les profils en AG de ses consommateurs directs. Dans notre étude, la capacité des limnées à retenir de manière sélective les AGPI ingérés ou de maintenir un profil en AGPI quasi homéostatique pour leur besoin physiologique pourrait expliquer la distribution nettement distincte avec les profils en AG des biofilms.

L'importance de la qualité nutritionnelle du phytoplancton a été montrée dans l'étude de Bartsch et al. (2017), où la croissance d'huîtres (*Lampsilis cardium* et *L. siliquoidea* placées dans des cages (28 j) sur différents sites de la rivière Sainte-Croix, États-Unis) était positivement corrélée à la composition en AG du phytoplancton. Une forte proportion en cyanobactéries dans le phytoplancton a été identifiée comme source d'appauvrissement nutritionnel. Dans notre étude,

le biofilm exposé au Cd et les escargots nourris avec ce biofilm présentent une diminution d'EPA (C20:5n3). La synthèse d'EPA *de novo* est principalement réalisée par les organismes chlorophylliens (Dalsgaard et al., 2003). Chez les animaux, la voie privilégiée est l'assimilation par l'alimentation, même des désaturases fonctionnelles (qui permettraient de produire des AGPI oméga 3 *de novo*) chez plusieurs familles de métazoaires, dont les mollusques, ont récemment été découvertes (Kabeya et al., 2018 ; Monroig et Kabeya, 2018). Dans notre étude, la diminution d'EPA observée dans les biofilms contaminés pourrait ne pas être suffisamment compensée par les escargots et l'assimilation de cet AG dépendrait de leur alimentation. La diminution de C20:5n3 pourrait avoir des conséquences sur les consommateurs supérieurs, qui n'ont pas toujours la capacité de produire en quantité suffisante cet AG *de novo* (Sinclair et al., 2002).

Une autre stratégie d'adaptation à des conditions limitantes en nutriments a pu être observée chez les mollusques. La mise en place de symbiose avec des organismes bactériens, logés dans leurs tissus et capables de fixer le dioxyde de carbone de manière autotrophe et de synthétiser des composés organiques, peut permettre l'assimilation d'AG non présents dans leur alimentation (Dubilier et al., 2008). Dans notre étude, des concentrations élevées en 16:1n7 et 18:1n7, associées à une réduction considérable des AGPI oméga 3 et oméga 6 en provenance des algues, pourraient laisser penser à une contribution possible des bactéries à la nutrition des mollusques (Purroy et al., 2018 ; Silina et Zhukova, 2007 ; Zhukova, 2019). Des analyses supplémentaires permettant de suivre la réponse de la communauté bactérienne en présence de métal, telles que réalisé dans l'étude de Ancion et al. (2010), permettraient une consolidation de cette hypothèse. En effet, Ancion et al. (2010) ont étudié les changements dans la structure de la communauté bactérienne avec une analyse automatisée de l'espace intergénique ribosomique (ARISA). L'ARISA utilise le polymorphisme de la séquence d'ADN située entre les gènes ARNr 16S et 23S afin de caractériser les bactéries.

Cette étude a également montré un effet de l'interaction des facteurs explicatifs BIOFILM et EAU sur la somme des AGMI, avec une influence significative sur le C18:1n9 qui était significativement diminué. Plusieurs facteurs pourraient alors entrer en jeu simultanément suite à une exposition au Cd et influencer le profil en AG des escargots tels qu'une diminution de certains AG dans la nourriture (pourcentage de C18:1n9 diminué dans le biofilm), une stratégie énergétique de conservation des AG à fort potentiel énergétique (AGS) et une peroxydation des AG à longue chaîne (Bidar et al., 2008).

Un ensemble de systèmes de défense sensiblement différent entre les individus des différentes conditions (voir partie transcriptionnelle) pourrait expliquer une sensibilité différente à la

peroxydation. La peroxydation étant principalement déclenchée par la présence d'ERO, un système antioxydant actif et efficace pourrait permettre de protéger les AGPI de l'oxydation. Afin d'investiguer cette hypothèse, une mesure du taux de MDA sera réalisée prochainement sur les derniers échantillons d'escargots collectés en fin d'expérimentation. L'observation d'un faible taux de MDA chez les individus exposés au Cd par voie directe permettrait de consolider cette hypothèse. Enfin, il est aussi possible que toutes ces hypothèses puissent intervenir simultanément et expliquer la différence marquée entre les conditions.

## 6 CONCLUSION

---

Nous avons pu montrer que le biofilm accumule le Cd présent dans l'eau, ce qui mène à une modification de sa composition en AG, par exemple une diminution de la proportion d'AGPI. En plus d'avoir accumulé le Cd, le biofilm est donc également altéré en termes de qualité nutritive. Ces effets ont eu des répercussions sur les limnées, organismes consommateurs du biofilm, chez qui une modification similaire de leur composition en lipides avec une diminution de la proportion des AGPI (principalement oméga 3) a été observée.

Cependant, à ce stade, il est impossible d'attribuer cette diminution d'AGPI directement à un effet de carence alimentaire. Il se peut que d'autres mécanismes rentrent en jeu de manière différente entre les conditions. Des mesures de l'expression et de l'activité d'enzymes impliquées dans les voies de synthèses des AGPI pourraient permettre de mieux cerner les effets du Cd sur le métabolisme lipidique. Les mécanismes de synthèse des AGPI chez les mollusques restent peu connus et une approche génétique de recherche de gènes d'enzyme permettant la synthèse d'AGPI est une des perspectives majeures découlant de ces travaux.

Les escargots accumulent le Cd présent dans l'eau et dans la nourriture. Les résultats transcriptionnels semblent indiquer une réponse génétique dépendante de la voie de contamination. En effet, la surexpression des gènes liés au système d'efflux et au métabolisme mitochondrial a été observée chez les individus de la condition **Biofilm** seulement. Il aurait été intéressant d'étudier des gènes impliqués dans les systèmes antioxydants. Nos résultats semblent effectivement indiquer un effet protecteur de l'internalisation du Cd via l'eau sur l'intégrité des AG. Il se peut que des systèmes antioxydants soient mis en place plus rapidement et efficacement lors d'une contamination via l'eau que via l'alimentation. Une meilleure gestion des ERO expliquerait une peroxydation des AGPI moins marquée. Pour vérifier cette hypothèse, des mesures des niveaux de MDA devraient être réalisées par la suite.

Il aurait été intéressant de réaliser des études de protéomique telles que présentées par Chora et al. (2009) qui a montré une modification dans les profils d'expression de protéines impliquées dans le métabolisme chez des palourdes (*Ruditapes decussatus*) exposées à 330 nM de Cd sur 21 jours. L'utilisation de technologies de transcriptomique a permis à Wang et Crowley (2005) de mettre en évidence que l'exposition au Cd (à 8,90  $\mu$ M sur 5, 15 ou 25 min) provoquait chez les bactéries *Escherichia coli* un arrêt de la biosynthèse des protéines, un passage au métabolisme anaérobie et une baisse de la production d'énergie.

Dans cette étude le Cd est transféré de la base de la chaîne trophique aux organismes de niveau trophique supérieur. Pour de prochaines études, il serait intéressant d'introduire une troisième espèce d'un niveau trophique supérieur (un consommateur d'escargots) afin d'avoir une idée du comportement du Cd sur une plus grande échelle. Cela pourrait également permettre de vérifier si la diminution de certains acides gras (ex., EPA, oméga 3) chez la proie est retrouvée systématiquement chez le consommateur supérieur, comme semblent l'indiquer nos résultats pour les deux premiers maillons. Si c'est le cas, les profils en AG, bon marqueur de qualité nutritive pour le biofilm, pourraient être utilisés sur l'ensemble du réseau trophique. L'analyse des AG semble être un bon outil pour évaluer l'effet du Cd en milieu aquatique. En effet, notre étude a permis de mettre en évidence les répercussions d'un biofilm contaminé au Cd sur ses consommateurs à des concentrations sublétales.

Il serait également intéressant de réaliser une expérience trophique avec du biofilm et des escargots exposés dans un même milieu (afin de se rapprocher de la réalité environnementale). On pourrait imaginer des mésocosmes de plus grande ampleur, où du biofilm serait mis à coloniser en amont, puis les escargots et le Cd seraient introduits dès lors que la biomasse de biofilm serait jugée suffisante (les interactions brouteur-biofilm seraient alors prises en compte). Le biofilm et les consommateurs seraient ainsi exposés au Cd simultanément. Il serait également intéressant d'avoir plusieurs espèces consommatrices de biofilm.

L'utilisation de multiples descripteurs biologiques pour le suivi des effets de la contamination métallique a permis de déterminer des effets biologiques sur les organismes en complément aux informations sur les concentrations de contaminants.

## 7 BIBLIOGRAPHIE

---

- Ahlgren, G., Lundstedt, L., Brett, M., & Forsberg, C. (1990). Lipid composition and food quality of some freshwater phytoplankton for cladoceran zooplankters. *Journal of Plankton Research*, 12(4), 809–818.
- Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., & Rainbow, P. S. (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 76(2), 160–202. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.015>
- Ancion, P.Y., Gavin, L., Lewis, G.D. (2010). Three common metal contaminants of urban runoff (Zn, Cu & Pb) accumulate in freshwater biofilm and modify embedded bacterial communities. *Environmental Pollution*, 158(8), 2738–2745. doi:10.1016/j.envpol.2010.04.013
- Arakelova, E. S. (2010). Periphyton grazing and phosphorus excretion by mollusks. *Russian Journal of Ecology*, 41(4), 327–332. <https://doi.org/10.1134/S1067413610040089>
- Arini, A. (2011). Décontamination métallique et capacités de récupération de deux composantes biologiques d'un hydro système naturel - biofilms diatomique et bivalves filtreurs - après remédiation d'un site industriel. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, 79-142 <http://www.theses.fr/2011BOR14438>
- Arts MT, Brett MT, Kainz MJ. (2009). Lipids in aquatic ecosystems. Springer, New York, NY, 1-114, 211-236. ISBN 978-0-387-89366-2. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-89366-2>
- Bakry, F. A., El-Hommosany, K., Abd El-Atti, M., & Ismail, S. M. (2013). Alterations in the fatty acid profile, antioxidant enzymes and protein pattern of *Biomphalaria alexandrina* snails exposed to the pesticides diazinon and profenfos. *Toxicology and Industrial Health*, 32(4), 666–676. <https://doi.org/10.1177/0748233713506770>
- Barata, C., Carlos Navarro, J., Varo, I., Carmen Riva, M., Arun, S., & Porte, C. (2005). Changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in *Daphnia magna* during the aging process. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 140(1), 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.09.025>
- Barros, A. C., Gonçalves, A. L., & Simões, M. (2019). Microalgal/cyanobacterial biofilm formation on selected surfaces: the effects of surface physicochemical properties and culture media composition. *Journal of Applied Phycology*, 31(1), 375–387. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1582-3>
- Bartsch, M. R., Bartsch, L. A., Richardson, W. B., Vallazza, J. M., & Lafrancois, B. M. (2017). Effects of food resources on the fatty acid composition, growth and survival of freshwater mussels. *Plos one*, 12(3), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173419>
- Bérard, A., Dorigo, U., Humbert, J. F., Leboulanger, C., & Seguin, F. (2002). La méthode PICT (Pollution-Induced Community Tolerance) appliquée aux communautés algales : intérêt comme outil de diagnose et d'évaluation du risque écotoxicologique en milieu aquatique. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 38(3), 247–261. <https://doi.org/10.1051/limn/2002020>
- Besse, J. P., Coquery, M., Lopes, C., Chaumot, A., Budzinski, H., Labadie, P., & Geffard, O. (2013). Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of

- bioavailable contamination levels in continental waters: Towards the determination of threshold values. *Water Research*, 47(2), 650–660.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.024>
- Bidar G, Verdin A, Garçon G, Pruvot C, Laruelle F, Grandmougin-Ferjani A, Douay F, Shirali P. (2008). Changes in fatty acid composition and content of two plants (*Lolium perenne* and *Trifolium repens*) grown during 6 and 18 months in a metal (Pb,Cd, Zn) contaminated field. *Water Air Soil Pollution*, 192, 281–29. <https://doi.org/10.1007/s11270-008-9655-6>
- Blaby-Haas, C. E., & Merchant, S. S. (2012). The ins and outs of algal metal transport. *Biochimica et biophysica acta - molecular cell research*, 1823(9), 1531–1552.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.04.010>
- Blanc, G., Schäfer, J., Audry, S., Bossy, C., Lavaux, G., Lissalde, J. (2007). Le cadmium dans le Lot et la Garonne : sources et transport. *hydroécologie Appliquée*, 15, 19-41.  
<http://dx.doi.org/10.1051/hydro:2006005>
- Bodó, A., Bakos, É., Szeri, F., Váradi, A., & Sarkadi, B. (2003). The role of multidrug transporters in drug availability, metabolism and toxicity. *Toxicology Letters*, 140–141, 133–143. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00497-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00497-6)
- Bonnineau C, Artigas J, Chaumet B, Dabrin A, Faburé J, Ferrari BJD, Lebrun JD, Margoum C, Mazzella N, Miège C, Morin S, Uher E, Babut M, Pesce S. (2020). Role of biofilms in contaminant bioaccumulation and trophic transfer in aquatic ecosystems: current state of knowledge and future challenges. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. doi:10.1007/398\_2019\_39
- Borja, A., Josefson, A. B., Miles, A., Muxika, I., Olsgard, F., Phillips, G., Rodríguez, G., Rygg, B. (2007). An approach to the intercalibration of benthic ecological status assessment in the North Atlantic ecoregion, according to the European water framework directive. *Marine Pollution Bulletin*, 55(1–6), 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.08.018>
- Bouétard, A., Besnard, A. L., Vassaux, D., Lagadic, L., & Coutellec, M. A. (2013). Impact of the redox-cycling herbicide diquat on transcript expression and antioxidant enzymatic activities of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Aquatic Toxicology*, 126, 256–265.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.11.013>
- Bradac, P., Wagner, B., Kistler, D., Traber, J., Behra, R., & Sigg, L. (2010). Cadmium speciation and accumulation in periphyton in a small stream with dynamic concentration variations. *Environmental Pollution*, 158(3), 641–648. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.10.031>
- Brett, M. T., Bunn, S. E., Chandra, S., Galloway, A. W. E., Guo, F., Kainz, M. J., Kankaala, P., Lau, D. C. P., Moulton, T.P., Power, M.E., Rasmussen, J.B., Taipale, S.J., Thorp, J.H., Wehr, J. D. (2017). How important are terrestrial organic carbon inputs for secondary production in freshwater ecosystems? *Freshwater Biology*, 62(5), 833–853.  
<https://doi.org/10.1111/fwb.12909>
- Brett, M.T. & Müller-Navarra, D.C. (1997). The role of highly unsaturated fatty acids in food web processes. *Freshwater Biology* 38 : 483 – 499.
- Brown, K.M., DeVries, D.R. Predation and the distribution and abundance of a pulmonate pond snail. *Oecologia* 66, 93–99 (1985). <https://doi.org/10.1007/BF00378558>
- Borgmann, U., Néron, R., & Norwood, W. (2001). Quantification of bioavailable nickel in sediments and toxic thresholds to *Hyalella azteca*. *Environmental Pollution*, 111(2), 189–198. doi :10.1016/s0269
- Bunn, S.E., Leigh, C., Jardine, T.D. (2013). Diet-tissue fractionation of  $\delta^{15}\text{N}$  by consumers from

- streams and rivers. *Limnology and Oceanography*, 58, doi: 10.4319/lo.2013.58.3.0765.
- Byfield, G. E., & Upchurch, R. G. (2007). Effect of temperature on delta-9 stearyl-ACP and microsomal omega-6 desaturase gene expression and fatty acid content in developing soybean seeds. *Crop Science*, 47(4), 1698–1704.  
<https://doi.org/10.2135/cropsci2006.04.0213>
- Canadian Council of Ministers for the Environment. (2014). Canadian water quality guidelines: Cadmium. Scientific criteria document. Canadian council of ministers of the environment, Winnipeg, 49-75. PN 1515. ISBN 978-1-77202-000-7 PDF
- Campbell, P.G.C. (1995). Interactions between trace metals and organisms: a critique of the free-ion activity model. In: Tessier A, Turner D (eds) *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. Wiley, Chichester, 45–102, Chapter 2
- Campbell, P. G. C., Errécalde, O., Fortin, C., Hiriart-Baer, V. P., & Vigneault, B. (2002). Metal bioavailability to phytoplankton - Applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 133(1–2), 189–206.  
[https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00104-7](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00104-7)
- Campbell, P.G.C., Pelletier, E., Denizeau, F. (2004). *Écotoxicologie moléculaire : principes fondamentaux et perspectives de développement*. Presses de l'Université du Québec.
- Canli, M., & Furness, R. W. (1995). Mercury and cadmium uptake from seawater and from food by the Norway lobster *Nephrops norvegicus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14(5), 819–828. <https://doi.org/10.1002/etc.5620140512>
- Capdevila, M., Bofill, R., Palacios, O., & Atrian, S. (2012). State-of-the-art of metallothioneins at the beginning of the 21st century. *Coordination Chemistry Reviews*, 256(1–2), 46–62.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.07.006>
- Chabicoovsky, M., Niederstätter, H., Thaler, R., Hödl, E., Parson, W., Rossmannith, W., & Dallinger, R. (2003). Localization and quantification of Cd- and Cu-specific metallothionein isoform mRNA in cells and organs of the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 190(1), 25–36. [https://doi.org/10.1016/S0041-008X\(03\)00148-0](https://doi.org/10.1016/S0041-008X(03)00148-0)
- Chebotareva, M. A., Zabelinskiĭ, S. A., Shukoliukova, E. P., & Krivchenko, A. I. (2011). Bounds of change in unsaturation index of fatty acid composition of phospholipids at adaptation of molluscs to biogenic and abiogenic factors of external medium]. *Zhurnal Evoliutsionnoĭ Biokhimii i Fiziologii*, 47(5), 383–387.
- Cheng, J., Qiu, H., Chang, Z., Jiang, Z., & Yin, W. (2016). The effect of cadmium on the growth and antioxidant response for freshwater algae *Chlorella vulgaris*. *SpringerPlus*, 5(1), 1–8.  
<https://doi.org/10.1186/s40064-016-2963-1>
- Cheung, M. S., Fok, E. M. W., Ng, T. Y. T., Yen, Y. F., & Wang, W. X. (2006). Subcellular cadmium distribution, accumulation, and toxicity in a predatory gastropod, *Thais clavigera*, fed different prey. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(1), 174–181.  
<https://doi.org/10.1897/05-282R.1>
- Chia, M. A., Lombardi, A. T., Melão, M. D. G. G., & Parrish, C. C. (2013). Effects of cadmium and nitrogen on lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *European Journal of Phycology*, 48(1), 1–11.  
<https://doi.org/10.1080/09670262.2012.750687>
- Chora, S., Starita-Geribaldi, M., Guigonis, J.M., Samson, M., Roméo, M., Bebianno, M.J. (2009). Effect of cadmium in the clam *Ruditapes decussatus* assessed by proteomic

- analysis. *Aquatic Toxicology*, 94-4, pp. 300-308, ISSN 0166-445X, <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.07.014>.
- Cobbett, C. S. (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology*, 123(3), 825–832. <https://doi.org/10.1104/pp.123.3.825>
- Coeurdassier, M., De Vaufleury, A., Scheifler, R., Morhain, E., & Badot, P. M. (2004). Effects of cadmium on the survival of three life stages of the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* (Mollusca: Gastropoda). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72(5), 1083–1090. <https://doi.org/10.1007/s00128-004-0354-8>
- Corcoll, N., Bonet, B., Leira, M., & Guasch, H. (2011). Chl-a fluorescence parameters as biomarkers of metal toxicity in fluvial biofilms: An experimental study. *Hydrobiologia*, 673(1), 119–136. <https://doi.org/10.1007/s10750-011-0763-8>
- Cormier, H., Rudkowska, I., Lemieux, S., Couture, P., Julien, P., & Vohl, M. C. (2014). Effects of FADS and ELOVL polymorphisms on indexes of desaturase and elongase activities: Results from a pre-post fish oil supplementation. *Genes and Nutrition*, 9(6). <https://doi.org/10.1007/s12263-014-0437-z>
- Covich, A.P., Palmer, M.A. and Crowl, T.A. (1999). The role of benthic invertebrate species in freshwater ecosystems. *BioScience*, **49**: 119– 127.
- Crémazy, A., Brix, K.V., Smith, D.S., Chen, W., Grosell, M., Schlekot, C.E., Garman, E.R., Middleton, E.T. and Wood, C.M. (2020). A Mystery tale: Nickel is fickle when snails fail— Investigating the variability in Ni toxicity to the great pond snail. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 16: 983-997. <https://doi.org/10.1002/ieam.4300>
- Croteau, M.-N., Hare, L., & Tessier, A. (2001). Differences in Cd accumulation among species of the lake-dwelling biomonitor *Chaoborus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58(9), 1737–1746. <https://doi.org/10.1139/cjfas-58-9-1737>
- Dalsgaard J, St John M, Kattner G, Muller-Navarra D, Hagen W. (2003). Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Advances in marine biology*, 46, 225–340. [https://doi.org/10.1016/s0065-2881\(03\)46005-7](https://doi.org/10.1016/s0065-2881(03)46005-7)
- Das, S., & Khangarot, B. S. (2010). Bioaccumulation and toxic effects of cadmium on feeding and growth of an Indian pond snail *Lymnaea luteola* L. under laboratory conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 182(1–3), 763–770. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.06.100>
- De Nadal, E., Ammerer, G., & Posas, F. (2011). Controlling gene expression in response to stress. *Nature Reviews Genetics*, 12(12), 833–845. <https://doi.org/10.1038/nrg3055>
- Directive 2008/105/CE du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau, modifiant et abrogeant les directives du Conseil 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/280/CEE et modifiant la directive 2000/60/CE, OJ L 348, 24.12.2008, 84–97.
- Dubilier, N., Bergin, C., & Lott, C. (2008). Symbiotic diversity in marine animals: The art of harnessing chemosynthesis. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 725–740. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1992>
- Dubois, M., & Hare, L. (2009). Subcellular distribution of cadmium in two aquatic invertebrates: Change over time and relationship to Cd assimilation and loss by a predatory insect. *Environmental Science and Technology*, 43(2), 356–361. <https://doi.org/10.1021/es801406r>
- Duong, T. T., Morin, S., Herlory, O., Feurtet-Mazel, A., Coste, M., & Boudou, A. (2008).

- Seasonal effects of cadmium accumulation in periphytic diatom communities of freshwater biofilms. *Aquatic Toxicology*, 90(1), 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.07.012>
- Duong, T. T., Morin, S., Coste, M., Herlory, O., Feurtet-Mazel, A., & Boudou, A. (2010). Experimental toxicity and bioaccumulation of cadmium in freshwater periphytic diatoms in relation with biofilm maturity. *Science of the Total Environment*, 408(3), 552–562. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.015>
- Dunstan, G. A., Volkman, J. K., Barrett, S. M., Leroi, J.-M., & Jeffrey, S. W. (1993). Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae). *Phytochemistry*, 35(1), 155–161
- European Union Risk Assessment - ECHA. (2008). European Union Risk Assessment Report: Nickel and Nickel compounds. 99-114. Retrieved from [http://www.unep.org/chemicalsandwaste/Portals/9/Lead\\_Cadmium/docs/GC27\\_Followup\\_2013/EU\\_cadmiumoxide\\_RAreport302\\_Volume\\_75.pdf](http://www.unep.org/chemicalsandwaste/Portals/9/Lead_Cadmium/docs/GC27_Followup_2013/EU_cadmiumoxide_RAreport302_Volume_75.pdf)
- Environnement et Changement climatique Canada. (2018). Indicateurs canadiens de durabilité de l'environnement : Rejets de substances nocives dans l'eau. Consulté le 17 juin 2019. Disponible à : <https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/indicateurs-environnementaux/rejets-substances-nocives-eau.html>
- Faburé, J., Dufour, M., Autret, A., Uher, E., & Fechner, L. C. (2015). Impact of an urban multi-metal contamination gradient: metal bioaccumulation and tolerance of river biofilms collected in different seasons. *Aquatic Toxicology*, 159, 276–289. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.12.014>
- Fadhlaoui, M., & Couture, P. (2016). Combined effects of temperature and metal exposure on the fatty acid composition of cell membranes, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquatic Toxicology*, 180, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.09.005>
- Fadhlaoui, M., Laderriere, V., Lavoie, I., & Fortin, C. (2020). Influence of temperature and nickel on algal biofilm fatty acid composition. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39: 1566-1577. <https://doi.org/10.1002/etc.4741>
- Farag, A. M., Nimick, D. A., Kimball, B. A., Church, S. E., Harper, D. D., & Brumbaugh, W. G. (2007). Concentrations of metals in water, sediment, biofilm, benthic macroinvertebrates, and fish in the boulder river watershed, Montana, and the role of colloids in metal uptake. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52(3), 397–409. <https://doi.org/10.1007/s00244-005-0021-z>
- Filimonova, V., Gonçalves, F., Marques, J. C., De Troch, M., & Gonçalves, A. M. M. (2016). Fatty acid profiling as bioindicator of chemical stress in marine organisms: A review. *Ecological Indicators*, 67, 657–672. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.03.044>
- Flemming, H. C. & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flessas, C., Couillard, Y., Pinel-Alloul, B., St-Cyr, L., & Campbell, P. G. C. (2000). Metal concentrations in two freshwater gastropods (Mollusca) in the St. Lawrence River and relationships with environmental contamination. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57(SUPPL. 1), 126–137. <https://doi.org/10.1139/f99-229>
- Franchini, A., & Ottaviani, E. (1992). Intestinal cell types in the freshwater snail *planorbis* *corneus*: Histochemical, immunocytochemical and ultrastructural observations. *Tissue and Cell*, 24(3), 387–396. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(92\)90055-C](https://doi.org/10.1016/0040-8166(92)90055-C)

- Fried, B., Rao, K. S., & Sherma, J. (1992). Fatty acid composition of *Biomphalaria glabrata* (gastropoda: Planorbidae) fed hen's egg yolk versus leaf lettuce. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, 101(2), 351–352. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(92\)90545-2](https://doi.org/10.1016/0300-9629(92)90545-2)
- Fuschino JR, Guschina IA, Dobson G, Yan ND, Harwood JL, Arts MT. (2011). Rising water temperatures alter lipid dynamics and reduce n-3 essential fatty acid concentrations in *scenedesmus obliquus* (chlorophyta). *Journal of Phycology*, 47(4):763-774. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2011.01024.x
- Gaillardet, J., Viers, J., & Dupré, B. (2004). Trace elements in river waters. *Treatise on geochemistry: Surface and ground water , Weathering and Soils*, 225–272. <https://doi.org/10.1016/B0-08-043751-6/05165-3>
- Galap, C., Netchitaïlo, P., Leboulenger, F., & Grillot, J. P. (1999). Variations of fatty acid contents in selected tissues of the female dog cockle (*Glycymeris glycymeris* L., Mollusca, Bivalvia) during the annual cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 122(2), 241–254. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(99\)00006-9](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(99)00006-9)
- Galay-Burgos, M., Spurgeon, D. J., Weeks, J. M., Stürzenbaum, S. R., Morgan, A. J., & Kille, P. (2003). Developing a new method for soil pollution monitoring using molecular genetic biomarkers. *Biomarkers*, 8(4/3), 229–239. <https://doi.org/10.1080/354750031000138685>
- Gambonnet, J. (2016). Interactions “ biofilm-herbivores ” : influence de la qualité des ressources alimentaires sur l'état physiologique des herbivores. Mémoire d'étudiant, sciences de l'ingénieur, école d'ingénieurs de l'écologie, de l'énergie, du développement durable et de la mer. Dumas- 01841331, 34-43.
- Gardner, D., & Riley, J. P. (1972). The component fatty acids of the lipids of some species of marine and freshwater molluscs. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 52(4), 827–838. <https://doi.org/10.1017/S0025315400040571>
- Genter, R. B., & Lehman, R. M. (2000). Metal toxicity inferred from algal population density, heterotrophic substrate use, and fatty acid profile in a small stream. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(4 I), 869–878. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190413>
- Golding, L. A., Borgmann, U., & George Dixon, D. (2013). Cadmium bioavailability to *Hyalella azteca* from a periphyton diet compared to an artificial diet and application of a biokinetic model. *Aquatic Toxicology*, 126, 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.09.016>
- Gonçalves, S., Kahlert, M., Almeida, S. F. P., & Figueira, E. (2018). Assessing Cu impacts on freshwater diatoms: biochemical and metabolomic responses of *Tabellaria flocculosa* (Roth) Kützing. *Science of the Total Environment*, 625, 1234–1246. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.320>
- Gouvernement du Canada, Environnement Canada, Santé Canada (1994). Loi canadienne sur la protection de l'environnement. Liste des substances d'intérêt prioritaire, rapport d'évaluation. Le cadmium et ses composés. Ministère des Approvisionnements et Services Canada 1994 N°de catalogue En 40-215/40F, 5-23. ISBN 0-662-99805-7
- Grall, J., & Glemarec, M. (1997). Using biotic indices to estimate macrobenthic community perturbations in the bay of Brest. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 44(SUPPL. A), 43–53. [https://doi.org/10.1016/S0272-7714\(97\)80006-6](https://doi.org/10.1016/S0272-7714(97)80006-6)
- Greaves, G. N., Simkiss, K., Taylor, M., & Binsted, N. (1984). The local environment of metal sites in intracellular granules investigated by using X-ray-absorption spectroscopy. *The*

- Biochemical Journal, 221(3), 855–868. <https://doi.org/10.1042/bj2210855>
- Guanzon, G., Nakahara, H., & Yoshida, Y. (1994). Inhibitory effects of heavy metals on growth and photosynthesis of three freshwater microalgae. *Fisheries Science*, 60(4), 379–384.
- Guo, F., Bunn, S. E., Brett, M. T., Fry, B., Hager, H., Ouyang, X., & Kainz, M. J. (2018). Feeding strategies for the acquisition of high-quality food sources in stream macroinvertebrates: Collecting, integrating, and mixed feeding. *Limnology and Oceanography*, 63(5), 1964–1978. <https://doi.org/10.1002/lno.10818>
- Guo, F., Bunn, S. E., Brett, M. T., & Kainz, M. J. (2017). Polyunsaturated fatty acids in stream food webs – high dissimilarity among producers and consumers. *Freshwater Biology*, 62(8), 1325–1334. <https://doi.org/10.1111/fwb.12956>
- Guo, F., Kainz, M. J., Sheldon, F., & Bunn, S. E. (2015). Spatial variation in periphyton fatty acid composition in subtropical streams. *Freshwater Biology*, 60(7), 1411–1422. <https://doi.org/10.1111/fwb.12578>
- Guo, F., Kainz, M. J., Sheldon, F., & Bunn, S. E. (2016). The importance of high-quality algal food sources in stream food webs - current status and future perspectives. *Freshwater Biology*, 61(6), 815–831. <https://doi.org/10.1111/fwb.12755>
- Gust, M., Fortier, M., Garric, J., Fournier, M., & Gagné, F. (2013). Effects of short-term exposure to environmentally relevant concentrations of different pharmaceutical mixtures on the immune response of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Science of the Total Environment*, 445–446, 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.057>
- Habdija, I., Lajtner, J., & Belinić, I. (1995). The contribution of gastropod biomass in macrobenthic communities of a Karstic river. *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie Und Hydrographie*, 80(1), 103–110. <https://doi.org/10.1002/iroh.19950800113>
- Hare, L. (1992). Aquatic insects and trace metals: bioavailability, bioaccumulation, and toxicity, critical reviews. *Toxicology*, 22:5-6, 327-369, DOI: 10.3109/10408449209146312
- Hare, L., & Tessier, A. (1996). Predicting animal cadmium concentrations in lakes. *Nature*, 380(6573), 430–432. <https://doi.org/10.1038/380430a0>
- Hare, L., & Tessier, A. (1998). The aquatic insect *Chaoborus* as a biomonitor of trace metals in lakes. *Limnology and Oceanography*, 43(8), 1850–1859. <https://doi.org/10.4319/lo.1998.43.8.1850>
- Hixson, S. M., & Arts, M. T. (2016). Climate warming is predicted to reduce omega-3, long-chain, polyunsaturated fatty acid production in phytoplankton. *Global Change Biology*, 22(8), 2744–2755. <https://doi.org/10.1111/gcb.13295>
- Hobden, D. J. (1967). Iron metabolism in *Mytilus edulis* 1. Variation in total content and distribution. *Journal of the marine biological association of the United Kingdom*, 47(3), 597–606. <https://doi.org/10.1017/S0025315400035219>
- Hödl, E., Felder, E., Chabicovsky, M., & Dallinger, R. (2010). Cadmium stress stimulates tissue turnover in *Helix pomatia*: Increasing cell proliferation from metal tolerance to exhaustion in molluscan midgut gland. *Cell and Tissue Research*, 341(1), 159–171. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-0980-x>
- Hommen U, Knopf B, Rudel H, Schafers C, De Schamphelaere K, Schlekot C, Garman ER. (2016). A microcosm study to support aquatic risk assessment of Nickel: community-level effects and comparison with bioavailability-normalized species sensitivity distributions.

- Environmental Toxicology Chemistry 35:1172-1182. DOI: 10.1002/etc.3255.
- Honeyfield, D. C., & Maloney, K. O. (2015). Seasonal patterns in stream periphyton fatty acids and community benthic algal composition in six high-quality headwater streams. *Hydrobiologia*, 744(1), 35–47. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-2054-7>
- Huang, F., Peng, L., Zhang, J., Lin, W., & Chen, S. (2018). Cadmium bioaccumulation and antioxidant enzyme activity in hepatopancreas, kidney, and stomach of invasive apple snail *Pomacea canaliculata*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(19), 18682–18692. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2092-1>
- Ireland, M. P. (1981). Uptake and distribution of cadmium in the terrestrial slug *Arion ater* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, 68(1), 37–41. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(81\)90314-5](https://doi.org/10.1016/0300-9629(81)90314-5)
- Jin, X., Yang, X., Islam, E., Liu, D., & Mahmood, Q. (2008). Effects of cadmium on ultrastructure and antioxidative defense system in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator ecotypes of *Sedum alfredii* Hance. *Journal of Hazardous Materials*, 156(1–3), 387–397. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.12.064>
- Jomova, K., & Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2–3), 65–87. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.001>
- Kabeya, N., Fonseca, M. M., Ferrier, D. E. K., Navarro, J. C., Bay, L. K., Francis, D. S., Tocher, D.R, Castro, L.F-C.Monroig, Ó. (2018). Genes for de novo biosynthesis of omega-3 polyunsaturated fatty acids are widespread in animals. *Science Advances*, 4(5), 1–9. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aar6849>
- Kainz, M. J., Perga, M. E., Arts, M. T., & Mazumder, A. (2009). Essential fatty acid concentrations of different seston sizes and zooplankton: a field study of monomictic coastal lakes. *Journal of Plankton Research*, 31(6), 635–645. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbp015>
- Kelly, J. R., & Scheibling, R. E. (2012). Fatty acids as dietary tracers in benthic food webs. *Marine Ecology Progress Series*, 446, 1–22. <https://doi.org/10.3354/meps09559>
- Kim Tiam, S., Feurtet-Mazel, A., Delmas, F., Mazzella, N., Morin, S., Daffe, G., & Gonzalez, P. (2012). Development of q-PCR approaches to assess water quality: Effects of cadmium on gene expression of the diatom *Eolimna minima*. *Water Research*, 46(4), 934–942. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.005>
- Kimberly, D. A., & Salice, C. J. (2014). If you could turn back time: Understanding transgenerational latent effects of developmental exposure to contaminants. *Environmental Pollution*, 184, 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.09.018>
- Lambert, A. S., Dabrin, A., Foulquier, A., Morin, S., Rosy, C., Coquery, M., & Pesce, S. (2017). Influence of temperature in pollution-induced community tolerance approaches used to assess effects of copper on freshwater phototrophic periphyton. *Science of the Total Environment*, 607–608, 1018–1025. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.035>
- Lamberti, G.A., and Resh, V. H.. (1983). Stream periphyton and insect herbivores: an experimental study of grazing by a caddisfly population. *Ecology*, 64:1124-1135  
doi:10.2307/1937823
- Lane, T. W., & Morel, F. M. M. (2000). A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), 4627-4631. doi:10.1073/pnas.090091397.

- Lang, I., Hodac, L., Friedl, T., Feussner, I. (2011) Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC Plant Biology* 11, 124. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-124>
- Lange, K., Liess, A., Piggott, J. J., Townsend, C. R., & Matthaei, C. D. (2011). Light, nutrients and grazing interact to determine stream diatom community composition and functional group structure. *Freshwater Biology*, 56(2), 264–278. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2010.02492.x>
- Lavoie, I., Campeau, S., Grenier, M., & Dillon, P. J. (2006). A diatom-based index for the biological assessment of eastern Canadian rivers: An application of correspondence analysis (CA). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 63(8), 1793–1811. <https://doi.org/10.1139/F06-084>
- Lavoie, I., Campeau, S., Zugic-Drakulic, N., Winter, J. G., & Fortin, C. (2014). Using diatoms to monitor stream biological integrity in Eastern Canada: An overview of 10 years of index development and ongoing challenges. *Science of the Total Environment*, 475, 187–200. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.092>
- Lavoie, I., Lavoie, M., & Fortin, C. (2012). A mine of information : Benthic algal communities as biomonitors of metal contamination from abandoned tailings. *Science of the Total Environment*, 425, 231–241. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.057>
- Lavoie, I., Morin, S., Laderriere, V., & Fortin, C. (2018). Freshwater diatoms as indicators of combined long-term mining and urban stressors in junction creek (Ontario, Canada). *Environments - MDPI*, 5(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/environments5020030>
- Lavoie, M., Campbell, P. G. C., & Fortin, C. (2012). Extending the biotic ligand model to account for positive and negative feedback interactions between cadmium and zinc in a freshwater alga. *Environmental Science and Technology*, 46(21), 12129–12136. <https://doi.org/10.1021/es302512r>
- Lavoie, M., Campbell, P. G. C., & Fortin, C. (2014). Predicting cadmium accumulation and toxicity in a green alga in the presence of varying essential element concentrations using a biotic ligand model. *Environmental Science and Technology*, 48(2), 1222–1229. <https://doi.org/10.1021/es402630z>
- Lavoie, M., Le Faucheur, S., Fortin, C., & Campbell, P. G. C. (2009). Cadmium detoxification strategies in two phytoplankton species: Metal binding by newly synthesized thiolated peptides and metal sequestration in granules. *Aquatic Toxicology*, 92(2), 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.12.007>
- Le Faucheur, S., Behra, R., & Sigg, L. (2005). Phytochelatin induction, cadmium accumulation, and algal sensitivity to free cadmium ion in *Scenedesmus vacuolatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(7), 1731–1737. <https://doi.org/10.1897/04-394R.1>
- Leguay, S., Lavoie, I., Levy, J. L., & Fortin, C. (2016). Using biofilms for monitoring metal contamination in lotic ecosystems: The protective effects of hardness and pH on metal bioaccumulation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(6), 1489–1501. <https://doi.org/10.1002/etc.3292>
- Leung, K. M. Y., Ibrahim, H., Dewhurst, R. E., Morley, N. J., Crane, M., & Lewis, J. W. (2003). Concentrations of metallothionein-like proteins and heavy metals in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* exposed to different levels of waterborne cadmium. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 71(5), 1084–1090. <https://doi.org/10.1007/s00128-003-8856-3>

- Li, Y., Yang, H., Liu, N., Luo, J., Wang, Q., & Wang, L. (2015). Cadmium accumulation and metallothionein biosynthesis in cadmium-treated freshwater mussel *Anodonta woodiana*. *PLoS ONE*, 10(2), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117037>
- Li, M., Xia, T., Jiang, C. S., Li, L. J., Fu, J. L., & Zhou, Z. C. (2003). Cadmium directly induced the opening of membrane permeability pore of mitochondria which possibly involved in cadmium-triggered apoptosis. *Toxicology*, 194(1–2), 19–33. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00327-5](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00327-5)
- Liess, A., & Hillebrand, H. (2004). Invited review: Direct and indirect effects in herbivore - Periphyton interactions. *Archiv Fur Hydrobiologie*, 159(4), 433–453. <https://doi.org/10.1127/0003-9136/2004/0159-0433>
- Livak, K.J., & Schmittgen T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.
- Lopez-Doval, J.C., Poquet, M., & Munoz, I., (2014). Sublethal effects of the herbicide diuron on the freshwater snail *Physella acuta*. *Limnetica*, 33(1): 205-215.
- Lukowiak, K., Ringseis, E., Spencer, G., Wildering, W., & Syed, N. (1996). Operant conditioning of aerial respiratory behaviour in *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Experimental Biology*, 199(3), 683–691.
- Marigómez, J.A., Cajaraville, M.P. & Angulo, E. (1990). Cellular cadmium distribution in the common winkle, *Littorina littorea* (L.) determined by X-ray microprobe analysis and histochemistry. *Histochemistry* 94, 191–199. <https://doi.org/10.1007/BF02440187>
- Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M. P., Angulo, E., & Giamberini, L. (2002). Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microscopy Research and Technique*, 56(5), 358–392. <https://doi.org/10.1002/jemt.10040>
- Mason, A. Z., & Nott, J. A. (1981). The role of intracellular biomineralized granules in the regulation and detoxification of metals in gastropods with special reference to the marine prosobranch *Littorina littorea*. *Aquatic Toxicology*, 1(3–4), 239–256. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(81\)90018-7](https://doi.org/10.1016/0166-445X(81)90018-7)
- Mayer, M., and Likens, G. (1987). The importance of algae in a shaded headwater stream as food for an abundant caddisfly (Trichoptera). *Journal of the North American Benthological Society*, 6(4), 262-269. doi:10.2307/1467313
- McCollum, E. W., Crowder, L. B., & Andy McCollum, S. (1998). Complex interactions of fish, snails, and littoral zone periphyton. *Ecology*, 79(6), 1980–1994. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1998\)079\[1980:CIOFSA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(1998)079[1980:CIOFSA]2.0.CO;2)
- McCormick, P. V., & Stevenson, R. J. (1991). Grazer control of nutrient availability in the periphyton. *Oecologia*, 86(2), 287–291. <https://doi.org/10.1007/BF00317542>
- Milinsk, M. C., Das Graças Padre, R., Hayashi, C., de Oliveira, C. C., Visentainer, J. V., de Souza, N. E., & Matsushita, M. (2006). Effects of feed protein and lipid contents on fatty acid profile of snail (*Helix aspersa maxima*) meat. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(2–3), 212–216. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.09.011>
- Monroig, Ó., & Kabeya, N. (2018). Desaturases and elongases involved in polyunsaturated fatty acid biosynthesis in aquatic invertebrates: a comprehensive review. *Fisheries Science*, 84(6), 911–928. <https://doi.org/10.1007/s12562-018-1254-x>
- Monroig, Ó., Tocher, D. R., & Navarro, J. C. (2013). Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids

- in marine invertebrates: Recent advances in molecular mechanisms. *Marine Drugs*, 11(10), 3998–4018. <https://doi.org/10.3390/md11103998>
- Morin, S., Duong, T. T., Dabrin, A., Coynel, A., Herlory, O., Baudrimont, M., Delmas, F., Durrieu, G., Schäfer, J., Winterton, P., Coste, M. (2008a). Long-term survey of heavy-metal pollution, biofilm contamination and diatom community structure in the Riou Mort watershed, south-west France. *Environmental Pollution*, 151(3), 532–542. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.04.023>
- Morin, Soizic, Duong, T. T., Herlory, O., Feurtet-Mazel, A., & Coste, M. (2008b). Cadmium toxicity and bioaccumulation in freshwater biofilms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54(2), 173–186. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9022-4>
- Munger, C., & Hare, L. (1997). Relative importance of water and food as cadmium sources to an aquatic insect (*Chaoborus punctipennis*): Implications for predicting Cd bioaccumulation in nature. *Environmental Science and Technology*, 31(3), 891–895. <https://doi.org/10.1021/es9606440>
- Niyogi S, Brix KV, Grosell M. (2014). Effects of chronic waterborne nickel exposure on growth, ion homeostasis, acid-base balance, and nickel uptake in the freshwater pulmonate snail, *Lymnaea stagnalis*. *Aquatic Toxicology*, 150: 36-44. DOI:10.1016/j.aquatox.2014.02.012.
- Ng, T. Y. T., Amiard-Triquet, C., Rainbow, P. S., Amiard, J. C., & Wang, W. X. (2005). Physico-chemical form of trace metals accumulated by phytoplankton and their assimilation by filter-feeding invertebrates. *Marine Ecology Progress Series*, 299(October 2015), 179–191. <https://doi.org/10.3354/meps299179>
- Ng, T. Y. T., Rainbow, P. S., Amiard-Triquet, C., Amiard, J. C., & Wang, W. X. (2007). Metallothionein turnover, cytosolic distribution and the uptake of Cd by the green mussel *Perna viridis*. *Aquatic Toxicology*, 84(2 SPEC. ISS.), 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.01.010>
- Nott, J. A., & Langston, W. J. (1989). Cadmium and the phosphate granules in *Littorina littorea*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 69(1), 219–227. <https://doi.org/10.1017/S0025315400049195>
- Nováková, M., Matějova, E., & Sofrová, D. (2004). Cd<sup>2+</sup> effect on photosynthetic apparatus in *Synechococcus elongatus* and spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Photosynthetica*, 42(3), 425–430. <https://doi.org/10.1023/B:PHOT.0000046162.87918.98>
- Office québécois de la langue française.  
[http://gdt.oqlf.gouv.qc.ca/ficheOqlf.aspx?Id\\_Fiche=26521016](http://gdt.oqlf.gouv.qc.ca/ficheOqlf.aspx?Id_Fiche=26521016) (Consulté le 03 novembre 2020) et [http://gdt.oqlf.gouv.qc.ca/ficheOqlf.aspx?Id\\_Fiche=26539060](http://gdt.oqlf.gouv.qc.ca/ficheOqlf.aspx?Id_Fiche=26539060) (Consulté le 04 novembre).
- Olofsson, M., Lamela, T., Nilsson, E., Bergé, J. P., del Pino, V., Uronen, P., & Legrand, C. (2012). Seasonal variation of lipids and fatty acids of the microalgae *Nannochloropsis oculata* grown in outdoor large-scale photobioreactors. *Energies*, 5(5), 1577–1592. <https://doi.org/10.3390/en5051577>
- Ouzounidou, G., Moustakas, M., & Eleftheriou, E. P. (1997). Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 32(2), 154–160. <https://doi.org/10.1007/s002449900168>
- Overnell, J. (1975). The effect of some heavy metal ions on photosynthesis in a freshwater alga. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 5 19-26.
- Overnell, J. (1976). Inhibition of marine algal photosynthesis by heavy metals. *Marine Biology*,

38(4), 335–342. <https://doi.org/10.1007/BF00391373>

- Pais, N. (2012). Studies on waterborne cadmium exposure to *Lymnaea stagnalis* in varying water qualities and the development of a novel tissue residue approach. Thèse de doctorat, Wilfrid Laurier University, 15-66. Retrieved from <http://scholars.wlu.ca/etd/837/>
- Pinto, E., Carvalho, A. P., Cardozo, K. H. M., Malcata, F. X., dos Anjos, F. M., & Colepicolo, P. (2011). Effects of heavy metals and light levels on the biosynthesis of carotenoids and fatty acids in the macroalgae *Gracilaria tenuistipitata* (var. *liui* Zhang & Xia). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 21(2), 349–354. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000060>
- Pinto, E., Sigaud-Kutner, T. C. S., Leitão, M. A. S., Okamoto, O. K., Morse, D., & Colepicolo, P. (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology*, 39(6), 1008–1018. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.2003.02-193.x>
- Peltomaa, E.T., Aalto, S.L., Vuorio, K.M., Taipale, S.J., (2017). The importance of phytoplankton biomolecule availability for secondary production. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 5-128. doi:10.3389/fevo.2017.00128
- Prygiel, J., Coste, M., & Bukowska, J. (1996). Les diatomées et les indices diatomiques dans les réseaux de mesure de la qualité des cours d'eau français : Historique et avenir. *Bulletin Francais de La pêche et de la pisciculture*, (341–342), 65–79. <https://doi.org/10.1051/kmae :1996006>
- Purroy, A., Najdek, M., Isla, E., Župan, I., Thébault, J., & Peharda, M. (2018). Bivalve trophic ecology in the Mediterranean: Spatio-temporal variations and feeding behavior. *Marine Environmental Research*, (July), 234–249. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.10.011>
- Rainbow, P. S., Luoma, S. N., & Wang, W. X. (2011). Trophically available metal - A variable feast. *Environmental Pollution*, 159(10), 2347–2349. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.06.040>
- Reátegui-Zirena, E. G., French, A. D., Klein, D. M., & Salice, C. J. (2017). Cadmium compartmentalization in the pulmonate snail *Lymnaea stagnalis*: Improving our understanding of exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 72(4), 575–585. <https://doi.org/10.1007/s00244-017-0407-8>
- Reinfelder, J., & Fisher, N. (1991). The assimilation of elements ingested by marine copepods. *Science*, 251(4995), 794-796. Retrieved November 4, 2020, from <http://www.jstor.org/stable/2875179>
- Rikans, L. E., & Yamano, T. (2000). Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 14(2), 110–117. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0461\(2000\)14:2<110::AID-JBT7>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0461(2000)14:2<110::AID-JBT7>3.0.CO;2-J)
- Roeselers, G., Van Loosdrecht, M.C.M., Muyzer, G. (2008). Phototrophic biofilms and their potential applications. *Journal of Applied Phycology*, 20:227–235. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9223-2>
- Roesijadi, G., & Unger, M. E. (1993). Cadmium uptake in gills of the mollusc *Crassostrea virginica* and inhibition by calcium channel blockers. *Aquatic Toxicology*, 24(3–4), 195–205. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(93\)90071-8](https://doi.org/10.1016/0166-445X(93)90071-8)
- Romani, A.M., Sabater, S. (2001). Structure and activity of rock and sand biofilms in a Mediterranean stream. *Ecology* 82:3232–3245
- Roméo, M., Gharbi-Bouraoui, S., Gnassia-Barelli, M., Dellali, M., & Aïssa, P. (2006). Responses of *Hexaplex (Murex) trunculus* to selected pollutants. *Science of the Total Environment*,

- 359(1–3), 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.09.071>
- Schmitz, G., Ecker, J. (2008). The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 47:147–55. doi: 10.1016/j.plipres.2007.12.004.
- Shuhaimi-Othman, M., Nur-Amalina, R., & Nadzifah, Y. (2012). Toxicity of metals to a freshwater snail, *Melanoides tuberculata*. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–10. doi:10.1100/2012/125785
- Sies, B. H. (1986). *Biochemistry of oxydative stress* (Vol. 25). International edition in english 25,1058-1071
- Sidwell, V. D., James, C., Zook, E. G., & Bonnet, J. C. (1973). Chemical and nutritive values of several fresh and canned finfish, crustaceans, and mollusks part I : Proximate composition, calcium, and phosphorus. *Marine Fisheries Review*, 35(12), 16–19. Retrieved from <http://spo.nmfs.noaa.gov/mfr3512/mfr35124.pdf>
- Silina, A. V., & Zhukova, N. V. (2007). Growth variability and feeding of scallop *Patinopecten yessoensis* on different bottom sediments: Evidence from fatty acid analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 348(1–2), 46–59. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2007.03.018>
- Sinclair, A.J., Attar-Bashi, N.M., Li, D. (2002). What is the role of  $\alpha$ -linolenic acid for mammals? *Lipids*, 37(12):1113–1123.
- Simon, D. F., Davis, T. A., Tercier-Waeber, M-L, England, R., & Wilkinson, K. J. (2011). In situ evaluation of cadmium biomarkers in green algae. *Environmental Pollution*, 159(10), 2630–2636. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.05.028>
- Sokolova, I. M., & Lannig, G. (2008). Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: Implications of global climate change. *Climate Research*, 37(2–3), 181–201. <https://doi.org/10.3354/cr00764>
- Sminia, T., Van der Knaap, W.P.M., Kroese, F.G.M. (1979). Fixed phagocytes in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Cell Tissue Research*, 196:545–548.
- Swamikannu, X., & Hoagland, K. D. (1989). Effects of snail grazing on the diversity and structure of a periphyton community in a eutrophic pond. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46(10), 1698–1704. <https://doi.org/10.1139/f89-215>
- Tang, Y., Tian, J., Li, S., Xue, C., Xue, Z., Yin, D., & Yu, S. (2015). Combined effects of graphene oxide and Cd on the photosynthetic capacity and survival of *Microcystis aeruginosa*. *Science of the Total Environment*, 532, 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.081>
- Taipale, S., Strandberg, U., Peltomaa, E., Galloway, A. W. E., Ojala, A., & Brett, M. T. (2013). Fatty acid composition as biomarkers of freshwater microalgae: Analysis of 37 strains of microalgae in 22 genera and in seven classes. *Aquatic Microbial Ecology*, 71(2), 165–178. <https://doi.org/10.3354/ame01671>
- Taylor, G., Baird, D. J., & Soares, A. M. V. M. (1998). Surface binding of contaminants by algae: Consequences for lethal toxicity and feeding to *Daphnia magna* straus. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(3), 412–419. [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(1998\)017<0412:SBOCBA>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(1998)017<0412:SBOCBA>2.3.CO;2)
- Theodoulou, F. L., & Kerr, I. D. (2015). ABC transporter research : Going strong 40 years on. *Biochemical Society Transactions*, 43(October), 1033–1040. <https://doi.org/10.1042/BST20150139>

- Thévenod, F., Friedmann, J. M., Katsen, A. D., & Hauser, I. A. (2000). Up-regulation of multidrug resistance P-glycoprotein via nuclear factor- $\kappa$ B activation protects kidney proximal tubule cells from cadmium- and reactive oxygen species-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(3), 1887–1896. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.3.1887>
- Tissier, C., Morvan, C., Bocquené, G., Gossel, H., James, A., Marchand, M. (2005). Les substances prioritaires de la directive cadre sur l'eau (DCE). Fiche de synthèse. IFREMER.
- Tlili, A., Marechal, M., Montuelle, B., Volat, B., Dorigo, U., & Bérard, A. (2011). Use of the MicroResp™ method to assess pollution-induced community tolerance to metals for lotic biofilms. *Environmental Pollution*, 159(1), 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.09.033>
- Tocher, D. R. (2003). Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11(2), 107–184. doi:10.1080/713610925
- Torres-Ruiz, M., Wehr, J. D., & Perrone, A. A. (2007). Trophic relations in a stream food web: importance of fatty acids for macroinvertebrate consumers. *Journal of the North American Benthological Society*, 26(3), 509–522. <https://doi.org/10.1899/06-070.1>
- Tůmová, E., Sofrová, D. (2002). Response of intact cyanobacterial cells and their photosynthetic apparatus to Cd<sup>2+</sup> ion treatment. *Photosynthetica* 40, 103–108. <https://doi.org/10.1023/A:1020112403728>
- Vadeboncoeur, Y., & Power, M. E. (2017). Attached algae: The cryptic base of inverted trophic pyramids in freshwaters. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 48(1), 255–279. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-121415-032340>
- Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161–1208. <https://doi.org/10.2174/0929867053764635>
- Van Hoey, G., Borja, A., Birchenough, S., Buhl-Mortensen, L., Degraer, S., Fleischer, D., Kerckhof, F., Magni, P., Muxika, I., Reiss, H., Schröder, A., Zettler, M. L. (2010). The use of benthic indicators in Europe: From the water framework directive to the marine strategy framework directive. *Marine Pollution Bulletin*, 60(12), 2187–2196. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.09.015>
- Verrengia Guerrero, N. R., Nahabedian, D. E., & Wider, E. A. (2000). Analysis of some factors that may modify the bioavailability of cadmium and lead by *Biomphalaria glabrata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(11), 2762. [https://doi.org/10.1897/15515028\(2000\)019<2762:aosftm>2.0.co;2](https://doi.org/10.1897/15515028(2000)019<2762:aosftm>2.0.co;2)
- Viarengo, A., & 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. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(93\)90001-2](https://doi.org/10.1016/0742-8413(93)90001-2)
- Walker, C., Sibly, R., Sibly, R., Peakall, D. (2012). Principles of ecotoxicology. Boca Raton : CRC Press, <https://doi.org/10.1201/b11767>
- Walker, G. (1972). The digestive system of the slug, *Agriolimax reticulatus* (müller): Experiments on phagocytosis and nutrient absorption. *Journal of Molluscan Studies*, 40(1), 33–43. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.mollus.a065204>
- Wallace, W. G., & Luoma, S. N. (2003). Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. *Marine Ecology Progress Series*, 257, 125–137. Retrieved from [http://www.camnl.wr.usgs.gov/tracel/references/pdf/MarEcolProgSer\\_v257p125.pdf](http://www.camnl.wr.usgs.gov/tracel/references/pdf/MarEcolProgSer_v257p125.pdf)
- Wallace, W.G., Lee, B.G., Luoma, S.N. (2003). Subcellular compartmentalization of Cd and Zn

- in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Marine Ecology Progress Series* 249, 183e197.
- Wang, A., Crowley, D.E., (2005). Global Gene Expression Responses to Cadmium Toxicity in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 187 (9) 3259-3266; DOI: 10.1128/JB.187.9.3259-3266.2005
- Wang, W. X., & Ke, C. (2002). Dominance of dietary intake of cadmium and zinc by two marine predatory gastropods. *Aquatic Toxicology*, 56(3), 153–165. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(01\)00205-3](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00205-3)
- Wang, Y., Fang, J., Leonard, S. S., & Rao, K. M. K. (2004). Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(11), 1434–1443. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.03.010>
- Whalen, K. E., Sotka, E. E., Goldstone, J. V., & Hahn, M. E. (2010). The role of multixenobiotic transporters in predatory marine molluscs as counter-defense mechanisms against dietary allelochemicals. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 152(3), 288–300. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.05.003>
- Wier, C. F., & Walter, W. M. (1976). Toxicity of cadmium in the freshwater snail, *Physa gyrina* Say. *Journal of Environmental Quality*, 5(4), 359–362. <https://doi.org/10.2134/jeq1976.00472425000500040004x>
- Zhukova, N. V. (2019). Fatty acids of marine mollusks: Impact of diet, bacterial symbiosis and biosynthetic potential. *Biomolecules*, 9(12), 1–25. <https://doi.org/10.3390/biom9120857>



